

**Räumliche und zeitliche Untersuchungen zum
Teilungsapparat der äußeren Mitochondrienmembran
mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nadia Martini

aus Krefeld

Göttingen 2003

D7

Referent: Prof. Dr. Ulrich Ehlers

Korreferent: Prof Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Morphologie und Dynamik der Mitochondrien	1
1.2	Zielsetzung	3
2.	Material und Methoden	5
2.1	Material	5
2.1.1	Verwendete Stämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.1.2	Verwendete Plasmide	6
2.1.3	Medienzusätze	6
2.1.4	Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i>	7
2.1.5	Enzyme	9
2.1.6	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.7	Geräte	11
2.1.8	Lösungen und Puffer	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Methoden der Hefegenetik	12
2.2.1.1	Anzucht von Hefekulturen	12
2.2.1.2	Kreuzung von Hefezellen	12
2.2.1.3	Sporulation von diploiden Hefezellen	13
2.2.1.4	Tetradenanalyse	13
2.2.1.5	Transformation von Hefezellen durch Elektroporation	14
2.2.1.6	Isolierung genomischer DNA	14
2.2.1.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.1.8	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	17
2.2.1.9	Herstellung von rho ^o -Mutanten (Petite-Mutanten)	18
2.2.1.10	Halo-Test	19
2.2.1.11	Plasmidkonstruktionen	19
2.2.2	Durchführung der Experimente	20
2.2.2.1	Wachstumsbedingungen	20
2.2.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	20
2.2.2.3	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	22
2.2.2.4	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie über die Zeit	24
2.2.2.5	Grundlagen der 4Pi-Mikroskopie	25
2.2.2.6	Multifokale-Multiphotonen-Mikroskopie (MMM-4Pi)	28
2.2.2.7	Durchführung der Experimente am MMM-4Pi	30
2.2.2.8	Durchmesserbestimmung von mitochondrialen Tubuli	32
2.2.2.9	Bildbearbeitung: lineare und nichtlineare Entfaltung	33
3.	Ergebnisse	35
3.1	Mitochondrien sind dynamische Strukturen	35
3.1.1	Das mitochondriale Netzwerk passt sich der Kohlenstoffquelle an	35
3.1.2	Die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks nach Beginn der Glucoserepression ist in $\Delta fis1$ -Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen verzögert	37

3.1.3	Zeitliche Dynamik der Metamorphose des mitochondrialen Netzes von Wildtypzellen	40
3.1.4	Die Umstrukturierung des mitochondrialen Netzes von $\Delta fis1$ -Zellen ist begleitet von Tubulusteilungen und Fusionen	44
3.1.5	Die Frequenz von Matrixseparationen und Fusionen ist in $\Delta fis1$ - und Wildtyp- Mitochondrien vergleichbar	49
3.1.6	Die Zahl der Tubulusteilungen ist in $\Delta dnm1$ -Mitochondrien merklich reduziert	52
3.1.7	In $\Delta mdm33$ -Zellen können sowohl Matrixkonstruktionen als auch Tubulusteilungen beobachtet werden	54
3.2	Durchmesserbestimmung von Mitochondrien	57
3.2.1	Der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien hängt von der Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums ab	59
3.2.2	Die Deletion von Fis1p, Dnm1p oder Mdv1p führt zu Mitochondrien mit deutlich höherem Tubulusdurchmesser im Vergleich zur Wildtypsituation	61
3.2.3	Doppeldeletionsmutanten haben im Vergleich zu Wildtypzellen Mitochondrien mit höherem Tubulusdurchmesser	62
3.2.4	Doppeldeletionsmutanten ohne Fzo1p zeigen eine geringe Zu- oder Abnahme des mitochondrialen Tubulusdurchmessers im Vergleich zu Wildtypzellen	63
3.2.5	Der Verlust der mitochondrialen DNA führt zur Verringerung des mitochondrialen Tubulusdurchmessers	66
4.	Diskussion	68
4.1	Die mitochondriale Dynamik unter Glucoserepression	68
4.1.1	Die mitochondriale Vereinfachung unter Glucoserepression in Wildtypzellen erfolgt vermutlich durch Tubulusteilungen und Fusionen im Zuge der Zellteilung	68
4.1.2	Fis1p ist nicht essentiell für die Tubulusteilung und beeinflusst die Frequenz der Matrixseparationen und Fusionen nicht	70
4.1.3	Dnm1p ist essentiell für die Teilung der äußeren Membran, aber nicht für die Matrixkonstruktion	74
4.1.4	Ablauf der Teilung der äußeren Membran	76
4.1.5	Mdm33p ist nicht essentiell für die Konstruktion bzw. die Teilung der inneren Mitochondrienmembran	80
4.2	Durchmesserbestimmung von mitochondrialen Tubuli	83
4.2.1	Einfluss der Kohlenstoffquelle auf den Tubulusdurchmesser von Mitochondrien	83
4.2.2	Die mitochondrialen Tubuli weisen in $\Delta dnm1$ -, $\Delta fis1$ - und $\Delta mdv1$ -Zellen größere Durchmesser auf als in Wildtypzellen	84
4.2.3	Petite-Mutanten haben Mitochondrien mit einem geringeren Tubulusdurchmesser	84
4.2.4	Hierarchie der Gene innerhalb einer denkbaren Genwirkungskette	85
5.	Zusammenfassung	87

6.	Anhang	90
6.1	konfokale Langzeitaufnahmen	90
6.2	Beschreibung der Eigenschaften eines neuentwickelten Glycerinobjektivs und seiner Anwendungsmöglichkeiten für die 3D-Fluoreszenzmikroskopie	106
7.	Literaturverzeichnis	112

Verwendete Abkürzungen

2P	zwei Photonen
CCD	Kamera („ <i>charge-coupled device</i> “)
DsRed	<i>Discosoma</i> rot fluoreszierendes Protein („ <i>Discosoma red fluorescent protein</i> “)
GFP	grün fluoreszierendes Protein („ <i>green fluorescent protein</i> “)
mtGFP	grün fluoreszierendes Protein in der mitochondrialen Matrix
MMM	Multifokales-Multiphotonen-Mikroskop
NA	numerische Apertur
OM45-GFP	grün fluoreszierendes Protein, das an das COOH-Ende des äußeren Membranproteins OM45 fusioniert worden ist.
PMGal	Pepton-Minimal-Galaktose-Medium
PSF	Punktbildfunktion („ <i>point spread function</i> “)
WT	Wildtyphefezellen
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium
YPG	Hefeextrakt-Pepton-Glycerin-Medium
YPGal	Hefeextrakt-Pepton-Galaktose-Medium

1. Einleitung

1.1 Morphologie und Dynamik der Mitochondrien

Mitochondrien sind komplexe Zellorganellen mit einer Doppelmembran, einem Genom und einem eigenen Transkriptions- und Translationssystem. Sie vermehren sich durch Teilung.

In den Mitochondrien finden zahlreiche essentielle Stoffwechselfvorgänge statt, u.a. die Atmungskette, der Citratzyklus und die Fettsäureoxidation. Durch oxidative Phosphorylierung (Scheffler, 2001) wird in den Mitochondrien Energie in Form von ATP gewonnen.

In vielen Abbildungen aus Lehrbüchern werden Mitochondrien als einzelne, voneinander isolierte, ovale Zellorganellen dargestellt. Dieses Bild ist stark vereinfacht. Tatsächlich reicht die Bandbreite der mitochondrialen Morphologie von kugelförmigen Organellen bis zu verzweigten tubulären Netzwerken.

Morphologie, Anzahl und Verteilung der Mitochondrien in der Zelle hängen in der Regel mit dem Energiebedarf zusammen und sind daher eng mit Funktion und Differenzierung einer Zelle verbunden (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn und Voth., 1994; Chen, 1988; Griparic et al., 2001; Johnson et al., 1980; Munn, 1974; Tandler und Hoppel, 1972; Warren et al., 1996; Yaffe, 1999). Beispielsweise ändert sich Morphologie und Anzahl der Mitochondrien im Verlauf der Entwicklung von *Xenopus* und *Drosophila* (Fuller, 1993; Tourte et al., 1981). Aufgrund des hohen Energiebedarfs machen in Muskelzellen die Mitochondrien einen hohen Teil des Zellvolumens aus. Sie liegen in Reihen angeordnet zwischen den Aktin-Myosin-Bündeln, also direkt am Ort des größten ATP-Bedarfs (Bakeeva, 1978). In anderen Zellen dagegen, wie beispielsweise den Fibroblasten, machen die Mitochondrien nur einen kleinen Prozentsatz des Zellvolumens aus und liegen weit verteilt im Cytoplasma (Johnson et al., 1980). Pathologische Erscheinungen sind häufig mit Veränderungen in der Morphologie und der Verteilung der Mitochondrien assoziiert, beispielsweise Lebererkrankungen (Tandler und Hoppel, 1986; Inagaki et al., 1992), Muskeldystrophie (Nishino et al., 1998), Kardiomyopathie (Arbustini et al., 1998) und Krebs (Djaldetti, 1982; Eapen et al., 1998). Mitochondrien spielen zudem eine Schlüsselrolle bei Zellalterung und Apoptose in Säugerzellen (Green et al., 1998; Scheffler, 2001).

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* passt die Morphologie ihrer Mitochondrien unterschiedlichen Stoffwechselbedingungen an. Anaerob gewachsene Hefezellen bilden sehr kleine Mitochondrien aus, die Promitochondrien genannt werden (Criddel und Schatz, 1969; Plattner und Schatz, 1969). Unter aeroben Bedingungen dagegen bildet das mitochondriale Kompartiment in der logarithmischen Wachstumsphase ein ausgedehntes tubuläres Netzwerk (Hoffmann und Avers, 1973; Stevens, 1977, 1981). Dieses Netz kann zeitweilig aus mehreren kleinen Einheiten bestehen. Für die mitochondriale Morphologie spielt neben den Sauerstoffverhältnissen auch das Wachstumsmedium eine entscheidende Rolle. Hefezellen stellen nach Wechsel der Kohlenstoffquelle ihren Energiemetabolismus um (Gancedo, 1998) und ändern dabei Größe und Verzweigungsgrad ihrer Mitochondrien (Egner et al., 2002; Pon und Schatz, 1991; Stevens, 1977). Ein bekanntes Phänomen in diesem Zusammenhang ist die Glucoserepression: In Anwesenheit von Glucose als bevorzugter Kohlenstoffquelle schalten Hefezellen eine große Zahl von Genen ab. Unter Glucoserepression sind die mitochondrialen Proteine des Citratzyklus bzw. der Atmungskette nicht vorhanden (Entian et al., 1992; Felenbok, 1991; Gancedo, 1992; Johnston et al., 1992; Trumbly, 1992; Wills, 1990). Die Umstellung des Stoffwechsels lässt sich auch am niedrigeren Verzweigungsgrad der Mitochondrien von *S. cerevisiae* unter Glucoserepression ablesen.

In *S. cerevisiae* finden fortlaufend Tubulusteilungen und Fusionen zur Stabilisierung und Aufrechterhaltung der Netzstruktur statt (Bleazard et al., 1999; Nunnari et al., 1997; Sesaki und Jensen, 1999). Vermutlich spielen diese Ereignisse auch bei der Änderung von Größe und Gestalt der Mitochondrien eine Rolle (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn und Voth, 1994). Ein mögliches Modell für die Teilung der äußeren Mitochondrienmembran sieht folgendermaßen aus (Shaw und Nunnari, 2002): Die GTPase Dnm1p ist ein Schlüsselprotein der Teilungsmaschinerie der äußeren Mitochondrienmembran (Bleazard et al., 1999; Otsuga et al., 1998; Sesaki und Jensen, 1999). Dnm1-Proteine lagern sich an einigen Stellen zirkulär um den Tubulus an. Man stellt sich vor, dass diese zirkulären Strukturen die äußere Membran zusammenschnüren und so eine Tubuluskonstriktion oder -teilung herbeiführen. Die Anlagerung bzw. die Verteilung von Dnm1p auf der äußeren Membran wird vermutlich von einem integralen Protein der äußeren Membran reguliert: Fis1p (Mozdy et al., 2000). Für die Tubulusteilung wird zusätzlich das im Cytoplasma gelöste Mdv1p benötigt (Cervený et al., 2001; Fekkes et al., 2000; Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Tieu et al., 2002). Dieses Protein bindet sowohl an Dnm1p als auch an Fis1p und katalysiert möglicherweise die Tubulusteilung.

Mitochondrien haben eine Doppelmembran. Folglich müssen Teilungen und Fusionen der beiden Membranen in irgendeiner Weise koordiniert werden (Westermann, 2002). Andernfalls würde dies zu einer Fragmentation des Organells führen. Die Teilung und Fusion der inneren Mitochondrienmembran wird wahrscheinlich von einer eigenen Maschinerie vermittelt, die über noch unbekanntene Faktoren mit der äußeren Membran in Kontakt steht (Fritz et al., 2001).

Über die Teilung der inneren Membran ist bisher wenig bekannt. Kürzlich wurde ein Protein beschrieben, das möglicherweise eine Rolle bei der Teilung der inneren Mitochondrienmembran spielt: Mdm33p. Δ mdm33-Mutanten zeigen große kugelförmige Mitochondrien mit langgestreckten Tubuli, die einen sehr engen Matrixraum umschließen (Messerschmitt et al., 2003).

1.2 Zielsetzung

Die bisherigen Kenntnisse über die an der Tubulusteilung und Fusion beteiligten Proteine basieren in erster Linie auf genetischen und biochemischen Untersuchungen sowie morphologischen Beschreibungen des Phänotyps anhand statischer Aufnahmen. So nimmt man an, dass die fischernetzartigen Mitochondrien der Mutanten Δ fis1, Δ dnm1 und Δ mdv1 (Mozdy et al., 2000; Otsuga et al., 1998; Tieu und Nunnari, 2000) dadurch entstehen, dass die Tubulusteilung in diesen Zellen blockiert ist, während Fusionen weiterhin stattfinden können (Jensen et al., 2000; Shaw und Nunnari, 2002; Yaffe, 1999). Fzo1p ist ein integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran. Der Verlust dieses Proteins führt zur Fragmentierung der Mitochondrien. Man nimmt an, dass die Fusion der Tubuli verhindert wird, Tubulusteilungen aber weiterhin stattfinden können (Hermann, et al., 1998; Rapaport et al., 1998). Daher geht man davon aus, dass Fzo1p an der Fusion der inneren und äußeren Mitochondrienmembran beteiligt ist (Fritz et al., 2001).

Bei Teilung und Fusion der Mitochondrien handelt es sich um dynamische Prozesse. Daher ist es zwingend erforderlich, diese Vermutungen durch zeitaufgelöste mikroskopische Untersuchungen nachzuvollziehen. Nur so ist es möglich, Tubulusteilungen und Fusionen tatsächlich zu erkennen.

In der vorliegenden Arbeit soll erstmalig eine detaillierte Analyse der mitochondrialen Dynamiken in Raum und Zeit vorgestellt werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf Wildtypzellen und der $\Delta fis1$ -Mutante, deren mitochondriale Matrix mit dem „green fluorescent protein“ (GFP) markiert worden ist. Mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde das dynamische Verhalten der Mitochondrien bis zu fünf Stunden nach Glucoserepression beobachtet. Die dreidimensionalen Datensätze über die Zeit bieten einen Einblick in die komplexe strukturelle Anpassung der Mitochondrien an veränderte Wachstumsbedingungen. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit dem dynamischen Verhalten von $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdm33$ -Mutanten lassen zudem Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Proteine zu.

Des Weiteren soll in dieser Arbeit anhand von hochauflösenden Aufnahmen der Mitochondrien von $\Delta fis1$ -, $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdv1$ -Zellen sowie zahlreicher Doppeldelentionsmutanten ein tieferer Einblick in die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks gegeben werden. Hierzu wurde das neue Verfahren der MMM-4Pi-Mikroskopie (Typ A) angewendet. Zusammen mit der anschließenden Bildbearbeitung erreicht man mit diesem Fluoreszenzmikroskop eine Auflösung von 200 nm in lateraler und 100 nm in axialer Richtung. In axialer Richtung ist dieser Wert damit 3-5 mal höher als bei einem konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Merkmale
Y20000	BY4743, <i>MATa/MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>
Y00000	BY4741, <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
Y10000	BY4742, <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
Y01489	BY4741, <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0; ura3Δ0 dnm1::kanMX4</i>
Y11489	BY4742, <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dnm1::kanMX4</i>
Y01458	BY4741, <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fis1::kanMX4</i>
Y11458	BY4742, <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 fis1::kanMX4</i>
Y03319	BY4741, <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fzo1::kanMX4</i>
Y13319	BY4742, <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 fzo1::kanMX4</i>
Y01311	BY4741, <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mdv1::kanMX4</i>
Y11311	BY4742, <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 mdv1::kanMX4</i>
Y04229	BY4741, <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR393w::kanMX4</i>
Y31458	BY4743, <i>MATa/MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 fis1::kanMX4/fis1::kanMX4</i>
Y31489	BY4743, <i>MAT a/MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 dnm1::kanMX4/dnm1::kanMX4</i>

Die Wildtypstämme und die Deletionsstämme wurden von EUROSCARF (Frankfurt) bezogen. Die Deletion wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestätigt.

2.1.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Merkmale	Lokalisation	Quelle
pPVT100-mtGFP	ADH; 2μ - <i>URA3</i>	GFP, Matrix	Westermann und Neupert, 2000
pSJ55	ADH; 2μ - <i>HIS3</i>	DsRed, Matrix	Jakobs, persönliche Mitteilung
pHS12-DsRed.T4	ADH; <i>ARS-CEN</i>	DsRed, innere Membran	Bevis und Glick, 2002
pAS43	ADH; 2μ - <i>URA3</i>	GFP, äußere Membran	Schauss, persönliche Mitteilung

2.1.3 Medienzusätze

Mediumzusatz	Quelle
Adeninsulfat	Serva
Ammoniumsulfat	Serva
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Hefe Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Difco
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Galaktose	Serva
Kaliumacetat	AppliChem
Aminosäuren	AppliChem, Serva

2.1.4 Nährmedien für *S. cerevisiae*PMGal- („peptone minimal galctose“) Medium

Hefe Nitrogen Base ohne Aminosäuren	1.7 g
Adeninsulfat	20 mg
Ammoniumsulfat	5.0 g
Pepton	5.0 g
Galaktose	20 g
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

SD- („synthetic dextrose minimal“) Medium

Hefe Nitrogen Base ohne Aminosäuren	6.7 g
Glucose	20 g
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

SGE- („synthetic glycerol ethanol minimal“) Medium

Hefe Nitrogen Base ohne Aminosäuren	6.5 g
Pepton	6.7 g
Glycerin	30 g
Ethanol	20 ml
Adeninsulfat (2.0 g/l)	10 ml
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

Den Minimalmedien SD und SGE werden pro Liter Medium folgende Zusätze zugegeben:

Adeninsulfat	20 mg
L-Histidin-HCl	20 mg
L-Leucin	30 mg
L-Lysin-HCl	30 mg
L-Tryptophan	20 mg
Uracil	20 mg

YPD- („yeast extract peptone glucose“) Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Glucose	20 g
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

YPGal- („yeast extract peptone galactose“) Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Galaktose	20 g
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

YPG- („yeast extract peptone glycerol“) Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Glycerin	20 g
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

Für die Herstellung von Platten werden allen Medien 20 g/l Agar zugesetzt. Die Medien 20 Minuten bei 121°C autoklavieren und bei 4°C lagern. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 42°C gibt man gegebenenfalls die entsprechenden Aminosäuren zu.

Kaliumacetat-Agarplatten (Sporulationsplatten)

Kaliumacetat	6.0 g
Agar	6.0 g
Destilliertes Wasser	600 ml

Pro Liter Medium werden folgende Zusätze zugegeben:

Adeninsulfat	3.0 mg
L-Histidin-HCl	3.0 mg
L-Leucin	5.0 mg
L-Lysin-HCl	5.0 mg
L-Tryptophan	3.0 mg
Uracil	3.0 mg

2.1.5 Enzyme

Enzym	Quelle
Ampli- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Applied Biosystems
B-Glucuronidase	Boehringer
Turbo-Pfu-Polymerase	Stratagen
Ribonuklease A	Sigma
Zymolyase	Seikagaku Kogyo Company

2.1.6 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Substanz	Quelle
Aceton	Merck
Acrylamid	Roth
Agarose	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin	Sigma
Chloroform	Merck
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer
DNA-Leiter	MBI Fermentas
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Merck
EDTA-Dinatriumsalz	AppliChem
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	AppliChem
FluoSpheres, 0.2 µm (505/515)	Molecular Probes
Kanamycin B/C	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumacetat	AppliChem
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Phenol	Roth
Poly-L-Lysin Lösung, 0.1 % w/v in Wasser	Sigma
Sorbitol	Sigma
Tris-HCl	ProLabo
Triton X-100	Merck

2.1.7 Geräte

Gerät	Quelle
Allgemeine Glaswaren	Schütt
Autoklav „Sanoclav“	Wolf
Brutschränke	Heraeus
Sterilbank „Herasafe“	Heraeus
Elektrophoresekammer	Biometra
Elektroporationsgerät	BioRad
Elektrorührer „MR3001K“	Heidolph
Eppendorffthermocycler	Schütt
Eppendorfftischzentrifuge	Schütt
Feinwaage	Sartorius
Inkubator	Heraeus
Inkubationsschüttler „Certomat RS“	Braun Biotech International
Mikromanipulator	Singer Instruments
Mikrowelle	Daewoo
Photometer „Uvikon 860“	Kontron Instruments
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick
Milli-Q Wassersystem, Millipore S. A.	Molsheim
Schüttelgerät „Rocky“	Schütt
Transilluminator, 302 nm	Bachofer
Ultraschallbad „Ultrasonic Cleaner“	Branson 200
Vortex „Genie TM“	Bender und Holbein
Wasserbad	Köttermann
Zentrifugen „Sorvall RC-5B, RC-3b“ und entsprechende Rotoren	DuPont Instruments
Zentrifuge „Biofuge pico“	Heraeus

2.1.8 Lösungen und Puffer

Alle selbst angesetzten Lösungen und Puffer sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Hefegenetik

2.2.1.1 Anzucht von Hefekulturen

a) Plattenkultur

Mit einer Impföse werden Zellen der entsprechenden Dauerkultur auf einer YPD-Platte ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Plattenkulturen können mehrere Wochen mit Parafilm verschlossen bei 4°C gelagert werden.

b) Flüssigkultur

30 ml Flüssigmedium werden mit Zellen einer entsprechenden Plattenkultur angeimpft und bei 30°C in einem Schüttler bei 300 U/min über Nacht inkubiert, bis die gewünschte optische Zelldichte erreicht ist.

c) Dauerkultur

1 ml einer Übernachtskultur werden mit 500 µl sterilem Glycerin versetzt, durchmischt und bei - 80°C gelagert. Die tiefgefrorenen Zellen bleiben mehrere Jahre lang lebensfähig.

2.2.1.2 Kreuzung von Hefezellen

Haploide Hefestämme mit unterschiedlichem Paarungstyp und verschiedenen Markern werden in YPD-Medium herangezogen. Eine konzentrierte Zellsuspension jeder Hefekultur wird in Form eines Kreuzungsausstriches auf eine Vollmediumplatte aufgebracht. Nachdem die beiden Striche eingetrocknet sind, vermischt man die Enden mit einer Impföse. Nach einem Tag Wachstum bei 30°C werden die gewachsenen Kolonien auf Selektionsplatten umgestempelt. Die diploiden Zellen, die die Marker beider Ausgangsstämme enthalten, kann man nach einem weiteren Tag Inkubation als Kolonien identifizieren.

2.2.1.3 Sporulation von diploiden Hefezellen

Diploide Stämme von *S. cerevisiae* treten nur unter Mangelbedingungen in den meiotischen Zellzyklus ein.

Zur Induktion der Sporulation werden 5 ml einer Übernachtskultur bei 3000 U/min abzentrifugiert und in Wasser gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes nimmt man das Pellet für mindestens 3 Stunden in YPGal auf und tropft danach die konzentrierte Zellsuspension auf Kaliumacetat-Platten (nicht verstreichen). Nach zwei bis fünf Tagen Inkubation bei 30°C kann man die Bildung von Asci mit jeweils vier Sporen, die auch als Tetrade bezeichnet werden, im Lichtmikroskop erkennen. Jeder Askus ist von einer Askuswand umgeben.

2.2.1.4 Tetradenanalyse

Für den enzymatischen Andau der Askuswände wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden angewendet:

- 1) Von einer Kaliumacetat-Platte nimmt man sporulierende Hefezellen auf und resuspendiert diese in ca. 500 µl Wasser. Durch Zugabe von 10 µl β-Glucuronidase und anschließender 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Askuswand partiell verdaut. Danach sollen die Zellen auf Eis gehalten werden. Ca. 30 µl der Lösung tropft man auf eine Vollmediumplatte und verstreicht die Suspension vorsichtig mit der Impföse am Rand der Platte.
- 2) Von einer Kaliumacetat-Platte werden einige Zellen in 20 µl Zymolyaselösung (0.5 mg/ml in 1M Sorbitol) suspendiert und 6-8 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach gibt man vorsichtig 0.5 ml steriles Wasser hinzu und stellt den Ansatz auf Eis. Anschließend werden 1-2 Tropfen der Lösung auf eine Vollmediumplatte aufgebracht und vorsichtig mit der Impföse am Rande der Platte verstrichen.

Am Mikromanipulator können nun die vier Sporen eines Askus mit Hilfe einer feinen Glasspitze getrennt und separat auf der Vollmediumplatte auslegt werden. Dabei muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass nur die vier zusammenhängenden Sporen eines Askus isoliert werden. Tetraden sind leicht mit vier zufällig zusammenliegenden Zellen oder Sporen zu verwechseln. Nach Möglichkeit sollte man deshalb nur Aski mit noch erkennbarer Askuswand verwenden.

Zum Auskeimen der Sporen müssen die Platten 2-4 Tage bei 25°C inkubieren. Die Einzelkolonien sind danach in der Regel soweit herangewachsen, dass sie phänotypisch analysiert werden können. Dazu werden die vier zusammengehörenden Meioseprodukte auf Minimalplatten umgestempelt.

2.2.1.5 Transformation von Hefezellen durch Elektroporation

Die hier angewandte Elektroporation von Hefezellen basiert auf der Methode von Guarente (1991). Durch einen elektrischen Impuls wird die Zellmembran vorübergehend permeabilisiert, so dass die DNA in die Hefezelle eingeschleust werden kann.

Eine Übernachtskultur wird in Vollmedium bei 30°C bis zur stationären Phase wachsen gelassen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen auf Eis mit sterilen, eiskalten Lösungen. Zunächst zentrifugiert man die Zellen bei 3000-5000 U/min für 5 Minuten ab, wäscht sie dann im gleichen Volumen Aqua dest. und resuspendiert sie schließlich im halben Volumen Aqua dest.. Nach erneutem Pelletieren wäscht man die Zellen in 20 ml 1M Sorbitol und nimmt sie schließlich in 0.5 ml Sorbitol auf.

Für die Elektroporation werden 40 µl der vorbereitete Zellen mit maximal 5 µl DNA vermischt. Für die Negativkontrolle stellt man 40 µl der Zellsuspension beiseite. Danach erfolgt die Transformation in einer sterilen Küvette (Puls: 1.5 kV, 25 µF, 200 Ω). Nach sofortiger Zugabe von 1 ml Sorbitol überführt man die Zellsuspension in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß, um sie zu pelletieren. Danach werden die Zellen sofort auf Selektionsplatten ausgestrichen. Ist die Zelldichte sehr hoch, sollten zusätzlich 100 µl der Zellsuspension direkt ausplattiert werden, um ein Überwachsen zu verhindern.

2.2.1.6 Isolierung genomischer DNA

Ca. 10 ml Hefekultur lässt man in Vollmedium bei 30°C bis zur stationären Phase wachsen. Danach werden die Zellen durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min geerntet, in 0.5 ml Aqua dest. aufgenommen, anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 Sekunden lang pelletiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet im verbleibenden Volumen resuspendiert. Danach gibt man 0.2 ml 2 % Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8) und 1 mM Na₂EDTA dazu. Zuletzt fügt man 0.2 ml Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1, gesättigt mit 10 mM Tris-HCl; pH 8.0) und 0.3 g Glasperlen hinzu.

Die Gasperlen und der Aufschlusspuffer Triton X-100 perforieren die Zellmembran. Phenol und Chloroform trennen die verschiedenen Fraktionen auf. Das Ganze wird für ca. 8 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt, bevor 0.2 ml TE-Puffer (pH 8) hinzugegeben werden. Nach fünfminütigem Zentrifugieren ist eine deutliche Schichtung erkennbar. Die oberste klare wässrige Phase enthält die DNA. Diese wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. 1 ml 100 %iges Ethanol wird zugegeben und vorsichtig durch mehrfaches Umdrehen mit der DNA vermischt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit und Dekantieren des Überstandes wird das Pellet in 0.4 ml TE-Puffer mit 3 µl RNaseA (10 mg/ml) resuspendiert. Die RNaseA spaltet die noch vorhandene RNA auf. Anschließend inkubiert man den Ansatz für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Dann werden 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 100 %iges Ethanol hinzugefügt und durch Umdrehen mit der Suspension vermischt. Anschließend pelletiert man die DNA und lässt sie an der Luft trocknen. Zuletzt wird die DNA in 30 µl Aqua dest. aufgenommen. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß erneut für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubieren, damit eventuell verbliebene Reste von Ethanol verdampfen können. 10 µl entsprechen 3-6 µg DNA (Adams, 1997).

TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8.3
	1 mM	EDTA

2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe lassen sich mit Hilfe der PCR-Technik vervielfältigen und modifizieren (Mullis und Falloona, 1987). Die Amplifikation eines DNA-Fragments beginnt mit der Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 95°C. Dabei wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend reduziert man die Temperatur rasch so weit, dass sich kurze Primermoleküle an die Einzelstränge anlagern können. Diese Anlagerung wird in Abhängigkeit von der Sequenz der Primer bei einer Temperatur von 50-60°C durchgeführt. In einem dritten Schritt erfolgt dann die Synthese zweier neuer Doppelstränge bei einer für die hitzestabile DNA-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur (72°C). Nach der Synthese des DNA-Gegenstranges beginnt ein neuer Zyklus mit dem Denaturierungsschritt.

Für eine PCR-Reaktion wird zu 1 µl (300-600 ng) genomischer DNA je 1 µl der entsprechenden Primer (1 µM), 2 µl dNTP-Lösung (0.2 mM), 2 µl PCR-Puffer (10x), 12.5 µl Aqua dest. und 0.5 µl Ampli-*Taq*-DNA-Polymerase gegeben. Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Eine Standardreaktion wird bei folgenden Temperaturen ausgeführt:

- 1) 4 min 94°C
- 2) 1 min 94°C Denaturierung
- 3) 1 min 54°C Primeranlagerung
- 4) 2 min 72°C Polymerisation
- 5) 10 min 72°C
- 6) Aufbewahrung bei 4°C bis zur Probenentnahme aus dem Thermocycler

Die Schritte 2-4) werden 35 mal wiederholt.

dNTP-Lösung:	2.0 mM	dATP
	2.0 mM	dTTP
	2.0 mM	dGTP
	2.0 mM	dCTP

10x PCR-Puffer:	100 mM	Tris-HCl, pH 8.3
	500 mM	KCl
	25 mM	MgCl ₂

2.2.1.8 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese kann zur Reinigung, zur Trennung und zur Identifizierung von zirkulärer Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten genutzt werden. Im elektrischen Feld wandern DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppe zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer und doppelsträngiger DNA ist in einem Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts (Hellig et al., 1974).

Durch Vergleich eines Molekulargewichtsstandards mit dem zu analysierenden DNA-Fragment kann die Größe (in Basenpaaren) bestimmt werden. Eine Abschätzung der Konzentration der aufgetragenen DNA kann nach Anfärbung mit Ethidiumbromid durch den Vergleich der jeweiligen Bandenintensität mit einem Längenstandard, der in definierter Konzentration aufgetragen wurde, erfolgen.

In Abhängigkeit von den zu trennenden DNA-Molekülen wählt man eine Agarosekonzentration von 0.7 % bis 2 %. Je höher dabei die Agarosekonzentration ist, desto besser gelingt die Auftrennung der kurzen DNA-Fragmente: Bei einer Agarosekonzentration von 2 % lassen sich beispielsweise getrennte 100 und 200 Basenpaarfragmente gut unterscheiden, während sehr große Fragmente schlechter getrennt werden.

Die 1 %ige Agarose-Lösung wird in der Mikrowelle durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Die Gelform (Größe: 108 x 142 mm bzw. 65 x 100 mm) muss mit Gewebepband abdichtet werden. Danach 10-20 µl Ethidiumbromid in der Form mit etwas Gel vermischen. Anschließend das restliche Gel in die Gelform gießen und einen Kamm zum Formen der Probetaschen aufstecken. Nach Verfestigung der Agarose (ca. 30 Minuten) kann der Kamm entfernt werden. Das Gel wird aus der Form genommen, in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE- Puffer überschwemmt. Als nächstes versetzt man die DNA-Proben mit 4 µl DNA-Auftragspuffer (6x) und pipettiert sie anschließend in die Geltaschen. Der Auftragspuffer sorgt für das Absinken der DNA-Lösung in den Taschen. Als DNA-Größenmarker wird eine 1 kb DNA-Leiter verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 70-80 Volt für zwei bis drei Stunden. Die aufgetrennten mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente werden durch UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) auf einem Transilluminator sichtbar.

Agarose-Lösung:	1% (w/v)	Agarose in 1x TAE-Puffer
6x DNA-Auftragspuffer:	12 % (w/v)	TAE (50x)
	38 % (w/v)	Glycerin (80 %)
	50 % (w/v)	destilliertes Wasser
	30 mg	Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg/ml	Ethidiumbromid in Wasser
10x TAE-Puffer:	400 mM	Tris-HCl, pH 7.2
	200 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA

2.2.1.9 Herstellung von rho^o-Mutanten (Petite-Mutanten)

Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA und ist daher mutagen. Ethidiumbromid wandelt atmungsfähige Hefezellen (rho⁺) in atmungsdefiziente Mutanten um (rho^o). Es inhibiert selektiv die mitochondriale DNA-Synthese. Bereits vorhandene mitochondriale DNA wird fortschreitend zerstört. In rho^o-Mutanten, die durch andauernde Behandlung mit Ethidiumbromid entstanden sind, kann keine mitochondriale DNA mehr nachgewiesen werden.

Die Zellen wachsen in 5 ml SD-Medium ohne Uracil mit 12.5 µl sterilem Ethidiumbromid (25 µg/ml) bis zur stationären Phase. Danach überimpft man die Zellen in das gleiche Medium. Nachdem die Zellen wieder bis zur stationären Phase hochgewachsen sind, streicht man sie auf einer Vollmediumplatten aus und inkubiert diese für mindestens zwei Tage bei 30°C (Fox et al., 1991).

Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um rho^o-Mutanten und damit um atmungsdefiziente Zellen handelt, werden die Zellen von YPD auf YPG übergeimpft. rho^o-Mutanten können auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin nicht wachsen.

2.2.1.10 Halo-Test

Zur Bestimmung des Paarungstyps von Tetraden oder für die Analyse sekretorischer Defekte kann die Sekretion des α -Faktors mit Hilfe des Halo-Tests erfasst werden (Julius et al., 1984; Ciejek und Thorner, 1979). Der Test beruht auf der Sensitivität des *MATa*-Testerstammes RC 898, der in der Gegenwart von α -Faktor in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert wird und deshalb in der Nähe von α -Faktor sekretierenden Zellen nicht wachsen kann.

200 ml YPD werden mit 2 g Agar (0.8 % bis 1 %) in der Mikrowelle aufgeköcht und im Wasserbad auf 42°C herunter gekühlt. Vorsichtig, um Luftblasen zu vermeiden, mischt man 500 μ l einer stationären RC 898-Kultur unter 100 ml Medium und gießt dünne Platten. Diese können sofort nach Erstarren der Agarose verwendet oder bei 4°C für maximal eine Woche gelagert werden. Nach Auftropfen von 5-15 μ l der zu testenden Zellen werden die „Halo-Platten“ bei 30°C inkubiert. Um *MATa*-Zellen bildet sich ein klarer Hof, dessen Durchmesser abhängig von der Menge an sezerniertem α -Pheromon ist.

2.2.1.11 Plasmidkonstruktionen

Zum Klonieren werden Standardmethoden eingesetzt (Sambrook et al., 1989). Für die PCR wurde Turbo-Pfu-Polymerase gemäß den Instruktionen des Herstellers verwendet.

Für die Markierung der mitochondrialen Matrix wurde das Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) verwendet. Dieses Plasmid enthält ein GFP kodierendes DNA-Fragment, welches an das 3'-Ende der Untereinheit 9 (aa1-69) der F_0 -ATPase von *Neurospora crassa* unter Kontrolle des konstitutiven Alkoholdehydrogenase-Promoters fusioniert worden ist.

Die innere Mitochondrienmembran wurde mit dem Fusionsprotein pCox4-DsRed (Bevis und Glick, 2002) unter Verwendung des Plasmids pHS12-DsRed.T4 markiert. Die Markierung der äußeren Membran mit GFP erfolgte mit Hilfe des Vektors pAS43. Dieses *2 μ -URA3* Plasmid exprimiert OM45p-GFP (Cervený et al., 2001) und wurde wie folgt konstruiert: Ein 1223 Basenpaare (bp) großes DNA-Fragment, das den OM45 ORF kodiert, und 41 bp der Upstream-Sequenz wurden von der genomischen Hefe-DNA unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-GCGAAGCTTGGCCAGTAACGTTAATCA-3' und 5'-GCGGGTACCGTCCTTTTTTCGAGCTCCA-3' amplifiziert.

Zur Erleichterung der Klonierung wurden an die Primer zusätzliche Restriktionsschnittstellen angefügt: *Hind*III und *Kpn*I. Das Fragment inserierte im Plasmid pVT100U-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000) anstelle der Su9-Presequenz.

Für die Markierung der Matrix mit DsRed wurde das Plasmid pSJ55 hergestellt. Für diesen Vektor wurde das Plasmid pHS12-DsRed.T4 (Bevis und Glick, 2002) als Vorlage benutzt. Die kodierende Sequenz DsRed.4 wurde durch PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment inserierte anschließend in pYX142-mtGFP (Westermann und Neupert, 2000), wo es die GFP kodierende DNA-Sequenz ersetzte. Daraus resultierte ein Vektor, auf dem das Protein Su9(1-69)-DsRed.4 unter der Kontrolle eines konstitutiven Triosephosphat-Isomerase-Promotors (TPI) kodiert ist. Zuletzt wurde die TPI-Su9(1-69)-DsRed.4-Kassette in die *Sma*I-Restriktionsseite des 2μ -basierten Vektors pRS323 (Sikorski und Hieter, 1989) eingefügt. Daraus resultierte das Plasmid pSJ55.

2.2.2 Durchführung der Experimente

2.2.2.1 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht von *S. cerevisiae* wurde nach Standardmethoden durchgeführt (Sherman, 1991). Die Zellen wuchsen in Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium (YPD), Hefeextrakt-Pepton-Glycerol-Medium (YPG) oder in Pepton-Minimal-Galakotose-Medium (PMGal) bei 30°C und 300 U/min im Schüttler über Nacht. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:4 verdünnt, so dass sich die Zellen vier Stunden später in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Zur Überprüfung diente die Messung der optischen Dichte vor jedem Experiment.

2.2.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für die unter 2.2.2.2 und 2.2.2.3 beschriebenen Bildaufnahmen wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop (TCS SP2, Leica Microsystems, Heidelberg GmbH) mit einem inversen Leica DMIRBE-Stativ verwendet. Das Mikroskop war mit einer HBO 50 W/Ac Quecksilberlampe (Osram) und einem GFP- bzw. einem DsRed-Filtersatz (Leica, Wetzlar) ausgestattet. Für die Bildaufnahme wurde ein Ölimmersionsobjektiv (HCX PL APO 100 x,

Leica, Wetzlar) einer numerische Apertur von 1.4 verwendet. Alle Aufnahmen wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 22°C durchgeführt.

Um die Abhängigkeit der mitochondrialen Morphologie von der Kohlenstoffquelle darzustellen, erfolgte die Anzucht von Wildtypzellen (Y20000) und $\Delta fis1$ -Zellen (Y31458) mit GFP markierter Matrix (pVT100-mtGFP) in YPD oder in YPG. Für die Probenpräparation wurden die Zellen bei 3000 U/min abzentrifugiert, mit 10 μ l 1 %iger Agaroselösung vermischt und auf einen Objektträger aufgebracht. Bei der Agarose handelt es sich um einen niedrig schmelzenden Typ (Sigma, Typ IX). Der Schmelzpunkt liegt bei 65°C, der Gelpunkt bei 35°C. Die Agarose wurde in PBS gelöst und kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Die 1% ige Lösung konnte über mehrere Tage im Wasserbad bei ca. 50°C aufbewahrt werden. Bevor die Agaroselösung zu den Zellen geben wurde, ließ man sie bis knapp oberhalb des Gelpunkts abgekühlen. So war sichergestellt, dass einerseits die Hefezellen nicht durch zu hohe Temperaturen geschädigt wurden und andererseits die Agaroselösung noch flüssig genug war, um sie mit dem Pellet vermischen zu können. Die Zellen wurden auf einen Objektträger aufgetropft und durch leichten Druck auf das Deckgläschen gleichmäßig verteilt. Um störende Zellbewegungen während der Aufnahme zu vermeiden, sollte die Probe einige Minuten bei Raumtemperatur liegen gelassen werden, damit die Agarose auspolymerisieren kann.

Das GFP wurde durch blaues Licht angeregt. Anhand der Morphologie ihrer Mitochondrien wurden die Zellen in jeweils drei Kategorien eingeteilt. Wildtypzellen wurden anhand des Verzweigungsgrades ihrer Mitochondrien unterschieden. Zeigten die Netze zahlreiche stark verzweigte Seitenäste, die von den Hauptästen abgingen, wurden sie in die Kategorie „Mitochondrien mit hohem Verzweigungsgrad“ eingeordnet. War die Zahl und die Verzweigung der Seitenäste geringer, so wurden diese Netze der Kategorie „Mitochondrien mit mittlerem Verzweigungsgrad“ zugeteilt. „Mitochondrien mit geringem Verzweigungsgrad“ bestanden überwiegend aus den peripher verlaufenden Hauptästen.

$\Delta fis1$ -Mitochondrien wurden aufgrund des Verhältnisses von fischernetzähnlichen Netzbereichen zu tubulären Strukturen unterschieden. Mitochondriale Netze, die zu über 50 % aus netzartigen Bereichen bestanden, wurden der Kategorie „Mitochondrien mit großen Netzbereichen“ zugeteilt. Machten die netzartigen Bereiche nur 30 % bis 50 % des gesamten Netzes aus, so wurden sie der Kategorie „Netze mit kleinen Netzbereichen“ zugeordnet. Netze der Kategorie „tubuläre Strukturen“ besaßen entweder keine oder sehr kleine netzartige Bereiche.

Für die morphologischen Untersuchungen von Mitochondrien unter Glucoserepression wurden Wildtypzellen (Y20000) und $\Delta fis1$ -Zellen (Y31458) mit mtGFP (pVT100-mtGFP) in YPG angeimpft und am nächsten Morgen für 45 bzw. 70 Minuten in YPD transferiert. Nach einer weiteren Stunde im Schüttler bei 30°C sind im Stundentakt Zellen entnommen worden. Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie oben beschrieben. Das GFP wurde mit blauem Fluoreszenzlicht angeregt. Der Verzweigungsgrad der Mitochondrien wurde bestimmt und den oben beschriebenen Kategorien zugeordnet.

2.2.2.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für die Bildaufnahme wurde das unter 2.2.2.2 beschriebene konfokale Fluoreszenzmikroskop (TCS SP2, Leica Microsystems, Heidelberg GmbH) verwendet. Als Lichtquellen dienten ein Argon-Krypton-Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und ein grüner Neon-Laser ($\lambda = 543 \text{ nm}$). Alle Aufnahmen entstanden bei einer Raumtemperatur von ca. 22°C.

Um die Matrixseparation und die Tubulusteilung von $\Delta fis1$ -Mutanten zu zeigen, wurden folgende Zellen verwendet: $\Delta fis1$ -Mutanten (Y31458) mit DsRed markierter Matrix (pSJ55) und mit GFP markierter äußerer Membran (pAS43) und $\Delta fis1$ -Zellen (Y31458) mit DsRed markierter innerer Membran (pHS12-DsRed.T4) und mit GFP markierter äußerer Membran (pAS43). Die Anzucht der Zellen erfolgte in YPG über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in PMGal Medium transferiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 70 Minuten im Schüttler bei 30°C wurden die Zellen in einer Lösung aus 1 % niedrig schmelzender Agarose in einem Teil PMGal und zwei Teilen PBS in eine Mikroskopiekammer gefüllt.

Diese 5 x 5 cm große Kammer besteht aus einem Boden, einem Mittelteil mit dem Kammerraum selbst, und einem Deckel. Boden und Deckel werden mit Hilfe von Schrauben am Mittelteil befestigt und haben in der Mitte eine runde Aussparung für die Deckgläser. Der Kammerraum fasst ein Volumen von ca. 400 μl . Über insgesamt vier Zu- bzw. Abflüsse kann der gesamte Kammerraum während des Experiments kontinuierlich mit Nährmedium versorgt werden.

Da bei den Experimenten in dieser Arbeit nur ca. 70 % des Kammervolumens genutzt wurde, reichte ein Zufluss und ein Abfluss aus. Die Kammer wurde mit Hilfe eines Halters auf dem Objektisch befestigt. Neben dem Mikroskop war an einem Stativ ein

Falconröhrchen mit 50 ml PMGal-Medium ca. 20 cm oberhalb des Objektisches befestigt. Über einen Schlauch war das Falconröhrchen mit der Kammer verbunden.

Durch einen erzeugten Unterdruck floss das Medium (ca. 100 $\mu\text{l}/\text{min}$) über den gesamten Zeitraum des Experimentes hinweg durch den Schlauch in die Kammer und anschließend durch den Abflussschlauch in ein Auffanggefäß.

Die Anregung des GFP erfolgte bei $\lambda = 488 \text{ nm}$. Die Fluoreszenz wurde zwischen 490 und 540 nm detektiert. GFP und DsRed exprimierende Zellen wurden simultan bei 488 nm und 568 nm angeregt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei 490 bis 540 nm bzw. bei 620 bis 670 nm. Beide Photomultiplier waren auf die gleiche Sensitivität eingestellt.

Von $\Delta fisI$ -Mutanten mit DsRed markierter Matrix und GFP markierter äußerer Membran wurden einzelne dreidimensionale Bilderstapel (xy-Bilder) aufgenommen. Der Abstand zwischen den Bildern in axialer Richtung betrug 300 nm.

Von $\Delta fisI$ -Zellen mit DsRed markierter innerer Membran und GFP markierter äußerer Membran wurden Langzeitaufnahmen gemacht. Dazu wurde alle 120 Sekunden ein dreidimensionaler Bilderstapel (xy-Bilder) aufgenommen. Der Abstand zwischen den Bildern in axialer Richtung betrug 300 nm.

Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „ImSpector“.

Um die Separation der Matrix darzustellen, wurde jeder optische Schnitt eines Bilderstapel einzeln betrachtet. Eine Matrixseparation wurde nur dann als solche gezählt, wenn die Helligkeitsintensität in dem entsprechenden Bereich nach Abzug des Hintergrundes Null betrug.

Zur Darstellung der Teilung der äußeren bzw. der inneren Membran wurde nacheinander jede dreidimensionale Aufnahme einer Langzeitaufnahme geöffnet und jeder optische Schnitt einzeln betrachtet. Im Vergleich mit der entsprechenden Schnittebene der vorhergehenden bzw. nachfolgenden dreidimensionale Aufnahme konnte der größte Teil der Teilungen der äußeren bzw. der inneren Membran erfasst werden. Eine Membranteilung wurde nur dann als solche gezählt, wenn die Helligkeitsintensität in dem entsprechenden Bereich nach Abzug des Hintergrundes Null betrug.

Die für die Filme und Abbildungen verwendeten Bilder sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Dabei werden die hellsten Pixel der Ebene entlang der optischen Achse addiert.

Abgesehen von der Anpassung des Kontrasts wurde keine weitere Bildbearbeitung vorgenommen.

1x PBS, pH 7.3	137 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	4.3 mM Na ₂ HPO ₄
	1.4 mM KH ₂ PO ₄

2.2.2.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie über die Zeit

Die Langzeitaufnahmen wurden mit einem multifokalen konfokalen System (UltraView; Perkin Elmer, Boston, USA) aufgenommen. Dieser Scannerkopf war an ein inverses Leica DMIRBE-Mikroskop angeschlossen. Der Laserstrahl wird bei diesem System durch ein Mikrolinsenrad in mehr als 1000 Einzelstrahlen aufgeteilt. Diese beleuchten gleichzeitig das gesamte Bild in lateraler Richtung. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem Ölimmersionsobjektiv (HCX PL APO 100 x, Leica, Wetzlar) einer numerische Apertur von 1.4 und einer gekühlten CCD-Kamera (Imager, LaVision, Göttingen). Als Lichtquelle diente ein Argon-Krypton-Laser (Innova 70 C Spektrum). Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 488$ nm. Die Shutter, die Bewegung des Tisches und die Bildaufnahme waren computergesteuert. Das Mikroskop war mit einer HBO 50 W/Ac Quecksilberlampe (Osram) und einem GFP Filtersatz (Leica, Wetzlar) ausgestattet. Alle Aufnahmen wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 22°C durchgeführt.

Wildtypzellen (Y20000), $\Delta fis1$ - (Y31458), $\Delta dnm1$ - (Y31489), $\Delta mdm33$ - (Y04229) und $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Zellen mit mtGFP (pVT100U-mtGFP) wuchsen in YPG über Nacht heran. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in YPD transferiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit im Schüttler bei 30°C (45 Minuten, Wildtypzellen bzw. 70 Minuten, Deletionsmutanten) zentrifugierte man die Zellen ab und füllte sie mit einer Lösung aus 1% niedrig schmelzender Agarose in einem Teil YPD und zwei Teilen PBS in die unter 2.2.2.3 beschriebene Mikroskopiekammer. Während der gesamten Dauer des Experiments fand eine konstante Versorgung der Kammer mit YPD statt. Die dreidimensionalen Bilderstapel der Mitochondrien entstanden durch Aufnahmen der Fokalebene (xy-Bilder) und durch Bewegung des Tisches um 0.25 μ m entlang der optischen Achse. Die einzelnen Bilderstapel wurden alle 78 Sekunden bei Wildtypzellen, alle 226 Sekunden bei $\Delta mdm33$ -

Zellen, alle 116 Sekunden bei $\Delta fis1$ - und $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Hefen und alle 60 Sekunden bei $\Delta dnm1$ -Zellen aufgenommen.

Für die Bildaufnahme von Wildtypmitochondrien benötigte man eine Belichtungszeit von 550 msec, für die Deletionsmutanten betrug die Belichtungszeit 1000 msec. Die Pixelgröße betrug $0.04 \mu\text{m}^2$ für Wildtypzellen bzw. $0.01 \mu\text{m}^2$ für die Deletionsmutanten. Die Datensätze der Mitochondrien von $\Delta fis1$ - und $\Delta dnm1$ -Zellen wurden mit Hilfe des Richardson-Lucy-Algorithmus (Lucy, 1974; Nagorni et al., 2001; Richardson, 1972) entfaltet. Durch diese nichtlineare Bildrekonstruktion wurde die Auflösung der Aufnahmen erhöht, was vor allem in Bereichen mit schwacher GFP-Fluoreszenz das Erkennen von Tubulusteilungen erleichterte.

Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „ImSpector“. Nacheinander wurde jede dreidimensionale Aufnahme einer Serie geöffnet und jeder optische Schnitt einzeln betrachtet. Im Vergleich mit der entsprechenden Schnittebene der vorhergehenden bzw. nachfolgenden dreidimensionalen Aufnahme konnte der größte Teil der Matrixseparationen, Tubulusteilungen und Fusionen erfasst werden. Eine Separation wurde nur dann als solche gezählt, wenn die Helligkeitsintensität in dem entsprechenden Bereich nach Abzug des Hintergrundes Null betrug. Eine Tubulusteilung wurde als solche bezeichnet, wenn nach einer Separation entweder keine Fusion oder eine Fusion an einer anderen Stelle des mitochondrialen Netzes folgte.

Die für die Filme und Abbildungen verwendeten Bilder sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Dabei werden die hellsten Pixel der Ebene entlang der optischen Achse addiert. Abgesehen von der Anpassung des Kontrasts wurde keine weitere Bildbearbeitung vorgenommen.

2.2.2.5 Grundlagen der 4Pi-Mikroskopie

Die Durchmesserbestimmung der mitochondrialen Tubuli wurde mit Hilfe der MMM-4Pi-Mikroskopie durchgeführt. Zum besseren Verständnis der Funktionsweise dieses Mikroskops soll an dieser Stelle zunächst eine Einführung in die Grundlagen der 4Pi-Mikroskopie gegeben werden (Egner, 2002):

Die Auflösung eines Lichtmikroskops ist proportional zur Wellenlänge bzw. in lateraler Richtung umgekehrt proportional zur numerischen Apertur $n \sin(\alpha)$ und in axialer Richtung umgekehrt proportional zu $n \sin^2(\alpha)$. Sie kann nicht beliebig gesteigert werden: Die Erhöhung des Brechungsindex des Immersionsmediums ist nur bis zu einem gewissen

Grad möglich, da eine große Differenz zum Brechungsindex des Einbettmediums zu starken sphärischen Aberrationen führt, die ihrerseits wiederum die Auflösung reduzieren. Darüber hinaus können konstruktionstechnisch bedingt keine Objektive gebaut werden, deren Aperturwinkel deutlich über 70° liegt.

Die Idee der 4Pi-Mikroskopie ist es, die Auflösung zu erhöhen, indem zwei sich gegenüberstehende Objektive verwendet werden, die auf den selben Punkt fokussieren. Durch kohärente Beleuchtung und/oder Detektion mit beiden Objektiven wird erreicht, dass der effektive Aperturwinkel sich verdoppelt und so die Auflösung gesteigert wird. Zusammen mit der anschließenden Bildbearbeitung werden Auflösungen von ~ 200 nm in lateraler bzw. ~ 100 nm in axialer Richtung erreicht. In axialer Richtung ist dies 3-5 mal (Typ A) schärfer als bei einem konventionellen konfokalen System.

Abbildung 1 zeigt das prinzipielle Schema eines 4Pi-Mikroskops: Ein aufgeweiteter, kollimierter Laserstrahl wird durch einen Strahlteilerwürfel in zwei Teilstrahlen gleicher Intensität aufgespalten. Jeder Teilstrahl wird auf die Rückapertur eines der beiden Objektive geleitet und auf den selben Punkt fokussiert. Da es sich hier um ein 2P-Mikroskop handelt, das mit einem gepulsten Laser betrieben wird, müssen, damit die beiden Foki miteinander interferieren können, die optischen Weglängen der beiden Teilstrahlen genau abgeglichen werden. Dies erfolgt in der Regel durch Verschieben des Strahlteilerwürfels in Richtung des einfallenden Strahls. Auf diese Weise können auch objektinduzierte Phasenstörungen, die während des axialen Rasterns auftreten, kompensiert werden. Das Fluoreszenzsignal wird über das linke Objektiv gesammelt, mit einem dichroitischen Spiegel ausgefiltert, auf eine Lochblende abgebildet und anschließend mit einer Avalanche-Photodiode detektiert. Durch die konfokale Detektion erreicht man eine Unterdrückung der Nebenmaxima. Zum Rastern wird die Probe in allen drei Raumrichtungen verschoben.

Bei der hier vorgestellten Variante des 4Pi-Mikroskops werden die Objektive nur bei der Beleuchtung gemeinsam verwendet. Dies bezeichnet man als Typ A. Darüber hinaus gibt es zwei weitere Konstruktionstypen: Beim Typ B werden die Objektive nur zur Detektion gemeinsam eingesetzt, und beim Typ C werden sowohl Beleuchtung als auch Detektion im 4Pi-Modus durchgeführt. Im Gegensatz zum Typ A muss bei den beiden anderen Varianten das Fluoreszenzlicht zum Interferieren gebracht werden. Dies ist wegen der geringen Kohärenzlänge experimentell anspruchsvoller, bietet aber auf Grund der kleineren Wellenlänge eine höhere Auflösung.

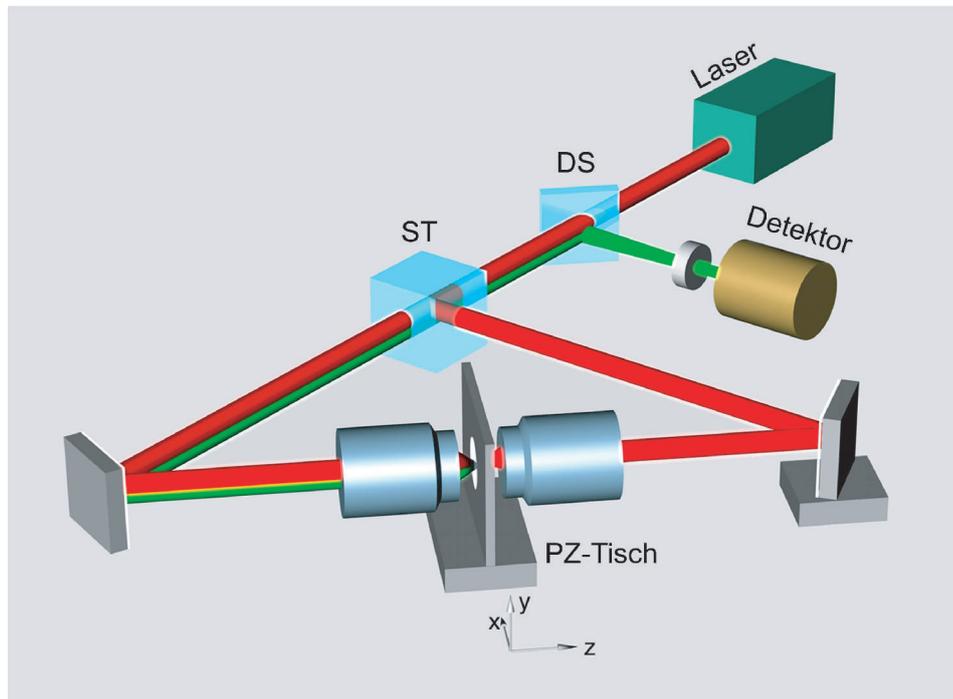


Abb. 1 Schema eines 4Pi-Mikroskops

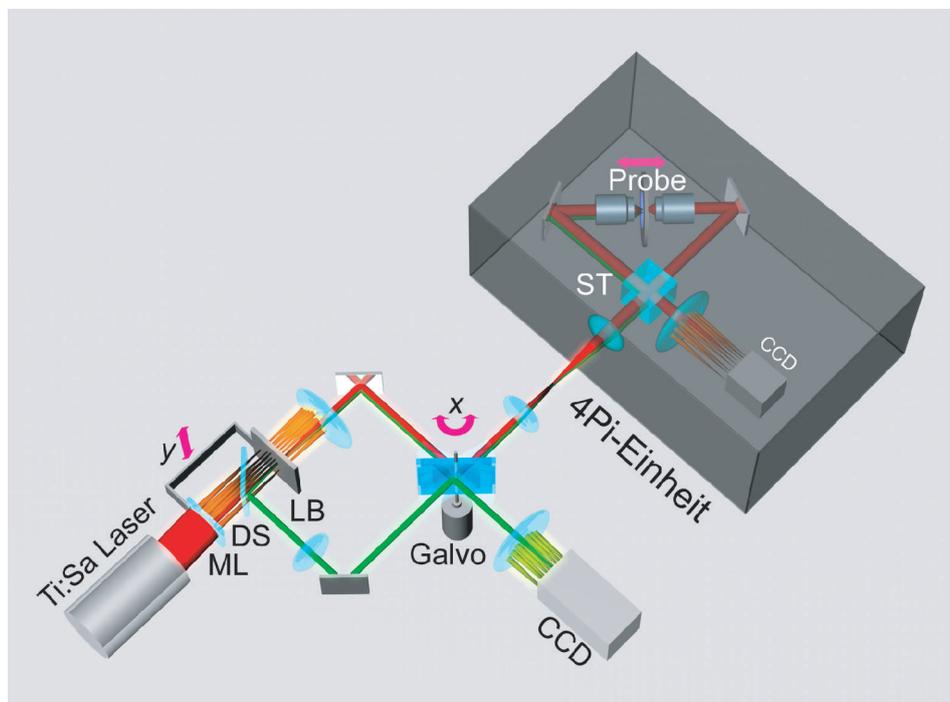


Abb.2 MMM-4Pi-Mikroskop

Abb. 1 Schema eines 4Pi-Mikroskops. Der aufgeweitete Laserstrahl wird durch den Strahlteilerwürfel (ST) in zwei Teilstrahlen gleicher Intensität aufgespalten. Die beiden Teilstrahlen werden auf die Rückapertur zweier sich gegenüberstehender Objektive abgebildet und auf den selben Punkt innerhalb der Probe fokussiert. Die Fluoreszenz wird mit dem linken Objektiv gesammelt, mit einem dichroitischen Spiegel (DS) ausgefiltert, auf eine Lochblende abgebildet und anschließend detektiert (Egner, 2002).

Abb. 2 MMM-4Pi-Mikroskop. Ein Mikrolinsen-Gitter (ML) teilt einen gepulsten Laserstrahl in mehrere Teilstrahlen auf, die jeweils durch eine korrespondierende Lochblende (LB) fokussiert werden. Die Foki der Mikrolinsen werden über eine Scanner-Optik (x-Richtung) in die Probe abgebildet. Das Fluoreszenzsignal wird über das linke Objektiv auf die Lochblenden zurück abgebildet, mit dem dichroitischen Spiegel (DS) vom Laserlicht getrennt und anschließend über die CCD-Kamera gerastert. Das Rastern in y-Richtung erfolgt durch Verschiebung der miteinander verbundenen Mikrolinsen- und Lochblenden-Gitter. Die z-Richtung wird durch Verschieben der Probe gerastert (Egner et al., 2002).

2.2.2.6 Multifokale-Multiphotonen-Mikroskopie (MMM-4Pi)

Bei der MMM-4Pi-Mikroskopie wird in lateraler Richtung statt der Probe der Strahl gerastert. Ein Mikrolinsengitter teilt hierzu einen gepulsten Laserstrahl in mehrere Teilstrahlen auf. Durch die gleichzeitige Datenaufnahme an mehreren Punkten muss die 4Pi-Beleuchtungs-PSF („*point spread function*“, Punktbildfunktion) über das gesamte Bildfeld konstant gehalten werden.

Diese Variante hat zwei wesentliche Vorteile: Zum einen kann deutlich schneller gerastert werden, da die relativ große Masse der Probe und ihrer Halterung nicht bewegt werden muss, zum anderen wird die Probe weniger beeinflusst.

Abbildung 2 zeigt die schematische Anordnung des verwendeten MMM-4Pi-Mikroskops. Es ist aus zwei Modulen aufgebaut: Das erste Modul besteht aus der 4Pi-Einheit, die dem in Abbildung 1 dargestellten 4Pi-Mikroskop entspricht. Das Rastern der Probe in axialer Richtung geschieht, wie bei handelsüblichen konfokalen Mikroskopen auch, durch Verschieben der Probe in axialer Richtung. Beim zweiten Modul handelt es sich um die multifokale Raster-Einheit. Hier wird der Strahl des gepulsten Titan-Saphir-Lasers ($\lambda = 890 \text{ nm}$) (Mira 900, Coherent, Palo Alto, CA) durch ein Mikrolinsen-Gitter der Brennweite $f = 10.7 \text{ mm}$ in eine Gruppe von Teilstrahlen aufgespalten, die durch einen dichroitischen Spiegel hindurch auf korrespondierende Lochblenden fokussiert werden. Diese Foki stellen die Punktlichtquellen zur Erzeugung der 4Pi-Beleuchtungs-PSF innerhalb der Probe dar. Nachdem sie die Lochblenden passiert haben, werden alle Teilstrahlen durch eine achromatische Linse auf den Spiegel eines Galvanometerscanners gelenkt. Mit den folgenden Linsen wird die Oberfläche des Galvanometerspiegels in die Rückapertur der Objektive (HCX PL APO 63x / 1.20 W, Leica, Wetzlar) abgebildet. Durch schnelles Verkippen des Galvanometerspiegels wird die x-Achse gerastert.

Das Rastern der Probe in y-Richtung erfolgt durch lineare Verschiebung der miteinander verbundenen Mikrolinsen- und Lochblenden-Gitter. Das Fluoreszenzsignal wird mit dem linken Objektiv gesammelt und zurück auf die Lochblenden abgebildet. Auf Grund der Rückabbildung über den Galvanometerspiegel werden die Lochblenden, unabhängig von der schnellen Rasterbewegung wieder getroffen. Ihr Durchmesser entspricht mit $50\ \mu\text{m}$ der 1.25 fachen rückabgebildeten Airy-Scheibe des Fluoreszenzlichts. Die Lochblenden erfüllen hier eine doppelte Funktion: Zum einen filtern sie bereits bei der Beleuchtung Restaberrationen, die von den Mikrolinsen stammen, aus, zum anderen unterdrücken sie durch die leichte Konfokalisierung bei der Detektion die Nebenmaxima. Das Fluoreszenzsignal wird mit einem dichroitischen Langpassfilter vom Laserlicht getrennt, kollimiert, auf die ebenfalls reflektierende Rückseite des Galvanometerspiegels gelenkt und über den „*thinned back illuminated*“ Chip der CCD-Kamera (MicroMax 512EBFT, Princeton Instruments, Trenton) gerastert. Durch die Verwendung der Rückseite des Galvanometerspiegels erfolgt die Rasterung des Bildes vollkommen synchron zur Rasterung innerhalb der Probe.

Die CCD-Kamera innerhalb der 4Pi-Einheit wird verwendet, um die Foki innerhalb der Probe zur Deckung zu bringen. Das Bild, das man auf ihr sieht, entspricht dem Bild der vom rechten Objektiv erzeugten Foki, die mit dem linken Objektiv betrachtet werden, und dem vom linken Objektiv erzeugten Foki, die mit dem rechten Objektiv betrachtet werden. Stellt man die Kamera in die richtige Ebene, so sieht man genau dann ein scharfes Bild, wenn die Fokalebene der beiden Objektive axial in der gleichen Position sind. Um die Foki lateral zur Deckung zu bringen, müssen ihre Bilder zur Deckung gebracht werden. Somit kann mit dieser Kamera vor jeder Datenaufnahme die relative Justierung der beiden Objektive kontrolliert und notfalls korrigiert werden.

Die Geschwindigkeit der Datenaufnahme des MMM-4Pi-Mikroskops hängt stark vom Grad der Parallelisierung und somit von der Anzahl der Foki ab. Die Zahl der Foki ist wiederum von der Intensität des Laserlichts abhängig. Ein modengekoppelter Titan-Saphir-Laser hat eine Durchschnittsleistung von 1-2 W. Auf Grund der starken Verluste, die man durch die Säuberung des Laserstrahlprofils, die Entfernung von Aberrationen und die nicht ideale Transmission/Reflektion der optischen Komponenten hat, können nur 30 mW an Laserleistung in der Probe genutzt werden. Die durchschnittliche Leistung pro 4Pi-Fokus liegt bei 1-2 mW. Je nach Anwendung und benötigter Leistung pro Fokus werden bei diesem System 16-64 Fokusse simultan durch die Probe gerastert.

2.2.2.7 Durchführung der Experimente am MMM-4Pi

Der mitochondriale Tubulusdurchmesser wurde an Zellen folgender Stämme bestimmt: Wildtyp, *MATa* (Y00000) und *MAT α* (Y10000), Δ *dnm1*, *MATa* (Y01489), Δ *fis1*, *MATa* (Y01458), Δ *mdv1 MATa* (Y01311) und Δ *fis1*, diploid (Y31458). Aus der Kreuzung dieser Stämme mit Δ *dnm1*, *MAT α* (Y11489), Δ *fis1*, *MAT α* (Y11458), Δ *mdv1 MAT α* (Y11311) und Δ *fzo1*, *MAT α* (Y13319) entstanden folgende Deletionsmutanten, deren mitochondrialer Tubulusdurchmesser ebenfalls gemessen worden ist: Δ *dnm1/\Delta**mdv1*, Δ *fis1/\Delta**mdv1*, Δ *fis1/\Delta**dnm1*, Δ *mdv1/\Delta**fzo1*, Δ *dnm1/\Delta**fzo1*, Δ *fis1/\Delta**fzo1*, Δ *fis1/\Delta**mdv1/\Delta**dnm1*. Von den Doppeldeletionsmutanten ohne *Fzo1p* und den Einzeldelentionsmutanten wurden durch Behandlung mit Ethidiumbromid rho^o-Mutanten hergestellt. Der Durchmesser der Mitochondrientubuli dieser Zellen wurde ebenfalls bestimmt. Die mitochondriale Matrix sämtlicher Zellen war mit mtGFP (pVT100U-mtGFP) markiert.

Alle Stämme wurden in YPD angezogen. Die Stämme Wildtyp, *MATa* (Y00000) und *MAT α* (Y10000), Δ *dnm1*, *MATa* (Y01489), Δ *fis1*, *MATa* (Y01458), Δ *mdv1 MATa* (Y01311) und Δ *fis1*, diploid (Y31458) zusätzlich auch in YPG.

Für die Probenpräparation wurden die Zellen bei 3000 U/min pelletiert, mit 1 %iger Agarose in PBS vermischt und auf ein mit fluoreszierenden Kügelchen beschichtetes Deckglas von 146-149 μ m Dicke aufgebracht. Die fluoreszierenden Kügelchen (505/515) mit einem Durchmesser von 0.2 μ m waren zuvor mit Hilfe von Poly-L-Lysin auf die Deckgläser geklebt worden. Anhand der fluoreszierenden Kügelchen konnte die Höhe der Nebenmaxima sowohl während einer Aufnahme, als auch bei der Auswertung der Daten über den gesamten Bildbereich leicht ermittelt werden. Auf die andere Seite der Probe kam ein halbseitig verspiegeltes Deckglas. Durch leichten Druck auf das Deckgläschen wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. Am Spiegel konnte die Interferenz der beiden Teilstrahlen in der Probe überprüft.

Die hohen Anforderungen bei dieser Messtechnik an die Dicke der Deckgläser hat folgenden Grund: Da Wasserobjektive (HCX PL APO 63 x / 1.20 W, Leica, Wetzlar) verwendet werden, treten auf jeder Seite Medienübergänge auf: Von Wasser $n = 1.334$ auf Glas $n = 1.518$ und umgekehrt. Wegen des hohen Aperturwinkels und der Dicke der Deckgläser würden die Foki so stark aberrieren, dass Mikroskopie unmöglich wäre.

Aus diesem Grund werden die Wellenfronten vorab so aberriert, dass nach den

Deckgläsern eine Wellenfront ohne Aberrationen vorliegt. Mittels eines Korrekturrings kann der Grad der Vorkorrektur auf die jeweilige Deckglasdicke eingestellt werden. Diese Einstellung muss auf +/- 2 μm genau sein.

Die Kanten der Probe wurden mit Nagellack abgedichtet, um ein Eintrocknen zu verhindern. Die Probe konnte so bis zu einer Stunde verwendet werden. Zur Befestigung der Probe im MMM-4Pi-Mikroskop wurde ein spezieller Halter benutzt. Der Halter besteht aus einem identischen Ober- bzw. Unterteil. Beide haben für die Deckgläser eine runde Aussparung in der Mitte. Die Probe wurde am Unterteil mit Hilfe von Nagellack fixiert, bevor dieses mit dem Oberteil verschraubt wurde.

Die dreidimensionalen Bilder entstanden durch Aufnahme der Fokalebene (xy-Bilder) und durch Bewegung der Probe in axialer Richtung um 0.08 μm . Die Belichtungszeit lag bei 1000 msec pro Schnittebene. Die Pixelgröße betrug 0.019 μm^2 . Alle Aufnahmen wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22°C durchgeführt.

Um mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung des Durchmessers der Mitochondrien ausschließen, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt:

1) Könnte der zur Abdichtung der Proben verwendete Nagellack einen schädlichen Einfluss auf die Mitochondrien haben, z.B. durch Eindringen von Lösungsmittel in die Probe? Zur Klärung dieser Frage wurden zwei identische Proben angefertigt, von denen nur eine mit Nagellack versiegelt wurde. Nach einer Stunde bei 22°C wurde der Zustand der Mitochondrien untersucht. In beiden Proben waren die Mitochondrien intakt. Auch die Helligkeit des GFP war gleich gut. Nagellack hat also unter den beschriebenen Versuchsbedingungen keinen schädigenden Einfluss auf die Mitochondrien von *S. cerevisiae*.

2) Mitochondrien sind dynamische Organellen. Eine Bewegung des Netzes kann bei einer Aufnahmezeit von ca. zwei Minuten pro Mitochondrium daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Bewegung des Tubulus in axialer Richtung könnte aber die Bestimmung des Durchmessers verfälschen. Um die Größenordnung einer eventuellen tubulären Bewegung in axialer Richtung abschätzen zu können, wurden $\Delta fis1$ -Zellen (Y01458) mit mtGFP (pVT100U-mtGFP) vier Mal hintereinander im Abstand von jeweils fünf Minuten aufgenommen und anschließend der Tubulusdurchmesser bestimmt. Bei keiner Zelle unterschieden sich die vier Werte voneinander. Eine Verfälschung der Messergebnisse durch axiale Tubulusbewegungen scheint daher unwahrscheinlich.

2.2.2.8 Durchmesserbestimmung von mitochondrialen Tubuli

Im Gegensatz zu konventionellen konfokalen Systemen besteht die PSF („*point spread function*“, „Punktbildfunktion“, Abbild einer punktförmigen Lichtquelle) des 4Pi-Mikroskops aus einem engen Hauptmaximum, das in Richtung der optischen Achse (z) von zwei Nebenmaxima eingeschlossen wird. Die axiale Auflösung ist durch die Ausdehnung des Hauptmaximums bestimmt. Aufgrund der Form der PSF hat man die Möglichkeit, mit dem 4Pi-Mikroskop den Durchmesser von Strukturen, die deutlich kleiner als die Wellenlänge sind, sehr genau zu bestimmen. Das Verhältnis zwischen der Höhe der ersten Nebenmaxima und der Minima zwischen Haupt- und erstem Nebenmaximum ist ein direktes Maß für den Durchmesser D . Das 4Pi-Intensitätsprofil $M(z)$ durch einen lateral ausgerichteten Stab hat aufgrund seines endlichen Durchmessers D höhere Minima als die z -Antwort $I(z)$ eines Objekts mit kleinst möglichem Durchmesser, z.B. ein fluoreszierendes Kügelchen oder eine fluoreszierende Schicht (siehe Abb. 3).

Bezeichnen wir mit $\overline{M \min(D)}$ den Mittelwert von $M(z)$ der Minima zwischen Haupt- und erstem Nebenmaximum und mit $\overline{M \max(D)}$ den Mittelwert der ersten Nebenmaxima, so ist ihr Verhältnis gegeben durch:

$$v(D) = \frac{\overline{M \min(D)}}{\overline{M \max(D)}} = \frac{M \min, r(D) + M \min, l(D)}{M \max, r(D) + M \max, l(D)}$$

Die Mittelwerte werden gewählt, um weniger anfällig gegenüber Störungen zu sein.

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen weiß man, dass die Tubuli der Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae* nahezu stabförmig sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass GFP frei in der mitochondrialen Matrix diffundieren kann (Nunnari, 1997; Partikian, 1998). Daher kann man Hefemitochondrien mit mtGFP als gleichmäßig markierte Stäbe betrachten. Das Volumen der Cristastrukturen ist im Verhältnis zum Gesamtvolumen der Matrix vernachlässigbar. Diese Voraussetzungen reichen aus, um die beschriebene Methode für die Bestimmung des Tubulusdurchmessers anzuwenden.

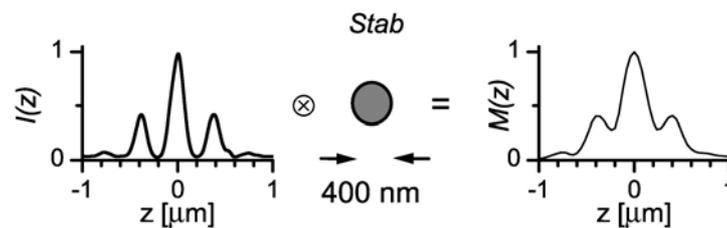


Abb. 3 Das axiale Intensitätsprofil $M(z)$ durch einen Stab hat aufgrund seines endlichen Durchmessers D höhere Minima als die z -Antwort $I(z)$. Das Verhältnis zwischen der Höhe der ersten Nebenmaxima und der Höhe der Minima zwischen Haupt- und erstem Nebenmaximum ist ein direktes Maß für den Durchmesser D (Egner, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien von insgesamt 20 Hefestämmen ermittelt. Pro Stamm wurden mindestens 36 geeignete Messpunkte innerhalb von mindestens 4 Mitochondrien gesucht. Die Auswahl der Messpunkte beschränkte sich dabei auf die tubulären Bereiche und zwar auch bei den Stämmen, die Mitochondrien mit fischernetzähnlichen Netzbereichen aufwiesen.

Grundsätzlich kann der Tubulusdurchmesser an den Stellen bestimmt werden, an denen sich das axiale Intensitätsprofil bestimmen lässt. In xz - bzw. yz -Projektionen der aufgenommenen Daten erkennt man solche Stellen daran, dass das Hauptmaximum und die beiden ersten Nebenmaxima deutlich getrennt voneinander in drei parallelen Linien verlaufen (siehe Abb. 4). Wichtig ist außerdem, dass der Tubulus nicht schräg in axialer Richtung liegt. Dies würde zu falschen Ergebnissen führen.

Für die Auswertung der Daten wurde das Computerprogramm „ImSpector“ verwendet.

2.2.2.9 Bildbearbeitung: lineare und nichtlineare Entfaltung

Aufgrund der Nebenmaxima der 4Pi-PSF enthalten 4Pi-Aufnahmen deutlich erkennbare Scheinbilder. Damit diese entfernt werden können, darf sich die Form der 4Pi-PSF während der Datenaufnahme nicht ändern (Invarianz der PSF), d.h., die relative Phase der interferierenden Foki zueinander muss während der gesamten Datenaufnahme konstant bleiben. Eine weitere notwendige Bedingung ist, dass die Höhe der ersten Nebenmaxima geringer als 50% der Höhe des Hauptmaximums ist.

Zur Entfernung der Scheinbilder werden mathematische Filter eingesetzt. Diese Filter benötigen keine Informationen über das aufgenommene Objekt, sondern lediglich Angaben über die Höhe und die Lage der Nebenmaxima. Mit Hilfe des 4Pi-Intensitätsprofils eines Objekts mit kleinst möglichem Durchmesser wird das aufgenommene Bild abgetastet und die Nebenmaxima aus den Datensätzen entfernt. Im ersten Schritt wird hierzu die lineare Dreipunkt-Entfaltung angewendet. Im zweiten Schritt die nichtlineare Entfaltung nach Richardson-Lucy (van Kempen et al., 1997; Nagorni et al., 1998).

Die axiale Auflösung des MMM-4Pi ist mit 150 ± 10 nm um einen Faktor 4.5 höher als die des konfokalen Mikroskops (700 ± 25 nm). Durch nichtlineare Entfaltung kann sie auf 100 nm gesteigert werden.

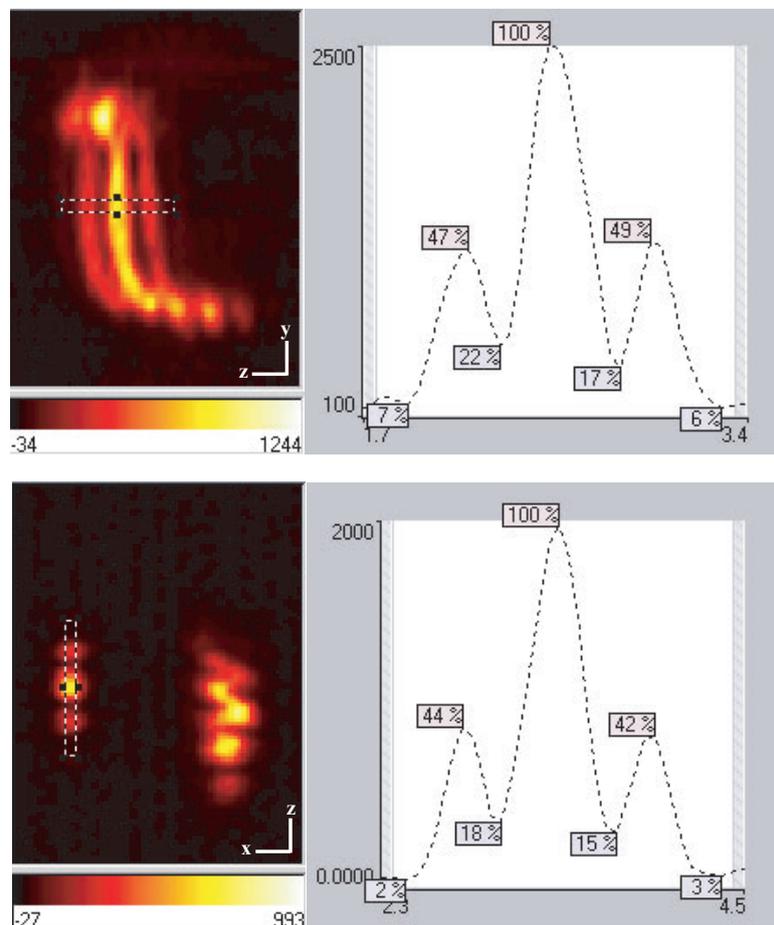


Abb. 4 zy- und zx- Bilder der mit GFP markierten mitochondrialen Matrix von *S. cerevisiae*. Das Hauptmaximum und die ersten Nebenmaxima des Intensitätsprofils verlaufen deutlich voneinander getrennt in drei parallelen Linien. Wichtig für die Bestimmung des Tubulusdurchmessers ist außerdem, dass der Tubulus nicht schräg in axialer Richtung liegt. Rechts sind die axialen Intensitätsprofile gemittelt über die markierten Bereiche zu sehen. Für die Durchmesserbestimmung wurde das Computerprogramm „ImSpector“ verwendet. Maßstab: jeweils $0.5 \mu\text{m}$

3. Ergebnisse

3.1 Mitochondrien sind dynamische Strukturen

3.1.1 Das mitochondriale Netzwerk passt sich der Kohlenstoffquelle an

Eine einfache Möglichkeit die Struktur der Mitochondrien zu verändern, ist der Wechsel des Wachstumsmediums. Hefezellen stellen nach Wechsel der Kohlenstoffquelle ihren Energiemetabolismus um (Gancedo, 1998) und ändern dabei Größe und Verzweigungsgrad ihrer Mitochondrien (Egner et al., 2002; Pon und Schatz, 1991; Stevens, 1977). Die mitochondriale Dynamik spielt in diesem Zusammenhang vermutlich eine wichtige Rolle.

Um die morphologische Anpassungsfähigkeit darzustellen, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Wildtypzellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wuchsen entweder in glucosehaltigem Medium (YPD) oder in glycerinhaltigem Medium (YPG) bis zur log-Phase heran. Anschließend wurden Zellen entnommen und mit 1 %iger Agarose auf einen Objektträger aufgebracht. An einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Mitochondrien anhand des Verzweigungsgrades ihrer Netze in drei Kategorien eingeteilt: 1) Netzwerk mit hohem Verzweigungsgrad, 2) Netzwerk mit mittlerem Verzweigungsgrad und 3) Netzwerk mit niedrigem Verzweigungsgrad.

Die Struktur der Wildtypmitochondrien ist bei gleicher Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium weitgehend homogen: 90 % der in YPG gewachsenen Wildtypzellen haben stark verzweigte Mitochondrien, wohingegen 90 % der in YPD gewachsenen Zellen Mitochondrien mit einem einfachen Netzwerk haben (siehe Tab. 1 und Abb. 5, A-C). Die mitochondriale Morphologie wurde bei insgesamt 455 Zellen bestimmt.

Sind $\Delta fis1$ -Mutanten ebenso wie Wildtypzellen dazu in der Lage, die Morphologie ihrer Mitochondrien verschiedenen Kohlenstoffquellen anzupassen? Unter dieser Fragestellung wurden $\Delta fis1$ -Zellen, die mtGFP exprimierten, bis zur log-Phase in YPD oder YPG angezogen und danach die Morphologie ihrer Mitochondrien in drei Kategorien eingeteilt: 1) Mitochondrien mit großen fischernetzartigen Bereichen, 2) Mitochondrien mit mittelgroßen fischernetzartigen Bereichen und 3) Mitochondrien ohne bzw. mit sehr kleinen netzartigen Bereichen, die stattdessen tubuläre Strukturen aufweisen.

In glycerinhaltigem Medium zeigen ungefähr die Hälfte der $\Delta fis1$ -Zellen Mitochondrien mit großen oder mittelgroßen fischernetzähnlichen Bereichen (siehe Tab. 1 und Abb. 5, D und E). Man findet aber ebenfalls Mitochondrien mit überwiegend tubulärer Morphologie (siehe Abb. 5, E). Der Anteil der Mitochondrien mit fischernetzähnlichen Bereichen sinkt bei $\Delta fis1$ -Zellen, die in glucosehaltigem Medium angezogen wurden auf 16 %. Die mitochondriale Morphologie wurde bei insgesamt 1580 Zellen bestimmt. Die Struktur der $\Delta fis1$ -Mitochondrien ist bei gleicher Kohlenstoffquelle im Wachstumsmedium also heterogen. Die beiden Populationen sind aber klar anhand der Verteilung der drei Strukturtypen voneinander unterscheidbar. Die Struktur der Mitochondrien der $\Delta fis1$ -Zellen ist demzufolge ebenso wie die der Wildtypzellen von der Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums abhängig.

In diesem Zusammenhang soll als nächstes der zeitliche Rahmen für die Anpassung der mitochondrialen Morphologie an eine neue Kohlenstoffquelle untersucht werden.

3.1.2 Die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks nach Beginn der Glucoserepression ist in $\Delta fis1$ -Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen verzögert

Im Folgenden soll untersucht werden, wann nach Beginn der Glucoserepression die Umstrukturierung der Mitochondrien beginnt und wie lange dieser Vorgang dauert.

Wildtypzellen und $\Delta fis1$ -Zellen wuchsen bis zur log-Phase in YPG heran und wurden anschließend in YPD transferiert. Die Zellkultur verblieb im Inkubationsschüttler bei 30°C. Jede Stunde wurden Zellen entnommen und mit 1 %iger Agarose auf einen Objektträger aufgebracht. Am Fluoreszenzmikroskop konnte die Struktur des mitochondrialen Netzes analysiert und in die unter 3.1.1 beschriebenen Kategorien eingeteilt werden. Die Umstrukturierung der Mitochondrien wurde solange verfolgt, bis die überwiegende Zahl der Hefen Mitochondrien mit der typischen Morphologie für in glucosehaltigem Medium gewachsene Zellen zeigten. Bei Wildtypzellen war dies nach ca. drei Stunden der Fall, bei $\Delta fis1$ -Zellen nach ca. vier Stunden. Insgesamt wurde die mitochondriale Morphologie von 340 Wildtypzellen pro Stunde bzw. von 450 $\Delta fis1$ -Zellen pro Stunde bestimmt. Um ein objektives Ergebnis zu gewährleisten, erfolgte die Auszählung als Blindprobe.

Wie bereits erwähnt, zeigt der Großteil der Wildtypzellen in glycerinhaltigem Medium stark verzweigte Mitochondrien. Bereits nach einer Stunde in glucosehaltigem Medium sinkt dieser Anteil auf ein Drittel aller Zellen ab. Nach drei Stunden weisen weniger als 10 % der Zellen stark verzweigte Netze auf (siehe Tab. 2).

Bei $\Delta fis1$ -Zellen findet ebenfalls eine Anpassung der Morphologie der Mitochondrien an veränderte Kohlenstoffquellen statt. Im Gegensatz zum Wildtyp bleiben aber die Anteile der verschiedenen Morphologietypen der $\Delta fis1$ -Population mehr als zwei Stunden nach dem Transfer in YPD konstant. Erst nach vier Stunden hat sich mehr als die Hälfte der Mitochondrien mit großen fischernetzähnlichen Bereichen in einfachere Strukturen umgewandelt (siehe Tab. 2). Die strukturelle Anpassung der Mitochondrien nach Wechsel der Kohlenstoffquelle ist in Zellen ohne Fis1p also deutlich verlangsamt.

Nachfolgend soll der Verlauf der mitochondrialen Metamorphose unter Glucoserepression genauer untersucht werden.

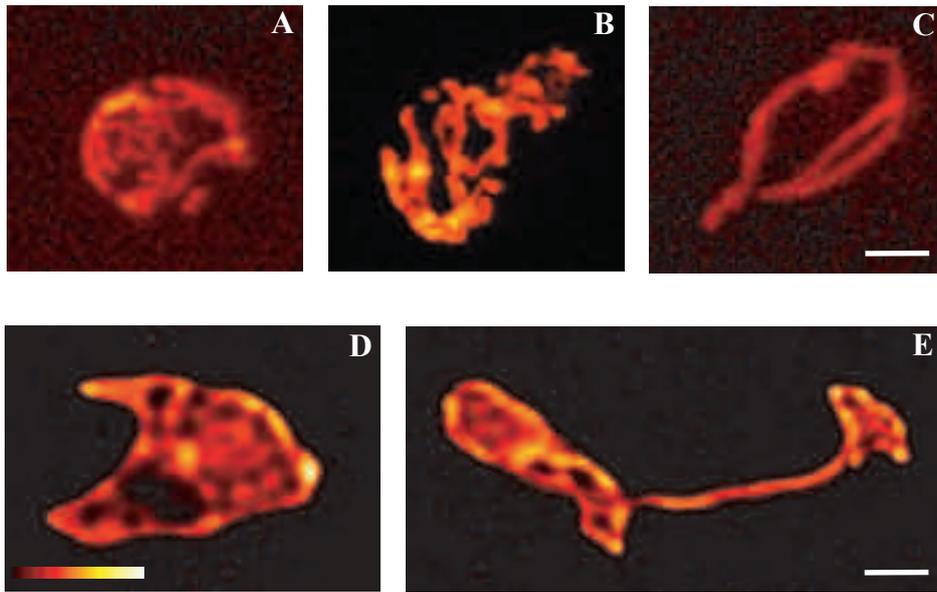
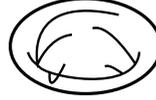


Abb. 5 Wildtypmitochondrien zeigen bei gleicher Kohlenstoffquelle eine homogene Morphologie, $\Delta fis1$ -Mitochondrien dagegen eine heterogene. **A-C** Wildtypzellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG bzw. YPD wachsen gelassen. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. **A, B** In YPG gewachsene Wildtypzellen zeigen **A** vorwiegend hochverzweigte Netze und **B** teilweise mittel stark verzweigte Netze. **C** In YPD-Medium gewachsene Wildtypzellen haben gering verzweigte Netzwerke. **D, E** $\Delta fis1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. **D** Mitochondrium mit großem fischernetzartigem Bereich **E** Linkes Mitochondrium mit fischernetzartigem Bereich mittlerer Größe, rechtes Mitochondrium mit überwiegend tubulären Strukturen. Diese morphologische Bandbreite bleibt beim Wechsel der Kohlenstoffquelle erhalten. Es verschieben sich aber die Anteile der verschiedenen Morphologietypen zueinander. Maßstab für A-C: 2 μm , für D-E: 1 μm

Tab. 1 Mitochondriale Morphologie von Wildtyp- und $\Delta fis1$ -Zellen

Wildtyp			
	hoher Verzweigungs- grad (%)	mittlerer Verzweigungs- grad (%)	geringer Verzweigungs- grad (%)
			
Wachstumsmedium			
YPG (n = 340)	89	10	1
YPD (n = 115)	0	5	95
$\Delta fis1$			
	große Netzbereiche (%)	kleine Netzbereiche (%)	tubuläre Strukturen (%)
			
Wachstumsmedium			
YPG (n = 1085)	23	28	49
YPD (n = 495)	6	10	84

Tab. 2 Mitochondriale Morphologie von Wildtyp- und $\Delta fis1$ -Zellen nach Wechsel der Kohlenstoffquelle

Wildtypzellen			
Wachstumsbedingungen	hoher Verzweigungs- grad (%)	mittlerer Verzweigungs- grad (%)	geringer Verzweigungs- grad (%)
log-Phase (n = 340) in YPG	89	10	1
1 h in YPD (n = 340)	31	54	15
2 h in YPD (n = 345)	20	61	19
3 h in YPD (n = 340)	8	57	35
$\Delta fis1$			
Wachstumsbedingungen	große Netzbereiche (%)	kleine Netzbereiche (%)	tubuläre Strukturen (%)
log-Phase (n = 440) in YPG	22	30	48
1 h in YPD (n = 460)	22	30	48
2 h in YPD (n = 450)	19	31	50
3 h in YPD (n = 470)	14	30	56
4 h in YPD (n = 465)	9	28	63

3.1.3 Zeitliche Dynamik der Metamorphose des mitochondrialen Netzes von Wildtypzellen

Wie läuft die Umstrukturierung der Mitochondrien nach Wechsel der Kohlenstoffquelle ab? Wir nehmen an, dass bei der Anpassung der mitochondrialen Struktur an veränderte Stoffwechselbedingungen Tubulusteilungen und Fusionen eine zentrale Rolle spielen.

Um dreidimensionale Informationen über die mitochondriale Dynamik zu erhalten, wurden konkokale Langzeitaufnahmen durchgeführt. Wildtypzellen mit mtGFP wuchsen bis zur log-Phase in YPG heran, wurden in YPD transferiert und für weitere 45 Minuten im Schüttler bei 30°C inkubiert. Danach war die Mehrzahl der Zellen am Beginn des Umwandlungsprozesses (siehe Tab. 2). Um die Dynamiken der Hefemitochondrien über einen längeren Zeitraum hinweg beobachten zu können, müssen die Zellen kontinuierlich mit Nährstoffen versorgt werden. Deshalb wurde eine Mikroskopiekammer mit Zu- und Abfluss für das Nährmedium benutzt. Die Zellen wurden mit einer Lösung 1 %iger Agarose in einem Teil YPD und zwei Teilen PBS vermischt und in die Kammer gefüllt. Die Hefezellen ließen sich auf diese Weise bis zu fünf Stunden aufnehmen. Sie zeigten in der Kammer ein normales Teilungsverhalten, verdoppelten sich also ungefähr alle 90 Minuten. An den Mitochondrien waren bis zum Ende der Aufnahmezeit keine Anzeichen von Fragmentation zu erkennen (siehe Anhang, Abb. A1).

Der Begriff „Separation“ der mitochondrialen Matrix wird nachfolgend benutzt, um eine deutliche Diskontinuität der mit GFP markierten mitochondrialen Matrix zu beschreiben. Eine solche Separation kann auf eine Matrixkonstriktion, eine Teilung der inneren Membran oder auf eine Tubulusteilung, also eine Teilung der äußeren und der inneren Membran, zurückzuführen sein (siehe Abb. 6).

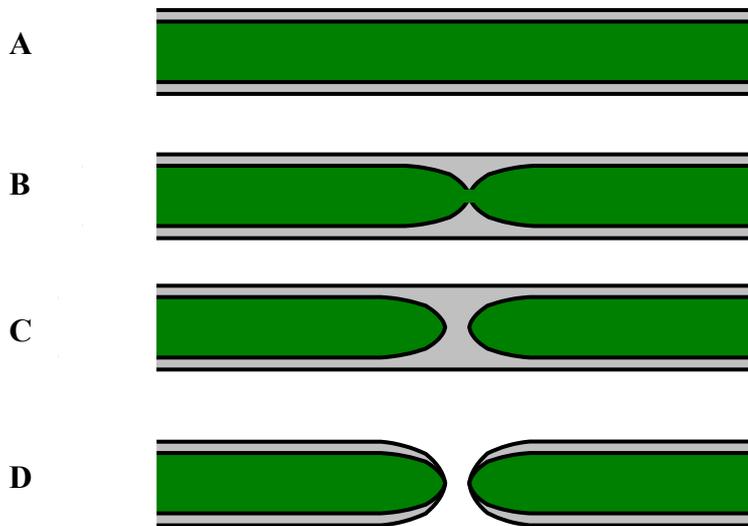


Abb. 6 Sowohl Matrixkonstriktionen als auch Teilungen der inneren Membran oder Tubulusteilungen sind in Mitochondrien mit GFP markierter Matrix, als Matrixseparationen zu erkennen. **A** mitochondrialer Tubulus **B** Bei einer Matrixkonstriktion kommt es zu einer Einschnürung der mitochondrialen Matrix. Der Matrixraum bleibt dabei kontinuierlich. Die entstehende „Matrixbrücke“ ist aber kleiner als die Auflösung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. **C** Eine Teilung der inneren Membran ohne Teilung der äußeren Membran führt zu einer Diskontinuität der mitochondrialen Matrix. **D** Teilen sich äußere und innere Membran, spricht man von einer Tubulusteilung.

Die für die Beobachtung der Metamorphose ausgewählten Wildtypzellen wiesen die typische stark verzweigte Mitochondrienmorphologie für Zellen auf, die in glycerinhaltigem Medium gewachsen sind. Die Gestaltänderung der Mitochondrien konnte bei insgesamt 15 Wildtypzellen über maximal fünf Stunden verfolgt werden. Dazu wurde alle 78 s eine dreidimensionale Aufnahme gemacht. Neun der Zellen teilten sich während der Aufnahmeperiode. In jeder sich teilenden Zellen ist eine deutliche Vereinfachung des mitochondrialen Netzwerks erkennbar. Die restlichen sechs Zellen teilten sich während des Untersuchungszeitraums nicht. Trotz fortlaufender Matrixseparationen und Fusionen vereinfachten sich deren Mitochondrien nicht. Diese Beobachtungen lassen einen Zusammenhang zwischen der Umstrukturierung des Organells und dem Zellzyklus vermuten.

Das Muster der mitochondrialen Metamorphose ist bei allen sich teilenden Wildtypzellen gleich. Repräsentative Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten dieses Prozesses aufgenommen wurden, sind in Abbildung 7, A-C dargestellt. Kurze Zeit nach Entstehung der Tochterzelle dringt ein mitochondrialer Tubulus aus der Mutterzelle ein.

Er bleibt zunächst mit dem Muttermitochondrium verbunden. Dieser Tubulus bewegt sich in den ersten 10-15 Minuten ungerichtet in der Tochterzelle und bindet schließlich an den Zellkortex. Während des Wachstums der Tochterzelle bleibt das sich kontinuierlich vergrößernde Mitochondrium an diesem Punkt angeheftet. Die Verbindung zwischen Tochter- und Muttermitochondrium bleibt solange bestehen, bis das Tochtermitochondrium fast die Größe des Muttermitochondriums erreicht hat. Tubuli, die die beiden Mitochondrien verbinden, sind häufig der Ort für Fusionen und Teilungen (siehe Abb. 7, D-L und Anhang, Abb. A1). Das Mitochondrium der Tochterzelle scheint nach jeder Teilung in diesem Bereich größer zu werden. Vermutlich werden auf diese Weise mitochondriale Tubuli von der Mutter in die Tochterzelle transportiert. Begleitet wird dieser Vorgang von fortlaufenden Matrixseparationen und Fusion in der Mutterzelle. Zusätzlich finden viele Tubulusteilungen statt, denen eine Fusion an einer anderen Stelle folgt (siehe Abb. 7, D-F, oberer Pfeil). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Vereinfachung des Netzwerks unter Glucoserepression durch Tubulusteilungen und Fusionen erfolgt. Durch Lösen von Verzweigungen und anschließender Neuverknüpfung der Tubuli scheinen aus komplexen Strukturen einfachere zu entstehen.

Im Folgenden soll die Umstrukturierung der Mitochondrien von $\Delta fis1$ -Zellen nach Wechsel der Kohlenstoffquelle untersucht werden.

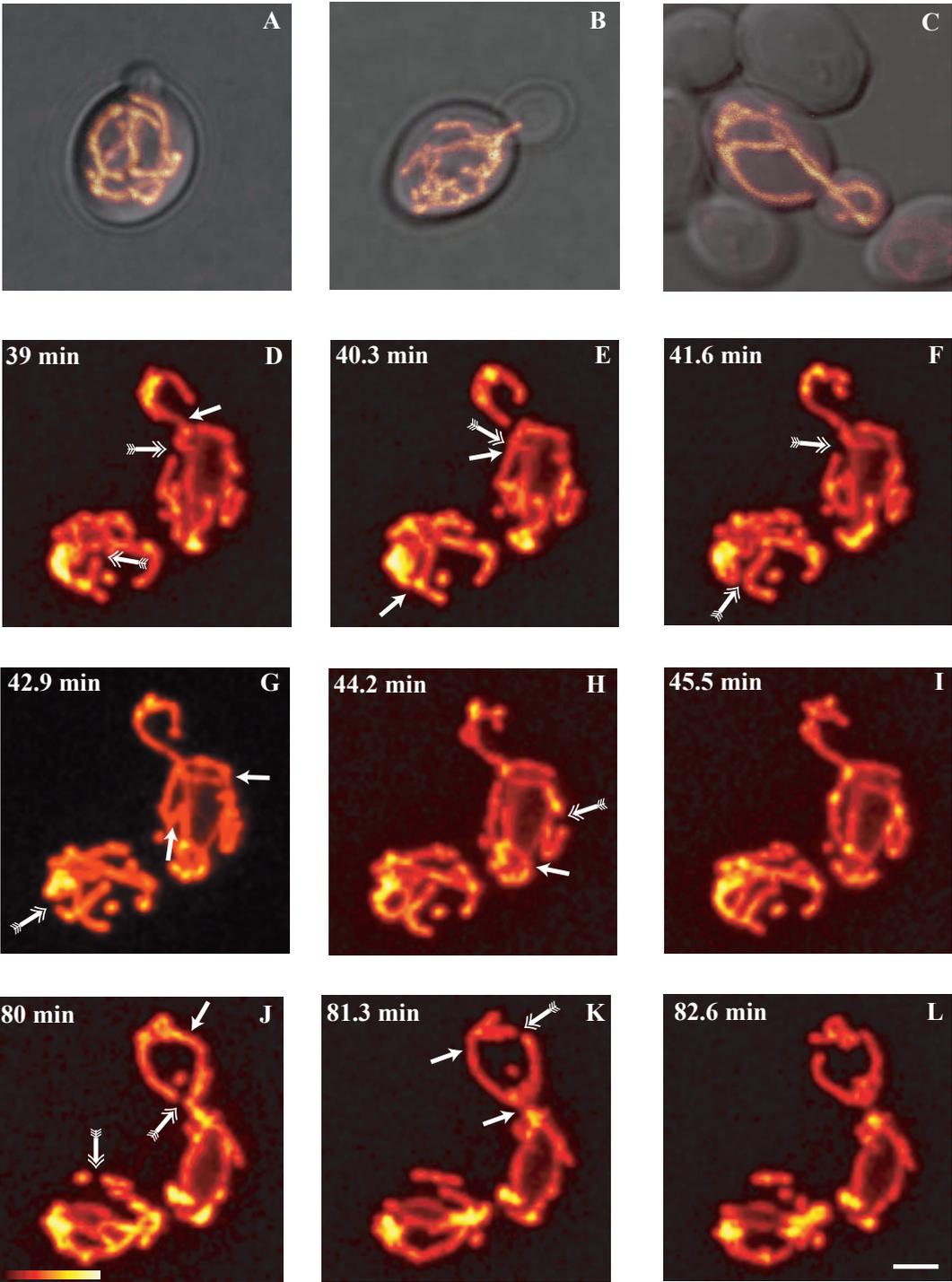


Abb. 7 Umstrukturierung von Wildtypmitochondrien unter Glucoserepression. Wildtypzellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. **A-C** Konfokale Aufnahmen sich teilender Zellen. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit, auf die Hellfeldaufnahmen projiziert worden sind. **D-L** Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Umstrukturierung des mitochondrialen Netzwerks unter Glucoserepression. Dargestellt sind ausgewählte Projektionen der maximalen Helligkeit. Der gesamte Datensatz umfasst 165 dreidimensionale Bilderstapel mit ~ 4000 einzelnen optischen Schnitten. Die Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Matrixseparation stattfindet. Die Doppelpfeile kennzeichnen Stellen, an denen Fusionen zwischen zwei Tubuli stattfinden werden. Das mitochondriale Netzwerk hatte zum Zeitpunkt Null die typische Morphologie von in glycerinhaltigem Medium gewachsenen Zellen.

Der vollständige Datensatz ist im Anhang zu finden (siehe Abb. A1). Maßstab: 2 μm

3.1.4 Die Umstrukturierung des mitochondrialen Netzes von $\Delta fis1$ -Zellen ist begleitet von Tubulusteilungen und Fusionen

Wie läuft die Umstrukturierung der Mitochondrien von $\Delta fis1$ -Zellen unter Glucoserepression ab? Spielen wie bei Wildtypzellen Tubulusteilungen und Fusionen dabei eine Rolle?

Um dreidimensionale Informationen über die mitochondriale Dynamik zu erhalten, wurden konfokale Langzeitaufnahmen durchgeführt. $\Delta fis1$ -Zellen mit mtGFP wuchsen bis zur log-Phase in YPG heran, wurden in YPD transferiert und für weiter 70 Minuten im Schüttler bei 30°C inkubiert. Danach war die Mehrzahl der Zellen am Beginn des Umwandlungsprozesses (siehe Tab. 2). Die für die Aufnahmen ausgewählten Zellen wiesen Mitochondrien mit großen netzartigen Bereichen auf. Die Beobachtung der mitochondrialen Gestaltänderung erfolgte bei insgesamt 17 $\Delta fis1$ -Zellen. Einige davon konnten über drei Stunden beobachtet werden. Dazu wurde alle 78 s bis 116 s eine dreidimensionale Aufnahme gemacht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Vereinfachung“ eine Größenreduktion des netzartigen Bereiches zugunsten einer Vergrößerung der tubulären Bereiche.

Drei der Zellen teilten sich während der Aufnahmezeit und zeigten gleichzeitig eine Vereinfachung der Mitochondrienstruktur. Sieben Zellen vereinfachten ihr mitochondriales Netzwerk ohne Anzeichen einer beginnenden Teilung. Folglich scheint in Zellen ohne Fis1p die Umstrukturierung unabhängig vom Zellzyklus zu sein. Im Falle der Zellteilung dringt, ähnlich wie beim Wildtyp, ein mitochondrialer Tubulus aus der Mutterzelle in die Tochterzelle ein (siehe Abb. 8, A-C). Dieser bleibt mit dem Netz der Mutterzelle verbunden. Später bindet der Tubulus an einen Punkt des Zellkortex der Tochterzelle, wo er während des weiteren Wachstums angeheftet bleibt.

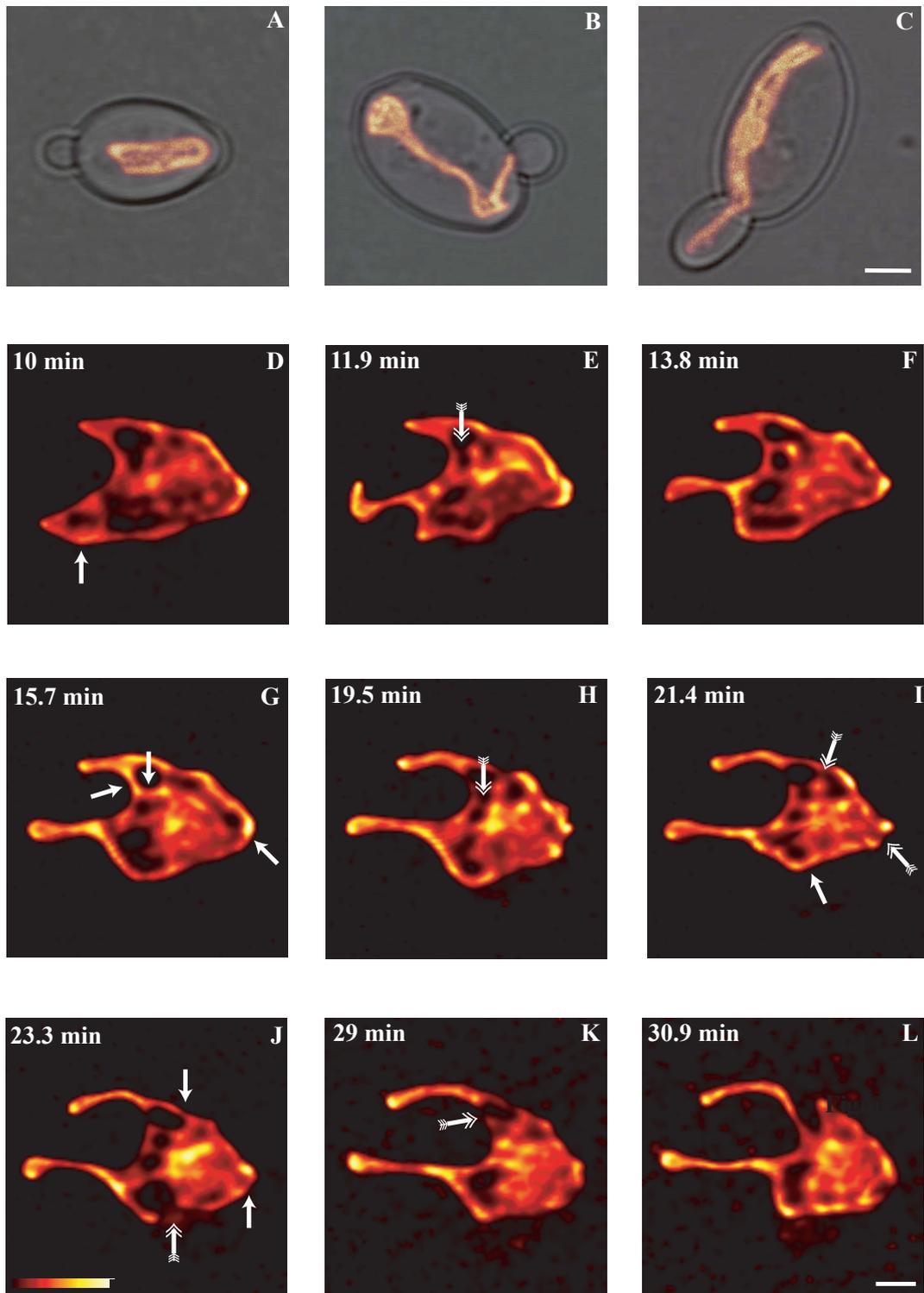


Abb. 8 Umstrukturierung von $\Delta fis1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta fis1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. **A-C** Konfokale Aufnahmen sich teilender Zellen. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit, auf die Hellfeldaufnahmen projiziert worden sind. **D-L** Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Umstrukturierung des mitochondrialen Netzwerks unter Glucoserepression. Dargestellt sind ausgewählte Projektionen der maximalen Helligkeit. Der gesamte Datensatz umfasst 99 dreidimensionale Bilderstapel mit ~ 2200 einzelnen optischen Schnitten. Die Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Matrixseparation stattfindet wird. Die Doppelpfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Fusion zwischen zwei Tubuli stattfindet wird. Das mitochondriale Netzwerk zeigte zum Zeitpunkt Null eine fischernetzähnliche Morphologie. Der vollständige Datensatz ist im Anhang zu finden (siehe Abb. A2). Maßstab für A-C: 2 μm , für D-L: 1 μm

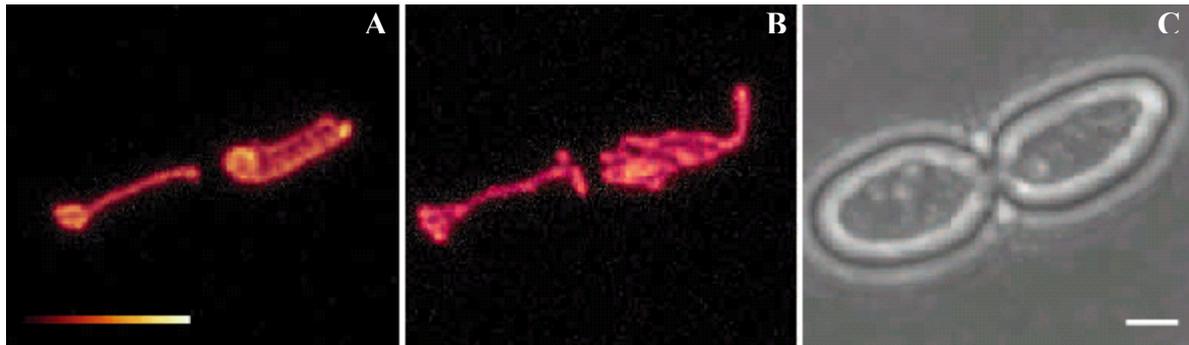


Abb. 9 Die Umstrukturierung von $\Delta fis1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression ist nicht unmittelbar vom Zellzyklus abhängig. $\Delta fis1$ -Mutanten, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. **A, B** Konfokale Aufnahmen zweier Zellen vor und nach der Metamorphose. Gezeigt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. **A** Das mitochondriale Netzwerk der rechten Zelle zeigt zum Zeitpunkt Null eine fischernetzähnliche Morphologie, während bei dem Mitochondrium der linken Zelle die tubulären Strukturen überwiegen. **B** Nach 135 Minuten in YPD ist eine deutliche Reduktion des fischernetzähnlichen Bereichs des rechten Mitochondriums zugunsten tubulärer Strukturen zu erkennen, ohne dass eine Zellteilung stattgefunden hat. **C** Hellfeldaufnahme nach 135 Minuten. Der gesamte Datensatz umfasst 14 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 210 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 15 Minuten. Maßstab: 2 μm

Die Metamorphose des Netzes unter Glucoserepression folgt in allen untersuchten $\Delta fis1$ -Zellen einem ähnlichen Muster und zwar unabhängig von der Zellteilung (siehe Abb. 8; D-L, Abb. 9 und Anhang, Abb. A2). Überraschenderweise kann man zahlreiche Separationen der mit GFP markierten Matrix beobachten. Diese finden sowohl im Inneren des gefensterten Netzbereiches (siehe Abb. 8, E) als auch in den Außenbereichen statt. Meistens folgt der Matrixseparation eine Fusion an derselben Stelle des Tubulus. Bei diesen Ereignissen kann es sich sowohl um eine Matrixkonstriktion, eine Teilung der inneren Membran oder eine Tubulusteilung handeln (siehe Abb. 6).

Manchmal folgt aber auf eine Separation entweder keine Fusion (siehe Abb. 8, D) oder eine Fusion an einer anderen Stelle (siehe Abb. 8, J-L; obere Pfeile). Im zweiten Fall muss der Fusion eine vollständige Tubulusteilung vorausgegangen sein, ansonsten könnte es zu keiner Neuverknüpfung zweier Tubuli kommen.

In diesem Zusammenhang wurden zusätzlich $\Delta fis1$ -Mitochondrien untersucht, deren äußere Membran mit OM45-GFP und deren innere Membran mit DsRed markiert war. Das DsRed war an die Presequenz von Cox4p fusioniert (Bevis und Glick, 2002). Von den in PMGal gewachsenen Zellen wurde alle zwei Minuten eine dreidimensionale Aufnahme gemacht.

In den Zellen kann man gleichzeitige Separationen der inneren und der äußeren Membran erkennen (siehe Abb. 10, D-J). Auch ohne Fis1p finden also komplette mitochondriale Tubulusteilungen statt.

Folgt auf eine Separation eine Fusion an der gleichen Stelle handelt es sich mutmaßlich um eine Konstriktion der Matrix ohne Beteiligung der mitochondrialen Membranen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden zunächst $\Delta fis1$ -Mutanten untersucht, deren äußere Mitochondrienmembran mit GFP und deren mitochondriale Matrix mit DsRed markiert war. Das GFP war an das COOH-Ende des äußeren Membranproteins OM45 (Cervený, 2001) fusioniert, das DsRed an die Presequenz der Untereinheit 9 der F₀-ATPase von *Neurospora crassa*. Die Zellen wuchsen in PMGal bis zur log-Phase heran. An einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden dreidimensionale Aufnahme dieser zweifach markierten Mitochondrien gemacht.

Meistens findet man eine strikte Kollokalisierung von OM45-GFP und DsRed. Gelegentlich beobachtet man jedoch eine durchgängige mit OM45-GFP markierte äußere Membran, die eine separierte mit DsRed markierte Matrix umschließt (siehe Abb. 10, A-C).

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Konstriktion der Matrix in $\Delta fis1$ -Mutanten ohne Beteiligung der äußeren Membran stattfinden kann.

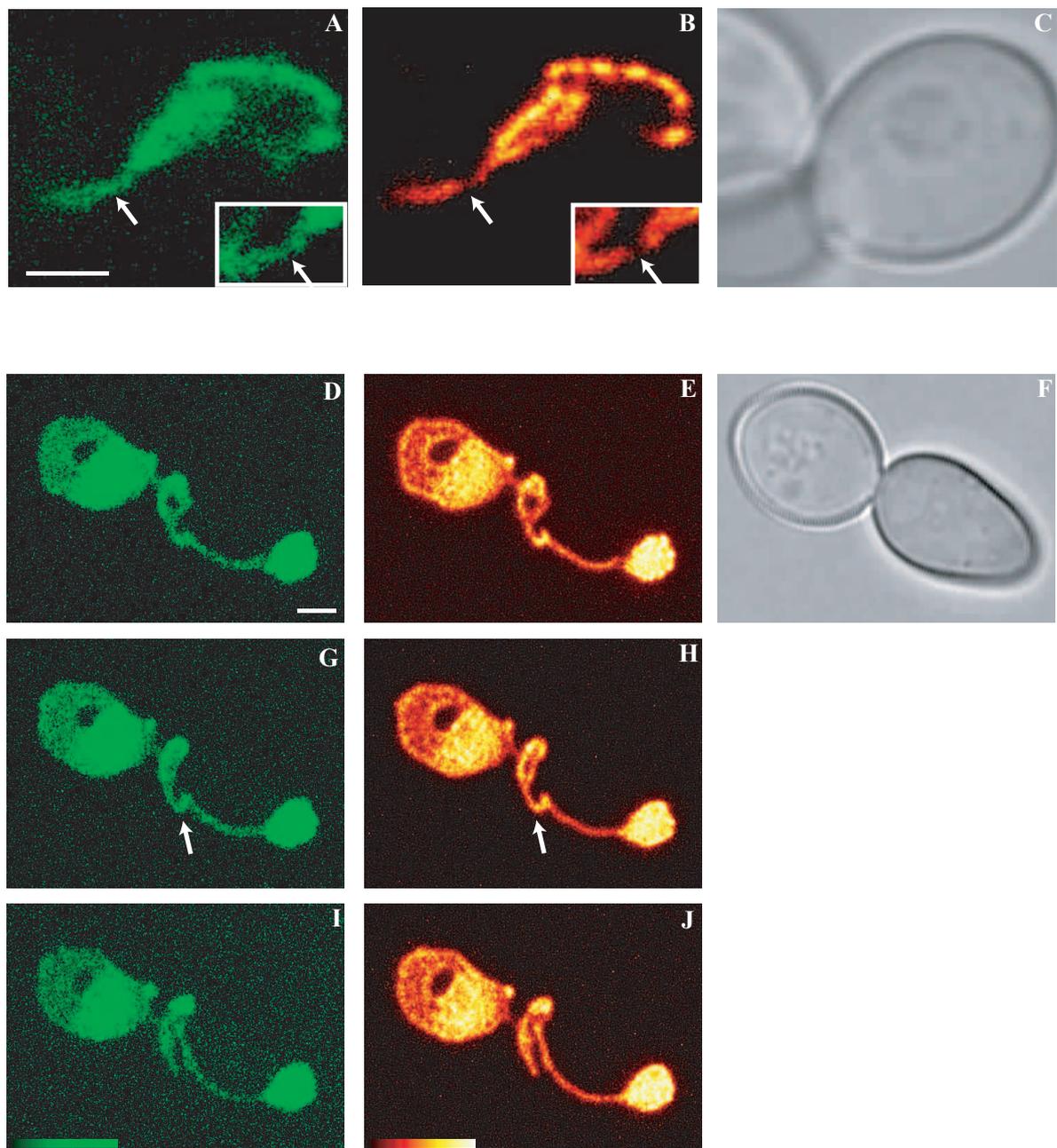


Abb. 10 Teilung der äußeren Membran in $\Delta fisI$ -Zellen. **A-C** $\Delta fisI$ -Mutanten, deren Matrix mit DsRed und deren äußere Membran mit OM45-GFP markiert war, wurden in PMGal-Medium bis zur log-Phase wachsen gelassen. **A** OM45-GFP, **B** DsRed in der Matrix und **C** Hellfeldaufnahme. Gezeigt sind einzelne optische Schnitte. Der Pfeil kennzeichnet eine Matrixseparation ohne Teilung der äußeren Membran. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen Projektionen der maximalen Helligkeit der Separationsstelle. **D-J** $\Delta fisI$ -Mutanten, deren innere Membran mit DsRed und deren äußere Membran mit OM45-GFP markiert war, wurden in PMGal bis zur log-Phase wachsen gelassen. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. **D, G, I** OM45-GFP; **E, H, J** DsRed in der inneren Membran, **F** Hellfeldaufnahme. **D-J** Langzeitaufnahmen. Der Zeitabstand zwischen zwei Aufnahmen betrug zwei Minuten. Die Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen Tubulusteilungen stattfinden werden. Man beachte die Kolokalisation von DsRed (innere Membran) und OM45-GFP (äußere Membran). Maßstab: 2 μm

(Jakobs und Martini et al., 2003)

Auch die innere Membran scheint an Matrixkonstruktionen nicht beteiligt zu sein: In den oben erwähnten $\Delta fisI$ -Mutanten, deren äußere Membran mit OM-GFP und deren innere Membran mit DsRed markiert war, konnte keine Teilung der inneren Membran ohne eine Teilung der äußeren Membran beobachtet werden. Da die äußere Membran wie oben gezeigt nicht an Matrixkonstruktionen beteiligt zu sein scheint, spricht dieses Ergebnis dafür, dass auch die innere Mitochondrienmembran nicht an Matrixkonstruktionen beteiligt ist.

Auf Grund dieser Resultate wird im Folgenden anstatt von Matrixseparationen von Matrixkonstruktionen gesprochen. Der Begriff Separation wird nur noch als Sammelbegriff für Matrixkonstruktionen und Tubulusteilungen verwendet.

Als nächstes soll die Frequenz von Separations- und Fusionsereignissen untersucht werden.

3.1.5 Die Frequenz von Matrixseparationen und Fusionen ist in $\Delta fisI$ - und Wildtyp Mitochondrien vergleichbar

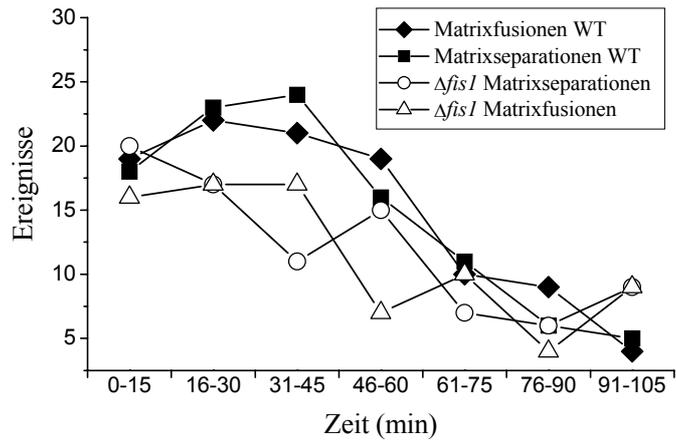
Ändert sich die Frequenz von Matrixseparationen und Fusionen in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle? Und wenn ja, sind Unterschiede zwischen Wildtypzellen und $\Delta fisI$ -Mutanten erkennbar? Anhand von Langzeitaufnahmen soll die Frequenz der Separationen und Fusionen in einzelnen Wildtyp- und $\Delta fisI$ -Zellen, während der durch Glucoserepression induzierten Umgestaltung des Mitochondriums erfasst werden. Dazu wurde alle 78 s bzw. 116 s (Wildtyp- bzw. $\Delta fisI$ -Zellen) eine dreidimensionale Aufnahme gemacht. Mit Hilfe des Computerprogramms „ImSpector“ wurde nacheinander jede dreidimensionale Aufnahme der Serie geöffnet und jeder der 20-25 optischen Schnitte einzeln betrachtet. Im Vergleich mit der entsprechenden Schnittebene der vorhergehenden bzw. nachfolgenden dreidimensionalen Aufnahme konnte der größte Teil der Matrixseparationen und Fusionen gezählt werden. Dabei wurden nur Ereignisse in der Mutterzelle berücksichtigt. Separationen wurden nur dann als solche gezählt, wenn die Helligkeitsintensität in dem entsprechenden Bereich nach Abzug des Hintergrunds Null betrug. Möglicherweise sind einige Ereignisse übersehen worden, vor allem im Zentrum der fischernetzähnlichen Bereiche der $\Delta fisI$ -Mitochondrien. Daher fällt die Auszählung der Separationen und Fusionen tendenziell eher zu gering aus.

Im Folgenden soll exemplarisch an einer Wildtypzelle und einer $\Delta fis1$ -Zelle (siehe Anhang, Abb. A1 und A2) die Frequenz von Matrixseparationen und Fusionen unter Glucoserepression gezeigt werden: Über einen Zeitraum von 105 Minuten finden 104 Separationen und 103 Fusionen in der Wildtypzelle und 85 Separationen und 80 Fusionen in der $\Delta fis1$ -Zelle statt (siehe Abb. 11, A). Für beide Zellen gilt, dass das Verhältnis von Matrixseparation und Fusion ausgeglichen ist. In der Wildtypzelle sinkt im Verlauf der Metamorphose die Gesamtzahl von Matrixseparation und Fusion pro Minute von 2.5 auf 0.6. Ähnlich sind die Werte in Mitochondrien ohne Fis1p. Die Werte sinken von 2.4 auf 1.2 Separationen und Fusionen pro Minute (siehe Abb. 11, A). Um sicherzustellen, dass die analysierten Zellen repräsentativ sind, wurden Separationen und Fusionen in drei weiteren Zellen erfasst und zwar 15 Minuten lang an charakteristischen Zeitpunkten der Glucoseadaption (siehe Abb. 11, B und C):

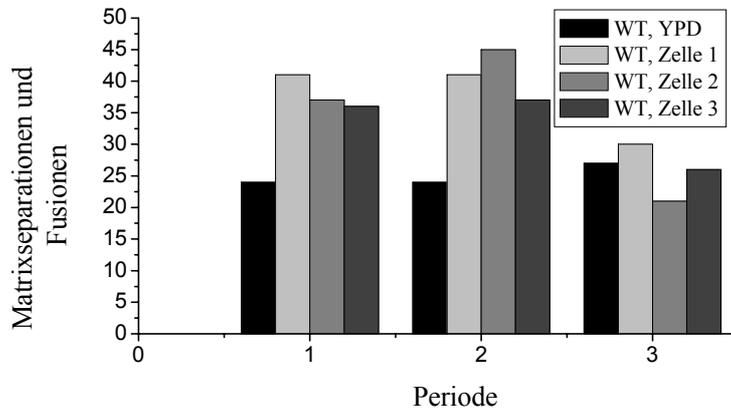
- 1) Vor Beginn der Glucoserepression. Die Mitochondrien zeigen das typische stark verzweigte Netzwerk für in glycerinhaltigem Medium gewachsene Zellen.
- 2) Nach der Hälfte der Zeitdauer, die für die Metamorphose von stark verzweigten Mitochondrien zu einfachen Strukturen benötigt wird.
- 3) Nach Ende der Umstrukturierung. Der Zeitpunkt, ab dem die Mitochondrien gering verzweigte Netze zeigen, die typisch sind für Zellen, die in glucosehaltigem Medium wachsen. Die Zahl der Separations- und Fusionsereignisse sind sowohl für Wildtypzellen als auch für $\Delta fis1$ -Mutanten über den gesamten Zeitraum betrachtet annähernd gleich hoch.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Frequenz der Separationen und Fusionen in den analysierten Wildtyp- und $\Delta fis1$ -Zellen unter Glucoserepression sinkt. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Absinken in der Zahl der Matrixseparationen und -fusionen ein charakteristisches Merkmal für den Prozess der Vereinfachung des mitochondrialen Netzwerks unter Glucoserepression ist. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass durch Lösen von Verzweigungen und anschließender Neuverknüpfung aus komplexen Netzwerken einfachere entstehen. In Mitochondrien von Wildtypzellen, die kontinuierlich in glucosehaltigem Medium gewachsen sind, bleibt die Frequenz der Separationen und Fusionen im selben Zeitraum konstant bei ungefähr 1.7 Ereignissen pro Minute (siehe Abb. 11, B). Das ausgeglichene Verhältnis von Separationen und Fusionen könnte darüber hinaus ein wichtiger Hinweis dafür sein, dass es sich bei dem Vereinfachungsprozess nach Glucoserepression vorwiegend um einen Umbau der Netzstruktur und nicht um einen Abbau von Tubuli handelt.

A



B



C

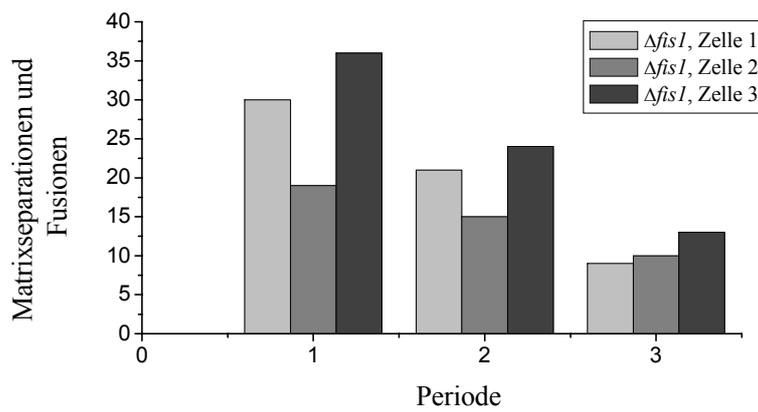


Abb. 11 Frequenz der Matrixseparationen und Fusionen während des Umstrukturierungsprozesses unter Glucoserepression. **A** Es wurden alle erkennbaren Separationen und Fusionen der mit GFP markierten Matrix einer Wildtyp- und einer $\Delta fis1$ -Zelle über einen Zeitraum von 105 Minuten gezählt. Am Zeitpunkt Null entsprach die mitochondriale Morphologie der von typischen in glycerinhaltigem Medium gewachsenen Zellen. Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes zeigten beide Zellen Mitochondrien mit deutlich vereinfachten Strukturen. **B, C** Matrixseparationen und Fusionen wurden für jeweils 15 Minuten an drei charakteristischen Zeitpunkten der mitochondrialen Metamorphose erfasst: Periode 1) vor Beginn der Umstrukturierung, Periode 2) nach der Hälfte der für den Umstrukturierungsprozess benötigten Zeit und Periode 3) am Ende der Umstrukturierung. Dabei wurden nur Ereignisse in der Mutterzelle berücksichtigt. **B** Wildtypzellen. Als Kontrolle dienten Wildtypzellen, die in YPD bis zu log-Phase gewachsen waren und anschließend in frisches YPD transferiert wurden. **C** $\Delta fis1$ -Zellen.

Bei einem Abbau der Verzweigungen wäre es naheliegend, dass die Zahl der Separationsereignisse höher ist, als die der Fusionen. Im Folgenden soll untersucht werden, wie sich $\Delta dnm1$ -Zellen unter Glucoserepression verhalten.

3.1.6 Die Zahl der Tubulusteilungen ist in $\Delta dnm1$ -Mitochondrien merklich reduziert

Eine Schlüsselfunktion bei der Teilung der äußeren Membran wird der GTPase Dnm1p zugeschrieben (Bleazard et al., 1999; Otsuga et al., 1998; Sesaki und Jensen, 1999). $\Delta dnm1$ -Mutanten gelten als defizient in der Teilung der äußeren Membran bzw. in der Tubulusteilung. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden konfokale Langzeitaufnahmen von $\Delta dnm1$ -Zellen unter Glucoserepression gemacht. Dabei wurden dieselben Versuchsbedingungen und Aufnahmeparameter angewendet wie für die Untersuchung von $\Delta fis1$ -Zellen.

Es zeigt sich, dass in $\Delta dnm1$ -Mitochondrien Matrixkonstriktionen und Fusionen stattfinden (siehe Abb. 12, A-J und Anhang, Abb. A3). Im Gegensatz zu $\Delta fis1$ -Mutanten folgt aber in $\Delta dnm1$ -Mitochondrien auf eine Konstriktion immer eine Fusion an derselben Stelle. Zu keinem Zeitpunkt konnten Tubulusteilungen beobachtet werden. Obwohl seltene Teilungen nicht ausgeschlossen werden können, scheinen diese in $\Delta dnm1$ -Zellen zumindest deutlich erschwert zu sein. Im Gegensatz zu Fis1p ist das Vorhandensein von Dnm1p anscheinend essentiell für mitochondriale Tubulusteilungen. Matrixkonstriktionen laufen dagegen sowohl ohne Dnm1p als auch ohne Fis1p ab.

Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich die mitochondriale Dynamik in $\Delta dnm33$ -Mutanten im Vergleich zu Wildtypzellen verändert.

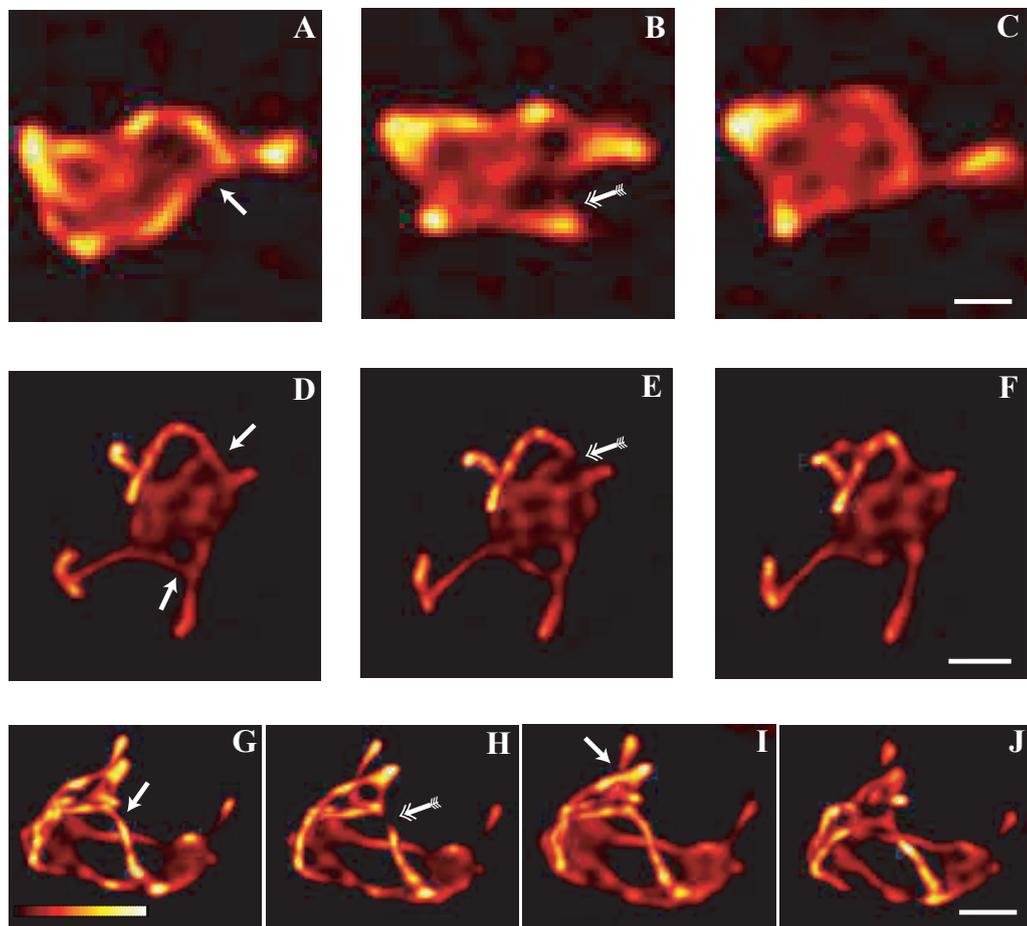


Abb. 12 Umstrukturierung von $\Delta dnm1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta dnm1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Die Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Matrixseparation stattfinden wird. Die Doppelpfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Fusion zwischen zwei Tubuli stattfinden wird. **A-C** Der gesamte Datensatz umfasst 49 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 49 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 60 Sekunden. **D-F** Der gesamte Datensatz umfasst 40 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 40 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 60 Sekunden. **G-J** Der gesamte Datensatz umfasst 43 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 43 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 60 Sekunden. Der vollständige Datensatz für D-F ist im Anhang zu finden (siehe Abb. A3). Maßstab für A-C: 0,5 μm , für D-F: 1 μm , für G-I: 1 μm

3.1.7 In $\Delta mdm33$ -Zellen können sowohl Matrixkonstruktionen als auch Tubulusteilungen beobachtet werden

Mdm33p ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran. Die Mitochondrien der $\Delta mdm33$ -Zellen sind ringförmige Organellen mit langgestreckten dünnen Tubuli. Die Morphologie der $\Delta mdm33$ -Mutanten legt die Vermutung nahe, dass Mdm33p möglicherweise eine Rolle bei der Teilung der inneren Mitochondrienmembran spielt (Messerschmitt et al., 2003). Wie wirkt sich das Fehlen von Mdm33p auf die mitochondriale Dynamik aus? Die Anzucht der Zellen und die Vorbereitung der Kammer erfolgte, wie für $\Delta fis1$ -Zellen beschrieben. Alle 226 Sekunden wurde eine dreidimensionale Aufnahme gemacht.

In $\Delta mdm33$ -Zellen sind diverse Matrixseparationen und darüber hinaus auch Tubulusteilungen ohne nachfolgende Fusion, oder mit anschließender Fusion an anderer Stelle zu beobachten (siehe Abb. 13 und Anhang, Abb. A4). $\Delta mdm33$ -Zellen sind folglich nicht defizient in der Teilung der inneren Membran, denn Tubulusteilungen können nur dann stattfinden, wenn sich beide Membranen gleichzeitig teilen.

Anders die Situation in $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Zellen: Die ebenfalls ringförmigen Mitochondrien dieser Doppeldeletionsmutanten zeigen weder Matrixseparationen noch Tubulusteilungen. Die Anzucht der Zellen und die Vorbereitung der Kammer erfolgte, wie für $\Delta fis1$ -Zellen beschrieben. Alle 116 Sekunden wurde eine dreidimensionale Aufnahme gemacht. Lediglich bei der endgültigen Trennung des Tochtermitochondriums vom Muttermitochondrium kann eine Tubulusteilung beobachtet werden, die aber wahrscheinlich auf ein mechanisches Auseinanderreißen zurückzuführen ist (siehe Abb. 14).

Zusammengefasst lässt sich sagen: Sowohl Zellen ohne Fis1p als auch solche ohne Mdm33p zeigen Matrixseparationen und Tubulusteilungen. Mitochondrien, denen beide Proteine fehlen, dagegen nicht.

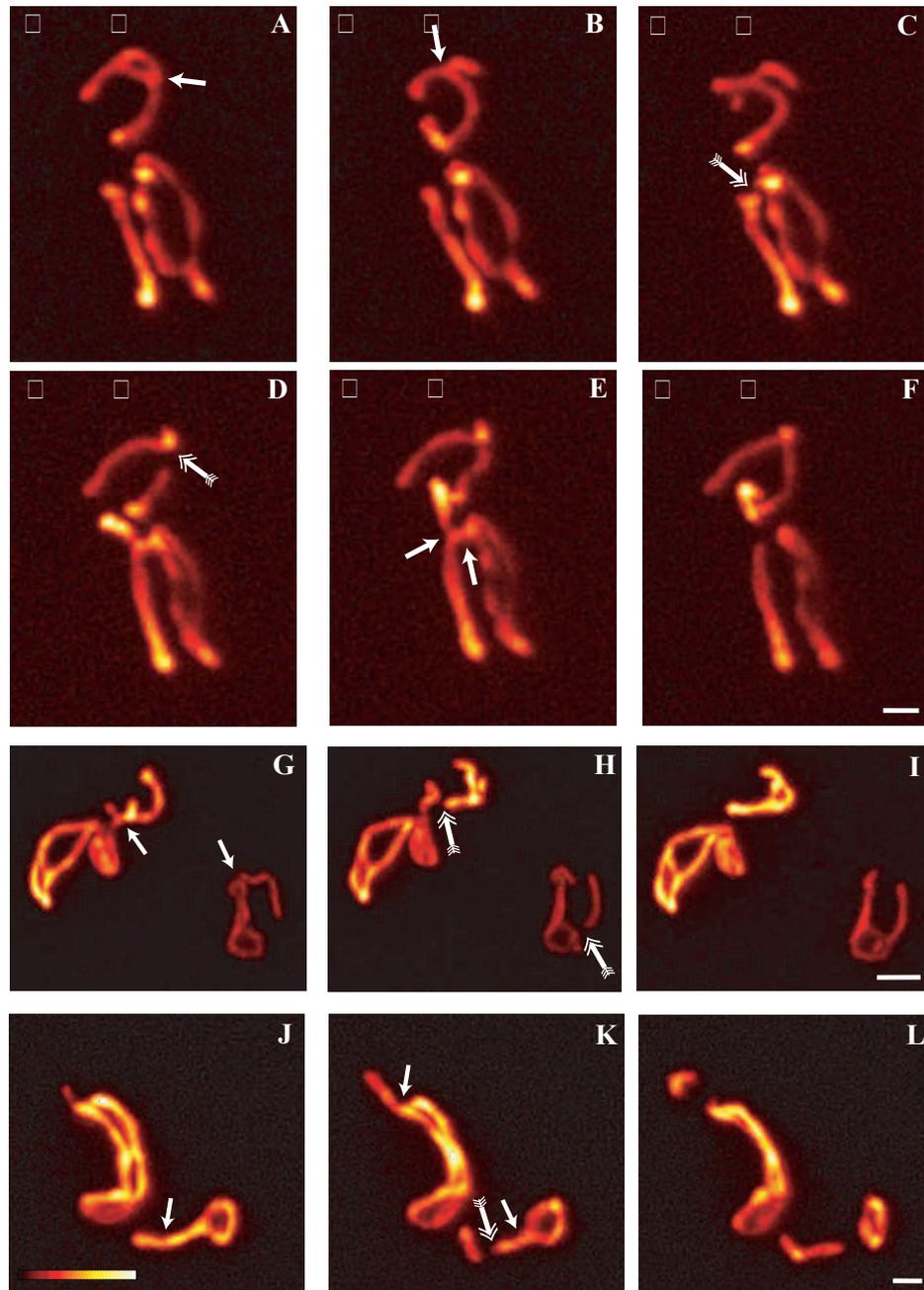


Abb. 13 Umstrukturierung von $\Delta mdm33$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta mdm33$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Die Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Matrixseparation stattfinden wird. Die Doppelpfeile kennzeichnen Stellen, an denen eine Fusion zwischen zwei Tubuli stattfinden wird. **A-F** Der gesamte Datensatz umfasst 62 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 241 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 226 Sekunden. **G-L** Der gesamte Datensatz umfasst 64 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 244 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 226 Sekunden. Der vollständige Datensatz für G-L ist im Anhang zu finden (siehe Abb. A4). Maßstab für A-F: 1 μ m, für G-I: 2 μ m, für J-L: 1 μ m

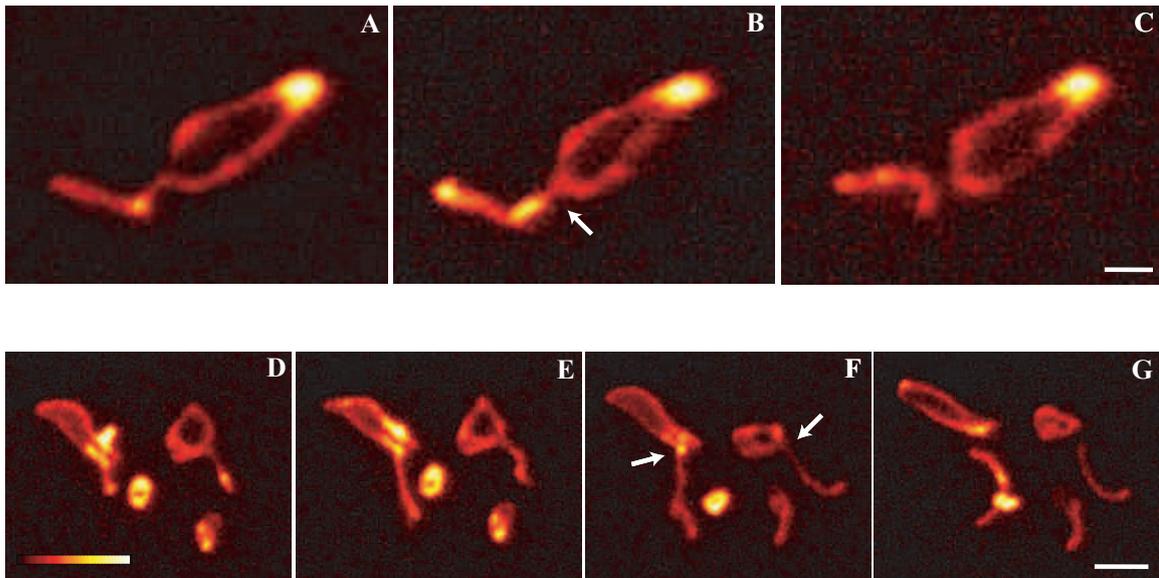


Abb. 14 Umstrukturierung von $\Delta m d m 3 3 / \Delta f i s 1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta m d m 3 3 / \Delta f i s 1$ -Zellen deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Die Pfeile kennzeichnen Stellen, an denen sich das Tochtermitochondrium vom Muttermitochondrium trennen wird. **A-C** Der gesamte Datensatz umfasst 16 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 31 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 226 Sekunden. **D-G** Der gesamte Datensatz umfasst 73 dreidimensionale Bilderstapel, die über einen Zeitraum von 275 Minuten hinweg aufgenommen wurden. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 226 Sekunden. Der vollständige Datensatz für D-G ist im Anhang zu finden (siehe Abb. A5). Maßstab für A-C: 1 μ m, für D-G: 2 μ m

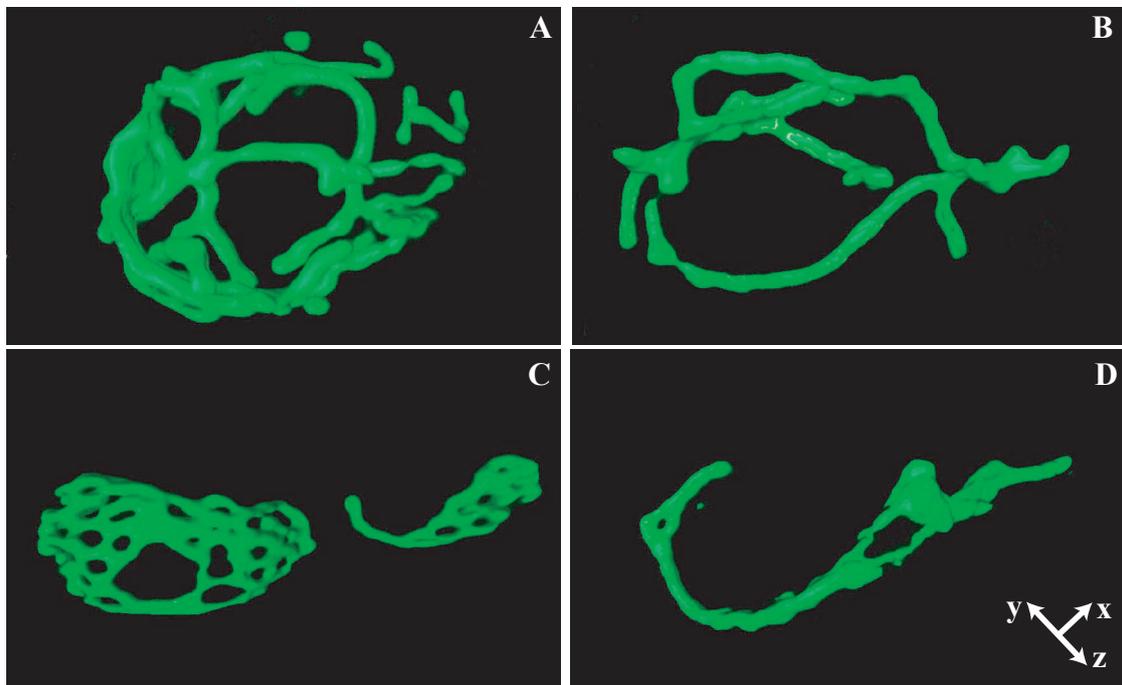


Abb. 15 Oberflächenrekonstruktion der Mitochondrien lebender Wildtypzellen und $\Delta f i s 1$ -Mutanten. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Diploide Wildtypzellen und $\Delta f i s 1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG oder in YPD wachsen gelassen. **A** Mitochondriales Netz einer in YPG gewachsenen Wildtypzelle. **B** Mitochondrium einer in YPD angezogenen Wildtypzelle. **C** $\Delta f i s 1$ -Zellen, deren Mitochondrien große fischernetzartige Bereiche aufweisen. **D** Mitochondrium mit überwiegend tubulären Strukturen einer in YPD angezogenen $\Delta f i s 1$ -Zelle. Maßstab: 1 μ m in jeder Raumrichtung

Neben den beschriebenen Langzeitaufnahmen wurde in dieser Arbeit das neue Verfahren der MMM-4Pi-Mikroskopie (Typ A) angewendet, um weitere Informationen über die an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine zu gewinnen. Zusammen mit der anschließenden Bildbearbeitung erreicht man mit diesem Fluoreszenzmikroskop eine Auflösung von 200 nm in lateraler und 100 nm in axialer Richtung. Dieses Verfahren kann daher für die Bestimmung des mitochondrialen Tubulusdurchmessers an lebenden Hefezellen angewendet werden.

3.2 Durchmesserbestimmung von Mitochondrien

In glycerinhaltigem Medium (YPG) gewachsene Wildtypzellen zeigen mitochondriale Netzwerke mit deutlich mehr Verzweigungspunkten und weisen gleichzeitig einen höheren mitochondrialen Tubulusdurchmesser auf als Wildtypzellen, die in glucosehaltigem Medium (YPD) angezogen worden sind (Egner et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde der Tubulusdurchmesser sowohl von Wildtypzellen als auch von den Deletionsmutanten $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ vor und unter Glucoserepression bestimmt (siehe Abb. 15, Kapitel 3.2.1).

Die Deletionsstämme $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ haben im Vergleich zum Wildtyp Mitochondrien mit einer veränderten Morphologie. Alle drei Stämme weisen Mitochondrien mit fischernetzähnlichen Bereichen auf. Im Abschnitt 3.2.2 soll der Frage nachgegangen werden, ob die Veränderung des Phänotyps bei diesen Deletionsmutanten ebenfalls mit Unterschieden im Tubulusdurchmesser der Mitochondrien korreliert ist. In diesem Zusammenhang wurden durch Kreuzung der Stämme auch Doppeldeletionsmutanten bzw. eine Tripeldeletionsmutante hergestellt und untersucht (siehe Abb. 16, B; Kapitel 3.2.3).

Beeinflusst das an der Fusion beteiligte Protein Fzo1p ebenfalls den Durchmesser der Mitochondrien? Da $\Delta fzo1$ -Zellen fragmentierte Mitochondrien zeigen, ist eine Durchmesserbestimmung an diesen Mutanten nicht möglich. Um trotzdem eine Aussage treffen zu können, wurden Doppeldeletionsmutanten hergestellt, denen neben *FZO1* entweder *FIS1*, *DNM1* oder *MDV1* fehlten (siehe Abb. 16, C). Die Darstellung dieser Ergebnisse ist in Kapitel 3.2.4 zu finden.

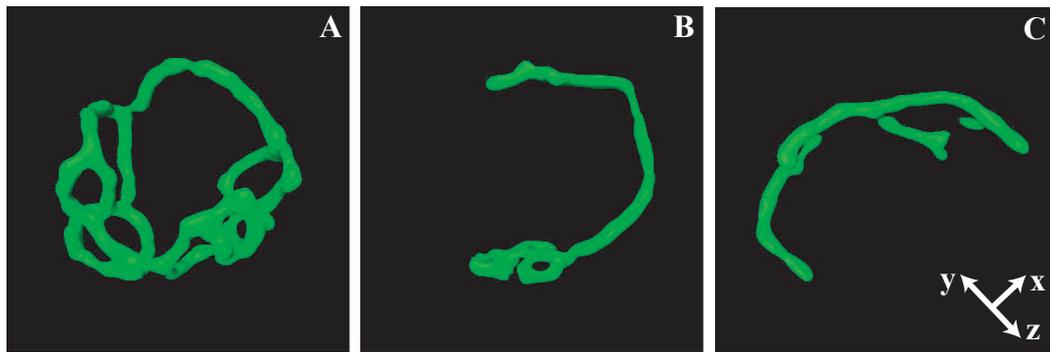


Abb. 16 Oberflächenrekonstruktion der Mitochondrien lebender Wildtypzellen und Deletionsmutanten. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Wildtypzellen, $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ - und $\Delta fis1/\Delta zoo1$ -Mutanten, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG oder in YPD wachsen gelassen. **A** Mitochondrium einer in YPG gewachsenen Wildtypzelle (*MATa*). **B** Mitochondrium einer in YPD gewachsenen $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ -Mutante **C** Mitochondrium einer in YPD gewachsenen $\Delta fis1/\Delta zoo1$ -Mutante. Maßstab: 1 μm in jeder Raumrichtung

In Petite-Mutanten, die durch Behandlung mit Ethidiumbromid entstanden sind, kann keine mitochondriale DNA mehr nachgewiesen werden (Fox et al., 1991). Sie sind atmungsdefizient, da den Zellen Proteine der Atmungskette und des Citratzyklus fehlen. Führt das Fehlen dieser Proteine zu einem verringerten Tubulusdurchmesser? Um dieser Frage nachzugehen, wurde der mitochondriale Durchmesser bei Petite-Mutanten von Wildtypzellen und verschiedenen Deletionsmutanten bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5).

Alle Stämme wurden in YPD angezogen. Die Stämme Wildtyp, *MATa* und *MAT α* ; $\Delta dnm1$, *MATa*; $\Delta fis1$, *MATa*; $\Delta mdv1$, *MAT a* und $\Delta fis1$, diploid zusätzlich auch in YPG. Im Folgenden ist der mittlere Durchmesser der mitochondrialen Tubuli und die Standardabweichung des Mittelwerts angegeben (siehe Abb. 17).

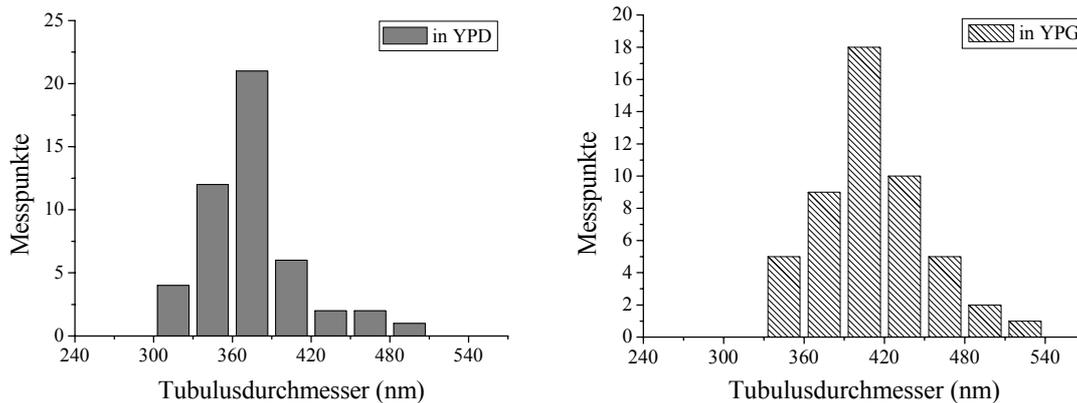


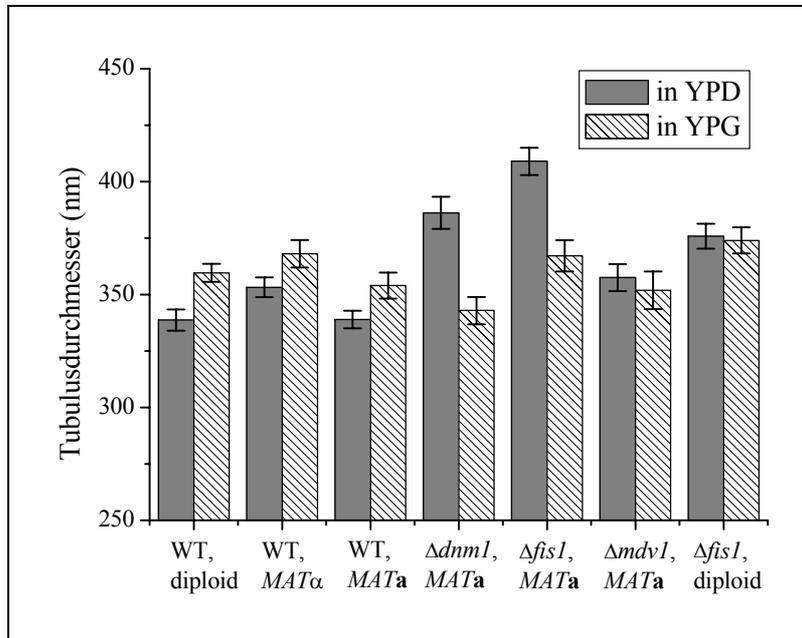
Abb. 17 Auswertung der mitochondrialen Durchmesserbestimmung für diploide $\Delta fis1$ -Zellen. Der mittlere Durchmesser beträgt bei in YPD gewachsenen Zellen 375.8 ± 5.5 nm, bei in YPG gewachsenen Zellen 374.0 ± 5.8 nm.

3.2.1 Der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien hängt von der Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums ab

Sowohl Wildtypzellen als auch die Zellen der Stämme $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ besitzen im glycerinhaltigen Medium YPG komplexere Netze mit mehr Verzweigungen als im glucosehaltigen Medium YPD. Bei der Bestimmung des Tubulusdurchmessers der Mitochondrien zeigen Wildtypzellen eine Abnahme des Tubulusdurchmessers unter Glucoserepression (siehe Abb. 18): Der Tubulusdurchmesser des Wildtyps, $MATa$ ist in YPD $4.3 \pm 2.0\%$ dünner als in YPG. Der Tubulusdurchmesser des Wildtyps, $MAT\alpha$ fällt in YPD um $4.0 \pm 2.1\%$ geringer aus als in YPG. Diese Tendenz entspricht der bei Egner et al. (2002): Der mitochondriale Durchmesser von diploiden Wildtypzellen ist in YPD ebenfalls um $5.8 \pm 1.7\%$ kleiner als in YPG.

Bei den Mutanten $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$, $\Delta mdv1$, $MATa$ und $\Delta fis1$, diploid (siehe Abb. 18) zeigt sich unter Glucoserepression entweder eine Zunahme des Tubulusdurchmessers oder kein Effekt, aber keine Abnahme wie bei Wildtypzellen: In YPD gewachsene $\Delta fis1$ -Zellen, $MATa$ haben einen um $10.2 \pm 2.2\%$ höheren Tubulusdurchmesser als in YPG. $\Delta dnm1$ -Mitochondrien haben in YPD Tubuli eines $11.2 \pm 2.4\%$ höheren Durchmessers als in YPG. Bei den Stämmen $\Delta mdv1$, und $\Delta fis1$, diploid ändert sich der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien unter Glucoserepression nur unwesentlich.

Der Einfluss der Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums auf den Tubulusdurchmesser ist bei den Deletionsmutanten somit entgegengesetzt zum Wildtyp.

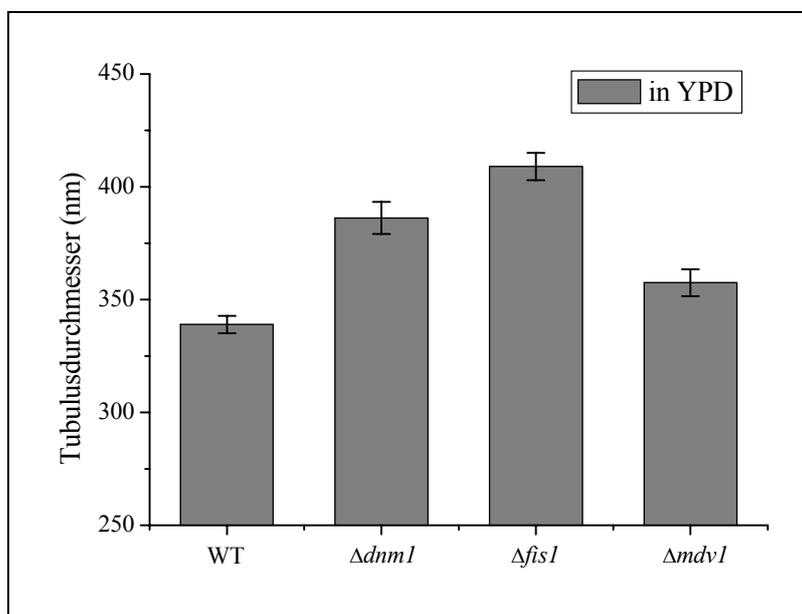


Stamm	Paarungstyp	rho ^{o/+}	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), in YPD	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), in YPG
WT	diploid	rho ⁺	338.73 +/- 35.34 (4.72)	359.64 +/- 27.65 (3.99)
WT	<i>MATα</i>	rho ⁺	353.22 +/- 30.49 (4.45)	368.03 +/- 38.98 (6.09)
WT	<i>MATa</i>	rho ⁺	338.95 +/- 25.29 (3.86)	354.02 +/- 41.04 (5.75)
$\Delta dnm1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	386.19 +/- 41.81 (7.07)	342.91 +/- 40.82 (6.08)
$\Delta fis1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	408.99 +/- 40.19 (6.06)	367.14 +/- 47.88 (6.91)
$\Delta mdv1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	357.49 +/- 37.50 (6.01)	351.85 +/- 52.83 (8.35)
$\Delta fis1$	diploid	rho ⁺	375.80 +/- 38.10 (5.50)	374.00 +/- 40.17 (5.80)

Abb. 18 Der mitochondriale Tubulusdurchmesser hängt von der Kohlenstoffquelle des Wachstumsmediums ab. Dargestellt ist der mittlere Tubulusdurchmesser von Wildtypzellen, $\Delta dnm1$ -, $\Delta fis1$ - und $\Delta mdv1$ -Mutanten. Die Zellen sind entweder in YPG (schraffierte Balken) oder in YPD (graue Balken) angezogen worden. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des axialen Intensitätsprofils konnte der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli bestimmt werden.

3.2.2 Die Deletion von Fis1p, Dnm1p oder Mdv1p führt zu Mitochondrien mit deutlich höherem Tubulusdurchmesser im Vergleich zur Wildtypsituation

Das Fehlen von Dnm1p bzw. Fis1p führt im Vergleich zum Wildtyp, *MATa* zu einer deutlichen Erhöhung des mitochondrialen Tubulusdurchmessers: 12.2 +/- 2.4 % bei $\Delta dnm1$ bzw. 17.1 +/- 2.1 % bei $\Delta fis1$. Auch die $\Delta mdv1$ -Mutante zeigt einen um 5.2 +/- 2.1 % höheren mitochondrialen Tubulusdurchmesser als der Wildtyp. Die Zunahme fällt aber im Vergleich zu $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ merklich geringer aus (siehe Abb. 19).



Stamm	Paarungstyp	rho ^{o/+}	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), in YPD
WT	<i>MATa</i>	rho ⁺	338.95 +/- 25.29 (3.86)
$\Delta dnm1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	386.19 +/- 41.81 (7.07)
$\Delta fis1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	408.99 +/- 40.19 (6.06)
$\Delta mdv1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	357.49 +/- 37.50 (6.01)

Abb. 19 Das Fehlen der Proteine Fis1p, Dnm1p oder Mdv1p führt verglichen mit Wildtypzellen zu Mitochondrien mit deutlich höherem Tubulusdurchmesser. Dargestellt ist der mittlere Tubulusdurchmesser von Wildtypzellen, $\Delta dnm1$ -, $\Delta fis1$ - und $\Delta mdv1$ -Mutanten. Die Zellen sind in YPD angezogen worden. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des axialen Intensitätsprofils konnte der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli bestimmt werden.

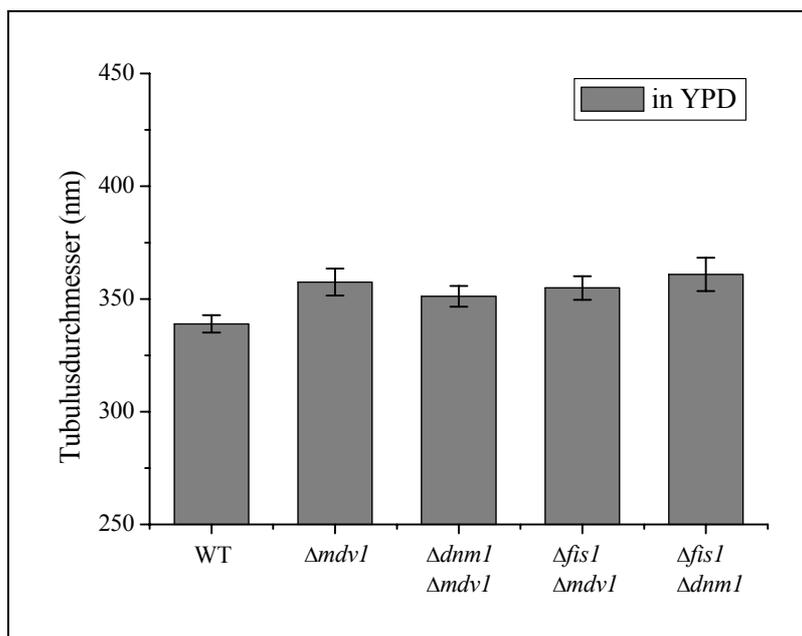
3.2.3 Doppeldeletionsmutanten haben im Vergleich zu Wildtypzellen Mitochondrien mit höherem Tubulusdurchmesser

Die Doppeldeletionsmutanten $\Delta dnm1/\Delta mdv1$, $\Delta fis1/\Delta mdv1$ und $\Delta fis1/\Delta dnm1$ haben einen höheren Tubulusdurchmesser als der Wildtyp *MATa*: Die Durchmesserzunahme beträgt bei $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ 3.5 +/- 1.8 %, bei $\Delta fis1/\Delta mdv1$ 4.5 +/- 1.9 % und im Falle von $\Delta fis1/\Delta dnm1$ 6.1 +/- 2.5 % (siehe Abb. 20). Die Durchmesserzunahme im Vergleich zum Wildtyp *MATa* fiel bei den Einzeldelentionsmutanten $\Delta dnm1$ und $\Delta fis1$ mit 12.2 +/- 2.4 % bei $\Delta dnm1$ bzw. 17.1 +/- 2.1 % bei $\Delta fis1$ deutlich höher aus.

Die Mitochondrien der Deletionsmutante $\Delta mdv1/\Delta fis1/\Delta dnm1$, *MATa* haben einen tubulären Durchmesser von 352.08 +/- 5.53 nm. Im Vergleich zum Wildtyp, *MATa* ist mit 353.22 +/- 4.45 nm keine Zu- oder Abnahme zu verzeichnen (siehe Abb. 22).

Fehlen also zwei Proteine der Teilungsmaschinerie der äußeren Membran, so ist die Durchmesserzunahme im Vergleich zum Wildtyp geringer als bei der Deletion eines Gens. Fehlen drei Proteine, so ist im Vergleich zur Wildtypsituation keine Zunahme des mitochondrialen Tubulusdurchmessers festzustellen.

Interessant ist weiterhin, dass die Doppeldeletionsmutanten $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ und $\Delta fis1/\Delta mdv1$ mit 351.16 +/- 4.60 nm bzw. 354.91 +/- 5.24 nm Mitochondrien mit einem annähernd gleichen Tubulusdurchmesser besitzen wie die Einzeldelentionsmutante $\Delta mdv1$ mit 357.49 +/- 6.01 nm.



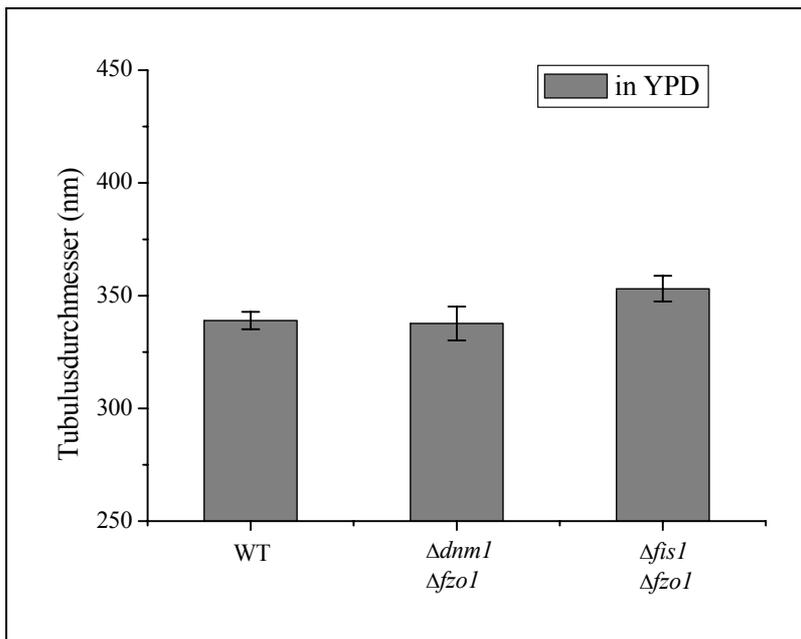
Stamm	Paarungstyp	rho ^{o/+}	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), in YPD
WT	<i>MATa</i>	rho ⁺	338.95 +/- 25.29 (3.86)
$\Delta mdv1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	357.49 +/- 37.50 (6.01)
$\Delta dnm1/\Delta mdv1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	351.16 +/- 30.45 (4.60)
$\Delta fis1/\Delta mdv1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	354.91 +/- 33.17 (5.24)
$\Delta fis1/\Delta dnm1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	360.88 +/- 47.83 (7.38)

Abb. 20 Doppeldeletionsmutanten haben im Vergleich zum Wildtyp Mitochondrien mit höherem Tubulusdurchmesser. Die Doppeldeletionsmutanten $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ und $\Delta fis1/\Delta mdv1$ besitzen darüber hinaus Mitochondrien mit annähernd gleichem Tubulusdurchmesser wie die Einzeldelentionsmutante $\Delta mdv1$. Dargestellt ist der mittlere Tubulusdurchmesser von Wildtypzellen, $\Delta mdv1$ -, $\Delta dnm1/\Delta mdv1$ -, $\Delta fis1/\Delta mdv1$ - und $\Delta fis1/\Delta dnm1$ -Mutanten. Die Zellen sind in YPD angezogen worden. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des axialen Intensitätsprofils konnte der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli bestimmt werden.

3.2.4 Doppeldeletionsmutanten ohne Fzo1p zeigen eine geringe Zu- oder Abnahme des mitochondrialen Tubulusdurchmessers im Vergleich zu Wildtypzellen

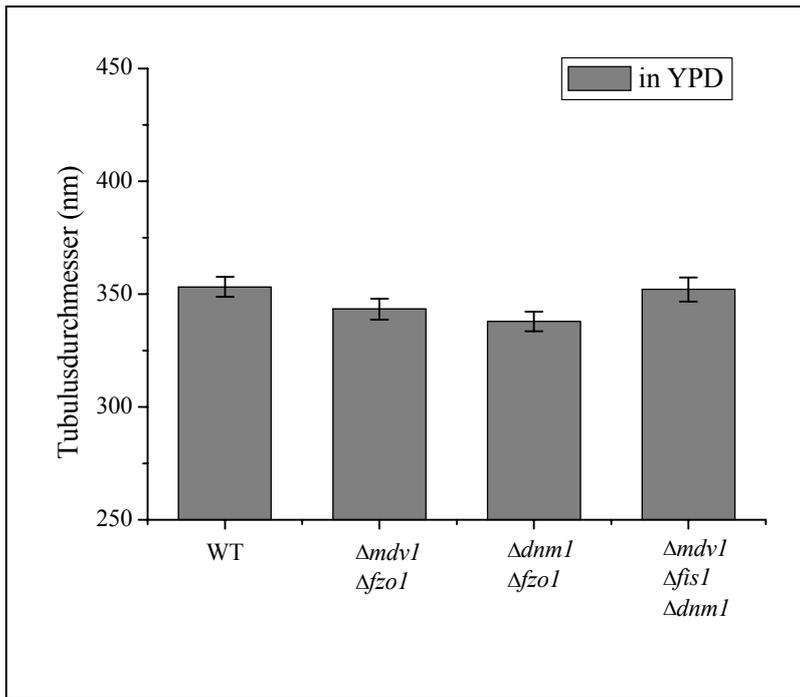
Kreuzt man $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$, $\Delta mdv1$ jeweils mit $\Delta fzo1$ so fällt die Veränderung des tubulären Durchmessers im Vergleich zum Wildtyp folgendermaßen aus: Der tubuläre Durchmesser der Mitochondrien des Stammes $\Delta fis1/\Delta fzo1$ ist um 4.0 +/- 2.0 % höher als der des Wildtyps, *MATa*. Die Durchmesser der Tubuli von $\Delta dnm1/\Delta fzo1$ -Zellen entspricht dem des Wildtyps, *MATa* (siehe Abb. 21). Die Zellen des Stammes $\Delta mdv1/\Delta fzo1$, *MATa* sind um 2.8 +/- 1.8 % dünner als die des Wildtyps, *MATa* (siehe Abb. 22)

Zusammengefasst ist der Durchmesser der Mitochondrientubuli der Doppeldeletionsmutanten ohne Fzo1p deutlich geringer als bei den Deletionsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$. Darüber hinaus ist er auch tendenziell geringer als bei den Deletionsmutanten $\Delta dnm1/\Delta mdv1$, $\Delta fis1/\Delta mdv1$ und $\Delta fis1/\Delta dnm1$.



Stamm	Paarungstyp	rho ^{o/+}	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), in YPD
WT	<i>MATa</i>	rho ⁺	338.95 +/- 25.29 (3.86)
$\Delta dnml/\Delta fzo1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	337.70 +/- 49.34 (7.52)
$\Delta fis1/\Delta fzo1$	<i>MATa</i>	rho ⁺	353.11 +/- 36.89 (5.76)

Abb. 21 Doppeldeletionsmutanten ohne Fzo1p vom Paarungstyp *MATa* zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine geringe Zunahme oder eine Abnahme des mitochondrialen Tubulusdurchmessers. Dargestellt ist der mittlere Tubulusdurchmesser von Wildtypzellen, $\Delta dnml/\Delta fzo1$ - und $\Delta fis1/\Delta fzo1$ -Mutanten. Die Zellen sind in YPD angezogen worden. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des axialen Intensitätsprofils konnte der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli bestimmt werden.



Stamm	Paarungstyp	rho ^{o/+}	Tubulardurchmesser +/- Standardabweichung (nm), in YPD
WT	<i>MATα</i>	rho ⁺	353.22 +/- 30.49 (4.45)
$\Delta mdv1/\Delta fzo1$	<i>MATα</i>	rho ⁺	343.39 +/- 31.07 (4.63)
$\Delta dnm1/\Delta fzo1$	<i>MATα</i>	rho ^o	337.95 +/- 28.04 (4.33)
$\Delta mdv1/\Delta fis1/\Delta dnm1$	<i>MATα</i>	rho ⁺	352.08 +/- 35.40 (5.53)

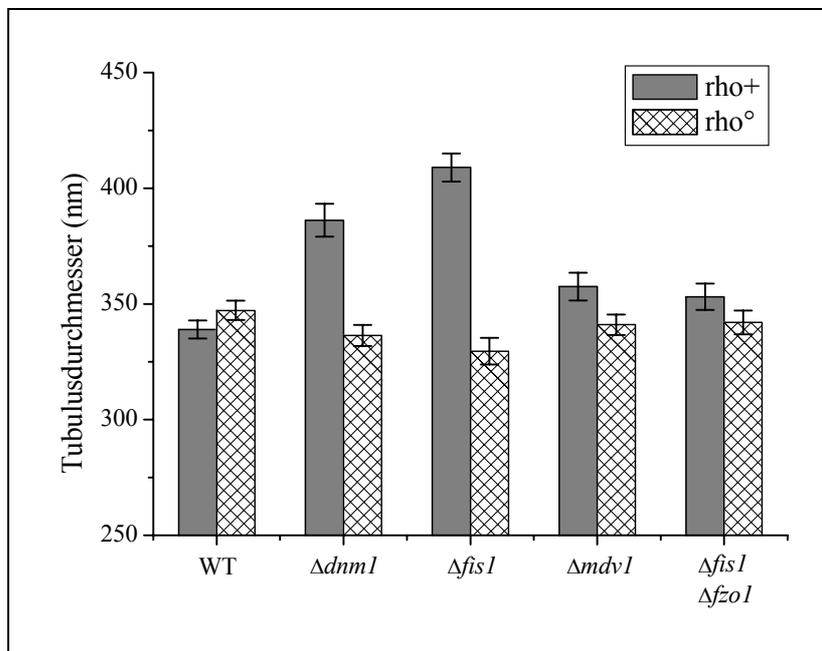
Abb. 22 Doppeldeletionsmutanten ohne *Fzo1p* vom Paarungstyp *MAT α* zeigen im Vergleich zu Wildtyp eine Abnahme des mitochondrialen Tubulardurchmessers. Dargestellt ist der mittlere Tubulardurchmesser von Wildtypzellen, und $\Delta mdv1/\Delta fzo1$ -Mutanten. Zusätzlich ist der mittlere mitochondriale Tubulardurchmesser von $\Delta dnm1/\Delta fzo1$ -Zellen (rho^o) und der Deletionsmutante $\Delta mdv1/\Delta fis1/\Delta dnm1$ gezeigt. Die Zellen sind in YPD angezogen worden. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des axialen Intensitätsprofils konnte der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli bestimmt werden.

3.2.5 Der Verlust der mitochondrialen DNA führt zur Verringerung des mitochondrialen Tubulusdurchmessers

Die Durchmesser der Mitochondrien der rho^o-Zellen fallen im Vergleich zu den entsprechenden rho⁺-Hefen folgendermaßen aus (siehe Abb. 23): Die rho^o-Mutanten von $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ haben einen 19.4 +/- 2.0 % bzw. 12.9 +/- 2.2 % geringeren Tubulusdurchmesser als die entsprechenden rho⁺-Zellen. Weniger deutlich fällt der Abfall bei $\Delta mdv1$, rho^o und bei $\Delta fis1/\Delta fzo1$, rho^o aus: 4.6 +/- 2.1 % bzw. 3.1 +/- 2.2 % weniger als die entsprechenden rho⁺-Hefezellen.

Lediglich ein Stamm zeigt eine Zunahme des mitochondrialen Tubulusdurchmessers bei Verlust der mitochondrialen DNA: rho^o-Zellen des Wildtyp, *MATa* haben einen um 2.4 +/- 1.7 % höheren Tubulusdurchmesser als rho⁺-Zellen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass durch Verlust der mitochondrialen DNA der Tubulusdurchmessers der Mitochondrien sich in der Regel verringert.



Stamm	Paarungstyp	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), rho ⁺ , in YPD	Tubulusdurchmesser +/- Standardabweichung (nm), rho ^o , in YPD
WT	<i>MATa</i>	338.95 +/- 25.29 (3.86)	347.20 +/- 27.59 (4.16)
<i>Δdnm1</i>	<i>MATa</i>	386.19 +/- 41.81 (7.07)	336.34 +/- 29.65 (4.57)
<i>Δfis1</i>	<i>MATa</i>	408.99 +/- 40.19 (6.06)	329.52 +/- 38.11 (5.75)
<i>Δmdv1</i>	<i>MATa</i>	357.49 +/- 37.50 (6.01)	341.06 +/- 27.79 (4.39)
<i>Δfis1/Δfzo1</i>	<i>MATa</i>	353.11 +/- 36.89 (5.76)	342.03 +/- 32.39 (5.12)

Abb. 23 Der Verlust der mitochondrialen DNA führt zur Verringerung des mitochondrialen Tubulusdurchmessers. Dargestellt ist der mittlere Tubulusdurchmesser von Wildtypzellen, *Δdnm1*-, *Δfis1*-, *Δmdv1*- und *Δfis1/Δfzo1*-Mutanten mit mitochondrialer DNA (rho⁺, graue Balken) oder ohne mitochondriale DNA (rho^o, schraffierte Balken). Die Zellen sind in YPD angezogen worden. Die dreidimensionalen Datensätze wurden mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des axialen Intensitätsprofils konnte der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli bestimmt werden.

4. Diskussion

4.1 Die mitochondriale Dynamik unter Glucoserepression

4.1.1 Die mitochondriale Vereinfachung unter Glucoserepression in Wildtypzellen erfolgt vermutlich durch Tubulusteilungen und Fusionen im Zuge der Zellteilung

Wildtyphefen passen sich der Kohlenstoffquelle des Nährmediums an, indem sie ihren Stoffwechsel umstellen (Gancedo, 1998) und die Größe und den Verzweigungsgrad ihrer Mitochondrien ändern (Egner et al., 2002; Pon und Schatz, 1991; Stevens, 1977). In Anwesenheit von Glucose als bevorzugter Kohlenstoffquelle schalten Hefen eine große Zahl von Genen ab. Dieses Phänomen wird Glucoserepression genannt. Der genetische Hintergrund der Glucoserepression wurde in zahlreichen Reviews ausführlich beschrieben (Entian et al., 1992; Felenbok, 1991; Gancedo, 1992; Johnston et al., 1992; Trumbly, 1992; Wills, 1990). Bisher ist aber kaum etwas darüber bekannt, wie die morphologischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerkes vonstatten gehen.

In dieser Arbeit konnte die Gestaltänderung der Mitochondrien von 15 Wildtypzellen verfolgt werden. Neun dieser Zellen teilten sich während der Aufnahmezeit von maximal fünf Stunden. In jeder sich teilenden Zellen ist eine Vereinfachung des mitochondrialen Netzwerkes erkennbar. Das Mitochondrium zeigt nach Beginn der Glucoserepression zunehmend weniger Verzweigungen, bis es die typische Morphologie für in glucosehaltigem Medium gewachsene Zellen zeigt. Die restlichen sechs Zellen teilen sich während des Untersuchungszeitraums nicht. Trotz fortlaufender Matrixseparationen und Fusionen war keine Metamorphose des mitochondrialen Netzes feststellbar.

Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Daten (siehe Abb. 7 und Anhang, Abb. A1) liegt die Vermutung nahe, dass unter Glucoserepression die Reduktion der Größe und des Verzweigungsgrades der Mitochondrien im Zuge der Zellteilung stattfindet. Solange sich die Mitochondrien nicht teilen, findet auch keine Umstrukturierung des Netzwerkes statt. Die Vereinfachung der Struktur wird wahrscheinlich in erster Linie durch zwei Mechanismen erreicht:

1) In der Mutterzelle entstehen durch fortlaufende Separationen und Fusionen aus komplexen Netzwerken einfachere Strukturen mit weniger Verzweigungen (siehe Abb. 7). Der Begriff „Separation“ wird benutzt, um eine deutliche Diskontinuität der mit GFP markierten mitochondrialen Matrix zu beschreiben.

2) Durch Teilungen der Tubuli, die Mutter- und Tochtermitochondrium verbinden werden Teile aus dem mitochondrialen Netzwerk der Mutterzelle frei, die durch Fusion in das neuentstehende Mitochondrium der Tochterzelle integriert werden (siehe Abb. 7, D-L). Eine allgemeine Übersicht der mitochondrialen Vereinfachung in Wildtyphefen ist in Abbildung 24, A dargestellt.

Bei der mutmaßlich vom Zellzyklus abhängigen Umstrukturierung des Netzwerks unter Glucoserepression könnte das Cytoskelett eine wichtige Rolle spielen. Man nimmt an, dass das Mitochondrium in der Zelle entlang von Aktinkabeln angeordnet ist (Simon et al., 1995 und 1997; Drubin et al., 1993). Diese Kabel aus F-Aktinfilamenten ordnen sich in der G1-Phase entlang der Mutter-Tochterachse an. Es kommt zu einer Polarisierung des Mitochondriums in Richtung der künftigen Tochterzelle. Als nächstes wandert ein mitochondrialer Tubulus in die Spitze der entstehenden Tochterzelle ein. Boldogh (1998) und Strauss (1999) vermuten, dass eine Polymerisation von Aktin der Motor für mitochondriale Bewegungen entlang der Kabel ist.

Die Funktion des Cytoskeletts bei der Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks nach Glucoserepression könnte folgendermaßen aussehen: Durch eine gezielte räumliche Anordnung und Steuerung von Mutter- und neuentstehendem Tochtermitochondrium entlang der Aktinkabel kommt es wiederholt zu einer Fusion und anschließender Trennung der beiden Netze. Diese Tubulusteilungen erfolgen in der Regel im Bereich des Muttermitochondriums, so dass das Tochtermitochondrium Membranen hinzugewinnt.

Abgesehen von Tubulusteilungen und Fusionen können zusätzliche Mechanismen zur Größenreduktion des Netzwerkes, wie z.B. Autophagie, nicht ausgeschlossen werden. Durch einen gezielten Abbau mitochondrialer Tubuli aus dem Netzwerk könnte theoretisch ebenfalls eine Reduktion des Verzweigungsgrades erreicht werden. Allerdings erscheint das präzise Ausschneiden und Entfernen tubulärer Seitenäste aus einem funktionsfähigen Organell wenig ökonomisch und damit unwahrscheinlich.

Eine ähnliche Strategie zur Vereinfachung der Struktur nach Glucoserepression konnte auch bei den netzartigen Mitochondrien der $\Delta fis1$ -Zellen beobachtet werden. Im Folgenden wurde dieser Prozess näher untersucht.

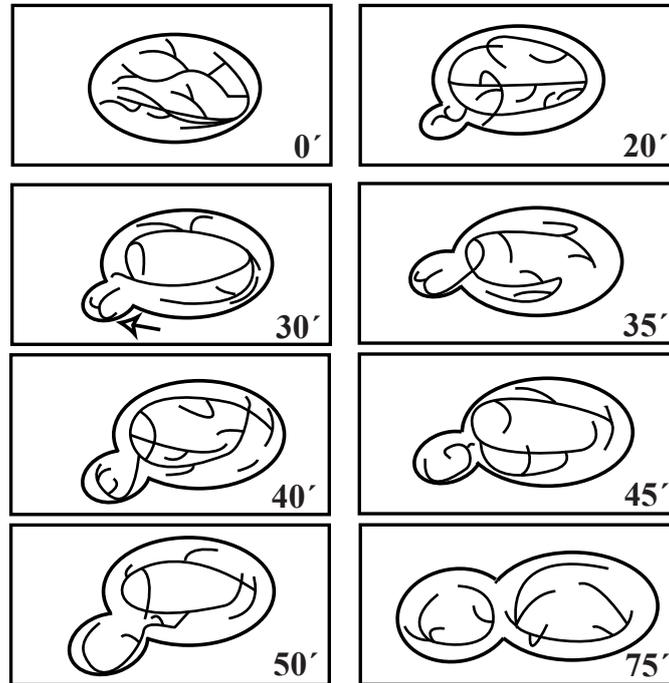
4.1.2 Fis1p ist nicht essentiell für die Tubulusteilung und beeinflusst die Frequenz der Matrixseparationen und Fusionen nicht

Fis1p ist ein 17 kD großes integrales Protein der äußeren Membran. Sein NH₂-Ende reicht ins Cytoplasma hinein, während sein COOH-Terminus im Intermembranraum liegt. Fis1p ist gleichmäßig über die gesamte mitochondriale Oberfläche verteilt (Mozdy et al., 2000).

Die Umstrukturierung der Mitochondrien unter Glucoserepression dauert bei $\Delta fis1$ -Zellen länger als beim Wildtyp. Bei Wildtypzellen weisen drei Stunden nach Beginn der Glucoserepression weniger als 10 % der Mitochondrien stark verzweigte Netze auf. Dagegen findet man bei $\Delta fis1$ -Zellen erst vier Stunden nach Glucoserepression überwiegend Mitochondrien mit einfachen Strukturen (siehe Tab. 2). Ein weiterer Unterschied im Vergleich zum Wildtyp ist, dass der Vereinfachungsprozess bei dieser Deletionsmutante nicht unmittelbar an die Zellteilung gebunden ist (siehe Abb. 8, 9 und Anhang, Abb. A2). Auch in sich nicht teilenden $\Delta fis1$ -Zellen kann eine Reduktion der fischernetzähnlichen Bereiche zugunsten tubulärer Strukturen beobachtet werden. Es wäre aber auch denkbar, dass $\Delta fis1$ -Zellen mehrere Zellzyklen zur maximalen Vereinfachung ihrer Mitochondrien benötigen.

Ähnlich wie bei Wildtypzellen wird die Verkleinerung der netzartigen Bereiche zugunsten von tubulären Strukturen vermutlich durch fortlaufende Separationen und Fusionen erreicht (siehe Abb. 24, B). Während der Umwandlung der mitochondrialen Struktur unter Glucoserepression konnten zahlreiche Separationen der mit GFP markierten Matrix in $\Delta fis1$ -Zellen beobachtet werden. Die Deletion des *FIS1*-Gens scheint also die Separation der Matrix nicht zu beeinflussen. Eine quantitative Analyse der absoluten Zahl von Separationen bei $\Delta fis1$ -Zellen zeigt, dass die Frequenz verglichen mit dem Wildtyp nur leicht reduziert ist (siehe Abb. 11, A): Für Wildtypzellen in glycerinhaltigem Medium konnten zu Beginn der Umstrukturierung 2.5 Separationen und Fusionen pro Minute gezählt werden. In $\Delta fis1$ -Zellen waren es etwa 2.4 Ereignisse.

A



B

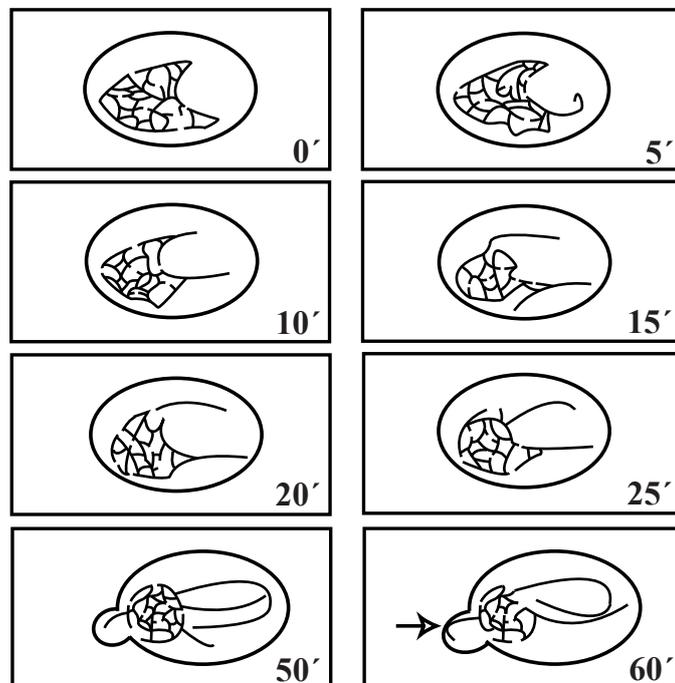


Abb. 24 Schema der mitochondrialen Umstrukturierung unter Glucoserepression in Wildtyp- und $\Delta fis1$ -Zellen. Die Minutenangaben kennzeichnen charakteristische Zeitpunkte während der Metamorphose. Am Zeitpunkt Null entspricht die mitochondriale Morphologie, der von typischen in glycerinhaltigem Medium gewachsenen Zellen. **A** Bei Wildtypzellen dringt kurz nach der Zellteilung ein mitochondrialer Tubulus aus der Mutterzelle in die Tochterzelle ein. Im nächsten Schritt bindet dieser an den Zellkortex der Tochterzelle (Pfeil). Während des weiteren Wachstums bleibt das Mitochondrium an dieser Stelle mit dem Zellkortex verbunden. Das übrige Netz bewegt sich frei in der Tochterzelle. Im Verlauf der Zellteilung werden Mutter- und Tochtermitochondrium häufig durch Tubulusteilungen voneinander getrennt. Durch fortlaufende Tubulusteilungen und Fusionen werden mitochondriale Membranen von der Mutter- in die Tochterzelle transportiert. **B** $\Delta fis1$ -Zellen, die in glycerinhaltigem Medium angezogen wurden, zeigen häufig mitochondriale Netze mit großen fischernetzähnlichen Bereichen. Die Netze liegen auf einer Seite der Zelle. In $\Delta fis1$ -Mitochondrien scheint die Vereinfachung des mitochondrialen Netzwerks nicht direkt an die Zellteilung gebunden zu sein. Unter Glucoserepression werden einzelne Maschen der netzartigen Bereiche durch Tubulusteilungen gelöst. Dadurch wird die Größe dieser Bereiche kontinuierlich reduziert. Gleichzeitig entstehen in der Regel ein oder zwei tubuläre Strukturen, die sich zunehmend ausdehnen. Diese langen Tubuli werden häufig durch Tubulusteilungen von den fischernetzähnlichen Bereichen getrennt. Anschließend fusionieren sie an der gleichen oder an einer anderen Stelle. Während der Zellteilung dringt eine Tubulus in die entstehende Tochterzelle ein. Wie bei Wildtypzellen auch, bindet dieser Tubulus an den Zellkortex der Tochterzelle (Pfeil). Das übrige Netz bewegt sich frei in der Tochterzelle.

Im Verlauf der Metamorphose sinkt sowohl in $\Delta fis1$ -Mutanten als auch in Wildtypzellen die Zahl der Ereignisse: 105 Minuten nach Beginn der mitochondrialen Umstrukturierung konnten bei Wildtypzellen nur noch 0.6 Separationen und Fusionen pro Minute gezählt werden. Bei $\Delta fis1$ -Zellen waren es 1.2 Ereignisse. Die Frequenz der Separationen und Fusionen sinkt also während der Umstrukturierung nach Glucoserepression in Wildtyp- und $\Delta fis1$ -Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Absinken in der Zahl der Matrixseparationen und -fusionen ein charakteristisches Merkmal für den Prozess der Vereinfachung des mitochondrialen Netzwerks ist. Was ist die Ursache für den Rückgang der Dynamiken? Dieses Phänomen könnte auf der zunehmend weniger verzweigten Morphologie des Netzwerks beruhen. Je geringer der Gesamtumfang des Netzes wird, desto weniger Punkte für evt. Teilungsereignisse und Fusionen sind vorhanden. Unterstützt wird diese Vermutung durch folgende Beobachtung: Mitochondrien von Wildtypzellen, die kontinuierlich in glucosehaltigem Medium gewachsen waren, zeigten einen stets gleichen Gesamtumfang und Verzweigungsgrad. Gleichzeitig blieb die Frequenz von Separationen und Fusionen über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg konstant. Die Höhe der Frequenz entsprach annähernd der von Wildtypzellen nach Ende der Umstrukturierung. Eine Reduktion des Verzweigungsgrades bzw. des Gesamtumfangs des mitochondrialen Netzwerks ist also anscheinend korreliert mit einem Rückgang von Separationen und Fusionen. Ändert sich der Verzweigungsgrad nicht, bleibt auch die Frequenz der dynamischen Ereignisse gleich.

Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass durch Matrixseparationen und Fusionen aus komplexen mitochondrialen Strukturen einfachere entstehen.

Das fast ausgeglichene Verhältnis von Separationen und Fusionen könnte ein wichtiger Hinweis dafür sein, dass es sich bei dem Vereinfachungsprozess nach Glucoserepression vorwiegend um einen Umbau der Netzstruktur und nicht um einen Abbau von Tubuli handelt: Beispielsweise kann aus einem Tubulus mit einem abzweigenden Seitenast durch eine Tubulusteilung (am Verzweigungspunkt) und eine Fusion (der beiden Tubulusspitzen) ein Tubulus ohne Seitenast entstehen. Bei einem Abbau von tubulären Strukturen wäre es naheliegend, dass die Zahl der Separationsereignisse höher ist, als die der Fusionen.

Der Begriff „Separation“ wird in diesem Zusammenhang benutzt, um eine deutliche Diskontinuität der mit GFP markierten mitochondrialen Matrix zu beschreiben. Eine solche Separation kann auf eine lokale Matrixkonstriktion, eine Teilung der inneren Membran oder auf eine Tubulusteilung, also eine Teilung der äußeren und der inneren Membran, zurückzuführen sein (siehe Abb. 6).

Aufgrund der folgenden Ergebnisse gehen wir davon aus, dass es sich bei den meisten Separationen in Zellen ohne Fis1p um Matrixkonstriktionen handelt: Doppelmarkierungen der Matrix mit DsRed und der äußeren Membran mit GFP zeigen deutlich, dass Separationen der Matrix ohne Teilung der äußeren Membran stattfinden können (siehe Abb. 10, A-C). Gleichzeitig scheint eine Teilung der inneren Mitochondrienmembran ohne eine Teilung der äußeren Membran sehr selten zu sein. In Zellen, deren äußere Membran mit GFP und deren innere Membran mit DsRed markiert war, konnte ein solches Ereignis nicht beobachtet werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den meisten beobachteten Separationen um Matrixkonstriktionen ohne Beteiligung der inneren und äußeren Membran handelt. Diese These wird durch die Ergebnisse von Jakobs et al. (2003) unterstützt. In dieser Arbeit wurde die Photokonversion des GFP genutzt, um die Kontinuität der mitochondrialen Matrix an Wildtyphefen und Deletionsmutanten zu untersuchen. Sowohl für $\Delta fis1$ - als auch für $\Delta dnm1$ -Zellen konnte gezeigt werden, dass die Matrix ein großes kontinuierliches Kompartiment bildet. Im Gegensatz zu Wildtypmitochondrien konnten keine Diskontinuitäten festgestellt werden. Diskontinuitäten können nur durch Teilungen der inneren Membran entstehen. Die Autoren folgern daraus, dass ein Defekt in der Teilung der äußeren Membran auch einen Defekt in der Teilung der inneren Membran nach sich

zieht. Folglich finden Separationen der Matrix in $\Delta fis1$ - und $\Delta dnm1$ -Mutanten ohne Einbeziehung der mitochondrialen Membranen statt.

$\Delta fis1$ -Zellen werden in der Literatur als defizient in der Teilung der äußeren Membran bzw. in der Tubulusteilung beschrieben (Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Tieu et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen zweifelsfrei gezeigt werden, dass in den Mitochondrien von $\Delta fis1$ -Zellen Tubulusteilungen stattfinden:

- 1) In Langzeitaufnahmen sind Matrixseparationen erkennbar, auf die entweder keine Fusion folgt oder eine Fusion an einer anderen Stelle (siehe Abb. 8, D-F, J-L).
- 2) In doppeltmarkierten Mitochondrien sind gleichzeitige Separationen der inneren und der äußeren Membran, also Tubulusteilungen, zu erkennen (siehe Abb. 10, D-J).

Fis1p ist folglich nicht essentiell für die Tubulusteilung bzw. die Teilung der äußeren Membran. Die Frequenz der erkennbaren Teilungsereignisse ist in $\Delta fis1$ -Zellen aber im Vergleich zu Wildtypzellen reduziert (durchschnittlich weniger als eine erkennbare Tubulusteilung in 10 Minuten).

Die beschriebene Tubulusteilungsaktivität in $\Delta fis1$ -Mutanten ist wahrscheinlich auf verbliebene Dnm1p-Mdv1p-Komplexe zurückzuführen. Diese lagern sich in Wildtypzellen in punktförmigen Strukturen an Fis1p an, sind aber auch ohne Fis1p in der Lage an die äußeren Mitochondrienmembran zu binden, allerdings in reduzierter Zahl und anderer Verteilung (Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Tieu et al., 2002).

4.1.3 Dnm1p ist essentiell für die Teilung der äußeren Membran aber nicht für die Matrixkonstriktion

Dnm1p besteht aus einer 150 Aminosäuren langen mittleren Domäne und einer Insert B-Sequenz. Am COOH-Ende liegt eine α -helikale Domäne (AH), die auch GTPase Effektor-domäne (GED) genannt wird. Am NH₂-Ende findet man eine GTPase-Domäne (Bleazard et al., 1999; Otsuga et al., 1998; Sesaki und Jensen, 1999; van der Bliek et al., 1999).

In dieser Arbeit waren in Langzeitaufnahmen in $\Delta dnm1$ -Mutanten im Gegensatz zu $\Delta fis1$ -Zellen nur Matrixseparation zu sehen, auf die eine Fusion an derselben Stelle folgte (siehe Abb. 12). Es konnten keine Tubulusteilung nachgewiesen werden. Bei den beobachteten Matrixseparationen in $\Delta dnm1$ -Zellen handelt es sich wahrscheinlich, ebenso wie bei $\Delta fis1$ -

Zellen, um Konstriktionen der Matrix ohne Beteiligung der äußeren und der inneren Membran (Jakobs et al., 2003). Die hier vorgestellten Daten legen folgende Schlüsse nahe:

1) Dnm1p ist essentiell für die Teilung der äußeren Membran bzw. für die Tubulusteilung. Aufgrund von genetischen Studien wurde dies bereits angenommen (Bleazard et al., 1999; Otsuga et al., 1998; Sesaki und Jensen, 1999). Die verwendeten statischen Aufnahmemethoden ließen aber keine zeitliche Auflösung dieses dynamischen Ereignisses zu.

2) Die Konstriktion der mitochondrialen Matrix ist nicht von Dnm1p abhängig. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Legesse-Miller und Massol (2003). Sie verfolgten in Langzeitaufnahmen die Verteilung von „*red fluorescent protein*“ (mito-RFP) in der Matrix von $\Delta dnm1$ -Zellen und konnten so ebenfalls Matrixseparationen zeigen.

Labrousse et al. (1999) beobachteten in *Caenorhabditis elegans* Mutanten, die eine mutierte Variante des DRP-1 exprimierten, ebenfalls separierte Matrixkompartimente. Gleichzeitig war bei diesen Mitochondrien eine durchgängige äußere Membran zu erkennen. DRP-1 ist dem Dnm1p aus Hefe homolog. Die Autoren untersuchten zusätzlich, ob diese separierten Matrixkompartimente isoliert voneinander waren, oder ob sie durch Matrixbrücken miteinander verbunden blieben. Mit Hilfe von FLIP-Experimenten („*fluorescence loss in photobleaching*“) konnte gezeigt werden, dass in DRP-1 Mutanten die mitochondriale Matrix diskontinuierlich ist. Aus diesen Ergebnissen schließen Labrousse et al. (1999), dass die Teilung der inneren Membran unabhängig von der Teilung der äußeren Membran stattfinden kann.

Diese Folgerung steht im Gegensatz zu den Daten der vorliegenden Arbeit an *S. cerevisiae*. In doppeltmarkierten $\Delta fis1$ -Zellen konnte keine Teilung der inneren Membran ohne Teilung der äußeren Membran beobachtet werden. Die vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass in Hefe die Teilung der äußeren und der inneren Membran in Abhängigkeit voneinander ablaufen. Unterstützt wird diese Annahme von Jakobs et al. (2003). Die Autoren konnten sowohl in $\Delta fis1$ - als auch in $\Delta dnm1$ -Zellen eine stets kontinuierliche Matrix nachweisen. Wäre die innere Mitochondrienmembran an den Separationsereignissen beteiligt, müsste eine Diskontinuität der mit GFP markierten Matrix nachweisbar sein, wie dies bei Wildtypmitochondrien der Fall ist.

4.1.4 Ablauf der Teilung der äußeren Membran

Über den Ablauf der Teilung der äußeren Membran ist bisher wenig bekannt. Man kennt zwar einige der beteiligten Proteine, kann aber über deren Interaktion nur Vermutungen anstellen. Shaw und Nunnari (2002) stellten folgendes Modell vor: Die Teilung der äußeren Membran wird von drei Proteinen reguliert: Dnm1p, Fis1p und Mdv1p. Die GTPase Dnm1p bewirkt darüber hinaus die Tubulusteilung. Zusammen mit Mdv1p bindet es auf der äußeren Membran in punktförmigen Strukturen an Fis1p. Dieser Komplex durchläuft eine Konformationsänderung. Dadurch treten Fis1p und Mdv1p in Kontakt miteinander. Der Dnm1p-GTPase-Zyklus wird in Gang gesetzt und eine Konstriktion mit einschließender Tubulusteilung eingeleitet. Aufgrund welcher Ergebnisse kommen die Autoren zu diesem Modell? Und welche neuen Erkenntnisse bringen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für das Verständnis der Tubulusteilung?

1) Dnm1p bewirkt die Tubulusteilung

Biochemische Analysen belegen einen Pool von Dnm1p im Cytoplasma von Hefezellen (Otsuga et al., 1998). Eine große Zahl dieser Proteine lagert sich in punktförmigen Strukturen auf der Cytosolseite der äußeren Mitochondrienmembran an (Bleazard et al., 1999). Langzeitaufnahmen sowohl von GFP markiertem Dnm1p in *S. cerevisiae* (Sesaki und Jensen, 1999; Legesse-Miller und Massol, 2003), als auch in DRP-1 in *C. elegans* (Labrousse et al., 1999) und Drp1 in Säugerzellen (Smirnova et al., 2001) zeigen, dass sich mitochondriale Tubuli an den Stellen teilen, an denen sich diese punktförmigen Strukturen befinden. Wahrscheinlich zeigen die Dnm1p-Komplexe die Orte vergangener und zukünftiger Teilungsereignisse an.

Wie bereits von Bleazard et al. (1999), Otsuga et al. (1998) und Sesaki und Jensen (1999) anhand genetischer Untersuchungen und der fischernetzähnlichen Morphologie der Mitochondrien vermutet, konnten in dieser Arbeit anhand von Langzeitaufnahmen erstmals gezeigt werden, dass in $\Delta dnm1$ -Zellen keine Tubulusteilungen stattfinden oder diese zumindest stark erschwert sind. In $\Delta dnm1$ -Mutanten folgte auf jede beobachtete Matrixkonstriktion eine Fusion an der gleichen Stelle des Tubulus. Dnm1p spielt folglich eine wichtige Rolle bei der Tubulusteilung.

Wie stellt man sich die Tubulusteilung durch Dnm1p vor? Für Drp1 in Säugerzellen konnte *in vitro* eine Ringbildung der Proteine nachgewiesen werden (Smirnova et al., 2001; Yoon et al., 2001).

Möglicherweise bilden die Dnm1p-Proteine in Hefe ebenfalls ringförmige Strukturen rund um den Tubulus, die die Tubulusteilung einleiten. Bis heute gibt es keinen Beweis dafür, dass Dnm1p sich *in vivo* ebenfalls in höhere Strukturen (Ringe, Kragen etc.) organisiert. In diesem Zusammenhang zeigen Legesse-Miller und Massol (2003) Dnm1p-Ansammlungen unterschiedlicher Gestalt (Ringe, symmetrische und asymmetrische Cluster) auf der äußeren Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae*. Aufgrund des geringen Tubulusdurchmessers von 340 nm ist die Auflösung eines konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskops zur Klärung dieser Frage nicht ausreichend. Die Ergebnisse können lediglich als Hinweis betrachtet werden.

Man geht davon aus, dass die GTPase Dnm1p homolog zum Dynamin in Säugerzellen ist. Die Familie der Dynamine besteht aus einer Reihe von GTPasen, die in vielen verschiedenen zellulären Strukturen zu finden sind (Chen et al., 1991; van der Blik und Meyerowitz, 1991; De Camilli et al., 1995; Liu und Robinson, 1995; Warnock und Schmid, 1996; Schmid, 1997; Urrutia et al., 1997). Dynamin in Säugerzellen ist das am besten charakterisierte Mitglied dieser Familie. Das Tetramer bildet eine Art Kragen um den Hals des an der Plasmamembran gebildeten „*clathrin-coated pit*“ (Takei et al., 1995). Durch GTP-Hydrolyse soll die Membranteilung bzw. die Freisetzung der Vesikel einleitet werden (Herskovits et al., 1993; van der Blik et al., 1993; Damke et al., 1994, 1995; Hinshaw und Schmid, 1995; Takei et al., 1995; Sweitzer und Hinshaw, 1998). Bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf die Situation in Hefe muss man aber bedenken, dass der Durchmesser eines mitochondrialen Tubulus mit ca. 340 nm deutlich größer ist als der Hals eines „*clathrin-coated pit*“ mit ca. 10 nm. Eine Tubulusteilung, die ausschließlich auf einer Ringbildung von Dnm1p beruht, ist daher schwer vorstellbar. Wahrscheinlich sind noch andere Proteine an der Komplexbildung beteiligt, oder es findet vor der durch Dnm1p eingeleiteten Tubulusteilung eine Konstriktion statt.

2) Dnm1p bindet zusammen mit Mdv1p an Fis1p auf der äußeren Mitochondrienmembran

MDV1 kodiert ein 80 kDa großes lösliches Protein mit einem NH₂-terminalen Überhang, einer zentralen „*coiled-coil*“ Region und sieben COOH-terminalen WD-Wiederholungen.

Das Protein liegt im Cytoplasma oder bildet mit Dnm1p Komplexe auf der äußeren Mitochondrienmembran. Mdv1p scheint im Komplex mit Dnm1p für die Tubulusteilung essentiell zu sein. Dies wird in erster Linie aus der fischernetzähnlichen Morphologie der Mitochondrien in $\Delta mdv1$ -Zellen geschlossen.

In diesen Zellen entspricht sowohl die Zahl als auch die Verteilung von Dnm1p auf der äußeren Membran der Wildtypsituation. Folglich wird Mdv1p nicht für die Anlagerung von Dnm1p auf der mitochondrialen Membran benötigt (Cervený et al., 2001; Fekkes et al., 2000; Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000). Scheinbar greift Mdv1p erst nach der Anlagerung von Dnm1p auf dem Tubulus in den Teilungsprozess ein. Möglicherweise spielt dabei eine zweite Bindung von Mdv1p mit Fis1p eine Rolle.

Die regelmäßige Verteilung von Fis1p auf der äußeren Mitochondrienmembran legt die Vermutung nahe, dass dieses Protein eine Art Rezeptor für die Dnm1p-Mdv1p-Komplexe ist. Es wird angenommen, dass diese Bindung eine Voraussetzung für die folgende Tubulusteilung ist. Die Funktion von Fis1p als Rezeptor für Dnm1p hängt dabei nicht von Mdv1p ab. In $\Delta mdv1$ -Zellen entspricht sowohl die Zahl als auch die Verteilung von Dnm1p auf der äußeren Mitochondrienmembran der Wildtypsituation. Dnm1p scheint neben Fis1p auch noch mit weiteren Lipiden und/oder Molekülen der äußeren Membran zu interagieren, da das Protein sowohl in $\Delta fis1$ - als auch in $\Delta mdv1/\Delta fis1$ -Zellen mit der äußeren Membran assoziiert ist (Tieu und Nunnari, 2000; Mozdy et al., 2000).

Die nicht an Fis1p gebundenen Dnm1p-Mdv1p-Komplexe sind in $\Delta fis1$ -Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, zumindest teilweise funktionell. Es konnten einige Tubulusteilungen in $\Delta fis1$ -Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 8, D-F, J-L und Abb. 10, D-J). Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Bindung des Dnm1p-Mdv1p-Komplexes an Fis1p keine notwendige Bedingung für die Tubulusteilung ist. Diese Bindung scheint jedoch förderlich zu sein. Die Frequenz der erkennbaren Tubulusteilungen ist in $\Delta fis1$ -Zellen im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Die beobachteten Teilungsereignisse sprechen weiterhin dafür, dass Dnm1p nicht nur an Fis1p sondern auch an andere Proteine der äußeren Membran bindet. Andernfalls könnte der Dnm1p-Mdv1p-Komplex keine Tubulusteilung herbeiführen.

3) Der Dnm1p-Mdv1p-Fis1p-Komplex durchläuft eine Konformationsänderung. Dadurch treten Fis1p und Mdv1p in Kontakt miteinander. Eine Konstriktion mit anschließender Tubulusteilung wird durch den GTPase Zyklus von Dnm1p eingeleitet.

Nicht jede Anlagerung von Dnm1p an den mitochondrialen Tubulus zieht eine Teilung nach sich (Legesse-Miller und Massol, 2003; Otsuga et al., 1998). Fukushima et al. (2001) vermuten, dass nach der Anlagerung des Dnm1p-Mdv1p-Komplexes die Dnm1p-GED-Region bzw. der Dnm1p-GTPase-Zyklus die Tubulusteilungsrate bestimmt. Wahrscheinlich wird nach der Komplexbildung der Proteine Dnm1p, Mdv1p und Fis1p, die Tubulusteilung durch eine Konformationsänderung eingeleitet. Wie dies genau geschieht, ist nicht bekannt. Möglicherweise spielt dabei eine Bindung zwischen Fis1p und Mdv1p eine Rolle. Für diese Fis1p-Mdv1p-Bindung gibt es folgende Anhaltspunkte: In $\Delta dnm1$ -Zellen bleibt Mdv1p weiterhin mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Tieu und Nunnari, 2000; Fekkes et al., 2000; Cervený et al., 2001). In $\Delta dnm1/\Delta fis1$ -Mutanten dagegen findet man Mdv1p im Cytoplasma (Tieu und Nunnari, 2000). Mdv1p scheint also unabhängig von Dnm1p eine Bindung mit Fis1p einzugehen. Diese Mdv1p-Fis1p-Bindung katalysiert möglicherweise die von Dnm1p abhängige Tubulusteilung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Bindung zwischen Mdv1p und Fis1p, die die Tubulusteilung katalysiert. In Langzeitaufnahmen von $\Delta fis1$ -Zellen konnten zwar diverse Matrixkonstriktion beobachtet werden, aber nur selten Tubulusteilungen. Es wäre denkbar, dass der Wegfall der Bindung zwischen Fis1p und Mdv1p in $\Delta fis1$ -Zellen verantwortlich für die reduzierte Zahl an Tubulusteilungen ist: Ohne Katalyse können Tubulusteilungen zwar stattfinden, sind aber seltener.

In dem am Anfang des Kapitels 4.1.4 beschriebenen Modell (Shaw und Nunnari, 2002) gehen die Autoren davon aus, dass Dnm1p nach der Anlagerung an die äußere Membran zunächst eine Konstriktion und anschließend eine Teilung des Tubulus herbeiführt. Die vorliegenden Daten zeigen in Zellen ohne Dnm1p keine Tubulusteilungen, aber zahlreiche Matrixkonstriktionen. Die Konstriktion der Matrix läuft also im Gegensatz zur Annahme von Shaw und Nunnari (2002) erstens ohne Dnm1p ab und ist zweitens ein eigenständiger Prozess, der unabhängig von der Tubulusteilung stattfindet. Wahrscheinlich sind andere Proteine, als die in die Tubulusteilung beteiligten, für die Matrixkonstriktion zuständig.

Auch Fis1p wird nicht für die Matrixkonstriktion benötigt, wie die zahlreichen Matrixkonstriktionen in $\Delta fis1$ -Zellen beweisen.

Alternativ wäre auch eine Rolle des Cytoskeletts bei der Matrixkonstriktion denkbar: Die mitochondrialen Tubuli sind entlang von Aktinkabeln assoziiert. Es wäre vorstellbar, dass durch Spannungen an diesen Kabeln die Tubuli gedehnt werden und dadurch lokale Verdünnungen entstehen (Simon et al., 1995; Suelmann et al., 2000).

4.1.5 Mdm33p ist nicht essentiell für die Konstriktion bzw. die Teilung der inneren Mitochondrienmembran

Mdm33p, ist ein ~ 54 kD großes Protein der inneren Mitochondrienmembran. Sein NH₂-Terminus liegt in der Matrix, sein COOH-Terminus reicht in den Intermembranraum hinein. $\Delta mdm33$ -Mutanten zeigen große kugelförmige Mitochondrien mit langgestreckten dünnen Tubuli. Die Morphologie dieser Mitochondrien legt die Vermutung nahe, dass Mdm33p eine Rolle bei der Teilung der inneren Mitochondrienmembran spielen könnte (Messerschmitt et al., 2003).

In dieser Arbeit konnten in Langzeitaufnahmen von $\Delta mdm33$ -Mitochondrien diverse Matrixseparationen und einige Tubulusteilungen beobachtet werden (siehe Abb. 13). Das Protein scheint die Separation der Matrix nicht zu beeinflussen. Es wäre denkbar, dass es sich bei den beobachteten Matrixseparationen, ebenso wie bei $\Delta fis1$ - und $\Delta dnm1$ -Mitochondrien, um Matrixkonstriktionen handelt. Für die Teilung der inneren Membran ist Mdm33p nicht essentiell, denn die beobachteten Tubulusteilungen sind nur unter Einbeziehung beider Membranen möglich. Allerdings ist die Frequenz der Tubulusteilungen gering.

Bei der Doppelmutante $\Delta mdm33/\Delta fis1$ waren in Langzeitaufnahmen weder Matrixseparationen noch Tubulusteilungen zu erkennen (siehe Abb. 14).

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit haben sowohl Zellen ohne Fis1p als auch Zellen ohne Mdm33p die Fähigkeit zur Matrixseparation und zur Tubulusteilung. Fehlen in $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Zellen dagegen beide Proteine, finden weder Separationen noch Tubulusteilungen statt. Möglicherweise ist in der Doppeldeletionsmutante die Interaktion zwischen den Teilungsmaschinerien der inneren und der äußeren Membran gestört.

Bringt man die Daten dieser Arbeit in Zusammenhang mit den beschriebenen bereits bestehenden Erkenntnissen, könnte ein Modell für die Tubulusteilung folgendermaßen

aussehen (siehe Abb. 25): Vor der Tubulusteilung findet eine Konstriktion des Matrixraumes statt. Wahrscheinlich wird die Matrixkonstriktion von bisher unbekannt Proteinen herbeigeführt. Eine Beteiligung der Proteine Fis1p, Dnm1p oder Mdm33p ist unwahrscheinlich. Dies lassen die beobachteten Matrixkonstriktionen in doppeltmarkierten $\Delta fis1$ -Zellen und in Langzeitaufnahmen von $\Delta fis1$ -, $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdm33$ -Mutanten vermuten. An diese durch die Konstriktion der Matrix verdünnten tubulären Bereichen lagern sich Dnm1p-Mdv1p-Komplexe auf der äußeren Membran an, und zwar bevorzugt an Fis1p.

Diese führen eine Teilung der äußeren Membran und schließlich des Tubulus herbei. Die Teilung der inneren Membran wird dabei vermutlich von einer eigenständigen Maschinerie vermittelt, die wahrscheinlich in Kontakt steht mit der Teilungsmaschinerie der äußeren Membran. Die Bindung des Dnm1p-Mdv1p-Komplexes an Fis1p ist nicht essentiell für die Tubulusteilung, da auch in $\Delta fis1$ -Zellen Tubulusteilungen beobachtet werden konnten. Allerdings ist die Frequenz der Teilungsereignisse in Wildtypzellen deutlich höher. Möglicherweise katalysiert die Bindung zwischen Mdv1p und Fis1p die von Dnm1p durchgeführte Teilung. Die beobachteten Tubulusteilungen in $\Delta fis1$ -Zellen sprechen außerdem dafür, dass Dnm1p neben Fis1p wahrscheinlich noch Bindungen mit weiteren Proteinen oder Lipiden der äußeren Membran eingeht. Andernfalls könnte der Dnm1p-Mdv1p-Komplex in $\Delta fis1$ -Zellen keine Tubulusteilungen herbeiführen.

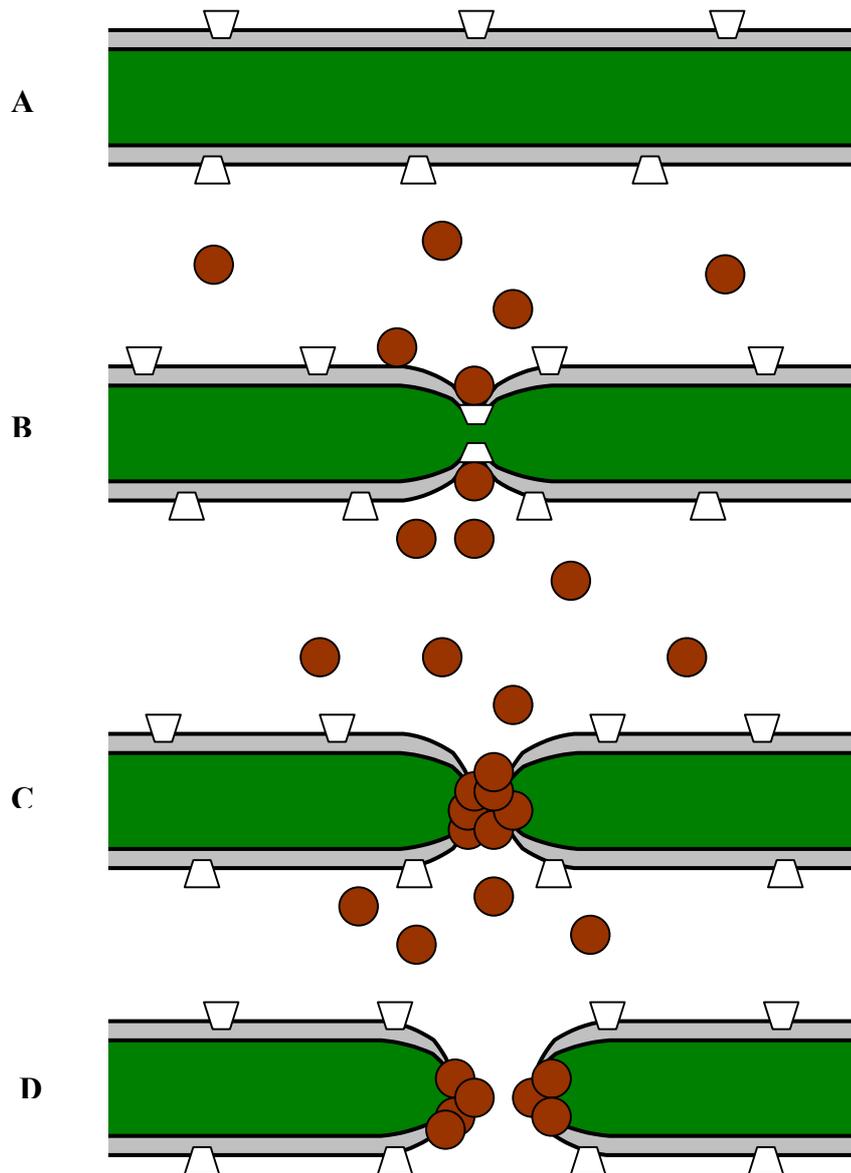


Abb. 25 Modell der mitochondrialen Tubulusteilung. **A** Fis1p (Trapeze) ist gleichmäßig über die gesamte mitochondriale Oberfläche verteilt. Im Cytoplasma von Hefezellen befindet sich ein Pool von Dnm1p (Kreise). **B** Vor der Tubulusteilung findet eine Konstriktion des Matrixraumes statt. **C** An diese verdünnten Bereiche lagern sich Dnm1p-Mdv1p-Komplexe auf der äußeren Membran an und zwar vorzugsweise an Fis1p. **D** Die Dnm1p-Mdv1p-Komplexe führen eine Teilung des Tubulus herbei.

4.2 Durchmesserbestimmung von mitochondrialen Tubuli

Neben den beschriebenen Langzeitaufnahmen wurde in dieser Arbeit das neue Verfahren der MMM-4Pi-Mikroskopie (Typ A) angewendet, um weitere Informationen über die Funktion der an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine zu gewinnen. Zusammen mit der anschließenden Bildbearbeitung erreicht man mit diesem Fluoreszenzmikroskop eine Auflösung von 200 nm in lateraler und 100 nm in axialer Richtung. In axialer Richtung ist dieser Wert damit 3-5 mal höher als bei einem konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Anhand von hochauflösenden Aufnahmen der Mitochondrien von $\Delta fis1$ -, $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdv1$ -Zellen und zahlreicher Doppeldeletionsmutanten werden neue Einblicke in die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks gegeben.

4.2.1 Einfluss der Kohlenstoffquelle auf den Tubulusdurchmesser von Mitochondrien

Die Umstellung des Stoffwechsels lässt sich auch an der Morphologie der Mitochondrien von *S. cerevisiae* vor und unter Glucoserepression ablesen. Sowohl Wildtypzellen als auch die Zellen der Stämme $\Delta dnm1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta fis1$ (Jensen et al., 2000; Mozdy et al., 2000; Otsuga et al., 1998; Tieu und Nunnari, 2000; Yaffe, 1999) zeigen in glycerinhaltigem Medium komplexere mitochondriale Strukturen mit mehr Verzweigungen als in glucosehaltigem Medium. In Anwesenheit von Glucose sind aufgrund der fehlenden Atmungsaktivität die Cristastrukturen kaum ausgeprägt (Yotsuyanagi, 1962a). Bei Egner et al. (2002) wurde außerdem beschrieben, dass der Tubulusdurchmesser von Wildtypmitochondrien unter Glucoserepression abnimmt.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit an Wildtypzellen bestätigen die Abnahme des mitochondrialen Tubulusdurchmessers unter Glucoserepression. Wildtypzellen haben in glucosehaltigem Medium mitochondriale Tubuli mit einem 4-6 % geringeren Durchmesser als in glycerinhaltigem Medium (siehe Abb. 18). Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der Rückbildung der Cristastrukturen. Die Mutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ zeigen entweder eine Zunahme des Tubulusdurchmessers oder keinen Effekt. Möglicherweise überlagert die im folgenden Abschnitt beschriebene Zunahme des Tubulusdurchmessers nach Deletion der Gene *DNM1*, *MDV1* bzw. *FIS1* die Zunahme des Tubulusdurchmessers nach Aufhebung der Glucoserepression.

4.2.2 Die mitochondrialen Tubuli weisen in $\Delta dnm1$ -, $\Delta fis1$ - und $\Delta mdv1$ -Zellen größere Durchmesser auf als in Wildtypzellen

$\Delta dnm1$ - bzw. $\Delta fis1$ -Zellen zeigen im Vergleich zum Wildtyp Mitochondrien mit deutlich größerem Tubulusdurchmesser: ca. 12 % bzw. 17 % mehr als bei Wildtypzellen. Auch der Durchmesser der mitochondrialen Tubuli der $\Delta mdv1$ -Mutante ist um ca. 5 % größer als beim Wildtyp. Die Zunahme fällt aber im Vergleich zu $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ geringer aus (siehe Abb. 19).

Lediglich anhand der mikroskopischen Daten kann man keine Aussage darüber treffen, warum der Tubulusdurchmesser beim Fehlen von Dnm1p, Fis1p oder Mdv1p zunimmt. Möglicherweise spielt eine Interaktion der Proteine mit dem Cytoskelett eine Rolle. Entfällt diese Interaktion im Fall der Deletionsmutanten, könnte das einen Einfluss auf den Tubulusdurchmesser haben. Eine solche Bindung konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Folgende Beobachtungen sind in diesem Zusammenhang aber interessant:

1) Eine Mutation in der GTPase-Domäne von Drp1 verursacht in humanen Zellen einen Zusammenbruch der mitochondrialen Struktur. Die mitochondrialen Tubuli bilden große perinukleare Aggregate. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass Drp1 die Mitochondrien am Cytoskelett verankert (Smirnova et al., 1998).

2) In $\Delta dnm1$ - und $\Delta fis1$ -Hefezellen liegen die Mitochondrien als kollabierte tubuläre Struktur auf einer Seite der Zelle (siehe Abb. 8, A-C). Dies lässt neben der Rolle bei der Tubulusteilung auch auf eine Funktion der Proteine Dnm1p und Fis1p bei der Anheftung des Mitochondriums an das Cytoskelett schließen (Otsuga et al., 1998).

4.2.3 Petite-Mutanten haben Mitochondrien mit einem geringeren Tubulusdurchmesser

In Petite-Mutanten (ρ^0 -Zellen) kann keine mitochondriale DNA mehr nachgewiesen werden (Fox et al., 1991). Diese Hefezellen sind atmungsdefizient. Die Messungen in dieser Arbeit an Wildtypzellen und den Deletionsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$, $\Delta mdv1$ und $\Delta fis1/\Delta fzo1$ haben ergeben, dass in glucosehaltigem Medium die Mitochondrien der

meisten ρ° -Zellen einen geringeren Durchmesser haben, als die Mitochondrien der entsprechenden ρ^{+} -Zellen (siehe Abb. 23).

Wie ist dieser Effekt zu erklären? Eine Reduktion des Tubulusdurchmessers beobachtet man, wie bereits erwähnt, auch in Hefen unter Glucoserepression. Diese Zellen zeigen Mitochondrien mit kaum ausgeprägten Cristae (Yotsuyanagi, 1962a). Ein Zusammenhang zwischen Reduktion des mitochondrialen Tubulusdurchmessers und der Rückbildung der Cristaestrukturen liegt daher nahe. Den ρ° -Mutanten fehlen aufgrund des Verlustes der mitochondrialen DNA mitochondriale Proteine. Möglicherweise führt dies zu einer Reduktion der Cristaestruktur und damit zu einem verringerten Tubulusdurchmesser, ähnlich wie bei Hefezellen unter Glucoserepression.

4.2.4 Hierarchie der Gene innerhalb einer denkbaren Genwirkungskette

Gibt es eine Hierarchie bei den an Tubulusteilungen und Fusionen beteiligten Genen? Erste Vermutungen darüber findet man in der Literatur: Aufgrund eines morphologischen Vergleichs der Netze der Deletionsmutanten $\Delta fis1$, $\Delta fzo1$, $\Delta mdm33$, $\Delta mdm33/\Delta fis1$ und $\Delta mdm33/\Delta fzo1$ vermuten Messerschmitt et al. (2003) folgendes: Erstens, der morphologische Defekt in den Mitochondrien von $\Delta mdm33$ -Zellen ist möglicherweise epistatisch zu dem in $\Delta fis1$ -Zellen. Zweitens, die Mutation in $\Delta fzo1$ -Zellen könnte epistatisch zu der in $\Delta mdm33$ -Zellen sein. Bleazard et al. (1999) vermuten, dass der morphologische Defekt in $\Delta dnm1$ -Zellen eventuell epistatisch zu dem in $\Delta fzo1$ -Zellen ist.

Wie bereits erwähnt, führt das Fehlen der Proteine Fis1p, Dnm1p oder Mdv1p zu Mitochondrien mit einer netzartigen Struktur. Bei diesen Deletionsmutanten, die den gleichen Phänotypen aufweisen, ist es nicht möglich, durch Vergleich der Morphologie der Mitochondrien auf eine Hierarchie der Gene zu schließen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist aber nicht nur die Netzstruktur, sondern auch der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien kennzeichnend für die jeweilige Deletionsmutante. Oder anders ausgedrückt: Durch das Ausschalten eines Gens, dessen Genprodukt an der Tubulusteilung beteiligt ist, verändert sich neben der Morphologie des Netzes auch der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien.

Um mit Hilfe dieses Wissens eine mögliche Hierarchie innerhalb einer Genwirkungskette aufklären zu können, wurden die einzelnen Gene in verschiedenen Kombinationen

ausgeschaltet und der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien bestimmt. $\Delta mdv1$ -Zellen zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine auffällig geringere Zunahme des Tubulusdurchmessers als die Deletionsmutanten $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$ (siehe Abb. 19).

Die Deletionsmutanten $\Delta mdv1/\Delta fis1$ und $\Delta mdv1/\Delta dnm1$ haben annähernd denselben Durchmesser wie die Mitochondrien in $\Delta mdv1$ -Zellen (siehe Abb. 20). Sie zeigen also deutlich dünnere Tubuli als die Deletionsmutanten $\Delta fis1$ und $\Delta dnm1$. Dies könnte möglicherweise darauf hinweisen, dass der morphologische Defekt in den Mitochondrien von $\Delta mdv1$ -Zellen epistatisch zu demjenigen in $\Delta fis1$ -Zellen bzw. in $\Delta dnm1$ -Zellen ist.

In diese Untersuchung wurde auch Fzo1p mit einbezogen. Fzo1p ist das erste bekannte Protein, das an der mitochondrialen Fusion beteiligt ist. Es ist Teil eines ~ 800 kD großen Proteinkomplexes, der in der äußeren Membran liegt. Fzo1p besitzt am NH₂-Ende eine GTPase-Domäne, die für die Fusion eine wichtige Rolle spielt. Zwei transmembrane Domänen in der Nähe des COOH-Terminus verankern das Protein in der äußeren Membran. Sowohl der NH₂-Terminus mit der GTPase-Domäne, als auch der COOH-Terminus liegen im Cytoplasma. Zwischen den transmembranen Domänen liegt eine zehn Aminosäure lange Schleife, die bis in den Intermembranraum reicht (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998; Fritz et al., 2001). Da eine Bestimmung des Durchmessers an $\Delta fzo1$ -Zellen aufgrund ihrer fragmentierten Mitochondrien nicht möglich ist, wurden Doppeldeletionsmutanten in Kombination mit $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ hergestellt und untersucht.

Zusammengefasst ist der Durchmesser der Mitochondrientubuli der Deletionsmutanten $\Delta fis1/\Delta fzo1$, $\Delta dnm1/\Delta fzo1$ und $\Delta mdv1/\Delta fzo1$ deutlich geringer als bei den Deletionsmutanten $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta mdv1$ (siehe Abb. 20-22). Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass der morphologische Defekt in $\Delta fzo1$ -Zellen epistatisch zu dem in $\Delta fis1$ -, $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdv1$ -Zellen ist.

5. Zusammenfassung

Die Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* bilden ein ausgedehntes tubuläres Netzwerk. Zur Aufrechterhaltung der Netzstruktur finden fortlaufend Tubulusteilungen und Fusionen statt. In der vorliegenden Arbeit wird eine detaillierte Analyse dieser mitochondrialen Dynamiken in Raum und Zeit vorgestellt. Dazu wurden neben Wildtypmitochondrien die Mitochondrien der Deletionsmutanten $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und $\Delta mdm33$ untersucht. Fis1p und Dnm1p wird eine Rolle bei der Teilung der äußeren Mitochondrienmembran zugeschrieben. Mdm33p ist möglicherweise an der Teilung der inneren Mitochondrienmembran beteiligt. Die mitochondriale Matrix sämtlicher verwendeter Zellen war mit GFP („green fluorescent protein“) markiert.

In Langzeitaufnahmen konnte gezeigt werden, dass $\Delta fis1$ -Mutanten ebenso wie Wildtypzellen dazu in der Lage sind, die Morphologie ihrer Mitochondrien an veränderte Kohlenstoffverhältnisse anzupassen. Unter Glucoserepression entstehen aus hochverzweigten Mitochondrien einfache, überwiegend tubuläre Strukturen. Allerdings ist die strukturelle Anpassung in Zellen ohne Fis1p deutlich verlangsamt. Vermutlich spielen bei der Vereinfachung des mitochondrialen Netzwerks Tubulusteilungen und Fusionen eine entscheidende Rolle. Durch Lösen von Verzweigungen und anschließende Neuverknüpfung der Tubuli scheinen aus komplexen Strukturen einfachere zu entstehen. Mit Beginn der Glucoserepression sinkt die Frequenz der Matrixseparationen und Fusionen. Dies scheint ein typisches Merkmal für den Vereinfachungsprozess zu sein. Der Begriff „Separation“ wird benutzt, um eine deutliche Diskontinuität der mit GFP markierten mitochondrialen Matrix zu beschreiben. Das Verhältnis von Matrixseparationen und Fusionen ist sowohl in Wildtypzellen als auch in $\Delta fis1$ -Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ausgeglichen. Im Unterschied zu Wildtypzellen ist die Metamorphose bei $\Delta fis1$ -Zellen nicht an den Zellzyklus gebunden.

Doppelmarkierungen in $\Delta fis1$ -Mitochondrien beweisen, dass in diesen Mutanten Matrixkonstriktionen ohne Beteiligungen der äußeren Membran stattfinden können. Vermutlich ist auch die innere Membran nicht an den Matrixkonstriktionen beteiligt.

Darüber hinaus konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass entgegen der bisherigen Meinung komplette Tubulusteilungen in $\Delta fis1$ -Mutanten möglich sind.

In $\Delta dnm1$ -Mutanten konnten zahlreiche Matrixkonstriktionen, aber keine Tubulusteilungen beobachtet werden. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass Dnm1p essentiell für die Teilung der äußeren Mitochondrienmembran bzw. für die Tubulusteilung ist, Matrixkonstriktionen aber auch ohne dieses Protein ablaufen können.

$\Delta mdm33$ -Zellen zeigen in Langzeitaufnahmen diverse Matrixseparationen und auch einige Tubulusteilungen. Mdm33p ist folglich nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für die Teilung der inneren Mitochondrienmembran nicht essentiell.

Neben den beschriebenen Langzeitaufnahmen wurde in dieser Arbeit das neue Verfahren der MMM-4Pi-Mikroskopie (Typ A) angewendet, um weitere Informationen über die Funktion der an der mitochondrialen Dynamik beteiligten Proteine zu gewinnen. Zusammen mit der anschließenden Bildbearbeitung erreicht man mit diesem Fluoreszenzmikroskop eine Auflösung von 200 nm in lateraler und 100 nm in axialer Richtung. In axialer Richtung ist dieser Wert damit 3-5 mal höher als bei einem konventionellen konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Anhand von hochauflösenden Aufnahmen der Mitochondrien von $\Delta fis1$ -, $\Delta dnm1$ - und $\Delta mdv1$ -Zellen und zahlreicher Doppeldeletionsmutanten werden in dieser Arbeit neue Einblicke in die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks gegeben.

Die Umstellung des Stoffwechsels von *S. cerevisiae* nach Wechsel der Kohlenstoffquelle lässt sich an der Morphologie der Mitochondrien ablesen. Sowohl Wildtypzellen als auch die Zellen der Stämme $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und $\Delta mdv1$ zeigen in glycerinhaltigem Medium komplexere mitochondriale Strukturen mit mehr Verzweigungen als in glucosehaltigem Medium. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass meistens auch der Tubulusdurchmesser der Mitochondrien von der jeweiligen Kohlenstoffquelle abhängt.

Der Tubulusdurchmesser ist in den Deletionsmutanten größer als in Wildtypzellen. Möglicherweise spielt eine Interaktion der Proteine Fis1p, Dnm1p und Mdv1p mit dem Cytoskelett eine Rolle. Entfällt diese Interaktion im Falle der Deletionsmutanten, könnte das einen Einfluss auf den Tubulusdurchmesser haben.

Bei ρ^0 -Mutanten ist der Tubulusdurchmesser geringer als bei den entsprechenden ρ^+ -Zellen. Die Zellen besitzen keine mitochondriale DNA und sind atmungsdefizient. Vermutlich sind die Cristastrukturen kaum ausgebildet und somit die mitochondrialen Tubuli dünner im Vergleich zur Wildtypsituation.

Δmdv1-Zellen zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine auffällig geringere Zunahme des Tubulusdurchmessers als die Deletionsmutanten *Δfis1* und *Δdnm1*. Die Doppeldelentionsmutanten *Δmdv1/Δfis1* und *Δmdv1/Δdnm1* haben annähernd denselben Durchmesser wie die Mitochondrien in *Δmdv1*-Zellen. Dies könnte möglicherweise darauf hinweisen, dass der morphologische Defekt in den Mitochondrien von *Δmdv1*-Zellen epistatisch zu dem in *Δfis1*-Zellen bzw. in *Δdnm1*-Zellen ist.

6. Anhang

6.1 konfokale Langzeitaufnahmen

Auf den folgenden Seiten sind die vollständigen Datensätze, die den Abbildungen 7, 8, 12, 13 und 14 zugrunde liegen, zu finden:

Seite 92-96

Abb. A1 Umstrukturierung von Wildtypmitochondrien unter Glucoserepression. Wildtypzellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Der Datensatz umfasst 165 dreidimensionale Aufnahmen. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 78 Sekunden. Die Gesamtaufnahmedauer beträgt 209 Minuten.

Maßstab: 2 µm

Seite 97-98

Abb. A2 Umstrukturierung von $\Delta fis1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta fis1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Der Datensatz umfasst 99 dreidimensionale Aufnahmen. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 116 Sekunden. Die Gesamtaufnahmedauer beträgt 194 Minuten.

Maßstab: 1 µm

Seite 99-100

Abb. A3 Umstrukturierung von $\Delta dnm1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta dnm1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Der Datensatz umfasst 40 dreidimensionale Aufnahmen. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 60 Sekunden. Die Gesamtaufnahmedauer beträgt 40 Minuten.

Maßstab: 1 μm

Seite 101-102

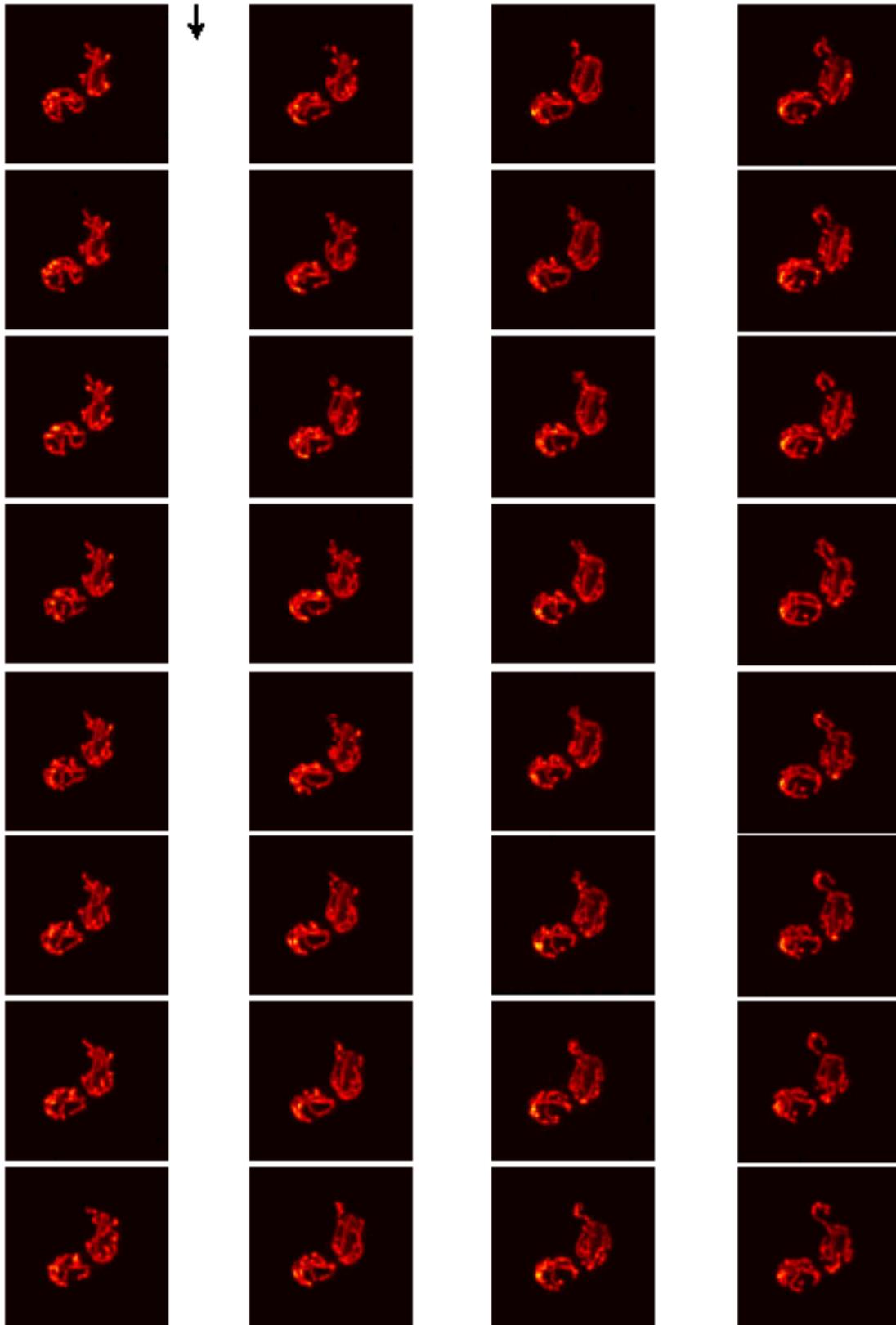
Abb. A4 Umstrukturierung von $\Delta mdm33$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta mdm33$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Der Datensatz umfasst 64 dreidimensionale Aufnahmen. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 226 Sekunden. Die Gesamtaufnahmedauer beträgt 244 Minuten.

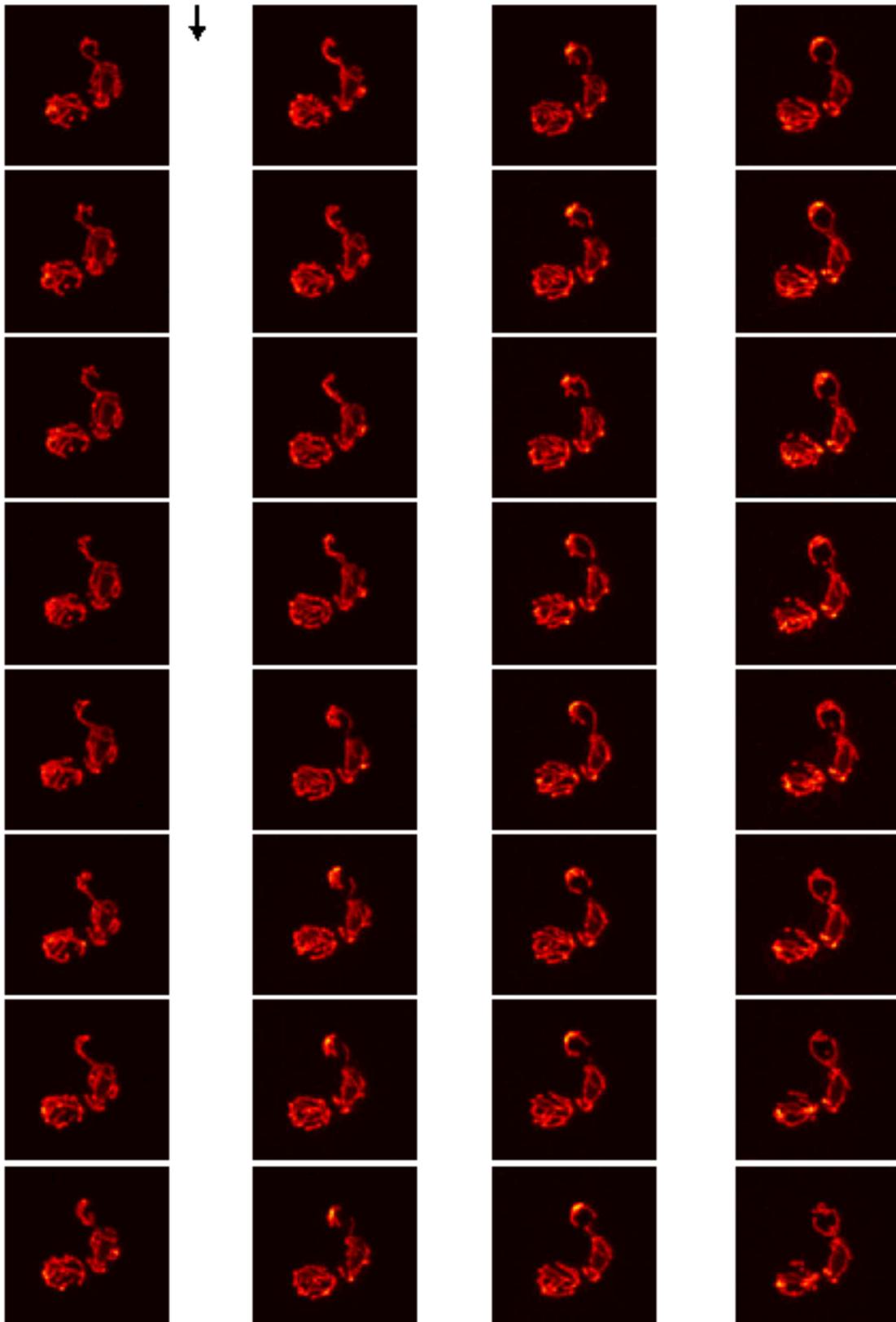
Maßstab: 2 μm

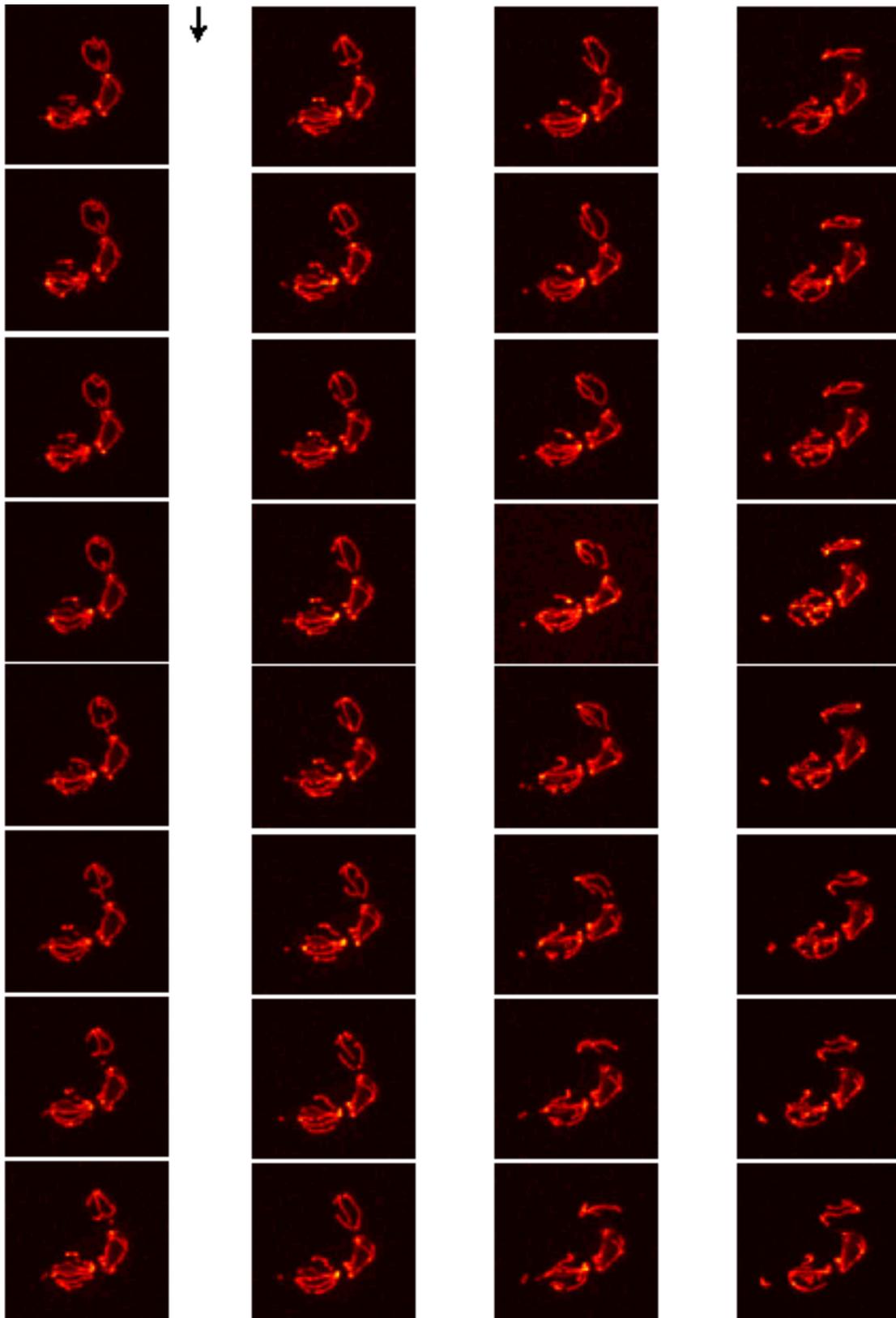
Seite 103-105

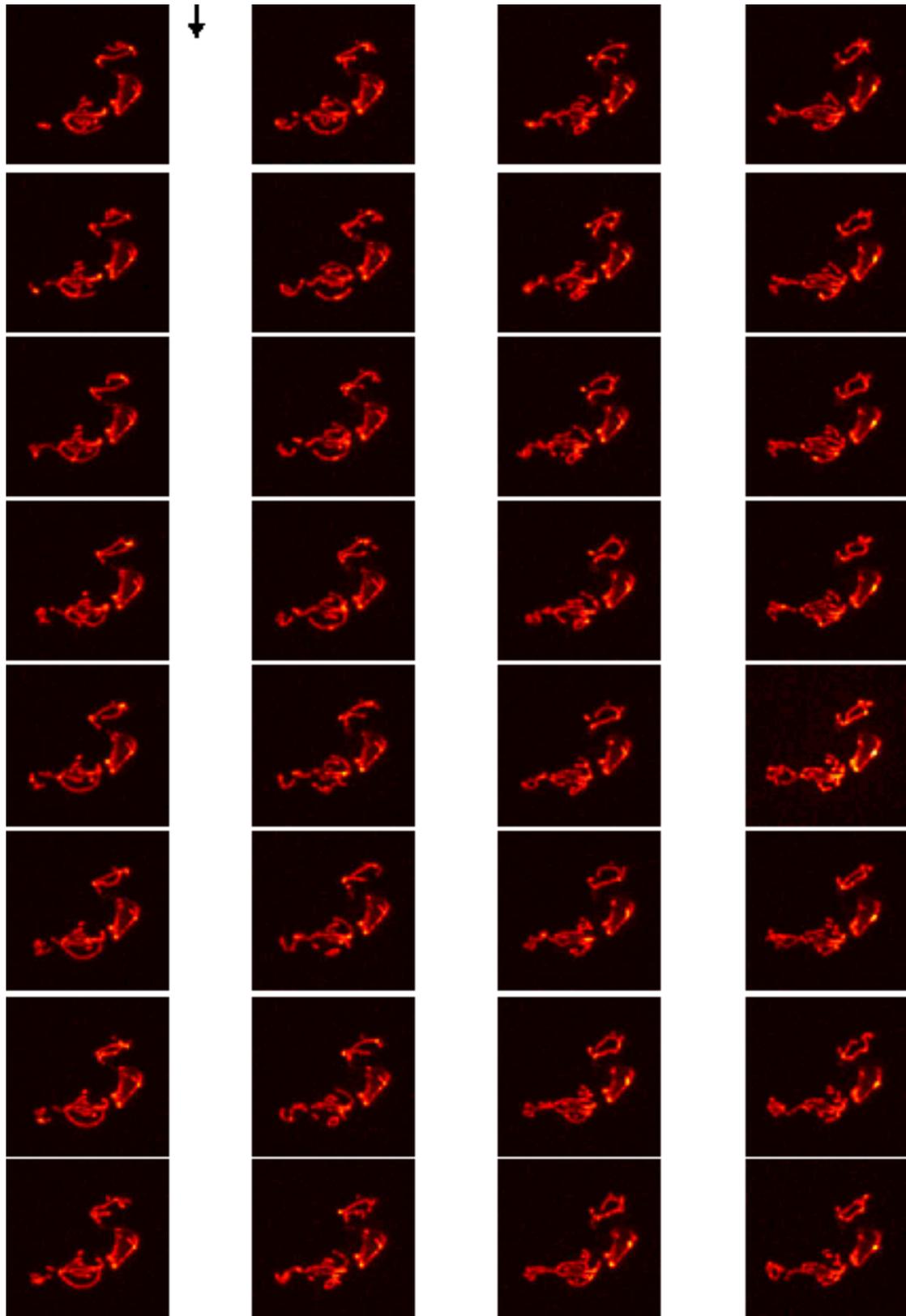
Abb. A5 Umstrukturierung von $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression. $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Zellen, deren mitochondriale Matrix mit GFP markiert war, wurden bis zur log-Phase in YPG wachsen gelassen und danach in YPD transferiert. Konfokale Langzeitaufnahmen zeigen die Metamorphose des mitochondrialen Netzwerks. Dargestellt sind Projektionen der maximalen Helligkeit. Der Datensatz umfasst 73 dreidimensionale Aufnahmen. Zwischen zwei Aufnahmen liegen 226 Sekunden. Die Gesamtaufnahmedauer beträgt 275 Minuten.

Maßstab: 2 μm









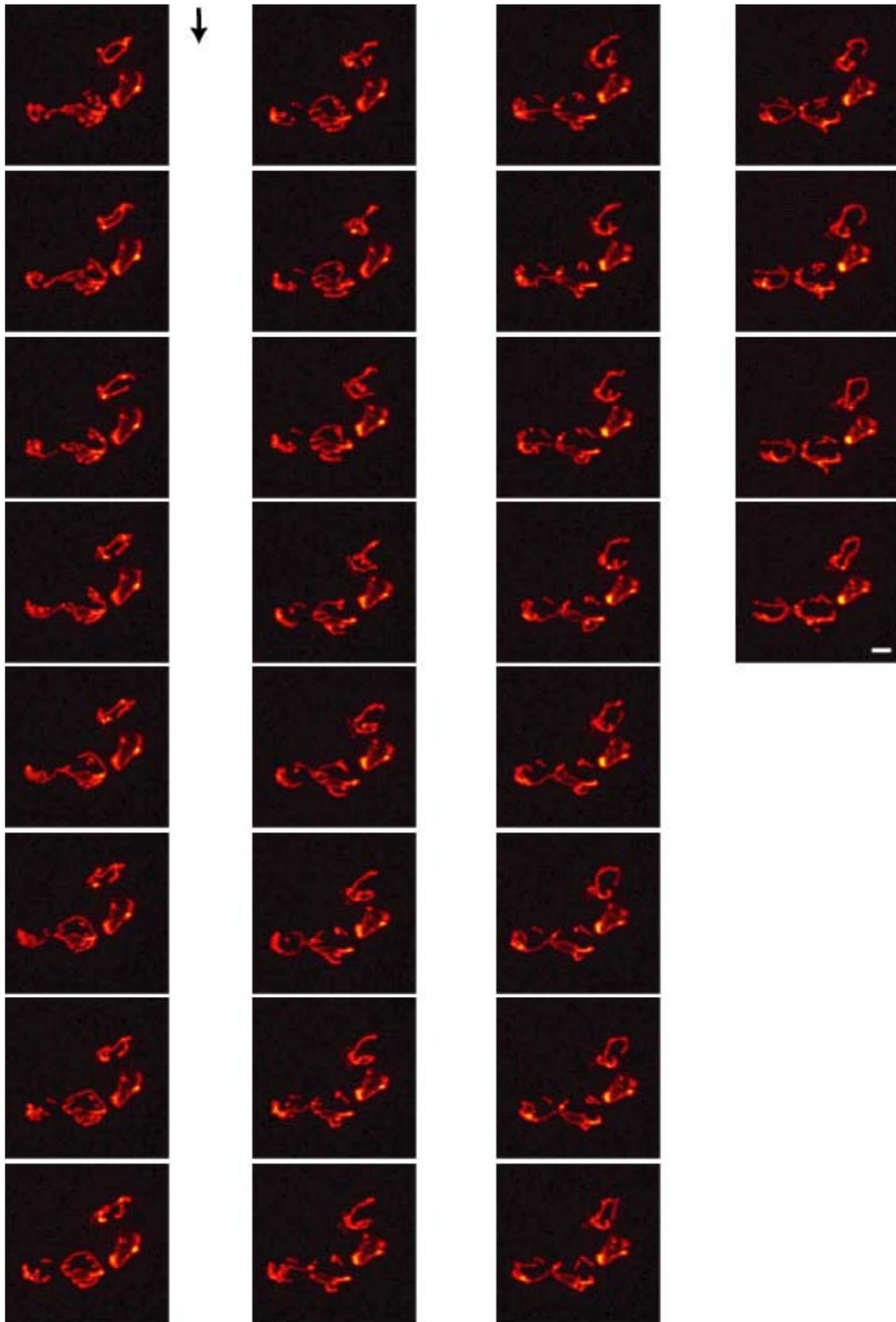
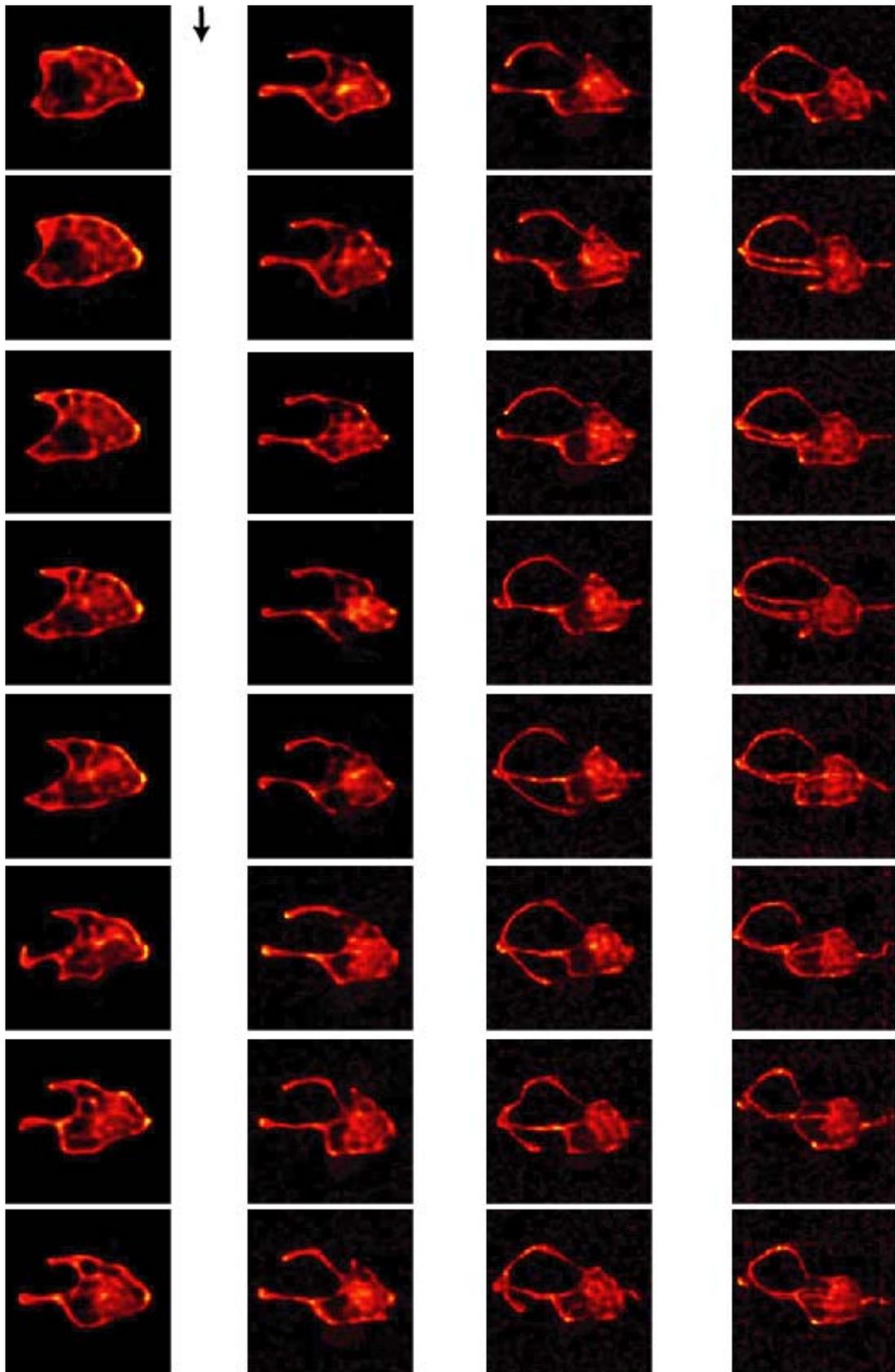


Abb. A1 Umstrukturierung von Wildtypmitochondrien unter Glucoserepression



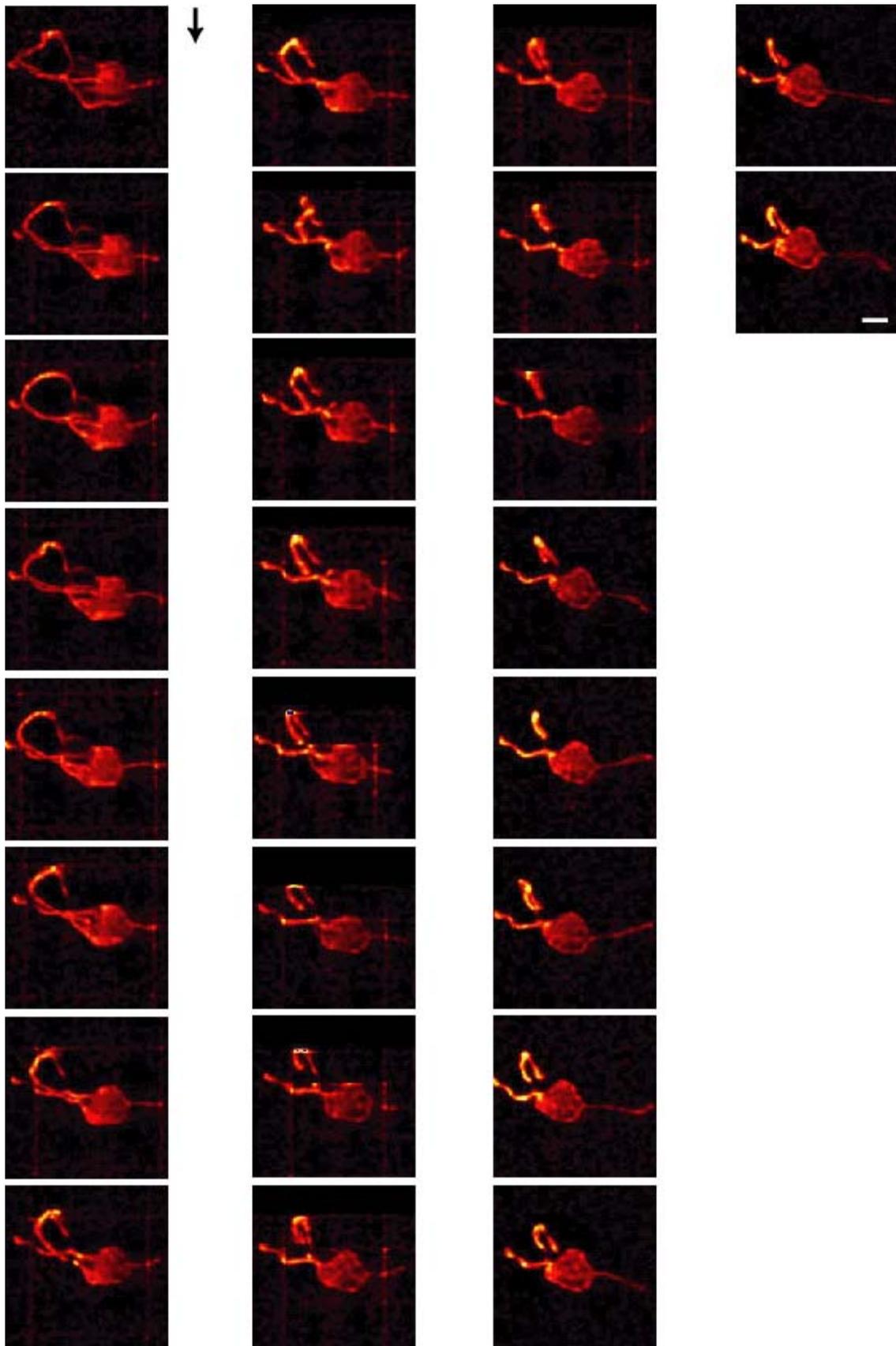
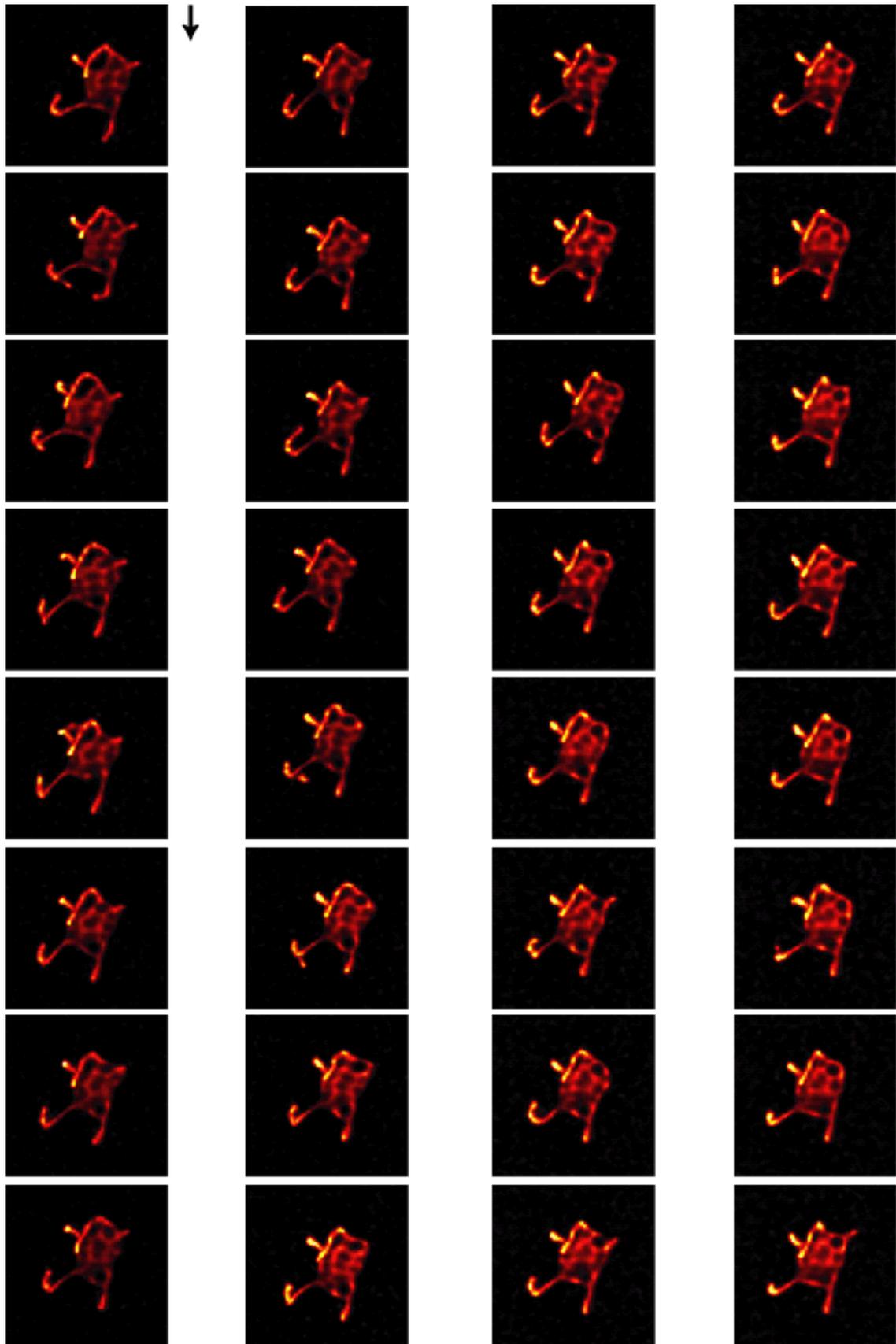


Abb. A2 Umstrukturierung von $\Delta fis1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression



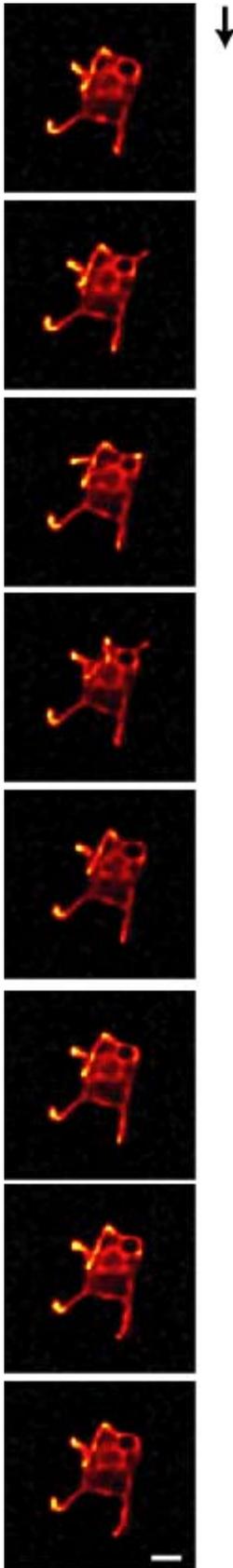
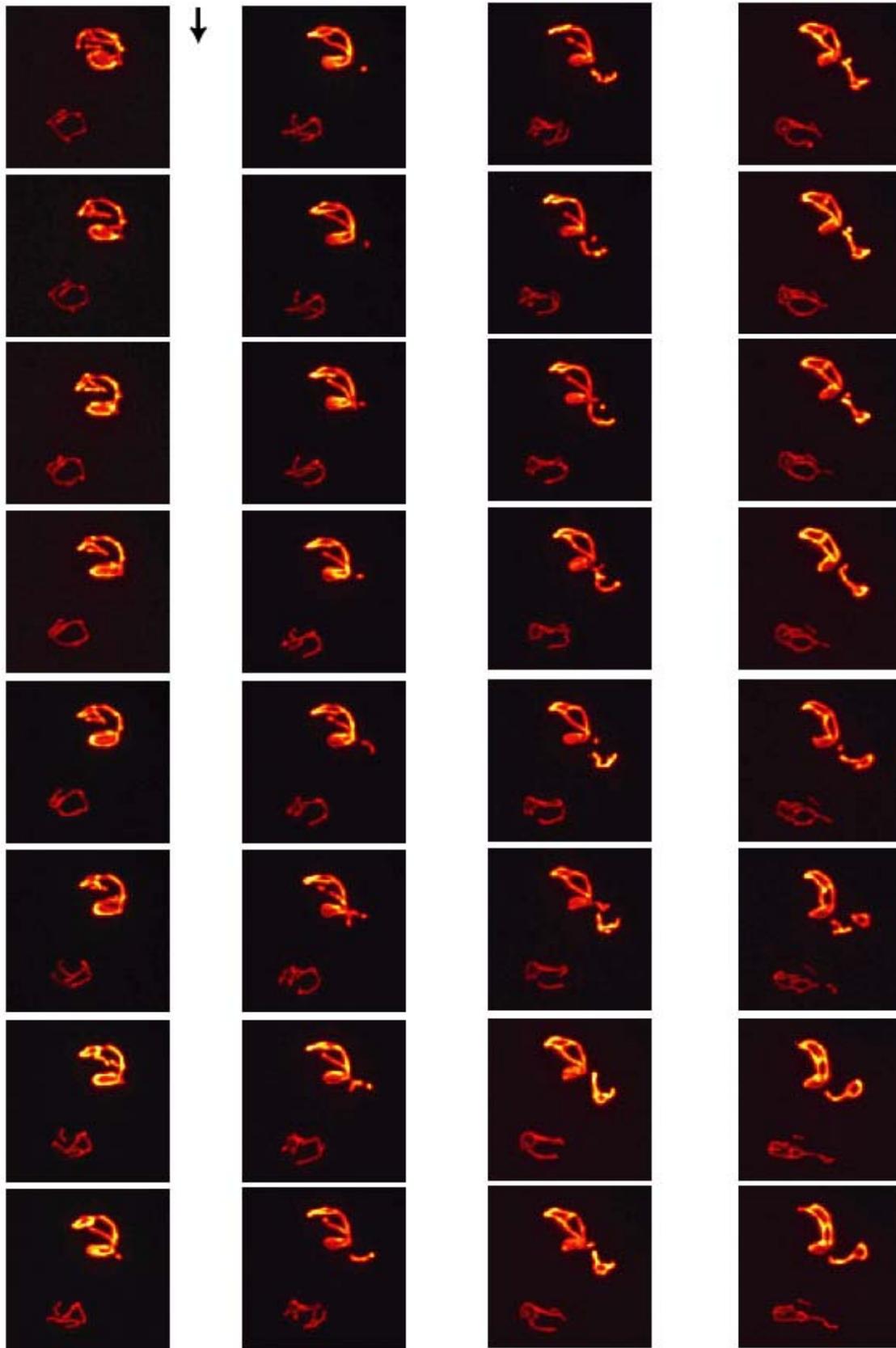


Abb. A3 Umstrukturierung von $\Delta dnm1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression



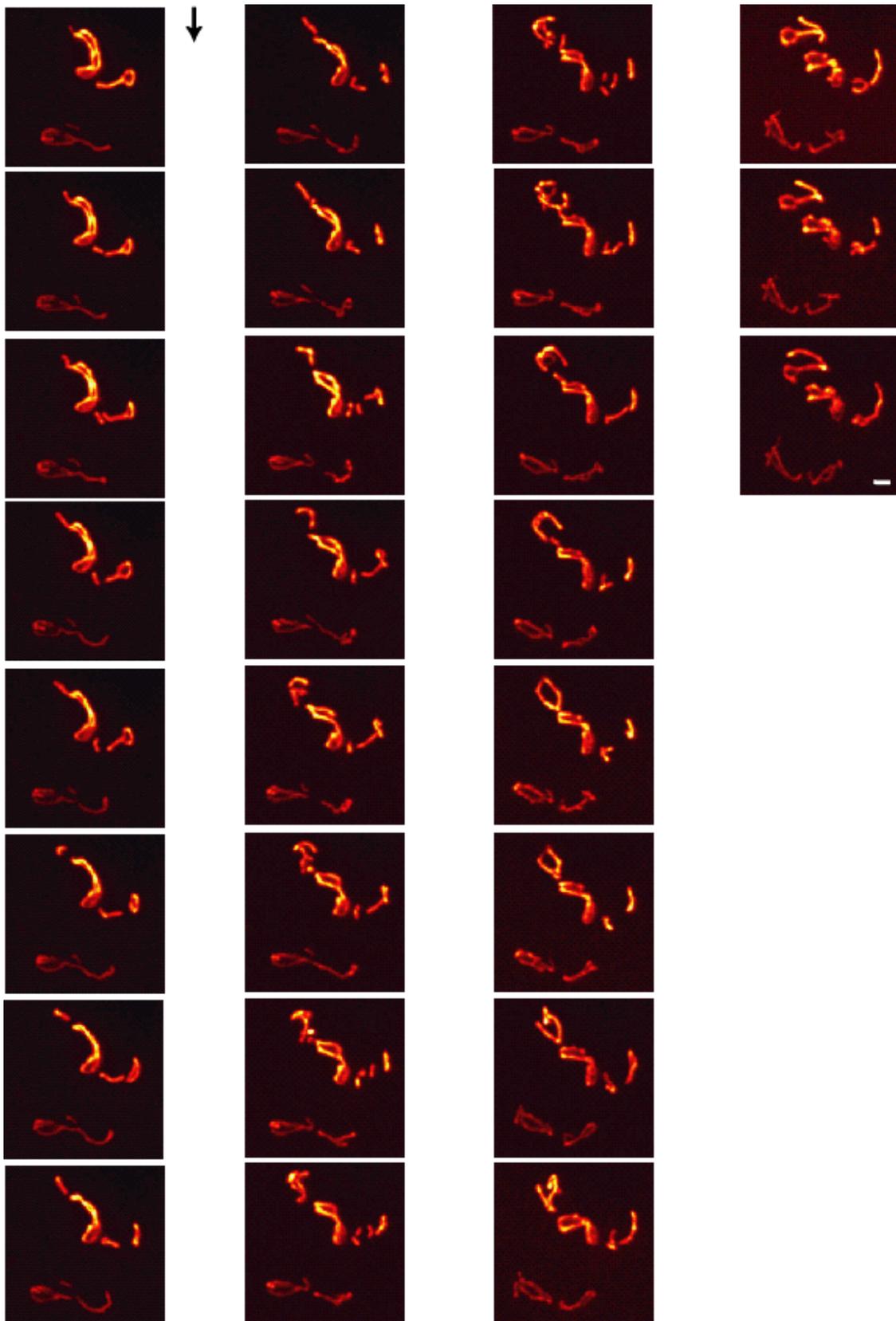
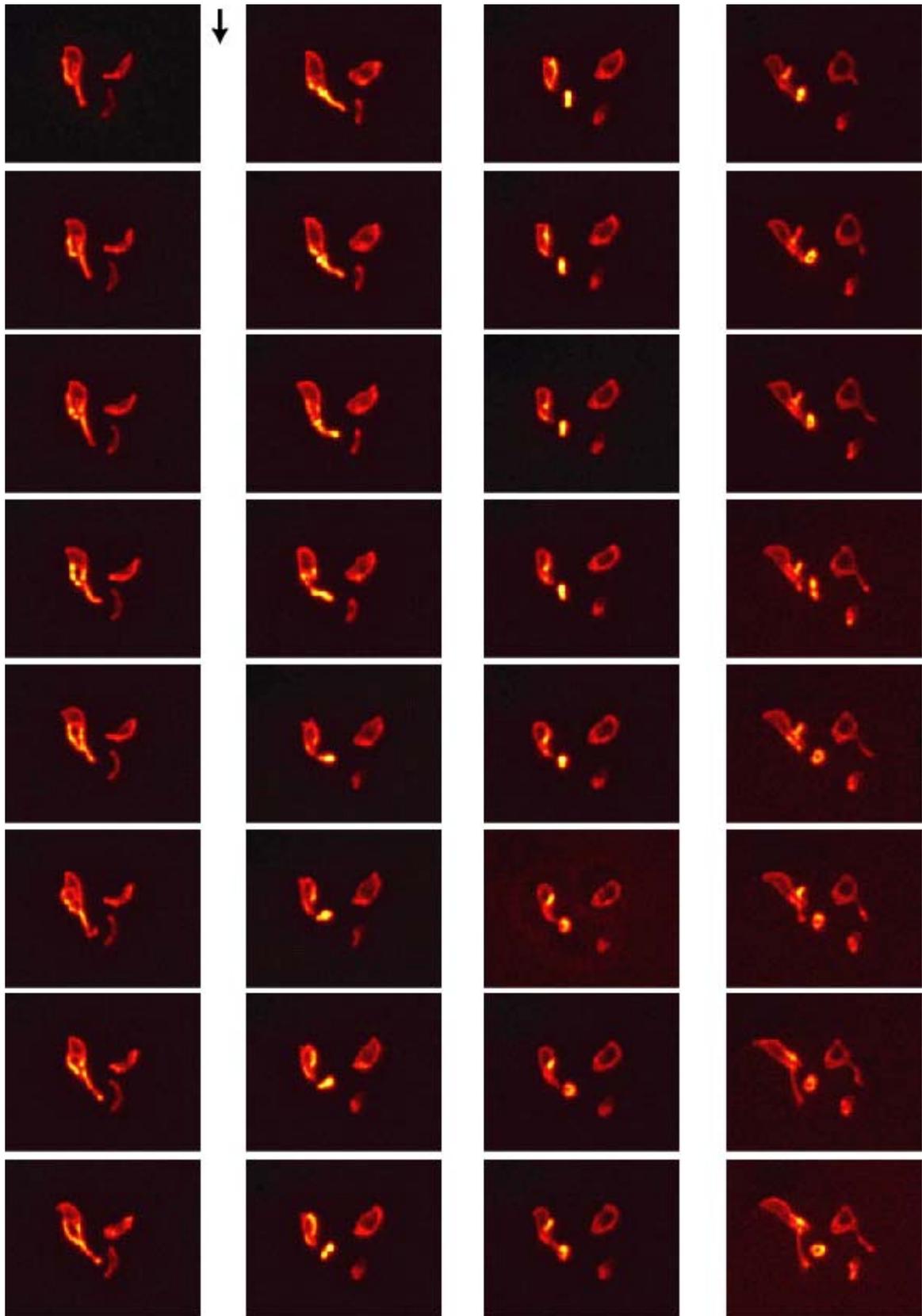
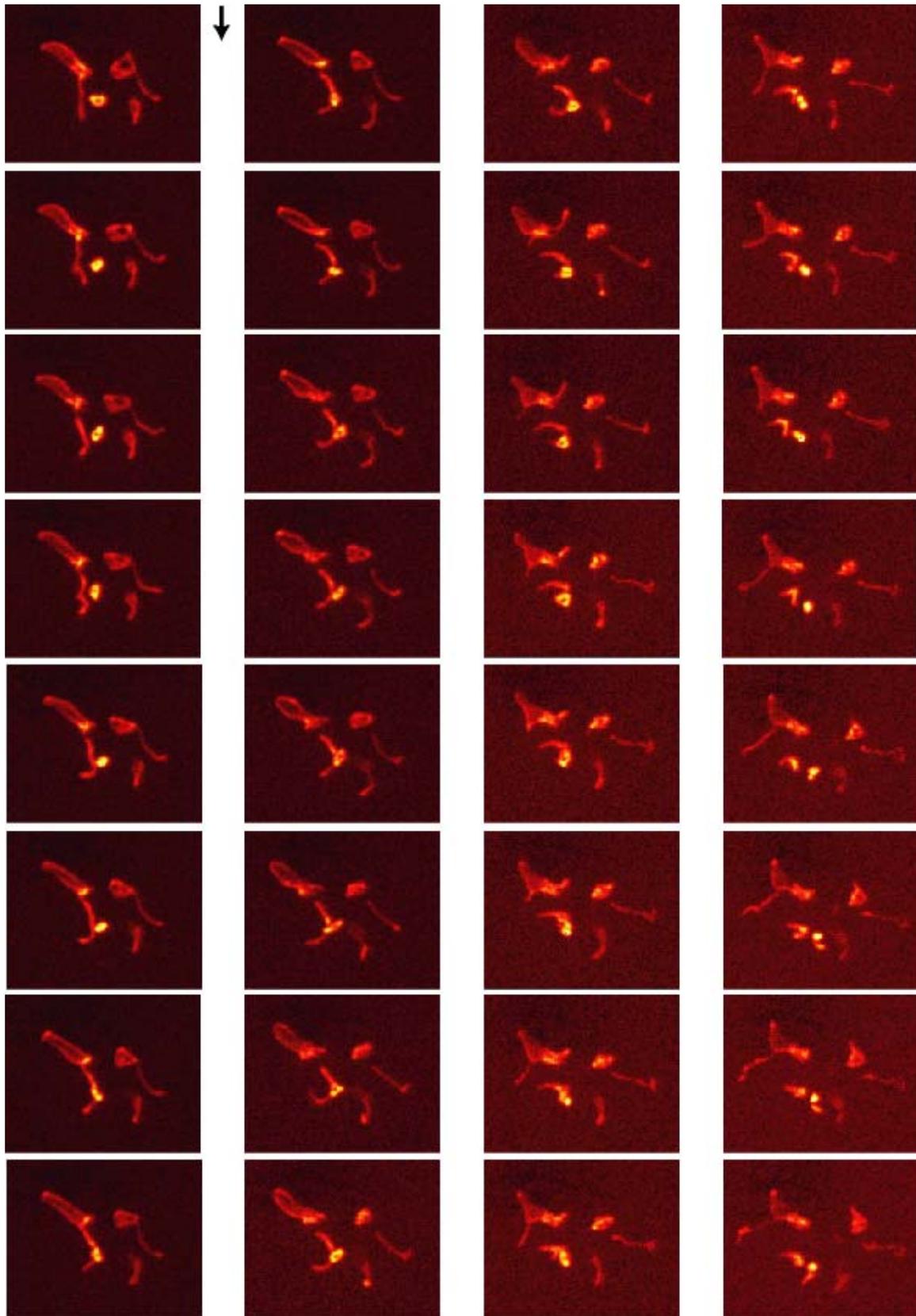


Abb. A4 Umstrukturierung von $\Delta mdm33$ -Mitochondrien unter Glucoserepression





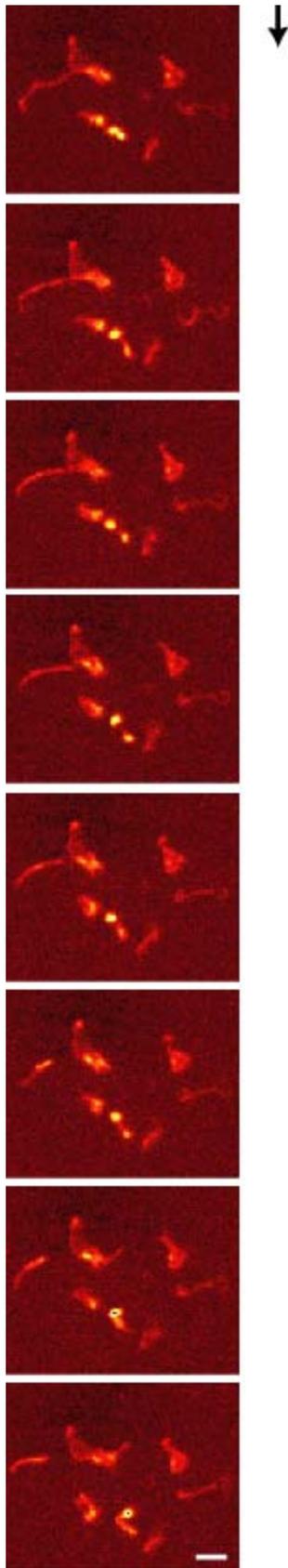


Abb. A5 Umstrukturierung von $\Delta mdm33/\Delta fis1$ -Mitochondrien unter Glucoserepression

Neben den Untersuchungen zum Teilungsapparat der äußeren Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae* wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation folgendes Projekt bearbeitet:

6.2 Beschreibung der Eigenschaften eines neuentwickelten Glycerinobjektivs und seiner Anwendungsmöglichkeiten für die 3D-Fluoreszenzmikroskopie

In der konfokalen Mikroskopie sind die sphärischen Aberrationen, die durch unterschiedliche Brechungsindizes der Probe, des Deckglases und des Immersionsmediums entstehen, Ursache für eine Reihe von Fehlern (Sheppard und Cogswell, 1991): 1) Das detektierte Signal sinkt mit steigender Eindringtiefe in die Probe. 2) Die Auflösung verschlechtert sich. 3) Die aufgenommenen Bilder erscheinen axial verlängert oder komprimiert (Bucher et al., 2000; Egner et al., 1998; Egner und Hell, 1999; Hell et al., 1993; Jacobsen und Hell, 1995; Török et al., 1997).

Hochauflösende Lichtmikroskopie biologischer Objekte, die in glycerinhaltigen Medien eingebettet sind, ist bisher mangels Alternative fast ausschließlich mit Ölobjektiven durchgeführt worden. Der Brechungsindex von Öl und Deckglas beträgt ~ 1.51 und kommt somit dem Brechungsindex des Glycerins von ~ 1.45 relativ nahe, so dass die sphärischen Aberrationen verhältnismäßig gering ausfallen, aber nicht zu vernachlässigen sind.

In dieser Studie soll die optische Leistung eines neuentwickelten plan apochromatischen Glycerinobjektivs (HCX PL APO 100 x / 1.35 GLYC CORR, Leica Microsystems, Wetzlar) untersucht werden. Mit diesem Objektiv können sphärische Aberrationen bei der Aufnahme von in glycerinhaltigem Medium eingebetteten biologischen Objekten vermieden werden. Bei einem Brechungsindex des Glycerins von $n = 1.451$ (Konzentration 80 %) ist der halbe Aperturwinkel des 1.35 NA Glycerinobjektivs mit 68.5° etwas höher als die 67.3° des häufig verwendeten 1.4 NA Ölobjektivs.

Das Glycerinobjektiv ist für Quarzdeckgläser von $220 \pm 10 \mu\text{m}$ Dicke korrigiert worden. Deren Brechungsindex von $n \sim 1.46$ liegt nahe dem des Glycerins. Ein integrierter Korrekturring kompensiert Werte von $n \sim 1.44$ bis ~ 1.46 , die einer Glycerinkonzentration von 72-88 % entsprechen. Die beste optische Korrektur erhält man im mittleren Verstellbereich. Dieser wird erreicht, indem man den Wassergehalt des Glycerins variiert.

Temperaturänderungen und unterschiedliche Deckglasdicken machen ebenfalls eine Kompensation durch den Korrekturring erforderlich.

Die 100 x Vergrößerung und der freie Arbeitsabstand von 100 μm sind weitgehend analog zum 1.4 NA Ölobjektiv.

Im Folgenden wurde die Leistung des neuentwickelten Glycerinobjektives auf verschiedene Parameter hin untersucht. Die Vergleichsmessungen mit einem 1.4 NA Leica Ölobjektiv (HCX PL APO 100 x / 1.40-0.7 Öl) folgten dabei direkt auf die Messungen mit dem Glycerinobjektiv. Die Experimente sind an den konfokalen Systemen TCS SP1 und SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH) durchgeführt worden. Der Brechungsindex des Glycerins schwankte zwischen $n = 1.452$ und 1.457 .

1) Axiale chromatische Aberration

Zur Erfassung der axialen chromatischen Aberration wurde ein Standarddeckglas sowie ein Quarzdeckglas mit Silber bedampft. Die unverspiegelte Seite der Probe lag der Linse zugewandt. Um Artefakte durch Bewegungen der Probe auszuschließen, erfolgte die Anregung gleichzeitig bei 488, 543 und 633 nm. Das reflektierte Licht wurde durch passende Filter spektral getrennt und mit drei Photomultipliern detektiert. Die Größe der Lochblende war auf den kleinsten möglichen Wert eingestellt (< 0.1 Airy Scheibe). Es wurden 2D-Bilder des reflektierten Lichtes in xz-Richtung aufgenommen.

Die Differenz in der axialen Position des Maximums des Signals bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge spiegelt die axiale chromatische Aberration des Systems wieder. Die axialen chromatischen Aberrationen liegen für das Öl- und das Glycerinobjektiv in derselben Größenordnung und sind kleiner als 250 nm für die gemessenen Wellenlängen.

2) Axiale Auflösung

Um die axiale Auflösung von Glycerin- und Ölobjektiv miteinander vergleichen zu können, wurde die axiale Antwort (z) einer dünnen fluoreszierenden Schicht bestimmt. Dazu wurden Standarddeckgläser und Quarzdeckgläser mit einem monomolekularen fluoreszierenden Polydiacetylen Langmuir-Blodgett Film (Schrader et al., 1998) verwendet. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen Immersionsöl bzw. Glycerin auf die Objektträger aufgebracht. Die Anregung der Schicht erfolgte bei 488 nm, die Detektion zwischen 550 nm und 650 nm. Eine Sättigung der Fluorophore wurde durch Verwendung

einer geringen Laserleistung vermieden. Die Aufnahme der xz-Bilder erfolgte mit zwei verschiedenen Durchmessern der Lochblende (Airy Scheibe 1.0 bzw. 0.5).

Die ideale Einstellung für den Korrekturring des Glycerinobjektives wurde durch Maximierung des Fluoreszenzsignals bestimmt. Anhand der z-Antwort konnte die Halbwertsbreite des Signals als ein Merkmal der axialen Auflösung des Systems bestimmt werden.

Für einen Durchmesser der Lochblende, der einer Airy Scheibe entspricht, liegt die axiale Halbwertsbreite bzw. die axiale Auflösung beim Glycerinobjektiv bei 610 +/- 20 nm bzw. bei 640 +/- 20 nm beim Ölobjektiv. Reduziert man den Durchmesser der Lochblende auf eine Größe, die einer halben Airy Scheibe entspricht, erhält man eine etwas engere z-Antwort von 460 +/- 20 nm bzw. 510 +/- 20 nm. Die axiale Auflösung der beiden Objektive unterscheidet sich also nur geringfügig. Die errechneten theoretischen Werte für die Halbwertsbreite (Richards und Wolf, 1959) lagen sowohl für das Öl- als auch für das Glycerinobjektiv bei 600 nm bzw. 400 nm (Airy Scheibe 1.0 bzw. 0.5). Diese Werte stimmen mit denen des Experiments überein. Der Toleranzbereich für die Halbwertsbreite beträgt durch das Herstellungsverfahren ca. 50 nm für jedes Objektiv. Das Experiment zeigt somit deutlich, dass die axiale Auflösung des Glycerinobjektives in der Größenordnung eines hoch korrigierten 1.4 NA Ölobjektives liegt.

3) Intensität des Signals in axialer Richtung

Inwieweit wirken sich unterschiedliche Brechungsindizes von Probe und Immersionsmedium auf die Intensität des Signals in axialer Richtung aus? Zur Klärung dieser Frage wurde in Glycerin (80 %) gelöstes Rhodamine 6G einer Konzentration von 10^{-5} M auf ein Deckglas aufgebracht. Die Höhe des Flüssigkeitspegels war größer als der freie Arbeitsabstand des Objektivs. Die Aufnahme von xz-Intensitätsprofile erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionsbreite, die zwischen 495 und 530 nm lag. Der Durchmesser der Lochblende entsprach einer Airy Scheibe. Der Rand der Probe lag noch im Aufnahmebereich und die Eindringtiefe des Lichts überschritt den freien Arbeitsabstand des Objektivs nicht.

Wie durch Theorie und Experimente zu erwarten war (Egner et al., 1998; Hell et al., 1993), führen die durch unterschiedliche Brechungsindizes verursachten sphärischen Aberrationen im Falle des Ölobjektives zu einem merklichen Abfall in der Bildhelligkeit

mit steigender Eindringtiefe des Lichts. Der Grund dafür ist, dass die Aberrationen einen Anstieg der Nebenmaxima des Beleuchtungsfokus auf Kosten des Hauptmaximums verursachen. Der Fokus wird unscharf.

Dieses „Ausschmieren“ des Beleuchtungsfokus führt zu einer Verringerung des Gesamtsignals, das durch die Lochblende detektiert wird (Hell et al., 1993). Bei einer axialen Tiefe von $\sim 30 \mu\text{m}$ ist bei Aufnahmen mit dem Ölobjektiv die Intensität des Signals im Vergleich zu dem Wert, der direkt hinter dem Deckglas gemessen worden ist, um 25 % reduziert. Bei einer axialen Tiefe von $80 \mu\text{m}$ liegt der Intensitätsverlust bei fast 50 %. Im Gegensatz dazu erhält man beim Glycerinobjektiv ein konstantes Signal ohne Intensitätsverlust über den gesamten axialen Aufnahmebereich von $80 \mu\text{m}$.

4) Tatsächlicher und geometrischer Fokus

Die axiale Verschiebung des tatsächlichen Fokus weg vom geometrischen ist ein weiterer Effekt der durch Aberrationen entsteht, die wiederum durch unterschiedliche Brechungsindizes verursacht werden (Hell et al., 1993; Egner et al., 1998). Die tatsächliche Position des Fokus in axialer Richtung weicht um den Faktor β vom geometrischen ab. Letzterer ist die angenommene Position des Fokus bei gleichen Brechungsindizes. Dieser Effekt wurde anhand einer biologischen Probe untersucht.

Der *Caenorhabditis elegans* Stamm PD4792 (Caenorhabditis Genetics Center, NIH National Center for Research Resources (NCRR)) wurde bei 20°C auf NGM Agarplatten (Brenner, 1974), die mit *Escherichia coli* OP50 besiedelt waren, wachsen gelassen. Dieser Stamm exprimiert EGFP, das von einem *myo-2*-Promotor reguliert wird. Die Probenpräparation basiert auf der Arbeit von Finney und Ruvkun (1990). Adulte Würmer wurden in physiologischem Puffer 1 x M9 (Brenner, 1974) gewaschen und dann chemisch mit 3.5 %igem Paraformaldehyd (pH 6.8) für 5 Minuten fixiert. Nach der Fixierung erfolgte eine Permeabilisierung der Membran mit 1 % Triton X-100 in PBS (pH 6.9) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Würmer mit destilliertem Wasser gewaschen und darin suspendiert. Die Präparate wurden mit Poly-L-Lysin auf ein Standarddeckglas aufgebracht. Nach Zugabe von $20 \mu\text{l}$ Glycerin, kam ein Quarzdeckglas auf die Objekte. So konnte die gleiche Probe durch Umdrehen mit dem für das jeweilige Objektiv passenden Deckglas betrachtet werden. Die Präparate wurden 6 Wochen liegen gelassen. So war sichergestellt war, dass das Glycerin sich gleichmäßig in der Probe verteilt hatte. xy-Schnitte von $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ Größe und mit einem axialen Abstand von

1,14 μm wurden mit beiden Objektiven aufgenommen. Die Anregung des EGFP erfolgte bei 488 nm, die Detektion zwischen 500 nm und 530 nm. Der Durchmesser der Lochblende entsprach einer Airy Scheibe.

Man weiß aus Theorie und Experimenten, dass für 1.4 NA Ölobjektive, die in Glycerin fokussieren, $\beta = 0.92$ ist. Das Objekt erscheint um 9 % größer als es tatsächlich ist (Hell et al., 1993; Egner et al., 1998). Im Falle des Glycerinobjektives sollte es keine solche axiale Verlängerung geben, da $\beta = 1$. Diese Annahme konnte im obigen Experiment bestätigt werden. Im Fall des Ölobjektivs wurde ein xy-Bild mehr benötigt, um die gesamte Probe in axialer Richtung abzubilden (siehe Abb. A6). In Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen erscheint das annäherungsweise 10 μm dicke Präparat fälschlicherweise 1 μm dicker, so dass für quantitative Analysen das 3D-Bild reskaliert werden muss. Im Falle des Glycerinobjektivs entsprechen die mechanischen Schritte den optischen Schritten in z-Richtung.

M9-Puffer (Brenner, 1974): 6.0 g Na_2HPO_4 , 3.0 g KH_2PO_4 , 5.0 g NaCl , 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml destilliertes Wasser.

NGM/OP50 Agarplatten (Brenner, 1974): 3.0 g NaCl , 2.5 g Pepton, 17.0 g Agar, 1 ml 5 mg/ml Cholesterol, 1 ml 1 M MgSO_4 , 25 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0) auf 975 ml destilliertes Wasser.

30 μl einer frisch in LB-Medium angezogenen OP50-Kultur werden 1:3 verdünnt auf die Platten ausgestrichen und 16 Stunden bei 20°C vorinkubiert.

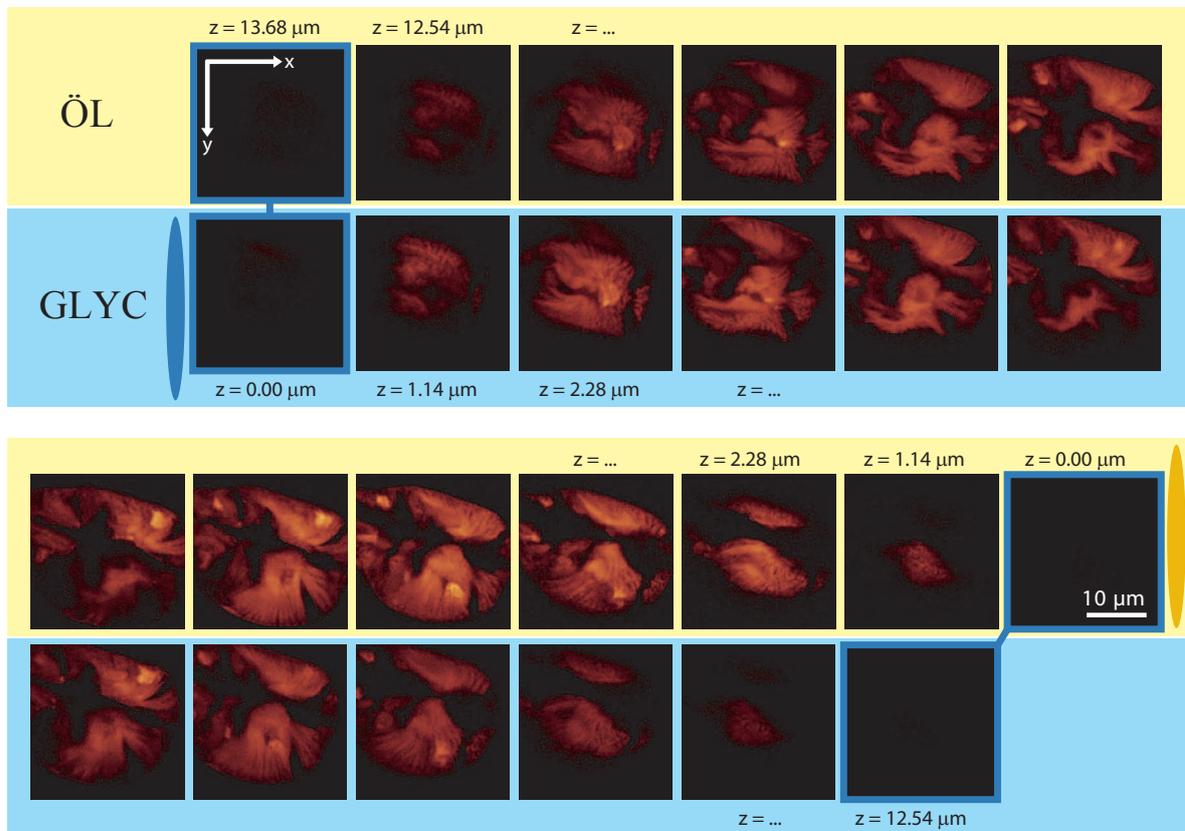


Abb. A6 Dreidimensionale Serien (xy-Bilder) der Pharynxmuskulatur von *C. elegans*. Die erste Serie wurde mit einem Ölobjektiv aufgenommen (gelber Hintergrund), die zweite mit einem Glycerinobjektiv (blauer Hintergrund). Beide Serien sind mit dem gleichen mechanischen Abstand zwischen den Schnitten in axialer Richtung aufgenommen worden. Die mit dem Ölobjektiv aufgenommene Serie besteht aus einem Bild mehr als die mit dem Glycerinobjektiv aufgenommene. Das Objekt erscheint fälschlicherweise ca. 10 % größer als es ist. Der Grund dafür sind die Aberrationen, die dadurch entstehen, dass ein in Glycerin eingebettetes Objekt mit einem 1.4 NA Ölobjektiv aufgenommen wird. Der optische axiale Abstand zwischen den Schnitten ist im Vergleich zum mechanischen axialen Abstand um 10 % reduziert. Bei der mit dem Glycerinobjektiv aufgenommenen Serie entspricht der mechanische dem optischen Abstand zwischen den Schnitten. Das Objekt war zwischen einem Standarddeckglas auf der einen und einem Quarzdeckglas auf der anderen Seite eingebettet. So konnte die Probe durch Umdrehen mit dem für das jeweilige Objektiv passenden Deckglas betrachtet werden. Die relative Position der Objektive zum Objekt sind schematisch dargestellt. Die Zahlen stehen für den mechanischen Abstand zwischen den Schnitten innerhalb der Probe.

7. Literaturverzeichnis

Adams, A. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Arbustini, E., Diegoli, M., Fasani, R., Grasso, M., Morbini, P., Banchieri, N., Bellini, O., Dal Bello, B., Pilotto, A., Magrini, G., Campana, C., Fartina, P., Gavazzi, A., Narula, J., Vignano, M. (1998). Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* **153**, 1501-1510.

Bakeeva, L. E. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochem. Biophys. Acta* **501**, 349-369.

Bereiter-Hahn, J. (1990). Behaviour of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1-63.

Bereiter-Hahn, J., Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Techn.* **27**, 198-219.

Bevis, B. J., Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* **20**, 83-87.

Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature Cell Biology* **1**, 298-304.

Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S., Pon, L. A. (1998). Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J. Cell Biology* **141**, 1371-1381.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.

Bucher, D., Scholz, M., Stetter, M., Obermayer, K., Pflüger, H.-J. (2000). Correction methods for three-dimensional reconstructions from confocal images: I. Tissue shrinking and axial scaling. *J. Neurosci. Meth.* **100**, 135-143.

Cervený, K. L., McCaffery, J. M., Jensen, R. E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DNM1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell* **12**, 309-321.

- Chen, L.B.** (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 155-181.
- Chen, M. S., Obar, R. A., Schroeder, C. C., Austin, T. W., Poodry, C. A., Wadsworth, S. C., Vallee, R. B.** (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586.
- Ciejek, E., Thorner, J.** (1979). Recovery of *S. cerevisiae* a cells from G1 arrest by alpha factor pheromone requires endopeptidase action. *Cell* **18**, 623-635.
- Criddel, R. S., Schatz, G.** (1969). Promitochondria of anaerobically grown yeast. I. Isolation and biochemical properties. *Biochemistry* **8**, 322-334.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., Schmid, S. L.** (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biology* **127**, 915-934.
- Damke, H., Baba, T., van der Blik, A. M., Schmid, S. L.** (1995). Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J. Cell Biology* **131**, 69-80.
- De Camilli, P., Takei, K., McPherson, P. S.** (1995). The function of dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiology* **5**, 559-565.
- Djaldetti, M.** (1982). Mitochondrial abnormalities in the cell of myeloma patients. *Acta Haematol.* **68**, 241-248.
- Drubin, D. G., Jones, H. D., Wertmann, K. F.** (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**, 1277-1294.
- Eapen, C. E., Madesh, M., Balasubramanian, K. A., Pulimood A., Mathan, M., Ramakrishna, B. S.** (1998). Mucosal mitochondrial function and antioxidant defences in patients with gastric carcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**, 975-981.
- Egner, A., Schrader, M., Hell, S. W.** (1998). Refractive index mismatch induced intensity and phase variations in fluorescence confocal, multiphoton and 4Pi-microscopy. *Opt. Commun.* **153**, 211-217.
- Egner, A., Hell, S. W.** (1999). Equivalence of the Huygens-Fresnel and Debye approach for the calculation of high aperture point-spread-functions in the presence of refractive index mismatch. *J. Microsc.* **193**, 244-249.

- Egner, A.** (2002). Multifokale hochauflösende 3D-Fluoreszenzmikroskopie. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg.
- Egner, A., Jakobs, S., Hell, S. W.** (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **99**, 3370-3375.
- Entian, K. D., Barnett J. A.** (1992). Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 506-510.
- Fekkes, P., Shepard, K. A., Yaffe, M. P.** (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biology* **151**, 333-340.
- Felenbok, B.** (1991). The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as tool for the expression of recombinant proteins. *J. Biotechnol.* **17**, 11-17.
- Finney, M., Ruvkun, G.** (1990). The *unc-86* gene product couples cell lineage and cell identity in *C. elegans*. *Cell* **63**, 895-905.
- Fox, T. D., Folley, L. S., Mulero, J. J., Mc Mullin, T. W., Thorsness, P. E., Hedin, L. O., Costanzo, M. C.** (1991). Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Methods of Enzymology* **194**, 149-165.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., Westermann, B.** (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* **152**, 683-692.
- Fukushima, N. H., Brisch, E., Keegan, B. R., Bleazard, W., Shaw, J. M.** (2001). The GTPase effektor domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2756-2766.
- Fuller, M. T.** (1993). In *The Development of Drosophila melanogaster*. Bate, M., Martinez-Arias, A. (eds.). Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 71-147.
- Gancedo, J. M.** (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **206**, 297-313.
- Gancedo, J. M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 334-361.
- Green, D. R., Reed, J. C.** (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.

- Griparic, L., van der Bliek, A. M.** (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* **2**, 235-244.
- Guarente, L., Becker, D. M.** (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in enzymology* **194**, 182-188.
- Hell, S. W., Reiner, G., Cremer, C., Stelzer, E. H. K.** (1993). Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *J. Microsc.* **169**, 391-405.
- Hellig, R. B., Goodman, H. M., Bayer, H. W.** (1974). Analysis of endonuclease *Eco* RI fragments of DNA from λ bacteriophages and other viruses by agarose gelelectrophoresis. *J. Virology* **14**, 1235-1244.
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., Shaw, J. M.** (1998). Mitochondrial Fusion in Yeast Requires the Transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biology* **143**, 359-373.
- Herskovits, J. S., Burgess, C. C., Obar, R. A., Vallee, R. B.** (1993). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biology* **122**, 565-578.
- Hinshaw, J. E., Schmid, S. L.** (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.
- Hoffmann, H. P., Avers, C. J.** (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science* **181**, 749-51.
- Inagaki, T., Kobayashi, S., Ozeki, N., Suzuki, M., Fukuzawa, Y., Shimizu, K., Kato, K., Kato, K.** (1992). Ultrastructural identification of light microscopic giant mitochondria in alcoholic liver disease. *Hepatology* **15**, 46-53.
- Jacobsen, H., Hell, S. W.** (1995). Effect of refractive index on the imaging of a confocal fluorescence microscope employing high aperture lenses. *Bioimaging* **3**, 39-47.
- Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A. C., Egner, A., Westermann, B., Hell, S.** (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Science* **116**, 2005-2014.
- Jakobs, S., Schauss, A. C., Hell, S. W.** (2003). Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen. *FEBS Letters* **554**, 194-200.

- Jensen, R. E., Hobbs, A. E. A., Cervený, K. L., Sesaki, H.** (2000). Yeast mitochondrial dynamics: Fusion, division, segregation, and shape. *Microscopy Research and Technique* **51**, 573-583.
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., Chen, L. B.** (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl Acad. Sci USA* **77**, 990-994.
- Johnston, M., Carlson, M.** (1992). Regulation of carbon phosphate utilization. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Jones, E. W., Pringle, J. R., Broach, J. R. (eds.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2**, 193-231.
- Julius, D., Schekman, R., Thorner, J.** (1984). Glycosylation and processing of prepro-alpha-factor through the yeast secretory pathway. *Cell* **36**, 309-318.
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A., van der Bliek, A. M.** (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular Cell* **4**, 815-826.
- Legesse-Miller, A., Massol, R. H., Kirchhausen, T.** (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1953-1963.
- Liu, J. P., Robinson, P. J.** (1995). Dynamin and endocytosis. *Endocrine Rev.* **16**, 590-607.
- Lucy, L. B.** (1974). An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astron. J.* **79**, 745-754.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Dimmer, K. S., Neupert, W., Westermann, B.** (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell. Biology* **160**, 553-564.
- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M., Shaw, J. M.** (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biology* **151**, 367-379.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- Munn E. A.** (1974). The structure of mitochondria. *New York: Academic Press Inc.* 465p.

- Nagorni, M., Hell S. W.** (1998). 4Pi-confocal microscopy provides three-dimensional images of the microtubule network with 100 to 150 nm resolution. *J. Struct. Biol.* **123**, 236-247.
- Nagorni, M., Hell, S. W.** (2001). Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. II. Power and limitation of nonlinear image restoration. *J. Opt. Soc. Am. A.* **18**, 49-54.
- Nishino, I., Kobayashi, O., Goto, Y., Kurihara, M., Kumagai, K., Fujita, T., Hashimoto, K., Horai, S., Nonaka, I.** (1998). A new congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve* **21**, 40-47.
- Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W., Walter, P.** (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1233-1242.
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W., Shaw, J. M.** (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biology* **143**, 333-349.
- Partikian, A., Olveczky, B., Swaminathan, R., Li, Y. X., Verkman, A. S.** (1998). Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix. *J. Cell Biology* **140**, 821-829.
- Plattner, H., Schatz, G.** (1969). Promitochondria of anaerobically grown yeast. III. Morphology. *Biochemistry* **8**, 339-343.
- Pon, L., Schatz, G.** (1991). Biogenesis of Yeast Mitochondria. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. Broach, J. R. Pringle, J. R., Jones, E. W. (eds.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 333-406.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., Westermann, B.** (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chemistry* **273**, 20150-20155.
- Richards, B., Wolf, E.** (1959). Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system. *Proc. Roy. Soc. Lond. A.* **253**, 358-379.

- Richardson, W. H.** (1972). Bayesian-based iterative method of image restoration. *J. Opt. Soc. Am.* **62**, 55-59.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheffler, I. E.** (2001). A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**, 3-31.
- Schmid, S. L.** (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 511-548.
- Sesaki, H., Jensen, R. E.** (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biology* **147**, 699-706.
- Shaw, J. M., Nunnari, J.** (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends in Cell Biology* **12**, 178-184.
- Sherman, F.** (1991). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology* **194**, 3-21.
- Sikorski, R. S., Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Simon, V. R., Swayne T. C., Pon L. A.** (1995). Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J. Cell Biology* **130**, 345-354.
- Simon, V. R., Karmon, S. L., Pon, L. A.** (1997). Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**, 199-210.
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N., van der Bliet, A. M.** (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biology* **143**, 351-358.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L., van der Bliet, A. M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245-2256.
- Stevens, B. J.** (1977). Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstitution. *Biol. Cellulaire* **28**, 37-56.

- Stevens, B.** (1981). Mitochondrial structure. In: *The molecular biology for the yeast Saccharomyces cerevisiae, life cycle and inheritance*. Strathern J. N., Jones, E. W., Broach. J. R. (eds.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 471-504.
- Strauss, E.** (1999). Microbes feature as pathogens and pals at gathering. *Science* **284**, 1916-1917.
- Suelmann, R., Fischer, R.** (2000). Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 42-50.
- Sweitzer, S. M., Hinshaw, J. E.** (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.
- Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., De Camilli, P.** (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP γ S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190.
- Tandler B., Hoppel, C. L.** (1972). Mitochondria. *New York: Academic Press* 59p.
- Tieu, Q., Nunnari, J.** (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *Journal of Cell Biology* **151**, 353-365.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K., Nunnari, J.** (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *Journal of Cell Biology* **158**, 445-452.
- Török, P., Hewlett, S. J., Varga, P.** (1997). The role of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy. *J. Microsc.* **188**, 158-172.
- Tourte, M., Mignotte, F., Mounolou, J. C.** (1981). Organization and replicative activity of the mitochondria of oogenetic and previtellogenic oocytes in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* **23**, 9-21.
- Trumbly, R. J.** (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 15-21.
- Urrutia, R., Henley, J. R., Cook, T., McNiven, M. A.** (1997). The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 377-384.
- van der Bliek, A. M., Meyerowitz, E. M.** (1991). Dynamin-like protein encoded by *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411-414.

- van der Blik, A. M., Redelmeier, T. E., Damke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M., Schmid, S. L.** (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biology* **122**, 553-563.
- Schrader, M., Hofmann, U. G., Hell, S. W.** (1998). Ultrathin fluorescent layers for monitoring the axial resolution in confocal and two-photon fluorescence microscopy. *J. Microsc.* **191**, 135-140.
- Sheppard, C. J. R., Cogswell, C. J.** (1991). Effects of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties. *Optik* **87**, 34-38.
- van der Blik, A. M.** (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trend Cell Biol.* **9**, 96-102.
- van Kempen, G. M. P., Van Vliet, L. J., Verveer, P. J., Van der Voort, H. T. M.** (1997). A quantitative comparison of image restoration methods for confocal microscopy. *J. Microsc.* **185**, 354-365.
- Warnock, D. E., Schmid, S. L.** (1996). Dynamin GTPase, a force generating molecular switch. *Bioessays* **18**, 885-893.
- Warren, G., Wickner, W.** (1996). Organelle inheritance. *Cell* **84**, 395-400.
- Westermann, B., Neupert, W.** (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1421-1427.
- Westermann, B.** (2002). Merging mitochondria matters - Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Reports* **3**, 527-531.
- Wills, C.** (1990). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 245-280.
- Yaffe, M. P.** (1999). Dynamic mitochondria. *Nature Cell Biology* **1**, 149-E150.
- Yotsuyanagi, Y.** (1962). Etudes sur le chondriome de la levure. I. Variation de l'ultrastructure du chondriome au cours du cycle de la croissance aerobie. *J. Ultrastruct. Res.* **7**, 121-140.
- Yoon, Y., Pitts, K. R., Mc Niven, M. A.** (2001). Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2894-2905.

Folgende Publikationen sind im Rahmen dieser Dissertation entstanden:

Jakobs, S. und Martini, N., Schauss, A. C., Egner, A., Westermann, B., Hell, S. W. (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *Journal of Cell Science* **116**, 2005-2014.

Martini, N., Bewersdorf, J., Hell, S. W. (2002). A new high-aperture glycerol immersion objective lens and its application to 3D-fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy* **206**, 146-151.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Stefan W. Hell für das zur Verfügung stellen der Rahmenbedingungen, insbesondere der guten Arbeitsmöglichkeiten bedanken, die das Anfertigen dieser Dissertation möglich machten.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Ehlers danke ich für die freundliche Übernahme des Referats.

Ein Dankeschön geht auch an Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Jakobs, der mir den Anstoß zu diesem Thema gab und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dr. Alexander Egner möchte ich dafür danken, dass er mich in das interessante Arbeitsgebiet der MMM-4Pi-Mikroskopie in Theorie und Praxis eingeführt hat, ebenso für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Jörg Bewersdorf sei für die stets freundliche Unterstützung und für die gute Zusammenarbeit, insbesondere im Rahmen der Einführung der Glycerinobjektive, gedankt.

Vielen Dank auch an Astrid Schauß für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Bei Dr. Alexander Goroschkov möchte ich mich für die Unterstützung bei der Arbeit am MMM-4Pi-Mikroskop bedanken.

Jan Keller danke ich für das Korrekturlesen und für die Hilfe bei physikalischen Fragen und Problemen am PC.

Dr. Andreas Schönle sei für das zur Verfügung stellen des Computerprogramms „ImSpector“ gedankt.

Rita Schmitz-Salve möchte ich für die Hilfestellungen bei der Laborarbeit und für die gute Zusammenarbeit herzlich danke sagen.

Der gesamten jetzigen und ehemaligen Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft danken.

Dr. Stephan Fröde danke ich für die kurzfristige Einführung in die Biologie von *C. elegans* und die Unterstützung.

Ein großes Dankeschön geht auch an Arend Baumfalk für das stetige Interesse an dem Thema und das Korrekturlesen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten. Ihnen, meinem Mann und meiner Schwester sei auch für Unterstützung und Zuspruch insbesondere in schwierigen Phasen gedankt.

Diese Arbeit wurde größtenteils durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Förderung He-1977, unterstützt.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Nadia Martini

Geburtstag: 17. April 1970

Geburtsort: Krefeld

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1976-1980 Grundschule
1980-1989 Viktoria-Luise-Gymnasium, Hameln
12. Mai 1989 Allgemeinen Hochschulreife

April 1990: Aufnahme des Studiums der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität, Göttingen.

Februar 1991: Vorphysikum

September 1992: Physikum

Oktober 1994: Aufnahme des Studiums der Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen.

Oktober 1996: Vordiplom

Februar 2000: Diplom
Thema der Diplomarbeit: „Morphologisch-ultrastrukturelle Untersuchung der Proboscisbasis, insbesondere des Lateralorgans bei *Paratenuisentis ambiguus* (van Cleave 1921)“. Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Ulrich Ehlers.

Juli 2000: Aufnahme des Promotionsstudiums an der Georg-August-Universität, Göttingen. Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, unter der Anleitung von PD Dr. Stefan W. Hell.