

Charakterisierung des mitochondrialen Teilungsproteins
Dnm1p mittels quantitativer hochauflösender
Lichtmikroskopie

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Astrid Claudia Schauß
aus
Wetzlar

Würzburg
2006

Eingereicht am: 20.01.2006

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Stefan W. Hell

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 21.03.2006

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung gemäß § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Ich erkläre hiermit, dass ich neben dem Diplom in Biologie keine weiteren akademischen Grade erworben habe oder versucht habe zu erwerben.

Würzburg, den 19.01.2006

(Astrid Claudia Schauß)

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Mitochondrien verändern dynamisch durch ein balanciertes Verhältnis von Teilung und Fusion die Gestalt ihrer Netzwerke und reagieren so auf interne und externe Signale. Ein Schlüsselprotein der mitochondrialen Teilung ist die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1p, die in dieser Arbeit charakterisiert wurde.

Da Mitochondrien aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs zwei Membranen besitzen, erfordert deren Teilung eine besondere Koordination. Unter Verwendung von photokonvertierbarem GFP wird in dieser Arbeit gezeigt, dass in *S. cerevisiae* die Teilung der inneren und äußeren Membran zeitlich eng gekoppelt verläuft. Dieser Prozess wird durch die GTPase Dnm1p, aber auch durch die Adaptor-Proteine Mdv1p und Caf4p sowie den integralen Membrananker Fis1p vermittelt. Dnm1p lagert sich zu Spiralen um die tubulären Stränge an und trennt GTP-abhängig die Mitochondrien voneinander. Eine Voraussetzung für die Anlagerung dieser Spiralen stellen wahrscheinlich Matrix-Konstriktionen dar. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Dnm1p und auch Fis1p für die Ausbildung dieser mitochondrialen Einschnürungen nicht essentiell sind.

Die Untersuchung der Verteilung, Orientierung und Größe der Epitop-markierten Dnm1p-Cluster in Hefezellen bildet den Schwerpunkt der Arbeit. Weiterhin wird der Einfluss der Teilungsproteine Fis1p, Mdv1p und Caf4p auf diese Dnm1p-Charakteristika ermittelt. Die Analyse basiert auf quantitativen Konfokalmikroskopie-Aufnahmen, zusätzlich werden auch neue hochauflösende Lichtmikroskope (4Pi und STED) zur genauen Lokalisation und Größenbestimmung eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass im Wildtyp und in $\Delta mdv1$ -Zellen die Mehrheit der Cluster mit den Mitochondrien assoziiert ist, während in $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen die Rekrutierung der Cluster zu den Mitochondrien gestört erscheint. Nur wenige Cluster bilden Spiralen um Matrix-Konstriktionen aus, die überwiegende Mehrheit der nicht an aktuellen Teilungsprozessen beteiligten Dnm1p-Aggregate weist dagegen im Wildtyp und in $\Delta mdv1$ -Zellen eine polare Orientierung Richtung Zellcortex auf. Die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschriebene Polarität ist in $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen aufgehoben, bleibt jedoch auch nach der Zerstörung des Aktin-Gerüsts aufrechterhalten.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass Dnm1p in einem Komplex mit Fis1p und Caf4p zusätzlich zu seiner Funktion als Teilungsprotein an der Anheftung der Mitochondrien an den Zellcortex beteiligt ist. Zudem scheinen die Adaptorproteine Mdv1p und Caf4p trotz ihrer molekularen Ähnlichkeit unterschiedliche Aufgaben in der Zelle zu erfüllen.

Summary

Mitochondrial networks dynamically change their shape by balanced fission and fusion in response to internal and external signals. The key protein in mitochondrial fission, the dynamin-related GTPase Dnm1p, is characterised in this study.

Because of their endosymbiotic origin mitochondria possess two membranes, whose separations must be coordinated. Using photoconvertible GFP, it is shown that the division of outer and inner membranes are tightly coupled in *S. cerevisiae*. This separation is due to the GTPase Dnm1p, but the adaptor proteins Mdv1p and Caf4p, as well as the membrane anchor Fis1p, are also involved in mitochondrial division in yeast. Dnm1p forms spirals around the mitochondrial tubes and separates them in a GTPase-dependant manner. Matrix constrictions are presumably one precondition for the formation of spirals. In this work it is shown that Dnm1p as well as Fis1p are not essential for the formation for this mitochondrial narrowing.

The main focus of the work is the analysis of the distribution, orientation and size of the epitope-tagged Dnm1p clusters in yeast cells. Additionally, the influence of the other division proteins, Fis1p, Mdv1p and Caf4p, on these Dnm1p characteristics is determined. The analysis is based on both quantitative confocal images and high resolution 4Pi and STED microscopy, for better localization and determination of the cluster sizes. The results demonstrate that in wild type and $\Delta mdv1$ cells, the majority of clusters are associated with mitochondria, whereas the recruitment of Dnm1p-clusters is disturbed in $\Delta fis1$ and $\Delta caf4$ cells. While just a few clusters form spirals around matrix constrictions, the overwhelming majority of clusters, which are not involved in an actual fission process, show a polar orientation towards the cell cortex in wild type and $\Delta mdv1$ cells. This polarity, described for the first time in this work, is abolished in $\Delta fis1$ and $\Delta caf4$ cells, but is maintained after the destruction of the actin cytoskeleton.

The results of this work point to an additional role of Dnm1p, together with Fis1p and Caf4p, in the attachment of mitochondria to the cell cortex. Furthermore it is shown that the adaptor proteins Mdv1p and Caf4p have different roles within the cell despite of their molecular similarity.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	MORPHOLOGIE DER MITOCHONDRIEN	1
1.2	MITOCHONDRIEN UND DAS ZYTOSKELETT	3
1.3	FUNKTION DER MITOCHONDRIEN	5
1.3.1	Rolle im Energiestoffwechsel	5
1.3.2	Bedeutung der Mitochondrien in der Apoptose	6
1.4	DER MITOCHONDRIALE TEILUNGS- UND FUSIONSAPPARAT	8
1.4.1	Die Bäckerhefe als Modellorganismus	8
1.4.2	Überblick über den mitochondrialen Fusionsapparat	10
1.4.3	Aufbau und Funktion des mitochondrialen Teilungsapparates	12
1.4.3.1	Die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1p	13
1.4.3.2	Der integrale Membrananker Fis1p	14
1.4.3.3	Die molekularen Adaptorproteine Mdv1p und Caf4p	15
1.4.3.4	Modelle der mitochondrialen Teilung in Hefe	16
1.5	ZIELSETZUNG	17
2	MATERIAL	19
2.1	BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME	19
2.2	OLIGONUKLEOTIDE	20
2.3	PLASMIDE UND VEKTOREN	21
2.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	21
2.5	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	22
2.6	MEDIEN UND AGARPLATTEN	24
2.6.1	Vollmedium für <i>S. cerevisiae</i>	24
2.6.2	Vollmedium für <i>E. coli</i>	24
2.6.3	Mangelmedium für <i>S. cerevisiae</i>	25
2.6.4	Sporulationsplatten	25
2.6.5	“Drop-out“-Mischung	26
2.6.6	Antibiotika-Zusätze	26
2.7	GERÄTE	27
3	METHODEN	28
3.1	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	28
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis <i>et al.</i> , 1986)	28
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	29
3.1.3	Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	29
3.1.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
3.1.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	30
3.1.6	Ligation mit der T4-Ligase	31

3.1.7	Horizontale Gelelektrophorese.....	31
3.1.8	Klonierung der verwendeten Fluoreszenzmarker.....	31
3.1.8.1	pAS43-OM45p-GFP.....	31
3.1.8.2	pSJ55-mtDsRed.....	32
3.1.8.3	pYX222-mtDsRed.....	32
3.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	33
3.2.1	Mitochondrienreinigung aus Hefe (Daum, 1982).....	33
3.2.1.1	Vorbereitung der Zellen.....	33
3.2.1.2	Spheroplastieren der Zellen.....	33
3.2.1.3	Isolierung der Mitochondrien.....	33
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford MM, 1976).....	34
3.2.3	Biochemische Analyse der Proteinlokalisierung in Mitochondrien.....	34
3.2.4	Western-Blot-Analyse.....	36
3.2.4.1	SDS-Page.....	36
3.2.4.2	Proteintransfer (Blotting).....	36
3.2.4.3	Antikörper Detektion.....	37
3.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	38
3.3.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	38
3.3.1.1	Elektrokompetente DH5 α	38
3.3.1.2	Chemisch-kompetente Hefen.....	38
3.3.1.3	Elektrokompetente Hefen.....	38
3.3.2	Elektroporation.....	39
3.3.3	Epitop-Markierung in Hefe.....	40
3.3.4	Kreuzung von Hefestämmen.....	40
3.3.4.1	Sporulation.....	41
3.3.5	Tetradenanalyse.....	41
3.3.6	Halo-Assay.....	41
3.3.7	Mikroskopische Probenvorbereitung.....	42
3.3.7.1	Einbettung von lebenden Hefezellen.....	42
3.3.7.2	Fixierung der Hefezellen in Formaldehyd.....	42
3.3.7.3	Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit Latrunculin A.....	42
3.3.7.4	Immobilisierung von Hefezellen mit Polylysin.....	43
3.3.8	Photokonversion von GFP in Hefemitochondrien.....	44
3.3.8.1	Glukose-Oxidase/Katalase-System.....	44
3.3.8.2	Myxothiazol.....	44
3.4	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	45
3.4.1	Einstellungen des konfokalen Laserraster- Mikroskops.....	45
3.4.2	Bildbearbeitung der 3D-Rohdatenstapel.....	45
3.4.3	Programm zur Lokalisierung der Dnm1p-GFP Cluster.....	46
3.4.4	Erstellung der 3D-Masken zur Bestimmung des zytosolischen Dnm1p-GFP Pools.....	47
3.4.5	Analyse von Matrix-Konstriktionen und Dnm1p-Spiralen.....	48
3.4.6	Bestimmung der Orientierung von Dnm1p-GFP Clustern innerhalb der Zelle.....	48
3.4.6.1	Kalkulation der Verteilung von gleichmäßig innen und außen orientierten Clustern.....	49
3.4.6.2	Simulation der Verteilung von gleichmäßig innen, außen und seitlich orientierten Clustern.....	49
4	MIKROSKOPE.....	51
4.1	KONFOKALES LASERRASTER-MIKROSKOP.....	51
4.2	DAS 4Pi-MIKROSKOP.....	52
4.2.1	Prinzip der 4Pi-Mikroskopie.....	52
4.2.2	Aufbau des 4Pi-Mikroskops.....	54
4.2.3	Justierung des 4Pi-Mikroskops.....	55
4.2.4	Mikroskop-Einstellungen und Bildbearbeitung.....	55
4.2.5	4Pi-Aufnahmen von Hefe-Mitochondrien.....	56

4.3	STED-MIKROSKOP	58
4.3.1	Prinzip der STED-Mikroskopie.....	58
4.3.2	Aufbau des STED-Mikroskops	59
4.3.3	Bestimmung der Auflösungsgrenze des STED-Mikroskops für GFP	59
5	ERGEBNISSE	63
5.1	DIE INNERE UND ÄUßERE MEMBRAN BLEIBT BEI MATRIX-KONSTRIKTIONEN KONTINUIERLICH....	63
5.1.1	Herstellung der verwendeten Fluoreszenzmarker Om45p-GFP und mtDsRed.....	64
5.1.2	Matrix-Konstriktionen treten unabhängig vom Teilungsprotein Fis1p auf.....	66
5.2	DIE PHOTOKONVERSION VON GFP EIGNET SICH FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER MITOCHONDRIALEN NETZWERKE IN HEFE	68
5.2.1	Die Photokonversion von GFP ist abhängig von einer geringen Sauerstoff-Konzentration .	68
5.2.2	Die photokonvertierte rote GFP-Fluoreszenz ist stabil und unschädlich für die Zellen.....	70
5.2.3	Die mitochondriale Matrix von Wildtyp-Zellen bildet ein Kontinuum.....	71
5.2.4	In $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ -Zellen treten Matrix-Konstriktionen auf.....	72
5.3	DIE GRÖßE UND VERTEILUNG DER DNM1P-CLUSTER IST VON FIS1P, CAF4P UND MDV1P ABHÄNGIG.....	74
5.3.1	Herstellung des Fusionsproteins Dnm1p-GFP durch Epitop-Markierung	74
5.3.2	Einkreuzen des Dnm1p-GFP Fusionsproteins in die Deletionsstämme $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$ mit Hilfe der Tetradenanalyse.....	76
5.3.3	Probenpräparation und konfokale Mikroskopie-Aufnahmen	78
5.3.4	Datenerfassung (Überblick)	78
5.3.5	Die Deletionen von <i>MDV1</i> , <i>FIS1</i> und <i>CAF4</i> haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Helligkeit und Verteilung der Dnm1p-Cluster	79
5.3.5.1	Kalibrierung der Fluoreszenz-Intensität.....	79
5.3.5.2	Die Helligkeit und Verteilung der Dnm1p-GFP Cluster variiert in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen	80
5.3.6	Die Bestimmung der Größen der Dnm1p-GFP Cluster mit Hilfe der STED-Mikroskopie... 82	82
5.4	DIE GRÖßE DES ZYTOSOLISCHEN DNM1P-POOLS IST ABHÄNGIG VON DEN TEILUNGSPROTEINEN MDV1P, FIS1P UND CAF4P	85
5.5	UNTERSUCHUNGEN VON DNM1P-SPIRALEN	88
5.5.1	Dnm1p-GFP Spiralen werden über Matrix-Konstriktionen definiert.....	89
5.5.2	Spiralen weisen meist eine bis sieben Windungen auf.....	90
5.5.3	In $\Delta caf4$ -Zellen treten häufiger Dnm1p-GFP Spiralen auf als im wt.....	91
5.6	DIE DNM1P-CLUSTER SIND POLAR ORIENTIERT	92
5.6.1	Die polare Orientierung der Dnm1p-Cluster wird in $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen aufgehoben, ist aber unabhängig von Mdv1p	93
5.6.2	Auch die seitlich orientierten Cluster werden durch Fis1p und Caf4p beeinflusst.....	95
5.6.3	Die Polarität der Dnm1p-Cluster kann mit Hilfe der 4Pi-Mikroskopie bestätigt werden	96
5.7	DAS AKTINGERÜST IST NICHT ESSENTIELL FÜR DIE AUFRECHTERHALTUNG DER POLARITÄT DER DNM1P-CLUSTER.....	97
6	DISKUSSION	100
6.1	DIE TEILUNG DER INNEREN UND ÄUßEREN MITOCHONDRIENMEMBRAN ERFOLGT IN HEFE ZEITLICH KOORDINIERT	100
6.2	MATRIX-KONSTRIKTIONEN TRETEN UNABHÄNGIG VON FIS1P UND DNM1P AUF	102
6.3	DNM1P-SPIRALEN WEISEN ÄHNLICHKEITEN MIT DYNAMIN AUF	104
6.3.1	Der GFP-VLP eignet sich zur Abschätzung der Dnm1p-GFP Moleküle in Clustern und Spiralen.....	108
6.3.2	Die Kalkulation der Anzahl von Dnm1p-Spiralwindungen beruht auf dem Vergleich zur Dynamin-Struktur aus <i>Drosophila</i>	109

6.4	DNM1P WIRD IN ABHÄNGIGKEIT DES ZYTOSKELETTS ZU DEN MITOCHONDRIEN REKRUTIERT	110
6.5	DIE POLARITÄT DER Dnm1P-CLUSTER IST ABHÄNGIG VON FIS1P UND CAF4P	112
6.6	DIE INTERAKTIONSPARTNER FIS1P, MDV1P UND CAF4P HABEN EINFLUSS AUF DIE VERTEILUNG UND GRÖÖE DER Dnm1P-CLUSTER	113
6.7	MDV1P UND CAF4P ERFÜLLEN UNTERSCHIEDLICHE AUFGABEN IM MITOCHONDRIALEN TEILUNGSAPPARAT	115
6.8	UNTERSCHIEDLICHE MORPHOLOGIEN DER MITOCHONDRIEN-NETZE DEUTEN AUF EINE INTERAKTION MIT DEM AKTIN-ZYTOSKELETT	116
6.9	AUSBLICK.....	118
7	LITERATUR.....	120
8	ABKÜRZUNGEN	129
9	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	130
10	LEBENS LAUF	131
11	ANHANG	132
11.1	VEKTORKARTEN.....	132
11.2	ANREGUNGS- UND EMISSIONSSPEKTREN.....	134
11.3	DNA-SEQUENZ DES EPITOP-MARKIERTEN <i>DNMI</i>	135
	DANKSAGUNG.....	138

1 Einleitung

Die ersten mikroskopischen Beobachtungen von Mitochondrien reichen bereits mehr als 100 Jahren zurück. Dabei leitet sich der Begriff „Mitochondrion“ aus dem griechischen Wort für „Fadenkörperchen“ (*mitos*, Faden; *chondros*, Korn) ab (Benda, 1898). Der evolutionäre Ursprung der in (fast) allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Organellen liegt in atmungskompetenten α -Proteobakterien, die vor 1.5 Milliarden Jahren eine Symbiose mit anaeroben Archaeobakterien eingegangen sind (Endosymbiontentheorie; Margulis, 1970; Gray *et al.*, 1999). Wegen ihrer Bedeutung in der zellulären Energiegewinnung (Zitronensäure-Zyklus und oxidative Phosphorylierung, ATP-Synthese) werden Mitochondrien häufig als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet. Ihre zentrale Rolle im Metabolismus und in der Ionen-Homöostase erlaubt ihnen die Integration und Überwachung des Zellstatus und lässt ihnen eine Schlüsselrolle in der Apoptose und Zell-Alterung zukommen. Erst in den letzten Jahren wurde dabei die Bedeutung der Morphologie und Dynamik der Mitochondrien in der Regulierung dieser zentralen zellulären Prozesse erkannt. Die molekularen Mechanismen der mitochondrialen Anpassung und Veränderung sind bisher nur ansatzweise entschlüsselt.

1.1 Morphologie der Mitochondrien

Aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs besitzen Mitochondrien eine Doppelmembran, eigene ringförmig vorliegende DNA und eine bakterienähnliche Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Durch ihre doppelte Membran lassen sich mehrere Reaktionräume unterscheiden. Die äußere Membran ähnelt in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung der Zellmembran, während die innere Membran in ihrem Aufbau eher Bakterienmembranen entspricht (Endosymbionten-Ursprung). Durch eine große Impermeabilität gegenüber Ionen kann der in der Atmungskette entstehende Protonengradient über der inneren Membran aufrechterhalten werden. In klassischen Schemazeichnungen ist die innere Membran stark gefaltet dargestellt (Abb. 1A: Baffle-Modell nach Palade, 1952) und wurde mit einer reinen Oberflächenvergrößerung begründet. Neuere Elektronentomografie-Aufnahmen zeigen, dass das ebenfalls bereits

1953 vorgestellte Cristae Junction Modell (Sjostrand, 1953) die Wirklichkeit besser widerspiegelt. Hier wird die innere Membran nochmals in die innere Grenzflächenmembran, die Cristae-Membran und die Cristae-Junctions unterteilt, welche enge Röhren bilden und die Cristae mit der Grenzflächenmembran verbinden (Abb. 1B: Cristae-Junction-Modell, Frey und Manella, 2000).

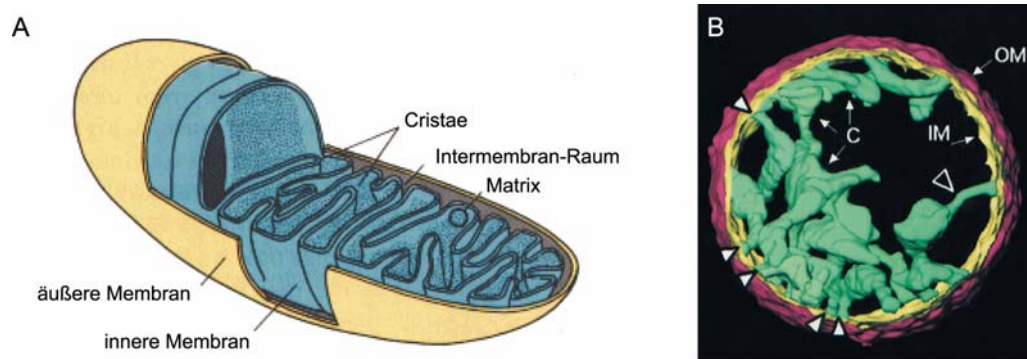


Abb 1: (A) *Baffle*-Modell der Mitochondrien nach Palada (1952). (B) *Cristae-Junction*-Modell nach Sjostrand (1953). Die Elektronentomographie-Aufnahme (Frey und Mannella, 2000) zeigt die äußere Mitochondrienmembran (OM, rot), die innere Membran (IM, gelb) und die Cristae (C, grün). Die Pfeilspitzen deuten auf die engen, röhrenförmigen Cristae-Junctions, die die innere Grenzflächenmembran mit der Cristae-Membran verbindet.

Es wird vermutet, dass durch diese Kompartimentierung ein separater Reaktionsraum in den Cristae entsteht, der sich vom restlichen Intermembranraum in seiner Proteinzusammensetzung unterscheidet (Reichert und Neupert, 2002). Die innere Membran umschließt die mitochondriale Matrix.

Die in der Matrix an die innere Mitochondrienmembran gebundenen Nukleotide kodieren neben mitochondrialen ribosomalen RNAs und transfer-RNAs auch für einige Untereinheiten der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzymkomplexe (Hobbs *et al.* 2001). Der Verlust der mitochondrialen DNA (mtDNA) führt zu atemungsdefizienten Mitochondrien. Der Großteil der für die Funktion der Mitochondrien essentiellen Gene ist im Laufe der Evolution ins Kern-Genom verlagert worden und besiegelt die wechselseitige Abhängigkeit von Wirt und Endosymbiont. Die kernkodierte mitochondrialen Proteine müssen posttranslational mit Hilfe mehrerer Translokationsmechanismen in die Mitochondrien importiert werden (Schatz und Dobberstein, 1996; Neupert, 1997). In letzter Zeit wird verstärkt die Rolle der mitochondrialen DNA im Alterungsprozess diskutiert (Cortopassi und Wong, 1999). Da die Nukleotide den membranassoziierten Atmungskettenkomponenten nah benachbart sind, unterliegen sie durch die in der oxidativen Phosphorylierung entstehenden freien Radikale einer erhöhten Mutationsanfälligkeit. Dieses gesteigerte Mutationsrisiko wird noch dadurch verstärkt, dass die mtDNA nicht wie die nukleäre DNA durch Histone

geschützt ist und den Mitochondrien nur ein begrenztes Spektrum an DNA-Reparaturmechanismen zur Verfügung steht (Croteau *et al.*, 1999; Sawyer und Van Houten, 1999). Eine Häufung von somatischen Mutationen wird in den Mitochondrien verhindert, indem defekte Gene durch homologe Rekombination mit benachbarten Nukleoiden eliminiert werden (Ono *et al.*, 2001; Nakada, 2001). Dabei stellen kontinuierliche Teilungs- und Fusionsprozesse der Mitochondrien eine ständige Durchmischung der mtDNA sicher und schützen den Organismus vor verfrühter Zellalterung.

Obwohl die interne strukturelle Organisation der Mitochondrien hoch konserviert ist, kann ihre äußere Gestalt von Zelle zu Zelle stark variieren. Die Vielfalt der Formen reicht von kleinen, kugelförmigen Organellen bis hin zu langgestreckten, verzweigten Netzwerken (Bereiter-Hahn und Voth, 1994).

Die in den meisten Zelltypen auftretenden mitochondrialen Verzweigungen sind hoch dynamisch und komplex. Ein diskutierter möglicher Vorteil dieser Netzwerke ist die Ausbildung eines energetischen Kontinuums. Durch die Verknüpfung der Mitochondrienstränge kann in einer Region des Organells mit Hilfe der Atmungskette ein Protonengradient aufgebaut werden, welcher an einer anderen Stelle in der Zelle in der Nähe von Energie-verbrauchenden Prozessen zur Synthese von ATP verwendet werden kann (Skulachev, 1990). Dass Lokalisation und Struktur der Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Zelle spielen wird deutlich, wenn diese Prozesse fehlreguliert sind. So sind Veränderungen in der mitochondrialen Verteilung und Morphologie mit einer Vielzahl von pathologischen Zuständen wie Leberkrankheiten, Muskeldystrophie, Cardiomyopathie und Krebs assoziiert (Yaffe, 1999).

1.2 Mitochondrien und das Zytoskelett

Die Anzahl, Morphologie und Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle unterliegt dynamischen Veränderungen und passt sich den energetischen Bedürfnissen der Zelle an. In Muskelzellen nehmen die Mitochondrien über 30% des Zellvolumens ein und liegen in räumlicher Nähe zu den ATP-verbrauchenden Aktin/Myosin-Fasern (Bakeeva *et al.*, 1978). In Fibroblasten hingegen machen die Mitochondrien nur einen relativ geringen Anteil des Zellvolumens aus und sind gleichmäßig in der Zelle verteilt. Mitochondrien können gezielt an Orte mit hohem Energiebedarf transportiert werden. Da sie selber weder Cilien noch Flagellen besitzen, nutzen sie das Zytoskelett, um sich innerhalb der Zelle zu bewegen. Dabei interagieren sie abhängig vom Zelltyp sowohl mit Mikrotubuli (siehe Abb. 2) als auch mit Intermediärfilamenten und Aktin, um ihre intrazelluläre Verteilung zu erlangen und aufrechtzuerhalten (Rappaport *et al.*, 1998; Yaffe, 1999; Karbowski *et al.*, 2001).

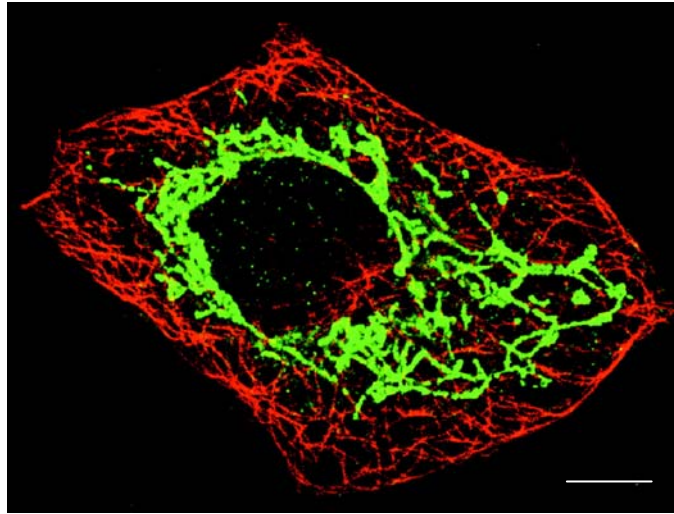


Abb. 2: Immunomarkierung von Mitochondrien (grün) und Mikrotubuli (rot) in einer COS-7-Zelle (Yaffe, 1999). Größenstandard: 10 μm

Ein besonders eindrucksvolles Beispiel für eine gerichtete Mitochondrienbewegung ist der Transport dieser Organellen entlang der Axone von Nervenzellen. Dabei werden die Mitochondrien über lange Strecken vom Zellkörper entlang von Mikrotubuli zu den Synapsen und den Wachstumskegeln der Neuronen transportiert (Hollenbeck, 1996). Der Transport isolierter Mitochondrien erfolgt sowohl anterograd als auch retrograd entlang von Mikrotubuli (Brady, 1991). In Säugerzellen sind bereits einige mitochondrienspezifische Motorproteine der Kinesin-Familie identifiziert worden (Nangaku *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1997; Khodjakov *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu den meisten höheren Organismen ist die Mitochondrienbewegung in *S. cerevisiae* vom Aktin-Zytoskelett abhängig (Simon *et al.*, 1995; Hermann und Shaw, 1998, Simon and Pon, 1996). Ein großer Teil der Hefemitochondrien kolokalisiert mit Aktin-Kabeln, jedoch konnten bisher keine Proteine identifiziert werden, die eine Interaktion der Organellen mit dem Aktin-Zytoskelett vermitteln. Es gibt jedoch Hinweise, dass der an der Nukleation von Aktin beteiligte Arp2/3-Komplex während der Zellteilung überdies am Transport der Hefemitochondrien in die Tochterzelle beteiligt ist (Boldogh *et al.*, 2001).

Auch in einigen höheren Zellen ist das Aktin-Gerüst an der Morphologie der Mitochondrien beteiligt. So wurde in CV1-4A-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze *Cercopithecus aethiops*) festgestellt, dass die Zerstörung des F-Aktins zu einer gestörten Rekrutierung des Teilungsproteins Drp1 (*dynamin related protein*) zu den Mitochondrien und somit zu einer verminderten Teilungsaktivität der Organellen

führt (De Vos *et al.*, 2005). In HeLa-Zellen wurde hingegen von einer Dynein/Dynaktin-abhängigen Drp1-Rekrutierung zu den Mitochondrien berichtet (Varadi *et al.*, 2004). In welcher Weise das Zytoskelett an der Regulation des Teilungsapparates beteiligt ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

1.3 Funktion der Mitochondrien

1.3.1 Rolle im Energiestoffwechsel

Mitochondrien nehmen eine zentrale Stellung im Energiestoffwechsel der Zelle ein. Insbesondere sind in ihnen die Enzyme der Atmungskette lokalisiert, aber auch die Fettsäureoxidation und der Zitronensäurezyklus sind an dieses Organell gebunden. Weiterhin sind Mitochondrien an anabolen Prozessen wie dem Harnstoffzyklus, der Synthese von Häm, Pyrimidinen, Nukleotiden und Phospholipiden beteiligt (Scheffler, 2001). Eine ihrer Hauptaufgaben ist jedoch die Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung.

In dieser Reaktion werden die im Zitronensäure-Zyklus, der Glykolyse und dem Fettsäure-Abbau entstehenden Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 oxidiert und ihre Protonen und Elektronen in mehreren Stufen auf Sauerstoff übertragen (Atmungskette, innere Mitochondrienmembran). Die beim Elektronentransport auf den einzelnen Redoxstufen frei werdende Energie wird dazu genutzt, Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu pumpen (Mitchell, 1961). Dadurch bildet sich ein elektrochemischer Gradient über die innere Mitochondrienmembran aus. Die protonenmotorische Kraft treibt die ATP-Synthase (innere Mitochondrienmembran) an, welche die freiwerdende chemiosmotische Energie dazu nutzt, anorganische Phosphate auf ADP zu übertragen. Das in dieser Reaktion syntetisierte ATP stellt eine speicher- und transportierbare Energieform für die Zelle dar.

Die mitochondrialen Netzwerke sind dynamisch und können sich dem aktuellen Energie-Status der Zelle anpassen. So weisen Hefezellen (*S. cerevisiae*) in Gegenwart von fermentierbaren Kohlenstoff-Quellen (z.B. Glukose) unverzweigte tubuläre Mitochondrien auf, während sie bei nicht-fermentierbaren Nährstoffen (z.B. Glyzerin) die Atmungskette zur Energiegewinnung benötigen und komplexe mitochondriale Verzweigungen ausbilden (Egner *et al.*, 2002). Die Anpassung der Mitochondrien-Morphologie wird dabei durch fortlaufende Teilungs- und Fusionsprozesse gewährleistet.

1.3.2 Bedeutung der Mitochondrien in der Apoptose

Eine wichtige Rolle kommt den Mitochondrien bei der Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) zu (Bernardi, 1999; Bernardi et al., 2001). Im Gegensatz zur Nekrose (provozierter Zelltod), die meist durch eine starke Schädigung der Zelle von außen verursacht wird und zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe führt, bleibt bei der Apoptose die Integrität der Zelle erhalten und somit angrenzendes Gewebe unbeschädigt (Kerr *et al.*, 1972).

Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus, um den Organismus vor potentiellen Gefahren wie genotoxisch geschädigten oder viral infizierten Zellen zu schützen (Shub, 1994). Weiterhin spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung (Jacobson *et al.*, 1997) und der Lymphozyten-Reifung. Die Bedeutung des Zelltodes für den Organismus als Gesamtheit wird besonders deutlich, wenn dieser Prozess fehlreguliert ist. Dabei lassen sich Krankheiten durch eine gesteigerte Apoptose-Induktion (z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson; Thompson *et al.*, 1995; Offen *et al.*, 2000) von solchen unterscheiden, die auf einem Apoptose-Mangel beruhen (z.B. viele Tumorerkrankungen und Autoimmundefekte; Rosen *et al.*, 1999).

Bei der Regulation der Apoptose unterscheidet man zwischen einem extrinsischen und intrinsischen Weg. Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren vermittelt. Diese TNF-Rezeptoren (tumor necrosis factor) leiten apoptotische Signale in die Zelle weiter und führen zur Aktivierung einer Kaskade sich autokatalytisch spaltender Caspasen. Diese zur Familie der Proteasen gehörenden Enzyme schneiden wiederum spezifische Substrate, die zum Zelltod führen (Scaffidi, 1998). Das Signal kann durch den Mitochondrien-abhängigen Apoptoseweg (intrinsischer Signalweg) verstärkt werden. Der intrinsische Weg kann jedoch auch völlig unabhängig von äußeren Signalen durch z.B. DNA-Schädigung, oxidativen Stress, Hunger, hohe Ca^{2+} -Konzentrationen oder chemische Substanzen induziert werden (Kaufmann, 2000; Wang, 2001). Dabei spielt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran eine entscheidende Rolle, da Intermembranraum-Proteine wie Cytochrom c und AIF (*apoptose inducing factor*) freigesetzt werden und als allosterische Aktivatoren der Caspasen wirken (Luo, 1998). Ein Überblick über die Apoptose-Wege in der Zelle ist in Abbildung 3 dargestellt.

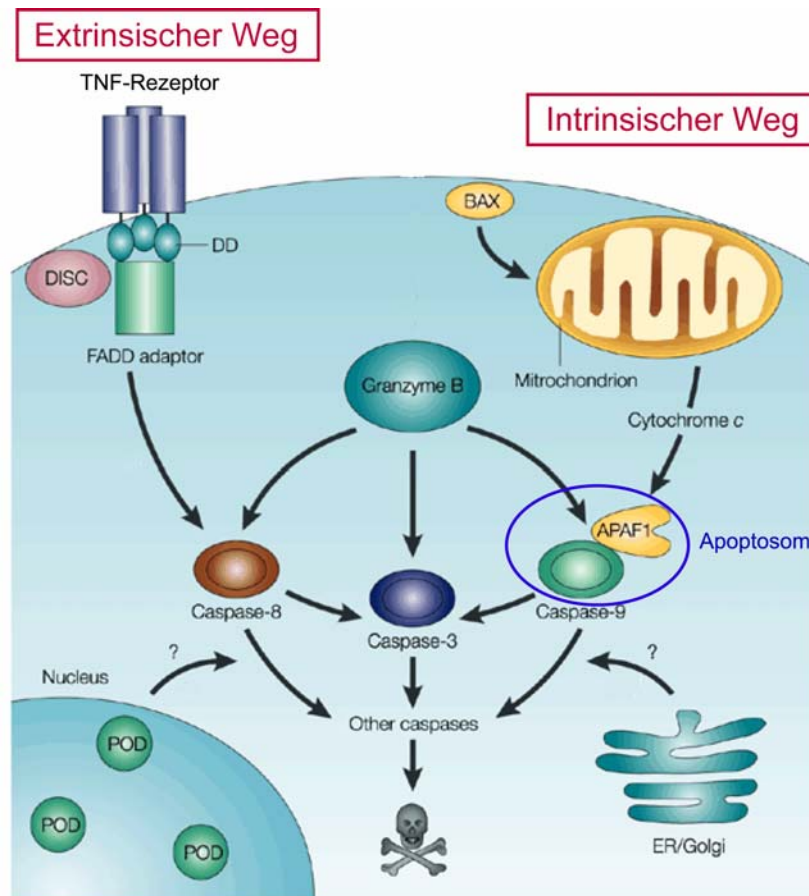


Abb. 3: Überblick über den extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Weg (Reed, 2002; vereinfacht)

Die zur Durchlässigkeit der Membran führenden Mechanismen sind vielfältig und werden kontrovers diskutiert. Zum einen bilden Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bax und Bak) einen Kanal in der äußeren Membran. Auch eine Permeabilitätspore (PTPC, *permeability transition pore complex*), unter anderem bestehend aus dem spannungsabhängigen Anionen-Kanal (VDAC, *voltage-dependent anion channel*) und dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT), kann zur Öffnung der inneren und äußeren Membran führen (Green und Kroemer, 2004). Das freigesetzte Cytochrom c bildet zusammen mit Apaf-1 und anderen Proteinen das Apoptosom, welches zur Aktivierung weiterer Caspasen führt und schließlich den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg vereint.

Die Regulation der Mitochondrien-Morphologie rückt in der Erforschung der Apoptose immer stärker in den Mittelpunkt des Interesses. So wurde gezeigt, dass die Fragmentierung der Mitochondrien während der Apoptose durch eine Unterdrückung der mitochondrialen Teilungsproteine Drp1 und Fis1 (Frank *et al.*, 2001; Perfettini *et al.*, 2005) oder eine Überexpression des Fusionsproteins Mfn1 (Mitofusion 1)

verhindert werden kann (Sugioka *et al.*, 2004). Besonders am Beispiel der Dynamin-verwandten GTPase Drp1 wird deutlich, dass die Beziehungen zwischen den apoptotischen Signalwegen und der mitochondrialen Morphologie komplex sind. Einerseits führt eine Überexpression des Teilungsproteins durch eine verstärkte Fragmentierung der Mitochondrien zu einer erhöhten Sensibilität der Zelle gegenüber Apoptose-auslösenden Faktoren. Andererseits verhindert die Fragmentierung eine Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen innerhalb des Organells. Da ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel die Öffnung der Permeabilitätspore bedingt (Brookes *et al.*, 2004), führt die verhinderte Ausbreitung zur Unterdrückung des Apoptosewegs. Weiterhin wurde gezeigt, dass Drp1 mit Bax an Bereichen aktueller Teilungspunkte kolokalisiert (Karbowski *et al.*, 2004).

Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind, weisen die bisherigen Ergebnisse auf eine enge Beziehung zwischen der Regulation des mitochondrialen Teilungs- und Fusionsapparates und dem programmierten Zelltod hin.

1.4 Der mitochondriale Teilungs- und Fusionsapparat

Viele an der mitochondrialen Teilung und Fusion beteiligten Proteine sind in Pilzen, Pflanzen und Tieren konserviert. Die Vergleichbarkeit der fundamentalen Mechanismen kombiniert mit den genetischen, biochemischen und zellbiologischen Vorteilen der Bäckerhefe hat *S. cerevisiae* zu einem beliebten Modellsystem für mitochondriale Dynamiken gemacht (Nunnari *et al.*, 2002).

1.4.1 Die Bäckerhefe als Modellorganismus

Der Hemiascomycet *Saccharomyces cerevisiae* gehört zur Familie der knospenden Hefen (siehe Abb. 4). Der von Louis Pasteur Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckte Organismus gewann neben seiner industriellen Nutzung (z.B. Alkohol-Herstellung) als Modellsystem in der Biologie immer mehr an Bedeutung. Die Gründe für die Beliebtheit von *S. cerevisiae* sind vielfältig.

Der einzellige Mikroorganismus ist leicht kultivierbar und besitzt eine Generationszeit von nur zwei Stunden. Im Gegensatz zu Bakterien wie *E. coli* sind Hefen Eukaryonten und besitzen somit einen Zellkern und Organellen wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und

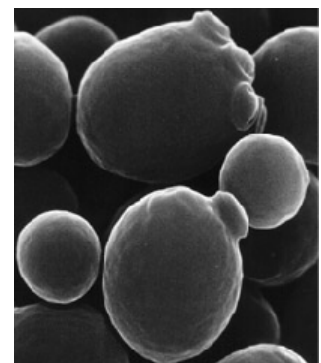


Abb. 4: *S. cerevisiae* im Raster-Elektronenmikroskop (Alan Wheals, Universität Bath, GB)

Mitochondrien. *S. cerevisiae* ist genetisch, molekular- und zellbiologisch sehr viel besser zugänglich als Säugerzellen, die an Hefe gewonnenen Ergebnisse erlauben jedoch überraschend genaue Rückschlüsse auf menschliche Zellen. Das relativ kleine Genom der Bäckerhefe besteht aus etwa 6000 Genen, die sich auf 16 Chromosomen verteilen. Dabei weisen etwa die Hälfte aller Hefegene Homologe im menschlichen Genom auf (Botstein *et al.* 1997).

Abgesehen davon bietet Hefe für molekularbiologische Arbeiten einige Vorteile, da sie sowohl haploid als auch diploid auftritt. Mutationen können sehr leicht in die haploide Form eingeführt werden, da nur eine Kopie des Gens mutiert werden muss. Bei der geschlechtlichen Fortpflanzung verschmelzen zwei haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps (\mathbf{a} und α) zu einer diploiden Zygote, welche wiederum vier haploide Ascosporen ausbildet. Die Sporen besitzen unterschiedliche Kombinationen der Erbinformationen ihrer Eltern und können in der Tetradenanalyse (siehe Methoden 3.3.5) untersucht werden. Des Weiteren tritt in *S. cerevisiae* sehr häufig homologe Rekombination auf (100 mal öfter als beim Menschen bezogen auf gleiche DNA-Mengen). Diese macht es möglich, ganze Genomabschnitte spezifisch gegen Fremd-DNA auszutauschen, solange die Ränder der auszutauschenden Bereiche übereinstimmen. Auf diese Weise kann man einerseits definierte Gene ausschalten („Knock-out-Hefen“), andererseits aber auch fremde Gene gezielt ins Genom integrieren (Epitoptagging).

Da die Mechanismen der mitochondrialen Dynamiken von der Hefe bis zum Mensch konserviert und Hefezellen genetisch leicht zu manipulieren sind, wurde in dieser Arbeit *S. cerevisiae* als Modellorganismus gewählt. Obwohl die Bäckerhefe eine Größe von nur 5 μm besitzt, sind die Mitochondrien im Gegensatz zu den Organellen in Säugerzellen von vergleichbarer Größe (Durchmesser etwa 300-500 nm) und innerer Struktur (Egner *et al.*, 2002). Je nach Kohlenstoffquelle bilden Hefemitochondrien ein einfaches oder verzweigtes Netzwerk aus, das unterhalb des zellulären Cortex verläuft (Hoffmann and Avers, 1973; Nunnari *et al.*, 1997). Der Verlust eines der Proteine, die an der Fusion beteiligt sind, führt zur Fragmentierung der Mitochondrien, da die Teilungen fortschreiten (siehe Abb. 5).

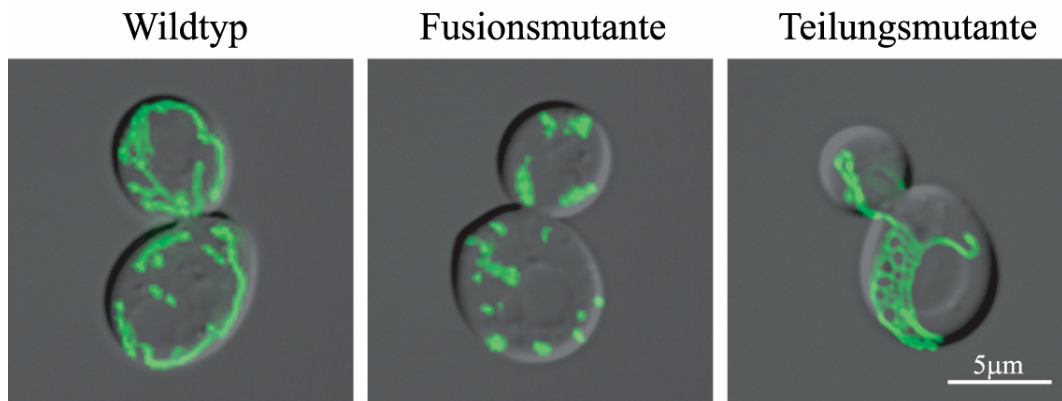


Abb. 5: Mitochondrialer Phänotyp von *S. cerevisiae* in Wildtyp-Zellen, Stämmen mit einem Defekt in der mitochondrialen Fusion ($\Delta fzo1$) und Teilung (hier am Beispiel von $\Delta dnm1$). Die Matrix der Mitochondrien ist mit GFP markiert. (Okamoto und Shaw, 2005)

Der Verlust von Proteinen, die an der mitochondrialen Teilung beteiligt sind, führt zur Bildung von zusammenhängenden, netzartigen Organellen. Der Phänotyp ergibt sich aus dem Fortschreiten der Fusionsvorgänge, während die Teilung unterbunden ist. Zellen, die sowohl einen Defekt in der Fusion als auch in der Teilung aufweisen, zeigen einen wildtypischen Netzwerk-Phänotyp. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Mitochondrienmorphologie durch ein ausgeglichenes Verhältnis von Teilung und Fusion aufrechterhalten wird. Die an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine werden im Folgenden näher beschrieben.

1.4.2 Überblick über den mitochondrialen Fusionsapparat

Da Mitochondrien eine Doppelmembran besitzen, stellt der Mechanismus der mitochondrialen Fusion ein einzigartiges Problem dar. Die inneren und äußeren Membranen müssen räumlich und zeitlich koordiniert miteinander fusionieren. Anders als bei anderen Membranfusionsvorgängen sind an der mitochondrialen Fusion keine SNARE-Proteine beteiligt. Stattdessen spielen GTPasen in der Regulation der Fusion eine wichtige Rolle (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). In Hefe sind bisher drei Fusionsproteine charakterisiert worden: Fzo1p, Mgm1p und Ugo1p. In Abbildung 6 ist ein Modell der Lokalisation dieser Komponenten dargestellt.

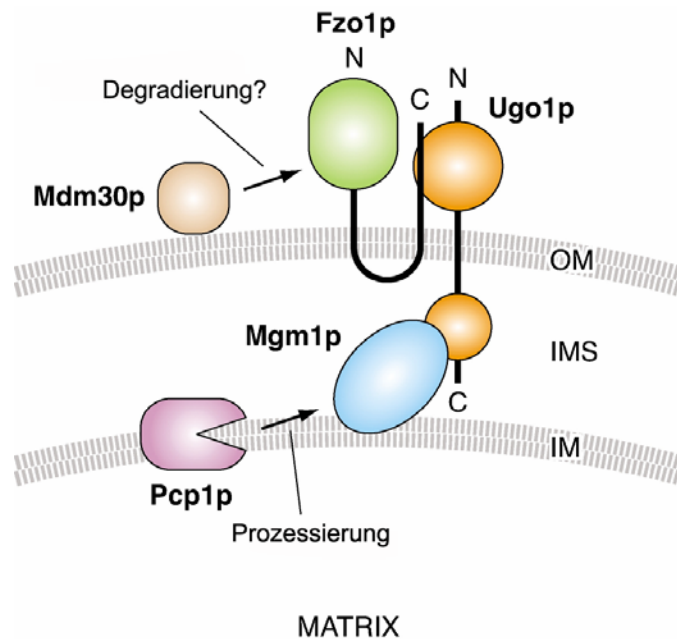


Abb. 6: Modell der an der mitochondrialen Fusion beteiligten Proteine in *S. cerevisiae* (Okamoto und Shaw, 2005)

Fzo1p ist ein integrales Protein der äußeren Membran und wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckt (*fuzzy onion*), wo es während der Spermatogenese die Fusion der einzelnen Mitochondrien zu einem Riesenorganell vermittelt (Hales und Fuller, 1997). In Säugern sind zwei Homologe bekannt, Mfn1 und Mfn2 (*mitofusin*) (Santel und Fuller, 2001). Fzo1p (in Abb. 6 grün dargestellt) gehört zur Familie der GTPasen und weist neben der GTPase-Domäne zwei Transmembran-Sequenzen auf, die es in der äußeren Mitochondrien-Membran verankern. Weiterhin besitzt Fzo1p vier coiled-coil Domänen, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln.

Eine weitere an der Fusion beteiligte GTPase ist Mgm1p (*mitochondrial genome maintenance*). Orthologe von Mgm1p wurden in anderen Eukaryoten wie Spaltheefe (Msp1) und Säugern (Opa1, *optic atrophy*) gefunden (Pelloquin *et al.*, 1998; Delettre *et al.*, 2000). Mutationen in *opal* führen zur autosomal dominanten optischen Atrophie (ADOA), der häufigsten Form der optischen Neuropathie. ADOA stellte die erste beschriebene direkte Verbindung der mitochondrialen Dynamik mit einem Krankheitsbild dar und beruht auf dem Sterben der retinalen Ganglionzellen (Alexander *et al.*, 2000). Dabei ist bisher nicht vollständig geklärt, ob der Defekt auf einer energetischen Unterversorgung der Zellen durch den sekundären Verlust der Atmungskette oder einer erhöhten Sensitivität gegenüber Apoptose durch Sauerstoff-

Radikale zurückzuführen ist (Carelli *et al.*, 2004). Das Dynamin-verwandte Mgm1p kommt in zwei Formen vor, die durch proteolytische Prozessierung ineinander umgewandelt werden können. Die eine Form ist ein Integralprotein der inneren Membran, während die andere, prozessierte Form Membran-assoziiert im Intermembranraum vorkommt (Sesaki *et al.*, 2003; Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003).

Das dritte mitochondrial Fusionsprotein, Ugo1p (japanisch für „Teilung“), wurde bisher nur in Pilzen identifiziert. Obwohl es typische Sequenzmotive eines Transporters aufweist, liegt es integriert in der äußeren Membran vor (Sesaki und Jensen, 1999).

Im ersten Schritt der Fusion verschmelzen zunächst die äußeren Membranen von zwei Organellen. Die räumliche Annäherung der beiden Mitochondrien wird vermutlich durch Elemente des Zytoskeletts vermittelt. Bei der Anlagerung der beiden äußeren Membranen spielt Fzo1p wahrscheinlich eine zu den SNARE-Proteinen analoge Rolle (Meeusen und Nunnari, 2004). Mgm1p ist nicht nur wichtig für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran, sondern scheint für die strukturelle Integrität der ATP-Synthase und der Cristae-Morphologie bedeutend zu sein (Olichon *et al.*, 2003). Die Interaktion mehrerer Mgm1p-Proteine könnte sowohl an der Einfaltung der inneren Membran und somit der Cristae-Bildung beteiligt sein, als auch in einem vergleichbaren Mechanismus die Annäherung gegenüberliegender innerer Membranen vor der Membranfusion vermitteln. Ugo1p fungiert als Adaptor zwischen Fzo1p und Mgm1p und könnte somit die Fusion der inneren und äußeren Membranen koordinieren (Sesaki und Jensen, 2001). Der genaue Ablauf der Verschmelzung sowie die Koordination zwischen Fusionsprozesses und mitochondrialer Teilung sind jedoch bisher ungeklärt.

1.4.3 Aufbau und Funktion des mitochondrialen Teilungsapparates

Die Veränderung der Mitochondrien-Morphologie stellt eine Anpassung des Organells an externe und interne Signale der Zelle sicher (z.B. Energiestatus, Apoptose) und wird durch ein balanciertes Verhältnis zwischen Fusion und Teilung aufrechterhalten. Dabei spielt ebenso wie im Fusionsapparat auch in der mitochondrialen Teilung eine Dynamin-verwandte GTPase eine wichtige Rolle. Genetische, biochemische und zellbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass in *S. cerevisiae* neben dieser GTPase (Dnm1p) noch drei weitere Proteine an der mitochondrialen Teilung beteiligt sind: Fis1p, Mdv1p und das erst vor kurzem entdeckte Caf4p (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005). Ein Modell ihrer Lokalisationen und Interaktionen ist in Abbildung 7 dargestellt, die postulierte Aufgabe der Proteine wird im Folgenden näher beschrieben.

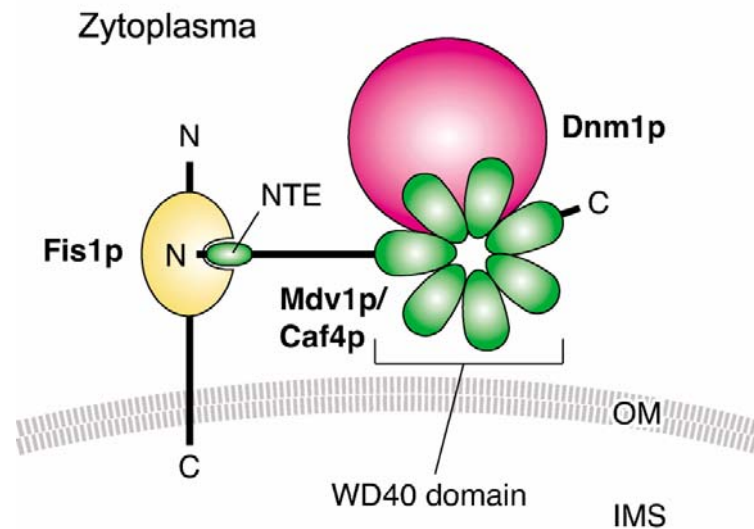


Abb. 7: Proteine des mitochondrialen Teilungsapparates in Hefe (Okamoto und Shaw, 2005)

1.4.3.1 Die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1p

In der mitochondrialen Teilung spielt die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1p eine Schlüsselrolle. Dnm1p (*dynamin-related*) in Hefe oder Drp1/DLP1 (*dynamin-related protein/dynamin-like protein*) in Säugern ist hoch konserviert und besteht aus einer N-terminalen GTPase-Domäne, einer Mitteldomäne, einer hydrophilen Region von bisher noch unbekannter Funktion, genannt Insert B, und einer C-terminalen GTPase-Effektor Domäne (GED). Dnm1p/Drp1 (in Abb. 7 rot dargestellt) lagert sich in Clustern an die Oberfläche von Mitochondrien an (Otsuga *et al.*, 1998).

Die Mehrzahl dieser Cluster ist nicht an aktuellen Teilungsvorgängen beteiligt, während eine Minderheit dieser Dnm1p-Aggregate vermutlich spiralförmige Strukturen um vorher eingeschnürte mitochondriale Stränge ausbildet und in einer dem Dynamin ähnlichen Funktionsweise die Mitochondrien durchschnürt (Shaw und Nunnari, 2002). Der genaue Mechanismus wird kontrovers diskutiert, wahrscheinlich induziert die Hydrolyse von GTP eine Konformationsänderung der Spirale und führt zur Trennung der Stränge (Fukushima *et al.*, 2001).

1.4.3.2 Der integrale Membrananker Fis1p

Fis1p (hFis1 im Menschen) ist ein evolutionär konserviertes integrales Protein der äußeren Membran, dessen C-Terminus in den Intermembranraum ragt, während der N-terminale Abschnitt ins Zytoplasma gerichtet ist und sechs α -Helices aufweist (Mozdy *et al.*, 2000). Diese Helices werden zu einem Tetratricopeptid Repeat (TRP) gefaltet und bilden eine hydrophobe Einstülpung (siehe Abb. 7, gelb), die vermutlich als Bindungstasche für die Adaptoren Mdv1p und Caf4p fungiert (Suzuki *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu Dnm1p und Mdv1p ist Fis1p gleichmäßig in der äußeren Membran der Mitochondrien verteilt (Mozdy *et al.*, 2000) und scheint an zwei voneinander unabhängigen Schritten im Teilungsweg beteiligt zu sein (Tieu und Nunnari, 2000; Tieu *et al.*, 2002). In einer frühen Phase rekrutiert es Dnm1p mit Hilfe der molekularen Adaptoren Mdv1p/Caf4p zur mitochondrialen Membran (Tieu *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005). Später ist Fis1p im Zusammenspiel mit Dnm1p und Mdv1p am eigentlichen Teilungsprozess beteiligt (Shaw und Nunnari, 2002; Tieu *et al.*, 2002; Cerveny und Jensen, 2003).

Die Rolle von Fis1p als Rekrutierungsfaktor wird jedoch kontrovers diskutiert. Da trotz der gleichmäßigen Verteilung von Fis1p sowohl Dnm1p als auch Mdv1p clusterförmig auf der äußeren Membran verteilt sind, vermuten Cerveny und Jensen eine Rolle von Dnm1p in der Rekrutierung sowohl von Mdv1p als auch von Fis1p (Cerveny und Jensen 2003). Gestützt wird diese These durch die gleichmäßige Anlagerung von Mdv1p in $\Delta dnm1$ -Zellen (Shaw und Nunnari, 2002). Weiterhin ist schwer zu erklären, warum sich Dnm1-Proteine in Aggregaten an bestimmte Stellen des gleichmäßig verteilten Fis1-Proteins anlagern (Cerveny und Jensen 2003). In $\Delta fis1$ -Zellen weisen sowohl Dnm1p als auch Mdv1p eine gestörte Rekrutierung zu den Mitochondrien auf und bilden neben vielen zytosolischen Clustern wenige große Aggregate auf der äußeren Membran (Tieu und Nunnari, 2000; Mozdy *et al.*, 2000). Die Fähigkeit, sich trotz des fehlenden Membranankers an die mitochondriale Membran zu binden, erklären Cerveny und Jensen durch die Anlagerung von Dnm1p an bisher unbekannte Proteine oder modifizierte Lipide. Obwohl die genaue Funktion von Fis1p bisher nicht im Detail verstanden ist, so hat sich die Modellvorstellung von Fis1p als Rekrutierungsprotein von Mdv1p, Caf4p und Dnm1p und seiner Rolle als Membrananker im Teilungsprozess durchgesetzt.

1.4.3.3 Die molekularen Adaptorproteine Mdv1p und Caf4p

Im Gegensatz zu den konservierten Proteinen Fis1p und Dnm1p sind Mdv1p und Caf4p bisher nicht in vielzelligen Eukaryoten entdeckt worden. Mdv1p (Gag3p/Net2p) und Caf4p besitzen eine sogenannte N-terminale Extension (NTE), ein bzw. zwei coiled-coil Domänen in der N-terminalen Hälfte und sieben C-terminale WD40 Wiederholungen, welche einen β -Propeller formen (siehe Abb. 7, grün) (Fekkes *et al.*, 2000). Sowohl die coiled-coil-Domäne als auch die WD40-Wiederholungen sind wichtig für Protein-Protein-Interaktionen. Caf4p und Mdv1p können aufgrund dieser Domänen als molekulare Adaptoren zwischen Fis1p und Dnm1p fungieren (Tieu und Nunnari, 2000; Griffin *et al.*, 2005).

Mdv1p (*mitochondrial division protein*) wird in Abhängigkeit von Fis1p zu den Mitochondrien rekrutiert, während es sich in Dnm1p-abhängiger Weise zu punktförmigen Strukturen auf der äußeren Membran anlagert (Cervený *et al.*, 2001, Tieu und Nunnari, 2000). *Yeast Two-Hybrid*-Experimente zeigten, dass Fis1p ausschließlich mit der NTE-Domäne von Mdv1p interagiert (Cervený und Jensen, 2003), während andere Studien eine Fis1p-abhängige Interaktion sowohl mit NTE als auch mit den WD40-Wiederholungen beobachteten (Tieu *et al.*, 2002). Weitere Studien zeigten eine Interaktion zwischen Dnm1p und Mdv1p, welche durch die WD40-Wiederholungen vermittelt werden (Tieu *et al.*, 2002; Cervený und Jensen, 2003). Experimente mit Dnm1p GTPase-Mutanten deuten auf eine GTP-abhängige Regulation der Dnm1p-Mdv1p-Interaktion hin (Cervený und Jensen, 2003).

Die Teilungsproteine Fis1p, Mdv1p und Dnm1p wurden in systematischen Durchmusterungen nach mitochondrialen Morphologie-Phänotypen entdeckt, da in Deletionsmutanten dieser Gene verzweigte, fischernetzartige Mitochondrien auftreten. Im Gegensatz dazu wurde Caf4p nicht in diesen Ansätzen gefunden, da eine Deletion des *CAF4*-Gens keine starken Auswirkungen auf die Gestalt der Mitochondrien aufweist. Caf4p (*CCR4 associated factor*) wurde ursprünglich als Protein-Interaktionspartner von Ccr4p identifiziert, einer zentralen Komponente des CCR4-NOT Transkriptionsregulator-Komplexes (Liu *et al.*, 2001). Als Komponente des Teilungsapparates und Interaktionspartner von Fis1p und Dnm1p wurde Caf4p erst durch Coimmunopräzipitation und Two-Hybrid-Analysen entdeckt (Griffin *et al.*, 2005). Aufgrund seiner starken Homologie zu Mdv1p wird für Caf4p eine ähnliche Wirkungsweise als molekularer Adaptor postuliert. Dabei wurde bisher gezeigt, dass die NTE-Domäne ebenfalls mit Fis1p und die WD40-Wiederholungen mit Dnm1p interagieren (Griffin *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie sich die Aufgaben von Mdv1p und Caf4p in der Zelle unterscheiden.

1.4.3.4 Modelle der mitochondrialen Teilung in Hefe

Verschiedene Konzepte über die Funktion des Teilungsapparates wurden in den letzten Jahren vorgestellt (Osteryoung und Nunnari, 2003; Shaw und Nunnari, 2002; Cervený und Jensen, 2003).

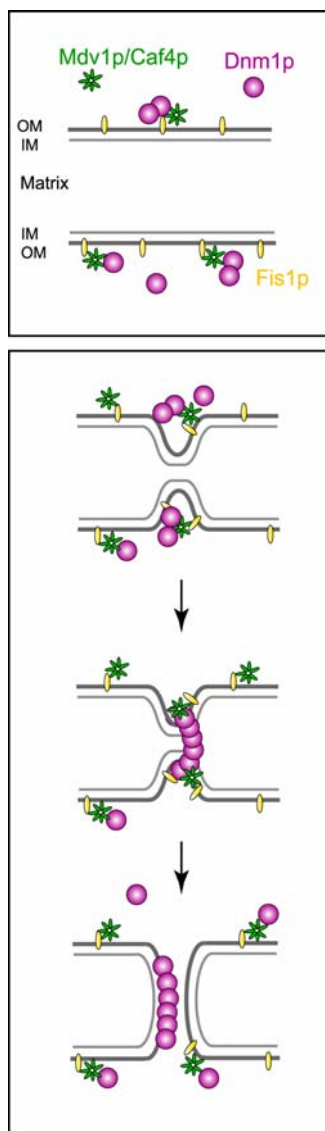


Abb. 8: Modell der mitochondrialen Teilung in Hefe. An einer Matrix-Konstriktion lagern sich Dnm1-Proteine zu einem Ring zusammen und durchtrennen die Mitochondrien.

In einem Modell vermittelt dabei Fis1p die Rekrutierung des Dnm1-Proteins zu Orten aktueller oder zukünftiger Teilungen, während Mdv1p stabil mit Fis1p interagiert. Mit Hilfe der WD40-Domäne verbindet Mdv1p die Interaktion zwischen Dnm1p und Fis1p, woraufhin es zur Ausbildung einer Matrix-Konstriktion (siehe Abb. 8) und zur Anlagerung einer Dnm1p-Spirale um diese mitochondriale Einschnürung kommt (Osteryoung und Nunnari, 2003; Shaw und Nunnari, 2002). Beobachtungen von Legesse-Miller *et al.* zeigen jedoch, dass Matrix-Konstriktionen auch unabhängig von der Anlagerung von Dnm1p-Clustern auftreten (Legesse-Miller *et al.*, 2003). In einem anderen Modell wird die Anlagerung von Dnm1p auf der mitochondrialen Oberfläche als unabhängig von Fis1p und Mdv1p betrachtet (Cervený und Jensen, 2003).

Die Vorstellung von Dnm1p als Mechano-Enzym wird stark von Dynamin geprägt (Fukushima *et al.*, 2001), welches bei der Abschnürung von Vesikeln beteiligt ist und einen Spiraldurchmesser von 10-20 nm aufweist (van der Blik, 1999). Weiterhin wurden *in vitro* Dnm1p-Spiralen mit einem Durchmesser von etwa 110 nm beobachtet (Ingerman *et al.*, 2005). Da Mitochondrien einen Durchmesser von 350-500 nm aufweisen (Egner *et al.*, 2002), stellen Matrix-Konstriktionen vermutlich eine Vorbedingung zur Anlagerung von Dnm1p-Spiralen dar (siehe Abb. 8). Die Durchschnürung der Spirale erfolgt wahrscheinlich in Abhängigkeit des GTP-Status und führt zur Trennung des Mitochondrien-Stranges (Fukushima *et al.*, 2001).

Der detaillierte Ablauf der mitochondrialen Teilung sowie die Regulation des Prozesses sind bisher nicht bekannt. In Säugerzellen wurde beobachtet, dass Komponenten des Zytoskeletts die Rekrutierung der Dynamin-verwandten GTPase Drp1 zu den Mitochondrien vermitteln (De Vos *et al.*, 2005; Varadi *et al.*, 2004). Ob das Zytoskelett in Hefe eine Rolle in der Regulation des Teilungsapparates spielt und welche Komponenten eine Interaktion zwischen diesen Strukturen und den Mitochondrien vermitteln, ist bisher nicht erforscht. Weiterhin ist unbekannt, welche Proteine an der Ausbildung von Matrix-Konstriktionen beteiligt sind und warum trotz der molekularen Ähnlichkeit zwischen Caf4p und Mdv1p die Deletion dieser Gene zu unterschiedlichen Mitochondrien-Phänotypen führt.

Eine zentrale Bedeutung kommt dem Schlüsselprotein Dnm1p in der mitochondrialen Teilung zu. Da die Anzahl der Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-Cluster die Häufigkeit der Teilungsprozesse weit überschreitet, bleibt die Frage zu klären, welche Funktion die restlichen Cluster erfüllen. Dabei können sie Orte zukünftiger, aktueller und vergangener Teilungen markierten, oder eine bisher unentdeckte zusätzliche Aufgabe in der Zelle erfüllen. Welchen Einfluss die anderen Teilungsproteine auf die Größe und Verteilung der Dnm1p-Cluster besitzen, kann dabei Rückschlüsse auf die Interaktion dieser Proteine untereinander gewähren.

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen verschiedene Aspekte des mitochondrialen Teilungsapparates in *S. cerevisiae* näher charakterisiert werden. Dabei liegt im ersten Teil der Schwerpunkt auf der Untersuchung von Matrix-Konstriktionen, die nach der Modellvorstellung eine Vorbedingung für die Anlagerung von Dnm1p-Spiralen darstellen. Welche Teilungsproteine als Ursache dieser Einschnürungen in Betracht kommen, soll einerseits durch die Verwendung zweifarbiger Doppelmarkierungen der Mitochondrien-Membranen geklärt werden. Andererseits soll die Verwendung des photokonvertierbaren GFP in Hefe etabliert werden, um den Einfluss der Teilungsproteine auf die Kontinuität der mitochondrialen Netzwerke zu zeigen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der mikroskopischen Charakterisierung der Dynamin-verwandten GTPase Dnm1p. Die Verwendung eines GFP-VLP (*virus-like protein*) als internem Kalibrierungsstandard soll eine Abschätzung der Molekülzahl innerhalb der zytosolischen und Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-GFP Cluster erlauben und den Einfluss der Teilungsproteine Fis1p, Mdv1p und Caf4p im

quantitativen Vergleich aufzeigen. Eine besondere Herausforderung stellt weiterhin die Unterscheidung zwischen Dnm1p-Clustern und Spiralen sowie die Abschätzung der an einer Spirale beteiligten Moleküle dar. Neben der Helligkeitsbestimmung gilt es, die Ausrichtung der Mitochondrien-assoziierten Cluster innerhalb der Zelle zu bestimmen, um einen möglichen Einfluss des Aktin-Zytoskelettes auf die Dnm1p-Orientierung experimentell zu überprüfen und somit Aufschluss über eine Interaktion zwischen Mitochondrien und F-Aktin zu gewinnen.

2 Material

2.1 Bakterien- und Hefestämme

Tab. 1: In der vorliegenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Bakterien- und Hefestämme aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E.coli</i> DH5 α	F-; 80dlacZ Δ M15; Δ (lacZXA-argF); <i>endA1</i> ; <i>recA1</i> ; <i>hsdR17</i> ;rk--mk+; <i>thi-1</i> ; <i>supE44</i> ; <i>relA1</i>	Hanahan, 1985
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	Mat a ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0	Euroscarf, Deutschland
<i>S. cerevisiae</i> Y1145	Mat α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>lys2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; Δ <i>fis1</i> ::kanMX4	Euroscarf, Deutschland
<i>S. cerevisiae</i> Y11311	Mat α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>lys2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; Δ <i>mdv1</i> ::kanMX4	Euroscarf, Deutschland
<i>S. cerevisiae</i> Y17048	Mat α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>lys2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; Δ <i>caf4</i> ::kanMX4	Euroscarf, Deutschland
<i>S. cerevisiae</i> AS198	Mat a ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; <i>DNM1</i> -GFP-loxP-KanMX- loxP	diese Arbeit
<i>S. cerevisiae</i> AS373	Mat a ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; Δ <i>fis1</i> ::kanMX4; <i>DNM1</i> -GFP-loxP- KanMX-lox	diese Arbeit
<i>S. cerevisiae</i> AS424	Mat α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; Δ <i>mdv1</i> ::kanMX4; <i>DNM1</i> -GFP-loxP- KanMX-lox	diese Arbeit
<i>S. cerevisiae</i> AS501	Mat a ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; Δ <i>caf4</i> ::kanMX4; <i>DNM1</i> -GFP-loxP- KanMX-lox	diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide

Tab. 2: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Unterstrichene Bereiche markierten die eingefügten Schnittstellen.

Name	Sequenz 5'-3'	Quelle
Om45-up- <i>HindIII</i>	GCG <u>AAGCTT</u> GGCCAGTAACGTTAATCA	IBA
Om45-down- <i>KpnI</i>	GCGGGT <u>ACCGTC</u> CTTTTTTCGAGCTCCA	IBA
KanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	IBA
KanC	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	IBA
Dnm1-A	GTACCTTGATCGCCACCTTT	IBA
Dnm1-B	TTTCGATTTCTCTTTTGATATCGTC	IBA
Dnm1-C	AAAGGCAGTTATGTGTTTACTCGTC	IBA
Dnm1-D	GTTCTATACCTTTAGGTAGAGC	IBA
GFP-out-2	GTTGCATCACCTTCACCCTC	IBA
Mdv1-A	CCAATAGTTGACAGTGAGTGCATAC	IBA
Mdv1-D	TTTTTCAATAGCAAGGATGAAAAAG	IBA
Fis1-A	CATTGCCACTATTCTGCACAGA	IBA
Fis1-D	AATGATAAATGTTTACGCGTGCG	IBA
Dnm1-tagging- up	TATAAAAAGGCTGCAACCCTTATTAGTAA TATTCTGGGTCGACGGATCCCGGG	IBA
Dnm1-tagging- down	ATTTTTATTAACAAGAAAAAGAATGGAGA GGAGAGCATCGATGAATTCGAGCTC	IBA
DsRed-up- <i>XbaI</i>	CGT <u>TCTAGAT</u> CGCTGTGATTCGGCAAATG	IBA
DsRed-down- <i>SacI</i>	CGT <u>GAGCTC</u> CTACAGGAACAGGTGGGTGG	IBA
DsRed-up- <i>BamHI</i>	GCGGGATCCCCACTAGTCGCCACCATG	IBA
DsRed-down- <i>HindIII</i>	GCG <u>AAGCTT</u> CTACAGGAACAGGTGGTG	IBA
Sequenzierung Übergang Dnm1-GFP	CGGTATTAATGGTACTTC	IBA
Abstandshalter Dnm1p / GFP	GGTCGACGGATCCCCGGGTAAATTAAC	Wach <i>et al.</i> , 1997

2.3 Plasmide und Vektoren

Tab. 3: Die in der Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren sind in dieser Tabelle zusammengefasst.

Plasmid	Merkmale	Lokalisation	Quelle
pVT100U mt-GFP	Amp; 2 μ -URA3, ADH	Matrix Su9(1-69)-GFP	Westermann und Neupert, 2000
pAS43 OM45-GFP	Amp; 2 μ -URA3, ADH	äußere Membran Om45p-GFP	diese Arbeit
pSJ55 mtDsRed	Amp, 2 μ -HIS3, TPI	Matrix Su9(1-69)-DsRed	Jakobs <i>et al.</i> , 2003
pHS12- DsRed.T4	Amp; 2 μ -Leu2, ADH	innere Membran Cox4p-DsRed	Bevis und Glick, 2002
pYX222- mtDsRed	Amp; 2 μ -His3, TPI	Matrix Su9(1-69)-DsRed	Martin Andresen
pFAa- GFP(S65T)- kanMX6	G418-Resistenz	Verwendet als PCR- Matrize zur C- terminalen Epitop- Markierung	Wach <i>et al.</i> , 1997

Die Vektorkarten der verwendeten Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

2.4 Puffer und Lösungen

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Alle weiteren Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden separat aufgeführt.

- 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan; 20 mM Natriumacetat-Trihydrat; 2 mM EDTA; pH 7.2 mit Essigsäure einstellen)
- 1xPBS-Puffer (137 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄; pH 7.4)

2.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tab. 4: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

Substanz	Hersteller
1.5-Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
Acetone	Merck
Acrylamid	Roth
Agarose	Sigma
Agarose (low melting)	Sigma
Alexa Fluor 546 Phalloidin	Molecular Probes, Niederlande
Alkalische Phosphatase	Biolabs
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin	Sigma
anti-ATPase-IgG	Molecular Probes, Niederlande
anti-DsRed-IgG (monoklonal)	BD Bioscience
anti-GFP-IgG (polyklonal)	Abcam, Großbritannien
anti-Hase-IgG mit Meerrettich-Peroxidase	Amersham Biosciences
anti-Hexokinase-IgG (polyklonal)	BioGenes, Deutschland
anti-Maus-IgG mit Meerrettich-Peroxidase	Amersham Biosciences
Chloroform	Merck
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's)	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
ECL-System	Roche
Elektroporationsküvetten	PeqLab
Ethanol 100 %	Merck

Material

Ethidiumbromid	AppliChem
G418 Sulfat	Calbiochem
HEPES	Merck
Immersionsöl	Leica
Kaliumchlorid	Merck
Ligase	Biolabs
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natronlauge (NaOH)	Merck
Pfu-Polymerase	Stratagene
Phenol	Roth
Poly-L-Lysin 0.1 % w/v in Wasser	Sigma
Proteinstandard zweifarbig "Precision Plus"	Biorad
Qiagen-Kits	Qiagen
Restriktionsenzyme	Biolabs
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Merck
Sorbitol	Sigma
Taq-Polymerase	Biolabs
Tris-HCl	ProLabo
Triton X-100	Merck

2.6 Medien und Agarplatten

2.6.1 Vollmedium für *S. cerevisiae*

Tab. 5: In den Tabellen sind Vollmedien für die Bäckerhefe aufgelistet.

YPD-Vollmedium	Menge / Liter	Quelle
Hefe-Extrakt	10 g	Applichem
Pepton	20 g	Applichem
Glukose	20 g	Merck
Uracil	20 ml (1 g/l)	Serva
Adeninsulfat	20 ml (1 g/l)	Serva
<u>für Platten:</u> + Agar + NaOH	20 g 1 Plätzchen	Difco

YPGal-Vollmedium	Menge / Liter	Quelle
Hefe-Extrakt	10 g	Applichem
Pepton	20 g	Applichem
Galaktose	20 g	Serva
Uracil	20 ml (1 g/l)	Serva
Adeninsulfat	20 ml (1 g/l)	Serva
<u>für Platten:</u> + Agar	20 g	Difco

2.6.2 Vollmedium für *E. coli*

Tab. 6: In der Tabelle ist die Zusammensetzung des für *E. coli* verwendeten LB-Mediums aufgelistet

LB-Medium (Luria-Bertani)	Menge / Liter	Quelle
Yeast Extract	5 g	Applichem
NaCl	5 g	Merck
Pepton	10 g	Applichem
1N NaOH	5 ml	Merck
<u>für Platten:</u> + Agar	14 g	Applichem

2.6.3 Mangelmedium für *S. cerevisiae*

Tab. 7: Hefezellen können neben der Verwendung von Antibiotika auch auf Aminosäuren selektiert werden. Dabei muss das transformierte Plasmid für eine Aminosäure kodieren, die der Organismus nicht selber herstellen kann, die aber trotzdem essentiell ist. In der Tabelle sind Medien für eine Selektion auf Uracil und Histidin aufgelistet.

PM-Gal (-Ura-Medium)	Menge / Liter	Quelle
Yeast Nitrogen Base	1,7 g	Becton Dickinson
Ammoniumsulfat	5 g	Serva
Pepton	5 g	AppliChem
Galaktose	20 g	Serva
Adeninsulfat	20 ml (1 g/l)	Serva
<u>für Platten:</u> + Agar	20 g	Difco

SC-(-His)-Medium (Synthetic-Complete-Medium ohne His)	Menge / Liter	Quelle / Bemerkung
Yeast Nitrogen Base	1,7 g	Becton Dickinson
Ammoniumsulfat	5 g	Serva
Glucose	20 g	Merck
Drop-out Mix ohne His	2 g	Zusammensetzung siehe unten
<u>für Platten:</u> + Agar	20 g	pH 6.0 – 6.5 einstellen

2.6.4 Sporulationsplatten

Tab. 8: Diploide Hefezellen können unter Mangelbedingungen wie Acetat als Kohlenstoffquelle Ascosporen ausbilden. Die Zusammensetzung der verwendeten Kalium-Acetat-Platten ist in dieser Tabelle aufgelistet.

Kalium-Acetat-Platten (zur Sporulation)	Menge / Liter	Quelle / Bemerkung
Kaliumacetat	10 g	AppliChem
Agar	10 g	Difco
Aminosäuren	5 mg ade, ura, his, trp 8 mg leu, lys	AppliChem Serva

2.6.5 “Drop-out”-Mischung

Tab. 9: Der „Drop-out-Mix“ ist eine Kombination aller Aminosäuren ohne die entsprechende Komponente, auf die selektiert werden soll. Wichtig ist eine gute Zerkleinerung und Vermischung der Komponenten vor der Verwendung.

Aminosäure		Aminosäure	
Adenine	0,5 g	Leucine	4,0 g
Alanine	2,0 g	Lysine	2,0 g
Arginine	2,0 g	Methionine	2,0 g
Asparagine	2,0 g	para-Aminobenzoic-Säure	0,2 g
Aspartic acid	2,0 g	Phenylalanine	2,0 g
Cysteine	2,0 g	Proline	2,0 g
Glutamine	2,0 g	Serine	2,0 g
Glutamic acid	2,0 g	Threonine	2,0 g
Glycine	2,0 g	Tryptophan	2,0 g
Histidine	2,0 g	Tyrosine	2,0 g
Inositol	2,0 g	Uracil	2,0 g
Isoleucine	2,0 g	Valine	2,0 g

2.6.6 Antibiotika-Zusätze

- G418 (200 µg/ml; Calbiochem, Deutschland)
- Ampicillin (100 µg/ml; Sigma, Deutschland)

Die Antibiotika werden den autoklavierten Medien erst zugegeben, wenn diese auf 40-50°C abgekühlt sind.

2.7 Geräte

Tab. 10: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller
Allgemeine Glaswaren	Schütt
Autoclav „Fedegari“	Integra Biosciences
Brutschränke	Heraeus
Elektrophoresekammern	Werkstatt MPI /Serva
Elektroporationsgerät „Gene Pulser“	Biorad
Eppendorff-Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorff
Feinwaagen	Sartorius
Gefrierschrank -80°C	Heraeus
Gefrierschränke -20°C	Bauknecht
Heizrührer „Ikamag RET“	Ika Labortechnik
Inkubationsschüttler	Braun Biotech International
Kühlschränke 4°C	Liebherr
Lumi Imager	Mannheim-Boehringer
Mikromanipulator	Singer Instruments
Mikrowelle	Siemens
Milli-Q Anlage	Millipore
pH-Meter “CG 822”	Schott Geräte
Photometer “Uvikon 810”	Kontron Instruments
Speedvac “Speedvac Concentrator”	Savant
Thermomixer 5436	Rettberg
Vortex “Genie TM”	Bender und Holbein
Wasserbäder	Köttermann
Zentrifuge “Biofuge fresco”	Heraeus
Zentrifuge “Sorvall RC-5B”	DuPont Instruments

3 Methoden

3.1 Molekulargenetische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis *et al.*, 1986)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ermöglicht eine Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen und stellt einen sehr sensitiven Nachweis von geringen DNA-Mengen dar. Durch den wiederholten Ablauf von Doppelstrangtrennung, Bindung zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und der DNA-Synthese durch hitzestabile DNA-Polymerasen wird eine exponentielle Synthese von DNA-Molekülen aus Desoxynukleosid-triphosphaten (dNTP) erreicht. Die Reaktionen finden bei unterschiedlichen Temperaturen in einem programmierbaren Thermocycler (T-Gradient, Biometra) statt.

Für einen Ansatz von 50 µl werden 5 µl 10x-PCR-Puffer, 1 µl dNTP's (20 mM), 1 µl DNA-Matrize (~ 100 ng), je 1 µl pro Primer (1 µM) und 1 µl Polymerase zugegeben. Bei einer PCR auf chromosomaler DNA wird zusätzlich 1 µl DMSO zugegeben (ad 50 µl H₂O dest.). Für analytische Nachweise wird die Taq-Polymerase (Biolabs) verwendet, für die Synthese von DNA-Abschnitten wird die Pfu-Polymerase (Fermentas) wegen ihrer geringeren Fehlerquote durch Korrekturlesen verwendet.

Ein typisches Programm besteht aus 2 min Aufschmelzen der DNA bei 95°C zu Beginn, dann einer sich ~30x wiederholenden Einheit aus DNA-Aufschmelzung (1 min bei 95°C), Primeranlagerung (~55°C, Primer-abhängig) und Neusynthese (72°C). Es schließt sich eine 10 minütige Synthese bei 72°C an, um nicht vollständig synthetisierte PCR-Produkte aufzufüllen. Danach werden die Proben auf 4°C gekühlt und im Gefrierfach gelagert. Die Zeitspanne der Neusynthese richtet sich nach der Geschwindigkeit der Polymerasen (*taq*: 1 kb/1 min; *pfu*: 0.5 kb/1 min) und der Länge

des zu synthetisierenden Stranges. Die Anlagerungstemperatur der Primer kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$T_m = 69.3 + 0.41 \cdot (G+C)\% - 650 / \text{Länge des Oligonukleotids}$$

- 10x-PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂)

3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Von einer Übernacht-Kultur (üN-Kultur) werden 1.5 ml bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet in 200 µl P1-Puffer (Qiagen) suspendiert. Danach werden 200 µl P2-Puffer (Qiagen) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Lösung wird viskos, die Bakterienzellwand wird aufgespalten. Nach Zugabe von 200 µl P3-Puffer (Qiagen) bildet sich ein weißer Niederschlag, die zellulären Proteine werden ausgefällt. Die Proben werden 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorff, 1.5 ml) überführt. Die Plasmid-DNA wird in 1 ml 100 % Isopropanol gefällt und die Probe bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 70 % eiskalter Ethanol-Lösung gewaschen und nach der Trocknung in 50 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

- P1-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A)
- P2-Puffer (200 mM NaOH; 1 % SDS)
- P3-Puffer (3.0 M Kaliumacetat, pH 5.5)

3.1.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

10 ml einer Hefe-Übernachtskultur werden für 2 min bei 3000 rpm in einer Zentrifuge (Sigma 3-10) zentrifugiert. Das Pellet wird in 0.5 ml destilliertem Wasser resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Danach werden 0.2 ml einer Lösung aus 2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 1 mM Na₂EDTA zugegeben. Unter dem Abzug fügt man 0.2 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und 0.3 g Glasskugelchen zu. (Die Glasskugelchen wurden zuvor in rauchende Salpetersäure über Nacht eingelegt, in

heißer 1 % SDS-Lösung gewaschen und anschließend mehrfach mit Wasser gespült und getrocknet.) Die Proben werden 3-4 min gevortext, die Glaskügelchen schließen die Zellen auf. Danach werden 0.2 ml TE-Puffer (pH 8.0) zugegeben und die Proben für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wäßrige Schicht wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA in 1 ml 100 % Ethanol gefällt. Die durch Invertieren gemischte Probe (Vortexen würde die chromosomale DNA durch Scherkräfte beschädigen) wird 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 0.4 ml TE mit 10 mg/ml RNase A aufgenommen. Die Probe wird für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die chromosomale DNA durch Zugabe von 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 100 % Ethanol erneut gefällt. Die DNA wird 2 min bei 13.000 rpm pelletiert und luftgetrocknet. Das Pellet wird in 30 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

- 1xTE-Puffer (10mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7.5)

3.1.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Überprüfung von Plasmiden oder zu präparativen Zwecken kann DNA an spezifischen Stellen durch Restriktionsenzyme gespalten werden. Dazu werden in einem 20 µl-Ansatz 1-10 µl der DNA (abhängig von der Ausgangskonzentration und dem Verwendungszweck) mit 2 µl des auf die Enzyme abgestimmten 10x-Puffers und 1 µl der Restriktionsenzyme gemischt (ad 20 µl H₂O dest.). Die Restriktion erfolgt (wenn nicht anders vorgeschrieben) bei 37°C für 2 h. Der Ansatz wird anschließend mit Hilfe der horizontalen Gelelektrophorese (siehe 3.1.7) aufgetrennt und analysiert. Für eine spätere Ligation oder Integration kann ein gespaltenes DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt werden.

3.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um Religationen zu vermeiden, kann der geschnittene Vektor direkt nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von 1 µl Alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIP, BioLabs, New England) zum Restriktionsansatz dephosphoryliert werden. Der Ansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert und die Phosphatase anschließend durch einen Temperatur-Anstieg auf 65°C für 10 min inaktiviert. Die Probe wird mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) vor der Ligation aufgereinigt.

3.1.6 Ligation mit der T4-Ligase

Um zwei DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu verknüpfen, wird 1 µl des geschnittenen Vektors mit einem 3-fach molekularen Überschuss an Insert-DNA in 1 µl 10x-Ligasepuffer vermischt und 1 µl T4-Ligase zugegeben (ad 10 µl H₂O dest.). Der Ansatz wird entweder 4 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert.

3.1.7 Horizontale Gelelektrophorese

DNA-Fragmenten werden nach ihrer Grösse in einem 1 % igem Agarosegel aufgetrennt. Dabei verhält sich die Grösse der Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Gel. Die Proben werden in 6x-Auftragspuffer aufgenommen und in die Auftragstaschen geladen. Die Gelelektrophorese erfolgt in 1x TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 80-100 V. Danach wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad (~1 µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, wodurch diese unter UV-Licht sichtbar gemacht und in einer Gel-Dokumentationsanlage fotografiert werden kann.

- 6x-Auftragspuffer (6 ml 10x TAE; 3.5 ml 87 % Glycerin, autoklaviert; 15 mg Bromphenolblau; 15 mg Xylencyanol; 0.4 ml H₂O)
- 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan; 20 mM Natriumacetat-Trihydrat; 2 mM EDTA; pH 7.2 mit Essigsäure einstellen)

3.1.8 Klonierung der verwendeten Fluoreszenzmarker

3.1.8.1 *pAS43-OM45p-GFP*

Das Plasmid *pAS43-OM45-GFP* basiert in seinem Grundgerüst auf dem Vektor *pVT100U-mtGFP* (Westermann und Neupert, 2000), einem Plasmid mit 2µ-Replikationsursprung, ADH-Promotor (konstitutiver Alkohol-Dehydrogenase Promotor) und *Su9(1-69)-GFP*. Die für einen Teil der Untereinheit 9 der F₀-ATPase von *Neurospora crassa* kodierende Präsequenz wurde mit *HindIII* und *KpnI* herausgeschnitten. An ihre Stelle wurde das *OM45*-Gen mit den gleichen Schnittstellen eingefügt. Das 1223 bp große DNA-Fragment, welches für *OM45p* und 41 bp der stromaufwärts gelegenen Sequenz kodiert, wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe Methoden 3.1.1) amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide (Primer) *OM45-up-HindIII* und *OM45-down-KpnI* verwendet (Sequenz siehe Material 2.2). Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass die Sequenz des *OM45*-Gens einen offenen Leserahmen mit der Sequenz des C-terminalen GFP bildet.

3.1.8.2 *pSJ55-mtDsRed*

Der Vektor pSJ55-mtDsRed basiert auf dem Vektor pRS323. Mit Hilfe der PCR wurde die Sequenz von TPI-Su9 AS1-69-DsRed mit den Primern DsRed-up-*Xba*I und DsRed-down-*Sac*I (Sequenz siehe Material 2.2) amplifiziert. Dabei diente das Plasmid P13-Su 9 (1-69) DsRed als Matrize. Die überhängenden Enden des PCR-Fragments wurde mit der T4-Polymerase aufgefüllt und in den mit *Sma*I geschnittenen Vektor pRS323 inseriert. DsRed wird durch die Präsequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATPase von *Neurospora crassa* in die mitochondriale Matrix adressiert.

3.1.8.3 *pYX222-mtDsRed*

Der Vektor pYX222-mtDsRed wurde konstruiert, um die mitochondriale Matrix mit DsRed zu markieren. Dazu wurde die für DsRed.T4 codierende Sequenz des Plasmids pHS12-DsRed.T4 (Bevis und Glick, 2002) durch PCR mit den Primern DsRed-up und DsRed-down amplifiziert (Sequenzen siehe Material 2.3). Das PCR-Fragment wurde anschließend mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den Basisvektor pYX222 (R&D Systems, USA) ligiert. Um das Fluoreszenzprotein in die mitochondriale Matrix zu adressieren, wurde die Untereinheit 9 (AS 1-69) der F₀-ATPase von *Neurospora crassa* aus dem Vektor pVT100U (Westermann und Neupert, 2000) mit *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten und unter Berücksichtigung des Leserasterrahmens stromaufwärts vor die DNA-Sequenz von DsRed kloniert. Das Konstrukt steht unter Kontrolle des konstitutiven TPI-Promotors (Triosephosphat-Isomerase-Promotor). Der mit Hilfe von Restriktionsspaltungen überprüfte Vektor wurde in die Stämme AS198, AS373, AS424 und AS501 transformiert, wo mtDsRed nun die mitochondriale Matrix markiert.

3.2 *Proteinbiochemische Methoden*

3.2.1 Mitochondrienreinigung aus Hefe (Daum, 1982)

3.2.1.1 *Vorbereitung der Zellen*

Zwei Liter über Nacht gewachsener Hefezellen werden bis zu einer OD₆₀₀ von 1-2 in YPGal-Medium (oder je nach verwendetem Stamm in Selektionsmedium) angezogen und anschließend bei 3000 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Die Zellen werden in 200 ml H₂O resuspendiert und erneut 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Nassgewicht der Zellen wird bestimmt (2 l OD₆₀₀ ergeben ca. 10 g). Die Zellen werden in 30 ml 100 mM Tris-Puffer mit 10 mM DTT resuspendiert und 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 40 ml 1.2 M Sorbitol-Puffer gewaschen und anschließend in 40 ml 1.2 M Sorbitolpuffer aufgenommen.

3.2.1.2 *Spheroplastieren der Zellen*

Pro 3 mg/g Zellen wird Zymolase-100T (100 Units/Gramm; MP Biomedicals, USA) in 1 ml 1.2 M Sorbitol-Puffer gelöst und zu den resuspendierten Zellen gegeben. Die Zellen werden in einem 30°C-Schütter für 20-40 min inkubiert, um die Zellwand abzudauen. Um den Erfolg der Spheroplastierung zu überprüfen, werden 20 µl der Zellen in 1 ml H₂O gegeben und die Klärung der Suspension (durch osmotisches Aufplatzen der Zellen) am Photometer (OD₆₀₀) verfolgt. Die Spheroplasten werden bei 3000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und in 40 ml 1.2 M Sorbitol-Puffer aufgenommen (nur vorsichtiges Schütteln).

Ab jetzt werden alle Vorgänge bei 0°C und die Zentrifugationsschritte in einer vorgekühlten Zentrifuge auf 2°C durchgeführt.

Die Zellen werden bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert, in 40 ml 1.2 M Sorbitol-Puffer vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in 30 ml 2xBB mit 1 mM PMSF aufgenommen und auf ein Endvolumen von 60 ml mit eiskaltem H₂O mit 1 mM PMSF aufgefüllt. Es ist besonders wichtig, PMSF jeweils frisch zuzugeben.

3.2.1.3 *Isolierung der Mitochondrien*

Die spheroplastierten Zellen werden mit einem Glashomogenisator durch etwa 15 Auf- und Abbewegungen homogenisiert und die Suspension bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird aufgefangen und je nach erforderlicher Ausbeute

noch einmal homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wird bei 12.000 rpm für 12 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1xBB ohne PMSF mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Um die Reinheit der Mitochondrienfraktion zu erhöhen, wird erneut ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm für 5 min durchgeführt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der Überstand wird wieder bei 12.000 rpm für 12 min zentrifugiert und das Pellet in 0.5 ml 1xBB aufgenommen. Für eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford werden 20 µl der Suspension separiert, bevor 7 Vol % einer BSA-Lösung zugegeben werden (etwa 5 mg/ml BSA). Die Suspension wird zu Aliquots von 30-50 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Verwendete Lösungen:

- Tris-Puffer mit DTT (100 mM Tris-SO₄ (pH 9.4); 10 mM DTT)
- 1.2 M Sorbitol-Puffer: 1.2 M Sorbitol, 20 mM KP_i (pH 7.4)
- 2xBB (mit 1mM PMSF): 1.2 M Sorbitol, 40 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM PMSF, 0.2 % BSA
- 1xBB: 0.6 M Sorbitol, 20 mM Hepes (pH 7.4)
- BSA-Lösung: 75 mg/ml BSA (Fettsäure-frei; Sigma), 0.6 M Sorbitol

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford MM, 1976)

Diese Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung (BioRad-Protein Assays, BioRad, München) basiert auf einer Absorptionsverschiebung von Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG), wenn der Farbstoff an Arginin und aromatische Reste gebunden ist. Die anionische (gebundene Form) besitzt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, während die kationische (ungebundene) Form ein Absorptionsmaximum bei 470 nm besitzt. 800 µl der verdünnten Proteinlösung werden mit 200 µl des Färbereagens vermischt, 15 min bei RT inkubiert und der OD₅₉₅-Wert bestimmt. Anhand der Eichkurve mit bekannter BSA-Konzentration läßt sich die Proteinkonzentration der Probe abschätzen.

3.2.3 Biochemische Analyse der Proteinlokalisierung in Mitochondrien

Um die Position und Orientierung von Proteinmarkern in Mitochondrien zu bestimmen, werden unterschiedliche Subfraktionen von Mitochondrien untersucht. Es werden Proteine von unbehandelten Mitochondrien als Gesamtextrakt verwendet (Fraktion 1), Mitochondrien, bei denen die Proteine der äußeren Membran entfernt wurden (Fraktion 2), Mitoplasten (Fraktion 3) und Mitoplasten ohne außen angelagerte Proteine (Fraktion 4). In Fraktion 5 wird zwischen membrangebundenen (Pellet) und freien Proteinen (Überstand) unterschieden, Fraktion 6 dient als Negativkontrolle, alle Proteine sollten hier degradiert sein. 600 µg der aufgereinigten Mitochondrien werden

in einem Endvolumen von 130 μl SEM-Puffer aufgenommen, alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Je 20 μl der Lösung werden in 6 Reaktionsgefäßen verteilt und folgende Substanzen zugefügt:

- Fraktion 1: 80 μl SEM
- Fraktion 2: 80 μl SEM; 100 $\mu\text{g/ml}$ (Endvolumen) frisch angesetzter PKK (Proteinkinase K)
- Fraktion 3: 180 μl HEPES (20 mM) pH 7.4
- Fraktion 4: 180 μl HEPES (20 mM) pH 7.4; 100 $\mu\text{g/ml}$ (Endvolumen) Proteinkinase K
- Fraktion 5: zunächst Ultrazentrifugation vor Zugabe weiterer Substanzen
- Fraktion 6: 80 μl SEM; 2.5 μl 20 % Triton X-100 (0.5 % Endvolumen); 100 $\mu\text{g/ml}$ (Endvolumen) Proteinkinase K

Die Reaktionsgefäße werden 25 min auf Eis gestellt und anschließend in alle Gefäße (bis auf Fraktion 5) 1 mM PMSF zugegeben. Die Fraktionen 1-4 werden 10 min bei 12.000 rpm und 2°C zentrifugiert. Das Pellet wird in SEM-Puffer/0.1 mM PMSF gewaschen und erneut 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Pellets werden bei -20°C eingefroren.

Die Proteine von Fraktion 6 werden mit 10 μl 100 % (w/v) Trichlor-Essigsäure (TCA) gefällt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Probe 15 min bei 14.000 rpm und 2°C zentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wird nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm getrocknet und bei -20°C eingefroren.

Fraktion 5 wird bei 12.000 rpm und 2°C zentrifugiert und das Pellet in 100 μl 0.1 M Na_2CO_3 /1mM PMSF gelöst. Die Suspension wird 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 1 h bei 45.000 rpm (Ultrazentrifuge) und 2°C zentrifugiert. Das Pellet wird bei -20°C eingefroren und der Überstand wie in Fraktion 6 mit TCA gefällt und ebenfalls eingefroren.

- SEM-Puffer: 250 mM Sucrose; 1 mM EDTA; 10 mM MOPS/KOH; pH 7.2

3.2.4 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden in einem SDS-Gel (*sodium-dodecylsulfat*)elektrophoretisch aufgetrennte (*SDS-Page*) Proteingemische auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Die zu untersuchenden Proteine können mit Hilfe von z.B. Peroxidase-markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden.

3.2.4.1 SDS-Page

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (kDa) werden die Proteine (10-50 µg, je nach Versuch) in 2x-Auftragspuffer (ca. 40 µl) aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Um Zellfragmente in der Proteinlösung zu vermeiden, werden die Proben für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf ein 12.5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Als Größenreferenz wird ein Proteinmarker (BenchMark Prestained, Invitrogen) verwendet. Die SDS-Minigele bestehen aus einem 12.5 %igen Trenngel (6.3 ml Wasser; 5 ml 1.5 M Tris-Puffer pH 8.8; 8.3 ml 30 % Acrylamid; 200 µl 10 % SDS; 200 µl 10 % APS; 20 µl TEMED; Ansatz für 4 Gele), welche nach dem Gießen mit gesättigtem Isopropanol überschichtet werden. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das Isopropanol entfernt und mit einem 5 %igem Sammelgel mit Kamm überschichtet (5.6 ml Wasser; 2.5 ml 0.5 M Tris-Puffer pH 6.8; 1.7 ml 30 % Acrylamid; 100 µl 10 % SDS; 100 µl 10 % APS; 10 µl TEMED; Ansatz für 5 Gele). Die Proteine werden bei 20-30 mA/Gel elektrophoretisch in einer BioRad-Apparatur mit Elektrophorese-Puffer aufgetrennt. Die unterschiedlichen Ladungen und Teilladungen der Proteine werden durch das im Auftragspuffer enthaltene negativ geladene SDS ausgeglichen, so dass die Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden.

- 2x-Proteinauftragspuffer (0.1 M Tris-HCl pH 6.8; 2 % β-Mercaptoethanol; 2 % SDS; 20 % Glycerin; 0.002 % Bromphenolblau)
- Elektrophorese-Puffer (0.25 M Tris pH 8.3; 1.93 M Glycin; 1 % SDS)

3.2.4.2 Proteintransfer (Blotting)

Um die zu untersuchenden Proteine spezifisch detektieren zu können, müssen sie aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden. In dieser Arbeit wird das Nassblot-Verfahren gewählt. Hierzu werden in Transferlösung getränkte und auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene luftblasenfreie Stapel gebildet, die in folgender Reihenfolge geschichtet werden: Vlies, zwei Whatman-Papiere, Gel, Nitrocellulose-Membran, zwei Whatman-Papiere, Vlies. Der Stapel wird in ein Gitter eingespannt und die Proteine werden bei einer angelegten Spannung von 30 V in einer

BioRad-Apparatur über Nacht im Kühlraum auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Da die Proteine durch die Behandlung mit SDS negativ geladen sind, erfolgt der Transfer Richtung Kathode. Eine Elektrolyse der Transferlösung wird durch Rühren mit einem Magnetrührer verhindert.

- Transferpuffer (20 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin, 20 % Methanol)

3.2.4.3 Antikörper Detektion

Um aus dem aufgetrennten Proteingemisch ein spezifisches Protein detektieren zu können, werden Antikörper gegen das Protein oder gegen ein Epitop des Proteins verwendet. Ein zweiter Peroxidase-markierter Antikörper erkennt den ersten. Die Verwendung von sekundären Antikörpern hat den Vorteil, dass nicht jeder spezifische Antikörper für die Detektion markiert werden muss. Außerdem lagern sich an den ersten Antikörper gleich mehrere sekundäre Antikörper, was zu einer Signalverstärkung führt.

Bevor die Antikörper-Detektion erfolgen kann, muss die Membran 1 h bei RT mit 4 % Milchpulver in TBS geblockt werden, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wird der erste Antikörper in 4 % Milchpulver in TBS verdünnt (individuell für jeden Antikörper) und mindestens 2 h bei RT (oder üN bei 4°C) auf einem Kipp-Schüttler inkubiert. Die Membran wird anschließend 10 min mit Waschpuffer A, dann 2x 5 min mit Waschpuffer B und wiederum 10 min mit Waschpuffer A gewaschen. Der zweite Antikörper wird 1:10.000 in 4 % Milchpulver in TBS verdünnt und 1-2 h bei RT inkubiert. Die Membran wird wie nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper mit Waschpuffer A und B gewaschen. Wird ein besonders schwaches Signal erwartet, kann die Behandlung mit Waschpuffer B ausgesetzt werden.

Zur Detektion des zweiten mit Peroxidase markierten Antikörpers werden die zwei ECL-Lösungen (Lumi-LightPlus, Roche) im Verhältnis 1:1 vermischt (0.1 ml/cm²) und sofort für 1 min auf die Membran gegeben. Die Peroxidase am sekundären Antikörper setzt enzymatisch eine Lichtreaktion der Luminol enthaltenen ECL-Lösung in Gang. Die Chemifluoreszenz kann mit Hilfe des Lumi-Imagers (Roche) detektiert werden.

- TBS-Puffer (137 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)
- Waschpuffer A (10 mM Tris HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl)
- Waschpuffer B (0.2 % SDS; 150 mM NaCl; 0.5 % Triton X100)

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

3.3.1.1 Elektrokompente DH5 α

DH5 α -Zellen werden in 500 ml LB (Zusammensetzung siehe Material 2.5.1) über Nacht angezogen, am nächsten Tag in LB-Medium verdünnt (~1:10) und bis 0.6 OD₆₀₀ bei 37°C inkubiert. Die Kultur wird 15-30 min auf Eis gestellt und anschließend 15 min bei 4000 rpm (gilt für alle weiteren Zentrifugationsschritte) im vorgekühlten Rotor (Sorvall RC-5B, DuPont Instruments, Wilmington, DE) zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml H₂O (eiskalt) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird mit 250 ml H₂O wiederholt. Das Pellet wird anschließend in 10 ml 10 % Glycerin gewaschen und in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Die Suspension wird zu je 40 μ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.3.1.2 Chemisch-kompetente Hefen (Knop et al., 1999)

Die Hefen werden in 500 ml YPD-Medium (Zusammensetzung siehe Material 2.5.2) über Nacht bei 30°C angezogen, die Kultur am nächsten Tag in YPD-Medium verdünnt (~1:10) und bis 0.5–0.7 OD₆₀₀ inkubiert. Die Zellen werden mit 500 x g bei RT zentrifugiert und das Pellet in 250 ml H₂O gewaschen. Das Pellet wird anschließend mit 100 ml SORB-Puffer waschen, zentrifugieren und Pellet in je 360 μ l SORB/50 ml Kultur resuspendiert. Die Zellen werden zu je 50 μ l in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

- SORB-Puffer (100 mM LiAc; 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA/NaOH (pH 8.0); 1 M Sorbitol; steril filtrieren)

3.3.1.3 Elektrokompente Hefen (Methods in Enzymology, Vol 194)

Um die Aufnahmeeffizienz der Zellen gegenüber Fremd-DNA zu erhöhen, kann eine Vorbehandlung der Zellen mit Lithiumacetat durchgeführt werden. Dieser Schritt ist zu empfehlen, wenn die eingebrachte DNA in das Genom integriert werden soll. Bei einer Plasmidtransformation kann dieser Schritt übersprungen werden.

a. Vorbehandlung mit LiAc

Eine Hefe-Kultur wird über Nacht in YPD bei 30°C inkubiert und am nächsten Tag in YPD verdünnt (~1:10). Nachdem sich die Hefen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden (OD₆₀₀ 0.8-1.2) werden 100 ml der Kultur entnommen und 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 17 ml LiAc aufgenommen. Nach 45 min Inkubation bei 30°C wird unter langsamem Schütteln 0.42 ml 1 M DTT zugegeben. Nach weiteren 15 min Inkubation bei 30°C werden 67 ml H₂O (4°C) zugegeben. Die weiteren Waschschriffe erfolgen wie für unvorbehandelte Zellen.

b. Vorbereitung der Hefezellen

50 ml der Hefe-Kultur (OD₆₀₀ unter 1.2) werden 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50 ml sterilem eiskaltem destillierten Wasser aufgenommen. Ab hier werden alle Arbeitsschritte auf 4°C durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschriffe mit eiskaltem Wasser wird das Pellet in 20 ml 1 M Sorbitol (steril, eiskalt) resuspendiert und erneut bei 3000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 0.5 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und auf Eis gestellt. 40 µl der Suspension werden für jeden Elektroporationsansatz verwendet. Die Zellen müssen frisch hergestellt werden, eine Lagerung bei -80°C ist nicht möglich.

3.3.2 Elektroporation

40 µl der frisch hergestellten elektrokompente Zellen werden mit der zu transformierenden DNA (100 ng oder mehr bei Plasmid, 2 µg oder mehr bei Integration) vermischt und 5 min auf Eis gestellt. Die Suspension wird in eine vorgekühlte sterile Küvette gegeben (1 mm Spaltbreite) und in der BioRad-Apparatur (Gene Pulser™) elektroporiert (*E. coli* 2.5 kV, Hefe 1.5 kV, 25 µF, 200 Ω). Nach sofortiger Zugabe von 200 µl kaltem 1 M Sorbitol werden die Zellen in ein steriles Reaktionsgefäß überführen. Wenn auf eine Antibiotika-Resistenz selektiert wird, werden die Zellen in Vollmedium (LB für *E. coli* und YPD für Hefen) 2 h inkubiert (37°C für *E. coli*, 30°C für Hefen), damit sich die Resistenzproteine bilden können. Bei Selektion auf Mangelmedium können die Zellen direkt nach der Transformation auf die Selektionsplatten ausgestrichen werden. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 37°C für *E. coli* und 30°C für Hefen.

3.3.3 Epitop-Markierung in Hefe

Die Strategie der Epitop-Markierung beinhaltet die Integration von DNA über homologe Rekombination. Dazu ist ein lineares DNA-Fragment notwendig, das von Bereichen flankiert wird, die komplementär zur Basenabfolge im Genom der Hefe sind. Über die Homologie zum Genom wird der Integrationsort bestimmt. Die lineare DNA wird mit Hilfe der PCR erstellt. Die Primer für die PCR umfassen ca. 60 bp und bestehen aus zwei funktionellen Bereichen. Das 5'-Ende (ca. 40 bp) des Primers ist für die Rekombination notwendig, während das 3'-Ende (ca. 20 bp) für die Amplifikation auf einem Plasmid notwendig ist. Das als Vorlage für die PCR dienende Plasmid enthält die Sequenz, die an das Gen angehängt werden soll (in dieser Arbeit das für GFP codierende Gen). Zusätzlich ist ein Selektionsmarker notwendig. Die Primer werden so gewählt, dass die Rekombination am 3'-Ende des zu markierenden Gens stattfindet. Das Stopcodon muss bei der Integration wegfallen und die angehängte Sequenz im richtigen Leseraster zusammen mit dem Zielgen abgelesen werden. Die zweite Homologie liegt im 3' untranslatierten Bereich des Zielgens.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Selektionsmarker besteht aus der Resistenzkassette KanMX4 (Wach *et al.*, 1994), welche für eine Amino-glycosid-3'-Phosphotransferase codiert. Dieses Protein vermittelt eine Resistenz gegenüber Aminoglykosiden wie G418 (Neomycinhomolog) und Kanamycin. Die kanMX-Kassette codiert weiterhin für einen TEF-Promotor und TEF-Terminator, wodurch eine kontinuierliche Expression des Resistenzproteins gewährleistet wird. Das Modul wird flankiert von zwei loxP-Seiten, die durch Zugabe der Cre-Rekombinase zur nachträglichen Entfernung der kanMX-Kassette verwendet werden können. Diese Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit nicht genutzt. Um die Aufnahme-Wahrscheinlichkeit des linearen PCR-Fragments zu erhöhen, werden die Hefezellen vor der Elektroporation mit Lithiumacetat behandelt (siehe 3.3.1.3 Elektrokompetente Hefen).

3.3.4 Kreuzung von Hefestämmen

Zur Kreuzung haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps (α und a) und Selektionsmarker (Wachstum auf unterschiedlichen Minimalmedien) werden die Zellen in YPD-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Eine konzentrierte Zellsuspension beider Kulturen wird als Kreuzungsausstrich auf eine Vollmediumplatte aufgebracht und miteinander vermischt. Die haploiden Hefen unterschiedlichen Paarungstyps fusionieren miteinander und bilden diploide Zellen mit gemischtem Chromosomensatz. Nach einem Tag Inkubation bei 30°C werden die Zellen auf Minimalmedium überstempelt. Nur diploide Hefen, die die Selektionsmarker beider Ausgangsstämme tragen, können wachsen.

3.3.4.1 Sporulation

Diploide Hefezellen können unter geeigneten Mangelbedingungen (stickstoffarmes Medium mit ungünstiger C-Quelle, z.B. Acetat) den meiotischen Zellzyklus durchlaufen und dabei einen Ascus mit vier haploiden Ascosporen ausbilden, in denen die genetische Information neu kombiniert wird. Zur Auslösung der Sporulation werden 5 ml Übernachtskultur der Zellen bei 3000 rpm (Zentrifuge Sigma 3-10) zentrifugiert und in Wasser gewaschen. Das Pellet wird für mindestens 3 Stunden in YPGal-Medium aufgenommen und die konzentrierte Zellsuspension anschließend auf Kaliumacetat-Platten (Zusammensetzung siehe Material 2.5.4) aufgetropft (nicht verstreichen). Nach zwei bis fünf Tagen Inkubation bei 30°C kann man die Bildung von Ascis mit jeweils vier Sporen (Tetraden) im Lichtmikroskop erkennen. In der Tetradenanalyse werden die Sporen dann voneinander getrennt.

3.3.5 Tetradenanalyse

Jeder Ascus ist von einer Askuswand umgeben, die vor der Tetradenanalyse enzymatisch angedaut werden muss. Dazu werden einige Zellen in 20 µl Zymolyaselösung (0.5 mg/ml in 1 M Sorbitol; Zymolase-100T, MP Biomedicals, USA) suspendiert und 6-8 min bei 30°C inkubiert. Danach werden vorsichtig 0.5 ml steriles Wasser zugegeben und der Ansatz auf Eis gestellt. 1-2 Tropfen der Lösung werden auf eine Vollmediumplatte aufgebracht und vorsichtig mit der Impföse am Rand der Platte verstrichen. Am Mikromanipulator können die vier Sporen eines Askus mit Hilfe einer feinen Glasspitze getrennt und separat auf der Vollmediumplatte ausgelegt werden. Die Platte wird bei 30°C 2 Tage inkubiert. Die gewachsenen Klone werden auf Selektionsplatten umgestempelt und mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion weiter untersucht.

3.3.6 Halo-Assay

Der Halo-Assay beruht auf der Tatsache, dass die beiden Paarungstypen der Hefe **a** und α -Faktoren in ihre Umgebung abgeben. Das Hormon (ein kleines Peptid) bewirkt beim jeweils anderen Geschlechtstyp eine Blockade der Mitose als Vorbereitung auf die Paarung und die darauffolgende Meiose. Diesen Effekt macht man sich zunutze, um den Paarungstyp einer Zelle zu bestimmen. Bringt man α -Zellen auf eine Agar-Platte mit stark verdünnten **a**-Zellen auf, hören die **a**-Zellen wegen des sekretierten α -Faktors der α -Zellen mit dem Wachstum auf. Um die α -Kolonie bildet sich eine Zone ohne Hefezellen (sog. „Halo“). Werden **a**-Zellen auf eine Platte mit **a**-Zellen aufgebracht, bildet sich keine Halo-Zone aus.

Der supersensitive Stamm RC 898 (Mat a; *leu2Δ0*; *can1Δ0*; *trp5Δ0*; *ade2Δ0*) wird bis zur spätlogarithmischen oder stationären Phase in YPD-Medium inkubiert. Es werden 200 ml YEPD-Medium + 0.8-1 % Agar (2g) in der Mikrowelle aufgekocht und im Wasserbad auf 42°C abgekühlt. Auf 100 ml Medium werden 500μl RC 898-Kultur gegeben und vorsichtig vermischt (Luftblasenbildung vermeiden). Das Gemisch wird dünn in Petrischalen ausgegossen. Die Platten sind 1 Woche bei 4°C lagerbar. Auf die Platten werden 5-15 μl der zu untersuchenden Kultur aufgetropft und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

Auswertung : Wenn sich ein klarer Hof um den Tropfen bildet, handelt es sich um einen α -Stamm, sonst um einen **a**-Stamm.

3.3.7 Mikroskopische Probenvorbereitung

3.3.7.1 Einbettung von lebenden Hefezellen

Die Hefezellen werden bis zur logarithmischen Wachstumsphase im 30°C-Schüttler inkubiert und 0.5 ml der Kultur bei 3000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wird in PBS gewaschen. Die lebenden Zellen werden in 15-20 μl Agarose (1 % in PBS, 50°C) aufgenommen und unter dem Deckglas eingebettet.

3.3.7.2 Fixierung der Hefezellen in Formaldehyd

Für die mikroskopische Charakterisierung von Dnm1p wurden die Zellen in 3.7 % Formaldehyd fixiert. Hierzu wird das Pellet in Formaldehyd aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet in PBS gewaschen. Formaldehyd ist giftig und wird separat entsorgt. Die fixierten Zellen werden wie die lebenden in 1 % Agarose unter dem Deckglas eingebettet.

3.3.7.3 Zerstörung des Aktinzytoskeletts mit Latrunculin A

Um das Aktinzytoskelett von Hefezellen zu zerstören, werden 250 μM Latrunculin A (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zu den Zellen gegeben und bei RT für 40 min inkubiert. Danach werden die Hefen mit PBS gewaschen und in 3.7 % Paraformaldehyd fixiert. Die vollständige Zerstörung des F-Aktins kann mit einer Färbung mit 2.5 μM Alexa 546-Phalloidin (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 1 h bei RT überprüft werden. Nach 5 min kann F-Aktin nicht mehr detektiert werden.

3.3.7.4 Immobilisierung von Hefezellen mit Polylysin

Für die Aufnahmen am 4Pi-Mikroskop (Leica Microsystems CMS GmbH, Deutschland) werden die Hefezellen bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und 1 ml der Kultur zentrifugiert. Die Zellen werden in H₂O dest. gewaschen und anschließend in 3.7 % Formaldehyd für 10 min fixiert. Das verwendete Quarzdeckglas mit einer mit Aluminium verspiegelten Ecke (für die vereinfachte Justierung des Mikroskops) wird mit Poly-Lysin für 20 min beschichtet und das überschüssige Poly-L-Lysin abgespült.

Auf das getrocknete Deckglas werden auf einer Seite Fluoreszenzkügelchen (FluoSpheres yellow-green 0.1 µm (505/515); FluoSpheres orange 0.1 µm (540/560); Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zur Vereinfachung der Mikroskop-Justierung aufgebracht. Nach 15 min werden die Kügelchen entfernt, die sich in diesem Zeitraum nicht abgesetzt haben. Auf den ausbleibenden Bereich werden die fixierten Hefezellen gegeben und 20 min gewartet, bis sie sich abgesetzt haben. Die überschüssigen Zellen werden abgesaugt, die Probe mit 87 % Glycerin mit PBS überschichtet und mit einem zweiten Quarzdeckglas abgedeckt.

Für die 4Pi-Mikroskopie ist es wichtig, dass sich die Probe zwischen zwei Deckgläsern identischer Dicke befindet, da von beiden Seiten durch zwei Objektive jeweils angeregt und detektiert wird und die Umgebungsbedingungen für das ein- und austretende Licht daher identisch sein müssen. Zwischen beiden Deckgläsern befindet sich das Immersionsmedium, in diesem Fall 87 % Glycerin, da Glycerinobjektive verwendet werden. Die auf den 4Pi-Probenhalter aufgebrachten Deckgläser müssen vor Austrocknung geschützt werden, indem die Ränder luftdicht mit einem nicht-toxischen Zweikomponentenkleber auf Silikonbasis (Twinsil von Picodent, Additionsvernetztes Dubliersilikon für die Zahntechnik) versiegelt werden. Die Aufnahmebedingungen sind im Mikroskop-Teil näher beschrieben.

- PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄; pH 7.4)

3.3.8 Photokonversion von GFP in Hefemitochondrien

Photoaktivierbare Fluoreszenzproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre spektralen Eigenschaften als Antwort auf Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge und Intensität ändern können. Dabei konvertieren einige von einem dunklen zu einem hellen Fluoreszenzstatus (z.B. PA-GFP), während andere ihre Fluoreszenz-Wellenlänge verändern (z.B. asCP, Dronpa, Kaede, GFP). Photoaktivierbare Proteine sind ein hervorragendes Werkzeug für die Beobachtung markierter Proteine, Organellen und gesamter Zellen im lebenden Organismus in Raum und Zeit. In dieser Arbeit wurde GFP unter sauerstoffarmen Bedingungen durch Bestrahlung mit UV-Licht von der ursprünglich grünen zu einer roten Fluoreszenz konvertiert, um die Kontinuität der Mitochondrien und das Auftreten von Matrix-Konstriktionen in Hefe näher zu untersuchen.

GFP exprimierende Hefen werden bis zur log-Phase in Vollmedium angezogen, zentrifugiert (3000 rpm) und in PBS gewaschen. Die Zellen werden in PBS mit 1 % low melting Agarose aufgenommen und etwa 15 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben. Da GFP nur unter sauerstoffarmen Bedingungen photokonvertiert (Elowitz *et al.*, 1997; Sawin und Nurse, 1997, Jakobs *et al.*, 2003), 20-30 min warten, bis die Hefen den restlichen Sauerstoff veratmet haben.

Die Photokonversion des GFP wird durch die Beleuchtung der Zellen mit blauem Licht (Fluorescein-Filter) induziert (1-20 s). Anschließend kann die rote Fluoreszenz mit einem Rhodamine-Filter angeschaut werden.

Für die Spot-Photokonversion wird ein konfokales Laserraster-Mikroskop verwendet. Die Zellen werden unter Verwendung sehr geringer Lichtintensitäten im GFP-Kanal gesucht, ohne die Photokonversion bereits auszulösen. Ein räumlich begrenzter Bereich wird nun mit fokussiertem Laserlicht (488 nm) etwa 20x mit 400 Hz beleuchtet. Das photokonvertierte GFP wird mit 543 nm angeregt und bei 570-630 nm detektiert.

3.3.8.1 Glukose-Oxidase/Katalase-System

Bei Verwendung von rho⁰-Stämmen, die in der Zellatmung inhibiert sind, kann man die Sauerstoffkonzentration durch Zugabe des Glukose-Oxidase/Katalase-Systems enzymatisch senken (0.25 mg/ml Glukose-Oxidase (Sigma), 0.06 mg/ml Katalase (Sigma), 50 mM Glukose).

3.3.8.2 Myxothiazol

Um die Atmung in *S. cerevisiae* zu blockieren, können die Zellen für 10 min in Medium mit 10 µM Myxothiazol inkubiert werden, bevor sie in Agarose mit niedriger

Schmelztemperatur (1 % in PBS) und ebenfalls 10 μ M Myxothiazol unter dem Deckglas eingebettet werden (Stammlösung 5 mM Myxothiazol, Sigma). Die Blockierung der Atmungskette durch Myxothiazol verhindert die Sauerstoffabnahme unter dem Deckglas, wodurch die Photoinduktion von GFP inhibiert wird.

3.4 Mikroskopische Auswertung

Die im Folgenden beschriebenen Auswerteverfahren beziehen sich auf die vergleichenden Dnm1p-Messungen. Für die quantitativen Aussagen der Untersuchungen waren immer gleiche Mikroskopeinstellungen, Aufnahmebedingungen und Laserintensitäten wichtig. Da Laserschwankungen über einen längeren Zeitraum nicht ausgeschlossen werden können, wird zur Kalibrierung der Laserintensität an den verschiedenen Tagen ein GFP-VLP (*virus-like protein*) als interner Standard eingebaut. Jeder Viruspartikel enthält 120 GFP-Moleküle (Charpilienne *et al.*, 2001; Dundr *et al.*, 2002).

3.4.1 Einstellungen des konfokalen Laserraster- Mikroskops

Für die meisten Versuche wird ein modifiziertes Laserraster-Mikroskop (TCS SP2, Leica Microsystems CMS GmbH, Deutschland) verwendet. Zwei Avalanche Photodioden (Perkin Elmer Optoelectronics, Fremont, USA) wurden in die Austrittsöffnung des konfokalen Scannerkopfes eingebracht, um eine höhere Sensitivität (Detektion einzelner Photonen) in der Fluoreszenz-Detektion erreichen zu können. Zur Aufnahme der Bilder wird ein 1.2 N.A. (Numerische Apertur) Wasserimmersions-Objektiv (Leica 63x, Planapo) verwendet. Die Fluorophore (GFP und DsRed) werden simultan mit einer Ar-Kr Laserlinie von 488 nm und einer He-Ne Laserlinie von 543 nm angeregt. Zur Detektion werden die Bandpassfilter HQ 515/30 und HW 605/75M (Chroma Technology, Rockingham VT) und ein Detektions-Strahlteiler bei 560 nm verwendet.

Die folgenden Mikroskopeinstellungen wurden für alle vergleichenden Messungen verwendet: Lochblende mit 1 Airy Durchmesser; Strahlteiler des Anregungslichtes DD 488/543, Voxelgröße in x, y, z von 0.058 x 0.058 x 0.162 μ m, 256 x 256 Pixel pro Bildfeld, 4 x Bild-Accumulation, Rastergeschwindigkeit 400 Hz.

3.4.2 Bildbearbeitung der 3D-Rohdatenstapel

Die konfokalen 3D-Datenstapel werden per Hand in beiden Kanälen so zurechtgeschnitten, dass eine einzelne Hefezelle den Mittelpunkt des kleineren

Datenstapels bildet (die Größe des ausgeschnittenen Stapels entspricht etwa einem Würfel von 5-6 μm Kantenlänge). Das verwendete Bildbearbeitungsprogramm ist Inspector (Andreas Schönle). In beiden Kanälen werden manuell die Hintergrundwerte aller Datensätze bestimmt und zur weiteren Verarbeitung in ein selbstgeschriebenes Programm (Jörg Bewersdorf, C⁺⁺) eingegeben. Das Programm glättet die Rohdatensätze beider Kanäle mit einem Gauß-Filter von einer Größe unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops. Dadurch werden Rausch-Effekte reduziert, ohne die aufgenommenen Strukturen zu verwischen. Der Filter ist normalisiert, so dass das Gesamtsignal der Daten erhalten bleibt. Die Hintergrundwerte werden abgezogen und die Bilder für das Übersprechen der Kanäle korrigiert (3 % Übersprechen vom roten in den grünen Kanal; das Übersprechen von grün nach rot war vernachlässigbar). Auf diesen geglätteten und für Hintergrund und das Übersprechen der Kanäle korrigierten 3D-Datensätzen beruhen die folgenden Auswertungen.

3.4.3 Programm zur Lokalisierung der Dnm1p-GFP Cluster

Um die Helligkeit und Lage der Dnm1p-GFP Cluster in der Zelle zu bestimmen, sucht ein Computeralgorithmus im grünen Kanal (Dnm1p-GFP Aufnahme) nach dem hellsten Voxel ($I_{\text{max Dnm1}}$). Um diesen Voxel generiert das Programm einen virtuellen Kubus (290 nm x 290 nm x 810 nm, was ungefähr der 1.5-fachen Auflösung des Mikroskops entspricht) in beiden Kanälen. Anschließend bestimmt der Algorithmus innerhalb dieser Kuben den Schwerpunkt des Dnm1p-GFP Clusters und die Durchschnitts-Signale der Kuben in beiden Kanälen ($I_{\text{avg GFP}}$ und $I_{\text{avg DsRed}}$) und speichert die Information.

Zur späteren Bestimmung von Matrixkonstruktionen (siehe 3.4.5) werden drei Werte im roten Kanal auf einer Kugelschale von 150 nm Radius um den Dnm1p-GFP-Schwerpunkt bestimmt. Der hellste Wert auf der Schale im roten Kanal ($I_{\text{sphere DsRed max}}$) und der Wert genau gegenüber ($I_{\text{sphere DsRed otherside}}$) sowie die Helligkeit im Zentrum der Kugel im roten Kanal ($I_{\text{sphere DsRed center}}$) werden gespeichert und für die anschließende Analyse von Matrixkonstruktionen verwendet.

Für die Orientierungsanalyse der mt-assoziierten Cluster innerhalb der Zelle (siehe 3.4.6) werden zwei weitere Werte auf der Kugelschale im roten Kanal abgelesen. Das Signal im roten Kanal, was zum Zentrum des Datenstapels (und somit zum Zentrum der Zelle) zeigt, wird gemessen ($I_{\text{sphere DsRed inward}}$). Die Helligkeit des Signals auf der gegenüberliegenden, nach außen orientierten Seite ($I_{\text{sphere DsRed outward}}$) wird ebenfalls bestimmt und für die spätere Polaritätsbestimmung gespeichert.

Nachdem der Algorithmus die Informationen für den hellsten Cluster im Datensatz analysiert und gespeichert hat ($I_{\text{avg GFP}}$, $I_{\text{avg DsRed}}$, $I_{\text{sphere DsRed max}}$, $I_{\text{sphere DsRed otherside}}$, $I_{\text{sphere DsRed center}}$, $I_{\text{sphere DsRed inward}}$, $I_{\text{sphere DsRed outward}}$), wird eine unabhängig aufgenommene PSF (point spread function) eines Fluoreszenz-Kügelchens (FluoSpheres yellow-green

0.1 μm (505/515); Molecular Probes, Leiden, Niederlande) auf die Helligkeit von $I_{\text{max Dnm1}}$ normalisiert und von einer temporären Kopie des Datensatzes an der Position des Clusters abgezogen. In dieser Datensatzkopie sucht das Programm erneut nach dem hellsten Pixel im grünen Kanal (also dem zweithellsten Cluster im Original) und wiederholt die oben beschriebene Prozedur. Das Programm endet, wenn $I_{\text{max Dnm1}}$ unter eine definierte Helligkeitsuntergrenze sinkt.

3.4.4 Erstellung der 3D-Masken zur Bestimmung des zytosolischen Dnm1p-GFP Pools

Um die Größe des Mitochondrien-assoziierten und des zytosolischen Dnm1p-GFP Pools mikroskopisch zu ermitteln, muss die gemessene GFP-Fluoreszenzintensität jedes Voxels einem der beiden Pools zugeteilt werden. Dabei ist die räumliche Verteilung des Signals in beiden Pools sehr unterschiedlich: Das Mitochondrien-assoziierte Dnm1p-GFP ist oft in Clustern zusammengelagert, während der zytosolische Pool eher homogen verteilt ist. Durch das relativ große Zytosol-Volumen können sich jedoch auch geringe Helligkeitswerte einzelner Voxel zu einem hohen Gesamtsignal akkumulieren. Für die Auswertung ist eine genaue Korrektur des Hintergrund-Rauschens und des Übersprechens der Kanäle wichtig.

Um die Größe der beiden Pools bestimmen zu können, erstellt ein dafür angefertigter Algorithmus eine digitale 3D-Maske (Maske 1), die alle Voxel des Mitochondrien-assoziierten Pools enthält. Maske 1 kann noch einmal in zwei Gruppen (A und B) unterteilt werden. Gruppe A beinhaltet die GFP-Intensitäten aller Voxel, die auf den Mitochondrien liegen. Dabei werden die Mitochondrien anhand der korrespondierenden hohen $I_{\text{avg DsRed}}$ -Werte erkannt. Da die Hefezellen stark in ihrer DsRed-Helligkeit variieren, werden für jede Zelle individuelle $I_{\text{avg DsRed}}$ -Schwellenwerte bestimmt. Gruppe B beinhaltet die GFP-Intensitäten der Voxel von hellen Dnm1p-Clustern, die mit den Mitochondrien assoziiert sind. Diese Voxel werden durch ein GFP-Signal identifiziert, das oberhalb des typischen zytosolischen Signals liegt und gleichzeitig ein hohes DsRed-Signal aufweist. Das hohe DsRed-Signal beruht auf der Nähe zu einem Mitochondrienstrang, dessen Signal durch die optische Auflösung verwischt ist (Schwellenwert: 25 % des Grenzwertes von Gruppe A). Das Volumen der Gruppe B alleine wird als Maske 2 definiert (V_{Maske2}).

Die Größe des zytosolischen Dnm1p-GFP Pools besteht aus den verbleibenden GFP-Voxel-Intensitäten, die aufsummiert werden (S'_{Zyt}). Um für das entfallene zytosolische Volumen von Maske 2 zu korrigieren, wird S'_{Zyt} auf das gesamte zytosolische Volumen extrapoliert. Dabei wird das Volumen der Hefezelle (V_{Zelle}) als Kugel von 5 μm Durchmesser angenommen. Das vollständige zytosolische Signal wird nach folgender Formel extrapoliert:

$$S_{Zyt} = S'_{Zyt} \times (V_{Zelle} - V_{Maske1} + V_{Maske2}) / (V_{Zelle} - V_{Maske1})$$

Um das Signal des Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-GFP's zu erhalten (S_{Mito}), wird das Zytosol-Signal (S_{Zyt}) vom Gesamtsignal aller Voxel (S_{total}) abgezogen. Die relativen Fraktionen von mt-assoziiertem und zytosolischem Dnm1p-GFP erhält man, indem S_{Zyt} und S_{Mito} durch S_{total} geteilt werden.

Für die Extrapolierung wird eine homogene Verteilung von Dnm1p-GFP in der Zelle angenommen. Fehlerabschätzungen basierend auf der Vernachlässigung des Zellkerns und der Vakuole zeigen einen möglichen Fehler von nur 1%, wenn ein Kugeldurchmesser von 2 μm für beide Organellen angenommen wird.

3.4.5 Analyse von Matrix-Konstriktionen und Dnm1p-Spiralen

Ein Kriterium für Dnm1p-Spiralen ist ihre Lokalisierung an Matrix-Konstriktionen. Zunächst wird zwischen seitlich an Mitochondrienstränge sitzenden Dnm1p-GFP Clustern und potentiellen Spiralen unterschieden, indem das Verhältnis von $I_{\text{sphere DsRed max}}$ zu $I_{\text{sphere DsRed otherside}}$ untersucht wird. Bei einem Verhältnis größer als fünf werden die Cluster als seitlich definiert und entfallen für die nachfolgenden Untersuchungen der potentiellen Spiralen. Ob die Cluster, die nicht an der Seite liegen, an Matrix-Konstriktionen lokalisiert sind, wird durch den Vergleich von $I_{\text{sphere DsRed center}}$ zu $I_{\text{sphere DsRed otherside}}$ analysiert (siehe Abb. 10C). Es werden sehr strenge Kriterien für diesen Teil der Analyse verwendet. Für Dnm1p-Cluster mit $I_{\text{sphere DsRed otherside}} > I_{\text{sphere DsRed center}}$ wird eine Lokalisierung an einer Matrix-Konstriktion angenommen. Alle putativen Spiralen werden manuell in den Rohdaten untersucht.

3.4.6 Bestimmung der Orientierung von Dnm1p-GFP Clustern innerhalb der Zelle

Um zu unterscheiden, ob die Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-GFP Cluster ins Innere der Zelle zeigen oder Richtung Zellcortex orientiert sind, wird die Differenz ($I_{\text{sphere DsRed inward}} - I_{\text{sphere DsRed outward}} - \text{Korrekturfaktor}$) durch $I_{\text{sphere DsRed center}}$ geteilt. Der (kleine) Korrekturwert wird benötigt, um für die leicht gebogene PSF (point spread function) des verwendeten Mikroskop-Aufbaus zu korrigieren. Die Genauigkeit des Korrekturwertes wird durch Computer-Simulationen und Kontrollexperimente verifiziert. Als Ergebnis der Berechnung erhält man negative Werte für Cluster, die zum Inneren der Zelle zeigen (siehe Abb. 10A, blau), und positive Werte für nach außen orientierte Cluster (siehe Abb. 10B, rot). Cluster, die seitlich an den Mitochondrien liegen, sind in Abbildung 10B gelb dargestellt und liegen bei Werten zwischen -0.3 und 0.3.

3.4.6.1 Kalkulation der Verteilung von gleichmäßig innen und außen orientierten Clustern

Aufgrund der durch die „Kugelform“ der Hefe vorgegebenen Krümmung der Mitochondrien kommt es bei einer Gleichverteilung der Cluster bei gleicher Dichte der Aggregate zu einer leichten Verschiebung zwischen innen und außen orientierten Clustern. Diese Verteilung wurde durch den Vergleich von zwei Kugelflächen berechnet, deren Innendurchmesser dem mittleren Radius einer Hefezelle minus dem Mitochondriendurchmesser und deren Außendurchmesser dem mittleren Radius einer Hefezelle entspricht.

Die angenommenen Werte der Durchmesser (Innenradius: 2,4 µm; Außenradius: 2,6 µm) wurden in folgende Formel eingesetzt, um das relative Verhältnis der Kugelflächen zueinander zu bestimmen:

$$\begin{aligned} \% \text{ innere Kugelfläche} &= 4 \pi r_1^2 / (4 \pi r_1^2 + 4 \pi r_2^2) = 46 \% \\ \% \text{ äußere Kugelfläche} &= 4 \pi r_2^2 / (4 \pi r_1^2 + 4 \pi r_2^2) = 54 \% \end{aligned}$$

Die Werte wurden verwendet, um die durch die Krümmung der Mitochondrien verursachte Orientierung gleichverteilter Cluster abzuschätzen und als Referenz für die Polaritätsuntersuchung der Dnm1p-Cluster zu nutzen.

3.4.6.2 Simulation der Verteilung von gleichmäßig innen, außen und seitlich orientierten Clustern

Bei der oben beschriebenen Kalkulation wurden seitlich orientierte Cluster nicht berücksichtigt. Da für eine detailliertere Auswertung auch diese Cluster miteinbezogen wurden, musste ebenfalls ein Vergleichswert für gleichmäßig verteilte innen, seitlich und außen assoziierte Cluster ermittelt werden. Hierzu wurde eine Computer-Simulation durchgeführt, die ein künstliches Mitochondrien-Netzwerk generiert und über das Mitochondrium zufällig verteilte Cluster einfügt. Zehn dieser Datensätze (Beispiel der Mitochondrien-Simulation siehe Abb. 9) wurden im gleichen Programm wie die mikroskopischen Aufnahmen ausgewertet und ergeben die Werte in der Simulation in Abbildung 42 .

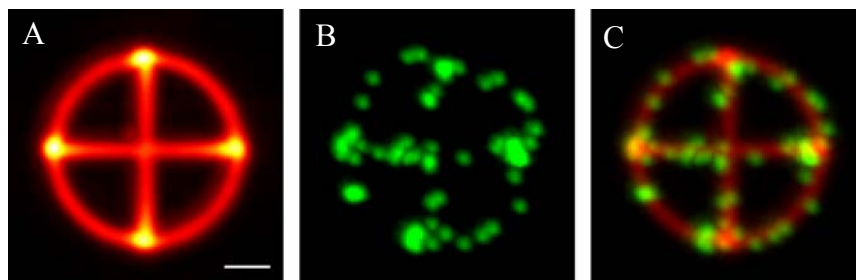


Abb. 9: Dargestellt sind Maximum-Projektionen der Simulationen von einem dreidimensionalen Mitochondrien-Netz (A) und darauf statistisch verteilten Clustern (B). In (C) ist eine Überlagerung beider Kanäle gezeigt. Größenstandard 1 µm

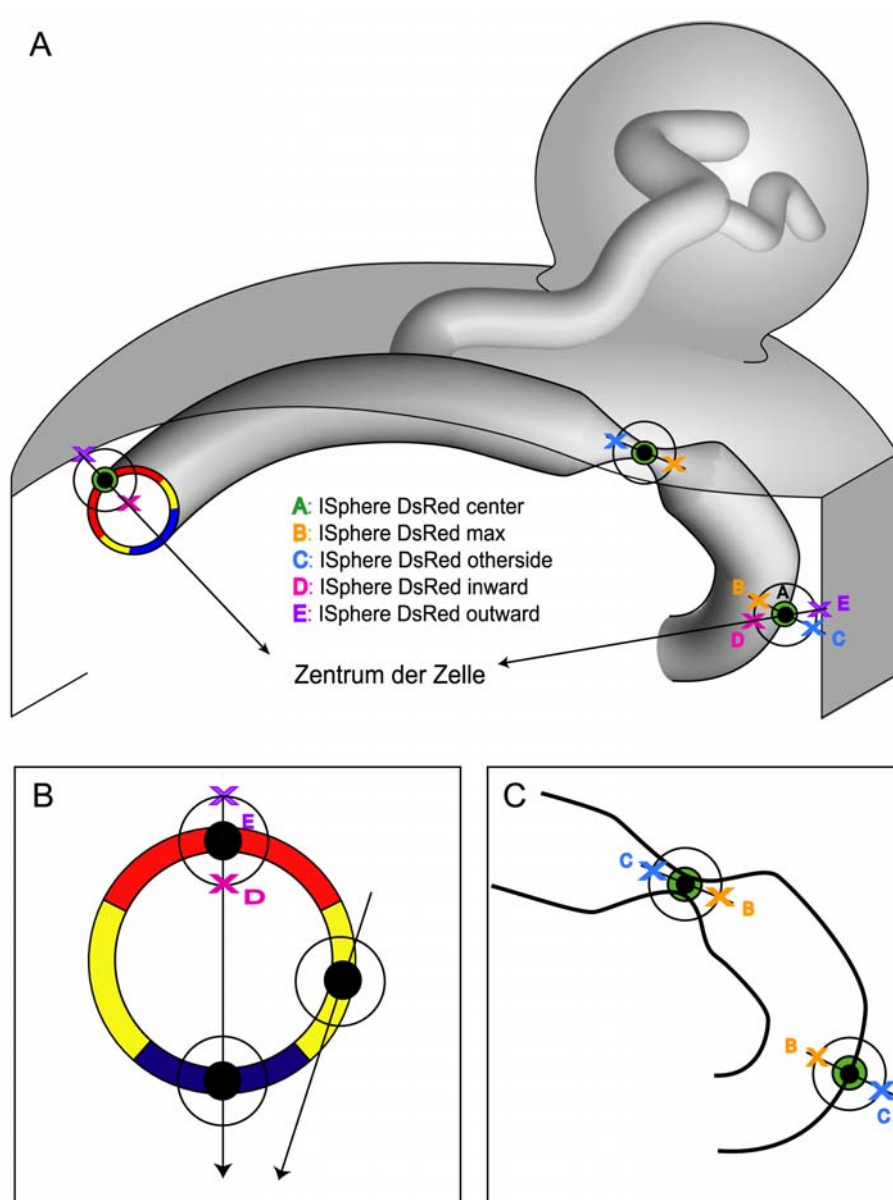


Abb. 10: (A) Die Zeichnung zeigt einen Bereich einer Hefezelle mit Knospe und Mitochondriensträngen. Auf der linken Seite ist ein Schnitt durch einen Mitochondrienstrang dargestellt. Rechts ist eine Matrix-Konstriktion angedeutet. Die schwarz-grünen Punkte repräsentieren Dnm1p-GFP Cluster. (B) Der Querschnitt eines Mitochondrienstranges soll die Orientierung von außen (rot), seitlich (gelb) und innen (blau) lokalisierten Clustern verdeutlichen. (C) Das Auffinden von Matrix-Konstriktionen als Voraussetzung für Dnm1p-GFP Spiralen ist dargestellt.

4 Mikroskope

4.1 Konfokales Laserraster-Mikroskop

Besonders in der biomedizinischen Forschung ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie ein wichtiges Werkzeug. Dabei werden zwei Vorteile gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie genutzt: (1) Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzproteine erlauben die gezielte Markierung von Zellkompartimenten und einzelnen Proteinen. Dadurch wird das Problem des Kontrastmangels, der limitierend in der Phasenkontrast-/Interferenzkontrast-Mikroskopie ist, überwunden. (2) Durch die Verwendung einer Lochblende vor dem Detektor wird nur Emissionslicht aus der Fokalebene erfaßt (Konfokalität). Das Fluoreszenzlicht aus anderen Ebenen wird nicht abgebildet. Dadurch können die Objekte in einzelnen Ebenen abgerastert und anschließend zu dreidimensionalen Bildern zusammengesetzt werden.

Wie jede andere auf Fokussierung von Licht basierende Aufnahmetechnik ist die Auflösung der Konfokal-Mikroskope selbst bei der Verwendung von Objektiven hoher numerischer Apertur (NA) durch Beugung begrenzt. Aufgrund der Welleneigenschaften des Lichts (Beugungslimit, Ernst Abbe, 1873) kann lateral eine Auflösung von etwa ~200 nm und axial nur ~500–800 nm erreicht werden (abhängig von der verwendeten Wellenlänge und numerischen Apertur). Mit dem konfokalen Laserraster-Mikroskop können verschiedene Fluorophore simultan detektiert werden, was zum Beispiel bei Verfahren wie FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) und der Kolokalisation unterschiedlich markierter Proteine oder Kompartimente wichtig ist. Eine Rastergeschwindigkeit von 400 Zeilen pro Sekunde erlaubt die Aufnahme von 3D-Datensätzen innerhalb weniger Minuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der überwiegende Teil der mikroskopischen Daten an einem inversen Fluoreszenz-Laserraster-Mikroskop der Firma Leica aufgenommen (Leica TCS SP2, Leica Microsystems CMS GmbH, Deutschland). Das für diese Arbeit verwendete Wasserimmersionsobjektiv hat eine Numerische Apertur von 1.2 (Leica HCX PL APO 63x / 1.2 W CORR). Die Fluoreszenzproteine GFP und DsRed, sowie der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 543 (gekoppelt an Phalloidin zur Markierung von F-Aktin) wurden in dieser Arbeit verwendet. GFP wurde mit der Argon-Krypton-Laserlinie bei 488 nm angeregt und im Bereich von 500-530 nm mit Photomultipliern

(PMT) detektiert. DsRed und Alexa 543 wurden mit der Helium-Neon-Laserlinie bei 543 nm angeregt. Die Detektion mit Photomultipliern erfolgte im Bereich von 600-650 nm. GFP und DsRed wurden in den quantitativen Dnm1p-GFP-Messungen mit zwei Avalanche-Photodioden (APD, Perkin Elmer Optoelectronics, Fremont, USA) detektiert, die an einen zusätzlichen Ausgang des konfokalen Scankopfes angeschlossen wurden und sich durch eine höhere Sensitivität auszeichnen. Dabei wurden die Bandpassfilter HQ 515/30 und HQ 605/75M (Chroma Technology, Rockingham VT) und ein Detektions-Strahlteiler bei 560 nm verwendet. Alle Messungen wurden bei einem Lochblenden-Durchmesser von einer Airy-Einheit (entspricht $1.22 \cdot \lambda/NA$) und einer Raster-Geschwindigkeit von 400 Linien pro Sekunde durchgeführt. Als Strahlteiler des Anregungslichtes wurde der Doppel-Dichroit (DD) 488/543 benutzt. Alle Zellen wurden als 3D-Datensätze (xyz) aufgenommen.

4.2 *Das 4Pi-Mikroskop*

4.2.1 Prinzip der 4Pi-Mikroskopie

Im Gegensatz zur gewöhnlichen Konfokalmikroskopie werden in der 4Pi-Mikroskopie (Hell, 1990; Hell und Stelzer, 1992) zwei einander gegenübergestellte Objektive verwendet. Durch kohärente Anregung und Detektion kann somit eine Auflösung unter 100 nm entlang der optischen Achse (z-Richtung) erreicht werden, was einer vier- bis siebenfach höheren axialen Auflösung im Vergleich zu einem herkömmlichen konfokalen Mikroskop entspricht. Die laterale Auflösung mit 200-250 nm entspricht der herkömmlicher Konfokal-Mikroskope. Die Interferenz der einander entgegenlaufenden Wellenfronten schärft den konfokalen Fokus (die Punktbildfunktion („point spread function“, PSF), erzeugt allerdings auch zwei Interferenz-Nebenmaxima, die ungefähr im Abstand der halben Wellenlänge des verwendeten Lichts ober- und unterhalb der Fokusebene entstehen, was zu axial verschobenen Geisterbildern in der Detektion führt (Abb. 11). Diese Geisterbilder können jedoch durch mathematische Bildrekonstruktionsverfahren (Entfaltung) aus dem Rohdatensatz entfernt werden.

Eine Bedingung für die erfolgreiche Bildentfaltung ist, dass die Helligkeit der Geisterbilder jeweils nicht 50 % der Signalstärke des Hauptbildes überschreitet. Da selbst im Idealfall die Interferenz-Nebenmaxima der fokussierten Strahlen nur ein Signalverhältnis von 60-70 % erreichen, müssen ihre Intensitäten durch eine Kombination verschiedener Maßnahmen gesenkt werden. (1) Durch konfokale Detektion kann aus den Nebenmaxima stammende Fluoreszenz unterdrückt werden. (2) Aufgrund der quadratischen Abhängigkeit der Anregungseffizienz von der Beleuchtungsintensität kann die relative Höhe der Nebenmaxima mittels 2-

Photonenanregung der Fluoreszenzfarbstoffe gesenkt werden. Außerdem werden durch die höhere Wellenlänge des 2-Photonen-Anregungslichts die Nebenmaxima weiter vom Hauptmaximum weg geschoben, so dass sie durch die konfokale Lochblende effizienter unterdrückt werden können. (3) Lässt man die Anregungs- und die Detektionswellen jeweils miteinander interferieren, führen die Unterschiede zwischen beiden Wellenlängen zu unterschiedlichen axialen Positionen der Nebenmaxima und verringern dadurch die Detektionseffizienz der Anregungsnebenmaxima.

Es gibt drei Arten der 4Pi-Mikroskopie, die sich hinsichtlich der Interferenz von Anregungs- und Emissionslicht unterscheiden (Abb. 11). Die einfachste Variante, 4Pi Typ A, kommt durch Interferenz in der Anregung zustande, während nur mit einem Objektiv detektiert wird. Erfolgt die Anregung lediglich durch ein Objektiv, jedoch die Detektion durch beide, spricht man von Typ B (ein in der Praxis nicht verwendeter Ansatz). Die im Unterpunkt (3) besprochene Möglichkeit zur Senkung der Nebenmaxima durch gleichzeitige Interferenz von Anregung und Detektion wird als 4Pi Typ C bezeichnet und wurde in dieser Arbeit angewendet. Ein Vergleich der Punktbildfunktionen eines konfokalen Mikroskops mit der des 4Pi Typ A und Typ C bei 2-Photonen-Anregung sind in Abbildung 11 dargestellt. Im Falle von 4Pi-TypC kann in speziellen Fällen auf die 2-Photonen-Anregung verzichtet werden (Dissertation Jörg Bewersdorf, 2002). Dieser Betriebsmodus wurde in den hier durchgeführten Messungen zum ersten Mal in der praktischen Anwendung erfolgreich genutzt.

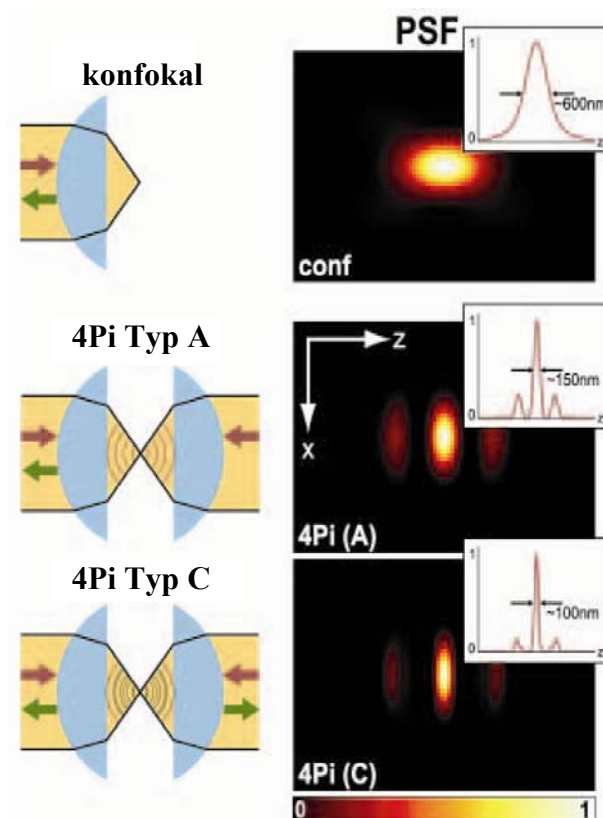


Abb. 11: Vergleich zwischen gewöhnlicher Konfokal- und 4Pi-Mikroskopie. Auf der linken Seite sind schematisch Anregung (rot, 2-Photonen) und Emission (grün) dargestellt. Rechts sind jeweils die normalisierten PSF's in xz-Richtung abgebildet. In den dazugehörigen Intensitätsverteilungen sind die Halbwertsbreiten der Hauptmaxima eingezeichnet. (Dissertation Jörg Bewersdorf, 2002)

4.2.2 Aufbau des 4Pi-Mikroskops

Das 4Pi-Mikroskop Leica TCS 4Pi (Gugel *et al.*, 2004) besteht aus einem konfokalen Laserraster-Mikroskop (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems CMS GmbH, Deutschland) und einem zusätzlich direkt am Stativ angebrachten 4Pi-Modul (Abb. 12). Das obere Objektiv (O1) ist unbeweglich, während das ihm gegenübergestellte untere Objektiv (O2) in allen drei Raumrichtungen über einen Piezo ansteuerbar ist. Es wurden zwei Glyzerinimmersions-Objektive (HCX PL APO 100x/1.35 GLYC CORR, Leica Microsystems) wegen der im Vergleich zu Wasser- und Öl-Objektiven höheren Öffnungswinkel verwendet. Für die Aufnahmen wurde die 488 nm-Laserlinie eines Argon-Krypton-Lasers verwendet. Dabei wird der Laserstrahl über den Strahlteiler in zwei Strahlen gleicher Intensität aufgespalten und durch beide Objektive in den gleichen Punkt der Probe fokussiert. Das Abrastern der Probe erfolgt lateral durch den Scan-Strahl entlang der optischen Achse (z) durch piezogesteuerte Bewegung des Probenstisches. Das Emissionslicht wird durch den gleichen Strahlteiler wieder vereinigt und über Linsen (L) und Spiegel (M, mirror) von den Photomultipliern (PMT) oder Avalanche Photodioden (APD) detektiert. Die Aufnahmen erfolgten mit den sensitiveren APDs, während zur Justierung des Mikroskops die Photomultiplier verwendet wurden.

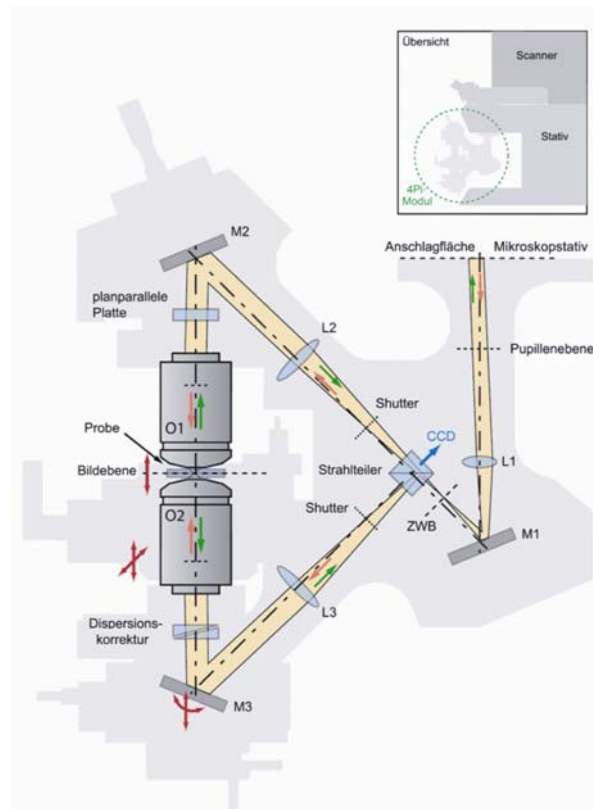


Abb. 12: Schematische Darstellung des 4Pi-Moduls (ZWB Zwischenbildebene, O Objektiv, L Linse, M Spiegel). (Gugel *et al.*, 2004)

4.2.3 Justierung des 4Pi-Mikroskops

Die in Formaldehyd-behandelten Hefezellen wurden mit Poly-L-Lysin auf einem Deckglas zusammen mit Fluoreszenzkügelchen (FluoSpheres yellow-green 0.1 μm (505/515); FluoSpheres orange 0.1 μm (540/560); Molecular Probes, Leiden, Niederlande) fixiert (Details siehe Methoden 3.3.7.2) und in Glycerin (87 % in Tris-HCl) eingebettet (Brechungsindex $n=1.45$). Wegen des ähnlichen Brechungsindex gegenüber Glycerin werden Quarzdeckgläser ($n_Q=1,46$) verwendet. Das untere Deckglas ist zu einem Viertel mit aufgedampftem Aluminium verspiegelt, um die Objektiv-Justierung zu erleichtern. Nachdem die Probe zwischen den Objektiven eingespannt wurde, werden zunächst die beiden Objektiv-Fokusse in eine gemeinsame Ebene gebracht. Dazu wird die verspiegelte Stelle des Deckglases verwendet, um das Laserlicht über dasselbe Objektiv detektieren zu können. Da das Licht durch beide Objektive auf den Spiegel trifft, erscheinen in der Detektion beide Fokalebene im xz-Scan-Ausschnitt als horizontale Streifen. Durch Bewegung des piezogetriebenen unteren Objektivs in z werden beide Ebenen übereinander gebracht. Anschließend werden im Transmissionsmodus die Fokusse in xy anhand eines Interferenzbildes auf einer Justage-CCD-Kamera übereinander gelegt. Der Winkel des Spiegels M3 wird so verändert, dass die PSF über einen möglichst großen Bildausschnitt konstant ist. Durch eine Höhenverstellung des Spiegels (M3) wird die optische Weglänge zwischen beiden Interferometer-Armen abgeglichen und die Stelle der konstruktiven Interferenz anhand niedriger Nebenmaxima (Sidelobes) optimiert. Da in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Fluorophore (GFP und DsRed) mit unterschiedlichen Emissionsspektren gleichzeitig detektiert wurden, muß das Mikroskop so eingestellt werden, daß die Phasen beider PSF's konstruktiv und die Nebenmaxima beider Kanäle möglichst niedrig sind.

4.2.4 Mikroskop-Einstellungen und Bildbearbeitung

Für die 1-Photonen-Anregung der Fluoreszenzproteine wurde die 488 nm Laserlinie eine Ar-Kr-Laser verwendet. Detektiert wurde mit Avalanche Photodioden (Filter HQ 515/30, Chroma und 655/80, Semrock), es wurde ein Detektionsstrahl-Teiler (625 dclp, Chroma) verwendet und die Lochblende auf 0.5 Airy-Einheiten eingestellt. Durch die Wahl des kleinen Lochblenden-Durchmessers geht einerseits Fluoreszenzsignal verloren, dafür werden andererseits die Nebenmaxima noch einmal verringert. Die einzelnen Zeilen wurden acht Mal gemittelt und jedes Bild vier Mal akkumuliert. Es wurde 256 x 256 Pixel pro Bildfeld aufgenommen, die Voxelgröße betrug 30x30x61 nm.

Die Geisterbilder wurden aus den erhaltenen 4Pi-Aufnahmen durch eine Sieben-Punkt-Entfaltung mathematisch entfernt. In Abbildung 13 ist beispielhaft an einem Datensatz die Entfaltung dargestellt.

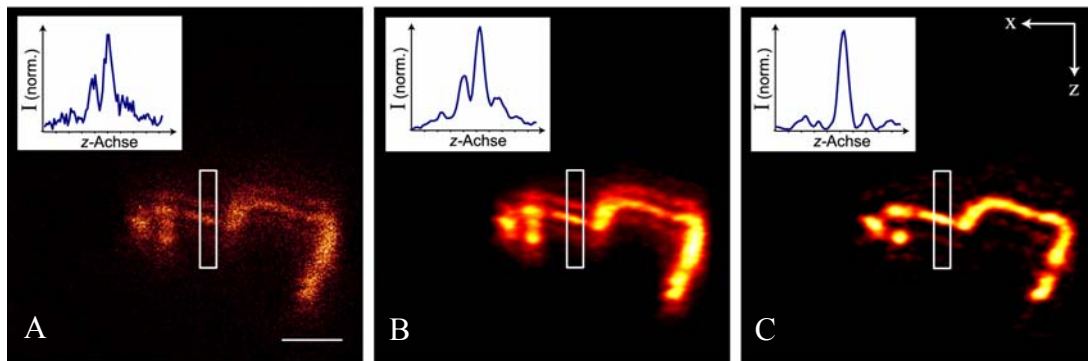


Abb. 13: Sieben-Punkt-Entfaltung einer 4Pi-Aufnahme. Dargestellt ist ein Einzelbild einer mit mtDsRed markierten Hefezelle in einer 1-Photonen 4Pi-TypC-Aufnahme als Rohdaten (A), geglättet (B) und Sieben-Punkt-entfaltet (C). Die Kurven zeigen die entlang der x-Achse addierten Fluoreszenz-Intensitäten (normiert) des weißen Kastens. Größenstandard: 1 μm

4.2.5 4Pi-Aufnahmen von Hefe-Mitochondrien

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode der 4Pi-Nutzung etabliert. Hierzu wurden sowohl wt-Hefen als auch *mdv1* Δ und *fis1* Δ -Stämme mit mtDsRed und Dnm1p-GFP markiert und 1-Photonen-Anregung bei 488 nm verwendet. Die Detektion erfolgte bei 510 nm für Dnm1p-GFP und 655 nm für DsRed.

Bei 1-Photonen-Anregung entfällt die Möglichkeit zur Senkung der Nebenmaxima durch die 2-Photonen-Anregung. Um diesen Nachteil auszugleichen, wurde in dieser Arbeit der große Wellenlängenunterschied zwischen 488 nm-Anregungs- und Emissionslicht (Stokes Shift) von DsRed ausgenutzt. Dieser führt im Typ C-Modus zu einer Senkung der Nebenmaxima der effektiven PSF.

Ein Vergleich zwischen einer konfokalen und einer 1-Photonen 4Pi-TypC Aufnahme einer Δ *fis1*-Zelle mit mtDsRed ist in Abbildung 14 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die fischernetzartigen Mitochondrien in der Konfokal-Aufnahme in dieser Orientierung nicht dargestellt werden können, in der 4Pi-Aufnahme dagegen einzelne Maschen des Netzwerkes aufgelöst werden.

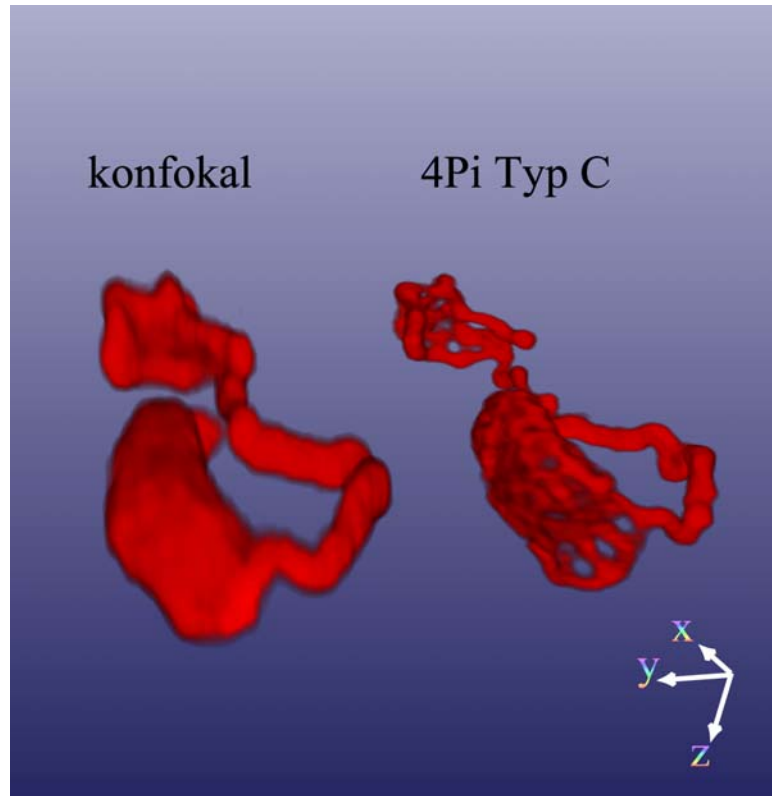


Abb. 14: Vergleich eines entfalteten 3D-Datensatzes einer 1-Photonen 4Pi-TypC-Aufnahme mit einer Konfokal-Aufnahme. Dargestellt ist eine $\Delta fis1$ -Zelle mit mtDsRed. Die Sieben-Punkt-Entfaltung wurde durch den großen Stokes Shift zwischen DsRed-Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Detektion bei 655 nm begünstigt. Die Orientierung der Zelle ist durch das Koordinatensystem gegeben. Die Längen aller Pfeile entsprechen je 1 μm .

4.3 STED-Mikroskop

Durch die 4Pi-Mikroskopie kann eine vier- bis siebenfache Auflösungserhöhung in z-Richtung im Vergleich zum Konfokal-Mikroskop erzielt werden. Trotzdem bleibt das Verfahren beugungsbegrenzt. Diese Auflösungsgrenze kann in der STED-Mikroskopie erstmals überwunden werden.

4.3.1 Prinzip der STED-Mikroskopie

Die durch die Welleneigenschaften des Lichts bedingte Auflösungsgrenze kann durch Konzepte überwunden werden, die folgende Gemeinsamkeit besitzen: Sie sind räumlich modulierbar und besitzen zwei molekulare Zustände, deren Übergänge gesättigt werden können (Hell und Wichmann, 1994; Hell, 2003). Eines dieser Konzepte wird in der STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*) verwirklicht. Wenn ein Photon auf Materie trifft und sich die Moleküle im Grundzustand befinden, kann ein Molekül in einen angeregten Zustand überführt werden. Die umgekehrte Reaktion kann eintreten, wenn sich ein Molekül bereits im angeregten Zustand befindet. Das eingestrahelte Photon nimmt die Energie des Moleküls in Form eines zweiten identischen Photons mit und das Molekül wird in den Grundzustand überführt (abgeregt). Das Prinzip der stimulierten Emission ist in Abbildung 15 dargestellt.

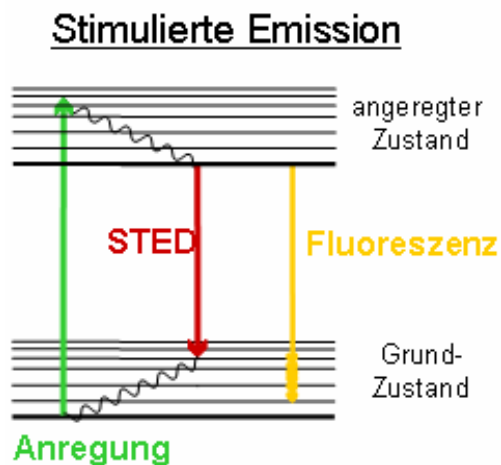


Abb. 15: Jablonski-Diagramm der stimulierten Emission (Klar *et al.*, 2001)

Die stimulierte Emission wird im STED-Mikroskop genutzt, um den Anregungsfokus (PSF, *point spread function*) deutlich zu verkleinern. Dazu wird ein Teil der angeregten Farbstoff-Moleküle einer Probe abgeregt, bevor sie fluoreszieren können. Dies gelingt, indem man dem kurzwelligen Lichtpuls, mit dem die Proben-Moleküle angeregt werden, einen längerwelligen STED-Puls folgen lässt, der zeitlich so abgestimmt ist,

dass sich die Moleküle noch im angeregten Zustand befinden. Die Wellenlänge dieses Pulses entspricht der Energiedifferenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustand. Räumlich betrachtet ist dieser zweite Lichtpuls zum Beispiel ringförmig um den Anregungsfokus angeordnet, sodass Farbstoff-Moleküle im Zentrum des Rings von der Abregung verschont bleiben und die PSF deutlich verkleinert wird.

Da natürlich auch der STED-Puls der Abbe'schen Beugungsgrenze unterliegt, kann die Größe des Ringes nicht beliebig verkleinert werden. Die Lösung liegt im nichtlinearen Zusammenhang zwischen Abregung und Intensität des STED-Pulses. Je höher die Energie des STED-Strahls, desto effektiver ist die Abregung der Fluorophore. Überschreitet man eine gewisse Schwelle, so tritt eine Sättigung des Prozesses ein. Bei einer weiteren Steigerung der Puls-Intensität wird die fluoreszierende Region im Zentrum immer weiter eingeschnürt. Der Faktor, um den man die Sättigungsschwelle überschreitet, bestimmt im Endeffekt die Auflösung des Mikroskops (die Auflösung nimmt mit der Wurzel des Sättigungsfaktors zu).

Mit dieser neuen Technik wurde die Beugungsgrenze des Lichtes erstmals durchbrochen (Klar *et al.*, 2000) und eine laterale Auflösung von 16 nm an Einzelmolekülen erreicht (Westphal und Hell, 2005). Die Auflösung des STED-Mikroskops hängt jedoch von den Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe wie z.B. ihrer Abregungsschwelle und ihrer Stabilität gegenüber Bleichen ab. Daher muss für jeden Farbstoff neben einer individuellen Anregungs-, STED-, und Detektionswellenlänge sowie Intensität die effektive Auflösung des Mikroskops neu bestimmt werden.

4.3.2 Aufbau des STED-Mikroskops

Die in dieser Arbeit gezeigten STED-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Katrin Willig an ihrem Aufbau durchgeführt (Dissertation Katrin Willig, 2006). Eine schematische Darstellung dieses Aufbaus ist in Abbildung 16 gezeigt.

Die Fluoreszenz-Anregung wurde mit einer gepulsten Laser-Diode (Picoquant, Deutschland) mit 100 ps langen Pulsen und einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt. Als STED-Laser wurde ein optisch-parametrischer Oszillators (OPO), betrieben bei 575 nm, verwendet (APE, Deutschland), welcher wiederum synchron durch einen Titan-Saphir-Laser (MaiTai, CA) mit 80 MHz gepumpt wurde. Die fs-Pulse des OPO wurden durch Dispersion in einer Glasfaser auf 200 ps gestreckt. Die ringförmige Modulation des STED-Pulses wurde mit einem räumlichen Lichtmodulator (Hamamatsu, Japan) generiert. Sowohl der Anregungs- als auch der STED-Strahl

wurden in ein reguläres 1.4 NA Öl-Objektiv (HCX PL APO, 100x, Leica Microsystems, Deutschland) durch die Verwendung von dichroitischen Spiegeln eingekoppelt. Die Fluoreszenz wurde durch das gleiche Objektiv gesammelt und mit APDs detektiert. Die Bilder wurden durch die Rasterung der Probe mit Hilfe eines Piezo-Tisches (Melles Griot, Großbritannien) aufgenommen (Aufnahmezeit pro Pixel: 0.3 ms). Die Pixelgröße betrug $20 \times 20 \text{ nm}^2$, es wurden Einzelbilder in xy-Orientierung aufgenommen.

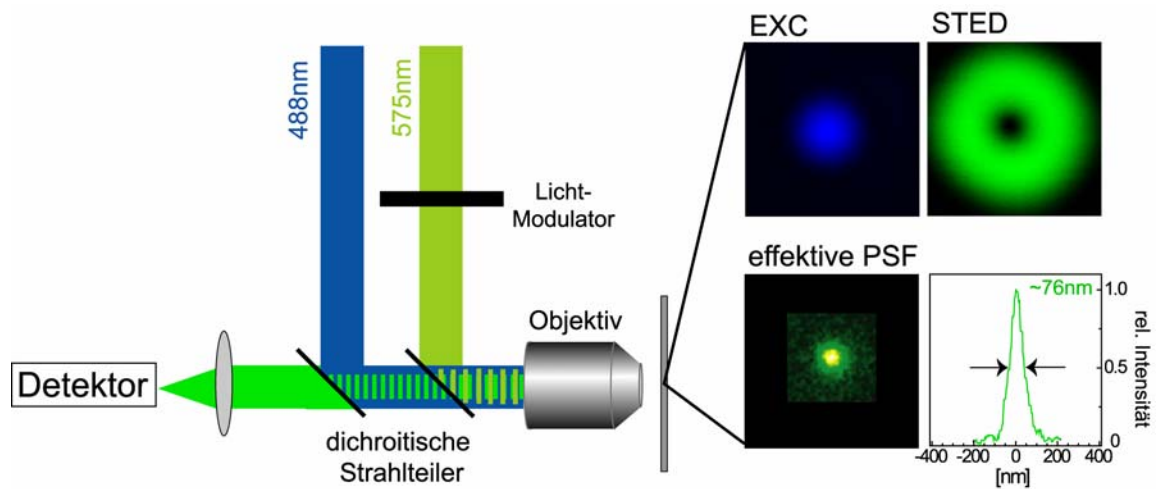


Abb. 16: Aufbau des verwendeten STED-Mikroskops. Die Fluorophore wurden mit einer Laserdiode der Wellenlänge von 488 nm angeregt (blau). Der STED-Strahl (grün) mit einer Wellenlänge von 575 nm wurde mit einem räumlichen Lichtmodulator (PAL-SLM, Hamamatsu, Japan) geformt, um in der Fokalebene eine ringförmige Intensitäts-Verteilung zu erhalten. Sowohl die Anregungs-PSF als auch der STED-Fokus wurden mit Goldkugeln (80 nm) gemessen und sind in gleicher Skalierung dargestellt. Die Überlagerung im Fokus der Anregung und der Abregung (STED) ergibt die dargestellte effektive PSF. Dargestellt ist die Auflösung des Mikroskops (76 nm) für GFP. Als Aufnahme-Objekt diente ein GFP-Virus (40 nm).

4.3.3 Bestimmung der Auflösungsgrenze des STED-Mikroskops für das Fluoreszenzmolekül GFP

In dieser Arbeit wurde die Größe der Dnm1p-GFP Cluster in *S. cerevisiae* mit Hilfe des STED-Mikroskops ausgemessen (siehe Ergebnisse 5.3.6). Da dies die ersten STED-Bilder von GFP-markierten biologischen Proben waren und sich die Auflösung des Mikroskops von Farbstoff zu Farbstoff unterscheidet, musste zuvor die individuelle Auflösungsgrenze für GFP ermittelt werden. Dazu wurden GFP-VLP (*virus-like proteins*) mit einer Größe von 40 nm (Durchmesser der mittleren Hülle) vermessen (Charpilienne *et al.*, 2001). Bei dem GFP-VLP wurde ein Protein der mittleren Hülle (VP2) durch ein chimäres VP2-GFP ersetzt, was wegen der Geometrie des Virus zu einer Packung von 120 GFP-Molekülen pro VLP führt (Charpilienne *et al.*, 2001; Dundr *et al.*, 2002). Trotz der Fusion an VP2 zeigten wenigstens 95 % der GFP-Moleküle eine richtige Faltung (Charpilienne *et al.*, 2001). Der GFP-VLP wurde in dieser Arbeit zusätzlich als interner Kalibrierungsstandard für quantitative Konfokal-Aufnahmen verwendet (siehe 5.3.5.1).

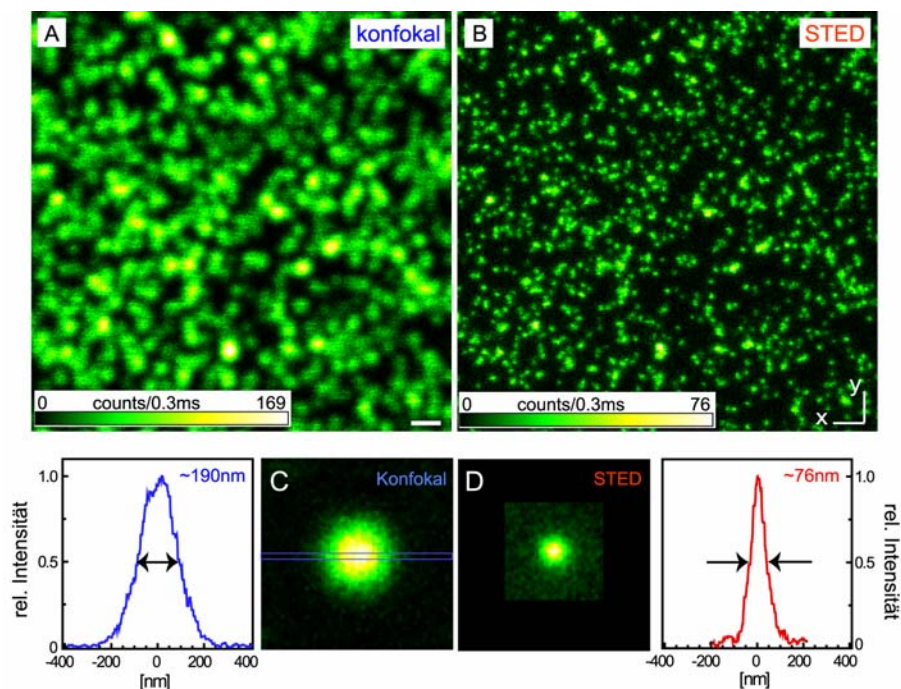


Abb. 17: Die Auflösung des STED-Mikroskops für GFP. (A) Die konfokalen Aufnahmen der GFP-VLP wurden bei einer Anregung von 488 nm durchgeführt. (B) Simultan wurden durch die Verwendung des STED-Pulses (575 nm) die STED-Bilder aufgenommen. (C+D) Dargestellt sind gemittelte Profile von 10 konfokalen und 10 STED-PSFs der aufgenommenen GFP-Viren. Größenstandard 500 nm

Die GFP-VLPs wurden in 4 % Formaldehyd für 10 min fixiert, in PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet. In Abbildung 17 sind die VLP in einem konfokalen und einem STED-Bild dargestellt. Für die Profile wurden wegen des besseren Signal-zu-Rausch Verhältnisses 10 Virenbilder im Schwerpunkt übereinandergelegt und gemittelt. Die Halbwertsbreiten der Helligkeitsprofile wurden von 188 nm beim Konfokalbild auf 76 nm in der STED-Aufnahme reduziert. Damit ist die Punktgröße der STED-Aufnahmen ~ 2.5 mal kleiner als in der Konfokal-Aufnahme. Für eine genauere Analyse der Punktgrößen-Verteilung beider Mikroskope wurden zwei unterschiedliche Konfokal- und STED-Aufnahmen herangezogen und insgesamt 243 VLPs konfokal und 150 VLPs mit dem STED-Mikroskop vermessen. Die Halbwertsbreiten (FWHM, *full width half maximum*) der GFP-VLP sind in Abbildung 18 gezeigt und eine Gauß-Kurve angepaßt.

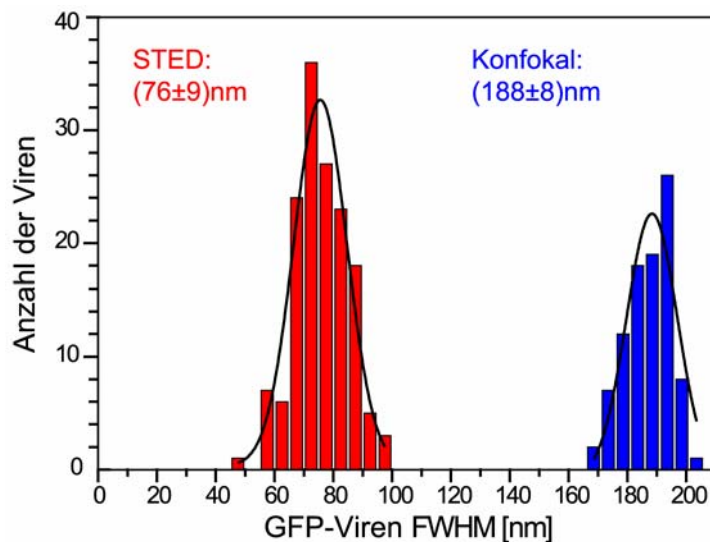


Abb. 18: Histogramm der Halbwertsbreiten der GFP-Viren im STED-Mikroskop (rot) und in der Konfokal-Aufnahme (blau). Die Daten wurden mit einer Lorentz-Kurve gefittet. Die Standardabweichung der Werte ist angegeben.

Die Punktgröße von 76 nm spiegelt jedoch nicht die Auflösungsgrenze des STED-Mikroskops wider, da das Testobjekt (GFP-VLP) eine Ausdehnung von 40 nm besitzt. Die tatsächliche Auflösung kann jedoch durch Faltungen unterschiedlich großer Objekte kalkuliert werden. Bei einem punktförmigen Objekt liegt die Auflösungsgrenze des Mikroskops für GFP bei 70 nm.

5 Ergebnisse

Mitochondrien sind hochdynamische Organellen, die durch ein balanciertes Verhältnis von Fusion und Teilung auf äußere und innere Signale ihrer Umgebung reagieren und daraufhin ihre Morphologie verändern können. In *S. cerevisiae* sind bisher vier Proteine bekannt, die an der mitochondrialen Teilung beteiligt sind. Fis1p spielt als integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran eine Rolle in der Rekrutierung und Anlagerung des Teilungskomplexes, während Caf4p und Mdv1p vermutlich eine Adaptorfunktion zwischen Fis1p und Dnm1p übernehmen. Dnm1p bildet Spiralen an Matrix-Konstriktionen und schnürt wahrscheinlich die Mitochondrienstränge in einer GTP-abhängigen Reaktion durch. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Matrix-Konstriktionen mikroskopisch näher untersucht und anschließend die Cluster des Dynamin-verwandten Dnm1p und der Einfluss der anderen Teilungsproteine auf diese Aggregate näher charakterisiert.

5.1 Die innere und äußere Membran bleibt bei Matrix-Konstriktionen kontinuierlich

Mitochondrien sind aufgrund ihres Ursprungs als Endosymbiont von einer Doppelmembran umgeben. Beim Verständnis der mitochondrialen Teilung ist bisher ungeklärt, ob sich beide Membranen gleichzeitig durchschnüren, oder ob sich zunächst die innere Membran teilt und erst später in einem zeitlich getrennten Vorgang die Teilung der äußeren Membran erfolgt. Markiert man die Matrix mit einem Fluoreszenzprotein und beobachtet Stellen, wo der Mitochondrienstrang unterbrochen scheint, können folgende Ereignisse lichtmikroskopisch nicht unterschieden werden:

- (1) Die Stränge sind vollständig voneinander getrennt.
- (2) Nur die inneren Membranen eines Stranges (und somit auch die Matrix) sind separiert, während die äußere Membran kontinuierlich ist.
- (3) Die innere und äußere Membran eines Stranges ist kontinuierlich, aber eingeschnürt, sodass das Matrixvolumen an dieser Stelle stark reduziert ist (Matrix-Konstriktion).

Um diese Ereignisse dennoch voneinander im Mikroskop unterscheiden zu können, wurden zwei unterschiedliche Ansätze realisiert. Das äußere Membranprotein Om45p (*outer membrane 45*) wurde C-terminal mit GFP fusioniert, um die äußere Mitochondrienmembran zu markieren. Als zweite Markierung wurde einmal die innere Membran und in einem anderen Ansatz die Matrix mit DsRed hervorgehoben. Durch die Markierung der Matrix in Kombination mit der äußeren Membran kann unterschieden werden, ob Matrix-Konstriktionen oder Teilungen der inneren Membran auftreten, obwohl die äußere Membran kontinuierlich bleibt. Die Hervorhebung der inneren Membran zusammen mit der äußeren ermöglicht weiterführend eine Unterscheidung zwischen Matrix-Konstriktionen und Teilungen der inneren Membran. Die Ergebnisse der Versuche sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

5.1.1 Herstellung der verwendeten Fluoreszenzmarker Om45p-GFP und mtDsRed

Das Plasmid pAS43-*OM45*-GFP basiert in seinem Grundgerüst auf dem Vektor pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000), einem Plasmid mit 2 μ -Replikationsursprung und ADH-Promotor (konstitutiver Alkohol-Dehydrogenase Promotor). Die Präsequenz (AS 1-69) der Untereinheit 9 der F₀-ATPase von *Neurospora crassa* wurde in diesem Vektor gegen die Gensequenz des äußeren Membranproteins Om45p ausgetauscht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die C-terminale GFP-Sequenz einen offenen Leserahmen mit *OM45* ausbildet. Das in der Zelle abgelesene Fusionsprotein Om45p-GFP wird zu den Mitochondrien transportiert und markiert nach seiner Verankerung die äußere Membran. Das Plasmid pJS55-mtDsRed basiert auf dem Vektor pRS323 mit 2 μ -Replikationsursprung (Sikorski und Hieter, 1989). Die für DsRed-T4 kodierende Sequenz wurde C-terminal an die Präsequenz (AS 1-69) der Untereinheit 9 der F₀-ATPase von *Neurospora crassa* ligiert, um das Fluoreszenzprotein in die Matrix zu adressieren. Zur Markierung der inneren Mitochondrienmembran mit DsRed wurde das Plasmid pHS12-DsRed.T4 (Bevis und Glick, 2002) mit CEN-Replikationsursprung verwendet. Die unter dem ADH-Promotor stehende DNA-Sequenz des fluoreszierenden Proteins ist N-terminal mit der Präsequenz von Cox4p, der Cytochrom c Oxidase aus der Elektronentransportkette, fusioniert. Die Präsequenz dirigiert das Protein in die innere Membran/Matrix. Die Vektorkarten aller verwendeten Konstrukte sind im Anhang einzusehen. Die genauen Klonierungsschritte sind im Methodenteil (3.1.8) aufgeführt.

Da für die Präsequenz von Cox4p die Lokalisationsangaben nicht eindeutig waren (innere Membran oder Matrix), wurde eine Lokalisationsanalyse des DsRed-Markers durchgeführt. Hierzu wurden die Mitochondrien des mit dem Plasmid pHS12-DsRed.T4 transformierten Hefestammes isoliert (siehe Methoden 3.2.1). Anschließend wurden die

Mitochondrien biochemisch in einzelne Kompartimente subfraktioniert (Lokalisationsanalyse, siehe Methoden 3.2.3). Die Methode beruht darauf, dass die in den Kompartimenten zugänglichen Proteine durch die Behandlung mit Proteinkinase K (PKK) systematisch entfernt werden. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden anschließend in einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Western-Blot-Analyse, siehe Methoden 3.2.4). Mit Hilfe eines primären DsRed-Antikörpers wurde in den verschiedenen Ansätzen kontrolliert, ob das Fluoreszenzprotein vom proteolytischen Abbau betroffen oder ob es für die Proteinkinase K nicht zugänglich war. Die Ergebnisse der Western-Analyse sind in Abbildung 19 dargestellt.

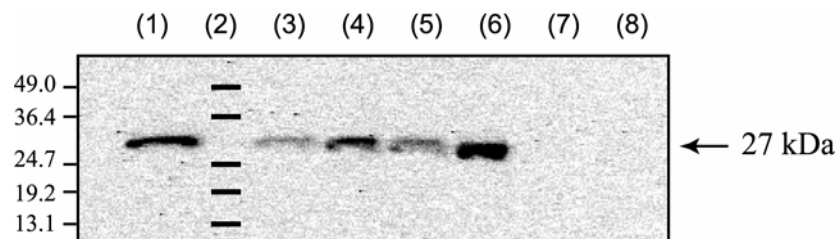


Abb. 19: Western-Analyse der Lokalisierung von *COX4*-Prä-DsRed des Plasmids pHS12-DsRed.T4. Die isolierten Mitochondrien des wt-Stammes BY4741 mit pHS12-DsRed.T4 wurden in der biochemischen Lokalisationsanalyse so behandelt, dass Proteine der einzelnen Kompartimente durch die Proteinkinase K (PKK) abgebaut werden konnten. (1) unbehandelte Mitochondrien, (2) Marker als Größenreferenz, (3) Mitochondrien mit PKK, (4) Mitoplasten, (5) Mitoplasten mit PKK, (6) Membran-gebundene Proteine, (7) ungebundene Proteine, (8) Negativ-Kontrolle (Proteindegradierung mit 100 % TCA). Die Western-Membran wurde mit einem primären anti-DsRed-Antikörper (1:500) und einem sekundären Peroxidase-konjugierten anti-Maus-Antikörper (1:10.000) inkubiert.

Die Western-Analyse zeigt, dass die Präsequenz von *COX4* das Fluoreszenzprotein DsRed in die innere Mitochondrien-Membran lokalisiert. Die Bande des DsRed-Proteins war nach der Markierung mit einem primären anti-DsRed-Antikörper und einem Peroxidase-konjugierten anti-Maus-Antikörper auf einer Höhe von 27 kDa in den Spuren eins, drei, vier, fünf und sechs zu detektieren. Die schwächeren Banden in Spur drei und fünf können durch den Verlust von Material während der biochemischen Aufreinigung zurückgeführt werden. Vom Abbau durch PKK sind in diesen Fraktionen nur Proteine betroffen, die sich gerade beim Import in die Mitochondrien befinden, und noch nicht ihre endgültige Lokalisierung aufweisen. Sowohl in der Spur der ungebundenen Proteine (sieben) als auch in der Negativ-Kontrolle (acht) konnte das Fluoreszenz-Protein nicht nachgewiesen werden. Die Analyse zeigt, dass Cox4-DsRed in der inneren Membran Richtung Matrix lokalisiert ist. Der Vektor pHS12-DsRed.T4 wurde im Folgenden zur Markierung der inneren Membran in Hefe eingesetzt.

5.1.2 Matrix-Konstriktionen treten unabhängig vom Teilungsprotein FisIp auf

Um zu untersuchen, ob Matrix-Konstriktionen oder Teilungen der inneren Membran ohne eine Teilung der äußeren Membran auftreten, wurden $\Delta fisI$ -Zellen mit den Plasmiden pAS43-OM45-GFP und pJS55-mtDsRed transformiert und in PM-Gal-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Danach wurden die lebenden Zellen in 1% Agarose eingebettet und mit einem konfokalen Laserraster-Mikroskop (SP2, Leica, Deutschland) in zwei Kanälen sequentiell aufgenommen (Details siehe Mikroskope 4.1). Für diesen Versuch wurden $\Delta fisI$ -Zellen verwendet, da vorangegangene Studien hier eine starke Dezimierung der äußeren Membranteilung zeigten. Durch den Gebrauch dieser Zellen sollte die Beobachtung von Einschnürungen oder Teilungen der inneren Membran unabhängig von der Trennung der äußeren Membran erleichtert werden. In den 3D-Daten konnten einige Matrix-Separationen beobachtet werden, bei denen die äußere Membran weiterhin kontinuierlich war (Abb. 20).

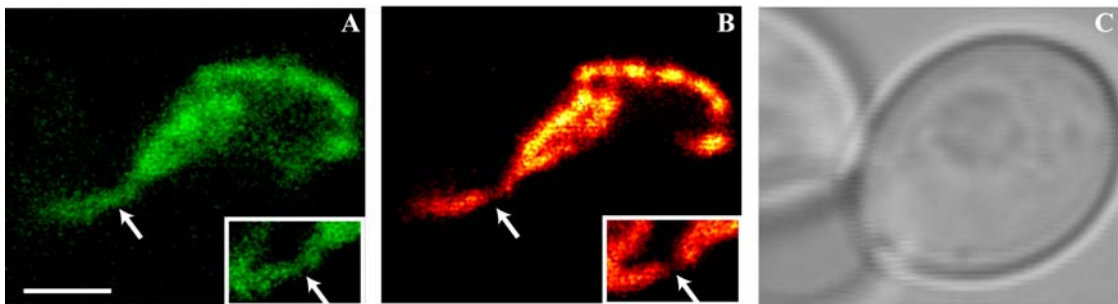


Abb. 20: Matrix-Konstriktionen treten in $fisI\Delta$ -Zellen auf. $fisI\Delta$ -Mutanten wurden mit OM45p-GFP (A) und mtDsRed (B) markiert (Hellfeld-Aufnahme in C) und in PMGal bis zur logarithmischen Phase inkubiert. Nach der Einbettung der lebenden Zellen in 1% iger Agarose wurden 3D-Bilderstapel mit einem Laserraster-Konfokalmikroskop aufgenommen. Gezeigt sind einzelne optische Schnitte, die in Falschfarben dargestellt sind. Die Separation der Matrix ohne Teilung der äußeren Membran (Pfeile) wird in der Detailansicht (Maximum-Projektion) besonders deutlich. Größenstandard: 2 μm .

Die Bilder belegen, dass Matrix-Konstriktionen (oder die Teilung der inneren Membran) unabhängig von der Separierung der äußeren Membran auftreten. Die Matrix-Markierung erlaubt jedoch nicht, zwischen einer Matrix-Konstriktion oder einer Teilung der inneren Membranen zu unterscheiden.

Aus diesem Grund wurde ein weiterer mikroskopischer Ansatz unternommen, bei dem neben der äußeren Membran mit Om45p-GFP die innere Membran mit Cox4p-DsRed markiert wurde. Die doppeltransformierten $\Delta fisI$ -Zellen wurden in einer Durchflusskammer mit Medium bei Raumtemperatur versorgt, um Teilungsprozesse in zeitlich gestaffelten Aufnahmen verfolgen zu können. Die Mikroskopeinstellungen blieben im Vergleich zum vorangegangenen Versuch dieselben.

Wie in Abbildung 21 gezeigt ist, konnten einige vollständige Teilungen beider Membranen beobachtet werden. Dies bestätigt vorangegangene Untersuchungen, die zeigten, dass in $\Delta fis1$ -Zellen die Anzahl der Teilungen zwar stark reduziert ist, einzelne Separationen jedoch noch stattfinden. Eine ausschließliche Teilung der inneren Membran mit kontinuierlicher äußerer Membran wurde niemals beobachtet. Dies belegt eine enge räumliche und zeitliche Koordination der Teilungsprozesse beider Membranen.

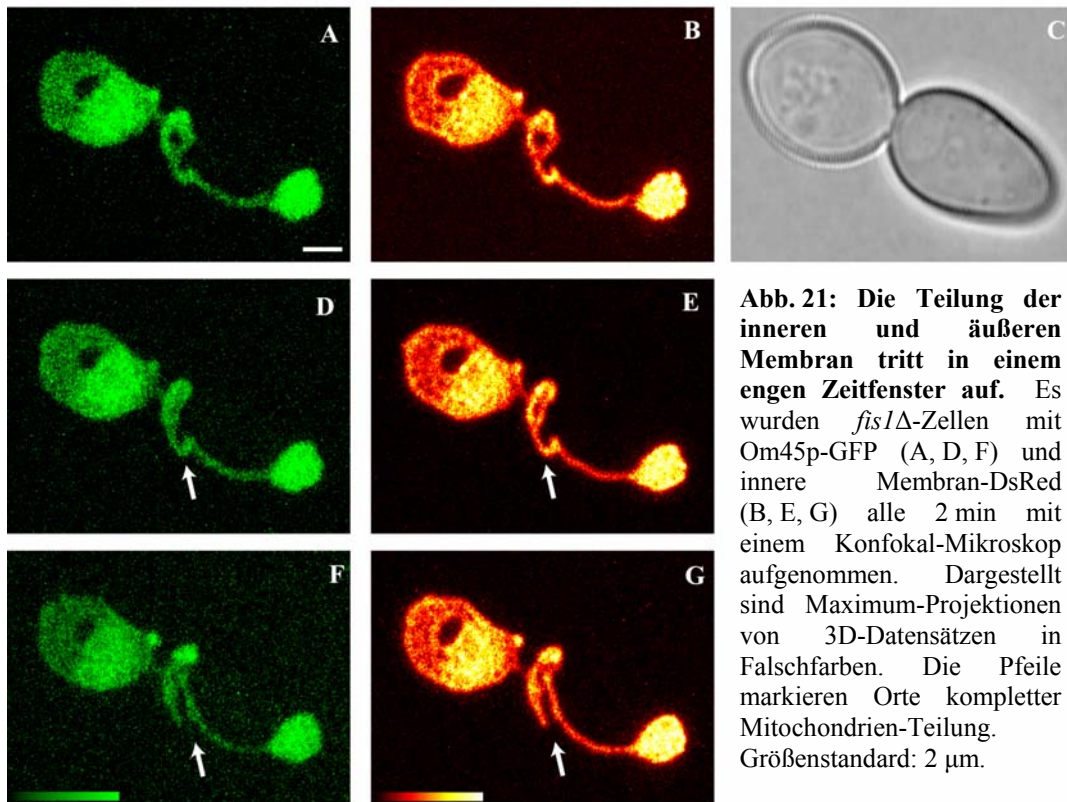


Abb. 21: Die Teilung der inneren und äußeren Membran tritt in einem engen Zeitfenster auf. Es wurden $fis1\Delta$ -Zellen mit Om45p-GFP (A, D, F) und innere Membran-DsRed (B, E, G) alle 2 min mit einem Konfokal-Mikroskop aufgenommen. Dargestellt sind Maximum-Projektionen von 3D-Datensätzen in Falschfarben. Die Pfeile markieren Orte kompletter Mitochondrien-Teilung. Größenstandard: 2 μ m.

In den Versuchen mit doppelmarkierten Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass Matrix-Konstriktionen unabhängig von der Teilung der äußeren Membran auftreten, die Separierung der inneren Membran jedoch zeitlich koordiniert mit der äußeren Membran-Teilung erfolgt. In den nächsten Versuchen soll die Kontinuität der mitochondrialen Netzwerke durch die Verwendung von photokonvertierbarem GFP untersucht werden. Da Konstriktionen im Gegensatz zu Teilungen der inneren Membran keine (dauerhafte) Diffusionsbarriere für Matrix-Proteine darstellen, können durch die Verfolgung der Ausbreitung des photokonvertierbaren Fluorophors in der Matrix zusätzlich Konstriktionen von Teilungen unterschieden werden. Zunächst musste jedoch die Methode der Photokonversion von GFP in Hefe-Mitochondrien etabliert werden.

5.2 Die Photokonversion von GFP eignet sich für die Untersuchung der mitochondrialen Netzwerke in Hefe

Photoaktivierbare Fluoreszenzmarker stellen ein geeignetes Werkzeug für die Beobachtung der räumlichen und zeitlichen Ausbreitung der markierten Zielstrukturen innerhalb der lebenden Zelle dar. In dieser Arbeit wurde die Verwendung von photokonvertierbarem GFP in Hefe-Mitochondrien etabliert, um die Kontinuität der mitochondrialen Netzwerke und das Auftreten von Matrix-Konstriktionen in wt, $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ -Zellen näher zu untersuchen.

5.2.1 Die Photokonversion von GFP ist abhängig von einer geringen Sauerstoff-Konzentration

Obwohl die Photokonvertierbarkeit von GFP schon länger bekannt ist (Elowitz *et al.*, 1997; Sawin und Nurse, 1997), wurde es mit Ausnahme einer Mobilitätsstudie in Bakterien (Elowitz *et al.*, 1999) nicht in lebenden Zellen angewendet. Einer der Gründe hierfür liegt darin, dass GFP nur unter sauerstoffarmen Bedingungen konvertiert. Für den fakultativ anaeroben Organismus *S. cerevisiae* kann eine niedrige Sauerstoffumgebung jedoch als physiologisch angesehen werden. Ob die Photokonversion von GFP in Hefemitochondrien durchgeführt werden kann, sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden. Dabei wurde zunächst die Abhängigkeit des O₂-Gehalts zur GFP-Konvertierbarkeit näher untersucht. Hierzu wurden die lebenden Zellen in Agarose eingebettet und direkt im Anschluss zehn Sekunden mit blauem Licht (Fluorescein Filter; 450-490 nm Anregung) bestrahlt (Abb. 22A). Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 543 nm konnte keine rote Fluoreszenz detektiert werden. Die atmungskompetenten Hefen verbrauchten den Sauerstoff unter dem Deckglas in weniger als 30 min. Die anschließende Photokonversion zeigte eine helle rote Fluoreszenz (Emissionsmaximum bei ~600 nm), die mit der grünen Fluoreszenz kolokalisierte (Abb. 22B).

Um zu überprüfen, ob die nach 30 min gesunkene Sauerstoffkonzentration für die erfolgreiche Photokonversion verantwortlich war, wurden Hefezellen mit einem Mutationsdefekt in der Atmung verwendet. Diesen Mutanten fehlt *COX6*, ein Gen, welches für eine Komponente des Atmungskettenkomplexes IV kodiert. In einem weiteren Versuch wurde die Atmungskette von Wildtyp-Zellen pharmakologisch mit 10 μ M Myxothiazol (Inhibitor des Komplexes III) blockiert. Zellen beider Ansätze konnten den Sauerstoff unter dem Deckglas nicht veratmen, die Photokonversion blieb auch nach 30 min aus (Abb. 22C und E). Entfernte man mit einem kombinierten Glukose-Oxidase/Katalase-System enzymatisch den Sauerstoff in diesen Zellen, konnte GFP wieder konvertiert werden (Abb. 22D und F).

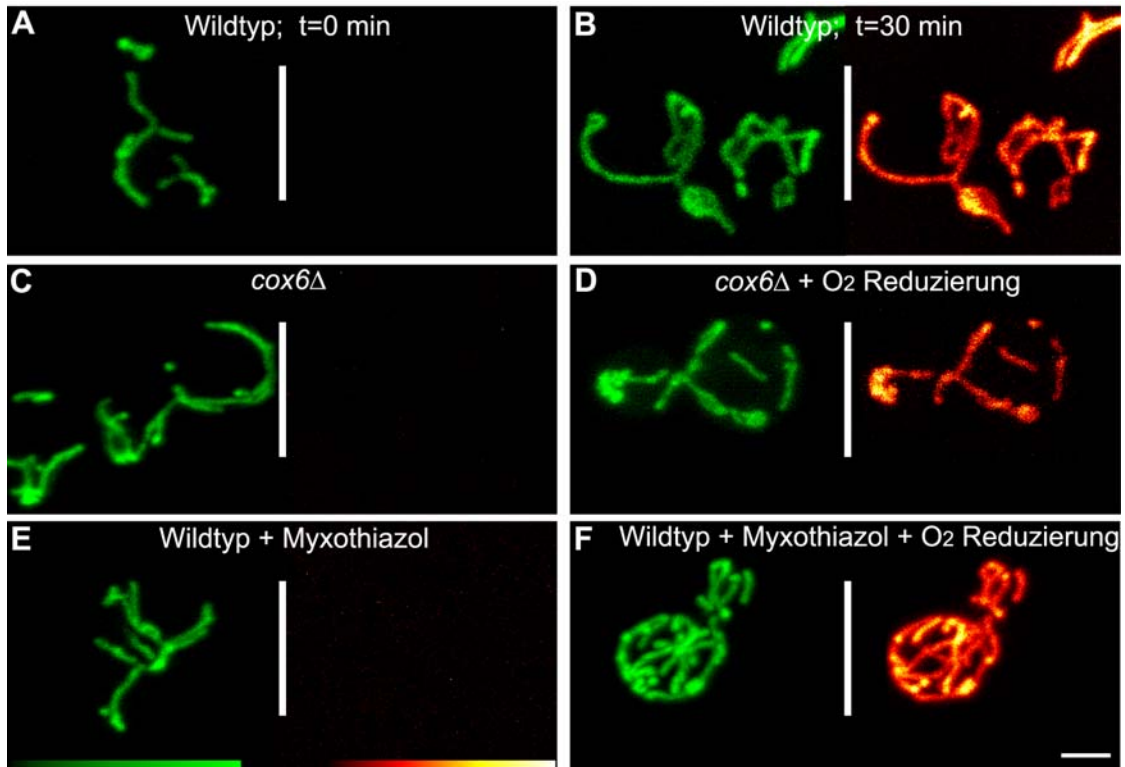


Abb. 22: Geringe Sauerstoff-Konzentrationen sind eine Voraussetzung für die Photokonversion von GFP. Hefezellen mit mtGFP wurden bis zur logarithmischen Phase inkubiert und in 1 % Agarose eingebettet. Auf der linken Seite jeder Abbildung (grüne Falschfarben-Tabelle) ist die grüne Fluoreszenz von GFP ($\lambda_{\text{Anr.}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Det.}} = 500\text{-}530 \text{ nm}$) dargestellt, auf der rechten Seite (feuerfarbene Tabelle) ist die photokonvertierte Fluoreszenz von GFP ($\lambda_{\text{Anr.}} = 543 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Det.}} = 570\text{-}630 \text{ nm}$) abgebildet. (A) Wildtyp-Zellen zeigten direkt nach der Einbettung grüne Fluoreszenz, ließen sich aber nach Beleuchtung mit blauem Licht (10 s, Fluorescein-Filter, 7 W cm^{-2} in der Probe) nicht photokonvertieren. (B) Nach 30 min unter dem Deckglas sind mtGFP exprimierende wt-Zellen photokonvertierbar. (C) In atemungsdefizienten *cox6*-Mutanten konnte auch nach 30 min keine Photokonversion festgestellt werden. (D) Nach Zugabe eines Sauerstoff-dezimierenden Systems (Glukose-Oxidase/Katalase) konnte in *cox6*-Mutanten mtGFP photokonvertiert werden. (E) In wt-Zellen mit $10 \mu\text{M}$ Myxothiazol konnte nach 30 min keine Photokonversion detektiert werden. (F) Nach Zugabe eines Sauerstoff-dezimierenden Systems konnte GFP in Zellen mit Myxothiazol photokonvertiert werden. Gezeigt sind Maximum-Projektionen von 3D-Datensätzen, aufgenommen mit einem Laserraster-Konfokalmikroskop. Größenstandard: $2 \mu\text{m}$.

Die Versuche zeigten, dass eine niedrige Sauerstoff-Konzentration eine wichtige Voraussetzung für die Photokonversion von GFP in Hefe darstellt. Weiterhin konnte ermittelt werden, dass sich die Methode zur Untersuchung von Matrix-markierten Hefemitochondrien eignet.

Ob die Methode der Photokonversion auch Langzeit-Experimente in Hefe ermöglicht, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden. Dabei sollte einerseits gezeigt werden, wie stabil das konvertierte Fluorophor über einen längeren Zeitraum bleibt und ob die Zellen andererseits durch den Marker in ihrer Lebensfähigkeit beeinflusst werden.

5.2.2 Die photokonvertierte rote GFP-Fluoreszenz ist stabil und unschädlich für die Zellen

Sorgt man für ausreichende Nährstoffe (fermentierbare Kohlenstoffquellen wie Glukose), können Hefezellen eingebettet in Agarose unter dem Deckglas auch bei sauerstoffarmen Bedingungen wachsen und sich teilen. Nach Beleuchtung dieser mtGFP markierten Zellen mit blauem Licht, wurde ein Teil der GFP-Moleküle photokonvertiert. Die konvertierte Protein wurde während der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben und blieb über einen Zeitraum von mindestens fünf Stunden stabil (siehe Abb. 23). Es konnte keine reduzierte Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt werden, somit scheint das photokonvertierte Protein unschädlich für den Modellorganismus Hefe zu sein. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Methode der Photokonversion dazu verwendet, Dynamiken der Hefemitochondrien über die Zeit zu verfolgen und Einblicke in die Kontinuität der Netzwerke zu gewinnen.

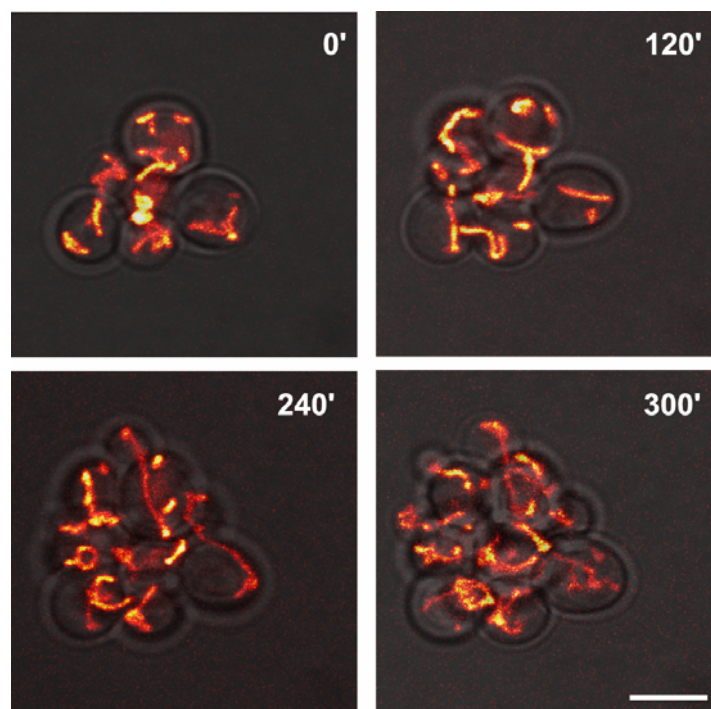


Abb. 23: Die Photokonversion von mtGFP beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der Hefe nicht. Wildtyp-Zellen mit mtGFP wurden in eine dünne Schicht YPD-Agar eingebettet und 2 h unter dem Deckglas inkubiert. Danach wurde das GFP durch Beleuchtung mit blauem Licht (10 s, Fluoreszein-Filter, 50 W Hg-Lampe) photokonvertiert. Die rote Fluoreszenz wurde mit einem Laserraster-Konfokalmikroskop zu den angegebenen Zeitpunkten aufgenommen (min). Dargestellt sind Maximum-Projektionen hinterlegt mit den Hellfeld-Aufnahmen. Größenstandard: 5 μm .

5.2.3 Die mitochondriale Matrix von Wildtyp-Zellen bildet ein Kontinuum

Wenn die mitochondriale Matrix mit einem Fluoreszenzprotein markiert ist, bleibt bei nicht kontinuierlich erscheinenden tubulären Bereichen zu klären, ob es sich um eine echte Teilung der Membran handelt, oder ob eine Matrix-Konstriktion vorliegt. Im Gegensatz zu einer Teilung würde eine Konstriktion keine (langfristige) Diffusionsbarriere für den Farbstoff darstellen. Die Photokonversion ermöglicht es, die räumliche Verbindung des mitochondrialen Netzwerks zu untersuchen. Hierzu wurde nur ein kleiner Bereich der Mitochondrien mit blauem Licht photokonvertiert (blauer Kreis in Abb. 24A und D) und die Fluoreszenz des konvertierten GFP nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 543 nm bei 570-560 nm detektiert (siehe Methoden 3.3.8).

Die Verteilung des rot konvertierten GFP wurde über die Zeit verfolgt. Am Ende jeder Zeitserie wurde ein Bild der grünen Fluoreszenz aufgenommen und verglichen, welche Bereiche des Netzwerkes zusammenhängen und welche separiert waren. Die Untersuchungen ($n > 25$) zur mitochondrialen Kontinuität wenige Sekunden nach der Photokonversion zeigten, dass durchschnittlich 50 % der Organellen zu einem bestimmten Zeitpunkt ein kontinuierliches Netzwerk bilden (Abb. 24A-C). Verfolgte man die Ausbreitung des photokonvertierten GFP über einen längeren Zeitraum, zeigte sich eine vollständige Durchmischung der mitochondrialen Matrix nach spätestens zehn Minuten (Abb. 24D-H).

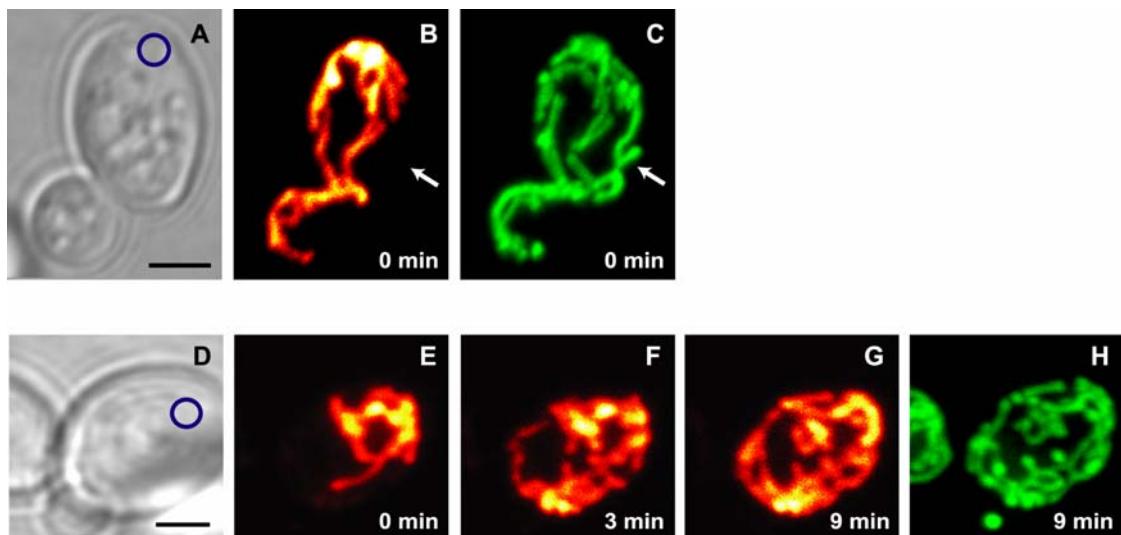


Abb. 24: Die Proteine der mitochondriale Matrix vermischen sich in weniger als 10 min. Matrix-GFP wird in Wildtyp-Zellen nach 30 minütiger Inkubation unter dem Deckglas in einem kleinen Bereich (blauer Kreis in Hellfeld-Bild A und D) photokonvertiert. (B) Der rote Farbstoff diffundiert in einen großen Teil des Netzwerkes. (C) Eine Aufnahme der grünen Fluoreszenz zeigt das gesamte mitochondriale Netzwerkes. Die Pfeile deuten auf einen Strang, der mit dem restlichen Netzwerk nicht verbunden ist. (E-G) Die Verteilung des photokonvertierten Farbstoffes zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Konversion zeigt eine Durchmischung der Matrix über die Zeit. (H) Die Aufnahme der grünen Fluoreszenz nach 9 min im Vergleich zur photokonvertierten Aufnahme (G) zeigt eine vollständige Vermischung der Matrix. Größenstandard: 2 μm

Die Ergebnisse zeigen, dass die mitochondrialen Netzwerke in wt-Zellen hoch dynamisch sind und sich die konvertierten Fluoreszenzproteine in der Matrix durch fortschreitende Fusionen ausbreiten. In den folgenden Experimenten wurde die Kontinuität der Netzwerke unter einem weiteren Aspekt betrachtet. So kann durch die Verwendung von photokonvertierbarem mtGFP auch zwischen Konstriktionen und Teilungen der inneren Membran unterschieden werden, da im Gegensatz zu Teilungen Matrix-Konstriktionen keine Barriere für die Ausbreitung der Fluoreszenzproteine darstellen. Die Methode wurde im Folgenden dazu verwendet, die Kontinuität und das Auftreten von Matrix-Konstriktionen in $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ -Zellen näher zu untersuchen.

5.2.4 In $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ -Zellen treten Matrix-Konstriktionen auf

Im Gegensatz zum wt weisen $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ -Zellen je nach Kohlenstoff-Quelle im Phänotyp Mitochondrien auf, die kleinen oder großen Fischernetzen ähneln, da in beiden Stämmen die mitochondriale Teilung ganz aufgehoben oder stark eingeschränkt ist, während Fusionen weiterhin stattfinden. In diesen Mutanten sollte mit Hilfe der Photokonversion die Kontinuität der mitochondrialen Netzwerke und das Auftreten von Matrix-Konstriktionen untersucht werden. Dazu wurde ein kleiner Bereich der Mitochondrien mit blauem Licht photokonvertiert und die Ausbreitung des konvertierten Proteins verfolgt. In Abbildung 25 ist am Beispiel von $\Delta fis1$ -Zellen die punktförmige Photokonversion und Verteilung des konvertierten GFP gezeigt. Dabei konnte sowohl in $\Delta fis1$ als auch in $\Delta dnm1$ -Zellen eine schnelle Ausbreitung des konvertierten Proteins über das gesamte Netzwerk beobachtet werden. Weiterhin traten in beiden Mutanten Matrix-Konstriktionen auf, die jedoch keine Barriere für die Verteilung des konvertierten GFP darstellten.

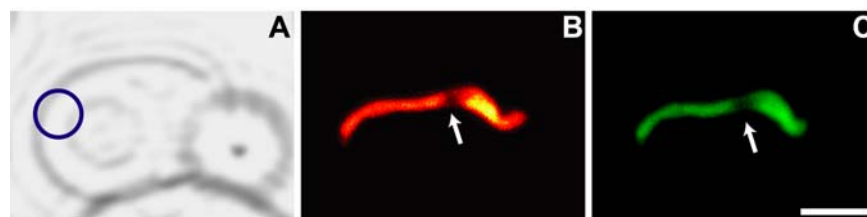


Abb. 25: In $\Delta fis1$ -Zellen bleibt die Kontinuität der Matrix trotz Konstriktion erhalten. In $\Delta fis1$ -Mutanten wurde in einer definierten Region mtGFP photokonvertiert (blauer Kreis in der Hellfeld-Aufnahme, A). Die rote Fluoreszenz des photokonvertierten GFP (B) breitete sich vollständig aus (Vergleich grüne Fluoreszenz, C). Die Pfeile deuten auf eine Matrix-Konstriktion. Größenstandard: 2 μ m

Das Auftreten von Matrix-Konstriktionen, die nach den aktuellen Teilungsmodellen als Voraussetzung für die Bildung von Dnm1p-Spiralen angesehen werden, ist somit unabhängig von den Teilungsproteinen Dnm1p und Fis1p. Die Proteine Mdv1p und Caf4p wurden mit dieser Methode nicht untersucht, in $\Delta caf4$ -Zellen wurden jedoch in weiteren Untersuchungen dieser Arbeit Matrix-Konstriktionen häufig beobachtet.

Zusammenfassung der Untersuchungen der Matrix-Konstriktionen

In den bisher vorgestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Teilung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran zeitlich eng gekoppelt abläuft. Eine Separation der inneren Membranen in Kombination mit einer kontinuierlichen äußeren Membran konnte dagegen nicht beobachtet werden. Mit Hilfe der Photokonversion von GFP wurde gezeigt, dass die Matrix in wt-Zellen ein Kontinuum darstellt, welches sich durch die Dynamik der Mitochondrien in weniger als zehn Minuten durchmischt. Dabei blieb die Kontinuität der Matrix trotz Matrix-Konstriktionen erhalten, da die tubulären Einschnürungen keine (dauerhafte) Diffusionsbarriere darstellten. Die Teilungsproteine Dnm1p und Fis1p sind für die Ausbildung von Matrix-Konstriktionen nicht essentiell, da in den entsprechenden Deletionsstämmen weiterhin mitochondriale Einschnürungen beobachtet werden konnten.

5.3 Die Größe und Verteilung der Dnm1p-Cluster ist von Fis1p, Caf4p und Mdv1p abhängig

Dnm1p spielt eine Schlüsselrolle in der mitochondrialen Teilung in Hefe. Die Dynamin-verwandte GTPase assoziiert in Clustern auf der äußeren Mitochondrien-Membran und bildet, nach den gegenwärtigen Modellen, Dnm1p-Spiralen an Stellen von Matrix-Konstriktionen. Nachdem bisher die Konstriktionen näher untersucht wurden, sollten nun die Dnm1p-Cluster mit GFP markiert und mikroskopisch charakterisiert werden. Dabei wurde zunächst die Helligkeitsverteilung der Cluster im Zytosol und den Mitochondrien sowie die Anzahl ihrer Moleküle im wt bestimmt werden. Es blieb die Frage zu klären, ob die anderen Teilungsproteine Fis1p, Caf4p und Mdv1p einen Einfluss auf die Größe und Verteilung der Dnm1p-Aggregate besitzen.

5.3.1 Herstellung des Fusionsproteins Dnm1p-GFP durch Epitop-Markierung

Um die Anzahl von Dnm1p-Molekülen in den Clustern lichtmikroskopisch bestimmen zu können, mussten die Proteine zunächst mit GFP markiert werden. Wichtig war, dass dabei die Funktionalität des Proteins nicht beeinflusst wurde. Um eine Über- oder Unterexpression des Proteins zu verhindern, wurde das Verfahren der Epitop-Markierung angewandt (siehe Abb. 26 und Methoden 3.3.3).

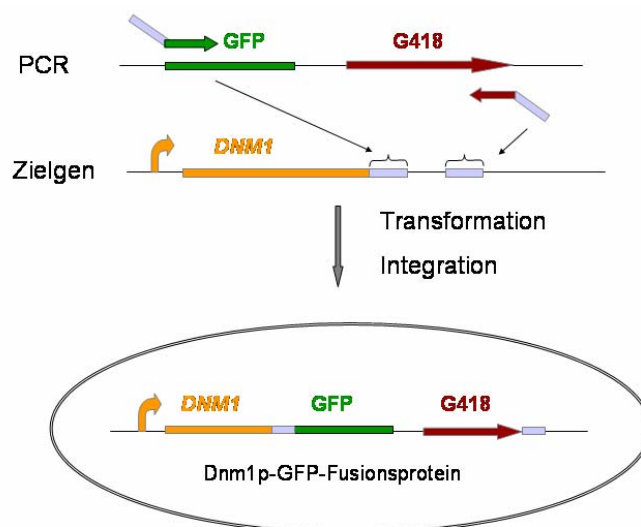


Abb. 26: Strategie des Epitop-Taggings

Das chromosomale Zielgen (*DNMI*) wurde ohne Stop-Codon mit der DNA-Sequenz von GFP C-terminal unter Berücksichtigung des Leserasterrahmens fusioniert. Zwischen *DNMI* und GFP wurde ein für acht Aminosäuren kodierender Abstandshalter eingefügt (siehe Material 2.2). Als Selektionsmarker wurde das kanMX-Modul verwendet (Güldener *et al.*, 1996), welches sich aus einer von zwei loxP-Abschnitten flankierten G418-Resistenzkassette zusammensetzt. Ein TEF-Promotor und ein TEF-Terminator flankieren das Modul nach außen und erlauben eine kontinuierliche Transkription des Kanamycin-Gens.

Mit Hilfe der PCR wurde der Abschnitt auf dem Plasmid pFAa-GFP(S65T)-kanMX6 (Wach *et al.*, 1997) amplifiziert, der für GFP und das KanMX-Modul kodiert. Die verwendeten Primer Dnm1-GFP tagging up und Dnm1-GFP tagging down (Sequenzen siehe Material 2.2) bestehen jeweils aus zwei Abschnitten. Die ersten 36 Basenpaare am 3'-Ende sind homolog zu den Bereichen stromabwärts des *DNMI*-Gens (hellblau in Abb. 26). Die folgenden 18 Basenpaare sind komplementär zu den Sequenzen von GFP (grün) bzw. G418 (rot) des Plasmids. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den haploiden Wildtyp-Stamm BY4741 transformiert (siehe Methoden 3.3.1.3). Durch homologes Doppel-Crossover wurde das wildtypische *DNMI*-Gen gegen *DNMI*-GFP-KanMX ausgetauscht und steht somit unter Kontrolle des nativen Promotors und seiner Umgebung. Die rekombinanten Klone wurden durch PCR (siehe Abb. 27) und Sequenzierung des Dnm1p-GFP-Überganges bestätigt (DNA-Sequenz siehe Anhang).

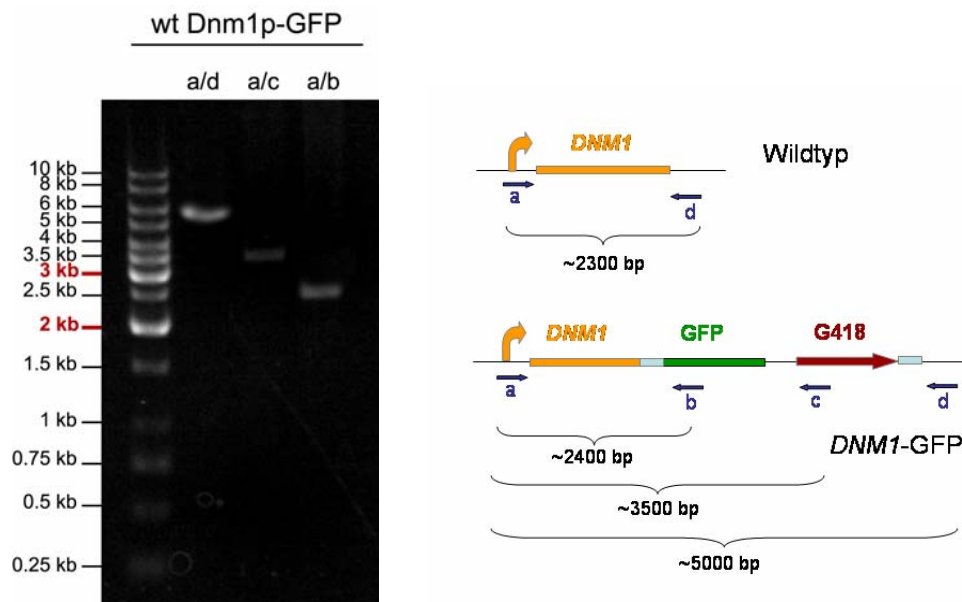


Abb. 27: Der wt-Stamm mit dem Fusionsprotein Dnm1p-GFP wurde mit Hilfe der PCR und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Die erste Spur stellt die Primerkombination a/d dar, die zweite Spur die Kombination a/c, die dritte die Primer c/b. Der Stamm zeigt die erwarteten Bandengrößen, die in der Skizze schematisch aufgezeichnet. Die wt-Bande bei 2.3 kb taucht bei der Primerkombination a/d nicht auf, das Fusionsgen *DNMI*-GFP ersetzt das chromosomale *DNMI*-Gen. Die Größen des DNA-Markers sind aufgetragen, die 3 und 2 kb-Banden sind rot markiert und dienen in den folgenden Gelbildern der besseren Orientierung.

Die Funktionalität des C-terminal mit GFP fusionierten Dnm1p lässt sich anhand des mitochondrialen Phänotyps feststellen. Eine Deletion oder ein Funktionsverlust des Dnm1-Proteins führt zu fischernetzartigen Mitochondrien, da die mitochondriale Teilung unterbunden ist, während die Fusion der Organellen fortschreitet. In Abbildung 28 ist der Phänotyp der Mitochondrien im wt und in $\Delta dnm1$ -Zellen gegenübergestellt. Der hergestellte Hefestamm mit Dnm1p-GFP als Fusionsprotein (im Folgenden als AS198 bezeichnet) zeigte zu ~90% (doppelt blinde Auszählungen) einen wildtypischen Mitochondrienphänotyp. Die Funktionalität von Dnm1p wird durch die C-terminale Fusion an GFP wenig beeinträchtigt.

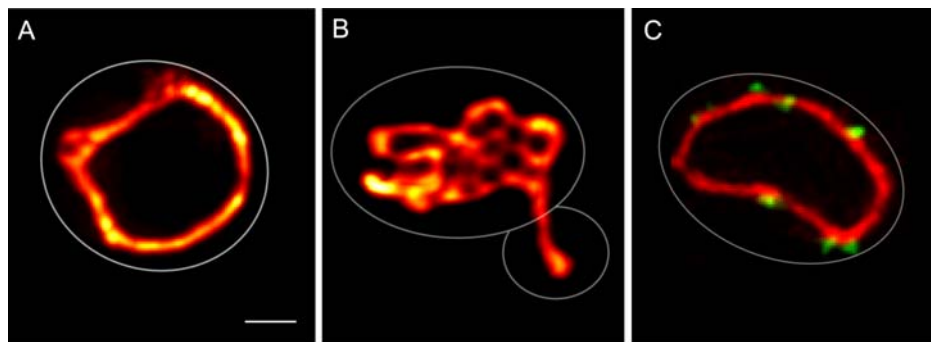


Abb. 28: Die mitochondrialen Netzwerke im wt (A) und im wt mit Dnm1p-GFP (C) unterscheiden sich deutlich vom mitochondrialen $\Delta dnm1$ -Phänotyp (B). Die Stämme in (A) und (B) wurden mit mtGFP markiert, während im wt-Stamm mit Dnm1p-GFP (C) die Matrix mit DsRed hervorgehoben wurde. Dargestellt sind Maximum-Projektionen von konfokalen 3D-Datenstapeln. Größenstandard: 1 μ m

5.3.2 Einkreuzen des Dnm1p-GFP Fusionsproteins in die Deletionsstämme $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$ mit Hilfe der Tetradenanalyse

Um Größe und Verteilung der Dnm1p-GFP Cluster in Abhängigkeit von den an der mitochondrialen Teilung beteiligten Proteine zu untersuchen, wurde das Fusionsgen in die haploiden Deletionsstämme $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$ (Euroscarf, Deutschland) eingekreuzt. Dazu wurde eine Tetradenanalyse durchgeführt (siehe Methoden 3.3.5). *S. cerevisiae* kann sowohl diploid als auch haploid vorliegen. Genetisch betrachtet bietet der haploide Zustand neben der vereinfachten Herstellung von Deletionsmutanten den Vorteil, dass er in unterschiedlichen Paarungstypen (\mathbf{a} und α) vorkommt. Haploide Hefen des \mathbf{a} - und α -Typs können zu einer diploiden Zygote verschmelzen und unter Mangelbedingungen vier Ascosporen ausbilden. Die Sporen beinhalten Teile der Erbinformation beider Eltern und können in der Tetradenanalyse voneinander getrennt werden. Zunächst wurden die Sporen mikroskopisch auf die Expression von Dnm1p-GFP untersucht wobei jeweils 2 von 4 Sporen dieses Kriterium erfüllten. Aus den

positiv getesteten Hefeklonen wurde chromosomale DNA isoliert (siehe Methoden 3.3.1). Mit Hilfe der PCR wurden die Klone darauf getestet, ob sie neben dem Gen für das Dnm1p-GFP Fusionsprotein auch die Deletion des entsprechenden Teilungsproteins (also *CAF4*, *MDV1* oder *FIS1*) tragen. Die Kontroll-PCR (Abb. 29) verifiziert die im Folgenden verwendeten Stämme (AS373, AS424, AS501).

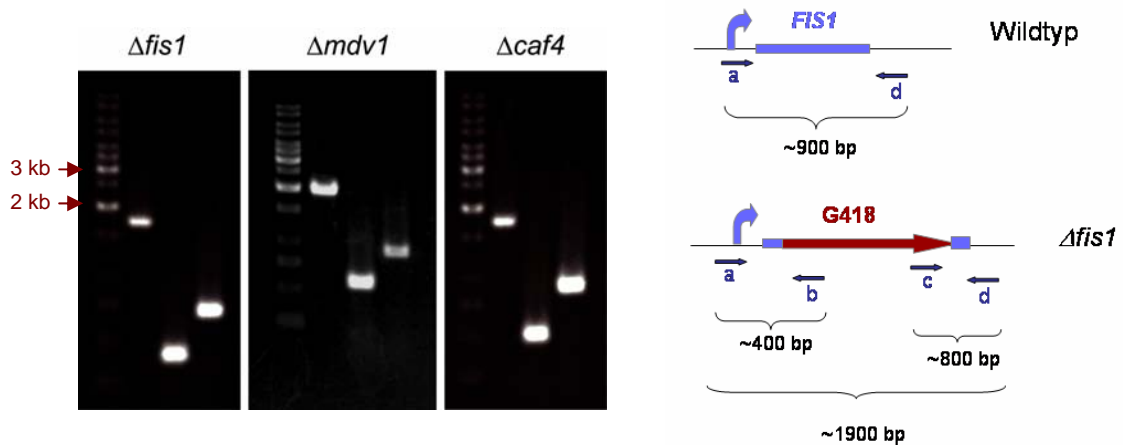


Abb. 29: Die Deletionsstämme *fis1* Δ , *mdv1* Δ und *caf4* Δ wurden mit Hilfe der PCR und anschließender Gelelektrophorese überprüft. Die erste Spur stellt jeweils die Primerkombination a/d dar, die zweite Spur die Kombination a/b, die dritte die Primer c/d. Die Stämme zeigen die erwarteten Bandengrößen, die in der Schemazeichnung für *FIS1* beispielhaft dargestellt sind. Wichtig ist, dass die wt-Bande nicht auftaucht, da ein zweites, nicht mit GFP markiertes Protein (z.B. durch Diploidie) die folgenden quantitativen Messungen beeinträchtigen würde.

Da für die weiteren Untersuchungen neben der Markierung von Dnm1p auch die Lokalisierung der Mitochondrien wichtig ist, wurde die mitochondriale Matrix mit DsRed markiert. Dazu wurde der 2 μ -Vektor pYX222-mtDsRed konstruiert (Vektorkarte siehe Anhang), der die für DsRed.T4 codierende Sequenz unter die Kontrolle eines TPI-Promotors (Triosephosphat-Isomerase-Promotors) stellt und DsRed durch die Präsequenz (AS 1-69) der Untereinheit 9 der F₀-ATPase von *Neurospora crassa* in die mitochondriale Matrix adressiert (Klonierung siehe Methoden 3.1.8.3). Der mit Hilfe von Restriktionsspaltungen überprüfte Vektor wurde in den wt, Δ *fis1*, Δ *mdv1* und Δ *caf4*-Stamm transformiert, so dass mtDsRed nun die mitochondriale Matrix markiert.

Die erzeugten Stämme enthalten das gleiche Epitop-markierte Dnm1p-GFP und gehen in ihrem Ursprung auf den Hefestamm BY4741/BY4742 zurück. Bei allen Stämmen ist die mitochondriale Matrix mit DsRed hervorgehoben. Die Helligkeit und Anzahl der Moleküle der Dnm1p-Cluster in den verschiedenen Zellen wurde in den folgenden Experimenten quantitativ bestimmt und miteinander verglichen, um den Einfluss der Teilungsproteine Fis1p, Mdv1p und Caf4p auf Dnm1p zu untersuchen.

5.3.3 Probenpräparation und konfokale Mikroskopie-Aufnahmen

Die mit DsRed und Dnm1p-GFP markierten *wt*, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$ -Stämme wurden über Nacht in SC-His-Medium bei 30°C angezogen und bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 3.7 % Formaldehyd für 10 min fixiert und in 1 % Agarose unter dem Deckglas eingebettet (Details siehe Methoden 3.3.7). Die Fixierung der Zellen ermöglicht eine genauere Lokalisierung der Punkte, da sowohl die mitochondriale Eigenbewegungen als auch Wanderungen der Dnm1p-Cluster während der Messung ausgeschlossen werden können. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Laserraster-Konfokalmikroskop (TCS SP2, Leica Microsystems CMS GmbH, Deutschland) durchgeführt, das zusätzlich mit Avalanche Photodioden (APDs) ausgestattet war. GFP wurde mit einem Argon-Krypton-Laser bei 488 nm und DsRed mit einem Helium-Neon-Laser bei 543 nm angeregt und die Fluoreszenz der beiden Proteine in zwei Kanälen mit APDs detektiert (Details siehe Mikroskope 4.1). Die erhaltenen konfokalen 3D-Rohdatenstapel wurden in beiden Kanälen (grüner Kanal für Dnm1p-GFP und roter Kanal für mtDsRed) so zurechtgeschnitten, dass jeweils eine einzelne Hefezelle in einem Datenstapel von etwa 6 μm Kantenlänge zentriert war.

5.3.4 Datenerfassung (Überblick)

Die zurechtgeschnittenen Rohdatenstapel wurden in ein dafür geschriebenes Computerprogramm (Details siehe Methoden 3.4.2) eingelesen. Die Daten wurden geglättet, der individuelle Hintergrund abgezogen und für das Übersprechen der Kanäle korrigiert. Dann wurden die Dnm1p-GFP Cluster im grünen Kanal anhand ihrer Fluoreszenz-Intensität identifiziert und Schwerpunkt und genaue Position innerhalb des Datenstapels bestimmt. An der gleichen Position im roten Kanal wurde mit Hilfe der mtDsRed-Helligkeiten ermittelt, ob die Cluster an den Mitochondrien angelagert sind oder sich im Zytoplasma befinden. Durch den Vergleich der Lage der Dnm1p-GFP Cluster zu den Mitochondrien und dem Mittelpunkt der Zelle (Zentrum des Datenstapels) kann die Orientierung der mt-assoziierten Cluster ermittelt werden. Die Fluktuation des mtDsRed-Signals entlang eines Mitochondrienstranges (Konstriktionen) wird zur Identifizierung potentieller Dnm1p-GFP Spiralen verwendet.

Im folgenden Versuch wurden die Helligkeiten der Cluster und ihre Zuordnung zum Zytoplasma oder den Mitochondrien in den verschiedenen Stämmen ermittelt und miteinander verglichen, um den Einfluss der Deletion einzelner Teilungsproteine auf die Verteilung von Dnm1p aufzuzeigen.

5.3.5 Die Deletionen von *MDV1*, *FIS1* und *CAF4* haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Helligkeit und Verteilung der Dnm1p-Cluster

Um einen quantitativen Helligkeitsvergleich der Dnm1p-GFP Cluster in den verschiedenen genetischen Hintergründen zu erhalten, musste die Vergleichbarkeit der aufgenommenen Daten an unterschiedlichen Tagen gewährleistet werden. Eine Voraussetzung hierfür waren gleiche Mikroskopeinstellungen, Bildgrößen und Laserintensitäten. Da die Laserleistung über einen längeren Zeitraum und an verschiedenen Messtagen nicht konstant ist, wurde ein GFP-VLP (*virus-like protein*) mit konstanter Anzahl an Fluoreszenzmolekülen als Kalibrierungsstandard verwendet.

5.3.5.1 Kalibrierung der Fluoreszenz-Intensität

Der GFP-VLP wurde einerseits dazu verwendet, die Laserintensität an verschiedenen Tagen kalibrieren zu können und andererseits, um einen internen Helligkeitsstandard in den Messungen zu haben. Bei dem GFP-VLP handelt es sich um einen genetisch veränderten Rotavirus, der durch den Austausch eines seiner Virenproteine (VP2) durch ein GFP-Fusionsprotein eine konstante Anzahl an GFP-Proteinen enthält (Charpilienne *et al.*, 2001; Dundr *et al.*, 2002). Durch den symmetrischen Aufbau der inneren Capsid-Hülle enthält jeder VLP 120 GFP-Moleküle. Mit Hilfe dieses Standards war es durch direkten Helligkeitsvergleich möglich, die Anzahl an Dnm1p-GFP Molekülen der Cluster abzuschätzen.

In Abbildung 30 ist die Helligkeitsverteilung der GFP-VLP mit zwei angepassten Gauss-Kurven dargestellt. Die enge Gauss-Verteilung des Hauptmaximums spiegelt die Genauigkeit der GFP-Menge pro VLP wieder. Das zweite kleinere Nebenmaximum mit der doppelten Helligkeit deutet auf zwei aggregierte VLP hin. Die mittlere Helligkeit eines VLP ist im Histogramm auf den Wert eins normiert und entspricht 120 GFP-Molekülen. Die in den folgenden Versuchen verwendeten Helligkeitswerte beziehen sich auf diese Einheit. Aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses gehen in die folgenden Histogramme und Statistiken nur Dnm1p-Cluster ein, die eine Helligkeit von mindestens einem VLP aufweisen.

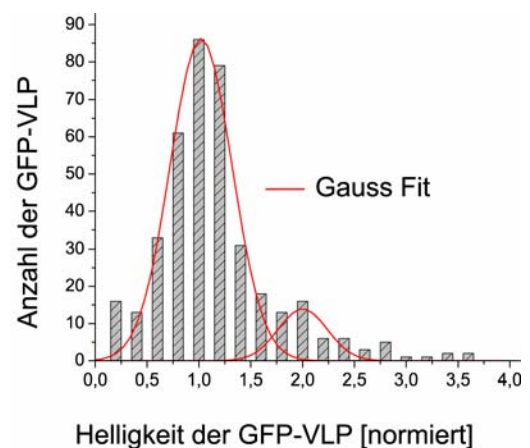


Abb. 30: Helligkeitsverteilung der GFP-VLP. Die mittlere Fluoreszenz-Intensitätsverteilung der GFP-VLP wurde auf die Helligkeit eines einzelnen VLP normiert. Das zweite Maximum entspricht zwei aggregierten VLP.

5.3.5.2 Die Helligkeit und Verteilung der Dnm1p-GFP Cluster variiert in den unterschiedlichen genetischen Hintergründen

In diesem Experiment wurden die Helligkeitsverteilungen der Cluster in den verschiedenen Stämmen ermittelt und verglichen, um den Einfluss der Deletionen von *FIS1*, *MDV1* und *CAF4* auf die Dnm1p-GFP Aggregate aufzuzeigen. Weiterhin wurden die Cluster basierend auf der Helligkeit der korrespondierenden DsRed-Signale in eine Mitochondrien-assoziierte (hellgrau) und eine zytosolische Gruppe (schwarz, Abb. 31) unterteilt. Die dargestellten Clusterverteilungen beziehen sich auf jeweils 80 untersuchte Hefezellen pro Stamm. Die Graphen wurden auf die Helligkeit von einem VLP (entspricht 120 GFP-Molekülen) normiert.

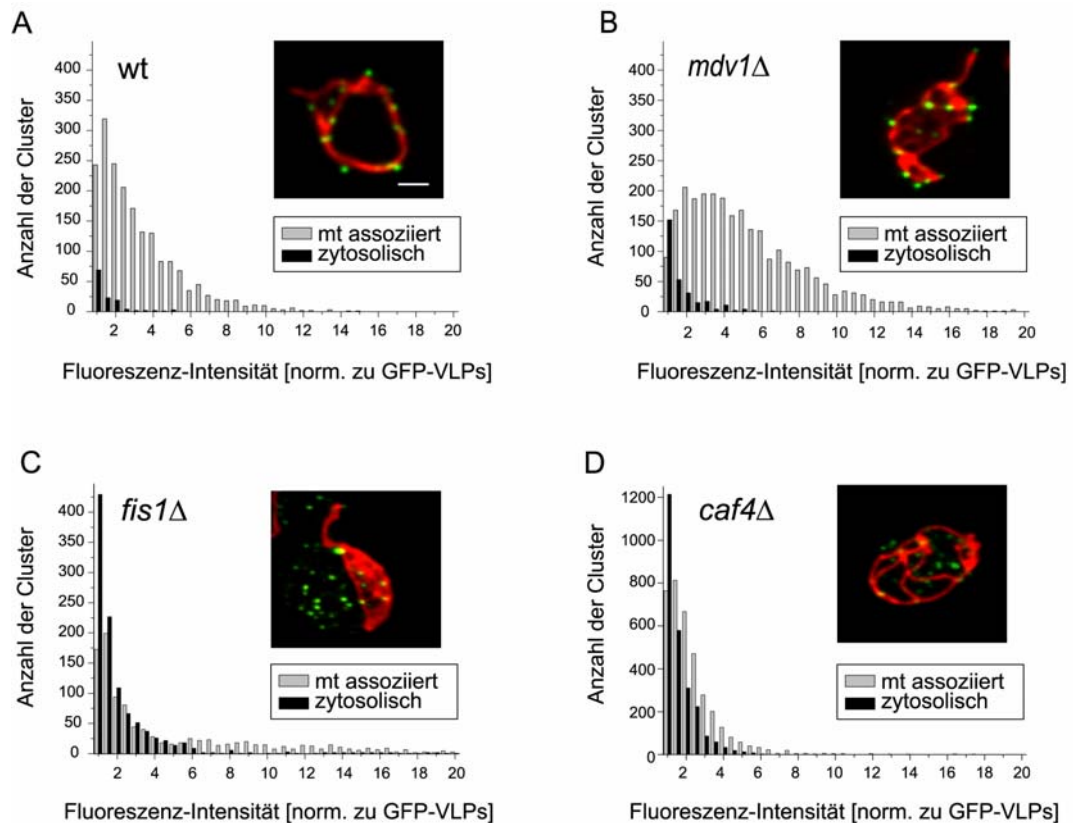


Abb. 31: Zytosolische und Mitochondrien-assoziierte Dnm1p-GFP Cluster haben in wt, *fis1Δ*, *mdv1Δ* und *caf4Δ*-Zellen unterschiedliche Helligkeiten und Verteilungen. (A-D) Die Fluoreszenz-Intensitätsverteilung der Mitochondrien-assoziierten (grau) und zytosolischen Dnm1p-GFP Clustern (schwarz) wurde auf die Fluoreszenz-Intensität eines GFP-VLP normiert. Für jeden Graphen wurden jeweils 80 Dnm1p-GFP und mtDsRed exprimierende Hefen aufgenommen und analysiert. Die eingefügten Bilder stellen repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der jeweiligen Stämme dar. Dabei sind die mtDsRed markierten Mitochondrien in rot (Falschfarben-Tabelle) und die Dnm1p-GFP Cluster in grün (Falschfarben-Tabelle) in einer Aufsummlung von konfokalen Einzelbildern dargestellt. Größenstandard: 1 μ m

Die Analyse zeigt, dass im Wildtyp (Abb. 31A) und in $\Delta mdv1$ -Zellen (Abb. 31B) nur sehr wenige dunkle Dnm1p-GFP Cluster im Zytosol vorliegen. In $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen ist hingegen etwa die Hälfte aller (vorwiegend dunklen und mittelhellen, in $\Delta fis1$ -Zellen aber auch wenigen sehr hellen) Cluster im Zytosol lokalisiert. Dieses Ergebnis spricht für eine Rolle von Fis1p und Caf4p in der Rekrutierung von Dnm1p zu den Mitochondrien. In $\Delta mdv1$ und $\Delta fis1$ -Zellen können besonders helle Cluster (> 1000 Moleküle) beobachtet werden. Eine statistische Auswertung der Daten ist in Tabelle 11 aufgeführt.

In Tabelle 11 ist zu erkennen, dass Dnm1p-GFP Cluster in $\Delta mdv1$ -Zellen durchschnittlich heller sind als in den anderen Stämmen. Dafür weisen $\Delta caf4$ -Zellen im Mittel mehrere dunklere Cluster auf. Grundsätzlich sind im Schnitt die zytosolischen Cluster dunkler als die Mitochondrien-assoziierten, wobei $\Delta fis1$ -Zellen auch wenige besonders helle Cluster im Zytosol aufweisen. Bezieht man die mittleren Fluoreszenz-Intensitäten mit Hilfe der verwendeten GFP-VLP auf die Anzahl der Dnm1p-GFP Moleküle, so enthält der durchschnittliche wildtypische Dnm1p-Cluster etwa 400 Proteine, ein Cluster in $\Delta mdv1$ -Zellen 540 Dnm1p-Moleküle, in $\Delta fis1$ -Zellen 370 Proteine und in $\Delta caf4$ -Zellen sogar nur 250 Dnm1p-Moleküle. Bei der aufgeführten Statistik ist zu beachten, dass die Helligkeiten der Cluster in $\Delta caf4$, besonders aber in $\Delta fis1$ -Stämmen sehr inhomogen sind. So besitzen $\Delta fis1$ -Zellen zum Beispiel häufig einen sehr hellen und viele dunklere Dnm1p-Cluster. Die Ergebnisse zeigen, dass Deletionen von *FIS1* und *CAF4* einen deutlich größeren Einfluss auf die Verteilung und Größe der Dnm1p-GFP Aggregate aufzeigen als die Ausschaltung von *Mdv1p*.

Stamm	Dnm1p-GFP Cluster pro Zelle	Ø Fluoreszenz-Intensität der Cluster (normiert)	mt assoz. Dnm1p-GFP Cluster pro Zelle	Ø Fluoreszenz-Intensität der mt assoz. Cluster (normiert)	Zytosol. Dnm1p-GFP Cluster pro Zelle	Ø Fluoreszenz-Intensität der zytosolischen Cluster (normiert)
wt	24.9 ± 0.9	3.4	23.4 ± 0.8	3.5	2.5 ± 0.2	1.3
$\Delta mdv1$	36.5 ± 1.8	4.5	32.3 ± 1.7	4.9	4.8 ± 0.4	1.3
$\Delta fis1$	27.1 ± 1.1	3.1	13.5 ± 0.6	4.1	13.6 ± 0.7	2.2
$\Delta caf4$	44.7 ± 2.4	2.1	28.7 ± 1.2	2.4	17.0 ± 1.7	1.6

Tab. 11: Verteilung, Anzahl und durchschnittliche Fluoreszenz-Intensitäten der Dnm1p-GFP Cluster. Die durchschnittliche Helligkeit der Mitochondrien-assoziierten und zytosolischen Dnm1p-GFP Cluster wurde in mehr als 80 Zellen pro Stamm (wt, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$) analysiert. Die Fehlerwerte stellen die Standardabweichungen der Mittelwerte dar. Die Fluoreszenz-Intensitäten wurden auf die Helligkeit eines GFP-VLP normiert, der 120 GFP-Moleküle enthält.

Die Auswertung zeigt sowohl die Helligkeit und Verteilung der Cluster, als auch die durchschnittliche Anzahl der Dnm1-Proteine innerhalb der Aggregate an. Jedoch sagen diese Werte alleine zunächst nichts über die tatsächlichen Größen der Dnm1p-Cluster aus. Da die erwarteten Größen der Aggregate in der Nähe oder unterhalb der Auflösungsgrenze eines konfokalen Laserraster-Mikroskops liegen, wurden im nächsten Versuch die Größen der Dnm1p-Cluster mit Hilfe der STED-Mikroskopie bestimmt.

5.3.6 Die Bestimmung der Größen der Dnm1p-GFP Cluster mit Hilfe der STED-Mikroskopie

Nachdem die Helligkeiten der Cluster ermittelt wurden, sollte ihre Größe lichtmikroskopisch vermessen werden. Da die Ausmaße eines Dnm1p-GFP Clusters im Bereich der Auflösungsgrenze eines Konfokalmikroskops (ca. 200 nm x 200 nm x 500-800 nm) oder sogar darunter liegen, wurde die in dieser Abteilung von Prof. Hell entwickelte Methode der STED-Mikroskopie (*stimulated emission depletion*) in Zusammenarbeit mit Katrin Willig angewandt. Stimulierte Emission bedeutet, dass angeregte Fluorophore durch die Bestrahlung mit längerwelligem Licht ohne zu fluoreszieren wieder in ihren Grundzustand gebracht werden (Details siehe Mikroskope 4.3). Die Technik wird genutzt, um den Anregungsfokus deutlich zu verkleinern, indem das längerwellige STED-Licht räumlich betrachtet ringförmig um den Anregungsfokus angeordnet wird. So werden die zuvor angeregten Fluorophore im Zentrum des Rings nicht abgeregt. Die Methode erlaubt die Durchbrechung der von Abbe postulierten Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen (Hell, 1997). Dabei hängt die tatsächlich erreichte Auflösung unter anderem von den verwendeten Farbstoffen, der Lichtintensität und der Form des STED-Strahls ab.

Um die Auflösung des STED-Mikroskops für GFP als verwendeten Farbstoff zu ermitteln, wurden die unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegenden GFP-VLP (40 nm) verwendet. Die ermittelte Grenze für GFP unter den verwendeten Aufnahmebedingungen betrug 70 nm in zwei Dimensionen (x,y). Der Aufbau des Mikroskops, die Bestimmung der Auflösung und die Probenvorbereitung sind im Teil über STED-Mikroskopie detaillierter beschrieben (4.3). In Abbildung 32 ist ein konfokal aufgenommenes Bild des wt-Stammes mit einer STED-Aufnahme der gleichen Zelle dargestellt. Die Größe eines Dnm1p-GFP Clusters wurde in beiden Bildern anhand der Halbwertsbreite eines Helligkeitsprofils der Cluster ausgemessen. Dabei wurde während einer bidirektionalen Abrasterung des Bildes zwischen einer konfokalen Messung und einer STED-Messung abgewechselt, um das Bleichen der Probe zwischen zwei separaten Aufnahmen als Fehlerquelle zu vermeiden. Die Messungen zeigten, dass die Größe der Dnm1p-GFP Cluster unterhalb der Auflösungsgrenze eines Konfokal-Mikroskops liegt und sich der STED-Aufbau für die Ausmessung der Cluster-Größen eignet.

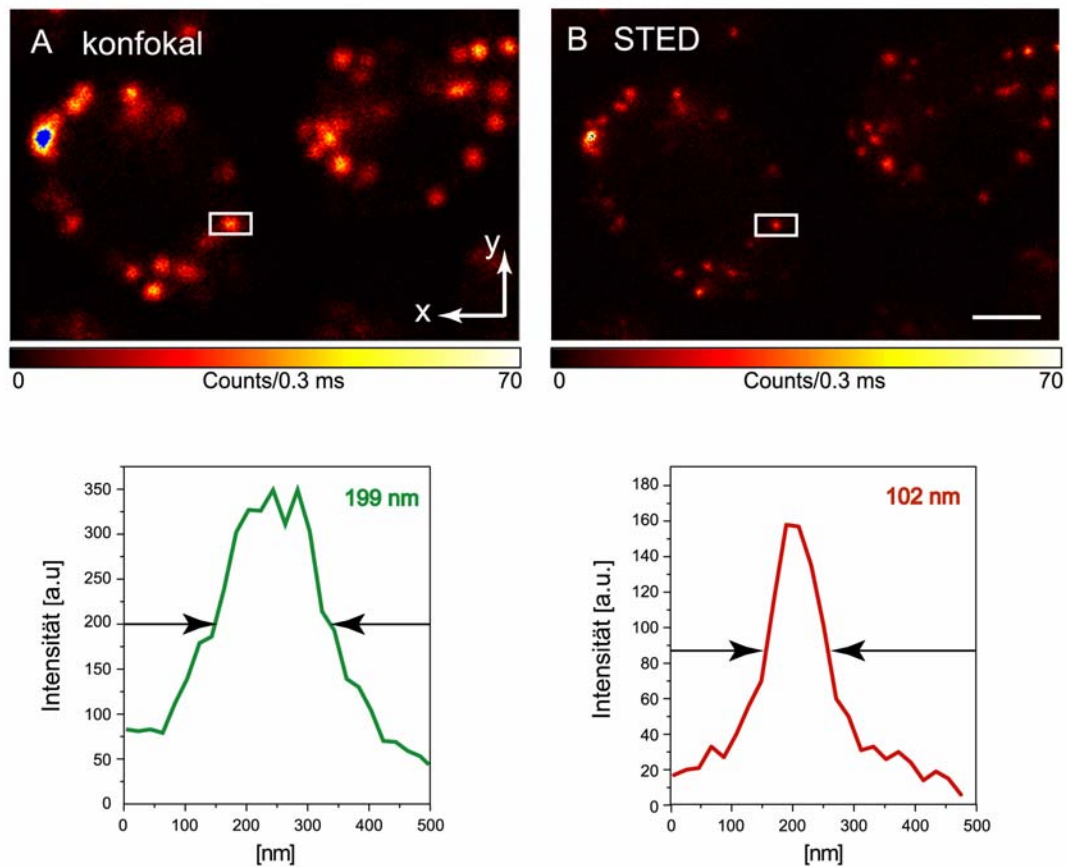


Abb. 32: Die Größe der Dnm1p-GFP Cluster liegt unterhalb der Auflösungsgrenze eines Konfokal-Mikroskops. (A) Eine Konfokal-Aufnahme (Einzelbild) von Dnm1p-GFP Clustern in wt-Zellen bei einer Anregung von 488 nm und einer Detektion bei 500-550 nm zeigte am Beispiel eines Clusters eine Halbwertsbreite von 199 nm, was der Auflösungsgrenze eines Konfokal-Mikroskops entspricht. Die unterhalb des Bildes angegebenen Profile sind eine Aufsummierung der Intensitäten der durch das weiße Rechteck markierten Region. Die Konfokal-Aufnahme (Einzelbild) zeigt zwei Hefezellen. (B) Derselbe Cluster mit eingeschaltetem STED-Strahl aufgenommen zeigt eine Halbwertsbreite von nur 102 nm. Dabei wurden die Fluorophore ebenfalls bei 488 nm angeregt, die Wellenlänge des STED-Strahls betrug 575 nm. Größenstandard: 1 μm

Mit einer Auflösung von 70 nm wurden im Folgenden die Größenverteilungen von Dnm1p-GFP Clustern in wt-Zellen vermessen. Dazu wurden die Dnm1p-GFP exprimierenden wt-Zellen in 4.0 % Formaldehyd fixiert und in Mowiol eingebettet. Sowohl die konfokalen wie auch die STED-Bilder zeigten wenige helle und mehrere dunkle Cluster. In die Auswertung gingen nur die hellen Cluster ein, da bei ihnen davon ausgegangen werden konnte, dass sie während der Messung in der Fokalebene waren. Aufgrund dieser Auswahlkriterien wurden von jeder Zellen durchschnittlich nur 0-3 Cluster vermessen. Für ein besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis wurden die Aufnahmen viermal aufsummiert und die Halbwertsbreite der Helligkeitsprofile der Cluster vermessen. Der Fehler dieser Messungen beträgt etwa 2 nm. In Abbildung 33 ist die Größenverteilung der vermessenen 94 Dnm1p-GFP Cluster dargestellt.

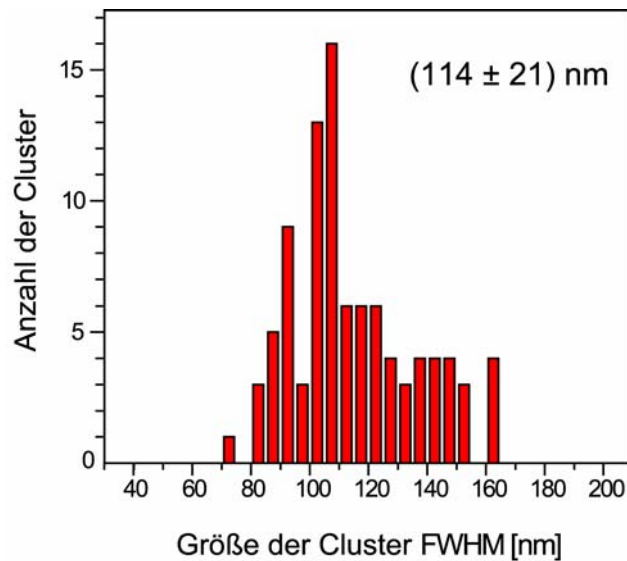


Abb. 33: Die vermessenen Dnm1p-GFP Cluster besitzen eine durchschnittliche Größe von 114 nm. Dargestellt ist die Größenverteilung von 94 Dnm1p-GFP Cluster aus wt-Zellen vermessen mit dem STED-Mikroskop. Die Fluorophore wurden mit 488 nm angeregt, die Wellenlänge des STED-Strahls betrug 575 nm. Die Cluster-Größen beziehen sich auf die Halbwertsbreite (FWHM) der Helligkeitsprofile. Die Standardabweichung beträgt 21 nm.

Die durchschnittliche Größe der vermessenen Dnm1p-GFP Cluster beträgt 114 nm und liegt somit unterhalb der Auflösungsgrenze eines Konfokal-Mikroskops. Die Standardabweichung von 21 nm spiegelt die breite Verteilung der Cluster-Größen wieder. Da die Cluster mehr als zweimal heller sind als die vermessenen GFP-VLP, die VLP-Verteilung aber eine weniger starke Streuung aufweist, ist die breite Größenverteilung der Cluster nicht auf Photonenstatistik zurückzuführen. Für die Messung wurden nur helle Dnm1-GFP Cluster verwendet, daher spiegelt die Größenverteilung eher das obere Maß der Clustergrößen wieder.

Die bisherigen Messungen bezogen sich auf die Größe, Helligkeit und Verteilung einzelner Dnm1p-Cluster. Um einen Einblick über den gesamten zytosolischen und Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-Pool zu erhalten, müssen dagegen die Gesamthelligkeiten beider Bereiche bestimmt werden, um auch einzelne, nicht-aggregierte Dnm1-Proteine in die Messung mit einzubeziehen. Dabei wurde in den folgenden Versuchen sowohl eine biochemische Subfraktionierung als auch eine lichtmikroskopische Bestimmung beider Pools durchgeführt und miteinander verglichen.

5.4 Die Größe des zytosolischen Dnm1p-Pools ist abhängig von den Teilungsproteinen Mdv1p, Fis1p und Caf4p

In den vorangegangenen mikroskopischen Studien wurde der überwiegende Teil der Dnm1-Proteine den Mitochondrien-assoziierten Clustern zugewiesen (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Biochemische Subfraktionierungen zeigten jedoch, dass fast der gesamte Dnm1p-Pool in Western-Analysen dem Zytosol zugeordnet wird (Cervený und Jensen, 2003; Ostuga *et al.*, 1998). Diese zueinander im Widerspruch stehenden Ergebnisse können erklärt werden durch (1) eine schwache Interaktion des Dnm1p mit der mitochondrialen Oberfläche, die während der Subfraktionierung zerstört wird, oder (2) durch einen relativ großen Dnm1p-GFP Pool, der gleichmäßig verteilt im Zytosol vorliegt und bei konventionellen Mikroskopie-Aufnahmen leicht übersehen werden kann.

Um die tatsächliche Größe des zytosolischen Dnm1p-Pools zu bestimmen, wurde zunächst eine Subfraktionierung der Dnm1p-GFP exprimierenden Hefestämme (wt, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ -Zellen) vorgenommen, um die veröffentlichten Daten zu bestätigen. Hierzu wurden die Mitochondrien von den übrigen zellulären Proteinen getrennt (, siehe Methoden 3.2.1). Aufgrund großer Volumenunterschiede zwischen der zytosolischen und der Mitochondrienfraktion wurde nur 1/20 des Volumens der zytosolischen Fraktion im Vergleich auf ein SDS-Gel zur näheren Charakterisierung aufgetragen (siehe Methoden 3.2.4). Die Menge an Dnm1p-GFP wurde durch Immunfluoreszenz mittels eines anti-GFP-Antikörpers bestimmt. Als Auftrags- und Subfraktionierungskontrolle dienten Antikörper der zytosolisch in konstanter Menge vorliegenden Hexokinase und der mitochondrial in der inneren Membran vorliegenden ATPase. Die Western-Analyse ist in Abbildung 34 dargestellt.

Durch die Western-Analyse konnte gezeigt werden, dass nach der biochemischen Mitochondrienaufräumung der überwiegende Teil von Dnm1p-GFP im wt in der zytosolischen Fraktion zu finden ist. Dabei muss beachtet werden, dass die Intensität der Banden im zytosolischen Bereich um das 20-fache verstärkt werden muss, um einen Intensitätsvergleich zur Dnm1p-Menge der Mitochondrienfraktion zu bekommen. In $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ -Zellen ist die Menge an Mitochondrien-gebundenem Dnm1p-GFP geringer, was auf eine Rolle von Fis1p und Mdv1p in der Rekrutierung bzw. Anlagerung von Dnm1p hinweist. Die Kontrolle der Subfraktionierung durch einen anti-ATPase-Antikörpers zeigt, dass sich keine Mitochondrienfragmente in der zytosolischen Fraktion befinden und auch die Beladung der Taschen der einzelnen Stämme gleichmäßig erfolgte. Die zweite Kontrolle mit Hilfe des anti-Hexokinase-Antikörpers zeigt, dass in der Mitochondrienfraktion ein kleiner Anteil an zytosolischer „Verunreinigung“ zu finden ist. In Bezug auf das Dnm1p-GFP Signal der Mitochondrienfraktion bedeutet dies, dass der tatsächliche Anteil an Dnm1p auf den Mitochondrien im vorliegenden Blot eher überschätzt wird.

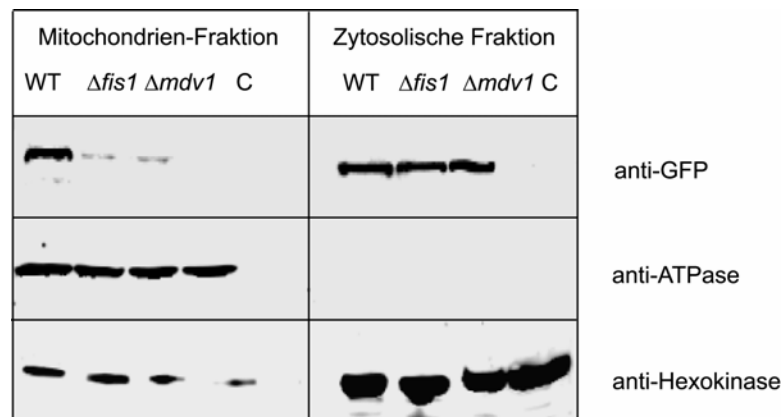


Abb. 34: Mehr als 80% des Dnm1p-GFP sind nach der biochemischen Aufreinigung der Mitochondrien in der zytosolischen Fraktion erhalten. Analysiert wurden wt, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ -Zellen. Die Kontrolle („C“) bestand aus einem nicht mit GFP markiertem wt-Stamm. Es wurden je 10 μg Mitochondrienproteine aufgetragen und 1/20 des Volumens der zytosolischen Fraktion. Die zytosolischen Banden müssen daher für einen Intensitätsvergleich als 20x heller angesehen werden. Dnm1p-GFP wurde mit einem anti-GFP-Antikörper (1:200; Abcam, Großbritannien) detektiert, als Ladungs- und Reinheitskontrolle der Mitochondrien-Aufreinigung wurde ein anti-ATPase-Antikörper (1:400; Molecular Probes, Niederlande) als Mitochondrienmarker und ein anti-Hexokinase-Antikörper (1:500; BioGenes, Deutschland) als Zytosolmarker verwendet.

Zusammengefasst bestätigt der Blot die publizierten Daten, dass bei der biochemischen Subfraktionierung der größte Teil (>80%) des Dnm1p-GFP im Zytosol zu finden ist.

Um die tatsächliche Größe des Dnm1p-GFP Pools ohne Beeinträchtigung durch die schwachen Dnm1p-Mitochondrien-Bindung ermitteln zu können, wurde die Verteilung von Dnm1p-GFP mikroskopisch mit Einzelphoton-sensitiven APDs quantifiziert. Dazu wurden zunächst die 3D-Datenstapel für den individuellen Hintergrund und das Übersprechen der Kanäle korrigiert. Anhand des mtDsRed-Signals wurden die Mitochondrien von der restlichen Zelle unterschieden und eine digitale 3D-Maske um den Mitochondrienstrang und die mit ihm assoziierten Dnm1p-GFP Cluster generiert (Details siehe Methoden 3.4.4). Durch das Verhältnis der aufaddierten Signale außerhalb und innerhalb der Maske in Bezug zum Gesamtsignal der Zelle wurde das relative Mitochondrien-assoziierte Dnm1p-GFP Signal ermittelt. Untersucht wurden je 80 Zellen mit Dnm1p-GFP und mtDsRed in wt, $\Delta mdv1$, $\Delta caf4$ und $\Delta fis1$ -Zellen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 35 dargestellt.

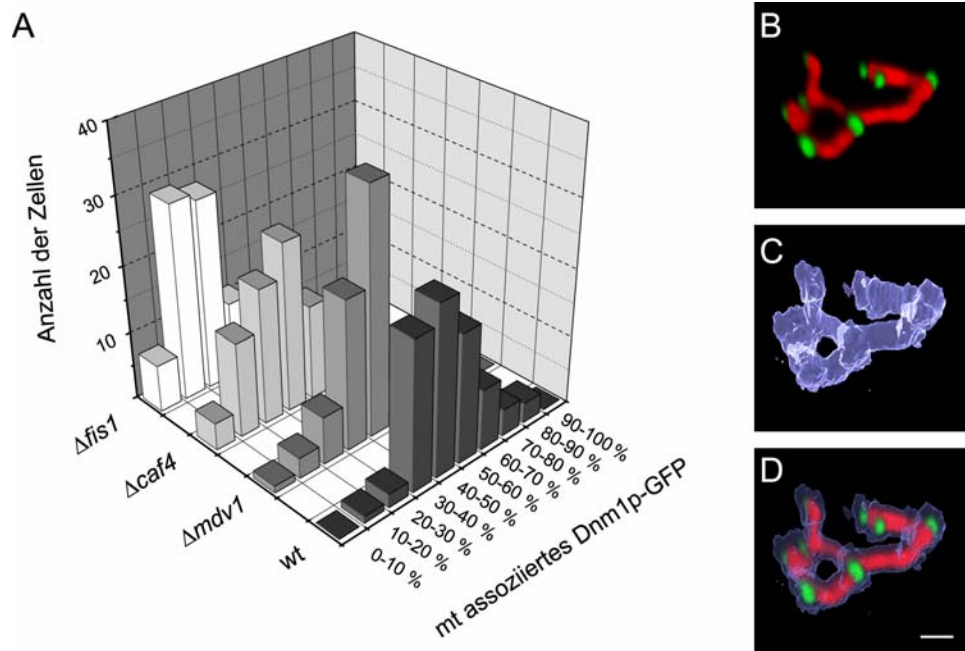


Abb. 35: Die Deletion von *FIS1*, *CAF4* und *MDVI* ändert die relative Größe des Mitochondrien-assoziierten und zytosolischen Dnm1p-GFP Pools. Das Histogramm (A) zeigt den relativen Anteil der Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-GFP-Menge aller Stämme. Es wurden jeweils 80 Zellen pro Stamm analysiert. Die fixierten Dnm1p-GFP und mtDsRed exprimierenden Zellen wurden mit sensitiver quantitativer Konfokalmikroskopie aufgenommen (B). Die 3D-Daten wurden bezüglich des Hintergrund-Rauschens und des Überschneidens der Kanäle korrigiert. Danach wurden 3D-Masken (C) erstellt, die die Mitochondrien und die mt-assoziierten Cluster umschließen (D). Das Fluoreszenzsignal innerhalb der Maske wurde ins Verhältnis zum Gesamtsignal der Zelle gesetzt, um den relativen Anteil des mt-assoziierten Dnm1p-GFP Signals zu bestimmen. Größenstandard: 1 μ m

Die mikroskopische Untersuchung der Dnm1p-GFP Pool-Größen zeigt, dass der mit den Mitochondrien assoziierte Dnm1p-GFP Pool in wt-Zellen durchschnittlich 52 % des Gesamtpools beträgt. Damit ist die Größe des zytosolischen Dnm1p-Pools deutlich größer als bisher mikroskopisch vermutet und kleiner als biochemisch ermittelt. Durch die Analyse konnte die Vermutung bekräftigt werden, dass die Bindung der Dnm1-Proteine an die Mitochondrien-Oberfläche zu schwach ist, um während der biochemischen Aufreinigung aufrechterhalten zu werden. Außerdem stellen die mt-assoziierten Dnm1p-Cluster nicht das einzige Reservoir für die Teilungsproteine dar, da die Hälfte von Dnm1p zytosolisch vorliegt.

Die Deletion der Teilungsproteine Mdv1p, Caf4p und Fis1p weist einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Rekrutierung von Dnm1p zu den Mitochondrien auf. So sinkt die Menge an mt-assoziiertem Dnm1p-GFP leicht in $\Delta mdv1$ -Zellen (40 %

mt-assoziiert), beträgt in $\Delta caf4$ -Zellen bereits nur noch 29 % und ist mit durchschnittlich 23 % in $\Delta fis1$ -Zellen am kleinsten. Die Daten sind konsistent mit der Fis1p in der Rekrutierung von Dnm1p zur Mitochondrienmembran zugeschriebenen Rolle. Im Gegensatz zu einer vorangegangenen Studie (Griffin *et al.*, 2005) weist Caf4p den beschriebenen Messungen zufolge einen größeren Einfluss auf die Rekrutierung von Dnm1p aus als Mdv1p. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Erkenntnissen aus der Clusterverteilung in $\Delta caf4$ -Zellen, die im Gegensatz zum $\Delta mdv1$ -Stamm viele zytosolische Dnm1p-Cluster aufweisen.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Daten einen wichtigen Einfluss von Fis1p und Caf4p auf die Rekrutierung von Dnm1p zu den Mitochondrien, während Mdv1p hierbei eine weniger wichtige Rolle zu spielen scheint. Dafür weist die biochemische Analyse auf eine Rolle von Mdv1p in der Stabilisierung des Dnm1p-Komplexes auf der Mitochondrien-Oberfläche hin.

Nachdem bisher die Helligkeit und Verteilung der Dnm1p-Cluster einerseits und die Größe des zytosolischen und mt-assoziierten Dnm1p-Pools andererseits untersucht wurde, sollte in den folgenden Experimenten eine Untergruppe der Mitochondrien-assoziierten Dnm1p-Cluster näher untersucht werden, die an aktuellen Teilungsprozessen beteiligten Dnm1p-Spiralen.

5.5 Untersuchungen von Dnm1p-Spiralen

Dnm1p gehört zur Familie der Dynamamin-verwandten GTPasen, die an der Modellierung von vielen Zellmembranen beteiligt sind (Hinshaw, 2000; van der Blik, 1999). Die Vorstellung der Wirkungsweise von Dnm1p wird dabei stark von Dynamamin geprägt. Es wird vermutet, dass Dnm1p ähnlich dem als Mechanoenzym an der Abschnürung von Vesikeln beteiligten Dynamamin eine Spirale um die Mitochondrien bildet. In Abhängigkeit der GTP-Hydrolyse könnte die Spirale ihre Konformation ändern und den mitochondrialen Strang durchschnüren. Im Gegensatz zu den Clathrin-umhüllten Vesikeln mit einem Durchmesser von ~10-20 nm weisen Mitochondrien einen Durchmesser von 300-450 nm auf. Deshalb wird vermutet, dass sich Dnm1p-Spiralen um zuvor eingeschnürte Mitochondrien, sogenannte Konstriktionen, anlagern. Diese Annahme wird durch Elektronenmikroskopie-Aufnahmen gestützt, die an Konstriktionsstellen eine Anhäufung von Dnm1p zeigen (Bleazard *et al.*, 1999).

5.5.1 Dnm1p-GFP Spiralen werden über Matrix-Konstriktionen definiert

Durch die limitierte Auflösung von konventionellen Lichtmikroskopen (etwa 200 nm lateral und 500-800 nm axial, abhängig von der Wellenlänge) ist es unmöglich, Dnm1p-GFP Spiralen optisch aufzulösen. Unter der Voraussetzung, dass Matrix-Konstriktionen eine Vorbedingung für die Anlagerung der Spiralen darstellen, wurden zwei Kriterien definiert, um dennoch Spiralen von Clustern unterscheiden zu können.

- (1) Matrix-Konstriktionen können durch ein reduziertes Fluoreszenzsignal des in der Matrix lokalisierten DsRed detektiert und zur Identifizierung von Spiralen herangezogen werden, da sich Spiralen nur an diesen Einschnürungsbereichen ausbilden können.
- (2) Wenn eine Spirale eine Mitochondrien-Konstriktion gleichmäßig umspannt, dann überlagern sich die Schwerpunkte der Fluoreszenzsignale von mtDsRed und Dnm1p-GFP.

Wenn Dnm1p-GFP Cluster beide Kriterien erfüllten und visuell bestätigt werden konnten, wurden sie im Folgenden als Dnm1p-GFP Spiralen bezeichnet. In Abbildung 36 ist ein Beispiel für eine Dnm1p-GFP Spirale dargestellt.

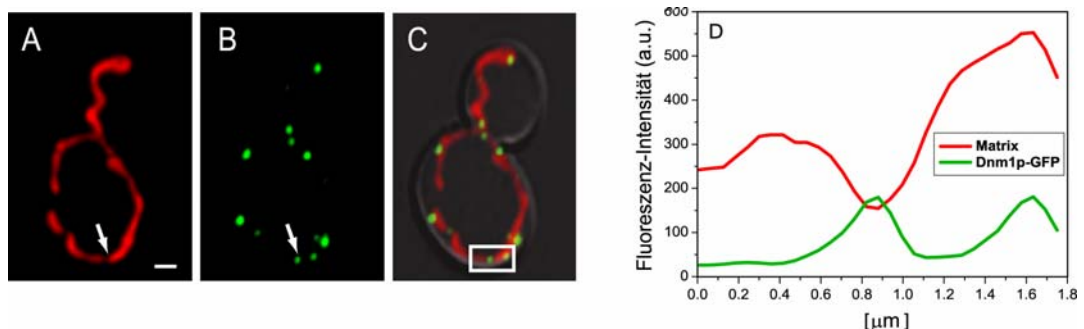


Abb. 36: Dnm1p-GFP Spiralen kolokalisieren mit Matrix-Konstriktionen. (A-C) Konfokale Aufnahme (aufaddierte 3D-Daten) einer mtDsRed (A) und Dnm1p-GFP (B) markierten Wildtyp-Zelle. Eine Überlagerung beider Aufnahmen zusammen mit einem Hellfeld-Bild ist in (C) dargestellt. Die Pfeile deuten auf eine Matrix-Konstriktion kolokalisiert mit einem Dnm1p-GFP Cluster. Größenstandard: 1 μm . (D) Das Diagramm zeigt die Fluoreszenz-Intensitätsprofile (aufaddiert in y-Richtung) im roten und grünen Kanal an der Stelle einer Matrix-Konstriktion (weißer Kasten in C).

Anhand dieser Kriterien identifizierte ein Programm in 117 wt-Hefezellen 56 Dnm1p-GFP Spiralen, die visuell überprüft wurden (Programmbeschreibung siehe Methoden 3.4.5). Um die Anzahl von Dnm1p-GFP Molekülen pro Spirale abschätzen zu können, wurden die Fluoreszenz-Intensitäten der Spiralen mit denen des GFP-VLP verglichen. Abbildung 37 zeigt, dass die Helligkeiten der Spiralen stark variieren (breite Streuung des Histogramms). Die Fluoreszenz-Intensität der Spiralen lag in der Mehrheit bei der ein- bis vierfachen Intensität der VLP. Mit 120 GFP-Molekülen pro GFP-VLP ergibt dies etwa 100-500 Dnm1p-Moleküle pro Spirale.

Basierend auf der ermittelten Anzahl von Dnm1-Proteinen sollte im Folgenden eine Abschätzung über die Anzahl der Windungen der Spiralen vorgenommen werden. Dabei diente die Spiral-Struktur des nahe verwandten Dynamins als Vorlage für die Kalkulation.

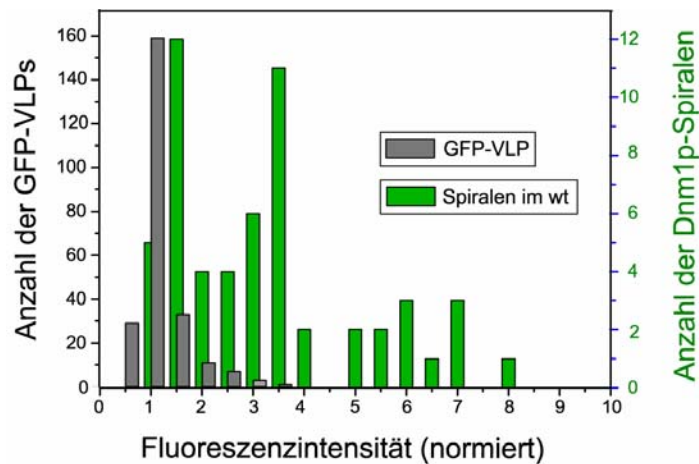


Abb. 37: Die meisten Dnm1p-Spiralen weisen eine Helligkeit von ein bis vier GFP-VLP auf. Das Histogramm zeigt die Fluoreszenz-Intensitäten aller gefundenen Dnm1p-Spiralen (grün) normiert auf die Helligkeit eines GFP-VLP. Die Verteilung der GFP-VLP (normiert auf einen VLPpartikel) ist grau dargestellt. Ein VLP enthält 120 GFP-Moleküle. Die Mehrheit der Spiralen sind ein bis viermal so hell wie GFP-VLP, was etwa 100-500 Dnm1p-GFP Molekülen entspricht.

5.5.2 Spiralen weisen meist eine bis sieben Windungen auf

Im Gegensatz zu Dynamamin (Zhang und Hinshaw, 2001; Chen *et al.*, 2004) ist der genaue Aufbau einer Dnm1p-Spirale bisher nicht untersucht worden. Aufgrund der starken Homologie zwischen Dynamamin und Dnm1p wurde jedoch eine vergleichbare Spiralstruktur angenommen und auf dieser Basis eine Abschätzung der Windungen einer Dnm1p-Spirale vorgenommen. Folgende Informationen wurden aus der Struktur der Dynamamin-Spirale verwendet:

- (1) 30 Dynamine bilden eine Spiralwendel von 50 nm Durchmesser.
- (2) Der Abstand zwischen zwei Dynamin-Molekülen beträgt ~10nm. Rechnerisch würde man daher auf nur ~15 Dynamin-Proteine pro Wendel kommen, aber Dynamin liegt als Homodimer vor, sodass jede Umwindung aus einer Doppelspirale besteht.
- (3) Der Abstand der umschlossenen Membran zur Außenseite der Spirale beträgt ebenfalls ~10 nm.

Aufgrund von Helligkeitsunterschieden des mtDsRed-Signals an Konstriktionen im Vergleich zu benachbarten Regionen und anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Ingermann *et al.*, 2005) wurde ein Durchmesser von ~100 nm für eine Mitochondrien-Konstriktion angenommen. Berücksichtigt man jeweils einen 10 nm Abstand der Dnm1p-Spirale auf beiden Seiten der Konstriktion, erhält man als Gesamtdurchmesser der Spirale 120 nm und ~70 beteiligte Proteine. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Dnm1p-Spiralen meist aus 100-500 Proteinen bestehen, was nach der vorliegenden Kalkulation ein bis sieben Windungen entspricht.

Die kalkulierten Daten beziehen sich auf Dnm1p-Spiralen im wt. Auch in $\Delta fis1$, $\Delta caf4$ und $\Delta mdv1$ -Zellen wurden Dnm1p-Spiralen ermittelt. Wegen der statistisch nicht signifikanten Anzahl der Spiralen in $\Delta mdv1$ (0.1 Spiralen/Zelle) und $\Delta fis1$ -Zellen (0.05 Spiralen/Zelle) wurden diese nicht weiter charakterisiert. In $\Delta caf4$ -Zellen traten dagegen besonders zahlreich Dnm1p-GFP Spiralen auf, die im folgenden Teil näher beschrieben werden.

5.5.3 In $\Delta caf4$ -Zellen treten häufiger Dnm1p-GFP Spiralen auf als im wt

Im wt sind statistisch nur in jeder zweiten Zelle Dnm1p-Spiralen zum Zeitpunkt der Fixierung zu finden (0.4 Spiralen/Zelle). Noch seltener ist dieses Ereignis in $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ -Zellen. Da zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen besonders strikte Auswahl-Kriterien zur Auffindung der Dnm1p-Spiralen verwendet wurden, spiegeln die Werte eine untere Grenze der Spiral-Anzahl wider. In $\Delta caf4$ -Zellen wurden dagegen statistisch 2 Spiralen pro Zelle gefunden. In Abbildung 38 sind die Helligkeiten der Dnm1p-Spiralen aus dem wt und aus $\Delta caf4$ -Zellen aufgetragen.

Das Histogramm zeigt, dass die Spiralen in beiden Zellen eine vergleichbare Helligkeitsverteilung aufweisen. Aufgrund der größeren Anzahl von Spiralen in $\Delta caf4$ -Zellen war hier ein Hauptmaximum bei ~240 Dnm1p-Molekülen pro Spirale zu erkennen. Dies entspricht nach der obigen Kalkulation 3-4 Windungen der Spirale bei einem angenommenen Durchmesser von 120 nm.

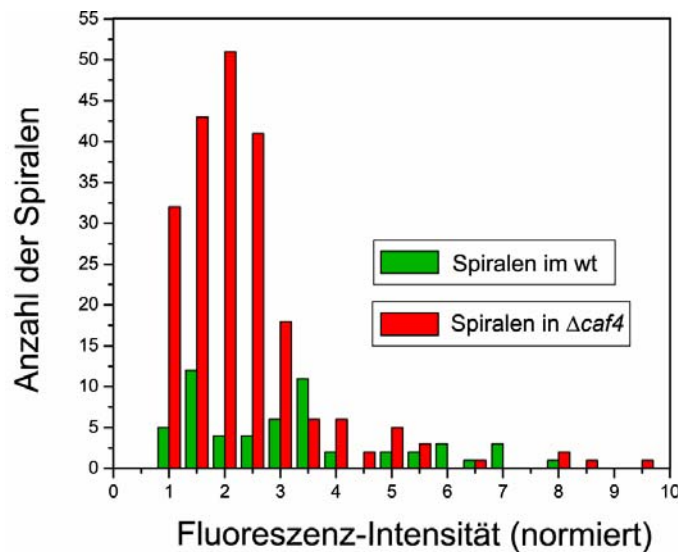


Abb. 38: Die Helligkeiten der Spiralen ähneln sich im wt und in $\Delta caf4$ -Zellen. Das Histogramm zeigt die Fluoreszenz-Intensitäten aller gefundenen Dnm1p-Spiralen im wt (grün) und in $\Delta caf4$ -Zellen (rot) normiert auf die Helligkeit eines GFP-VLP. Die meisten Spiralen zeigen eine Helligkeit von 1-4 GFP-VLP, was 100-500 Dnm1p-GFP Molekülen entspricht. Es wurden 104 $\Delta caf4$ -Zellen und 120 wt-Zellen für das Histogramm ausgewertet.

Im Gegensatz zu Caf4p scheinen die Teilungsproteine Fis1p und Mdv1p für die Ausbildung von Dnm1p-Spiralen benötigt zu werden, da Stämme ohne diese Proteine besonders wenige Spiralen aufweisen. Warum die Deletion von *CAF4* dagegen zur Ausbildung von etwa viermal mehr Spiralen gegenüber dem wt führt, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Die Untersuchungen der Spiralen zeigte, dass die grosse Mehrheit (> 90 %) der mt-assoziierten Dnm1p-Cluster nicht an aktuellen Teilungsprozessen beteiligt ist. Eine alleinige Rolle der Cluster als Dnm1p-Reservoir wird durch die Größe des zytosolischen Pools unwahrscheinlich. Ob die mitochondrialen Cluster eine zusätzliche Funktion innerhalb der Zelle übernehmen, sollte durch die Auswertung ihrer genauen Lage und Orientierung untersucht werden.

5.6 Die Dnm1p-Cluster sind polar orientiert

Da die Ausbildung von Dnm1p-Spiralen ein relativ seltener Prozess in der Zelle ist (nur jede zweite Zelle zeigte durchschnittlich in einer zeitlichen Momentaufnahme eine Spirale), stellt sich die Frage nach der Funktion der restlichen Dnm1p-Cluster. Zeitserien zeigten eine Fluktuation der Cluster, wobei nicht jede Dnm1p-Anlagerung ein Teilungsereignis auslöste. Daraus wurde geschlossen, dass diese Cluster entweder

ein Reservoir darstellen oder die Orte zukünftiger oder vergangener Teilungen markieren (Legesse-Miller *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte an fixierten Zellen häufig beobachtet werden, dass die Mitochondrien einen nach innen gezogenen Phänotyp zeigten. Dabei blieben einige Bereiche nach außen Richtung Zellcortex exponiert und wiesen in nahezu allen Aufnahmen Dnm1p-GFP Cluster auf. Ein Beispiel dieser Zellen ist in Abbildung 39 dargestellt.

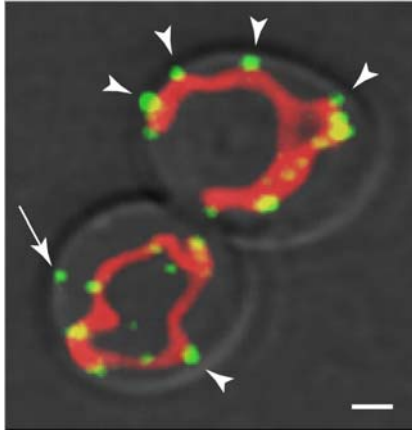


Abb. 39: Dnm1p-GFP Cluster scheinen die Mitochondrien an den Zellcortex zu befestigen. Eine wt-Zelle mit Dnm1p-GFP und mtDsRed wurde mit 3.7 % Formaldehyd fixiert. Dargestellt sind einzelne aufaddierte Konfokalaufnahmen der beiden Kanäle (rot und grün), die mit einer Hellfeld-Aufnahme überlagert sind. Durch die Formaldehyd-Fixierung werden häufig die Mitochondrien in den Innenraum der Zelle gezogen. Die Pfeilspitzen weisen auf Dnm1p-GFP Cluster, die an den Zellcortex geheftet scheinen. Der Pfeil zeigt auf einen Cluster, der am Zellcortex anhaftet und möglicherweise vom Mitochondrium abgerissen wurde. Größenstandard: 1 µm

Diese Aufnahmen deuten darauf hin, dass Mitochondrien durch Dnm1p-Cluster an den Zellcortex geheftet sind. Um eine mögliche Rolle der Dnm1p-Cluster in der Aufhängung der Mitochondrien zu untersuchen, wurde die polare Ausrichtung der Mitochondrien-assoziierten Cluster innerhalb der Zellen analysiert.

5.6.1 Die polare Orientierung der Dnm1p-Cluster wird in $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen aufgehoben, ist aber unabhängig von Mdv1p

Zur Analyse der genauen Lokalisierung der mt-assoziierten Dnm1p-GFP Cluster wurde mit Hilfe eines in der Abteilung erstellten Computerprogramms ihre relative Lage zu den Mitochondrien und dem Mittelpunkt der Zelle bestimmt (Details siehe Methoden 3.4.6). Dabei wurde zwischen Clustern unterschieden, die Richtung Zellcortex orientiert, ins Innere der Zelle gerichtet oder seitlich auf den Mitochondrien lokalisiert waren. Aus der Analyse wurden zytosolische Dnm1p-Punkte und Spiralen ausgenommen. Untersucht wurden jeweils mehr als 80 Zellen im wt und in $\Delta mdv1$, $\Delta caf4$ und $\Delta fis1$ -Stämmen. Die korrekte Funktion der Computerauswertung wurde durch Simulationen und die visuelle Überprüfung vieler Zellen bestätigt. In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Polaritätsuntersuchung zusammengefasst.

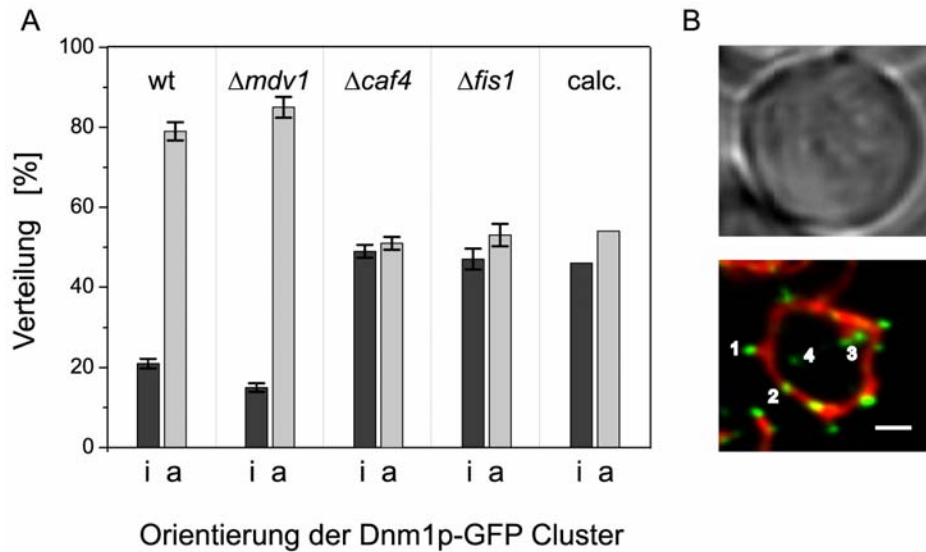


Abb. 40: Fis1p und Caf4p sind wichtig für die polare Lokalisierung der Dnm1p-GFP Cluster. (A) In wt, $\Delta mdv1$, $\Delta caf4$ und $\Delta fis1$ Zellen mit Dnm1p-GFP und mtDsRed wurde die Orientierung der Cluster in mehr als 80 Zellen pro Stamm analysiert. Es wurden nur Cluster ausgewertet, die entweder zum Zentrum der Zelle („i“, innen) oder Richtung Zellcortex zeigten („a“, außen). Wegen der Krümmung der Mitochondrien kalkulierte der verwendete Algorithmus eine leichte Verschiebung gleichmäßig verteilter Cluster Richtung Außenseite („calc.“). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte an. (B) Dargestellt ist eine Hellfeld-Aufnahme und eine Addierung einzelner konfokaler Schnitte einer Dnm1p-GFP und mtDsRed exprimierenden wt-Zelle. Das Programm unterscheidet zwischen Clustern, die („1“) Richtung Zellcortex orientiert sind, („2“) seitlich liegen, („3“) nach innen zeigen und („4“) im Zytosol lokalisiert sind. Zytosolische Cluster wurden von der Analyse ausgeschlossen, seitliche Cluster in diesem Diagramm nicht berücksichtigt. Größenstandard: 1 μ m.

Die Abbildung (40) zeigt die Verteilung der nach außen („a“; grau) und ins Innere der Zelle („i“; schwarz) gerichteten Dnm1p-GFP Cluster in den verschiedenen genetischen Hintergründen. Die seitlich orientierten Cluster wurden in dieser Auswertung nicht berücksichtigt. In wt-Zellen sind 79 % der Dnm1p-GFP Cluster Richtung Zellcortex orientiert, während nur 21 % zum Zellinneren gerichtet. Ähnlich polar sind die Cluster in $\Delta mdv1$ -Zellen angeordnet (85 % innen und 15 % außen). Ein anderes Bild zeigt sich in $\Delta caf4$ und $\Delta fis1$ -Zellen, bei denen die Polarität vollständig aufgehoben ist ($\Delta caf4$: 51 % innen und 49 % außen; $\Delta fis1$: 53 % innen und 47 % außen). Bei einer kompletten Gleichverteilung der Cluster kalkulierte der Algorithmus aufgrund der Krümmung der Mitochondrien ebenfalls eine leichte Verschiebung zwischen außen (54 %) und innen (46 %) (Kalkulation siehe Methoden 3.4.6.1).

Die Ergebnisse zeigen einerseits, dass im wt die Dnm1p-Cluster mit großer Mehrheit Richtung Zellcortex orientiert sind und andererseits, dass Fis1p und Caf4p, jedoch nicht Mdv1p Einfluss auf die polare Orientierung der Dnm1p-Cluster haben.

Um einen Einfluss der Fixierung der Zellen auf die Polarität der Cluster auszuschließen, wurden vergleichende Aufnahmen an nicht-fixierten Zellen durchgeführt. Dabei wurde bestätigt, dass die Fixierung keinen Einfluss auf die Polaritätsverteilung der Cluster hat (siehe Abb. 41).

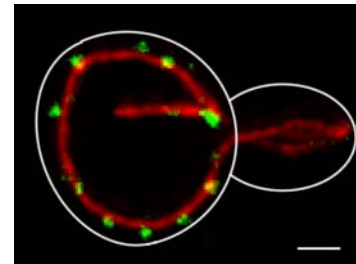


Abb. 41: Auch unfixierte wt-Zellen zeigen polar orientierte Dnm1p-GFP Cluster. Dargestellt ist eine Überlagerung von Maximum-Projektionen des DsRed- und GFP-Kanals. Balken: 1 μ m

Der unterschiedliche Einfluss der Teilungsproteine Fis1p, Caf4p und Mdv1p auf die lokale Ausrichtung der Dnm1p-Cluster wird nochmals verdeutlicht, wenn man die bisher aus der Analyse ausgeschlossenen, seitlich orientierten Cluster ebenfalls in die Auswertung miteinbezieht.

5.6.2 Auch die seitlich orientierten Cluster werden durch Fis1p und Caf4p beeinflusst

Berücksichtigt man neben den nach außen und innen orientierten auch die seitlich assoziierten Dnm1p-GFP Cluster, zeigt sich, daß sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta mdv1$ -Zellen die Zahl der seitlich orientierten Dnm1p-GFP Cluster gegenüber denen in $\Delta caf4$ und $\Delta fis1$ -Zellen vermindert sind. Die in Abbildung 42 dargestellten Daten sprechen dafür, dass auch die seitlich assoziierten Dnm1p-Cluster durch Caf4p und Fis1p beeinflusst werden.

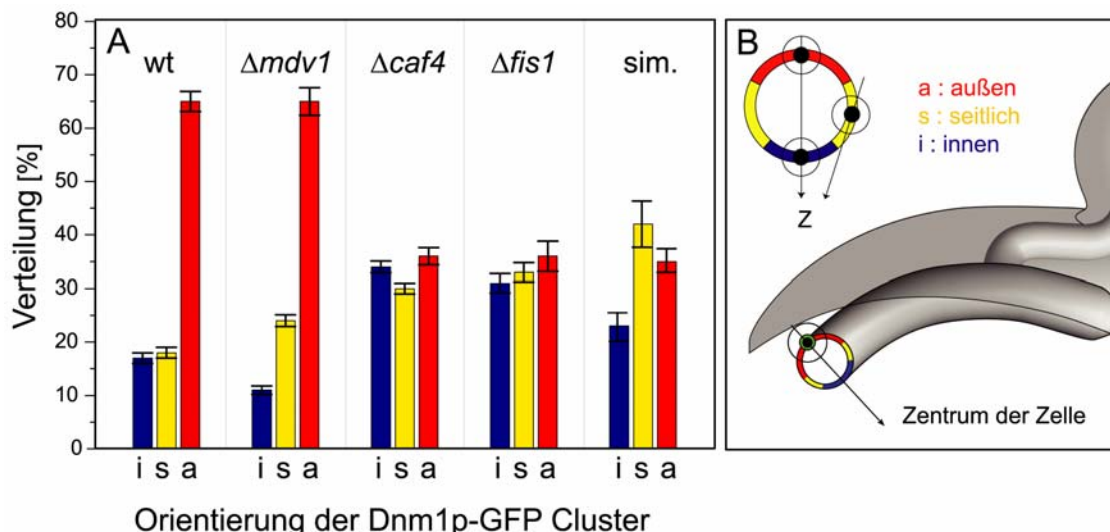


Abb. 42: Die seitliche Orientierung der Cluster ist ebenfalls von den Teilungsproteinen abhängig. (A) Das Diagramm bezieht neben den äußeren („a“) und inneren („i“) auch die seitlich orientierten Cluster („s“) mit ein. Die Referenz für gleichverteilte Cluster mit Hilfe einer Simulation („sim“) ermittelt (siehe Methoden 3.4.6.2, Abb. 9). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte an. (B) Die Skizze zeigt, welche Bereiche vom Computerprogramm zu den nach außen gerichteten (rot), seitlichen (gelb) und nach innen weisenden Clustern (blau) gezählt werden. Dabei ist die Orientierung der Punkte zum Zentrum der Zelle wichtig. (Details siehe Abb. 10)

Für eine verbesserte 3D-Darstellung wurden die Zellen mit Hilfe der 4Pi-Mikroskopie aufgenommen, um die Ergebnisse der Polaritätsuntersuchung ohne eine verwaschene Darstellung in z-Richtung zu verifizieren.

5.6.3 Die Polarität der Dnm1p-Cluster kann mit Hilfe der 4Pi-Mikroskopie bestätigt werden

In der 4Pi-Mikroskopie werden zwei einander gegenübergestellte Objektive verwendet, um durch die Interferenz der einander entgegenlaufenden sphärischen Wellenfronten den Fokus in z-Richtung zu verkleinern. Dadurch kann eine Auflösung in dieser Richtung unter 100 nm entlang der optischen Achse erreicht werden, was einer vier- bis siebenfach höheren axialen Auflösung im Vergleich zu einem herkömmlichen konfokalen Mikroskop entspricht (Details siehe Mikroskope 4.2). Der Vergleich zwischen einer konfokalen und einer 4Pi-Aufnahme von Hefemitochondrien ist im Mikroskop-Teil (siehe 4.2.5) dargestellt. Das Verfahren wurde genutzt, um die Lokalisierung der Dnm1p-GFP Cluster ohne ein verwaschenes Bild in Richtung z verwaschenes Bild zu erhalten und die Polarität der Dnm1p-Aggregate auf den Mitochondrien darzustellen. In der folgenden Abbildung 43 sind exemplarisch 4Pi-Aufnahmen von drei unterschiedlichen Zelltypen gezeigt.

Die Bilder bestätigen eine polare Lokalisierung der Dnm1p-Cluster im wt und in $\Delta mdv1$ -Zellen, während in $\Delta fis1$ -Zellen die Cluster auch häufig ins Innere der Zelle gerichtet waren. Weiterhin wurden in *MDV1*-Deletionsmutanten häufiger große, ausgebreitete Netzwerke beobachtet, wohingegen in *FIS1*-Deletionsstämmen die Netze oft zu einer Seite der Zelle kollabiert vorlagen.

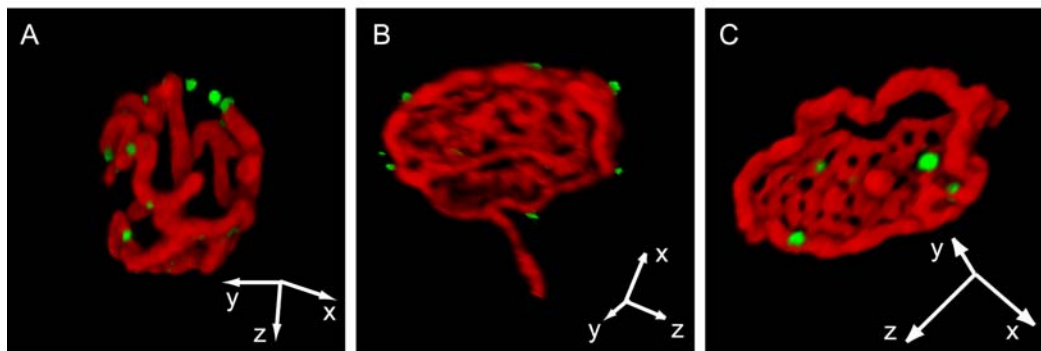


Abb. 43: Die 3D-Darstellung der 4Pi-Aufnahmen bestätigt die polare Orientierung der Dnm1p-GFP Cluster (grün) im wt und in $\Delta mdv1$ -Zellen. Gezeigt sind 4Pi TypC-Datensätze von in Galaktose-Medium gewachsenen wt (A), $\Delta mdv1$ (B) und $\Delta fis1$ -Zellen (C) mit mtDsRed. Die Bilder wurden mit Ein-Photonen-Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm und Detektion bei 655 nm (DsRed) und 515 nm (GFP) aufgenommen und anschließend linear entfaltet. Die Orientierung der in einem 3D-Visualisierungsprogramm (Amira) dargestellten Daten ist durch die Koordinatensysteme angegeben, deren Pfeillängen je 1 μm entsprechen.

Nachdem die Polarität der Dnm1p-Cluster im wt und in $\Delta mdv1$ -Zellen bestätigt wurde, sollte die Ursache ihrer Orientierung näher untersucht werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine Interaktion der Cluster mit dem Aktin-Gerüst der Zelle, da in Hefe die F-Aktin-Kabel unterhalb des Zellkortex verlaufen. Der Einfluss von Aktin auf die Polarität der Cluster sollte im folgenden Experiment geklärt werden.

5.7 Das Aktingerüst ist nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Polarität der Dnm1p-Cluster

Die polare Orientierung der Dnm1p-GFP Cluster kann auf unterschiedlichen Ursachen beruhen. So könnte Dnm1p einerseits an der Aufhängung der Mitochondrien an kortikale Strukturen beteiligt sein, andererseits könnten die mt-assoziierten Cluster entlang des Zytoskeletts der Zelle zu Orten aktueller Teilungsvorgänge transportiert werden. Wie in Abbildung 44 dargestellt ist, kolokalisiert in *S. cerevisiae* ein großer Teil der Mitochondrien mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle. Somit könnte F-Aktin ein potentieller Interaktionspartner von Dnm1p sein.

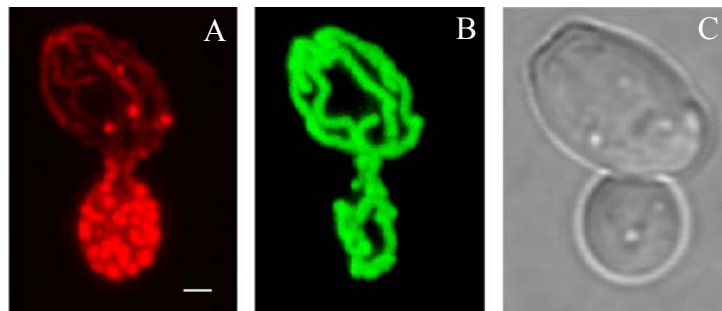


Abb. 44: In Hefe kolokalisieren die Mitochondrien mit dem Aktinzytoskelett. (A) Aktin wurde mit Alexa 546-Phalloidin markiert. Die Aktinkabel kolokalisieren über große Bereiche hinweg mit den mitochondrialen Strängen. Die Aktin-„Patches“ (helle Punkte) sind besonders häufig in der wachsenden Tochterzelle zu finden. (B) Die Mitochondrien sind mit mtGFP markiert. (C) Hellfeld-Aufnahme der wt-Hefe. Größenstandard: 1 μm

Um zu klären, ob das Aktingerüst der Zelle die Polarität der Dnm1p-Cluster beeinflusst, wurden die Zellen mit dem Aktin-depolymerisierenden Gift Latrunculin A (LatA, 250 μM , Molecular Probes, Niederlande) behandelt. Nach 10 min waren keine Aktinkabel mehr zu erkennen, wie in einer Gegenfärbung der Zellen mit Alexa-Phalloidin 546 (2.5 μM , Molecular Probes, Niederlande) nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 45).

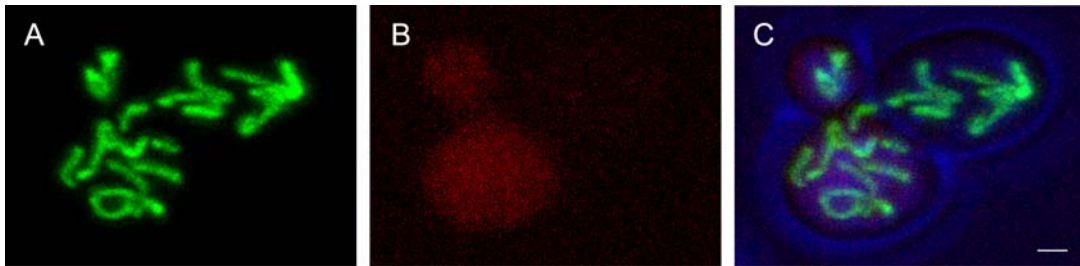


Abb. 45: Latrunculin A zerstört in weniger als 10 min das Aktingerüst der Hefezellen. Die mit mtGFP markierten Mitochondrien einer wt-Zelle (A) wurden mit 250 μM LatA für 10 min inkubiert und anschließend in 3.7 % Formaldehyd für 10 min fixiert. Die Zellen wurden mit Alexa-Phalloidin 543 (2.5 μM) gegengefärbt (B). Dargestellt sind addierte einzelne Konfokal-Aufnahmen der beiden Kanäle (rot und grün), die mit einer Hellfeld-Aufnahme (blau dargestellt) überlagert sind (C). Größenstandard: 1 μm

Nach 40-minütiger LatA-Behandlung wurden Dnm1p-GFP und mtDsRed exprimierende wt-Zellen fixiert und die Polarität ihrer Cluster untersucht. Die verwendete Zeitspanne zwischen Aktinzerstörung und Polaritätsuntersuchung wurde experimentell ermittelt, um den Clustern einerseits einen möglichst großen Zeitraum für die Veränderung ihrer Position zu geben, andererseits jedoch Artefakte durch die einsetzende Fragmentierung der Mitochondrien zu verhindern. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt.

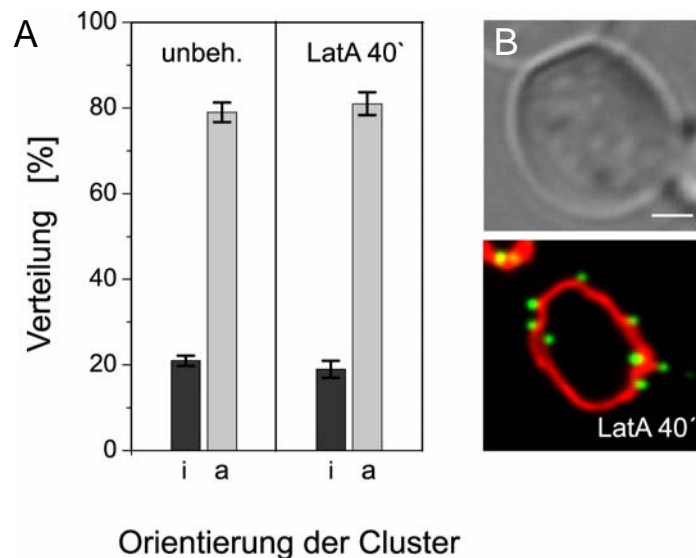


Abb. 46: Die polare Orientierung der Dnm1p-GFP Cluster bleibt selbst nach der Zerstörung von F-Aktin erhalten. (A) Analysiert wurden wt-Zellen, die mit Latrunculin A (250 μM) für 40 min behandelt und anschließend fixiert wurden. Im Vergleich dazu ist auf der linken Seite das Ergebnis für unbehandelte Zellen aufgetragen. Der Unterschied beider Diagramme ist nicht signifikant. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte an. (B) Sowohl eine Hellfeld- als auch eine Fluoreszenzaufnahme einer mit LatA behandelten wt-Zelle sind dargestellt. Trotz Zerstörung des Aktinskeletts fragmentieren die Mitochondrien in diesem Zeitfenster nicht. Größenstandard: 1 μm

In den mit Latrunculin A behandelten Zellen ($n > 20$) sind 81 % der analysierten Cluster Richtung Zellcortex ausgerichtet. Die polare Lokalisation der Dnm1p-GFP Cluster bleibt in der Abwesenheit des Aktin-Zytoskelett über einen gewissen Zeitraum hinweg erhalten. Obwohl Aktin an der Aufrechterhaltung der Polarität nicht essentiell ist, schließen die Experimente eine Beteiligung an ihrer Entstehung nicht aus. Denkbar ist ein Transport der Dnm1p-Cluster entlang der Aktinstränge. Bisher konnte jedoch kein Protein ermittelt werden, das sowohl mit Mitochondrien als auch dem Aktin-Zytoskelett interagiert.

Zusammenfassung der Untersuchungen der Dnm1p-Cluster

Es konnte gezeigt werden, dass der zytosolische und mt-assoziierte Dnm1p-Pool im wt eine vergleichbare Größe besitzen, wobei die Mehrheit der in Clustern vorliegenden Dnm1-Proteine an die Mitochondrien gebunden sind. In $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen war die Rekrutierung der Cluster zu den Mitochondrien gestört, während Mdv1p einen deutlich geringeren Einfluß auf die Anlagerung der Dnm1p-Aggregate aufwies.

Nur wenige Cluster waren an aktuellen Teilungsvorgängen beteiligt und bildeten Spiralen um Matrix-Konstriktionen aus. Während in $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ -Zellen nahezu keine Spiralen detektiert werden konnten, wiesen $\Delta caf4$ -Zellen viermal häufiger Spiralen auf als der wt. Die überwiegende Mehrheit der Cluster in allen Stämmen bildeten jedoch keine Spiralen aus. Im wt waren 80 % dieser Dnm1p-Cluster Richtung Zellcortex orientiert. Diese Cluster-Polarität war in $\Delta fis1$ und $\Delta caf4$ -Zellen aufgehoben, blieb jedoch in $\Delta mdv1$ -Zellen und auch nach der Zerstörung des Aktin-Gerüsts aufrechterhalten.

6 Diskussion

Mitochondrien sind dynamische Organellen, die durch ein balanciertes Verhältnis von Fusion und Teilung ihre Morphologie an die Bedürfnisse der Zelle anpassen. Der Transport und die Lokalisation der Organellen innerhalb der Zelle werden dabei durch Komponenten des Zytoskeletts vermittelt. Neben ihrer Bedeutung im Energiehaushalt spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Apoptose, Zellalterung und Ionen-Homöostase. Dabei wurde der Einfluss der Mitochondrien-Morphologie auf die Regulation dieser zellulären Prozesse erst in den letzten Jahren offenkundig. Besonders der am Teilungsprozess beteiligten Dynamin-verwandten GTPase Dnm1p/Drp1 wird eine zentrale Aufgabe in der dynamischen Strukturänderung der Mitochondrien als Antwort auf intra- und extrazelluläre Signale zugeschrieben. Die molekularen Grundlagen dieser Prozesse und ihre Regulation sind weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurden Matrix-Konstriktionen näher untersucht, die eine Vorbedingung für die mitochondrialen Teilungsvorgänge darstellen. Aufgrund der biochemischen, zellbiologischen und genetischen Vorteile der Bäckerhefe wurde *S. cerevisiae* als Modellorganismus für die Untersuchung des konservierten Teilungsmechanismus gewählt. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der mikroskopischen Charakterisierung der Dnm1p-Cluster. Weiterhin wurde der Einfluss der drei zusätzlichen Teilungsproteine Fis1p, Mdv1p und Caf4p auf die Verteilung, Größe und Orientierung der Dnm1p-Cluster sowie die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts näher untersucht.

6.1 Die Teilung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran erfolgt in Hefe zeitlich koordiniert

Matrix-Konstriktionen bezeichnen temporäre Einschnürungen der mitochondrialen Stränge und stellen nach der aktuellen Modell-Vorstellung eine Vorbedingung für die Anlagerung von Dnm1p-Spiralen dar. In der Literatur wurden Konstriktionen häufig unter Verwendung von Matrix-markierenden Fluoreszenzproteinen lichtmikroskopisch untersucht (Nunnari *et al.*, 1997, Cerveny *et al.*, 2001, Labrousse *et al.*, 1999). Dabei

ergibt sich das Problem, dass Einschnürungen der Matrix von Teilungen der inneren und äußeren Membran nicht unterschieden werden können. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Smirnova *et al.*, 2001, Ingermann *et al.*, 2005) ist zu erkennen, dass sich an Konstriktionsstellen sowohl die äußere als auch die innere Mitochondrienmembran gemeinsam mit der Matrix verengen. Ob dieser Konstriktion tatsächlich eine Teilung folgt, kann in den statischen Bildern jedoch nicht verfolgt werden. In dieser Arbeit wurde durch Doppelmarkierung der äußeren Membran und der Matrix/inneren Membran und durch die Photokonversion von mtGFP drei unterschiedliche Ansätze unternommen, um lichtmikroskopisch zwischen Teilungen und Konstriktionen zu unterscheiden. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die Teilung der inneren Membran zeitlich koordiniert mit der äußeren Membranteilung erfolgt.

Durch die Markierung der äußeren Membran mit einem Fusionsprotein aus OM45 (*outer membrane protein 45*) und GFP und der Matrix mit DsRed wurde gezeigt, dass in $\Delta fis1$ -Mutanten Matrix-Konstriktionen/innere Membranteilungen bei kontinuierlicher äußerer Membran auftreten. Da in diesem Ansatz jedoch nicht zwischen einer Konstriktion der Matrix und einer Teilung der inneren Membran unterschieden werden konnte, wurde in einem weiteren Versuch neben OM45-GFP die innere Mitochondrienmembran von $\Delta fis1$ -Zellen mit DsRed markiert. Obwohl die Mitochondrien nach Deletion des *FIS1*-Gens in der Literatur häufig als teilungsdefizient beschrieben werden (Shaw und Nunnari, 2002), konnte in diesem und vorangegangenen Versuchen eine gegenüber dem wt stark reduzierte, aber vorhandene Teilungsaktivität in $\Delta fis1$ -Zellen festgestellt werden. Eine Separierung der inneren Membran ohne gleichzeitige Teilung der äußeren Membran wurde in keinem Experiment beobachtet. In Hefe scheint somit die Teilung der inneren und äußeren Membran zeitlich eng gekoppelt aufzutreten.

Eine Übertragung der in Hefe gewonnenen Daten über die Koordination der inneren und äußeren Membranteilung auf andere Organismen muss sorgfältig geprüft werden. So wurde in *C. elegans* gezeigt, dass die äußere Membran durch eine *loss of function* Mutation in der GTPase-Domäne des Drp1-Gens (K40A) kontinuierlich bleibt, während die Matrix jedoch zu großen kugelförmigen Segmenten fragmentierte. Die einzelnen Matrix-Kompartimente blieben dabei durch die äußere Membran miteinander verbunden (Labrousse *et al.*, 1999). Abbildung 47 zeigt einen Ausschnitt der mikroskopischen Daten

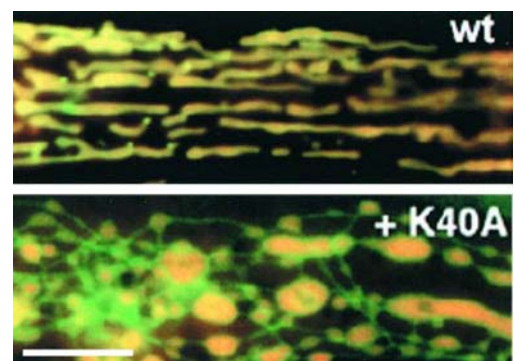


Abb. 47: Die äußere Membran (TOM70-YFP) von *C. elegans* bleibt in Drp1-Mutanten (K40A) kontinuierlich, während die Matrix (Mito-CFP) in kugelförmige Segmente fragmentiert (Labrousse *et al.*, 1999). Größenstandard 5µm

dieser Veröffentlichung. Um zwischen Matrix-Konstriktionen und Teilungen der inneren Membran zu unterscheiden, wurden FLIP-Experimente (*fluorescence loss in photobleaching*) durchgeführt, die die Diskontinuität der einzelnen Matrix-Kompartimente bestätigten. Die Ergebnisse in Hefe und Fadenwurm weisen darauf hin, dass der Mechanismus der koordinierten Trennung der inneren und äußeren Membran in beiden Organismen unterschiedlich reguliert wird.

6.2 Matrix-Konstriktionen treten unabhängig von *Fis1p* und *Dnm1p* auf

Ein dem FLIP-Experiment ähnlicher Ansatz für die Unterscheidung zwischen innerer Membran-Teilung und Matrix-Konstriktion wurde durch die Verwendung des photokonvertierbaren GFP gefunden. Statt die Fluoreszenz-Proteine zu bleichen, um die Kontinuität der mitochondrialen Netzwerke zu verfolgen, wurde hier die Ausbreitung des konvertierten Proteins untersucht. Eine Voraussetzung für die Konversion des Fluorophors besteht in einer sauerstoffarmen Umgebung, weshalb die Methode für die Anwendungen in vielen Bereichen der Zellbiologie weniger geeignet ist. Für Hefe als fakultativ anaeroben Organismus können sauerstoffarme Bedingungen jedoch als physiologisch angesehen werden. Die in dieser Arbeit für Hefe etablierte Methode wurde dazu verwendet, die Kontinuität der Matrix in $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und wt-Zellen näher zu untersuchen. Dazu wurde ein kleiner Bereich der Matrix-GFP markierten Mitochondrienstränge durch die Bestrahlung mit blauem Licht konvertiert und die Ausbreitung des konvertierten Proteins im Netzwerk über die Zeit verfolgt. In der Matrix von Säugerzellen wurde für GFP eine Diffusionsgeschwindigkeit von $2\text{-}3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ gemessen (Partikian *et al.*, 1998). Aufgrund des vergleichbaren Durchmessers (350-500 nm; Egner *et al.*, 2002) und inneren Struktur von Säuger- und Hefemitochondrien kann eine ähnliche Ausbreitungsgeschwindigkeit in Hefe angenommen werden. Bei durchgängigen Mitochondrien-Netzwerken reichen somit einige Sekunden für eine homogene Verbreitung des photokonvertierten GFP in der Matrix. In wt-Zellen erfolgte die Ausbreitung des konvertierten Fluoreszenzproteins in den zusammenhängenden Bereichen. Nach weniger als zehn Minuten konnte die Fluoreszenz des konvertierten Proteins im gesamten mitochondriale Netzwerk detektiert werden. Die schnelle Durchmischung der Matrix durch fortschreitende Fusion und Teilung gewährleistet einen ständigen Austausch der Matrixproteine untereinander, aber auch Proteine der inneren Membran und die an diese angelagerten Nukleotide können sich nach einem gewissen Zeitraum austauschen. Besonders für die mutationsanfällige mitochondriale DNA bietet die Durchmischung die Möglichkeit, durch homologe Rekombination somatische Mutationen zu beheben (Ono *et al.*, 2001).

In $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ -Zellen konnte mit der Photokonversion von GFP gezeigt werden, dass in beiden Mutanten Matrix-Konstriktionen auftreten, die jedoch für die Diffusion des Fluoreszenzproteins keine dauerhafte Barriere darstellen. Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sowohl Fis1p als auch Dnm1p nicht für die Ausbildung von Matrix-Konstriktionen verantwortlich sind. Da andererseits die Dynamamin-verwandte GTPase Dnm1p essentiell für die mitochondriale Teilung ist, handelt es sich bei der Ausbildung von Konstriktionen und der eigentlichen Teilung um zwei separate Mechanismen (Jakobs *et al.*, 2003; Legesse-Miller *et al.*, 2003). Die These wird gestützt durch die Erkenntnis, dass deutlich mehr Konstriktionen als Teilungen auftreten, und dass Konstriktionen zeitlich vor der Anlagerung von Dnm1p an die Mitochondrien stattfinden (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Die meisten Teilungsmodelle gehen jedoch bisher von einer engen Kopplung zwischen dem Auftreten von Konstriktionen und der Teilung der inneren und äußeren Mitochondrienmembran aus (Shaw und Nunnari, 2002). In dieser Versuchsreihe wurden keine $\Delta mdv1$ und $\Delta caf4$ -Zellen untersucht. In $\Delta caf4$ -Zellen konnten jedoch im Gegensatz zu $\Delta mdv1$ -Mutanten in späteren Versuchen viele Matrix-Konstriktionen beobachtet werden. Ob Mdv1p eine Rolle in der Regulation von Konstriktionen spielt, könnte durch einen weiteren, noch ausstehenden Photokonversions-Versuch herausgefunden werden. Bisher bleibt die molekulare Basis der Konstriktionen jedoch ungeklärt.

Eine Möglichkeit der Entstehung von Matrix-Konstriktionen beruht auf einer Interaktion zwischen Proteinen der inneren Membran. In Hefe wurde für das Protein Mdm33 eine Funktion als positiven Regulator der inneren Membranteilung publiziert (Messerschmidt *et al.*, 2003). Auch Mgm1p, ein an der mitochondrialen Fusion beteiligtes Protein, scheint an der Annäherung der inneren Membranen beteiligt (Olichon *et al.*, 2003). Würde Mgm1p in der Fusion und Teilung eine Rolle spielen, käme diesem Protein sogar eine Schlüsselrolle in der Koordination beider Prozesse zu. Gegen eine Rolle dieser Proteine in der Ausbildung von Matrix-Konstriktionen spricht, dass sie nicht essentiell für den Teilungsprozess sind, die Einschnürungen jedoch als Vorbedingung für die Anlagerung von Dnm1p-Spiralen betrachtet werden. Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von Konstriktionen sind Zytoskelett-abhängige Mitochondrienbewegungen, die eine (zumindest kurzzeitige) Spannung entlang der Mitochondrienstränge aufbauen und so zu lokale Einschnürungen führen. Da in *S. cerevisiae* ein großer Anteil der Mitochondrien mit Aktin kolokalisiert, liegt eine Beteiligung dieser Zytoskelett-Proteine nahe. Bisher konnten jedoch keine eindeutigen Interaktionspartner zwischen Mitochondrien und F-Aktin identifiziert werden. Einige Hinweise auf die Beteiligung von spannungsvermittelten Konstriktionen konnten in dieser Arbeit gewonnen werden. So wurden einige Male Mitochondrien beobachtet, die in Zeitserien kurz vor der Strangtrennung eine s-förmige Krümmung einnahmen, als ob zu beiden Seiten des Stranges eine Kraft auf sie einwirke. Ein typisches Beispiel dieser scheinbar unter Spannung stehenden Mitochondrien ist in der folgenden Abbildung 48 dargestellt.

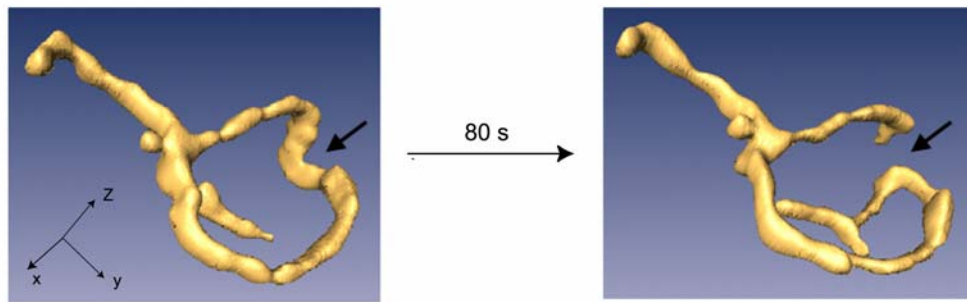


Abb. 48: Wildtyp-Zellen wurden mit Matrix-GFP markiert und in einem multifokalen Konfokal-Mikroskop („*spinning disc*“, PerkinElmer, Boston) aufgenommen. Die in einem zeitlichen Abstand von 80 s aufgenommenen 3D-Daten wurden mit einem Oberflächendarstellungs-Programm (Amira) dargestellt. Die Pfeile markieren Orte der s-förmigen Mitochondrienkrümmung kurz vor und nach der erfolgten Strangtrennung. Das Koordinatensystem gibt die Orientierung der Zelle an, die Pfeillängen entsprechen je 1 μm .

6.3 *Dnm1p*-Spiralen weisen Ähnlichkeiten mit Dynamin auf

Neben dem ungeklärten molekularen Mechanismus der Entstehung von Matrix-Konstriktionen bleibt zu klären, ob sie eine Vorbedingung zur Anlagerung der *Dnm1p*-Spiralen darstellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Kollokationen zwischen Matrix-Konstriktionen und *Dnm1p* (Bleazard *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999; Tieu und Nunnari, 2000; Tieu *et al.*, 2002). Zwei weitere Veröffentlichungen weisen neben *Dnm1p* auch zusätzlich Kollokationen von *Mdv1p* an Konstriktionen nach (Cervený *et al.*, 2001; Naylor *et al.*, 2005). Ein weiterer Grund für die Vermutung, dass Matrix-Konstriktionen die Vorbedingung für die Anlagerung einer *Dnm1p*-Spirale darstellen, beruht auf der molekularen Ähnlichkeit des Teilungsproteins zu Dynamin.

Dnm1p/Drp1 gehört zur Superfamilie der Dynamin-verwandten GTPasen und weist eine starke Sequenz- und Domänenähnlichkeit mit Dynamin auf (Gammie *et al.*, 1995; van der Bliek, 1999). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine N-terminale GTPase-Domäne und eine C-terminale GTPase Effektor Domäne (GED). *Drp1* und *Dnm1p* weisen jedoch im Gegensatz zu Dynamin keine Pleckstrin-Homologie (PH) oder Prolinreiche Domäne (PRD) auf (Yoon *et al.*, 2001). Diese Domänen bestimmen vermutlich, wo und wann Dynamin sich zu Spiralen zusammenlagern (van der Bliek, 1999). Ein schematischer Vergleich zwischen humanem Dynamin 1 und den Dynamin-verwandten Proteine *Drp1* (aus Mensch und *C. elegans*) und *Dnm1p* (*S. cerevisiae*) ist in der folgenden Abbildung 49 dargestellt.

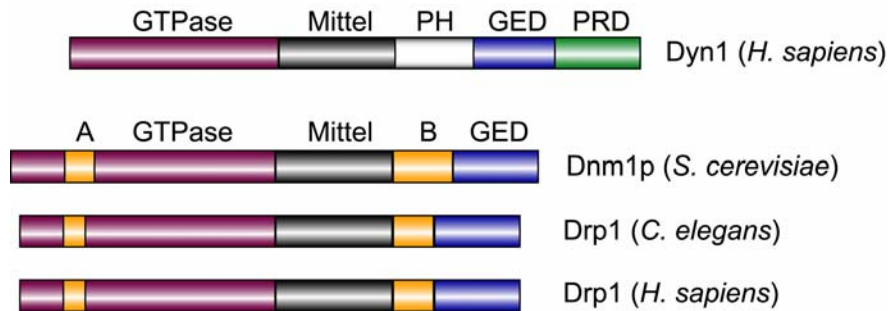


Abb 49: Domänenvergleich einiger Mitglieder der Dynamin-Familie.
A: Insert A; Mittel: Mittel-Domäne; PH: Pleckstrin-Homologie; B: Insert B; GED: GTPase-Effektor Domäne; PRD: Prolin-reiche Domäne

Mitglieder der Dynamin-Familie sind am Membrantransport und an der Umstrukturierung von Membranen in verschiedenen Bereichen der Zelle beteiligt (De Camilli *et al.*, 1995; van der Blik, 1999). Das Dynamin aus Säugerzellen gehört zu den am besten untersuchten Mitgliedern der Dynamin-Familie. Es lagert sich spiralförmig an der Basis von Clathrin-ummantelten Membran-Invaginationen (*clathrin-coated pits*) an und induziert, durch die Hydrolyse von GTP getrieben, die Durchschnürung der endozytotischen Vesikel von der Membran (Sweitzer und Hinshaw, 1998, Sever *et al.*, 2000).

Der Durchmesser von Dynamin-Spiralen aus *Drosophila* (hier wird das Dynamin-Homolog *shibire* genannt) liegt nach Zugabe des GTP-Analogons GMP-PCP im Bereich von 40-50 nm (Zhang und Hinshaw, 2001). *In vitro* weisen sowohl Drp1 aus Säugerzellen als auch Dnm1-Proteine aus Hefe abhängig vom GTP-Status eine Ring- bzw. Spiralstruktur auf, die stark an Dynamin-Spiralen aus *Drosophila* erinnert. Ein großer Unterschied besteht jedoch darin, dass die Drp1-Ringe einen deutlich kleineren Durchmesser (etwa 31 nm, Yoon *et al.*, 2001) als Dnm1p-Spiralen (etwa 110 nm; Ingerman *et al.*, 2005) aufweisen. Für einen direkten Vergleich sind in der folgenden Abbildung 50 Spiralen/Ringe beider Proteine dargestellt.

Der Spiral-Durchmesser von Dnm1p weist interessanterweise eine vergleichbare Größe auf wie die in Elektronenmikroskopie-Aufnahmen ausgemessenen Matrix-Konstriktionen in Hefe (Ingerman *et al.*, 2005). Da Mitochondrien ohne Konstriktionen einen erheblich größeren Durchmesser (350-500 nm) aufweisen, wird die Vorstellung bekräftigt, dass sich Dnm1p-Spiralen erst nachträglich an eingeschnürte Bereiche der Organellen anlagern können.

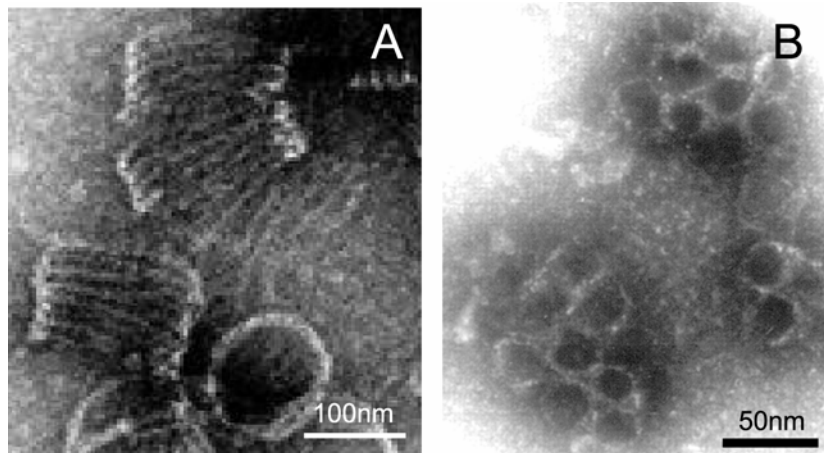


Abb 50: (A) Aufgereinigte Dnm1-Proteine bilden in Anwesenheit von GMP-PCP Spiralen von etwa 110 nm Durchmesser (Ingermann *et al.*, 2005). (B) Aufgereinigte Drp1-Proteine lagern sich in Anwesenheit von GTP γ S zu Ringen von etwa 31 nm zusammen (Yoon *et al.*, 2001). Dargestellt sind Elektronenmikroskopie-Aufnahmen.

Der Durchmesser der Dnm1p-Spiralen verdeutlicht, dass es bisher lichtmikroskopisch nicht möglich war, die ringförmigen Strukturen aufzulösen. Unter der Annahme, dass *in vivo* die Dnm1p-Spiralen eine vergleichbare Größe besitzen, liegen die Spiralen unterhalb der Beugungsgrenze eines herkömmlichen Konfokal-Mikroskops (etwa 200 nm lateral und 500-800 nm axial, abhängig von der verwendeten Wellenlänge). Trotz dieser physikalischen Grenze wurden Daten veröffentlicht, die anhand von konfokalen 3D-Datensätzen zwischen Ringen, Halbringen und Clustern unterscheiden wollen (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Dabei wurden entfaltete Datensätze mit einem Programm bearbeitet, welches Oberflächen anhand von Helligkeits-Grenzwerten generiert (Oberflächen-Rendering). Durch diese Methode entstehen scharfe Grenzflächen, die physikalisch nicht vorhanden sind und je nach Wahl der Helligkeitsschwelle aus Clustern Halbringe oder Ringe generiert. Diese Veröffentlichung zeigt, wie sorgfältig mikroskopische Daten bearbeitet, interpretiert und hinterfragt werden müssen.

Nimmt man einen Durchmesser der Dnm1p-Spiralen von etwa 100 nm *in vivo* an, so bieten sich zwei lichtmikroskopische Ansätze zur Auflösung dieser Strukturen, die 4Pi- und STED-Mikroskopie. Um vorab zu klären, ob sich die 4Pi-Mikroskopie für die Unterscheidung zwischen Clustern und Spiralen eignet, wurden Ringe von 100 nm Durchmesser im Computer simuliert und mit der Punktbild-Funktion des 4Pi-Mikroskops gefaltet. Bei einer Ein-Photonenanregung sind die Modulationen für eine Unterscheidung von Ringen und Clustern nicht geeignet, da die Nebenmaxima im Vergleich zum Hauptmaximum zu hoch sind, um rechnerisch entfaltet werden zu können (siehe Mikroskope 4.2). Durch die Modulation des 4Pi Typ C mit Zwei-Photonenanregung konnten in der Simulation Ringe dieser Größe von Clustern

unterschieden werden. Die Zwei-Photonenanregung der GFP-markierten Dnm1p-Proteine führte jedoch bei den Aufnahmen zu starkem Bleichen, so dass dieser Ansatz zur Auflösung der Spiral-Struktur nicht verwendet werden konnte.

Ein weiterer Versuch zur lichtmikroskopischen Auflösung der Ringstruktur wurde mit Hilfe eines STED-Mikroskops unternommen. Simulationen ergaben, dass mit einer Auflösung von 70 nm mit GFP als verwendetem Marker die Ringe aufzulösen sind. Bisherige Versuche zeigten keinen Erfolg, da einerseits die Ringe in einer günstigen Orientierung senkrecht zur optischen Achse liegen müssen und andererseits die Häufigkeit von Ringen in wt-Zellen relativ gering ist (statistisch etwa 1 Ring alle 2 Zellen). Außerdem werden STED-Bilder bisher nur in zwei Dimensionen aufgenommen, sodass die Wahrscheinlichkeit auf die Detektion eines Ringes noch einmal deutlich sinkt. Die Untersuchungen dauern jedoch an. Dabei soll in Zukunft die Häufigkeit der Ringe pro Zelle durch Reagenzien erhöht werden, die eine Fragmentierung der Mitochondrien induzieren. Voraussetzung für diesen Ansatz ist, dass diese Fragmentierung kein passives Ereignis darstellt, sondern durch den Teilungsapparat vermittelt wird. Durch Untersuchungen in Säugerzellen wurde gezeigt, dass die Expression eines dominant negativen Drp1 die Fragmentierung der Mitochondrien während der Apoptose verhindert und die Zellen dadurch weniger sensible gegenüber apoptotischen Signalen werden (Frank *et al.*, 2001). In Hefe wurde beobachtet, dass nicht nur Dnm1p, sondern auch Mdv1p die Apoptose durch verstärkte oder unterdrückte Teilungsraten beeinflussen (Fannjiang *et al.*, 2004). Beide Ergebnisse deuten auf eine aktiv durch den Teilungsapparat vermittelte Mitochondrien-Fragmentierung während der Apoptose. Somit sollte die Verwendung von Apoptose-induzierenden Reagenzien die Anzahl der Ringe/Spiralen der Zelle erhöhen können und dadurch ihre Detektion in der STED-Mikroskopie erleichtern.

Bisher ist es noch nicht gelungen, mit hochauflösender Lichtmikroskopie die Dnm1p-Spiralen darzustellen, da ihre Größe unterhalb der beugungsbegrenzten Auflösung der herkömmlichen Konfokalmikroskope liegen. Deshalb wurde ein anderer Ansatz zur Unterscheidung zwischen Spiralen von Clustern gefunden, der auf der Definition von Dnm1p-Spiralen mit Hilfe von zwei Auswahlkriterien beruht. Da Matrix-Konstriktionen nach der Modell-Vorstellung die Vorbedingung für eine Anlagerung der Dnm1p-Spirale darstellen, wurden nur Cluster berücksichtigt, die mit Konstriktionsstellen kolokalisieren. Ein weiteres Auswahl-Kriterium war die Überlagerung der Schwerpunkte der Mitochondrien und Cluster an diesen Stellen. Dabei geht man davon aus, dass eine Spirale gleichmäßig den tubulären Mitochondrienstrang umschließt und somit ihr Schwerpunkt im Zentrum der Spirale zu finden ist. Nur wenn beide Kriterien in strikter Weise erfüllt waren, wurden diese Cluster als Spiralen gewertet. Die Verteilung der Spiral-Helligkeiten zeigte eine breite Streuung und betrug durchschnittlich 100-500 Dnm1p-GFP Moleküle. Die Abschätzung der Molekülzahl wurde durch die Verwendung eines GFP-VLP (*virus-like protein*)

möglich, der eine konstante Zahl an GFP-Molekülen (120 pro Virus) enthält und als interner Kalibrierungsstandard verwendet wurde (Charpilienne *et al.*, 2001; Dundr *et al.*, 2002).

6.3.1 Der GFP-VLP eignet sich zur Abschätzung der Dnm1p-GFP Moleküle in Clustern und Spiralen

Obwohl der verwendete GFP-VLP nicht die erste beschriebene Kalibrierungsmethode für GFP-Messungen darstellt (Hirschberg *et al.*, 1998; Chiu *et al.*, 2001), so hebt sie sich von den anderen Methoden durch zwei Kriterien ab. Hirschberg *et al.* verwendeten GFP-Lösungen definierter Konzentration als Vergleichsstandard, während Chiu *et al.* transparente Kügelchen („beads“) mit

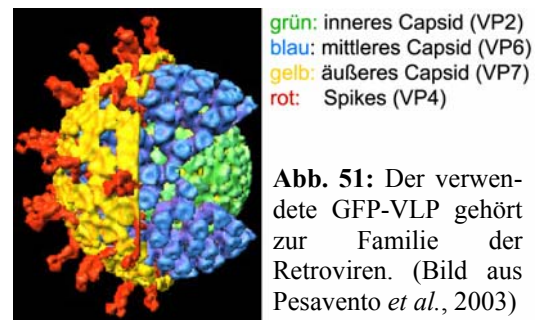


Abb. 51: Der verwendete GFP-VLP gehört zur Familie der Retroviren. (Bild aus Pesavento *et al.*, 2003)

GFP beschichteten und die Fluoreszenz-Intensitäten dieser Kügelchen in Lösung mit der Helligkeit der zu untersuchenden Proben verglichen. Im Gegensatz zu diesen Kalibrierungsmethoden kann der verwendete GFP-VLP direkt zu den Proben als interner Standard zugegeben und somit zeitgleich gemessen werden, was Ungenauigkeiten durch Schwankungen der Laserintensität als Messfehler ausschließen läßt. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die präzise Anzahl der GFP-Moleküle durch den symmetrischen Aufbau des Virus.

Der GFP-VLP basiert auf einem Rotavirus, dessen Hüllenprotein (VP2) des inneren Capsids durch ein Fusionsprotein mit GFP ersetzt wurde (siehe Abbildung 51). Das innere Capsid weist durch seinen symmetrischen Aufbau genau 120 VP2-Proteine (bzw. chimäre VP2-GFP-Proteine) auf, die Genauigkeit der Packungszahl zeigt sich in der schmalen Gauss-Verteilung der Fluoreszenz-Intensitäten der VLP. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass sich die GFP-Proteine innerhalb des Capsids korrekt falten können und trotz des geringen Abstands untereinander von Fluoreszenzlöschungs-Effekten (*quenching*) nicht beeinträchtigt werden (Charpilienne *et al.*, 2001). Für die Abschätzung der beteiligten Dnm1p-GFP Moleküle in den Clustern und Spiralen eignet sich der Virus besonders gut, da beide Strukturen vergleichbare Helligkeiten aufweisen, wodurch Unterschiede im Signal-zu-Rausch-Verhältnis ausgeschlossen werden können. Obwohl die mikroskopischen Aufnahmen mit Einzelphoton-sensitiven Avalanche-Photodioden durchgeführt wurden und die Auswertung bis hin zu deutlich dunkleren Dnm1p-Cluster erfolgte, gehen in die Diagramme und Statistiken keine Datenpunkte ein, die dunkler als eine Virushelligkeit und somit 120 GFP-Moleküle sind. Der Grund hierfür liegt im schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis der dunklen Cluster.

Die Verwendung des GFP-VLP als Kalibrierungs- und Helligkeitsstandard erlaubte erstmals die Kalkulation der Protein-Anzahl innerhalb der Dnm1p-Cluster. Besonders interessant war dabei die Information über die Molekülzahl der Spiralen, da dies eine Abschätzung der Spiral-Windungen um den Mitochondrien-Strang erlaubte.

6.3.2 Die Kalkulation der Anzahl von Dnm1p-Spiralwindungen beruht auf dem Vergleich zur Dynamin-Struktur aus *Drosophila*

Die Verwendung des GFP-VLP als internen Helligkeits-Standard ermöglichte eine Abschätzung der durchschnittlichen Molekülzahl einer Dnm1p-Spirale (100-500 Proteine). Dabei wurde die gut untersuchte Dynamin-Struktur aus *Drosophila* als Referenz zugrunde gelegt (Zhang und Hinshaw, 2001; Chen *et al.*, 2004), die in Abbildung 52 dargestellt ist.

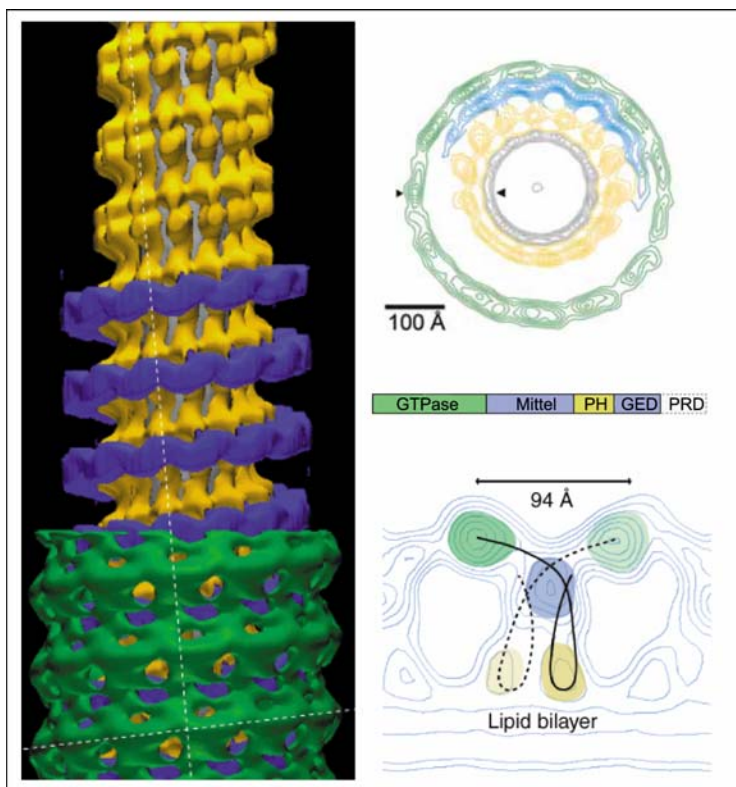


Abb. 52: Dynamin-Struktur aus *Drosophila* nach Zugabe des GTP-Analogon GMP-PCP. Die Bilder wurden mit einem Elektronen-Mikroskop aufgenommen und durch Oberflächen-Umrandungen nachbearbeitet. Eine Windung besteht aus 2x15 Dynamin-Molekülen, der Innen-Durchmesser der Spirale variiert zwischen zugeschnürter und offener Spirale zwischen 94-132 Å (Zhang und Hinshaw, 2001; Chen *et al.*, 2004).

Ausgehend von den veröffentlichten EM-Daten der Dnm1p-Spiralen *in vitro* (Ingerman *et al.* 2005) wurde ein Spiraldurchmesser von 100 nm angenommen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen auf ein bis sieben Windungen der Spiralen hin, was sehr gut mit den elektronenmikroskopischen Daten von Ingerman *et al.* übereinstimmt. Bei den Ergebnissen der Kalkulation muss jedoch berücksichtigt

werden, dass der tatsächliche molekulare Aufbau einer Dnm1p-Spirale bisher nicht bekannt ist und dieser sich trotz der großen Homologie der Proteine von der Dynamin-Spiralstruktur unterscheiden kann. Die starke Streuung der Spiral-Helligkeiten könnte auf einen dynamischen Mechanismus hindeuten, bei dem sich die Anzahl der Moleküle einer Spiralen während des Durchschnürens reduziert. Vielleicht sind Dnm1p-Spiralen in ihrer Größe aber auch nicht strikt reguliert.

Ein Hinweis, dass die Anzahl der Windung der meisten Spiralen nach der vorliegenden Kalkulation zwischen drei und vier Windungen liegt, zeigen die Daten in $\Delta caf4$ -Zellen. Aus bisher ungeklärten Gründen weisen diese Zellen deutlich mehr (etwa viermal so viele) Spiralen auf wie wt-Zellen, was zu einer besseren Statistik der Helligkeitsverteilung der Spiralen mit einem deutlichen Maximum bei etwa 250 Molekülen führt. Eine mögliche Erklärung für das vermehrte Vorkommen von Dnm1p-Spiralen in $\Delta caf4$ -Zellen könnte in der molekularen Ähnlichkeit zwischen Caf4p und Mdv1p liegen. Im Gegensatz zu Caf4p ist Mdv1p essentiell für die Teilung, was sich besonders in den fischernetzartigen Mitochondrien in $\Delta mdv1$ -Zellen widerspiegelt, während $\Delta caf4$ -Zellen einen normalen mitochondrialen Phänotyp zeigen. Wenn in der Zelle aufgrund der gleichen Interaktionspartner Mdv1p zu Caf4-Proteinen in Konkurrenz steht, so würde in $\Delta caf4$ -Zellen dieses Gleichgewicht zu Mdv1p und somit eventuell zur Bildung von Spiralen verschoben. Für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mdv1p und Spiralen sprechen Veröffentlichungen, die Kollokationen zwischen Mdv1p und Dnm1p an Konstriktionen zeigen (Cervený *et al.*, 2001; Naylor *et al.* 2005).

6.4 *Dnm1p/Drp1* wird in Abhängigkeit des Zytoskeletts zu den Mitochondrien rekrutiert

Aus der Beobachtung, dass Matrix-Konstriktionen zeitlich vor der Anlagerung von Dnm1p zu Spiralen entstehen und unabhängig von mt-assoziierte Dnm1p-Cluster auftreten (Legesse-Miller *et al.*, 2003), ergeben sich zwei Möglichkeiten der Dnm1p-Rekrutierung zu den eingeschnürten Mitochondrienbereichen. Entweder werden zytosolische Dnm1-Proteine zu den Orten der Konstriktion rekrutiert, oder bereits mt-assoziierte Dnm1p-Cluster wandern entlang der Mitochondrien zu benachbarten Einschnürungsbereichen. Obwohl frühere Modelle von der zytosolischen Rekrutierung ausgehen (Shaw und Nunnari, 2002), sprechen Beobachtungen in Hefe und *C. elegans* für die zweite Möglichkeit. So wurden in Zeitserien konfokaler Fluoreszenz-Aufnahmen in *C. elegans* Drp1-Cluster beobachtet, die lange vor der eigentlichen Teilung an den Mitochondrien angelagert waren (Labrousse *et al.*, 1999). In Hefe wurde gezeigt, dass das Auftreten von Konstriktionen zeitlich nicht mit der Anlagerung von Dnm1p korreliert und nur bei einem Zusammentreffen beider Prozesse Ringe/Spiralen

ausgebildet werden können (Legesse-Miller, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in wt-Zellen durchschnittlich 25 Cluster pro Zelle auftreten, davon aber nur in jeder zweiten Zelle eine Spirale zu detektieren ist. Der überwiegende Teil der Mitochondrien-assoziierten Dnm1-Proteine bildet somit Cluster auf der äußeren Membran, die nicht an aktuellen Teilungsprozessen beteiligt sind. Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Dnm1p-Cluster entlang der Mitochondrien zu Bereichen benachbarter Konstriktionen transportiert werden, wobei sich diese Einschnürungen unabhängig von Dnm1p ausbilden.

In Säugerzellen wurde sowohl von einer F-Aktin-abhängigen (De vos *et al.*, 2005) als auch von einer auf Tubulin und den Motorproteinen Dynein-Dynactin basierenden Rekrutierung von Drp1 zu den Mitochondrien berichtet (Varadi *et al.*, 2004). Die für den Transport von Dnm1p in Hefe wichtigen Proteine wurden bisher nicht identifiziert. Da jedoch in *S. cerevisiae* die Mitochondrien über große Bereiche mit dem Aktin-Zytoskelett kolokalisieren (Drubin *et al.* 1993), liegt F-Aktin als Interaktionspartner von Dnm1p nahe. Tubulin scheidet als möglicher Kandidat in Hefe aus, da die Mikrotubuli-Strukturen in diesem Organismus im Zentrum der Zelle liegen und nicht mit den Mitochondrien assoziiert sind. Auch zeigte die Zerstörung der Mikrotubuli durch Mutationen im β -Tubulin (Huffaker *et al.*, 1987) und durch die Zugabe von Mikrotubuli-destabilisierenden Substanzen (Jacobs *et al.*, 1988) keinen Effekt auf die Mitochondrien-Morphologie. Dagegen wandern aufgereinigte Hefe-Mitochondrien in Abhängigkeit von ATP entlang von immobilisierten Aktin-Filamenten (Simon *et al.*, 1995). Ein weiterer Hinweis auf eine Verbindung zwischen Aktin und Mitochondrien stellt die Fehlorganisation der Mitochondrien-Netzwerke in Mutanten des einzigen Aktin-Gens in Hefe (*ACT1*) dar (Drubin *et al.* 1993). Obwohl viele Ergebnisse auf eine Interaktion zwischen Mitochondrien und dem Aktin-Zytoskelett hindeuten, sind die Bindeglieder zwischen beiden Netzwerken bisher wenig charakterisiert.

Die zunächst untersuchten fünf Myosine in *S. cerevisiae* schienen nicht an der Mobilität der Mitochondrien beteiligt (Simon *et al.*, 1995; Goodson *et al.*, 1996). Eine neuere Veröffentlichung zeigt jedoch einen Einfluss von Myo2p auf die Organisation des Aktin-Netzwerkes und der Mitochondrienstruktur (Altmann und Westermann, 2005). Für einige andere Proteine wurde ebenfalls eine Verbindung zwischen den Mitochondrien und dem Aktingerüst postuliert. So wurde berichtet, dass der Arp2/3-Komplex für den Transport der Mitochondrien während der asymmetrischen Teilung in die Tochterzelle aktinabhängig erfolgt (Boldogh *et al.*, 2001). Ein gerichteter Transport der Organellen in die knospende Zelle ist besonders wichtig, da Mitochondrien aufgrund ihrer eigenen Erbinformation nicht *de novo* synthetisiert werden können. Die an der Tubulation der Mitochondrien beteiligten Proteine Mmm1p, Mdm10p und Mdm12p der äußeren Membran wurden ebenfalls als mögliche Aktin-bindende Kandidaten in Erwägung gezogen (Burgess *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1997; Sogo und Yaffe *et al.*, 1994).

Für das Verständnis der Mitochondrien-Morphologie und seiner Regulation wäre die Identifikation der Bindeglieder zwischen dem Organell und den Elementen des Zytoskeletts ein wichtiger Schritt. Dabei gilt es in Zukunft, bereits gefundene mögliche Interaktionspartner näher zu charakterisieren, weitere Kandidaten zu ermitteln sowie Proteine bekannter Wirkungsweise auf eine mögliche Doppelfunktion in der Zelle zu überprüfen.

6.5 Die Polarität der *Dnm1p*-Cluster ist abhängig von *Fis1p* und *Caf4p*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit (80%) der nicht an aktuellen Teilungsvorgängen beteiligten *Dnm1p*-Cluster im wt Richtung Zellcortex orientiert ist. Die exponierte Lage einiger Cluster (siehe Pfeile in Abb. 53) deutet darauf hin, dass diese *Dnm1p*-Aggregate an der Aufhängung der Mitochondrien an Strukturen unterhalb oder am Zellcortex beteiligt sein könnten. Neben dieser möglichen Funktion als Bindeglied zwischen den Mitochondrien und Elementen des Zytoskeletts könnte die polare Orientierung der *Dnm1p*-Komplexe auch auf eine F-Aktin-abhängige Rekrutierung der Cluster entlang der Mitochondrien zurückgeführt werden. Ein Transport der *Dnm1p*-Cluster über längere Strecken entlang der Aktinstränge konnte bisher mikroskopisch nicht verfolgt werden, da die meisten Cluster über einen längeren Zeitraum hinweg relativ immobil auf den Mitochondrien verweilen.

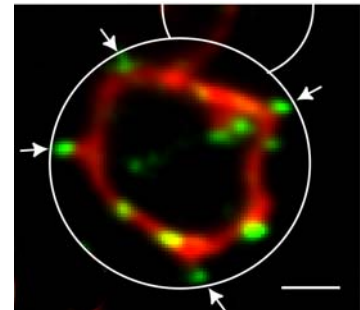


Abb. 53: *Dnm1p*-GFP Cluster sitzen häufig an exponierten Stellen auf den Mitochondrien (Pfeile) und sind Richtung Zellcortex orientiert. Dargestellt ist eine Maximum-Projektion einer fixierten wt-Zelle mit mtDsRed und *Dnm1p*-GFP. Größenstandard 1 μm

Der Einfluss von Aktin auf die Polarität der Cluster wurde durch die Behandlung der Zellen mit dem Aktin-depolymerisierenden Reagenz Latrunculin A untersucht. Überraschenderweise zeigte die Zerstörung des Aktin-Gerüsts keinen Einfluss auf die Orientierung der *Dnm1p*-Komplexe. Diese Beobachtungen zeigen, dass F-Aktin für die Aufrechterhaltung der Polarität in einem gewissen Zeitfenster nicht benötigt wird. Ob eine Interaktion der *Dnm1p*-Cluster mit Aktin die Ursache zur Entstehung der Polarität ist, konnte der Versuch nicht ausschließen. Eine Beobachtung der *Dnm1p*-Cluster nach erfolgter Aktin-Zerstörung über einen noch längeren Zeitraum war nicht möglich, da die Aktinfasern weitere wichtige Aufgaben als Transportsystem innerhalb der Zelle wahrnehmen und es ohne diese Strukturen nach einiger Zeit zum Zelltod des Organismus kommt.

Die bisherigen Versuche konnten nicht eindeutig klären, ob Dnm1p eine Funktion in der Aufhängung des Organells übernimmt oder das Teilungsprotein lediglich entlang des Zytoskeletts auf der Mitochondrienoberfläche transportiert wird. Zwar weisen einige bereits diskutierte Beobachtungen auf eine Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts hin, jedoch könnten die Dnm1p-Cluster auch an Komponenten des Zellkortex oder Intermediär-Filamenten aufgehängt sein. In Hefe wurde für Mdm1p eine Rolle als Intermediärfilament postuliert, was neben einer Stützfunktion der Zelle Einfluss auf die Mitochondrien-Organisation aufweisen soll (Fisk und Yaffe, 1997).

Die Polaritätsuntersuchung der Cluster wurde ebenfalls in Abhängigkeit der anderen Teilungsproteine Mdv1p, Fis1p und Caf4p durchgeführt, weitere Interaktionspartner von Dnm1p sind bisher nicht bekannt. Es zeigte sich, dass Mdv1p keinen Einfluss auf die polare Ausrichtung der Dnm1p-Komplexe aufwies, wohingegen sowohl in $\Delta fis1$ als auch in $\Delta caf4$ -Zellen die Orientierung der Cluster Richtung Zellcortex aufgehoben war. Da das integrale Protein Fis1p gleichmäßig in der äußeren Membran verteilt vorliegt (Mozdy *et al.*, 2000) und Caf4p zu den Mitochondrien rekrutiert (Griffin *et al.*, 2005), stellt die aufgehobene Polarität der Dnm1p-Cluster in $\Delta fis1$ -Zellen wahrscheinlich einen sekundären Effekt dar. Neben Fis1p und Caf4p sind vermutlich noch bislang unbekannte Proteine am polaren Dnm1p/Caf4p/Fis1p-Komplex beteiligt. Besonders wichtig für weitere Untersuchungen ist die Identifizierung von Bindeproteinen zwischen dem Komplex und dem Aktin-Zytoskelett oder alternativ, Komponenten des Zellcortex oder den Intermediär-Filamenten.

6.6 Die Interaktionspartner Fis1p, Mdv1p und Caf4p haben Einfluss auf die Verteilung und Größe der Dnm1p-Cluster

In dieser Arbeit wurde die Größe und Verteilung der Dnm1p-Cluster unter Verwendung von sensitiver Konfokal-Mikroskopie quantifiziert und der Einfluss der drei Teilungsproteine Fis1p, Mdv1p und Caf4p auf diese Charakteristika ermittelt. In einer biochemischen Subfraktionierung wurde zunächst bestätigt, dass nach der Aufreinigung der Mitochondrien der überwiegende Teil (mehr als 80 %) des Dnm1p im Zytosol zu finden ist (Cervený und Jensen, 2003; Otsuga *et al.*, 1998). Die Ergebnisse des Western-Blots stützen die Vermutung, dass die Bindung zwischen Dnm1p und der Mitochondrien-Membran vermutlich schwach ist und während der biochemischen Aufreinigung aufgebrochen wird. In $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ -Zellen waren laut Western-Analyse noch einmal deutlich weniger Dnm1-Proteine an die äußere Membran gebunden. Diese Ergebnisse überraschen für die Deletion des integralen Membranankers Fis1p nicht, da für Fis1p eine Rolle in der Rekrutierung von Dnm1p zur mitochondrialen Oberfläche beschrieben wurde (Tieu *et al.*, 2002). In $\Delta mdv1$ -Zellen zeigt die Analyse jedoch trotz der weiterhin erfolgenden „normalen“ Rekrutierung der

Dnm1p-Cluster zu den Mitochondrien eine deutlich geringere Stabilität der Komplexe. Die nahezu wildtypisch erscheinende Rekrutierung des Dnm1p zu den Mitochondrien in diesen Zellen kann durch die Aktivität von Caf4p erklärt werden, welches ebenfalls als Adaptor zwischen Fis1p und Dnm1p fungieren kann (Griffin *et al.*, 2005). Vielleicht beruht die geringere Stabilität des Komplexes in $\Delta mdv1$ -Zellen darauf, dass Caf4p zusammen mit Dnm1p und Fis1p nur einen weniger stabilen Komplex eingehen kann als Mdv1p und daher anfälliger für die Zerstörung der Bindungskräfte während der Mitochondrien-Aufreinigung ist.

Die Größe des zytosolischen und mt-assoziierten Dnm1p-Pools wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe von digitalen 3D-Masken bestimmt, ohne die Interaktion zwischen Dnm1p und den Mitochondrien biochemisch zu beeinflussen. Obwohl mehr als 90 % der Cluster in wt-Zellen an Mitochondrien gebunden vorliegen, kann der zytosolische, gleichmäßig verteilte Dnm1p-Pool leicht unterschätzt werden. Tatsächlich sind beide Fraktionen im wt etwa gleich groß (52 % mt-assoz.) und liegen somit zwischen dem biochemisch ermittelten (<80 % mt-assoz.) und mikroskopisch vermuteten Wert (>90 % mt-assoz.). Die Deletion von Fis1p zeigte durch seine Rolle als Membrananker den erwarteten größten Effekt (23 % mt-assoz.) auf die Rekrutierung der Dnm1-Proteine zu den Mitochondrien. Dagegen deuten die Ergebnisse der Untersuchung auf einen stärkeren Einfluss von Caf4p (29 % mt-assoz.) als Mdv1p (40 % mt-assoz.) auf die Rekrutierung der Dynamamin-verwandten GTPase zu den Mitochondrien hin.

Im Gegensatz zu dieser auf Gesamthelligkeiten beruhenden Methode wurde in einem dritten Ansatz die Helligkeit einzelner Cluster vermessen. Die Verteilung der Cluster steht in guter Übereinstimmung zu Beobachtungen anderer Gruppen (Mozdy *et al.*, 2000; Bleazard *et al.*, 1999), wobei die Bestimmung der Molekülzahlen innerhalb der Aggregate (durchschnittliche 400 Dnm1-Proteine pro Cluster) bisher nicht ermittelt werden konnte. In einer vorangegangenen Studie wurde die durchschnittliche Größe der Dnm1p-Cluster im wt lichtmikroskopisch ausgemessen und mit 300-400 nm angegeben (Cerveny und Jensen, 2003). Eigene Größenbestimmungen der Dnm1p-GFP Cluster in wildtypischem Hintergrund mit Hilfe des STED-Mikroskops ergaben deutlich kleinere Clustergrößen, deren Durchmesser durchschnittlich bei 114 nm lag. Da in die Auswertung der STED-Messungen nur besonders helle Cluster eingeschlossen wurden, um eine Messung der Dnm1p-Punkte in der Fokalebene sicherzustellen (siehe Mikroskope 4.3.3), repräsentiert dieser Durchschnittswert sogar die obere Grenze für die Clustergrößen. Die sich von den veröffentlichten Daten unterscheidenden Messergebnissen dieser Arbeit können sowohl auf die Verwendung eines anderen Stammes (FY833 statt BY4741) als auch auf eine andere Markierungsstrategie zurückgeführt werden. So wurde in der Veröffentlichung von Cerveny und Jensen das Fusionsprotein Dnm1p-GFP auf ein *CEN*-Plasmid unter die Kontrolle eines induzierbaren *Gal*-Promotors gestellt, was vermutlich zu einer Überexpression des

Dnm1-Proteins führte und die Cluster vergrößerte (Cervený und Jensen, 2003; Sesaki und Jensen, 1999). In dieser Arbeit wurde die deutlich exaktere Methode der Epitop-Markierung verwendet, da sie die Expressionsstärke des wildtypischen Gens widerspiegelt und das Gen des Fusionsproteins stabil ins Chromosom integriert.

Die Verteilung der Dnm1p-Cluster in $\Delta mdv1$ und $\Delta fis1$ -Zellen bestätigt die Daten vorangegangener Untersuchungen (Cervený *et al.*, 2001; Shaw und Nunnari, 2002). Die Anlagerung der Dnm1-Proteine ohne Fis1p als Membrananker könnte dabei durch eine Affinität von Dnm1p zu Lipiden der äußeren Membran vermittelt werden (Shaw und Nunnari, 2002). Dies erklärt auch die, wenn auch geringe, so doch vorhandene restliche Teilungsaktivität in $\Delta fis1$ -Zellen (Jakobs *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der Untersuchungen in $\Delta caf4$ -Zellen unterscheiden sich dagegen von den publizierten Daten (Griffin *et al.*, 2005). So weisen die Resultate dieser Arbeit auf ein gestörtes Rekrutierungsverhalten von Dnm1p in $\Delta caf4$ -Zellen hin, während Griffin *et al.* einen solchen Phänotyp erst nach einer Doppeldeletion beider Adaptorproteine Caf4p und Mdv1p beobachtete. Eine mögliche Erklärung der verschiedenen Ergebnisse könnte in unterschiedlichen GFP-Markierungen der Proteine beider Gruppen liegen. Eine Störung des GFP bei der Interaktion zwischen Dnm1p und Caf4p kann phänotypisch nicht ausgeschlossen werden, da $\Delta caf4$ -Zellen (im Gegensatz zu $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$) dem wt sehr ähnliche Netzwerk-Strukturen aufweisen. Dagegen spricht, dass die GFP-Markierung die Interaktion zwischen Mdv1p und Dnm1p nicht zu stören scheint und eine unterschiedliche, GFP-bedingte Störung in der Funktionsweise von Caf4p und Mdv1p aufgrund der starken Homologie beider Proteine überraschen würde. Wahrscheinlicher ist jedoch eine unterschiedliche Rolle der beiden Adaptor-Proteine in der Zelle.

6.7 Mdv1p und Caf4p erfüllen unterschiedliche Aufgaben im mitochondrialen Teilungsapparat

Die Gesamtheit der gewonnenen Daten deutet trotz der starken Homologie beider Proteine auf unterschiedliche Rollen von Caf4p und Mdv1p in der Regulation der mitochondrialen Teilung. Berücksichtigt man die Ergebnisse der Polaritätsuntersuchung, so zeigt sich, dass Caf4p im Gegensatz zu Mdv1p an der Aufhängung und Orientierung der Dnm1p-Cluster beteiligt scheint. Dafür ist Mdv1p für den Teilungsprozess essentiell. Weiterhin wird ein grundsätzlicher Funktionsunterschied dadurch bestätigt, dass $\Delta mdv1$ -Zellen im Gegensatz zu $\Delta caf4$ -Zellen einen fischernetzartigen Mitochondrienphänotyp aufweisen (Griffin *et al.*, 2005) und in $\Delta mdv1$ -Zellen besonders wenig Spiralen detektiert werden konnten. Dagegen zeichneten sich $\Delta caf4$ -Zellen durch viermal mehr Spiralen gegenüber dem wt aus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Mdv1p aufgrund der starken

Homologie mit Caf4p um die Bindungspartner in der Zelle konkurriert und nach der Deletion von Caf4p das Mdv1-Protein seine Funktion verstärkt ausüben kann. Da Mdv1p zusammen mit Dnm1p vermehrt an Konstriktionsstellen gefunden wurde (Cervený *et al.*, 2001; Naylor *et al.* 2005) und in den vorliegenden Versuchen bisher keine Konstriktionen in $\Delta mdv1$ -Zellen entdeckt werden konnten, deutet dies möglicherweise auf eine Beteiligung von Mdv1p in der Generierung von Matrix-Konstriktionen hin. Dieser Zusammenhang würde wiederum das vermehrte Auftreten von Spiralen in $\Delta caf4$ -Zellen verständlich machen. Dabei ist zu beachten, dass es trotz der vermehrten Spiral-Anlagerung offenbar nicht zu einer erhöhten Teilungsrate kommt, da sonst der mitochondriale Phänotyp in $\Delta caf4$ -Zellen fragmentierte Mitochondrien aufweisen müsste. Dass sie dennoch wildtypisch aussehen, könnte an der GTP-abhängigen, von Dnm1p vermittelten Reaktion der Strangtrennung als Geschwindigkeits-bestimmendem Schritt liegen (Fukushima *et al.*, 2001).

In einigen Modellen wird Mdv1p als essentiell für die Bildung von Spiralen oder sogar als Teil der Spiralkomplexe angesehen, da sowohl Dnm1p als auch Mdv1p an Matrix-Konstriktionen kolokalisieren (Taylor *et al.*, 2005). Dabei zeigen *in vitro*-Experimente, dass Dnm1-Proteine auch ohne die Zugabe von Mdv1p zur Ausbildung von Spiralen befähigt sind (Ingerman *et al.*, 2005). Welche Rolle Mdv1p tatsächlich im Teilungsapparat spielt, müssen weitere Versuche zeigen.

6.8 Unterschiedliche Morphologien der Mitochondrien-Netze deuten auf eine Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett

Ein bisher noch nicht diskutierter Aspekt ist die unterschiedliche Morphologie der einzelnen mitochondrialen Netz-Phänotypen. So konnte gezeigt werden, dass in $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ -Zellen die Fischernetze zu einer Seite kollabierten, wohingegen $\Delta mdv1$ -Zellen flächig ausgebreitete Netze aufwiesen (Cervený *et al.*, 2001; Griffin *et al.*, 2005). Beide Gruppen beobachteten unterschiedliche Mitochondrien-Phänotypen in $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ -Doppelmutanten. So zeigte Griffin, dass sich der Phänotyp von $\Delta dnm1$ -Netzen epistatisch zu $\Delta mdv1$ verhalte, da $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ -Doppelmutanten ebenfalls kollabierte Mitochondrien-Netzwerke zeigten (Griffin *et al.*, 2005), während Cervený $\Delta mdv1$ als epistatisch gegenüber $\Delta dnm1$ beschrieb (Cervený *et al.*, 2001). Doppelmutanten von $\Delta mdv1/\Delta caf4$ zeigten interessanterweise denselben Phänotyp wie $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ -Zellen, obwohl Einzeldelationen von *MDV1* und *CAF4* für sich genommen diesen Phänotyp nicht aufweist (Griffin *et al.*, 2005). Die Autoren erklären diese Ergebnisse durch partielle Teilungsaktivitäten in Δmdv -Zellen, die durch die gleichzeitige Deletion beider Adaptoren Mdv1p und Caf4p zum Erliegen kommt und die Netzwerke somit vollständig kollabieren. Dabei kann durch diese Argumentation

der Phänotyp von $\Delta fis1$ -Zellen nicht begründet werden, der ebenfalls restliche Teilungsaktivitäten aufweist (Jakobs *et al.*, 2003).

In Verbindung mit den neuen Erkenntnissen dieser Arbeit lassen sich die Daten in einer anderen Weise interpretieren. Wenn der Komplex bestehend aus den Teilungsproteinen Dnm1p/Fis1p/Caf4p an der Anheftung der Mitochondrien am Aktinzytoskelett oder anderen Komponenten des Zellkortex beteiligt ist, wird der Phänotyp der ausgebreiteten, aufgehängten Netzwerke durch die Deletion von Mdv1p nicht gestört. Sobald jedoch eines der an der Aufhängung beteiligten Proteine entfällt, können die Mitochondrien diese Verbindung nach außen nicht mehr aufrechterhalten und das Netzwerk kollabiert zur Seite. Gegen dieses Modell sprechen wiederum Versuche, die nach einer Latrunculin A-Behandlung der $\Delta mdv1$ -Zellen keine Auswirkungen auf die Mitochondrien-Netze sehen, während die kollabierten Mitochondrien in $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ -Zellen nach der Zerstörung des Aktin-Skeletts ausgebreitete Netzwerke aufwiesen (Cervený *et al.*, 2001). Dazu vergleichbar wurden in Säugerzellen mit kollabierten Mitochondrienetzen (Überexpression von dominant-negativem Drp1) diese durch die Behandlung mit dem Mikrotubuli-depolymerisierenden Reagenz Nocodazol ebenfalls in ausgebreitete Netzwerke überführt (Smirnova *et al.*, 2001).

Insgesamt sind die Ergebnisse der verschiedenen Veröffentlichungen in Bezug auf die Behandlung mit Latrunculin A jedoch sehr widersprüchlich. So wurde berichtet, dass bereits nach wenigen Minuten die Mitochondrien nach einer Behandlung mit Latrunculin A fragmentieren (Boldogh *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2000), während andere Gruppen von einer stabilen Mitochondrien-Morphologie über einen Zeitraum von mehr als 40 Minuten sprechen (diese Arbeit, Meeusen und Nunnari, 2003). Eine Untersuchung in Säugerzellen ergab, dass F-Aktin nicht für die Aufrechterhaltung der Mitochondrien-Struktur verantwortlich ist, obwohl Drp1 in Abhängigkeit des Aktin-Zytoskeletts zu den Mitochondrien rekrutiert wird (De Vos *et al.*, 2005). In Säugern könnte allerdings die Struktur der Mitochondrien durch das Mikrotubuli-Gerüst aufrechterhalten werden, während Aktin unabhängig davon am Transport verschiedener Mitochondrien-Proteine beteiligt sein könnte. Für Hefe entfällt dagegen eine stabilisierende Rolle der Mitochondrien durch Mikrotubuli, da sie nicht mit dieser Komponente des Zytoskeletts kolokalisieren.

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurde ein erweitertes Modell der mitochondrialen Teilung aufgestellt (Abb. 54). Nach dieser Vorstellung rekrutiert Fis1p die Dynamin-verwandte GTPase Dnm1p unter Beteiligung des Adaptorproteins Caf4p zu den Mitochondrien. Mdv1p spielt in diesem Schritt nur eine untergeordnete Rolle. Die drei Teilungsproteine Dnm1p, Fis1p und Caf4p bilden zusammen einen Komplex und interagieren mit Komponenten des Aktin-Zytoskeletts oder anderen Komponenten des Zellkortex. Die Bindeglieder sind bisher noch nicht identifiziert. Mdv1p ist an der Ausbildung von Matrix-Konstriktionen mit anderen Proteinen und möglicherweise

unter Einbeziehung des Zytoskeletts beteiligt. Treten diese Matrix-Konstriktionen in der Nähe von Dnm1p-Clustern auf, können diese an Aktin entlang zu den Orten der Einschnürung transportiert werden. Dort bildet Dnm1p eine Spirale um den Strang aus und schnürt ihn in Abhängigkeit vom GTP-Status des Proteins durch.

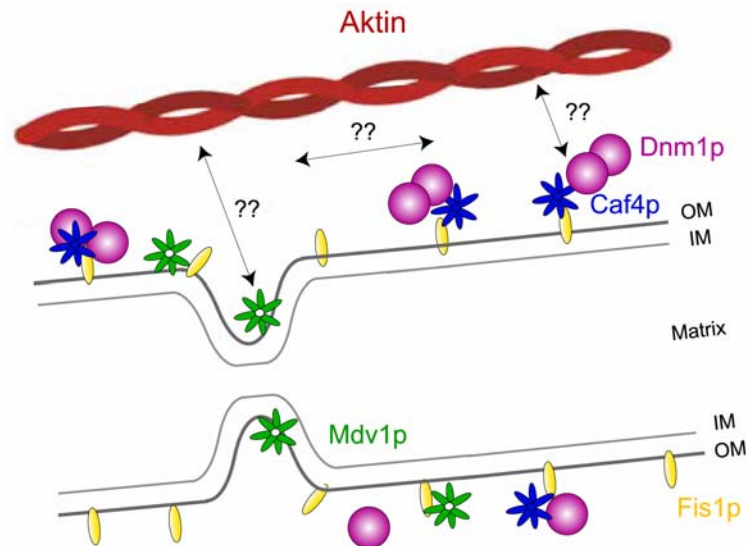


Abb. 54: Erweitertes Modell des mitochondrialen Teilungsapparates in Hefe.

6.9 Ausblick

Die in dieser Arbeit zum ersten mal beschriebene Polarität der Dnm1p-Cluster und ihre postulierte Aufgabe in einer Interaktion mit dem Zytoskelett der Zelle lässt die Komplexität der Funktion dieser Dynamamin-verwandten GTPase erkennen. Dabei bleiben viele Fragen in zukünftigen Experimenten zu klären. Zunächst soll mit Hilfe der Photokonversion von GFP in $\Delta mdv1$ -Zellen das Auftreten von Matrix-Konstriktionen untersucht werden, um Mdv1p als mögliche Ursache für diese mitochondrialen Einschnürungen zu belegen. Durch die optische Markierung einzelner Dnm1p-Cluster (z.B. mit schaltbaren Proteinen oder PA-GFP) könnte der Transport dieser Proteine entlang der Mitochondrien in Langzeit-Aufnahmen verfolgt werden. Durch die Zugabe von Latrunculin A während dieser Messungen könnten Aussagen über den Einfluss der Aktinfasern auf den Transport der Cluster gewonnen werden. Das Auffinden von weiteren möglichen Interaktionspartnern zwischen den Mitochondrien und dem Zytoskelett wäre ein wichtiger Schritt im Verständnis der Morphologie, aber auch die Untersuchung bereits vorhandener Kandidaten wie Arp2/3p und Myo2 auf eine

Interaktion mit Dnm1p durch Kollokalisationsexperimente wäre sinnvoll. Ein bereits erwähntes Ziel ist die Auflösung der Dnm1p-Spiralen mit Hilfe des STED-Mikroskops. Dabei soll durch die Behandlung der Zellen mit geringen Konzentrationen Apoptose-induzierender Substanzen die Wahrscheinlichkeit für eine Ausbildung der Spiralen erhöht werden. Bisher sind die Regulationsmechanismen der mitochondrialen Teilung als Antwort auf intra- und extrazelluläre Signale wenig charakterisiert. In Säugerzellen wurden bereits drei unterschiedliche Mechanismen postuliert. So konnte für Drp1 eine Regulation durch Sumoylierung, einer dem Ubiquitin verwandten Modifizierung von Proteinen, gezeigt werden (Harder *et al.*, 2004). Eine Rolle in der Rekrutierung von Drp1 zu den Mitochondrien wurde in Säugerzellen sowohl für Mikrotubuli als auch Aktin gezeigt (Varadi *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 2005). Weiterhin deutet die Kollokalisierung von Drp1 und Bax auf eine Regulation der Mitochondrien-Morphologie durch Apoptose-Faktoren hin (Karbowski *et al.*, 2004). Ob diese Mechanismen auch in anderen Eukaryonten konserviert sind, könnte durch weitere Experimente in Hefe untersucht werden. Aufgrund des Einflusses der mitochondrialen Struktur auf eine Reihe von wichtigen zellulären Prozessen (z.B. Energiehaushalt, Ionenhomöostase und Apoptose) ist eine komplexe Regulierung dieser Morphologie-Änderungen über verschiedene Wege wahrscheinlich.

7 Literatur

- Alexander, C., M. Votruba, *et al.* (2000). "OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28." Nat Genet **26**(2): 211.
- Altmann, K. and B. Westermann (2005). "Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Biol. Cell **16**(11): 5410-5417.
- Bakeeva, L. E., S. Chentsov Yu, *et al.* (1978). "Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle." Biochim Biophys Acta **501**(3): 349-69.
- Benda, C. (1902). "Die Mitochondria." Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte **12**: 743-781.
- Bereiter-Hahn, J. and M. Voth (1994). "Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria." Microsc Res Tech **27**(3): 198-219.
- Berger, K. H., L. F. Sogo, *et al.* (1997). "Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast." J Cell Biol **136**(3): 545-53.
- Bernardi, P., V. Petronilli, *et al.* (2001). "A mitochondrial perspective on cell death." Trends Biochem Sci **26**(2): 112-7.
- Bernardi, P., L. Scorrano, *et al.* (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem **264**(3): 687-701.
- Bevis, B. J. and B. S. Glick (2002). "Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)." Nat Biotechnol **20**(1): 83-7.
- Bewersdorf, J. (2002). "4Pi-konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit 1-Photonen-Anregung." Dissertation, Universität Heidelberg.
- Bleazard, W., J. M. McCaffery, *et al.* (1999). "The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast." Nat Cell Biol **1**(5): 298-304.
- Boldogh, I. R., H.-C. Yang, *et al.* (2001). "Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast." PNAS **98**(6): 3162-3167.
- Bossy-Wetzel, E., M. J. Barsoum, *et al.* (2003). "Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging." Current Opinion in Cell Biology **15**(6): 706.
- Botstein, D., S. A. Chervitz, *et al.* (1997). "Yeast as a model organism." Science **277**(5330): 1259-60.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brady, S. (1991). "Molecular motors in the nervous system." Neuron **7**(4): 521-33.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, *et al.* (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(4): C817-833.

- Burgess, S. M., M. Delannoy, *et al.* (1994). "MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria." J Cell Biol **126**(6): 1375-91.
- Carelli, V., M. Rugolo, *et al.* (2004). "Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1658**(1-2): 172.
- Cervený, K. L. and R. E. Jensen (2003). "The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria." Mol Biol Cell **14**(10): 4126-39.
- Cervený, K. L., J. M. McCaffery, *et al.* (2001). "Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p." Mol Biol Cell **12**(2): 309-21.
- Charpilienne, A., M. Nejmeddine, *et al.* (2001). "Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells." J Biol Chem **276**(31): 29361-7.
- Chen, Y.-J., P. Zhang, *et al.* (2004). "The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes." Nat Struct Mol Biol **v11**(n6): 574.
- Cortopassi, G. A. and A. Wong (1999). "Mitochondria in organismal aging and degeneration." Biochim Biophys Acta **1410**(2): 183-93.
- Croteau, D. L., R. H. Stierum, *et al.* (1999). "Mitochondrial DNA repair pathways." Mutat Res **434**(3): 137-48.
- Daum, G., P. C. Bohni, *et al.* (1982). "Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria." J. Biol. Chem. **257**(21): 13028-13033.
- De Camilli, P., K. Takei, *et al.* (1995). "The function of dynamin in endocytosis." Curr Opin Neurobiol **5**(5): 559-65.
- De Vos, K. J., V. J. Allan, *et al.* (2005). "Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission." Current Biology **15**(7): 678.
- Delettre, C., G. Lenaers, *et al.* (2000). "Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy." Nat Genet **26**(2): 207.
- Drubin, D. G., H. D. Jones, *et al.* (1993). "Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site." Mol Biol Cell **4**(12): 1277-94.
- Dundr, M., J. G. McNally, *et al.* (2002). "Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells." J Struct Biol **140**(1-3): 92-9.
- Egner, A., S. Jakobs, *et al.* (2002). "Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast." PNAS **99**(6): 3370-3375.
- Elowitz, M. B., M. G. Surette, *et al.* (1997). "Photoactivation turns green fluorescent protein red." Current Biology **7**(10): 809.
- Elowitz, M. B., M. G. Surette, *et al.* (1999). "Protein mobility in the cytoplasm of Escherichia coli." J Bacteriol **181**(1): 197-203.

- Fannjiang, Y., W. C. Cheng, *et al.* (2004). "Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast." Genes Dev **18**(22): 2785-97.
- Fehrenbacher, K. L., I. R. Boldogh, *et al.* (2005). "A role for Jsn1p in recruiting the Arp2/3 complex to mitochondria in budding yeast." Mol. Biol. Cell **16**(11): 5094-5102.
- Fekkes, P., K. A. Shepard, *et al.* (2000). "Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules." J. Cell Biol. **151**(2): 333-340.
- Fisk, H. A. and M. P. Yaffe (1997). "Mutational analysis of Mdm1p function in nuclear and mitochondrial inheritance." J. Cell Biol. **138**(3): 485-494.
- Frank, S., B. Gaume, *et al.* (2001). "The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis." Developmental Cell **1**(4): 515.
- Frey, T. G. and C. A. Mannella (2000). "The internal structure of mitochondria." Trends Biochem Sci **25**(7): 319-24.
- Fukushima, N. H., E. Brisch, *et al.* (2001). "The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission." Mol Biol Cell **12**(9): 2756-66.
- Gammie, A. E., L. J. Kurihara, *et al.* (1995). "DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast." J Cell Biol **130**(3): 553-66.
- Goodson, H. V., B. L. Anderson, *et al.* (1996). "Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton." J Cell Biol **133**(6): 1277-91.
- Gray, M., Burger, G., Lang, BF. (1999). "Mitochondrial Evolution." Science **283**(5407): 1476-1481.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death." Science **305**(5684): 626-629.
- Gugel, H., J. Bewersdorf, *et al.* (2004). "Cooperative 4Pi Excitation and Detection Yields Sevenfold Sharper Optical Sections in Live-Cell Microscopy." Biophys. J. **87**(6): 4146-4152.
- Guldener, U., S. Heck, *et al.* (1996). "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." Nucl. Acids Res. **24**(13): 2519-2524.
- Hales, K. G. and M. T. Fuller (1997). "Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase." Cell **90**(1): 121-9.
- Harder, Z., R. Zunino, *et al.* (2004). "Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission." Curr Biol **14**(4): 340-5.
- Hell, S.W. (2003). "Towards fluorescence nanoscopy." Nat Biotechnol **21**(11): 1347-1355.
- Hell, S.W, Stelzer, E.H.K. (1992). "Properties of a 4Pi-confocal fluorescence microscope." J. Opt. Soc. Am. A **9**: 2159-2166.
- Hell, S.W., Wichmann, (1994). "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission." Opt. Lett. **19**(11): 780-782.
- Hell, S. W. (2003). "Toward fluorescence nanoscopy." Nat Biotech **21**(11): 1347.

- Herlan, M., F. Vogel, *et al.* (2003). "Processing of Mgm1 by the Rhomboid-type Protease Pcp1 Is Required for Maintenance of Mitochondrial Morphology and of Mitochondrial DNA." J. Biol. Chem. **278**(30): 27781-27788.
- Hermann, G. J. and J. M. Shaw (1998). "Mitochondrial dynamics in yeast." Annual Review of Cell and Developmental Biology **14**(1): 265-303.
- Hinshaw, J. E. (2000). "Dynamin and its role in membrane fission." Annual Review of Cell and Developmental Biology **16**(1): 483-519.
- Hirschberg, K., C. M. Miller, *et al.* (1998). "Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells." J Cell Biol **143**(6): 1485-503.
- Hobbs, A. E., M. Srinivasan, *et al.* (2001). "Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability." J Cell Biol **152**(2): 401-10.
- Hoffmann, H. P. and C. J. Avers (1973). "Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell." Science **181**(101): 749-51.
- Hollenbeck, P. J. (1996). "The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons." Front Biosci **1**: d91-102.
- Huffaker, T. C., M. A. Hoyt, *et al.* (1987). "Genetic Analysis of the Yeast Cytoskeleton." Annual Review of Genetics **21**(1): 259-284.
- Ingerman, E., E. M. Perkins, *et al.* (2005). "Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria." J Cell Biol **170**(7): 1021-7.
- Jacobs, C. W., A. E. Adams, *et al.* (1988). "Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." J. Cell Biol. **107**(4): 1409-1426.
- Jacobson, M., Weil, M., Raff, MC. (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Jakobs, S., N. Martini, A.C. Schauss *et al.* (2003). "Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p." J Cell Sci **116**(Pt 10): 2005-14.
- Jakobs, S., A. C. Schauss, *et al.* (2003). "Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen." FEBS Lett **554**(1-2): 194-200.
- Jensen, R. E., A. E. Hobbs, *et al.* (2000). "Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape." Microsc Res Tech **51**(6): 573-83.
- Karbowski, M., S. Y. Jeong, *et al.* (2004). "Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology." J Cell Biol **166**(7): 1027-39.
- Karbowski, M., J. H. Spodnik, *et al.* (2001). "Opposite effects of microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs on biogenesis of mitochondria in mammalian cells." J Cell Sci **114**(Pt 2): 281-91.
- Kaufmann, S. H. and W. C. Earnshaw (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." Exp Cell Res **256**(1): 42-9.
- Kerr, J. F. (1971). "Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death." J Pathol **105**(1): 13-20.

- Khodjakov, A., E. M. Lizunova, *et al.* (1998). "A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells." Mol Biol Cell **9**(2): 333-43.
- Klar, T. A., S. Jakobs, *et al.* (2000). "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission." PNAS **97**(15): 8206-8210.
- Klockow, B., W. Tichelaar, *et al.* (2002). "The dynamin A ring complex: molecular organization and nucleotide-dependent conformational changes." EMBO J. **21**(3): 240-250.
- Knop, M., K. Siegers, *et al.* (1999). "Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines." Yeast **15**(10B): 963-72.
- Koch, A., Y. Yoon, *et al.* (2005). "A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells." Mol. Biol. Cell **16**(11): 5077-5086.
- Kong, D., L. Xu, *et al.* (2005). "Regulation of Ca²⁺-induced permeability transition by Bcl-2 is antagonized by Drp1 and hFis1." Molecular and Cellular Biochemistry **272**(1 - 2): 187.
- Labrousse, A. M., M. D. Zappaterra, *et al.* (1999). "*C. elegans* Dynamin-Related Protein DRP-1 Controls Severing of the Mitochondrial Outer Membrane." Molecular Cell **4**(5): 815.
- Lee, Y.-j., S.-Y. Jeong, *et al.* (2004). "Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opal in Apoptosis." Mol. Biol. Cell **15**(11): 5001-5011.
- Legesse-Miller, A., R. H. Massol, *et al.* (2003). "Constriction and Dnm1p Recruitment Are Distinct Processes in Mitochondrial Fission." Mol. Biol. Cell **14**(5): 1953-1963.
- Liu, H.-Y., Y.-C. Chiang, *et al.* (2001). "Characterization of CAF4 and CAF16 Reveals a Functional Connection between the CCR4-NOT Complex and a Subset of SRB Proteins of the RNA Polymerase II Holoenzyme." J. Biol. Chem. **276**(10): 7541-7548.
- Lukyanov, K. A., D. M. Chudakov, *et al.* (2005). "Photoactivatable fluorescent proteins." Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**(11): 885.
- Luo, X., I. Budihardjo, *et al.* (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-90.
- Margulis, L. (1970). "Recombination of non-chromosomal genes in *Chlamydomonas*: assortment of mitochondria and chloroplasts." J Theor Biol. **26**(2): 337-42.
- McQuibban, G. A., S. Saurya, *et al.* (2003). "Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease." Nature **423**(6939): 537.
- Meeusen, S., J. M. McCaffery, *et al.* (2004). "Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*." Science **305**(5691): 1747-1752.
- Meeusen, S. and J. Nunnari (2003). "Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome." J. Cell Biol. **163**(3): 503-510.
- Meeusen, S. L. and J. Nunnari (2005). "How mitochondria fuse." Current Opinion in Cell Biology **17**(4): 389.
- Messerschmitt, M., S. Jakobs, *et al.* (2003). "The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast." J Cell Biol **160**(4): 553-64.

- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemi-osmotic type of mechanism." Nature **8**(191): 144-8.
- Mozdy, A. D., J. M. McCaffery, *et al.* (2000). "Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p." J. Cell Biol. **151**(2): 367-380.
- Mullis, K., F. Faloona, *et al.* (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." Biotechnology **24**: 17-27.
- Nakada, K., K. Inoue, *et al.* (2001). "Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA." Nat Med **7**(8): 934-40.
- Nangaku, M., R. Sato-Yoshitake, *et al.* (1994). "KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria." Cell **79**(7): 1209-20.
- Naylor, K., E. Ingerman, *et al.* (2005). "MDV1 interacts with assembled DNMI to promote mitochondrial division." J. Biol. Chem.: M507943200.
- Neupert, W. (1997). "Protein import into mitochondria." Annu Rev Biochem **66**: 863-917.
- Nunnari, J., W. F. Marshall, *et al.* (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): 1233-42.
- Nunnari, J., E. D. Wong, *et al.* (2002). "Studying the behavior of mitochondria." Methods Enzymol **351**: 381-93.
- Offen, D., H. Elkon, *et al.* (2000). "Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases." J Neural Transm Suppl(58): 153-66.
- Okamoto, K. and J. M. Shaw (2005). "Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes." Annual Review of Genetics **39**(1): 503-536.
- Olichon, A., L. Baricault, *et al.* (2003). "Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis." J. Biol. Chem. **278**(10): 7743-7746.
- Ono, T., K. Isobe, *et al.* (2001). "Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria." Nat Genet **28**(3): 272.
- Otsuga, D., B. R. Keegan, *et al.* (1998). "The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast." J. Cell Biol. **143**(2): 333-349.
- Palade, G. (1952). "The fine structure of mitochondria." Anat Rec. **114**(3): 427-51.
- Partikian, A., B. Olveczky, *et al.* (1998). "Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix." J. Cell Biol. **140**(4): 821-829.
- Patterson, G. H. and J. Lippincott-Schwartz (2002). "A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells." Science **297**(5588): 1873-1877.
- Pelloquin, L., P. Belenguer, *et al.* (1998). "Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance." Biochemical and Biophysical Research Communications **251**(3): 720.

- Pelloquin, L., P. Belenguer, *et al.* (1999). "Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin-related protein." J Cell Sci **112**(22): 4151-4161.
- Pereira, A. J., B. Dalby, *et al.* (1997). "Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*." J Cell Biol **136**(5): 1081-90.
- Perfettini, J.-L., T. Roumier, *et al.* (2005). "Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis." Trends in Cell Biology **15**(4): 179.
- Pesavento, J. B., A. M. Billingsley, *et al.* (2003). "Structures of foot-and-mouth disease virus demonstrate correlation of altered conformation of the VP4 spike and expression of unexpected VP4-associated phenotypes." J. Virol. **77**(5): 3291-3296.
- Pitts, K. R., M. A. McNiven, *et al.* (2004). "Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains." J. Biol. Chem. **279**(48): 50286-50294.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." Nat Rev Drug Discov **1**(2): 111-21.
- Reichert, A. S. and W. Neupert (2002). "Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria—role in protein transport." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1592**(1): 41.
- Rosen, A. and L. Casciola-Rosen (1999). "Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease." Cell Death Differ **6**(1): 6-12.
- Santel, A. and M. T. Fuller (2001). "Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin." J Cell Sci **114**(Pt 5): 867-74.
- Sawin, K. E. and P. Nurse (1997). "Photoactivation of green fluorescent protein." Current Biology **7**(10): R603.
- Sawyer, D., Van Houten, B. (1999). "Repair of DNA damage in mitochondria." Mutat Res. **434**(3): 161-76.
- Scaffidi, C., S. Fulda, *et al.* (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.
- Schatz, G. and B. Dobberstein (1996). "Common principles of protein translocation across membranes." Science **271**(5255): 1519-26.
- Scheffler, I. E. (2001). "Mitochondria make a come back." Adv Drug Deliv Rev **49**(1-2): 3-26.
- Scorrano, L. (2005). "Proteins that fuse and fragment mitochondria in apoptosis: confining a deadly con-fusion?" Journal of Bioenergetics and Biomembranes **37**(3): 165.
- Sesaki, H. and R. E. Jensen (1999). "Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape." J Cell Biol **147**(4): 699-706.
- Sesaki, H. and R. E. Jensen (2001). "UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion." J. Cell Biol. **152**(6): 1123-1134.
- Sesaki, H., S. M. Southard, *et al.* (2003). "Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane." Mol. Biol. Cell **14**(6): 2342-2356.

- Sever, S., H. Damke, *et al.* (2000). "Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis." J Cell Biol **150**(5): 1137-48.
- Shaw, J. M. and J. Nunnari (2002). "Mitochondrial dynamics and division in budding yeast." Trends in Cell Biology **12**(4): 178.
- Shub, D. A. (1994). "Bacterial viruses. Bacterial altruism?" Curr Biol **4**(6): 555-6.
- Simon, V. R. and L. A. Pon (1996). "Actin-based organelle movement." Experientia **52**(12): 1117-22.
- Simon, V. R., T. C. Swayne, *et al.* (1995). "Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface." J Cell Biol **130**(2): 345-54.
- Sjostrand, F. (1953). "Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes." Nature **171**(4340): 30-32.
- Skulachev, V. P. (1990). "Power transmission along biological membranes." J Membr Biol **114**(2): 97-112.
- Smirnova, E., L. Griparic, *et al.* (2001). "Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells." Mol. Biol. Cell **12**(8): 2245-2256.
- Sogo, L. F. and M. P. Yaffe (1994). "Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane." J Cell Biol **126**(6): 1361-73.
- Sugioka, R., S. Shimizu, *et al.* (2004). "Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis." J. Biol. Chem. **279**(50): 52726-52734.
- Suzuki, M., A. Neutzner, *et al.* (2005). "Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission." J Biol Chem **280**(22): 21444-52.
- Sweitzer, S. M. and J. E. Hinshaw (1998). "Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation." Cell **93**(6): 1021-9.
- Takei, K., P. S. McPherson, *et al.* (1995). "Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-[gamma]S in nerve terminals." Nature **374**(6518): 186.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Tieu, Q. and J. Nunnari (2000). "Mdv1p Is a WD Repeat Protein that Interacts with the Dynamin-related GTPase, Dnm1p, to Trigger Mitochondrial Division." J. Cell Biol. **151**(2): 353-366.
- Tieu, Q., V. Okreglak, *et al.* (2002). "The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission." J. Cell Biol. **158**(3): 445-452.
- van der Blik, A. M. (1999). "Functional diversity in the dynamin family." Trends in Cell Biology **9**(3): 96.
- Varadi, A., L. I. Johnson-Cadwell, *et al.* (2004). "Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1." J Cell Sci **117**(19): 4389-4400.

- Wach, A., A. Brachat, *et al.* (1997). "Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **13**(11): 1065-75.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes Dev **15**(22): 2922-33.
- Westermann, B. and W. Neupert (2000). "Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **16**(15): 1421-7.
- Westphal, V. and S. W. Hell (2005). "Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope." Phys Rev Lett **94**(14): 143903.
- Willig, K. (2006). "STED microscopy in the visible range." Dissertation, Universität Heidelberg.
- Yaffe, M. P. (1999). "The machinery of mitochondrial inheritance and behavior." Science **283**(5407): 1493-1497.
- Yoon, Y. and M. A. McNiven (2001). "Mitochondrial division: New partners in membrane pinching." Current Biology **11**(2): R67.
- Yoon, Y., K. R. Pitts, *et al.* (2001). "Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes." Mol. Biol. Cell **12**(9): 2894-2905.
- Youle, R. J. and M. Karbowski (2005). "Mitochondrial fission in apoptosis." Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**(8): 622.
- Yu, T., R. J. Fox, *et al.* (2005). "Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1." J Cell Sci **118**(18): 4141-4151.
- Zhang, P. and J. E. Hinshaw (2001). "Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state." Nat Cell Biol **3**(10): 922.
- Zuchner, S., I. V. Mersiyanova, *et al.* (2004). "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A." Nat Genet **36**(5): 449.

8 Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxidisulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DsRed	<i>Disosoma spec.</i> Red
GFP	Green Fluorescent Protein
kb	Kilobase
LB	Luria Bertani
min	Minute
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecylsulfat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
Δ	Deletion
λ	Wellenlänge
μm	Mikrometer
STED	Stimulierte Emission

9 Eigene Veröffentlichungen

Schauss, A.C.; Bewersdorf J. and Jakobs, S (eingereicht in JCS). „Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface”

Jakobs, S., N. Martini, A.C. Schauss *et al.* (2003). "Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p." J Cell Sci **116**(Pt 10): 2005-14.

Jakobs, S., A. C. Schauss, *et al.* (2003). "Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen." FEBS Lett **554**(1-2): 194-200.

10 Lebenslauf

Name: *Astrid Claudia Schauß*
Wohnort: Zum Westergrund 35
35580 Wetzlar
Geburtsdatum: 10.12.1976
Geburtsort: Wetzlar
Familienstand: ledig
Staatsbürger: deutsch

Schulbildung und Studium

Juli 2002 – Frühjahr 2006	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abteilung NanoBiophotonik, Göttingen Dnm1p „Charakterisierung des mitochondrialen Teilungsproteins mittels quantitativer hochauflösender Lichtmikroskopie“
April 2002	Diplomprüfung in Biologie (mit Auszeichnung) Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Mai 2001 – April 2002	Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Abteilung für molekulare Infektionsforschung „Molekularbiologische Charakterisierung putativer neuer Targets in Staphylococcus aureus“
1996 – 2002	Studium der Biologie Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Sommer 1996	Abitur (Hauptfächer: Chemie und Mathematik) Gymnasiale Oberstufe Goetheschule Wetzlar

Praktika, Kurse und Qualifikationen

- Cold Spring Harbor Kurs „Immunocytochemistry, In Situ Hybridisation & Live Cell Imaging“, Herbst 2004, USA
- Max-Planck-Institut für Biochemie, Herbst 1999, München (Kristallographie)
- Mitbegründung der Doktoranden-Initiative am MPI und Organisation des Karriere-Seminars

11 Anhang

11.1 Vektorkarten

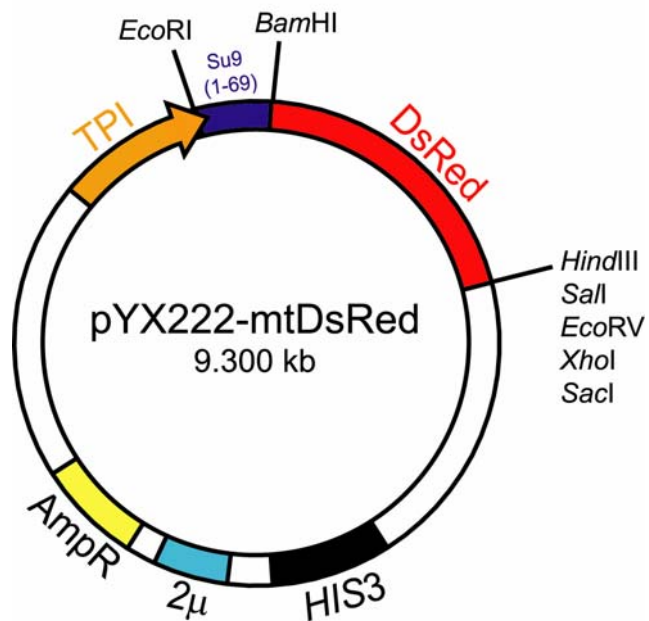


Abb 55: Vektorkarte von pYX22-mtDsRed (Markierung der mitochondrialen Matrix).

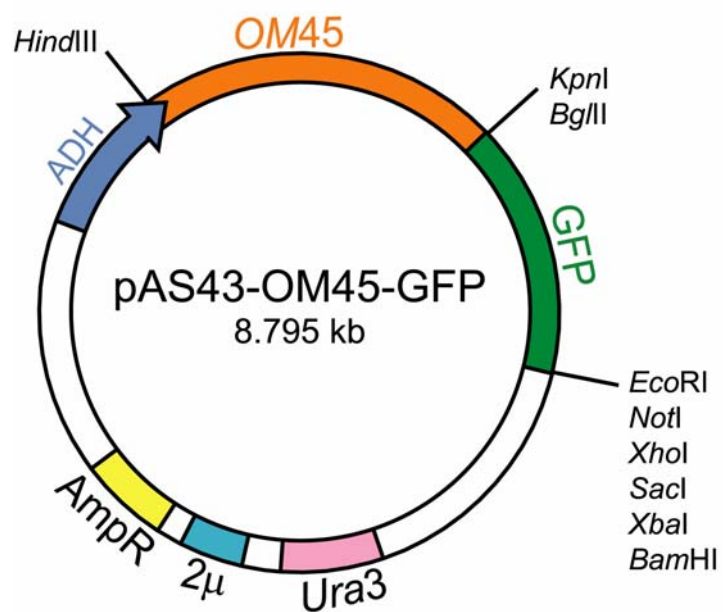


Abb 56: Vektorkarte von pAS43-OM45-GFP (Markierung der äußeren Mitochondrien-Membran).

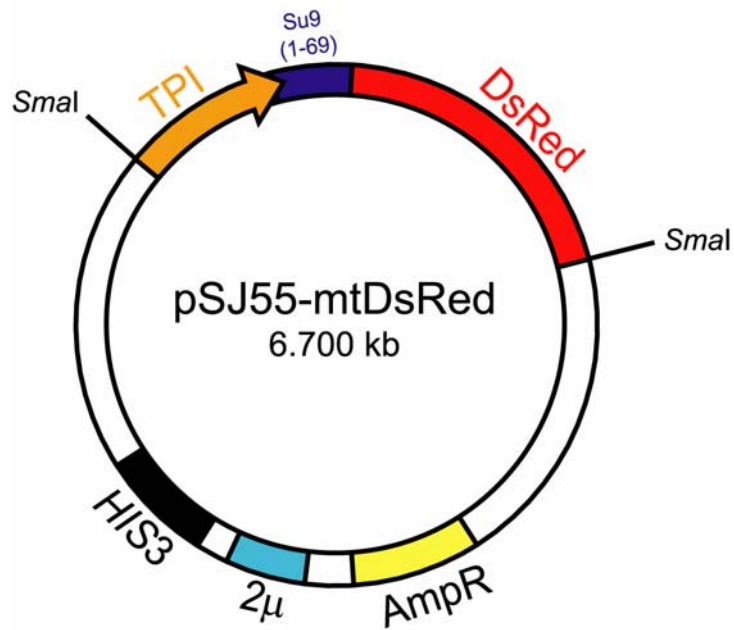


Abb 57: Vektorkarte von pSJ55-mtDsRed (Markierung der mitochondrialen Matrix).

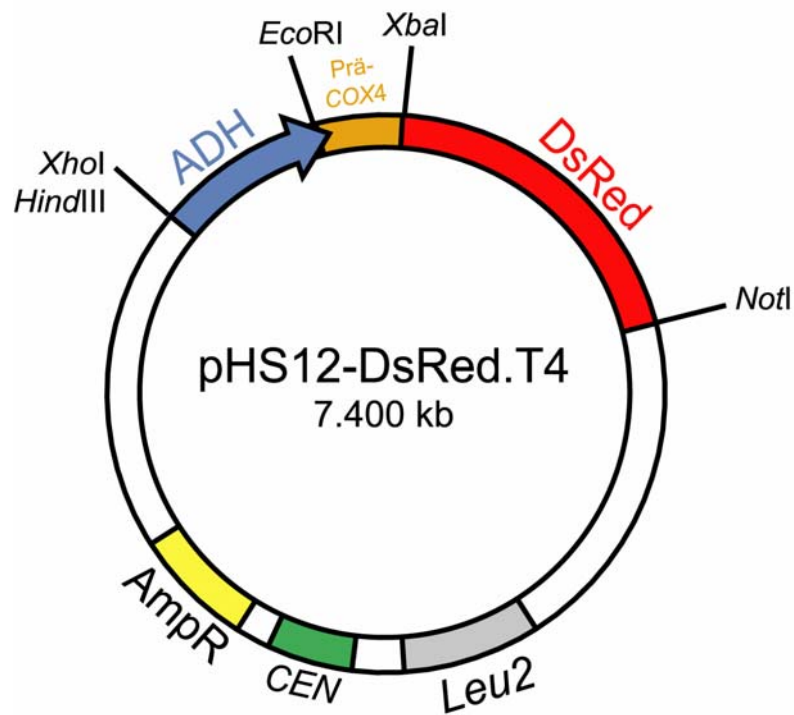


Abb 58: Vektorkarte von pHS12-DsRed.T4 (Markierung der inneren Mitochondrien-Membran).

11.2 Anregungs- und Emissionsspektren

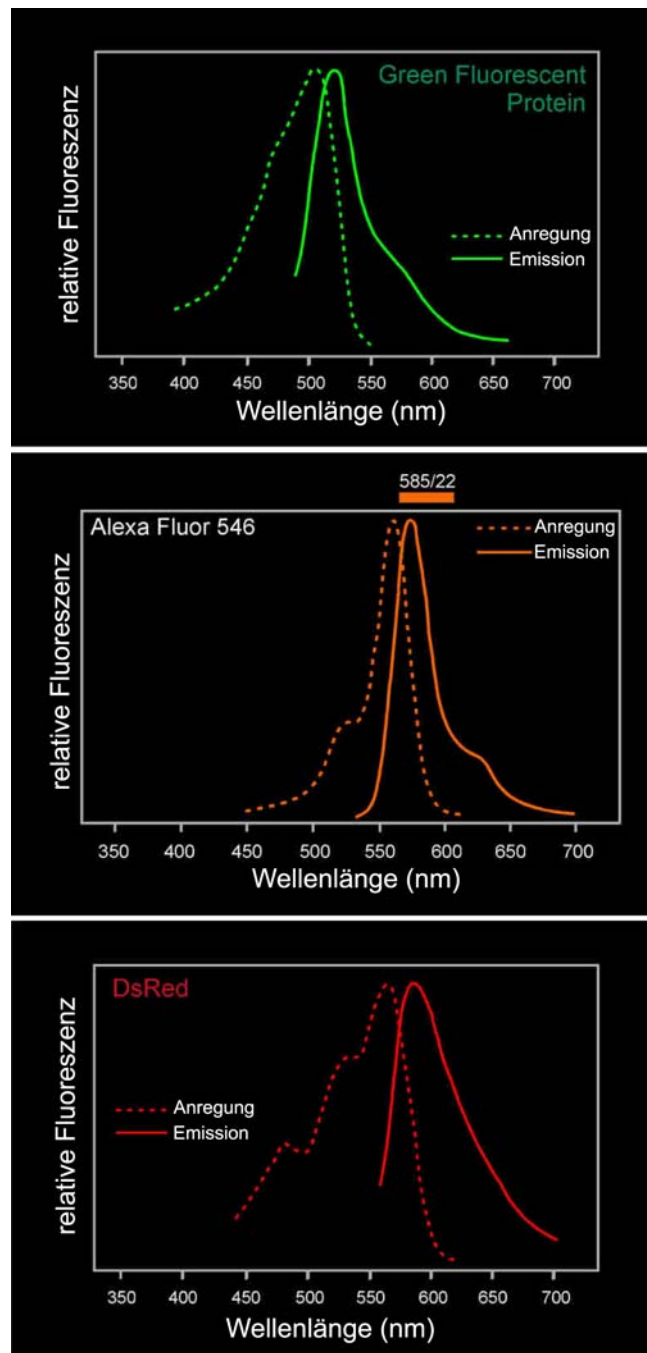


Abb. 59: Anregungs- und Emissionsspektren der in der Arbeit verwendeten Fluorophore GFP, Alexa-546-Phalloidin und DsRed (Quelle: NCI ETI Branch, Flow Cytometry Core Laboratory).

11.3 DNA-Sequenz des Epitop-markierten DNMI

CTTCCCAGATTCTTCAAAAAACAGCAAAAAGCATATACTAAATGGCGAGGAACTAATGAA
 ATGGTGGGGCTTTATTTTGGATAGATTACTAATTGAATGCTTTCAAAATGATACACAAGC
 AAAATTAAGGATACCGGGCGAAGATCCTGCTCGAGTAAGATCATACCTAAGAGGGATGAA
 ATATCCACTATGGCAAGTGGGTGATATATTTACCTCTAAAAGAAAATTTCTCTTGCGGTATA
 TAATATTCCATTATTCCCAGACGATCCTAAGGCTAGATTTATACACCAATTGGCAGAGGA
 AGATCGCCTCCTCAAAGTAAGCTTATCATCCTTCTGGATTGAACTACAAGAGCGTCAAGA
 GTTCAAATTAAGTGTACATCATCTGTAATGGGTATTTCTGGGATACTCTCTTGCCACTCC
 ATCTTTATTTCCATCTAGTGCCGATGTTATTGTACCGAAGTCAAGGAAGCAGTTTAGGGC
 AATCAAGAAGTACATTACTGGAGAGGAATACGATACAGAGGAAGGCGCAATAGAAGCTTT
 CACCAATATTCTGATTTTTCTATTGCTCAGAATGGCAACAAATCTTCAATCTTTAACAGG
 GAAGAGGGAGCATCGGGAGAGAAATCAGCCGGTTCCTGCAAGCAACATCAACACGTTGGC
 GATAACAATGCTAAAACCGCGTAAAAAAGCTAAAGCCTTGCCATAAACTTGATACATATT
 GATATTTATTATTTAGTACACGTATGTAGCATCGATCTTAGAAAATGCATGTTTGTATTT
 ATTGTTAGTACCTTGATCGCCACCTTTCTAGGTAATGATAGGTCCTCAACTTTTACTACG
 CGGTGCACGCCTGTAAGGTCTGGGCAAAACAAAGTGTGGGAACAATAAATAAGAGGGTAGG
 ATGAAATATTACCTTTACTCTACTGCTCAGGTTGGCCACAATTTGCTAAAGAGTTTATCA
 TTAAGTAGCTACCAGCGAATCTAAATACGACGGATAAAGAATGGCTAGTTTAGAAGATCT
 TATTCCTACTGTCAACAAGCTGCAGGATGTTATGTACGACTCCGGGATCGATACACTCGA
 TTTGCCATTTTAGCTGTTGTTGGGTCACAATCCTCCGGGAAATCCTCGATATTGGAAAC
 GTTAGTTGGAAGAGATTTTTTACCTAGGGGTACTGGTATTGTCAACAAGAGACCCTTAGT
 TCTTCAACTTAATAACATATCTCCAAATTTCTCTAATAGAGGAAGATGATAACTCAGT
 TAATCCACATGATGAAGTTACAAAAATATCAGGATTCGAAGCTGGTACGAAGCCCTTGG
 GTATAGGGGCAAGGAAAGAAATCATGCAGATGAGTGGGGGAATTCCTGCATATACCAGG
 AAAACGGTTTTATGATTTTCGACGATATCAAAAGAGAAATCGAAAACGAAACAGCGAGGAT
 AGCCGGTAAGGATAAAGGCATCAGTAAGATTCCGATTAATTTGAAAGTGTTTTCCCTCA
 TGTTTTGAATCTAACGCTAGTAGATTTGCTCTGGGATTACAAAGGTTCTATTGGGGAACA
 ACCACCTGATATTGAAAAGCAAATCAAGAATTTGATCCTAGACTATATAGCCACTCCAAA
 TTGTTTTAATCTTGGCCGTCTCTCCAGCTAACGTTGATCTTGTTAATTTCTGAATCCTTAAA
 GTTGGCCAGAGAGGTAGACCCTCAGGGCAAAAGGACTATTGGTGTCAATTACCAAATFAGA
 TTTGATGGATTCTGGGACTAATGCTCTAGATATCTTGTCTGGAAAAATGTATCCTCTGAA
 ATTGGGGTTTTGTTGGTGTAGTGAATCGCTCGCAACAGGATATTCAATTGAACAAAACCGT
 TGAAGAATCATTGGACAAAGAAGAGGACTATTTTCAGGAAACATCCAGTCTACAGAACTAT
 TTCAACAAAGTGTGGTACGCGTTATTTAGCTAAATTTGCTAAACCAGACATTATTAAGCCA
 CATTAGAGACAAGCTTCCGGATATTAACAAGTTAAATACCCTGATCTCTCAAACCGA
 ACAAGAGCTCGCTAGATACGGTGGCGTAGGAGCTACTACTAATGAAAGCAGAGCTAGCCT
 TGTTCTTCAACTAATGAATAAGTTTTCTACAAACTTCATTTCACTATAGATGGTACATC
 CTCCGACATTAATACGAAGGAACTCTGTGGTGGTGCCCGTATTTATTACATTTACAATAA
 TGTTTTTGGGAATTCCTTGAAGTGCATTGATCCAATTTCTAATTTATCCGTTCTTGATGT
 TAGAACAGCGATTAGAAATTTACTGGTCCCGTCTACATTATTTGTACCTGAGTTGGC
 TTTTGACCTATTGGTTAAACCTCAAATTAACCTTTTACTAGAACCATCTCAACGTTGCGT
 CGAGTTAGTTTACGAGGAGCTGATGAAAATATGCCATAAATGTGGCTCCGCTGAGCTAGC
 TAGATATCCTAAATGAAGAGTATGTTAATAGAAGTTATAAGCGAACTACTTAGAGAAAG
 GTTACAACCTACTCGCTCTTACGTTGAAAGCTTGATTGACATACATCGAGCCTACATCAA
 TACTAATCATCTAATTTTTTAAGTGCAACAGAAGCAATGGATGACATCATGAAAACGCG
 TAGAAAACGGAATCAAGAGTTATTGAAAAGTAAGTTGTCTCAACAGGAGAATGGACAAAC
 CAACGGTATTAATGGTACTTTCATCTATCTTTCGAATATAGATCAAGATTCTGCTAAAAA
 CAGTACTACGATGATGATGGTATCGACGCAGAATCGAAGCAAAACGAAGGACAAAATTTTT
 AAATTATTTCTTTGGCAAGGATAAAAAGGGTCAACCTGTGTTTCGATGCATCAGACAAGAA
 AAGATCCATTGCCGGTGTGGAATATTGAAGATTTTAGAAAATTTACAAATATCAGATTT
 TTCACTGGCGATATAGATGACCTTGAAAACGCTGAACCTCCACTGACCGAGAGAGAAGA
 ATTGGAGTGCGAATTAATTAACGCTCTGATTGTTTCATACTTTGATATTATAAGAGAAAT
 GATTGAAGATCAAGTACCAAAGGCAGTTATGTGTTTACTCGTCAATTATTGTAAGGATTC
 TGTTCAAACAGATTGGTAACCAAACCTTACAAAGAAACACTGTTTGAAGAACTTTTAGT
 TGAGGATCAAACCTTTAGCTCAAGATAGAGAACTATGTGTGAAATCACTCGGAGTTTATAA
 AAAGGCTGCAACCCTTATTAGTAATATTCTGGGTCGACGGATCCCCGGGTTAATTAAC
 AGTAAAGGAGAAGAATTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTGTTGAATTAGATGGTGAT
 GTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAA

1 kb vor
DNMI-Gen

DNMI-Gen

Primer Eptag
Dnm1-up

CTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACTTTGTC
 ACTACTTTTCACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCAT
 GACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTCAA
 GATGACGGGAACACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAAT
 AGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGACACAAATG
 GAATACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
 AAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCAT
 TATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTG
 TCCACACAATCTGCCCTTTTGGAAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTT
 GAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAGGGCGCG
 CCACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAATAAGTTATAA
 AAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTTAAAACGAAAATTTCTAT
 TCTTGAGTAACCTTTCTCTGTAGGTGAGTCTGCTTTCTCAGGTATAGTATGAGGTGCTC
 TTATTGACCACACCTTACCAGGAGATCCGCTAGGGATAACAGGGTAATATAGATCTGTT
 TAGCTTGCCTCGTCCCGCCGGGTACCCCGCCAGCGACATGGAGGCCAGAAATACCTC
 CTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTGCGCCGTACATTTAG
 CCCATACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGTATGGCCGCACGGCGCGA
 AGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCTCACAGAC
 GCGTTGAATTGTCCCGCCGCGCCCTGTAGAGAAATATAAAAAGGTTAGGATTTGCCA
 CTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCTTTTAAATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATC
 ACATCCGAACATAAACAACC**ATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTCGAGGCCGCGATTAA**
ATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAAT
CAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTCTGAAAC
ATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGA
CGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTA**CTCTGATGATGCATGGT**
TACTCACCCTGCGATCCCGGCAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATT
CAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCTCTG
TTTGTAAATTGTCCTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCTGCTCAGGCGCAATCACGAA
TGAATAACGGTTGGTTGATGCGAGTATTTTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTG
AACAAGTCTGAAAAGAAATGCATAAGCTTTTGGCATTCTCACCGGATT**CAGTCGTCAC**
ATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTA**TTTTT**GACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTG
 ATGTTGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAATGCC
 TCGGTGAGTTTTCTCCTTACATTACAGAAACGGCTTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATC
 CTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGTACTGA
 CAATAAAAAGATTCTTGTTTTCAAGAACTTGTCAATTTGTATAGTTTTTTTTTATATTGTAGT
 TGTTCTATTTTAAATCAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTTTTCGCCTCGACATCATCTG
 CCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCT
 GGTGCTATACTGCTGTCGATTGATACTAACGCCCATCCAGTTTAAAC**GAGCTCGAA**
TTCATCGATGCTCTCCTCTCCATTCTTTTTCTTGTTAATAAAAAATCCATAACTAAATAA
 ATAACAAATATTAGCAATCGCAAAAGTATTAACCTAAGCTAGAGAACCTTCACTAGAGAAG
 CTCTACCTAAAGGTATAGAACAGGAAAAAGTGTTTTTATTTTGGCGGACTTCGTGGAAGA
 TTGCCTTCCATCAATAATAAGCGTAGTCCATAGGTACGATCATTTTCTTTTTAACCGTTA
 AGCAAGCGACAAGATGTATTTTTGTTTTACCAGCGAATGCTCTTATTTATCTTCTGCGCCTT
 TCCAATAATCTAATTATCAATGCTACGAATGATTATAGTTTTTAACTAGATGAACGAAAT
 TCTAGGTTATTAAGAGTACGTTATGCATCAAAAAGAAATATCAGTCATAATAAGCAGATAG
 ACCTTCTACATGGTTTGTAGACAACCAAACTGGTGTATGCTAATATCAACGAGTAAACGC
 TTACTTTTCTAAAGTTGAATATTTGAAGTACACACCCGCGTAAAGAGTTTTTACCCGAA
 AACAATTTTTTATGCTTGAAAAATAGCTAATAAAAATGTTTTTATTGTTTCGGATAACAAAT
 ACAATAGTGTATTATAAAAAATAAACTTATTTAAAAATAGTAATTTAAATTAATTTTA
 TTTTAATAAACTTTTTAATAATATTTATTACAGTGAATTAATATATCCTGTTTTTTTTT
 CATCATTCTCTTTCTTTCTTATGTTAACCTCGTACTACAAGTTTTCTCCTTATAAAAAAGC
 TGACTAAAATTAGAGATTGATAATCATAAATAAAATTTAGTAGCCATTTCCATTTTTTACAT
 TTTGATTTAATCGACACTCAAAGTTCTTATTTGAAAGCTAGTTTAGAACTTATTTGTTTG
 CTCCTTGATGAATA

GFP-Sequenz

KanMX-Modul

Primer Eptag
Dnm1-down

132 bp nach
DNMI-Gen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die durch ihre wissenschaftliche und moralische Unterstützung zu dem Erfolg meiner Dissertation beigetragen haben.

Besonders möchte ich Prof. Dr. Stefan W. Hell für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung meine Doktorarbeit in einem interdisziplinären Team anfertigen zu dürfen. Der rege Austausch zwischen Physikern, Chemikern und Biologen, aber auch der feste Zusammenhalt der Gruppe und das gute Arbeitsklima haben mir viel bedeutet.

Bei Prof. Dr. Georg Krohne von der Universität Würzburg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Korrektur und das Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Stefan Jakobs danke ich für die biologische Betreuung und Korrektur der Arbeit, aber auch für seine Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen, für die er immer Zeit fand.

Mein besonderer Dank gilt Jörg Bewersdorf, der durch seine Hilfe bei der Computergestützten Auswertung der Daten und der Einweisung in die 4Pi-Mikroskopie einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Unsere technischen Assistentinnen Rita Schmitz-Salue und Sylvia Löbermann, aber auch die sich über die Jahre stetig vergrößernde Biologen-Gruppe unterstützten mich sehr durch fachliche Diskussionen und ein tolles Arbeitsklima.

Für die Hilfe bei Computerproblemen möchte ich mich bei Roman Schmitt, Harald Meyer, Martin Schmeisser, Alexander Egner und Andreas Schönle bedanken. Ohne euch wären die außergewöhnlichen Fehlermeldungen meines Computers schwer zu ertragen und noch schwerer zu lösen gewesen.

Bei der Korrektur dieser Arbeit wurde ich großartig unterstützt von Rebecca Medda, Miriam Schneider, Ida Suppanz, Jan Keller, Katrin Willig und Tobias Müller, vielen Dank, eure Anmerkungen haben mir sehr geholfen und Sicherheit gegeben.

Ich hatte das große Glück, in meiner Abteilung nicht nur Kollegen, sondern wirkliche Freunde zu finden. Besonders in schweren Zeiten habt ihr mich motiviert, hattet immer ein offenes Ohr für fachliche und private Gespräche und habt dadurch einen großen Anteil an dieser Arbeit.

Meinen Eltern und meiner gesamten Familie danke ich für ihre großartige Unterstützung und Anteilnahme in all den Jahren. Ich bin glücklich, dass ich mich auf euch in allen Lebenslagen verlassen kann und ihr immer an mich glaubt.