

Aus der
Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle der den Morbus Charcot-Marie-Tooth
verursachenden R94Q Mutation im MFN2 Gen
in der Resistenz gegen oxidativen Stress

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Rahel Zimmermann
aus Heidelberg

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.07.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 Morbus Charcot-Marie Tooth.....	3
2.1.1 Epidemiologie	3
2.1.2 Klinik und Verlauf.....	4
2.2 Mitochondriale Spaltung und Fusion	5
2.3 Mitofusin.....	7
2.4 Mitochondriale Calciumhomöostase.....	10
2.5 Mitophagie.....	11
2.6 Oxidativer Stress	13
2.7 Glutathion.....	13
3 MATERIAL	16
3.1 Zelllinien.....	16
3.2 Verbrauchsmaterialien	16
3.3 Medium	17
3.4 Puffer, Chemikalien	17
3.5 Antikörper, Farbstoffe, Marker	18
3.6 Plasmide	19
3.7 Kits.....	19
3.8 Geräte	19
3.9 Programme	21
4 METHODEN	22
4.1 Zellbiologie	22
4.1.1 Kultur und Passagieren von MEF- Zellen.....	22
4.1.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauerkammer	22
4.1.3 Automatisierte Zellzahlbestimmung.....	23
4.1.4 Zellviabilitätsbestimmung	23
4.1.5 Zellproliferationsbestimmung	23
4.1.6 Zelluläre ROS Messung mit CellROX® Green Reagenz	24
4.1.7 Mitochondriale Membranpotentialmessung mit TMRE	24
4.1.8 Glukoseaufnahme.....	25
4.2 Molekularbiologie	25
4.2.1 Transiente Transfektion	25
4.2.2 RNA Isolation.....	27

4.2.3	Polymerase-chain-reaction (PCR) und Sequenzierung	28
4.2.4	cDNA Synthese	29
4.2.5	Glutathionassay	29
4.2.6	Mitochondriale Calciumbestimmung.....	30
4.3	Proteinbiochemie.....	30
4.3.1	Probengewinnung	30
4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
4.3.3	SDS Page.....	31
4.3.4	Westernblot.....	32
5	ERGEBNISSE.....	33
5.1	Validierung der R94Q und Rescue Zelllinien	33
5.2	Proliferation von Wildtyp und R94Q MFN2 nimmt bei oxidativem Stress gleichermaßen ab.....	34
5.3	Oxidativer Stress führt gleichermaßen zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials.....	36
5.4	Erhöhter mitochondrialer Calciumgehalt bei R94Q-Zellen	37
5.5	Verringerte ROS und erhöhtes GSH sowie erhöhter Glukoseumsatz in R94Q-Zellen bei oxidativem Stress	38
5.6	Verringerte Mitophagie in R94Q-Zellen	43
6	DISKUSSION.....	48
6.1	KO+WT und KO+R94Q exprimieren gleiche Mengen an MFN2, die jedoch über dem MFN2 des WT liegen.....	48
6.2	Kein Unterschied zwischen Wachstumsraten von R94Q und WT Zellen und gleichermaßen Wachstumsinderung durch oxidativen Stress.....	48
6.3	R94Q beeinflusst die Calciumhomöostase über MAM.....	50
6.4	Verringerte ROS bei R94Q-Zellen	51
6.5	Erhöhtes Glutathion und gesteigerte Glukoseaufnahme bei R94Q-Zellen	53
6.6	Verringerte Mitophagie bei R94Q-Zellen	54
6.7	Diskussion der gewählten Methoden.....	55
7	ZUSAMMENFASSUNG	56
8	LITERATURVERZEICHNIS	57
9	DANKSAGUNG	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
BCA-Test	Bicinchoninsäure-Test
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Zirka
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CTB	<i>Celltiterblue-Assay</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cDNA	komplementäre DNA
CMT	Charcot Marie Tooth
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylfumarat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	fetales Kälberserum
G	Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GSH	Glutathion
GSS	Glutathion-Synthase
GSR	Glutathion-Reduktase
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSSG	Glutathion-Disulfid
GSTs	Glutathion-S-Transferasen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	in der lebenden Zelle
kDa	Kilodalton
mRNA	BotenRNA
M	Molar
m	Milli-
MFN	Mitofusin
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaOH	Natriumhydroxid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
n	Nano-
ng	Nanogramm
OH	Hydroxyl-Radikale
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Radikale
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
U	Units
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	Zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Patienten mit distal betonten Muskelatrophien	4
Abbildung 2: Mitochondriale Fusion und Fission	6
Abbildung 3: Struktur von MFN2	8
Abbildung 4: Initialisierung der Mitophagie	12
Abbildung 5: GSH/GSSG Zyklus	14
Abbildung 6: Rescue und R94Q exprimieren vergleichbare MFN2 Mengen	33
Abbildung 7: Behandlung mit 100 μ M H ₂ O ₂ beeinträchtigt das Wachstum von R94Q und Rescue-Zellen gleichermaßen.....	35
Abbildung 8: Oxidativer Stress führt bei beiden Zelllinien zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials	36
Abbildung 9: Erhöhter mitochondrialer Calciumgehalt bei R94Q-Zellen.....	38
Abbildung 10: Erhöhter Glukoseumsatz bei R94Q-Zellen unter oxidativem Stress	42
Abbildung 11: Verringerte Mitophagie in R94Q-Zellen sowie erhöhte Mitophagie durch H ₂ O ₂ Behandlung bei beiden Zellininen.....	44
Abbildung 12: Verringerte Mitophagie bei R94Q-Zellen	47

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 2: Medium	17
Tabelle 3: Puffer, Chemikalien.....	18
Tabelle 4: Antikörper, Farbstoffe, Marker.....	18
Tabelle 5: Plasmide	19
Tabelle 6: Kits 19	19
Tabelle 7: Geräte.....	20
Tabelle 8: Programme	21

1 EINLEITUNG

Der Morbus Charcot-Marie-Tooth (CMT) ist eine erblich bedingte neuronale Muskelatrophie und betrifft motorische und sensible Neurone des peripheren Nervensystems. Er ist die häufigste neurogenetische Krankheit und betrifft 1 von 2500 Menschen (Bucci et al., 2012). Die Symptome der CMT Krankheit setzen normalerweise in der frühen Kindheit bis zum jungen Erwachsenenalter ein und sind charakterisiert durch progressive distale Muskelatrophie und Polyneuropathie, die zu peripherer Schwäche, typischen Fuß- und Handdeformationen und dem Verlust der distalen Sensibilität führen. Es gibt über 80 Subtypen des CMT (Jerath & Shy, 2015), die nach elektrophysiologischen Charakteristika, Vererbungsmuster oder genetischer Mutation weiter klassifiziert werden können. CMT kann durch verschiedene Mutationen in Proteinen, die unter anderem für den zellulären Transport, die Formation von Myelin oder die mitochondriale Spaltung und Fusion wichtig sind, verursacht werden (Niemann et al., 2006). Eines davon ist das Mitofusin 2 Gen (MFN2), dessen Mutation die autosomal dominante axonale CMT2A Form auslöst (McCorquodale et al., 2011).

Mitochondrien sind hochdynamische Zellorganellen, die eine wichtige Rolle für Zellfunktionen wie Zellatmung, ATP-Produktion, Calciumregulation und Apoptose spielen (Youle & van der Bliek, 2012). Mitochondrien sind der Hauptentstehungsort von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), daher sind antioxidativ wirkende Stoffe wie Glutathion essentiell für die Homöostase des Redoxstatus und eine gute mitochondriale Funktion (Benard & Rossignol, 2008). Mitochondrien unterliegen ständiger Fusion und Fission, sodass ihre Gestalt von klein und fragmentiert bis zu groß und tubulär variieren kann. Dieser Prozess ist wichtig für die mitochondriale Bioenergetik und das Überleben der Zelle (Westermann, 2010). Fusion und Spaltung werden durch verschiedene Umwelteinflüsse ausgelöst, wie zellulärer Stress, Schädigung der DNA und Induktion der Apoptose (Youle & van der Bliek, 2012).

Mitofusine gehören zu der Gruppe von Proteinen, die für ein funktionierendes mitochondriales Netzwerk essentiell sind (Dorn, 2013; Huang et al., 2011). Neben dem Einfluss auf die mitochondriale Form, spielt MFN2 eine Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie der mitochondrialen Bioenergetik. Deshalb kann angenommen

werden, dass Fehlfunktion oder Abwesenheit von MFN2 starke Auswirkungen auf zelluläre Energiemetabolismus, Calciumhomöostase und andere zelluläre Funktionen hat. (Pich et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der R94Q Mutation im MFN2 Gen auf verschiedene zelluläre Prozesse zu untersuchen. Insbesondere wurde der Einfluss unter oxidativem Stress in Form von H₂O₂ Behandlung untersucht.

2 LITERATURDISKUSSION

2.1 Morbus Charcot-Marie Tooth

2.1.1 Epidemiologie

Der Morbus Charcot-Marie-Tooth (CMT) ist eine erblich bedingte neuronale Muskelatrophie und wurde im Jahre 1886 zum ersten Mal von Jean-Martin Charcot, Pierre Marie und Howard Henry Tooth beschrieben (Kazamel & Boes, 2015). Die Krankheit wird auch als hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ I (HMSN I) bezeichnet und betrifft motorische und sensible Neurone des peripheren Nervensystems. Es ist die häufigste neurogenetische Krankheit und betrifft 1 von 2500 Menschen (Bucci et al., 2012).

Es gibt über 80 Subtypen des CMT (Jerath & Shy, 2015), die nach elektrophysiologischen Charakteristika, Vererbungsmuster oder genetischer Mutation weiter klassifiziert werden können. Nach elektrophysiologischen Charakteristika lässt sich CMT in demyelinisierende und axonale Neuropathien unterteilen (Vallat, 2003). Die demyelinisierende Form (Typ 1) betrifft die Myelinscheiden der Axone und führt durch eine Abnahme der Isolation zu einer verminderten Nervenleitgeschwindigkeit. Bei der axonalen Form (Typ 2) kommt es dagegen zu einer Schädigung der Fasern im Axon selbst. Dadurch stehen weniger Fasern zur Verfügung stehen, welche aber noch gleich schnell leiten, da die Myelinschicht nicht beeinträchtigt ist. Folglich kommt es zu einer Abnahme der Amplitude, während die Nervenleitgeschwindigkeit nicht oder nur leicht verringert ist (Banchs et al., 2009). In Bezug auf das Vererbungsmuster kann man autosomal dominante (CMT1), autosomal rezessive (CMT4) und x-chromosomale Formen (CMT1X) unterscheiden. Der axonale Typ CMT2 kann sowohl autosomal dominant als auch x-chromosomal vererbt werden (Berger et al., 2002). CMT kann durch verschiedene Mutationen in Proteinen, die unter anderem für den zellulären Transport, die Formation von Myelin oder die mitochondriale Spaltung und Fusion wichtig sind, verursacht werden (Niemann et al., 2006). Insbesondere Mutationen in Proteinen, die an der mitochondrialen Dynamik beteiligt sind, führen zu den autosomal-rezessiven CMT4A und der autosomal dominanten CMT2A Form (R. V. Baxter et al., 2002).

Die axonale Form Typ 2A ist mit bis zu 40% der Fälle die häufigste (Szigeti & Lupski, 2009). Mutationen im CMT2A Gen Locus stehen in Verbindung mit dem Mitofusin 2 Gen. (Neusch et al., 2007).

2.1.2 Klinik und Verlauf

Die Symptome der CMT Krankheit setzen normalerweise in der frühen Kindheit bis zum jungen Erwachsenenalter ein. Diese sind charakterisiert durch eine progressive Polyneuropathie, die zu distaler Muskelatrophie und damit verbundener peripheren Schwäche und den typischen Fuß- und Handdeformationen (Abb.1) führt. Im weiteren Verlauf breitet sich die Schwäche und Atrophie dann auch auf proximale Muskelgruppen aus. Dies führt zu ausgeprägten funktionellen Beeinträchtigungen, die oft mit einer Rollstuhlpflichtigkeit verbunden sind. Abhängig von verschiedenen Untergruppen der CMT Krankheit können auch verschiedene Symptome wie kognitive Einschränkungen, Lernschwierigkeiten, Hör- und Sehschwächen sowie Probleme bei der Sprachproduktion auftreten (Jerath & Shy, 2015).

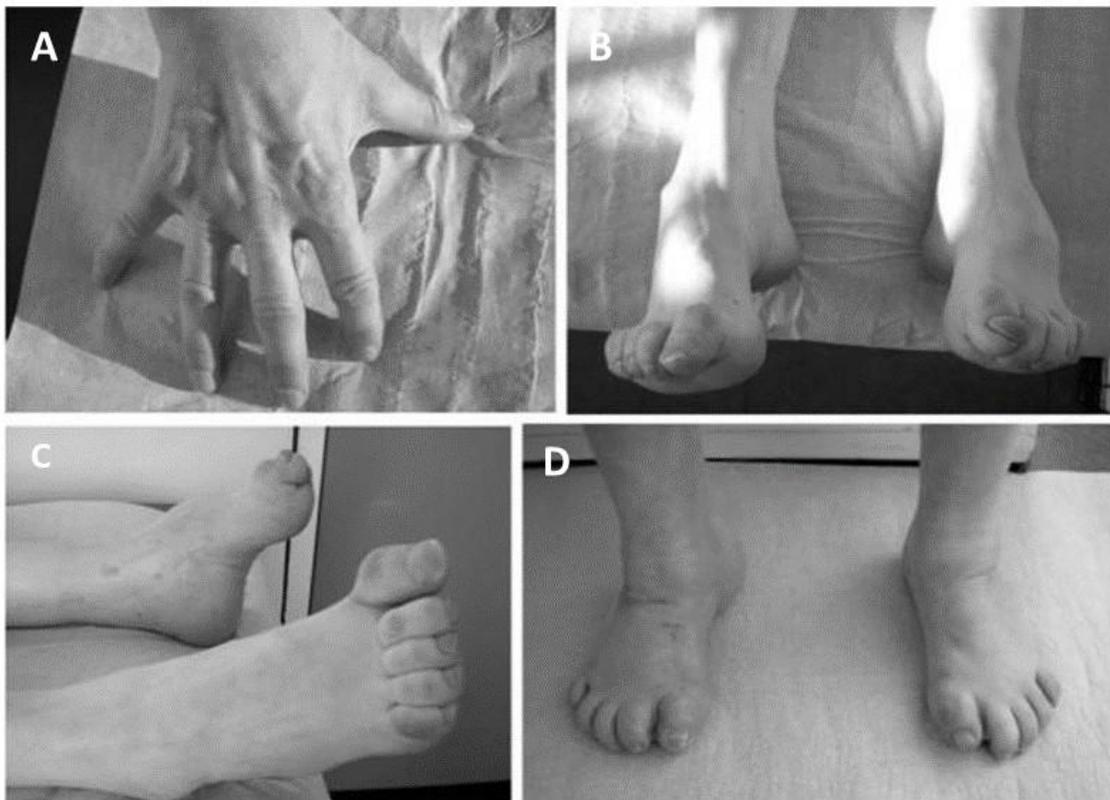


Abbildung 1: Patienten mit distal betonten Muskelatrophien

Interossäre Atrophie der Mittelhand (A) und pes cavus Deformation (B - D) (Neurogenetikambulanz, Universitätsmedizin Göttingen)

Es sind bisher keine kausalen Therapieoptionen bekannt, jedoch können unterstützende Maßnahmen wie Physio- und Ergotherapie den Patienten helfen besser mit den Symptomen zurecht zu kommen. Zusätzlich können orthopädietechnische und chirurgische Behandlungen zum Funktionserhalt, insbesondere der unteren Extremitäten, beitragen. Rehabilitationsaufenthalte in spezialisierten Kliniken können ebenfalls helfen die Funktionalität möglichst lange zu erhalten. Symptomatisch können Analgetika zur Linderung des neuropathischen und mechanischen Schmerzes eingesetzt werden. Die CMT Krankheit ist keine tödliche Erkrankung und die Lebenserwartung ist nicht eingeschränkt (Jerath & Shy, 2015).

CMT kann durch verschiedene Mutationen in Proteinen, die unter anderem für den zellulären Transport, die Formation von Myelin oder die mitochondriale Spaltung und Fusion wichtig sind, verursacht werden. Die in dieser Arbeit untersuchte R94Q-Mutation des MFN2 Proteins ist essenziell für die mitochondriale Spaltung und Fusion, weshalb im Folgenden genauer auf diesen Vorgang eingegangen wird.

2.2 Mitochondriale Spaltung und Fusion

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle für Zellfunktionen wie Zellatmung, ATP Produktion, Calciumregulation und Apoptose. Sie verfügen über eine Lipiddoppelmembran, ihre eigene extranukleäre zirkuläre DNA und teilen sich unabhängig vom Zellzyklus (Youle & van der Bliek, 2012). Aufgrund dessen wird die Endosymbiontentheorie angenommen, welche besagt, dass die Mitochondrien aus einer Symbiose von Prokaryoten mit Vorläufern heutiger Eukaryoten entstanden sind, indem sie ihre Genomgröße reduziert und die meisten ihrer Gene in das Wirtsgenom integriert haben (Benard & Rossignol, 2008). Die innere Mitochondrienmembran ist eingefaltet und bildet die Cristae, und somit eine massive Vergrößerung der Reaktionsoberfläche. Die am häufigsten erwähnte Funktion der Mitochondrien ist die Produktion von Energie in Form von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) während der oxidativen Phosphorylierung. Aufgrund dessen werden Mitochondrien auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet. Mitochondrien sind der Hauptentstehungsort von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und haben eine 5-10fach höhere Konzentration von Superoxiden als das Zytosol. Daher sind Antioxidantien wie Glutathion essentiell

für die Homöostase des Redoxstatus und eine gute mitochondriale Funktion (Benard & Rossignol, 2008).

Mitochondrien sind dynamische Organellen, die sich ständig spalten und fusionieren, sodass ihre Gestalt von klein und fragmentierte bis zu groß und tubuläre variieren kann. Dieser Prozess ist wichtig für die mitochondriale Bioenergetik und das Überleben der Zelle (Westermann, 2010). Fusion und Spaltung werden durch verschiedene Umwelteinflüsse ausgelöst, wie zellulärer Stress, Schädigung der DNA und Induktion der Apoptose. (Youle & van der Bliek, 2012).

Bei der mitochondrialen Fusion verbinden sich die äußere und innere Mitochondrienmembran und ermöglicht so den Austausch von mitochondrialer DNA, Proteinen und Lipiden. Dies hat eine protektive Wirkung, denn die Fusion eines geschädigten Mitochondriums mit einem gesunden kann das geschädigte wieder funktional werden lassen (H. Chen et al., 2003). Die hauptverantwortlichen Proteine für die Fusion sind die GTPasen Mitofusin 1 und 2 (Mfn1/Mfn2) in der äußeren Mitochondrienmembran sowie Optical Atrophy1 (OPA1) in der inneren Mitochondrienmembran (Olichon et al., 2002; Santel & Fuller, 2001).

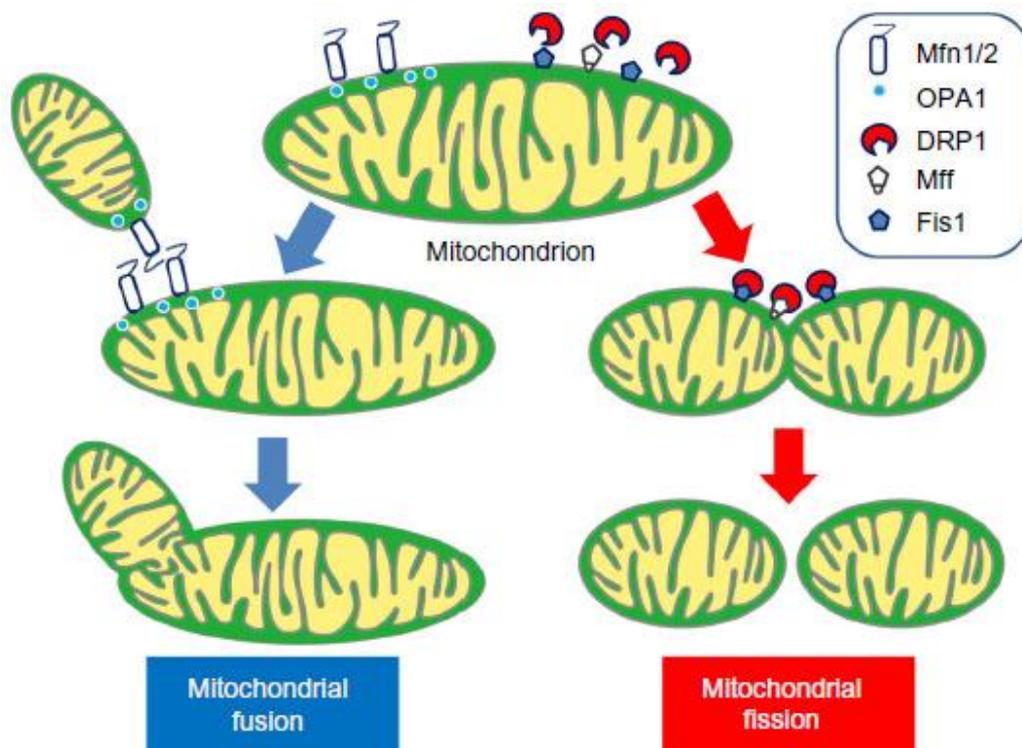


Abbildung 2: Mitochondriale Fusion und Fission
(Sotome et al., 2014)

Wichtige Vermittler für die mitochondriale Spaltung sind DRP1, Fis1 und Mff, sowie das *Ganglioside-induced differentiation-associated protein* (GDAP1) (Saotome et al., 2014)

Es wurde gezeigt, dass fragmentierte Mitochondrien die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die entsprechende Zelle apoptotisch wird (Suen et al., 2008). Daher könnte angenommen werden, dass die mitochondriale Spaltung ein proapoptischer Mechanismus ist. Sie kann jedoch auch unabhängig von dieser auftreten.

Interessanterweise führen sowohl eine Mutation von MFN2 als auch von GDAP1 zu klinisch nicht unterscheidbarem CMT, obwohl sie einen entgegengesetzten Effekt auf die mitochondriale Form haben.

2.3 Mitofusin

Mitofusin (MFN1 and MFN2) Proteine sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und ragen in das Zytosol (Koshihira et al., 2004). Am N-Terminale Ende befindet sich die GTPase Domäne. Das Gen für MFN2 ist auf Chromosom 1 lokalisiert und codiert für ein Protein bestehend aus 757 Aminosäuren und 85 kDa (H. Chen et al., 2003; Filadi et al., 2018). Bisher wurde angenommen, dass MFN2 zwei Transmembrandomänen besitzt, sodass beide Termini dem Zytosol zugewandt sind. Mattie et al. haben dagegen gezeigt, dass das C-Terminale Ende im mitochondrialen Intermembranraum liegt (Mattie et al., 2018). Zusammen mit Opa1, einem Protein in der inneren Mitochondrienmembran, regulieren MFN1 und MFN2 die Fusion der äußeren und inneren Mitochondrienmembran.

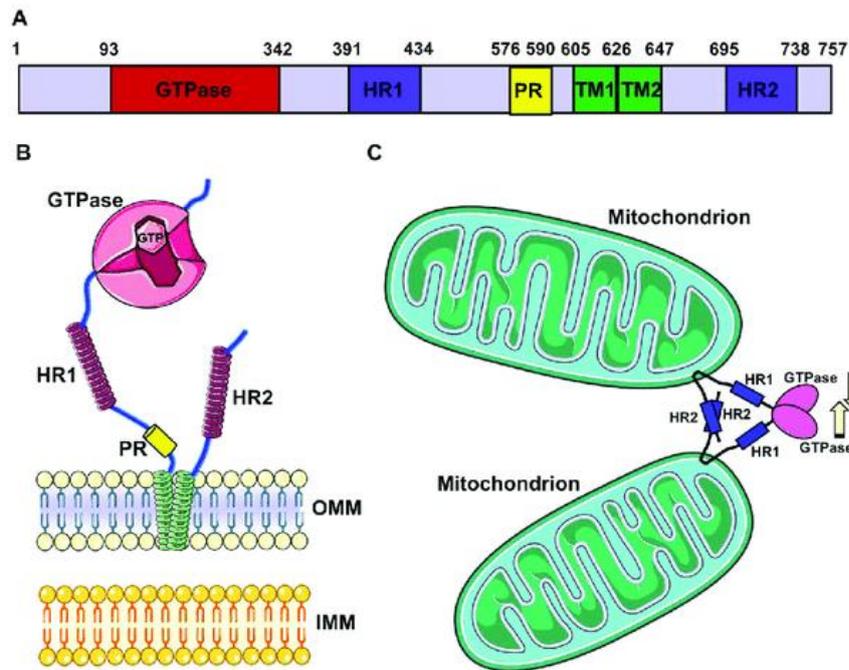


Abbildung 3: Struktur von MFN2

(A) Schema zeigt die lineare Struktur von MFN2, N-terminal liegt die GTPase Domäne, gefolgt von der HR1 Domäne, der PR Domäne und der C-terminalen HR2 Domäne. **(B)** MFN2 Topologie mit zwei Transmembrandomänen, nach neusten Ergebnissen könnte das C-terminale Ende auch im Intermembranraum liegen **(C)** Schema der OMM Fusionsaktivität. Die Fusion wird durch Interaktion der beiden HR2 Domänen, sowie Dimerisierung der GTPase Domäne vermittelt (Filadi et al., 2018).

Sowohl der Knockout von MFN1 als auch der Knockout von MFN2 führt zu frühem Tod im Embryonalstadium (H. Chen et al., 2003), während die Mutation von MFN2 die Charcot-Marie-Tooth Krankheit zur Folge hat (Koshiba et al., 2004). MFN2 Mutationen sind häufig bei der axonalen CMT Krankheit zu finden, weshalb empfohlen wird bei diesem Subtyp auf Mutationen im MFN2 Gen zu testen (Calvo et al., 2009). Die Überexpression von MFN2 führt zu perinukleärer Häufung über Konservierung der C-terminalen Doppelwende *Coiled-coil* Domäne und mitochondrialer Fusion über die GTPase Domäne (Santel & Fuller, 2001).

Neben dem Einfluss auf die mitochondriale Form, spielt MFN2 eine Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie der mitochondrialen Bioenergetik. Seine Runterregulierung reduzierte das mitochondriale Membranpotential und die Zellatmung und das mitochondrialen Protonenleck (Bach et al., 2003). MFN2 wird für die Produktion von mitochondrialem Coenzym Q, einem wichtigen Baustein der mitochondrialen Atmungskette, benötigt. Das Hinzufügen von Coenzym Q zu Zellen mit MFN2 Mangel führt zu einem Anstieg der Zellatmung sowie der mitochondrialen Fusion (Mourier et al., 2015). Die Überexpression von MFN2 dagegen führt zu einer Aktivierung der

Atmungskette (Pich et al., 2005). Kawalec et al. hat dagegen gezeigt, dass murine Fibroblasten mit einem MFN2 Knockout eine höhere Zellatmung haben als Wildtypzellen. Dies lässt vermuten, dass der zelluläre Energiemetabolismus durch Adaptation der mitochondrialen Atmung kompensiert werden kann (Kawalec et al., 2015).

De Brito et al. haben außerdem gezeigt, dass ein Teil des MFN2 im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, insbesondere an spezialisierten Kontaktstellen mit den Mitochondrien, auch *mitochondria-associated membranes* (MAM) genannt (de Brito & Scorrano, 2008). Die MAM kontrollieren verschiedenste zelluläre Prozesse wie Calciumhomöostase, mitochondriale Dynamik und Mitophagie (Krols et al., 2016; Rowland & Voeltz, 2012). Mitofusin 2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der MAM. Der Knockout von MFN2 in MEF Zellen führt zu einer gestörten ER Morphologie, zu verminderter ER-Mitochondrien Interaktion und damit zu einer ineffizienteren Calciumaufnahme in Reaktion auf Inositoltriphosphat (IP3) Stimuli (de Brito & Scorrano, 2008). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die R94Q Mutation von MFN2 zu einer Reduktion der MAM, ER Stress, Probleme der intrazellulären Calciumhomöostase sowie gestörter mitochondrialer Dynamik führen (Bernard-Marissal et al., 2019b).

Züchner et al. waren die ersten, die die heterozygote 281G-A Transition im MFN2 Gen bei einer russischen Familie mit CMT2A2A beschrieben haben. Die Mutation entsteht durch eine Substitution von Arginin 94 zu Glutamin (R94Q), die in einer Helixschleife der GTPase-Domäne vorgeschaltet ist. Transgene Mäuse, die diese Mutation exprimieren entwickeln motorische Beeinträchtigungen und Gangstörungen. Zusätzlich lassen sich distale Akkumulationen von Mitochondrien im Ischiasnerv nachweisen (Cartoni et al., 2010), sowie Defekte der Komplexe II und V der Atmungskette, die mit einem massiven Abfall der ATP Synthese assoziiert sind (Guillet et al., 2011).

El Fissi et al. konnten in einem Drosophila Modell zeigen, dass die R94Q Mutation zu einer Hemmung der Fusion und der Aggregation von fragmentierten Mitochondrien führt (El Fissi et al., 2018).

Van Hameren et al. haben in ruhenden oder stimulierten peripheren, myelinisierten Nervenaxonen in vivo gezeigt, dass die R94Q-Mitochondrien die ATP-Produktion nach axonaler Aktivität nicht hochregulieren, während die H₂O₂-Produktion weitgehend unbeeinflusst bleibt. Sie schlussfolgerten, dass neuropathische Bedingungen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ATP entkoppeln und dadurch möglicherweise die axonale Funktion und Integrität beeinträchtigen (van Hameren et al., 2019).

Bernard-Marissal et al. haben gezeigt, dass die R94Q Mutation die Degeneration der distalen Axone induziert. Zudem führt die Mutation zu einer Reduktion der ER-Mitochondrien Kontaktstellen in Fibroblasten, die von CMT2A Patienten stammen (Bernard-Marissal et al., 2019a).

Picci et al. haben bestätigt, dass R94Q-Mäuse progressive motorische und sensorische Dysfunktionen entwickeln, sowie eine Abnahme in der Acetylierung von α -tubulin in den distalen Segmenten der langen peripheren Nerven. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Behandlung mit einem neuen selektiven Inhibitor der *Histone deacetylase 6* (HDAC6) die Abnahme dieser Acetylierung rückgängig machen konnte und die motorische Funktion der Mäuse wiederhergestellt werden konnte. Somit könnte HDAC6 in der Zukunft auch ein therapeutischer Angriffspunkt für CMT2A Patienten sein (Picci et al., 2020).

2.4 Mitochondriale Calciumhomöostase

Calcium (Ca²⁺) ist eines der wichtigsten intrazellulären Signalmoleküle. Kontraktion, Sekretion und Proliferation und auch Lernen und Gedächtnisfunktionen werden calciumvermittelt reguliert, um nur einige zu nennen. Seine Konzentration ist extrazellulär 20.000-100.000-mal höher als intrazellulär. Um diesen Gradienten aufrecht erhalten zu können, muss Calcium aktiv nach extrazellulär sowie in das endoplasmatische Retikulum befördert werden. Zu hohe Calciumkonzentrationen wirken toxisch auf die Zelle und können zum Zelltod führen (Berridge et al., 2000). In den Mitochondrien kann Calcium Schlüsselenzyme der Atmungskette aktivieren und so die ATP Produktion steigern (Szabadkai & Duchon, 2008). Durch den Protonengradienten der Atmungskette entsteht ein negatives Membranpotential,

welches die treibende Kraft für den Einstrom von Calcium in die Mitochondrien ist (Rottenberg & Scarpa, 1974). Der wichtigste Kanal für den Calciumeinstrom über die innere Mitochondrienmembran ist der *mitochondrial Calcium Uniporter* (MCU), ein 40 kDa großer Kanal mit zwei Transmembrandomänen. Seine Überexpression führt über Stimulierung der IP3 Synthese und Freisetzung von Calcium aus dem ER zu einem massiven Anstieg der mitochondrialen Calciumkonzentration (Baughman et al., 2011). MCU wird durch *Mitochondrial calcium uptake 1 & 2* (MICU 1 & 2) reguliert. Sowohl das Fehlen von MCU als auch das von MICU1 oder 2 führt zu schweren Störungen in der Calciumhomöostase (Shamseldin et al., 2017).

Wie bereits in 2.3 beschrieben haben spezialisierte Kontaktstellen zwischen endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien, auch MAM genannt, einen wichtigen Einfluss auf die mitochondriale Calciumhomöostase. Der Calciumfluss zwischen den beiden Organellen wird durch einen Komplex aus dem IP3, einem Kanal zur Calciumfreisetzung aus dem ER, dem Chaperon Grp75 und dem OMM *voltage dependent anion channel* (VDAC) vermittelt (De Mario et al., 2017).

2.5 Mitophagie

Autophagie ist ein Mechanismus der Zelle, um intrazelluläre Komponenten wiederzuverwerten, die Organellenzahl zu regulieren und ebenfalls eine Form der Qualitätskontrolle. Autophagie der Mitochondrien wird als Mitophagie bezeichnet (Youle & Narendra, 2011). Die Mitophagie wird für die Elimination von dysfunktionalen und geschädigten Mitochondrien benötigt und ist essentiell für eine gesunde Mitochondrienpopulation (El-Hattab et al., 2018). Die Mitophagie wurde erstmals in Hefezellen untersucht, wo sie von *autophagy-related 32* (Atg32) vermittelt wird. In Säugetieren wird die Mitophagie während der Blutzelldifferenzierung von *NIP3-like protein X* (NIX; auch als BNIP3L bekannt) reguliert. Zusätzlich wird die Mitophagie in vielen Vielzellern von Parkin und *PTEN-induced putative kinase protein 1* (PINK1) reguliert. Mutationen in diesen Proteinen führen zu dysfunktionaler Mitophagie und sind unter anderem mit dem M. Parkinson assoziiert (Youle & Narendra, 2011).

In gesunden Mitochondrien wird das Protein PINK1 kontinuierlich importiert und abgebaut (Narendra et al., 2008). Gerät dieser Import bei geschädigten Mitochondrien

ins Stocken reichert sich PINK1 auf der Oberfläche von geschädigten Mitochondrien an und aktiviert dort Parkin durch Phosphorylierung und allosterisch durch das Generieren von Phosphoubiquitin (pUb) (Kazlauskaite et al., 2014). Parkin ist eine E3 Ubiquitinligase, katalysiert die Ubiquitinierung von Proteinen der äußeren Mitochondrien Membran (OMM) und rekrutiert damit durch Vorwärtskopplung die Ub- bindende Autophagiemaschinerie. Letztendlich werden die Mitochondrien in Lysosomen abgebaut (Heo et al., 2015; Lazarou et al., 2015).

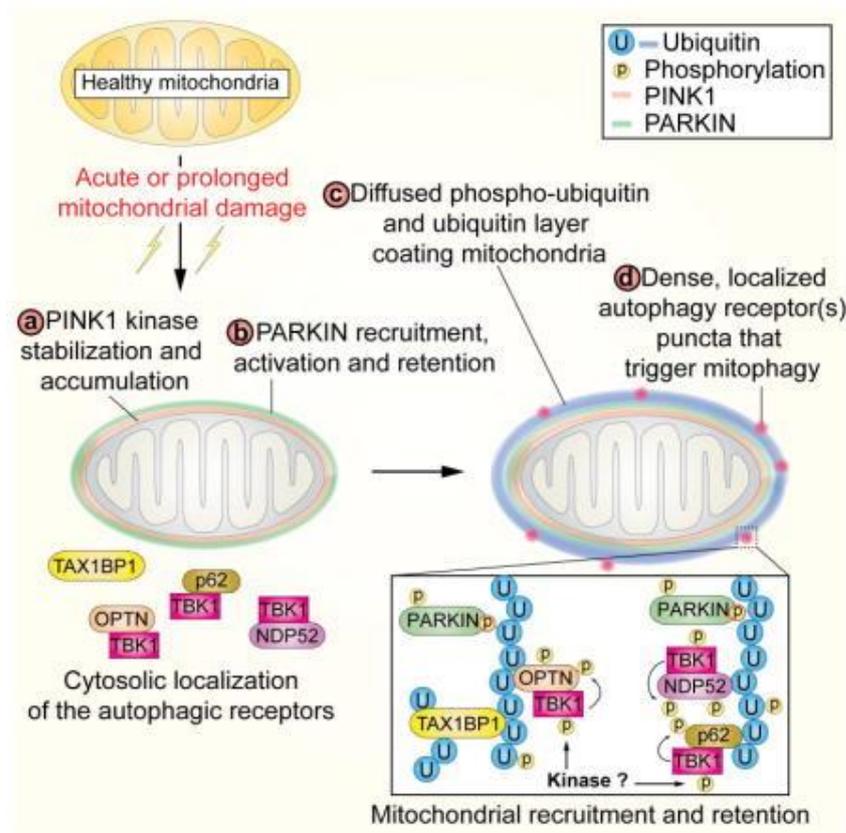


Abbildung 4: Initialisierung der Mitophagie

Mitochondriale Schädigung führt zu Akkumulation von PINK1 (a), welches daraufhin Parkin aktiviert (b). Ubiquitilierung der OMM (c) was wiederum zur Bildung von Autophagierezeptoren führt (d) (Heo et al., 2015).

McLelland et al. haben beschrieben, dass MFN2 die Autophagie der Mitochondrien durch PINK1 und Parkin reguliert (McLelland et al., 2018). ER Mitochondrien Kontaktstellen werden während der Mitophagie zerstört. Parkin/PINK1 katalysieren massive Phosphoubiquitierungen von MFN2, die wiederum zum p97-abhängige Abbau von Mfn2 Komplexen in der äußeren Mitochondrienmembran führen (McLelland et al., 2018). Dies hat wiederum das Distanzieren der Mitochondrien vom ER zur Folge.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Verbindung von Mitochondrien und ER zu einer Suppression der Mitophagie führen (McLelland et al., 2018) .

2.6 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist definiert als das Ungleichgewicht zwischen der Produktion und der Entfernung von ROS (Halliwell & Whiteman, 2004). Diese enthalten ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und werden auch als freie Radikale bezeichnet. Sie können als Elektronenakzeptor agieren und Elektronen von anderen Molekülen aufnehmen. Das andere Molekül wird damit oxidiert, weshalb man freie Radikale auch als Oxidationsmittel bezeichnet. Freie Radikale sind ubiquitär in unserer Umwelt vorhanden, wobei am häufigsten Hydroxyl-Radikale (OH), Superoxid-Radikale (O_2^-) und Stickstoffmonoxid (NO) vorkommen (Rahman, 2007). Moleküle, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit ($ONOO^-$) sind selbst keine freien Radikale, aber können zur Bildung von diesen führen.

Der Hauptentstehungsort von ROS ist in den Mitochondrien entlang der Elektronen-Transportkette am Komplex I (NADPH-Dehydrogenase) und am Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) (Finkel & Holbrook, 2000). Zusätzlich produzieren Peroxisomen und Enzyme wie die NADPH-Oxidase, Monoaminoxidase, Cyclooxygenase und Lipoxygenase ROS und erhöhen damit den oxidativen Stress. Die Zelle hat verschiedene Mechanismen zum Abbau von ROS. Zu diesen gehören die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase. Die Superoxiddismutase katalysiert den Zerfall von Superoxiden in Sauerstoff und Hydrogenperoxid. Die Katalase und die Glutathionperoxidase reduzieren dann H_2O_2 zu Wasser.

2.7 Glutathion

Eines der wichtigsten antioxidativen Moleküle ist Glutathion (GSH). GSH ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, wobei der Einbau von Cystein der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Glutathionsynthese von Neuronen ist, da diese Cystein nicht selbst herstellen und daher aufnehmen müssen (Tan et al., 2001). Glutathion hat viele verschiedene Funktionen, die drei wichtigsten sind Biotransformation, Cysteinreserve und Redoxpuffer. In der Phase II der

Biotransformation werden schädliche Stoffe an Glutathion gebunden, sind damit besser wasserlöslich und können über die Niere ausgeschieden werden. Die Reaktion wird von Glutathion-S-Transferasen katalysiert. Cystein ist als Aminosäure essenziell für eine funktionierende Proteinbiosynthese. Dieses ist jedoch reaktionsfreudig und geht in einer aeroben Umgebung durch Oxidation zu Cysteinsulfin- und -sulfonsäure ständig irreversibel verloren. Glutathion stellt damit die Notreserve für Cystein dar. Um als Redoxpuffer zu fungieren, wird Glutathion oxidiert, und geht damit von seiner monomeren Form (GSH) in das Dimer Glutathion-Disulfid (GSSG) über. Diese Reaktion wird von der Glutathion Peroxidase katalysiert.

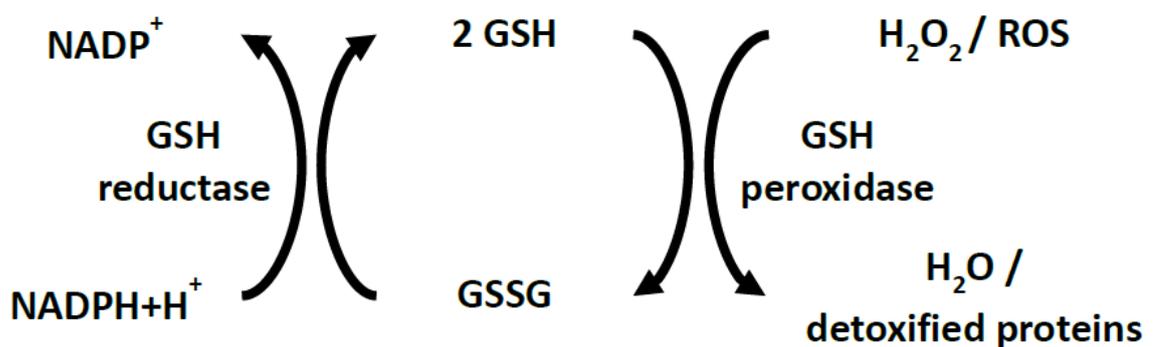


Abbildung 5: GSH/GSSG Zyklus

GSH reduziert katalysiert durch die GSH Reduktase ROS und andere oxidierte Proteine und wird dabei zu GSSG. Dieses wird NADPH abhängig von der GSH Peroxidase zu GSH recycelt.

GSSG kann dann durch die Glutathion-Reduktase (GSR) wieder zu Glutathion reduziert werden. Für diese Reaktion wird das Koenzym NADPH als Reduktionsmittel benötigt. So wird bei gesteigertem GSH-Level und erhöhter Glutathion-Reduktase Aktivität auch vermehrt NADPH benötigt. Dieses kann die Zelle durch eine Steigerung des *Pentose- Phosphat Pathways* (PPP) produzieren. Im oxidativen Teil des PPP wird Glukose unter NADPH Gewinnung in Ribulose-5-Phosphat umgewandelt, welches dann wiederum im nicht-oxidativen Teil zu Metaboliten der Glykolyse umgewandelt werden kann. GSH liegt normalerweise 100-fach höher vor als GSSG. Dieses Verhältnis spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Redoxsystems der Zelle (Maher, 2005).

Eine weitere Möglichkeit ROS zu reduzieren sind sogenannte *uncoupling proteins* (UCPs). UCP 1-3 sind mitochondriale Anionencarrierproteine und spielen eine wichtige Rolle darin die ROS-Emission der Elektronentransportkette zu reduzieren. Die Funktion von UCP1 ist noch nicht gänzlich geklärt. UCP 2 und UCP 3 werden von ROS

oder ROS By-Produkten aktiviert und induzieren dann einen Protonenleak und damit eine negative Feedbackschleife für mitochondriale ROS-Produktion. Zusätzlich wurde gezeigt, dass UCP2 und UCP3 von kovalenten Modifikationen durch Glutathion kontrolliert werden. Die reversible Glutathionylation ist folglich notwendig, um UCP2 und UCP3 aber nicht UCP1 zu aktivieren bzw. zu inhibieren. (Mailloux & Harper, 2011).

Zusammenfassend lassen die obigen Ergebnisse die Vermutung zu, dass die R94Q Mutation Auswirkungen auf mitochondriale Dynamik und Calciumhomöostase hat. Ziel dieser Arbeit war es diesen Einfluss in einem Zellkulturmodell insbesondere unter oxidativem Stress genauer zu untersuchen und so die Entstehung der CMT- Krankheit besser zu verstehen.

3 MATERIAL

3.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden Murine embryonale Fibroblasten (MEF) Zellen von MFN2^{-/-} Mäusen verwendet, die freundlicherweise von Timothy Shutt (University of Calgary) zur Verfügung gestellt wurden. Stabile Zelllinien wurden von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe mittels Piggybac System generiert (Wolf et al., 2019). Zusammengefasst wurde ein Piggybac backbone, welcher HA-MFN2-IRES-mCherry-NLS exprimiert, mit einer Transposase kotransfiziert. Nach 1 Woche wurden mCherry positive Zellen mit wiederholter fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung konzentriert, bis >95% der Zellen mCherry exprimierten. In dieser Arbeit wurde insbesondere mit den Zelllinien Knockout+WT (Rescue) und Knockout+R94Q (R94Q) gearbeitet. Diese Zellen wurden in DMEM high Glucose Medium mit 10% *fetal calf serum* (FCS) und 1% Penicillin und Streptomycin in einem Inkubator mit 5% CO₂ und 95% Luft bei 37°C kultiviert.

3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Zell- und Gewebekulturschale (100x20mm)	Sarstedt
Napfschale 6, 12, 24, 96 Loch, F-Böden	Greiner Bio-One
Cellstar® Reagiergefäß 15 ml	Greiner Bio-One
Röhre 50ml, 114x28mm, PP	Sarstedt
Reagiergefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Certified 0,2ml 8 Twin Strip StarPCR Tu	Starlab
Kyro-Röhrchen 20, 2ml	TPP
Kyrobbox	JG Labor Center e.k.
Cellstar® Zellkulturflaschen 250ml	Greiner Bio-One
Pipette 2,5;10;100;1000 µl	Eppendorf
Multipipette®	Eppendorf
accu-jet® pro	Brand
Serologische Pipette Cellstar® 5 ml;10 ml; 25 ml; 50 ml	Greiner Bio-One

Combitips advanced® 0,5; 2,5; 5ml	Eppendorf Biopur
Pipettenspitzen 10 µl; 200 µl; 1000 µl	Star Lab
TipOne®, Filter Tip	Starlab
Filter Tip	Greiner Bio-One
Zellschaber	Greiner Bio-One
Wägeschalen	A Hartenstein
Steriler Spritzen Filter	VWR internationale
Spritze, 5ml	BD Discardit
Luna™ Zell-Zählkammern	Logos Biosystems
Neubauerkammer	Precicolor HBG
Menzel-Gläser, Deckgläser	Thermo Scientific
Mini-PROTEAN® TGX™ Stain Free Precast Gels 4-20%	Bio-Rad
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDV Transfer Pack	Bio-Rad

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

3.3 Medium

Medium	Firma
Dulbecco's modified eagle's medium High Glucose mit Glukose, Sodium Pyruvat, L-Glutamin	Sigma Aldrich
Opti-Mem®	Gibco Life Technologies

Tabelle 2: Medium

3.4 Puffer, Chemikalien

Puffer	Firma
Dulbecco's phosphate buffered saline	Sigma Aldrich
0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	Life Technologies
HyClone™ Fetal Bovine Serum (FCS)	Thermo Scientific
10 000 Units/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin	Sigma Aldrich
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche Diagnostics

RIPA Lysis and Extraction Buffer	Perbio Science
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Dimethyl fumarate 97%	Sigma Aldrich
Lipofectamine® RNAiMAX™ Reagent	Invitrogen by Life Technologies
Ethanol Rotipuran 99,8%, p.a.	Roth
Milchpulver	Roth
Tween® 20	Roth
Ambion, Nuclease-Free Water	Nalgene
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
Glycerin	Roth
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	MP Biomedicals
Natriumchlorid (NaCl)	Roth

Tabelle 3: Puffer, Chemikalien

3.5 Antikörper, Farbstoffe, Marker

Antikörper, Farbstoff, Marker	Firma
Trypanblau, 0,4%	Invitrogen
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Midori Green	Nippon Genetics Europe
1 kb plus DNA ladder	Invitrogen
Anti-Aktin (mouse)	Millipore
Anti-MFN2 (rabbit)	Millipore
TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate) 10 µM	Sigma-Aldrich, 87917
CellROX Green Reagent 5 µM	Molecular Probes, C10444

Tabelle 4: Antikörper, Farbstoffe, Marker

3.6 Plasmide

Plasmid	Referenz
<i>pIND(SP1) mt-Keima</i>	Prof. Atsushi Miyawaki, RIKEN Brain Science Institute, Japan
<i>pDsRed2- Mito-Timer</i>	Addgene, 52659
<i>pCMV CEPIA 3mt</i>	Addgene, 58219
<i>pTurbo635N-Mito (MitoFarRed)</i>	Prof. Axel Methner lab
<i>pENTR6c mito-GFP (GFP Parkin)</i>	Prof. Axel Methner lab

Tabelle 5: Plasmide

3.7 Kits

Bezeichnung	Firma
Quick-gDNA™ MiniPrep	Zymo Research Corporation, D3025
BC Assay Protein Quantification Kit	Interchim, Wörgl, Austria
ZR RNA MiniPrep Kit	Zymo Research Corporation, R1064
High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems

Tabelle 6: Kits

3.8 Geräte

Gerät	Firma
Luna™ Automatischer Zellzähler	Logos Biosystems
Vortexe-2-Genie	Scientific Industries
Vortexer	Biozym
Heraeus Multifuge 3L-R Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraus Multifuge X1 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Aqualine AL 12 Warmwasserbad	LAUDA
JB Aqua 5 Plus Wasserbad	Grant

Motic AE20 Serien Mikroskop	Motic
Olympus IX 51 Mikroskop	Olympus
Vacunsafe Absaugpumpe	Integra
MSC-Advantage Sterilbank	Thermo Scientific
Abzugshaube	Infralab
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo
Kühlraum 4°	Viessman
Kühlschrank	Liebherr Comfort
Gefrierschrank -80°C	Sanyo
Gefrierschrank -20°	Liebherr Comfort
Schüttelplatte GFL 3011	GFL
Reax 2 Schüttelplatte	Heidolph
Grobwaage ALC-810.2	Acculab-Sartorius Group
MR Hei-Standard Magnet-Rührer	Heidolph
pH-Meter CG 810	Schott Geräte
Thermomixer comfort	Eppendorf
Stoppuhr	VWR
Milli-Q Plus Anlage	Millipore
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Trans Blot Turbo	Bio-Rad
Power Pac Basic	Bio-Rad
Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Infinite M200Pro, Tecan Reader	Tecan
peQSTAR 96 universal	peQlab
The Odyssey Sa Infrared Imaging System	Li-Cor
Leica TCS SP5	Leica Microsystems

Tabelle 7: Geräte

3.9 Programme

Programm	Firma
Adobe Illustrator CS6	Adobe
Adobe Photoshop CS6	Adobe
Image Studio Lite Version 3.1	LI-CO
Graph Pad Prism 6	Graph Pad Prism
ODYSSEY Sa	Li-Cor
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation
Image J	National Institutes of Health

Tabelle 8: Programme

4 METHODEN

4.1 Zellbiologie

4.1.1 Kultur und Passagieren von MEF- Zellen

Die MEF-Zellen wurden bei 37°C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% in Zellkulturmedium inkubiert. Als Zellkulturmedium wurde Dulbesso's Modified Eagle's Medium with high Glucose, L-glutamine and Sodium Pyruvate verwendet, dem 10% FCS (fetal calf serum) sowie 1% Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von 95% passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Platte mit 6 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; phosphate buffered saline) gewaschen, um Reste des FCS zu entfernen. Dies ist notwendig, damit das FCS nicht das im nächsten Schritt zugegebene Trypsin hemmt. Die 1ml 0.05%-Trypsin-EDTA lösen die adhärennten Zellen von der Schale, wobei dieser Prozess durch Auf- und Abpipettieren verstärkt wurde. Anschließend wurden 9ml Medium hinzugegeben, um den Prozess zu stoppen. Zuletzt wurden die Zellen in 1:40er Verdünnung in eine neue Petrischale mit vorgelegtem Medium überführt.

4.1.2 Zellzahlbestimmung in der Neubauerkammer

Die Neubauerkammer besteht aus neun gleich großen Quadraten, wobei zum Zählen der Zellen die äußeren vier Quadranten verwendet werden. Zunächst muss beachtet werden, dass die Konzentration der zu bestimmenden Probe zwischen $2,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml liegen sollte. Ist dies nicht der Fall muss die Probe weiter verdünnt werden. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau verdünnt. Dieses ist ein Diazofarbstoff und wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, kann jedoch durch die zerstörte Zellmembran toter Zellen dringen und diese anfärben. In die Neubauerkammer wurden 10 µl der Trypanblau-MEF-Zellsuspension pipettiert und mindestens zwei diagonal voneinander liegende Quadranten ausgezählt. Daraufhin kann die Konzentration der Ausgangsprobe wie folgt berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)}{\text{Anzahl gezählter Quadrate}}$$

4.1.3 Automatisierte Zellzahlbestimmung

Zur automatisierten Zellzahlbestimmung wurde die Probe zunächst ebenfalls mit Trypanblau 1:2 verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der Mischung in eine Zählkammer überführt und mit dem Luna automated cell counter gezählt.

4.1.4 Zellviabilitätsbestimmung

Um die Viabilität der Zellen zu bestimmen, wurde der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay der Firma Promega verwendet. Dieser beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen den Redoxindikator Resazurin in das fluoreszierende Endprodukt Resorufin zu überführen. Je 3000 MEF Zellen/Loch wurden als Triplets in 100 µmol Zellkulturmedium auf einer 96 Lochnapfschale ausplattiert und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und 0 µM, 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM H₂O₂ zugegeben und für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt und CellTiterBlue Reagenz hinzugegeben und für 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Fluoreszenzintensitätsbestimmung photometrisch mit dem Infinite® 200 PRO (Tecan) Reader bei einer Wellenlänge von 590 nm.

4.1.5 Zellproliferationsbestimmung

Um die Proliferation der Zellen zu messen, wurde der RealTime Glo MT Cell Viability Assay verwendet. Die NanoLuc Luciferase sowie das MT Cell Viability Substrat werden dem Zellkulturmedium zugefügt. Anschließend wird das MT Cell Viability Substrat von den lebenden Zellen reduziert und steht daraufhin der NanoLuc Luciferase zu Verfügung, die ein lumineszierendes Endprodukt herstellt. Die Fluoreszenzintensität ist damit proportional zu den lebenden Zellen. Das Besondere an diesem Assay ist, dass die Lumineszenz kontinuierlich für bis zu 72 h gemessen und somit auf die Zellproliferation rückgeschlossen werden kann.

Es wurden je 750 Zellen pro Loch in eine weiße 96er-Lochnapfschale ausplattiert. MT Cell Viability Substrat und NanoLuc Luciferase wurden 1:1000 in Zellkulturmedium verdünnt. Nach 30 min wurde die erste Lumineszenzmessung im 37°C vorgewärmten Tecan Reader durchgeführt. Nach 24 h, wurde zunächst eine 2. Messung

durchgeführt. Anschließend wurde bei der Hälfte der Zellen 10 µl einer 1 mM H₂O₂ Lösung den 100 µl Zellkulturmedium hinzugefügt, sodass eine H₂O₂ Konzentration von 100 µM entstand. Nach 48 h und 72 h wurden zwei weitere Messungen durchgeführt.

4.1.6 Zelluläre ROS Messung mit CellROX® Green Reagenz

CellROX® Green Reagenz ist eine fluorogene Sonde zur Messung des oxidativen Stresses in lebenden Zellen. Der membrangängige Farbstoff ist in reduziertem Zustand schwach fluoreszierend und zeigt bei Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine hellgrüne photostabile Fluoreszenz. Es wurden 4000 Rescue sowie 4000 R94Q MEF Zellen in 250 µl Zellkulturmedium in einem ibidi Slide ausplattiert und nach 24 h die eine Hälfte über 24 h mit 100 µM H₂O₂ behandelt. Nach weiteren 24 h wurde zunächst aus der 2,5 mM Stammlösung eine 5 µM Färbelösung hergestellt, indem das CellROX Reagenz 1:5000 in DMEM ohne FCS verdünnt wurde. Die Ibidi-Slides wurden mit DMEM ohne FCS einmal gewaschen und dann 250 µl Färbelösung pro Kammer hinzugefügt. Anschließend wurde bei 37°C für 30 min inkubiert und daraufhin 3x mit PBS gewaschen. Danach wurde angewärmtes DMEM Medium ohne Phenolrot hinzugefügt und die Fluoreszenzintensität bei 485/520 (ex/em) am konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP5) gemessen.

4.1.7 Mitochondriale Membranpotentialmessung mit TMRE

Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) ist ein membrangängiger, nicht zytotoxischer Fluoreszenzfarbstoff und kann aufgrund dessen im *live Cell Imaging* verwendet werden. Der Farbstoff verfügt über eine positive Ladung und akkumuliert deswegen in den negativ geladenen Mitochondrien. Bei einer Depolarisation der Mitochondrien, wie zum Beispiel zu Beginn der Apoptose werden die dort gespeicherten Anionen freigesetzt und demnach sinkt auch die TMRE-Konzentration.

Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) Pulver wurde in 486 µl Dimethylsulfoxide (DMSO) verdünnt, um eine 100mM Stammlösung zu erhalten. Für den Versuch wurde durch Verdünnen in Zellkulturmedium ohne FCS eine 25 nM Lösung hergestellt. Es wurden je 3500 Zellen der Rescue und R94Q Zelllinie in 250 µl Zellkulturmedium in einem ibidi Slide ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen hälftig mit 100 µM H₂O₂ behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 25 nM TMRE Färbelösung bei

37°C für 30 min gefärbt und anschließend zweimal mit warmem PBS gewaschen. TMRE besitzt zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 515$ nm und 555 nm sowie ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 575$ nm. Daher wurden Bilder mit dem SP5 Konfokalen Mikroskop (Leica) bei 561 nm gemacht. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend mit Image J bestimmt. Als Positivkontrolle wurde FCCP verwendet.

4.1.8 Glukoseaufnahme

Um die Glukoseaufnahme der Zellen zu messen, wurde der Farbstoff 2-NBDG (2-(*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) verwendet. Bei diesem handelt es sich um ein Glukoseanalogon, welches zum Life Imaging der Glukoseaufnahme und damit als Indikator der Zellviabilität verwendet werden kann.

Es wurden je 3500 Zellen der Rescue und R94Q Zelllinie in 250 μ l in einem ibidi Slide ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen hälftig mit 100 μ M H₂O₂ behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 100 μ M 2-NBDG Färbelösung für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und daraufhin in phenolrotfreiem Medium Bilder am konfokalen Laser Mikroskop aufgenommen. Da das Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 485$ nm liegt, wurde der 488 nm Argon Laser verwendet. Zuletzt wurde die Fluoreszenzintensität mithilfe von Image J analysiert.

4.2 Molekularbiologie

4.2.1 Transiente Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von DNA, meist in Form von Plasmiden, in eukaryotische Zellen bezeichnet. Hierbei wird zwischen transienter Transfektion und der Herstellung von stabiler Zelllinien unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird die DNA für das Protein nicht in das Genom der Zelle integriert, daher wirft die Zelle das Plasmid nach einigen Zellteilungen wieder ab. Das Protein wird also nur für eine kurze Dauer (transient) exprimiert. Bei der Herstellung von stabilen Zelllinien wird neben der DNA zusätzlich ein Plasmid für eine piggyBac Transposase transfiziert (Nickel et al., 2016). Diese integriert den DNA-Abschnitt mit dem zu transfizierenden Protein in das Genom der Zelle, sodass das Protein dauerhaft exprimiert wird.

Ein Plasmid besteht mindestens aus folgenden Teilsequenzen: einem *Origin of Replication* (kurz ORI), an dem die RNA-Polymerase ansetzt und mit der Transkription beginnt und eine Sequenz für ein Protein, bzw. eine „Leersequenz“ als Kontrolle. Die meisten Plasmide enthalten zudem eine Sequenz für ein fluoreszierendes Protein oder eine Antibiotikaresistenz, welches als Kontrolle der Transfektion dienen kann. Zellen, bei denen die Transfektion erfolgreich war, leuchten unter einem Fluoreszenzmikroskop oder verfügen über eine neue Antibiotikaresistenz. Der Anteil der transfizierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen wird als Transfektionseffizienz bezeichnet.

Je nach Zellart gibt es hierzu verschiedene Methoden, in dieser Arbeit wurde die Lipofektion verwendet. Bei dieser werden die Nukleinsäuren in Liposomen eingeschlossen beziehungsweise an diese gebunden. Diese Liposomen fusionieren nach Endozytose mit der Endosomenmembran, wodurch die DNA freigesetzt wird.

4.2.1.1 Transfektion mit den Plasmiden CEPIA3mt und Mito-TurboFarRed

Zunächst wurden 4000 MEF Zellen jeder Zelllinie in 250 µl Medium auf ein Ibidi Slide, zur anschließenden Auswertung am konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP5), ausplattiert. Diese Zellzahl wurde so gewählt, dass die Zellen zum Transfektionszeitpunkt 60-80% konfluent waren. Nach einer Inkubationszeit von 24 h, um das Anheften der Zellen an dem Slide zu gewährleisten, wurde die eigentliche Transfektion vorgenommen. Hierzu wurden zunächst in einem Mikroreaktionsgefäß 100 µl Opti-MEM® Medium mit 8 µl Lipofectamine vermischt. Zusätzlich wurde in einem anderen Mikroreaktionsgefäß je 2,5 µl der Plasmide CEPIA3mt und Mito-TurboFarRed, was einer DNA-Konzentration von 2,5 µg entspricht, mit 125 µl Opti-MEM® Medium gemischt. Anschließend wurden je 90 µl beider Ansätze in ein drittes Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieses wurde homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden 10 µl dieser Lösung auf jedes Loch gegeben, was einer Plasmidkonzentration von 100 µg Plasmid pro Loch entspricht.

4.2.1.2 Transfektion mit den Plasmiden MtKeima, Mitotimer, GFP-Parkin und Mito-TurboFarRed

Bei den Transfektionen wurde wie in 1.2.1.1 beschrieben vorgegangen. Es wurde lediglich anstelle der oben genannten Plasmide 3 µg des Plasmides MtKeima, bzw. je 2,5 µg der Plasmide GFP-Parkin und Mito-TurboFarRed bzw. 4 µg des Plasmides Mitotimer verwendet.

4.2.2 RNA Isolation

Um die RNA aus den MEF-Zellen zu isolieren, wurde das ZR RNA MiniPrep Kit der Firma Zymo Research verwendet. Das Prinzip beruht auf der *single step* Methode (Chomzynski & Sacchi, 1987) bei der im ersten Schritt die Proteine denaturiert werden. Im zweiten Schritt werden die Proteine durch Phenol entfernt und die DNA Fragmente sammeln sich nach Zentrifugation in der Interphase. Die RNA bleibt in dem wässrigen Überstand zurück. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Dafür wurde von konfluenten MEF-Zellen das Zellkulturmedium entfernt, mit PBS gespült und dann die Zellen durch Trypsin von der Lochnapfschale gelöst. Anschließend wurde wieder Medium hinzugefügt und 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 400 µl RNA Lyse Puffer suspendiert und für 1 min bei 12000 G zentrifugiert.

Anschließend wurde das Lysat in eine Zymo-Spin III C Säule im Auffangröhrchen überführt und für 30 S bei 8000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde im Auffangröhrchen aufbewahrt und mit 0,8 Volumen Ethanol (95-100 %) vermischt. Diese Mischung wurde in eine Zymo-Spin II C Säule mit Auffangröhrchen überführt und für 1 Min. bei 12000 G zentrifugiert.

Dann wurden 400 µl RNA Waschpuffer in die Zymo-Spin II C Säule gefüllt und abermals für 30 s bei 12000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde ein DNase Cocktail für jede Probe vorbereitet, dafür wurden 10 µl RNase-Free DNase 1, 10 µl 10x Reaction Buffer und 80 µl DNase/ RNase-Free Water zusammen pipettiert.

Die Zymo-Spin II C Säule wurde in ein RNase freies Röhrchen überführt und dann wurden 100 µl des zuvor hergestellten DNase 1 Cocktails auf die Matrix der Säule pipettiert. Das Ganze wurde für 30 s bei 500 zentrifugiert. Die Säule und der Durchfluss

wurden im RNase freien Röhrchen aufbewahrt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und dann bei 12000 G für 30 Sek zentrifugiert. Anschließend wurde die Zymo-Spin II C Säule in ein neues Auffangröhrchen überführt. Zu dem vorher gewonnenen Durchfluss (100 µl) wurden 300 µl RNA Lyse-Puffer im RNase freien Röhrchen hinzugefügt und gut gemischt. Daraufhin wurden 400 µl Ethanol dazu pipettiert und die ganze Mischung auf eine Zymo-Spin II C Säule in einem Auffangröhrchen übertragen und für 30 s bei 12000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 400 µl RNA Prep-Puffer der Säule hinzugefügt und für 1min bei 12000 G zentrifugiert. Daraufhin folgten einige Waschschrirte. Zuletzt wurden 25 µl DNase/RNase freies Wasser direkt auf die Säule aufgetragen und nach 1 min Inkubationszeit bei RT für 30 s bei 10000 G zentrifugiert, um die RNA aus der Säule zu extrahieren. Die RNA konnte nun direkt weiterverwendet oder bei -70 °C gelagert werden.

4.2.3 Polymerase-chain-reaction (PCR) und Sequenzierung

Die Polymerasekettenreaktion dient der in vitro Amplifikation von einem bereits bekannten DNA Stück und findet im Thermocycler statt. Die PCR wurde zur Sequenzierung des MFN2 Gens verwendet, um die Zelllinien Rescue und R94Q zweifelsfrei zu identifizieren. Es werden zwei Primer benötigt, die den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt am 5' und in 3' Ende einrahmen, Desoxynucleosidtriphosphate zur Strangverlängerung sowie eine DNA-Polymerase. In diesem Fall wurde die Herculase II verwendet. Die PCR besteht aus verschiedenen Schritten: der Denaturierung, der Hybridisierung und der Polymerisierung. Zur Denaturierung erhitzt sich der Thermocycler auf 95°C, um sicherzustellen, dass die DNA Doppelstränge sich trennen. Anschließend findet bei 68°C die Hybridisierung der Primer statt. Zuletzt wird das Gerät wieder auf 72°C erwärmt, da bei dieser Temperatur die Polymerase ihr Temperaturoptimum hat. Diese Schritte werden zwischen 20 und 30mal wiederholt bis die gewünschte DNA Konzentration erreicht ist. Anschließend wird die DNA durch Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Je höher die Konzentration der Agarose in dem Gel bilden sich mehr Quervernetzungen und somit auch ein feinerer Filter. Durch eine angelegte Spannung wandert die negativ geladenen DNA zum positiven Pol. Kürzere DNA-Stücke können das Gel besser

passieren und wandern daher weiter zum Positiven Pol, sodass eine Auftrennung nach Größe geschieht. Anschließend wurde das Gel mittels UV-Licht detektiert.

Um die Basenabfolge eines DNA-Abschnittes zu bestimmen wurde diese mit Nuklease-freiem Wasser auf die Konzentration $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt und bei GATC-Biotech per Sanger-Sequenzierung sequenziert.

4.2.4 cDNA Synthese

Um aus der RNA die komplementäre DNA, auch cDNA genannt, zu generieren, wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die reverse Transkriptase verwendet. Hierzu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit von Applied Biosystems verwendet. Es wurden $20 \mu\text{l}$ der zuvor isolierten RNA mit $2 \mu\text{l}$ Reverse Transkriptase Puffer, $1,6 \mu\text{l}$ eines $25\times$ Desoxyribonukleosidtriphosphate(dNTP) Mix; $4 \mu\text{l}$ eines $10\times$ Random Primers; $2 \mu\text{l}$ der Reversen Transkriptase und $8,2 \mu\text{l}$ Nuklease freies Wasser miteinander vermischt. Im Cycler wurde dann in temperaturabhängigen Schritten die cDNA synthetisiert: 10min bei 25°C , 120min bei 37°C , 5min bei 85°C und zuletzt 8min bei 4°C .

4.2.5 Glutathionassay

Der Glutathionassay dient zur Bestimmung des GSH- und des GSSH-Gehaltes. Das Prinzip liegt darin, dass GSSG mit Hilfe der Glutathionreduktase und NADPH zu GSH reduziert wird. Dieses wird wiederum durch DTNB in einer nichtenzymatischen Reaktion unter Entstehung von gelb gefärbtem 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB-) zu GSSG oxidiert.

Zunächst wurden 150000 Zellen pro Loch in einer 6-Lochnapfplatte ausplattiert und nach 24 h die Hälfte der Zellen mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe von $200 \mu\text{l}$ PBS mit einem Zellkratzer von der Platte gelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein Mikroreaktionsgefäß mit $100 \mu\text{l}$ 10% SSA pipettiert, um die Proteine zu präzipitieren. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde weitere 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden $280 \mu\text{l}$ des Überstandes in ein Mikroreaktionsgefäß mit

24 µl TEA/H₂O-Mischung gegeben. Das Zellpellet wurde über Nacht bei 37°C in NaOH gelöst und anschließend zur Proteinbestimmung mittels BCA-Assay verwendet.

Für den GSH-Assay wurden zunächst in Duplikaten je 20 µl einer GSH-Standardreihe (0-20µM) aufgetragen und Triplets der 4 Proben. Nach Zugabe von je 100 µl des Assay Mix bestehend aus DTNB, NADPH und der Glutathionreduktase wurde über 30 min die Absorption bei 412 nm im Infinite® 200 PRO (Tecan) Reader gemessen.

4.2.6 Mitochondriale Calciumbestimmung

Um die mitochondriale Calciumkonzentration messen zu können, wurden die Zellen wie unter 1.2.1 beschrieben mit den Plasmiden CEPIA3mt und Mito-TurboFarRed transfiziert. CEPIA3mt zeigt das mitochondriale Calcium an, während Mito-TurboFarRed ein mitochondrialer Expressionsmarker ist.

4000 Rescue sowie R94Q-Zellen wurden in 250 µl Zellkulturmedium in einem ibidi-Slide ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Plasmiden Cepia und MtFarRed transfiziert (siehe 7.2.1) und nach 24 h für 24 h mit 100 µM H₂O₂ behandelt. Die Fluoreszenzintensitätsbestimmung erfolgte am SP5 konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei 488/530 (ex/em) für CEPIA3mt und bei 633/640 (ex/em) für Mito-TurboFarRed. Zuletzt wurde die CEPIA3mt Fluoreszenzintensität auf die Mito-TurboFarRed Fluoreszenzintensität normalisiert.

4.3 Proteinbiochemie

4.3.1 Probengewinnung

Um eine Probe aus einer Zellkultur zu gewinnen, wurden die Zellen im Medium zunächst zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und das PBS ebenfalls entfernt. Dann wurde der Probe 100 µl Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitor zugegeben, diese auf Eis 10 min inkubiert und dann bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C 30 min zentrifugiert. Daraufhin befanden sich die Proteine im Überstand.

4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde der Bicinchoninsäure (BCA-) Test der Firma Interchim (*BC Assay Protein Quantification Kit*) verwendet. Dieses Verfahren beruht auf einer Reduktion von Cu^{2+} Ionen zu Cu-Ionen, welche einen Farbkomplex mit BCA bilden. Diese Farbkomplexe können dann photometrisch bei einer Wellenlänge (λ) von 562 nm analysiert werden. Als erstes wurden die Proteinproben 1:100 mit Nukleinsäure freiem Wasser verdünnt und anschließend als Triplet auf eine 96 Lochplatte aufgetragen. Als Vergleichswerte wurde eine Rinderserumalbumin (BSA)-Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen (0,6,25; 12,5; 25; 50; 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$) hergestellt und als Triplet mit je 15 μl pipettiert. Anschließend wurden den vorgelegten Lösungen je 100 μl des BC Assay Mix (Reagenz A+B 1:50) hinzugefügt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Zuletzt erfolgte die photometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 562 nm am Infinite® 200 PRO (Tecan) Reader. Zur Auswertung und Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde Excel verwendet.

4.3.3 SDS Page

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Größe wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Hierbei wird das Probenmaterial zunächst 3 min bei 100°C denaturiert mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, welches sich an diese lagert und ihnen somit eine stark negative Ladung gibt. Zusätzlich wird Dithiothreitol (DTT) der Probe zugefügt, um die Disulfidbrücken zu brechen, sowie das schwere Glycerol, um die Proben besser in die Taschen sinken zu lassen. Außerdem ist dem Puffer der Farbstoff Bromphenolblau zugesetzt. Dieser wandert aufgrund seiner geringen Größe schneller als die Proben, sodass man eine optische Kontrolle hat, wann die Elektrophorese zu beenden ist.

Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode. Die Geschwindigkeit wird durch die Größe der Proteine sowie die Beschaffenheit des Gels bestimmt. Meist bestehen Gele aus einem 5% Polyacrylamid-Gel (Sammelgel) und einem höher konzentrierten Polyacrylamid-Gel (Trenngel). Das Sammelgel dient dazu alle Proben möglichst gleichzeitig in das Trenngel eintreten zu lassen, in dem die endgültige Aufteilung nach Molekulargewicht erfolgt. In diesem Fall wurde ein 10% Mini PROTEAN Membrane Stain Free Gel von

Bio-Rad verwendet, welches vertikal in eine Gelelektrophoresekammer mit 1fachem SDS Puffer gehängt wurde. Als Marker wurden 5 µl MagicMark XP Western Protein Standard in die erste Tasche pipettiert, gefolgt von den Proben. Anschließend wurde 15 min eine Spannung von 300 V angelegt.

4.3.4 Westernblot

Nach dem SDS Page wurden die Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidene Fluorid (PVDF) Membran überführt. Hierzu wurde TransBlot Turbo von Bio-Rad verwendet. Indem ein elektrisches Feld angelegt wurde, binden die Proteine über hydrophobe Interaktionen an die Membran. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde mit 3% in PBST gelöstes Milchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von drei Waschschritten mit PBST, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Der sekundäre Antikörper, welcher an die Spezies-spezifische Fc-Region des primären Antikörpers bindet, ist mit einem fluorochrome konjugiert, der am Ende mit dem infrarot Bildsystem (ODYSSEY) detektiert werden kann. Der sekundäre Antikörper wurde für 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um das Ausbleichen des Fluoreszenzmarkers zu verhindern. Anschließend wurde drei Mal mit PBST gewaschen, dann der Blot in PBS gegeben und die Fluoreszenz mit dem ODYSSEY infrarot Bildsystem detektiert.

5 ERGEBNISSE

5.1 Validierung der R94Q und Rescue Zelllinien

Um die Auswirkungen der R94Q Mutation zu untersuchen, wurden von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe stabile Rescue (KO+WT) und R94Q (KO+R94Q) Zelllinien hergestellt. Hierzu wurden embryonalen Mäusefibroblasten (MEF-Zellen) von MFN2 knockout Mäusen verwendet, welche freundlicherweise von Timothy Shutt (Universität von Calgary) zur Verfügung gestellt wurden. Um mögliche toxische Effekte von Antibiotika, die oft zum Generieren von stabilen Zelllinien genutzt werden, zu vermeiden wurden wie folgt vorgegangen: Die MEF Zellen wurden, mittels Piggybac System mit einem HA-markierten MFN2 (WT oder R94Q) transfiziert und anschließend mittels fluorezenzaktivierter Zellsortierung die mCherry positiven Zellen konzentriert. Alle stabil transfizierten Zellen exprimieren ein rot fluoreszierendes mCherry-Protein hinter der *internal ribosomal entry site* (IRES), während Zellen mit einem zusätzlichen mCherry vor dem IRES-mCherry als Negativkontrolle dienen (Wolf et al., 2019).

Zu Beginn meiner Arbeit habe ich zunächst bestätigt, dass beide Zelllinien gleichermaßen MFN2 exprimieren. Abbildung 1A zeigt den Westernblot der verschiedenen Zelllinien. Bei 86 kDa ist die Bande von MFN2 zu erkennen, bei 40 kDa die der Ladekontrolle β -Aktin. Das überexprimierte MFN2 läuft aufgrund des N-terminalen HA-Tags langsamer. Wie zu erwarten gibt es bei WT, KO+WT und KO+R94Q jeweils eine MFN2 Proteinbande, während bei KO und KO+EV keine Bande zu sehen ist. In Abbildung 1B ist die Auswertung des Blots dargestellt. Es ist zu erkennen, dass KO+WT (Rescue) Zellen und KO+R94Q-Zellen (R94Q) vergleichbare Mengen an MFN2 exprimieren, wobei dies mehr ist als bei den Wildtyp-Zellen.

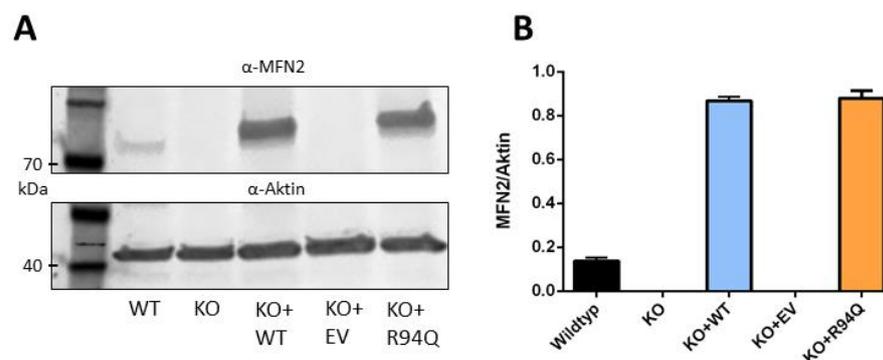


Abbildung 6: Rescue und R94Q exprimieren vergleichbare MFN2 Mengen

Westernblot mit MFN2 Antigen. Es ist zu sehen, dass Rescue (KO+WT) und R94Q (KO+R94Q) vergleichbare Mengen MFN2 exprimieren, die jedoch über der MFN2 Menge des Wildtyps liegen. Als Ladekontrolle diente Aktin. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung ($MW \pm SD$, $n = 3$)

5.2 Proliferation von Wildtyp und R94Q MFN2 nimmt bei oxidativem Stress gleichermaßen ab

Um in den Zellen oxidativen Stress auszulösen, wurde Wasserstoffperoxid verwendet, da dieses auch physiologisch in der Zelle vorkommt und damit oxidativen Stress im Organismus gut abbildet. Sies et al. hat gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen die intrazelluläre H_2O_2 Konzentration zwischen 1-10 nM liegt. Höhere Konzentrationen lösen eine adaptive Stressantwort über Schlüsselenzyme wie Nrf2/Keap1 oder NF- κ B aus. Überphysiologische Konzentrationen über 100 nM führen zur Schädigung von Biomolekülen und werden als oxidativer Distress bezeichnet (Sies, 2017).

Für diese Arbeit wollte ich eine Konzentration wählen, die in den Zellen eine deutliche Stressantwort auslöst. Der einfachste Weg eine Aussage über den Zustand von Zellen zu treffen ist deren Viabilität zu beurteilen. Es wurde folglich getestet welche H_2O_2 Konzentration bei den Zellen zu einer verminderten Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen derselben Zelllinie führt. Hierzu wurde der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay der Firma Promega verwendet. Dieser beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen den Redoxindikator Resazurin in das fluoreszierende Endprodukt Resorufin zu überführen. Es wurden Rescue und R94Q-Zellen für 24 h mit aufsteigenden H_2O_2 Konzentrationen (0-100 μ M) behandelt und anschließend die Viabilität bestimmt. Es ist in Abb. 2A zu erkennen, dass beide Zelllinien kaum bis gar nicht auf Konzentrationen bis 10 μ M reagieren. Bei einer H_2O_2 Konzentration von 100 μ M kommt es bei beiden Zelllinien zu einer verminderten Viabilität von ca. 50% im Vergleich zu niedrigeren H_2O_2 Konzentrationen. Diese Konzentration entspricht einer intrazellulären Konzentration von 1 μ M und ist als milder oxidativer Stress einzuordnen (Sies, 2017).

In einem zweiten Versuch wurde die Proliferation der MEF Zelllinien Rescue und R94Q untersucht. Im vorherigen Versuch konnte die Viabilitätsbestimmung nur einmal durchgeführt werden, da das Reagenz toxisch für die Zellen ist, und damit lediglich die

Viabilität 52h nach dem Ausplattieren bestimmt wurde. Folglich könnte die verminderte Viabilität nach Behandlung mit 100 μM sowohl durch den Tod von einigen Zellen als auch durch eine verminderte Proliferation der Zellen unter oxidativem Stress verursacht sein. Um diese Frage zu klären, wurde der RealTime Glo MT Cell Viability Assay verwendet. Mit diesem ist eine mehrfache Viabilitätsbestimmung und damit Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen möglich. NanoLuc Luciferase sowie das MT Cell Viability Substrate werden dem Zellkulturmedium zugefügt. Das MT Cell Viability Substrat wird von den lebenden Zellen reduziert und steht daraufhin der NanoLuc Luciferase zu Verfügung, die ein lumineszierendes Endprodukt herstellt. Die Messungen erfolgten 2h nach dem Ausplattieren und nach 24 h. Anschließend wurde in zwei Konditionen H_2O_2 hinzugefügt, sodass eine H_2O_2 Konzentration von 100 μM vorlag. Die weiteren Messungen erfolgten nach 48 h (24 h nach H_2O_2 Behandlung) und 72 h (48 h nach H_2O_2 Behandlung). Wie sich in Abbildung 2B erkennen lässt, vermehren sich Rescue und R94Q-Zellen ungefähr gleich schnell und ihre Proliferation wird durch die Behandlung mit 100 μM H_2O_2 gleichermaßen um ca. 25% eingeschränkt, was die Ergebnisse aus dem ersten Versuch bestätigt.

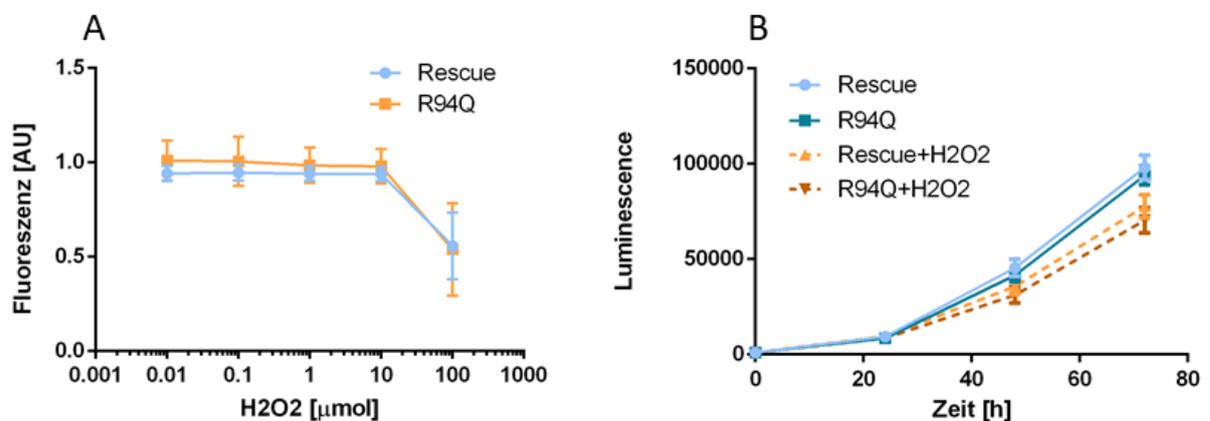


Abbildung 7: Behandlung mit 100 μM H_2O_2 beeinträchtigt das Wachstum von R94Q und Rescue-Zellen gleichermaßen

(A) Je 3000 Rescue und R94Q-Zellen/Loch wurden auf einer 96 Lochnapfschale ausplattiert und nach 24 h für 24 h mit H_2O_2 behandelt. Daraufhin wurde das CellTiterBlue Reagenz hinzugegeben und am Infinite® 200 PRO (Tecan) die Fluoreszenz bestimmt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung ($\text{MW} \pm \text{SD}$, $n = 5$ unabhängige Versuche mit Triplikaten), normalisiert zur Ausgangszellkonzentration. **(B)** 750 Rescue und R94Q MEF Zellen/Loch wurden in eine 96 Lochnapfschale ausplattiert. Daraufhin wurde das RealTimeGlo Reagenz hinzugefügt und zu den Zeitpunkten 0h, 24 h, 48 h und 72 h die Luminescence bestimmt. Nach der zweiten Messung wurden zwei Konditionen mit 100 μM H_2O_2 behandelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung ($\text{MW} \pm \text{SD}$, $n = 5$ unabhängige Versuche mit Triplikaten).

5.3 Oxidativer Stress führt gleichermaßen zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials

Gesunde Mitochondrien verfügen über ein Membranpotential von ca. -80mV. NADH überträgt seine Elektronen auf die Elektronentransportkette und deren Komplexe transportieren H⁺ Ionen in den Intermembranraum. Den so entstandenen Gradienten nutzt die ATPase zur Synthese von ATP. Tetramethylrhodamin-Ethylester (TMRE) ist ein membrangängiger, nicht zytotoxischer Fluoreszenzfarbstoff und kann aufgrund dessen im *live Cell Imaging* verwendet werden. Der Farbstoff verfügt über eine positive Ladung und akkumuliert deswegen in den negativ geladenen Mitochondrien. Bei einer Depolarisation der Mitochondrien, wie zum Beispiel zu Beginn der Apoptose werden die dort gespeicherten Anionen freigesetzt und demnach sinkt auch die TMRE Konzentration.

In Abbildung 8 ist zu erkennen, dass Rescue und R94Q-Zellen ohne H₂O₂ Behandlung über ein vergleichbares Membranpotential verfügen. Nach H₂O₂ Behandlung fällt das Membranpotential bei beiden Zelllinien gleichermaßen signifikant ab.

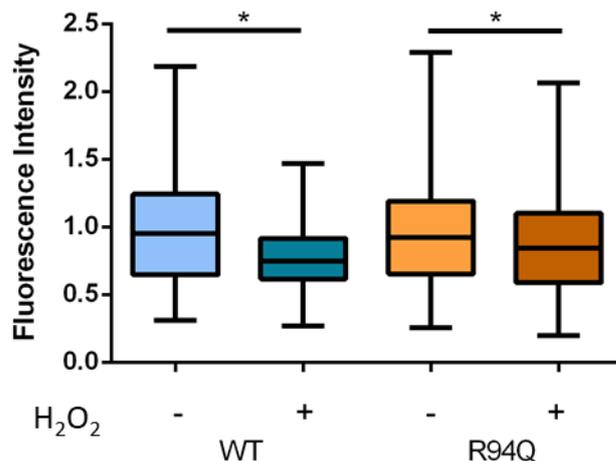


Abbildung 8: Oxidativer Stress führt bei beiden Zelllinien zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials

Es wurden je 3500 Zellen der Rescue und R94Q Zelllinien auf einem ibidi Slide ausplattiert. Nach 24 h wurde die Zellen hälftig mit 100 μ M H₂O₂ behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 25 nM TMRE Färbelösung bei 37°C für 30 min gefärbt. TMRE besitzt zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{max}} = 515$ nm und 555 nm sowie ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 575$ nm. Daher wurden Bilder mit dem roten Laser bei 561 nm gemacht. Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend mit Image J bestimmt.

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung (MW \pm SD, n = 3 unabhängige Versuche, insgesamt ca. 150 Zellen pro Kondition).

5.4 Erhöhter mitochondrialer Calciumgehalt bei R94Q-Zellen

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle beim Puffern des erhöhten zytosolischen Calciumlevels. MFN2 ist sowohl in der äußeren Mitochondrienmembran als auch im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Besonders häufig kommt es in spezialisierten Kontaktregionen zwischen ER und Mitochondrien, die auch als mitochondria-associated membranes (MAM) bekannt sind, vor. Es wurde gezeigt, dass die R94Q Mutation in Fibroblasten von Patienten mit CMT2A zu einer Abnahme der MAMs führt und in sensorischen Neuronen der basale Calciumspiegel der R94Q-Zellen über dem der Kontrollgruppe liegt (Bernard-Marissal et al., 2019b). Daher war es interessant zu untersuchen, ob die R94Q Mutation von MFN2 Einfluss auf den mitochondrialen Calciumgehalt hat und ob dies durch oxidativen Stress moduliert wird.

Zur Messung des intramitochondrialen Calciumgehaltes wurde das Plasmid CEPIA3mt verwendet. Um die Intensität des CEPIA3mt Signals auf den Level der Genexpression zu normalisieren, wurde mit dem mitochondrialen Marker Mito-TurboFarRed kotransfiziert. Die Zellen wurden transfiziert, zur Hälfte für 24 h mit 100 μ M H₂O₂ behandelt und anschließend am konfokalen Mikroskop Bilder von CEPIA3mt bei 488/530 (ex/em) dargestellt in Abb. 4A und von MtFarRed bei 633/640 (ex/em) dargestellt in Abb. 4B aufgenommen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität von CEPIA3mt auf den mitochondrialen Marker Mito-TurboFarRed normalisiert (beispielhaft dargestellt in Abb. 4C). In Abbildung 4D ist die Analyse der Bilder dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der mitochondriale Calciumgehalt der R94Q-Zellen ohne H₂O₂ Behandlung signifikant höher ist als der der Rescue-Zellen. Unter oxidativen Stress (24 h Behandlung mit 100 μ M H₂O₂) steigt der Calciumgehalt beider Zelllinien signifikant an, wobei auch hier analog der Calciumgehalt der R94Q höher ist als der der Rescue-Zellen.

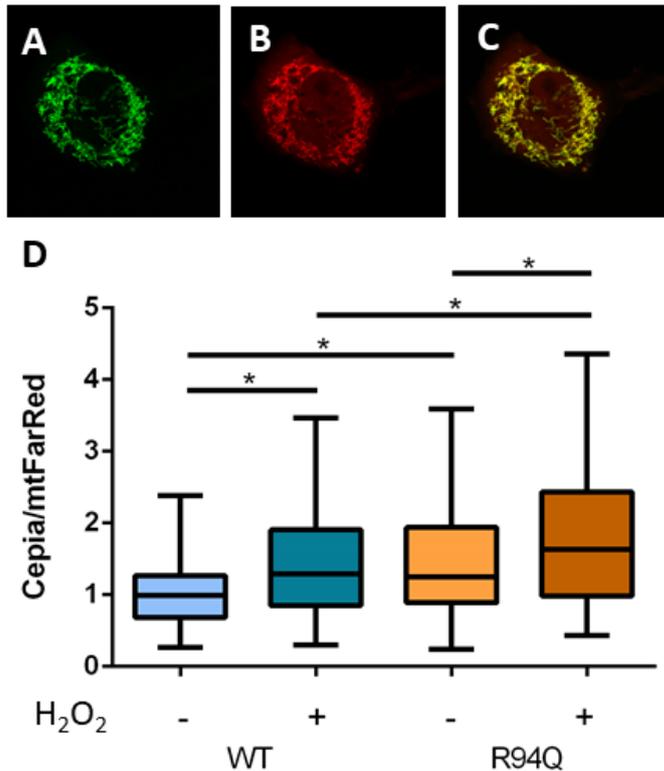


Abbildung 9: Erhöhter mitochondrialer Calciumgehalt bei R94Q-Zellen

4000 Rescue sowie R94Q-Zellen wurden in 250 μ l Zellkulturmedium in einem ibidi-Slide ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Plasmiden Cepia und MtFarRed transfiziert und daraufhin für 24 h mit 100 μ M H₂O₂ behandelt. Die Fluoreszenz Intensitätsbestimmung erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Abbildung A zeigt beispielhaft ein Bild von CEPIA3mt bei 488/530 (ex/em). Abbildung B zeigt beispielhaft ein Bild von MtFarRed bei 633/640 (ex/em). Die Calciumkonzentration (Cepia) wurde auf die Mitochondrienanzahl (MtFarRed) normalisiert, dies ist bildlich in Abbildung C zu erkennen. Abbildung D zeigt die Auswertung aller Konditionen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der mittleren Standardabweichung (MW \pm SD, n= 4 unabhängige Versuche).

5.5 Verringerte ROS und erhöhtes GSH sowie erhöhter Glukoseumsatz in R94Q-Zellen bei oxidativem Stress

Mitglieder unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass R94Q-Zellen nach H₂O₂ Exposition mit einem signifikanten Abfall des mitochondrialen ATP reagieren (Wolf et al., 2019). Wir vermuteten, dass diese Veränderungen durch ein höheres Level an oxidativem Stress oder einen stärkeren Anstieg nach H₂O₂ Behandlung provoziert werden. Um dies zu untersuchen wurde das CellROX® Green Reagenz verwendet, welches eine fluorogene Sonde zur Messung des oxidativen Stresses in lebenden Zellen ist. Der membrangängige Farbstoff ist in reduziertem Zustand schwach

fluoreszierend und zeigt bei Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine hellgrüne fotostabile Fluoreszenz.

Es wurden wie gehabt Rescue sowie R94Q-Zellen ausplattiert und die eine Hälfte über 24 h mit 100 μM H_2O_2 behandelt. Anschließend wurden sie gefärbt und die Fluoreszenzintensität bei 485/520 (ex/em) am SP5 konfokalen Mikroskop (Leica) gemessen. Wie in Abb. 6A zu erkennen ist, fanden wir bei R94Q-Zellen ohne H_2O_2 Behandlung eine geringere Produktion von ROS im Vergleich zu den Rescue-Zellen ohne H_2O_2 Behandlung. Die H_2O_2 Behandlung führt wie zu erwarten bei beiden Zelllinien zu einem ROS-Anstieg, dieser ist bei den Rescue-Zellen jedoch stärker als bei den R94Q-Zellen.

Die reaktiven Sauerstoffspezies können in der Zelle Schaden auslösen, weshalb die Zelle über Antioxidantien wie Glutathion verfügt. Das gesamte zelluläre Glutathion (GSSG und GSH) wurde enzymatisch gemessen und auf den Proteingehalt normalisiert. In Abbildung 6B ist zu erkennen, dass der Grundlevel von GSH bei den R94Q-Zellen niedriger ist als bei den Rescue-Zellen. Die H_2O_2 Behandlung führt in beiden Zelllinien zu einem Anstieg des Glutathions, jedoch ist dieser bei den R94Q-Zellen deutlich größer, was sich mit den vorherigen Ergebnissen deckt. Diese unerwarteten Ergebnisse lassen auf einen Unterschied in der antioxidativen Antwort zwischen WT und R94Q-Zellen schließen.

Ein wichtiger Transkriptionsmechanismus der zellulären antioxidativen Antwort ist die Hochregulierung von Genen mit *antioxidant response elements* (ARE) in deren Promotoren (P. S. Baxter & Hardingham, 2016). Daher wurden die Expressionslevel solcher Gene wie *glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit* (GCLC), *glutathione S transferase omega 1* (GSTO1), *NADPH-quinone-oxidoreductase-1* (NQO1), *glutathione peroxidase 1* (GPX1), *heme-oxygenase-1* (HO1) und xCT auf mRNA Level mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dies zeigte keinen größeren Unterschied zwischen den Zelllinien. GSTO und der cystine/glutamate antiporter xCT wurden bei H_2O_2 behandelten Zellen induziert und insbesondere bei xCT signifikant weniger in den R94Q-Zellen. Dies stimmt mit den vorherigen Ergebnissen des reduzierten oxidativen Stresses in diesen Zelllinien überein. Abschließend kann man sagen, dass entgegen unserer Erwartungen die erhöhte oxidative Aktivität der R94Q-Zellen bei

oxidativem Stress nicht durch einen basalen Unterschied des oxidativen Stresses oder eine dysregulierte oxidative Antwort erklärt werden kann.

Pyruvat ist der Ausgangsstoff des mitochondrialen Zitratzyklus und wird aus Glucose durch Enzyme wie die Hexokinase und Pyruvatkinase hergestellt. Die Hexokinase generiert Glukose-6-phosphat, welches entweder durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in den *Pentose Phosphat Pathway* (PPP) geschleust werden kann oder zu Pyruvat katalysiert wird. Diese kann anschließend in den Zitratzyklus geschleust werden oder zu Laktat weiter verstoffwechselt werden.

Wie in 2.7 beschrieben wurde, benötigt die Zelle zur Reduktion GSSG zu GSH NADPH. Dieser kann wiederum im PPP aus Glukose hergestellt werden. Folglich war es interessant die Glukoseaufnahme der Zellen genauer zu untersuchen. Dafür wurde der Farbstoff 2-NBDG verwendet. Bei diesem handelt es sich um ein Glukoseanalogon, welches zum Life Imaging der Glukoseaufnahme verwendet werden kann.

Es wurden Rescue und R94Q-Zellen hälftig für 24 h mit 100 μM H_2O_2 behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μM 2-NBDG Färbelösung für 60 min bei 37°C inkubiert und daraufhin in phenolrotfreiem Medium Bilder am konfokalen Laser Mikroskop aufgenommen. Da das Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{max}} = 485$ nm liegt, wurde der 488 nm Argon Laser verwendet. Zuletzt wurde die Fluoreszenzintensität mithilfe von Image J analysiert.

In Abbildung 6D ist zu erkennen, dass Rescue und R94Q-Zellen eine etwa gleich hohe Glukoseaufnahme haben. Interessanterweise reagieren sie divers auf oxidativen Stress: Während die Glukoseaufnahme bei Rescue-Zellen eher abfällt, führt die H_2O_2 Behandlung bei R94Q-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Glukoseaufnahme. Dies ließe sich damit erklären, dass R94Q-Zellen eine höhere Aktivität im PPP haben, um mehr NADPH zu generieren zur Reduktion von Glutathion. Folglich hätten sie auch einen höheren Glukoseverbrauch.

Um dies weiter zu untersuchen haben Mitglieder unserer Arbeitsgruppe die Aktivität der Hexokinase sowie der G6PD bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass zwar

die Hexokinase hochreguliert ist, was zu der erhöhten Glukoseaufnahme passt, jedoch die Aktivität der G6PD, als Schlüsselenzym des PPP in beiden Zelllinien nach H_2O_2 Behandlung herunterreguliert ist (Wolf et al., 2019). So kann geschlossen werden, dass die in vermehrt in die Zelle aufgenommene Glukose nicht in den PPP gelangt. Die ähnlichen Laktatlevel der beider Zelllinien und Konditionen lassen zusätzlich schließen, dass das Pyruvat nicht in die Glykolyse, sondern in den mitochondrialen Zitrat Zyklus gelangt.

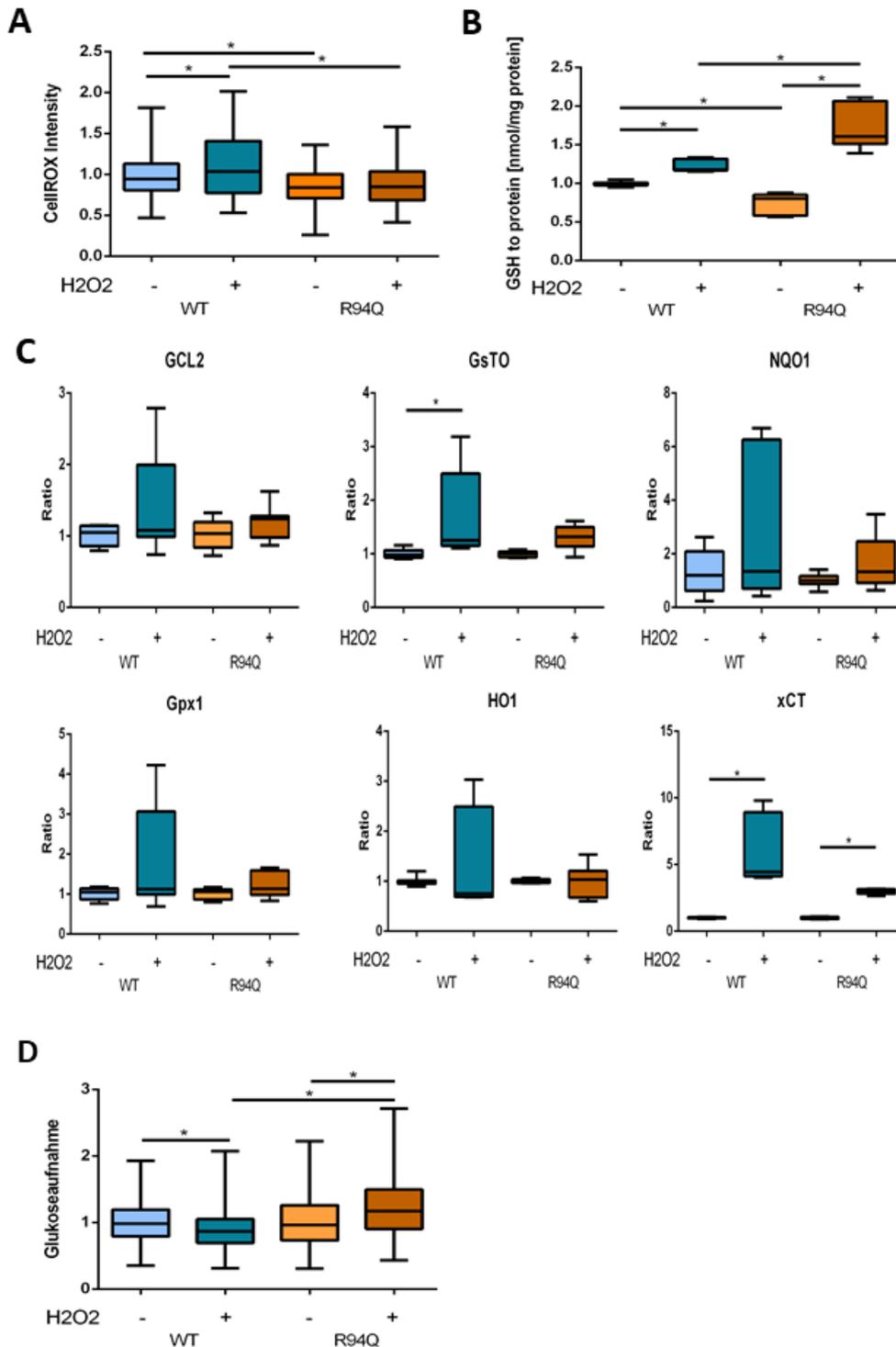


Abbildung 10: Erhöhter Glukoseumsatz bei R94Q-Zellen unter oxidativem Stress

A) Die Zellen wurden mit 5 μ M green CellROX für 30 minutes gefärbt und dann mit dem Konfokal Mikroskop bei 488/520 (ex/em) analysiert. (MW \pm SD, n= 3 unabhängige Versuche) **B**) 15000 Zellen/Loch wurden in einer 6 Lochplatte ausplattiert und nach 24 h für 24 h mit 100 μ M H₂O₂ behandelt. Anschließend erfolgte die totale Glutathionbestimmung. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung, normalisiert auf Gesamtprotein (MW \pm SD, n= 3 unabhängige Versuche). **C**) mRNA Extraktion mittels Kits und anschließend Analyse durch ein Partnerlabor **D**) Es wurden je 3500 Zellen der Rescue und R94Q Zelllinie in einem ibidi Slide ausplattiert. Nach 24 h wurde die Zellen hälftig für 24 h mit 100 μ M H₂O₂ behandelt und die Zellen mit 100 μ M 2-NBDG Färbelösung für 60 min bei 37°C inkubiert und daraufhin Bilder bei 488 nm am Confokalen Laser Mikroskop aufgenommen und die Fluoreszenzintensität mithilfe von Image J analysiert (MW \pm SD, n= 3 unabhängige Versuche).

5.6 Verringerte Mitophagie in R94Q-Zellen

Es wurde in 5.5 gezeigt, dass R94Q-Zellen nach oxidativem Stress mehr Glukose aufnehmen und im Zitratzyklus verstoffwechseln. Gleichzeitig produzieren sie jedoch weniger ATP (Wolf et al., 2019), was vermuten lässt, dass die Mitochondrien der R94Q-Zellen weniger effizient sind. Eine mögliche Erklärung ist ein Defekt der Mitophagie, einem mitochondrialen Qualitätskontrollsystem, das von den Proteinen PINK1 und Parkin vermittelt wird (vgl. 2.5). Das fehlerhafte Entfernen von geschädigten Mitochondrien könnte zu Mitochondrien mit einer ineffizienteren Kopplung von Zellatmung und ATP Produktion führen.

Das Plasmid Mito-Keima kodiert für ein fluoreszierendes Protein, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die Besonderheit liegt darin, dass das Exzitationsspektrum des Proteins pH-abhängig ist. So liegt der Exzitationspunkt in den relativ neutralen Mitochondrien bei 438 nm, während sich der Exzitationspunkt in den sauren Lysosomen zu 550 nm verschiebt. Der Emmisionspunkt liegt in beiden Fällen bei 620 nm. Bei der Mitophagie gelangen die Mitochondrien in die Autophagolysosomen und somit ändert sich auch deren pH. Es kann also der Grad der Säure in der Umgebung und somit den Anteil der Mitochondrien, die sich zum Abbau in Lysosomen befinden bestimmt werden (Katayama et al., 2011).

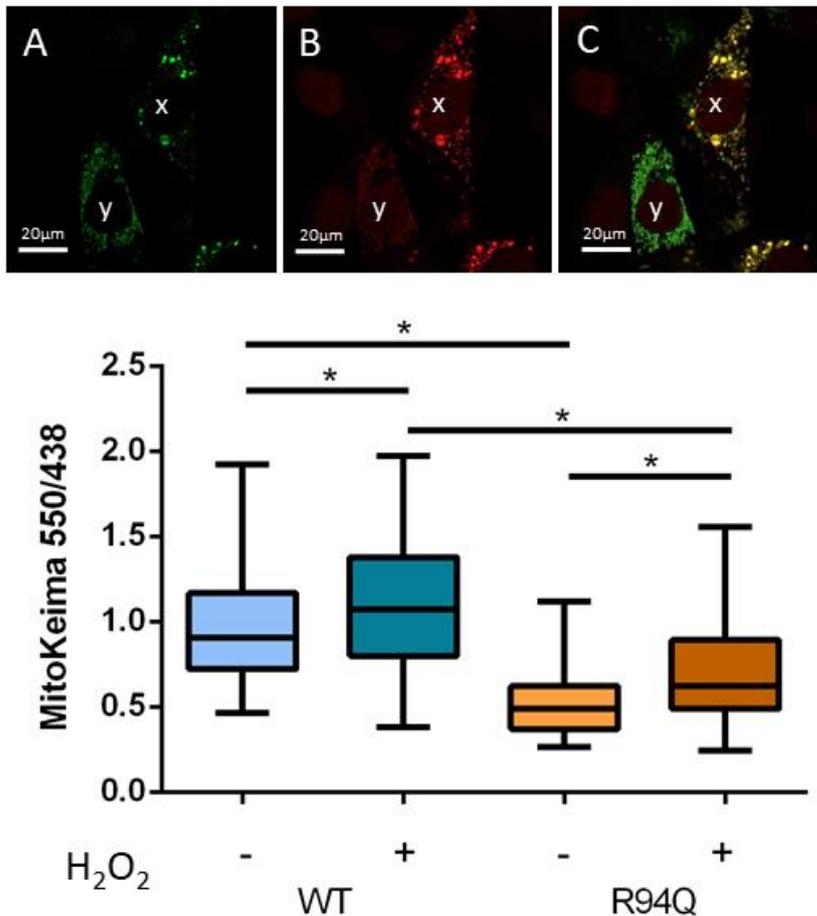


Abbildung 11: Verringerte Mitophagie in R94Q-Zellen sowie erhöhte Mitophagie durch H₂O₂ Behandlung bei beiden Zelllinien

Je 3500 Zellen der Rescue und R94Q Zelllinien in 250 μ l in einem ibidi Slide ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen gemäß des Transfektionsprotokolls mit 100 μ g MitoKeima transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen hälftig mit 100 μ M H₂O₂ behandelt. Nach abermals 24 h wurde je ein Bild bei 438 nm und eines bei 550 nm gemacht und daraufhin die Fluoreszenzintensität der Zellen auf beiden Bildern bestimmt. Anschließend wurde ein Quotient (Intensität bei 550 nm/Intensität bei 438 nm) gebildet. **A** Messung bei 438 nm **B** Messung bei 550 nm **C** Überlagertes Bild von A und B. **D** Quotient der Fluoreszenz Intensität bei 550 nm/438 nm, (MW \pm SD, n= 3 unabhängige Versuche, es wurden je Kondition pro Versuch ca. 50 Zellen ausgewertet).

Um die Mitophagie zu quantifizieren, wurden Zellen beider Zelllinien mit Mito-Keima Plasmid transfiziert und für 24 h hälftig mit 100 μ M H₂O₂ behandelt. Anschließend wurde am konfokalen Laser Mikroskop pro Zelle je ein Bild bei 438 nm und eines bei 550 nm gemacht und daraufhin die Fluoreszenzintensität der Zelle auf beiden Bildern bestimmt. Anschließend wurde ein Quotient (Intensität bei 550nm/Intensität bei 438nm) gebildet. Je höher der Quotient, umso mehr Autophagie findet folglich statt. In Abb. 4A-C ist die Funktionsweise von Mito-Keima gut zu erkennen: In Zelle x besitzt

viele Mitophagie-Mitochondrien: Bei 438 nm (neutraler pH - Abb. 4A) ist lediglich ein schwaches Signal, während bei 550 nm (saurer pH - Abb. 4B) ein starkes Signal zu sehen ist. Zelle y dagegen ist gesund: bei einem Exzitationspunkt von 438 nm (4A) sieht man ein starkes Signal, während bei 550 nm (4B) kaum ein Fluoreszenzsignal zu erkennen ist. Die Mitochondrien befinden sich hier bereits in Autophagosomen und Mito-Keima ist durch den niedrigen pH auf höherer Wellenlänge anregbar. Ebenfalls im roten Kanal zu sehen ist ein nukleärer mCherry-Marker, der für diesen Versuch jedoch irrelevant ist und lediglich bei der Auswertung die Konsequenz hatte, dass bei der Intensitätsbestimmung der Zellkern auszusparen war. In C ist die Überlagerung von A und B dargestellt, wobei die verschiedene Azidität der Mitochondrien der beiden Zellen deutlich zu sehen ist.

In Abbildung 4D ist die Auswertung des Versuchs für alle vier Konditionen dargestellt. Das relative Mito-Keima Verhältnis zeigt erniedrigte Mitophagie bei den R94Q-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Oxidativer Stress in Form von 100 μM H_2O_2 bewirkt in beiden Zelllinien ein Anstieg der Mitophagie, jedoch liegt auch hier die Mitophagie der R94Q-Zellen unter der Kontrolle.

Um die verminderte Mitophagie in den R94Q-Zellen zu bestätigen, wurde die Kolokalisation von Parkin und Mitochondrien mittels GFP-Parkin Fusionsprotein untersucht. Es wurde gezeigt, dass Parkin zu Mitochondrien wandert, um deren Mitophagie zu initiieren. Demnach korreliert Parkin-Mitochondrien Kolokalisation mit Mitophagie (Narendra et al., 2008).

Rescue- und R94Q-Zellen wurden mit GFP-Parkin und Mito-TurboFarRed als mitochondrialer Marker kotransfiziert und zur Hälfte für 24 h mit 100 μM H_2O_2 behandelt. Es wurden am konfokalen Lasermikroskop Bilder gemacht und daraufhin die Parkin-Mito-TurboFarRed Kolokalisation bestimmt. Hierzu wurde das JACoP plugin des ImageJ Programmes verwendet. In Abb. 5A sind Bilder der mit GFP-Parkin und MitoFarRed transfizierten Zellen zu sehen. In Grün ist GFP-Parkin und in Rot MitoFarRed zu erkennen. Anschließend wurde der Pearsonkoeffizient berechnet. Dieser beschreibt die Korrelation zweier Werte und liegt zwischen -1 und +1, wobei 0 keinem linearen Zusammenhang entspricht und 1 bzw. -1 einem starken linearen Zusammenhang. In Abb. 5B ist zu erkennen, dass der Pearson Koeffizient bei den

R94Q-Zellen ohne H₂O₂ Behandlung kleiner ist als bei den Rescue-Zellen ohne H₂O₂ Behandlung. Dies entspricht einer geringeren Parkin-Mitochondrien Kolokalisation und damit einer geringeren Mitophagie. Der im vorherigen Versuch beobachtete Anstieg der Mitophagie nach H₂O₂ Behandlung lässt sich in diesem Versuch lediglich bei der R94Q Gruppe beobachten. Zusätzlich wurde aus den gleichen Bilddaten die Kreuzkorrelation (CCF) berechnet, ein anderer Wert, der ebenfalls Rückschlüsse auf Korrelation und damit Kolokalisation zulässt. Auch hier lag der Mittelwert der R94Q-Zellen ohne H₂O₂ Behandlung unter dem der anderen Konditionen. Insgesamt bestätigt das Ergebnis die Vermutung, dass die R94Q Mutation eine verminderte Mitophagie zur Folge hat.

Um die Dynamik der Mitochondrien besser beurteilen zu können, wurde zuletzt noch ein Versuch mit dem Plasmid Mitotimer durchgeführt. Dieses Plasmid bindet an Mitochondrien und exprimiert ein grünes Fluoreszenzprotein, welches irreversibel zu Rot shiftet sobald es oxidiert wird. Demnach kann eine zeitliche Aussage über den Oxidationszustand und damit das Lebensalter der Mitochondrien getroffen werden.

Rescue und R94Q-Zellen wurden mit Mitotimer transfiziert und für 24 h mit 100 µM H₂O₂ behandelt. Anschließend wurde am konfokalen Laser Mikroskop die grüne Fluoreszenzintensität 488/518 (ex/em), sowie die rote Fluoreszenzintensität 543/572 (ex/em) bestimmt. Anschließend wurde ein rot/grün-Ratio gebildet. Wie in Abb. 5D zu erkennen ist, besteht kein signifikanter Unterschied im Oxidationszustand der Mitochondrien. Somit sind die Mitochondrien aller Konditionen vermutlich ähnlich alt und es besteht kein erhöhter mitochondrialer Umsatz.

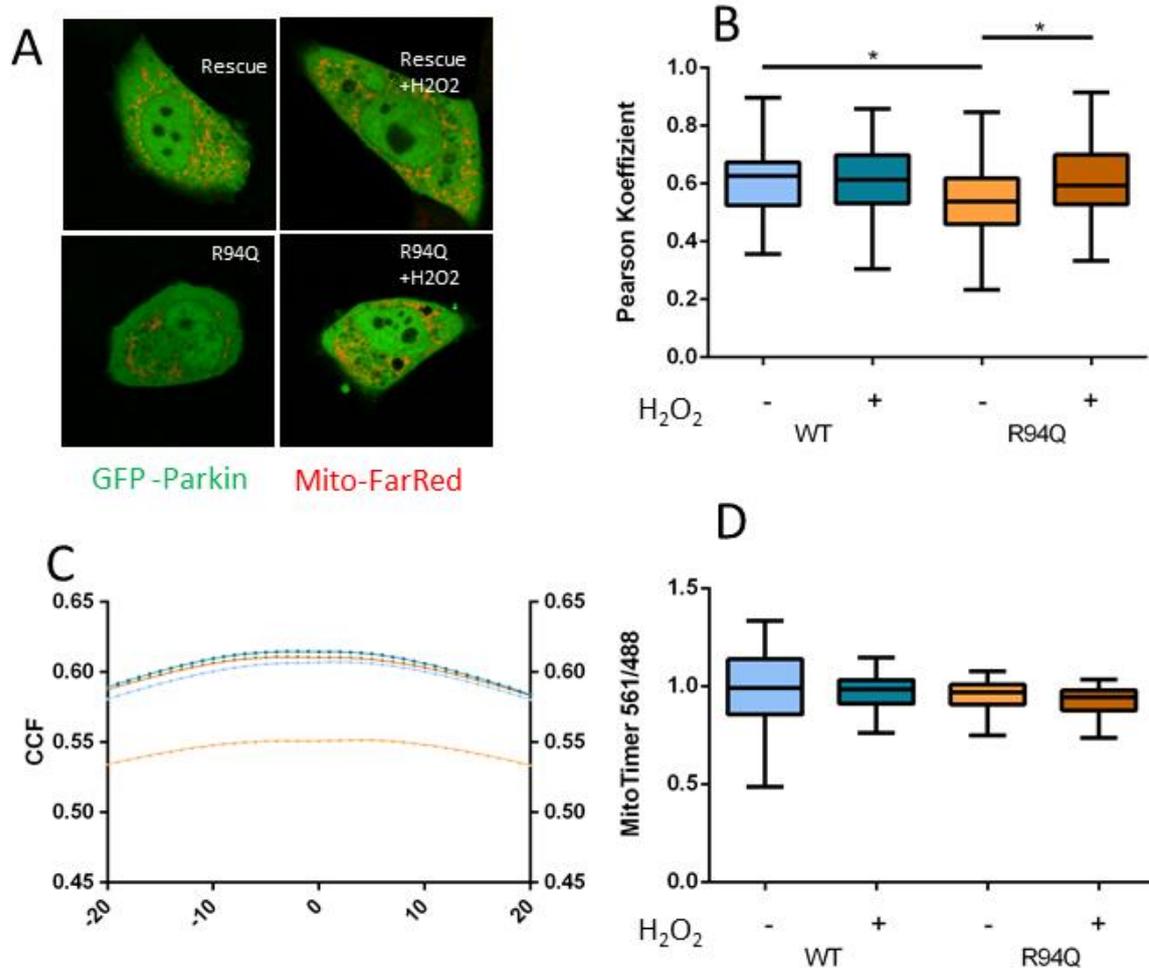


Abbildung 12: Verringerte Mitophagie bei R94Q-Zellen

Je 3500 Zellen der MEF Rescue und R94Q Zelllinie wurden in 250ul Medium in einem ibidi Slide ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen gemäß des Transfektionsprotokolls mit GFP-Parkin und Mito-TurboFarRed als mitochondrialer Marker (**B,C**) oder MitoTimer (**D**) transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen hälftig für 24 h mit 100 μ M H₂O₂ behandelt und am konfokalen Laser Mikroskop die Fluoreszenzintensität bestimmt (**A**). In Grün ist GFP-Parkin dargestellt und in Rot ist der mitochondriale Marker Mito-FarRed zu sehen. Mit dem JACoP plugin des ImageJ Programmes wurde anschließend der Pearson Koeffizient (**B**) und der CCF (**C**) berechnet. (**D**) Am konfokalen Laser Mikroskop wurde die grüne Fluoreszenzintensität 488/518, sowie die rote Fluoreszenzintensität 543/572 bestimmt. Anschließend wurde ein rot/grün-Ratio gebildet

6 DISKUSSION

6.1 KO+WT und KO+R94Q exprimieren gleiche Mengen an MFN2, die jedoch über dem MFN2 des WT liegen

Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen der R94Q Mutation des MFN2 Gens, insbesondere bei oxidativem Stress, besser zu verstehen. Grundvoraussetzung dafür ist es, zwei vergleichbare Zelllinien zu haben, die sich möglichst nur im Vorhandensein von Wildtyp Gen und Mutation unterscheiden. Um dies zu erreichen, wurden mit dem gleichen Verfahren (vgl. 3.1) die Zelllinien KO+WT und KO+R94Q hergestellt. Anschließend wurde kontrolliert, dass beide Zelllinien in gleiche Mengen von MFN2 exprimieren, da ansonsten die beobachteten Effekte auch durch Über- oder Unterexpression von MFN2 bedingt sein können. Zusätzlich wäre es wünschenswert, wenn das MFN2 von KO+WT dem des WT entspräche, um ein möglichst realistisches Abbild der Originalzelle zu haben. Ich konnte bestätigen, dass die MFN2 Menge von KO+WT und KO+R94Q nahezu identisch sind. Jedoch liegt diese deutlich über der MFN2 Menge der WT Zellen. Damit kann man zwar KO+WT und KO+R94Q-Zellen gut miteinander vergleichen, jedoch diese nicht wirklich mit dem WT, da bei beiden Zelllinien MFN2 im Vergleich zum WT MFN2 überexprimiert wird. Somit dienen die Ergebnisse zwar dem besseren Verständnis der R94Q Mutation, es muss jedoch beim Übertragen der Ergebnisse auf Patienten diese Überexpression des Zellmodells als möglicher Bias beachtet werden.

6.2 Kein Unterschied zwischen Wachstumsraten von R94Q und WT Zellen und gleichermaßen Wachstumsinderung durch oxidativen Stress

Um oxidativen Stress auszulösen wurde H_2O_2 verwendet. Dieses ist ein physiologischer Sauerstoffmetabolit und gleichzeitig ein wichtiges Signalmolekül in der Zelle. Unter physiologischen Bedingungen liegt die intrazelluläre H_2O_2 Konzentration zwischen 1-10nM. Höhere Konzentrationen lösen eine adaptive Stressantwort (oxidativen Eustress) über Schlüsselenzyme wie Nrf2/Keap1 oder NF- κ B aus. Überphysiologische Konzentration von über 100 nM führen zur Schädigung von Biomolekülen und werden als oxidativen Distress bezeichnet (Sies, 2017).

Ich habe die Viabilität der Zellen bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen untersucht, wobei erst die Konzentration von $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 bei beiden Zelllinien gleichermaßen zu einer Reduktion der Viabilität führte. Nach Sies entspricht diese Konzentration einer intrazellulären Konzentration von $1 \mu\text{M}$ und ist als milder oxidativer Stress einzuordnen (Sies, 2017). Ein Problem des gewählten Versuchsaufbaus ist, dass die Messung lediglich einmal durchgeführt werden kann, da das verwendete Reagent toxisch für die Zellen ist. Demnach kann nur die Viabilität 52h nach dem Ausplattieren bestimmt werden. Folglich könnte die verminderte Viabilität nach Behandlung mit $100 \mu\text{M}$ sowohl durch den Tod von einigen Zellen als auch durch eine verminderte Proliferation der Zellen unter oxidativem Stress verursacht sein. Ebenso ist es nicht möglich die Zellzahl nach 52h auf die Zellzahl nach dem Ausplattieren zu normalisieren, da diese nicht gemessen werden kann. Es wurden zwar die Zellen gezählt und versucht die gleiche Zellzahl auszuplattieren, jedoch gab es hier immer leichte Schwankungen und ein dichter Zellverband reagierte deutlich weniger sensibel auf oxidativen Stress. Dieses Problem wurde mit einem zweiten Proliferationsversuch umgangen, welches eine mehrfache Viabilitätsmessung zuließ. Somit konnte die Zell Viabilität nach dem Ausplattieren sowie alle 24 h gemessen werden. Auch hier bestätigte sich das Ergebnis des ersten Versuchs.

Somit ist ein Ergebnis meiner Arbeit, dass die R94Q Mutation keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Ebenso verändert die R94Q Mutation nicht die Proliferation der Zellen unter oxidativem Stress. Geringer oxidativer Stress hat keinen Einfluss auf Viabilität und Proliferation und eine H_2O_2 Konzentration von $100 \mu\text{M}$ verringert die Proliferation in 24 h um ca. 25%.

Es ist durchaus möglich, dass noch höhere H_2O_2 Konzentrationen einen Unterschied zwischen den Zelllinien zeigen, jedoch ist die gewählte Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{M}$ intrazellulär) schon 10fach über der von Sies als überphysiologisch bezeichneten Konzentration. Daher wäre ein solcher Effekt unter physiologischen Bedingungen vermutlich nicht relevant.

Ebenfalls könnte sein, dass der Zeitraum von 24 h nach H_2O_2 Messung zu lang gewählt ist, um mögliche Effekte bei niedrigeren H_2O_2 Konzentrationen zu sehen. Eventuelle Effekte hätten durch kürzere Messabstände im Proliferationsversuch gezeigt werden

können. Jedoch stellt auch jede weitere Messung zusätzlichen Stress für die Zellen dar. Der Tecan Reader wurde zwar vor jeder Messung vorgewärmt aber trotzdem stellte der Weg vom Inkubator zum Reader eine Kälteeinwirkung dar, die wiederum Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen haben könnte. Zusätzlich wären Effekte, die bereits nach 24 h nicht mehr zu sehen sind, vermutlich so gering, dass sie für die Ätiologie des CMT nicht relevant sind.

Außerdem ist es möglich, dass es andere, bisher nicht getestete Noxen gibt, bei denen die R94Q Mutation einen Einfluss auf das Zellüberleben hat.

Kawalek et al. berichtet 2015, dass die relative Proliferationsrate bei MEF MFN2 $-/-$ Zellen und Wildtyp Zellen von der Serum-Supplementation im Zellkulturmedium abhängt. So lag die Wachstumsrate bei den Knockout Zellen bei Zusatz von *fetal bovine serum* (FBS) deutlich unter dem der Wildtyp Zellen während bei Zugabe von *bovine calf serum* (BCS) die Wachstumsrate der Knockout-Zellen die der Wildtyp-Zellen überstieg (Kawalec et al., 2015). Ich habe in meiner Arbeit nur die Proliferationsrate bei Zellkulturmedium mit FCS untersucht und konnte hier keinen Unterschied zwischen R94Q-Zellen und Rescue-Zellen feststellen. In Bezug auf die Ergebnisse von Kawalek et al. wäre es eventuell interessant zu untersuchen in wie weit die Zugabe von BCS die Wachstumsrate verändert.

6.3 R94Q beeinflusst die Calciumhomöostase über MAM

Für eine regelrechte Funktion der Mitochondrien spielt der Ca^{2+} -Stoffwechsel eine entscheidende Rolle. So können Ca^{2+} Schlüsselenzyme der Atmungskette aktivieren und so die ATP-Produktion steigern (Szabadkai & Duchon, 2008). Die Calciumhomöostase wird unter anderem von MAM kontrolliert (Krols et al., 2016; Rowland & Voeltz, 2012), für deren Regulation wiederum MFN2 eine wichtige Rolle spielt (de Brito & Scorrano, 2008).

Dies wurde auch von Bernard-Marissal et al. bestätigt, die gezeigt haben, dass die R94Q Mutation von MFN2 zu einer Reduktion der MAM, ER Stress, Probleme der intrazellulären Calciumhomöostase sowie gestörter mitochondrialen Dynamik führen. Im Speziellen wurde bei Motoneuronen kein Unterschied der basalen

Calciumkonzentration gefunden, während bei sensorischen Neuronen der basale Calciumspiegel der R94Q-Zellen über dem der Kontrollgruppe lag (Bernard-Marissal et al., 2019b). Misko et al. haben Lentivirus-transduzierten Kulturen von sensorischen Neuronen verwendet, um die Auswirkungen des R94Q Mutation im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass die Überexpression von MFN2 mit axonaler Degeneration und axonalen Calciumanstieg einhergeht (Misko et al., 2012). Die Stimulation des MAM Proteins *Sigma Non-Opioid Intracellular Receptor 1* (SIGMAR1) mit dem pre-084 Agonist führt zu einem Schutz vor axonalen Degeneration in Motoneuronen die R94Q exprimieren. SIGMAR1 ist ein ER Chaperon Protein, das in der Stabilisierung des IP3 Rezeptor involviert ist und damit den Calcium Ausstrom kontrolliert (Watanabe et al., 2016). Die Hemmung von SIGMAR1 ist mit MAM Defekten und axonaler Degeneration in Motoneuronen assoziiert (Hayashi et al., 2009).

In meiner Arbeit konnte ich ebenfalls einen erhöhten mitochondrialen Calciumgehalt in R94Q-Zellen im Vergleich zu den Rescue-Zellen feststellen. Oxidativer Stress führte zu einem weiteren Anstieg des mitochondrialen Calciumgehaltes bei beiden Zelllinien, wobei auch hier der Wert der R94Q+H₂O₂ Zellen signifikant über dem der Rescue+H₂O₂ Zellen lag. Dies bestätigt damit die Ergebnisse von Bernard-Marissal et al. und Misko et al..

Abschließend kann festgehalten werden, dass MFN2 die MAM beeinflusst, und diese wiederum essenziell für eine funktionierende Calciumhomöostase sowohl des ER als auch der Mitochondrien sind. Daher wäre es weiterführend interessant die MAM nach H₂O₂ Behandlung zu untersuchen, um festzustellen, inwieweit auch hier der Calciumanstieg mit einer Reduktion von MAM einhergeht, beziehungsweise wie die MAM sich bei den Rescue-Zellen unter oxidativem Stress verändern.

6.4 Verringerte ROS bei R94Q-Zellen

Wie in 2.2 und 2.5 beschrieben haben Mitochondrien einen zellspezifischen Turnover, die Lebensdauer der Mitochondrien variiert also in verschiedenen Zellen und Geweben. Selektive Mitophagie entfernt dysfunktionale und geschädigte Mitochondrien und ist mit der mitochondrialen Biogenese verbunden (Kim &

Lemasters, 2011). Mitochondrien sind heterogen in ihrer ATP Produktion, manche produzieren große Mengen an ATP während andere ineffizient sind und größere Mengen an ROS produzieren (Twig et al., 2008). Durch eine starke ROS Erhöhung erleiden Mitochondrien oxidative Schäden, die dann von der Proteinqualitätskontrolle erfasst werden (Bender et al., 2011). Mitophagie wird also durch die ROS Produktion gesteigert (Kim & Lemasters, 2011).

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass eine höhere ROS Produktion mit einer gesteigerten Mitophagie korreliert. So hat bei beiden Zelllinien die Behandlung mit 100 μM H_2O_2 eine Steigerung der ROS und einen Anstieg der Mitophagie zur Folge. Pich et al. zeigt, dass MFN2 *loss-of-function* Pyruvate, Glukose und Fettsäureoxidation inhibiert und damit das mitochondriale Membranpotential reduziert (Pich et al., 2005). Bach et al. hat ebenfalls gezeigt, dass die Herunterregulierung von MFN2 zu einem reduzierten Membranpotential, reduzierter zellulärer Atmung und zu einer Reduktion des mitochondrialen *Protonenleaks* führt (Bach et al., 2003). Folglich wäre zu erwarten gewesen, dass die R94Q Mutation (ohne H_2O_2 Behandlung) ebenfalls mit einer Steigerung der ROS, Reduktion des Membranpotentials und daraus folgend eine Steigerung der Mitophagie einhergeht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch eine niedrigere ROS Produktion und verringerte Mitophagie der R94Q-Zellen im Vergleich zu den Rescue-Zellen bei vergleichbaren Membranpotentialen der beiden Zelllinien ohne H_2O_2 Behandlung. Die Behandlung mit H_2O_2 hatte bei beiden Zelllinien gleichermaßen den Abfall des Membranpotentials zur Folge und passt damit zu den oben beschriebenen Ergebnissen. Die verringerte ROS Produktion könnte durch Kompensationsmechanismen der R94Q-Zellen erklärt werden. Diese Theorie wird auch von Kawalec et al. vertreten, die gezeigt haben, dass murine Fibroblasten mit einem MFN2 knockout eine höhere Zellatmung haben als Wildtypzellen, was sich ebenfalls nicht mit den Ergebnissen von Bach et al. und Pich et al. deckt. Kawalec et al. schlossen folglich, dass der zelluläre Energiemetabolismus durch Adaptation der mitochondrialen Atmung kompensiert werden kann (Kawalec et al., 2015).

6.5 Erhöhtes Glutathion und gesteigerte Glukoseaufnahme bei R94Q-Zellen

Es ist bekannt, dass ein erhöhter Level des totalen GSH die Zelle gegen oxidativen Stress schützt. So hat Noack et al. gezeigt, dass eine Erhöhung des total GSH Levels Zellen, die GDAP1 überexprimieren, gegen oxidativen Stress schützt (Noack et al., 2012). Auch Del Amo und Secco haben bestätigt, dass Hoch- oder Runterregulation von GDAP1 eine Erhöhung des totalen Glutathions in Drosophilafliegen zur Folge hat (López Del Amo et al., 2015). Der Mechanismus über den GDAP1 zu einer Erhöhung des Glutathions führt ist bisher nicht genau verstanden. Shutt et al. haben jedoch die These aufgestellt, dass das GSH/GSSG Verhältnis ein wichtiger Regulationsmechanismus der mitochondrialen Fusion ist (Shutt et al., 2012). Da beide Mutationen in GDAP1 und MFN2 mit CMT assoziiert sind, könnte vermutet werden, dass die R94Q-Zellen ähnliche Kompensationsmechanismen haben und auch hier der totale GSH Level bei oxidativem Stress erhöht wird.

Diese Theorie wird durch die in 8.4. dargestellten Ergebnisse gestützt. Oxidativer Stress führt bei beiden Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg des totalen GSH Level, wobei der Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Gruppe bei den R94Q-Zellen deutlich größer ist (Anstieg um ca. 100%) als bei den Rescue-Zellen (Anstieg um ca. 30%). Dies könnte daran liegen, dass die R94Q-Zellen insgesamt eine schlechtere Stoffwechsellage und daher mehr zu kompensieren haben. Ohne H₂O₂ Behandlung liegt der GSH Level der R94Q-Zellen jedoch unter dem der Rescue-Zellen. Dies könnte damit erklärt werden, dass die R94Q-Zellen neben der erhöhten GSH Produktion noch andere Mechanismen der Kompensation ihres Defekts haben, wie beispielsweise das *mitochondriale uncoupling*. Dieses wird durch sogenannte *uncoupling Proteins* (UCPs) vermittelt. UCP 1-3 sind mitochondriale Anionencarrier, die eine wichtige Rolle in der Minimierung der ROS Emission der Elektronentransportkette spielen (Mailloux & Harper, 2011). Mitglieder unserer Forschungsgruppe konnten zeigen, dass bei R94Q-Zellen nach H₂O₂ Behandlung der Sauerstoffverbrauch signifikant höher ist als bei Rescue-Zellen nach H₂O₂ Behandlung. Gleichzeitig bleibt die ATP gleich (Wolf et al., 2019). Dies lässt darauf schließen, dass die Zelle sich durch uncoupling vor erhöhter ROS Produktion schützt. Die Tatsache, dass ROS bei R94Q-Zellen nach H₂O₂ Behandlung im Vergleich zu Rescue nach H₂O₂ Behandlung nicht deutlich erhöht sind, könnte dadurch erklärt werden, dass die Messungen nach 24 h durchgeführt wurden und daher durch die

oben genannten Kompensationsmechanismen das initial stärker erhöhte ROS schon wieder abgefallen ist.

Der signifikante Anstieg der Glukoseaufnahme in der R94Q+ H₂O₂ Gruppe passt ebenfalls zu der stark gesteigerten GSH Produktion: Für die vermehrte Reduktion von GSSG zu GSH wird mehr NADPH benötigt. Dieses wird wiederum durch eine Steigerung des Pentosephosphatwegs bereitgestellt, für die die Zelle vermehrt Glukose aufnehmen muss.

6.6 Verringerte Mitophagie bei R94Q-Zellen

In unseren R94Q-Zellen ging das Entkoppeln von ATP Produktion und Zellatmung, ausgelöst durch milden oxidativen Stress, mit einer Reduktion der Mitophagie einher. Chen et al. haben gezeigt, dass PINK1 MFN2 phosphoryliert und so die Parkin-vermittelte Ubiquitinierung und den folgenden Abbau der Mitochondrien initiiert. Wie auch bei uns führt die Akkumulation von morphologisch und funktional abnormalen Mitochondrien in MFN2 Knockout MEF zu respiratorischer Insuffizienz (Y. Chen & Dorn, 2013). Interessanterweise hemmt der Verlust von Beclin-1, einem Autophagie Protein, welches in der Formation und Reifung des Autophagosoms eine wichtige Rolle spielt, die CCCP induzierte Translokation von Parkin zu den Mitochondrien sowie MFN2 Ubiquitinierung und Abbau. Ebenso hebt die Depletion von Beclin-1 die Suppression der mitochondrialen Fusion in MFN2 Knockout Zellen auf (Choubey et al., 2014), was vermuten lässt, dass die MFN2 Mutation irgendwie diesen Stoffwechselweg beeinflusst. Anderenfalls könnte die Mutation die Phosphorylierung von MFN2 durch PINK1, die für die Bindung von Parkin sowie die Parkin Translokation essenziell ist, beeinflussen, was wiederum die Mitophagie hemmt.

Kontrovers zu unseren Ergebnissen stehen die von Rizzo et al.: Diese haben einen Anstieg der Mitophagie in Motoneuronen aus induzierten Stammzellen von CMT2A Patienten festgestellt. Diese Beobachtung ging mit einer Reduktion des Mitochondrienvolumens sowie Veränderung in der Anordnung der Mitochondrien einher, während Überleben und Axonverlängerung unverändert blieben (Rizzo et al., 2016). Ebenso zeigten die Neurone eine erhöhte Expression von PINK1, PARK2 und BNIP3, einer Spleißvariante von BECN1, die als Auslöser der Mitophagie vermutet

wird. Es wäre möglich, dass diese Spleißvariante nur bei menschlichen Motoneuronen exprimiert wird, was diese entgegengesetzten Ergebnisse erklären würde. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse von Sebastian et al. gestützt, die in MFN2 Knockout Mausmuskelfasern eine Reduktion der Mitophagie sowie geschädigte Mitochondrien zeigen konnten, die zu mitochondrialer Dysfunktion geführt haben (Sebastián et al., 2016). Sie konnten ebenfalls zeigen, dass ein altersinduziertes MFN2-Defizit einen ROS abhängigen adaptiven Signalweg durch Induktion des Transkriptionsfaktors HIF1 α und BNIP3 initiiert, was für den Verlust der Mitophagie kompensiert und damit die Mitochondrien schützt (Sebastián et al., 2016). Zhou et al. vermuten dagegen, dass verschiedene Level von MFN1 den Effekt des R94Q MFN2 auf die Parkin-vermittelte mitochondriale Autophagie beeinflussen. Dies wiederum könnte bedeuten, dass eine Anreicherung von MFN1 im Nervensystem eine mögliche Therapieoption für CMT darstellt (Zhou et al., 2019).

6.7 Diskussion der gewählten Methoden

Für viele Versuche wurden die Zellen transfiziert bzw. gefärbt und anschließend Bilder von 30-50 Zellen pro Kondition am konfokalen Mikroskop (SP5 Leica) aufgenommen und die Fluoreszenz ausgewertet. Obwohl ich mich bemüht habe möglichst objektiv Zellen aus den mehreren Tausend Zellen auszuwählen unterliegt das menschliche Auge immer einem gewissen Bias. So wurden beispielsweise nur Zellen ausgewählt, die entweder einzeln oder einschichtig im Zellverband vorlagen, da überlappende Zellen nicht gut auswertbar waren. Um dieses zu minimieren habe ich pro Kondition je zwei Kammern ausgewertet mit insgesamt mindestens 30 Zellen pro Kondition. Außerdem wurde jeder Versuch dreimal wiederholt, sodass insgesamt 90-150 Zellen pro Kondition zur Verfügung standen.

Eine objektivere Methode wäre sicherlich die Auswertung der Fluoreszenz mit einem Mikroskop, mit dem die (automatische) Aufnahme und Auswertung von einer deutlich größeren Zellzahl möglich ist. Alternativ käme auch die Auswertung mittels FACS in Frage. Jedoch setzt dies das Vorliegen der Zellen in einer Suspension voraus. Das Ablösen der adhären MEF Zellen würde wiederum mit Stress der Zellen einhergehen, sodass eventuell sensible live Messungen verfälscht wären.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Mutationen im MFN2 Gen führen zur Charcot-Marie Tooth Krankheit Typ 2A, eine dominante axonale Form dieser peripheren Neuropathie. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der R94Q Mutation des MFN2 Gens auf verschiedene zelluläre Prozesse insbesondere unter oxidativem Stress in Form von H₂O₂ Behandlung untersucht.

Zunächst habe ich bestätigt, dass KO+WT (Rescue) Zellen und KO+R94Q (R94Q) Zellen vergleichbare Mengen an MFN2 exprimieren. Ich konnte zeigen, dass kein Unterschied in der Proliferationsrate besteht, und unter oxidativem Stress in Form von 100 µM H₂O₂ für 24 h die Proliferationsrate beider Zelllinien gleichermaßen leicht reduziert wird.

Es wurde gezeigt, dass es bei R94Q-Zellen unter oxidativem Stress zu mitochondrialer Entkopplung kommt und einem damit verbundenen Abfall der ATP Produktion. Die Vermutung, dass diese Veränderungen durch erhöhten oxidativen Stress in Form von ROS verursacht werden konnte ich nicht bestätigen, es wurde sogar reduzierter oxidativer Stress in R94Q-Zellen gemessen. Es könnte daher vermutet werden, dass diese Zellen hochregulierte antioxidative Enzyme haben, die das Oxidationsniveau unter den untersuchten Konditionen niedrig halten.

Ebenfalls habe ich gezeigt, dass R94Q-Zellen eine erhöhte Glukoseaufnahme haben. Diese Glukose wird jedoch nicht wie vermutet in den PPP geschleust, sondern gelangt in den Zitratzyklus. Die R94Q-Zellen nehmen also mehr Glukose auf, aber produzieren trotzdem weniger ATP, was durch weniger effiziente Mitochondrien erklärt werden kann. Als möglicher Grund dafür konnte ich eine Reduktion der Mitophagie bei R94Q-Zellen mit und ohne Exposition zu oxidativem Stress feststellen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J. R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., & Zorzano, A. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(19), 17190–17197. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212754200>
- Banchs, I., Casasnovas, C., Albertí, A., De Jorge, L., Povedano, M., Montero, J., Martínez-Matos, J. A., & Volpini, V. (2009). Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2009*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2009/985415>
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V., & Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*(7360), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Baxter, P. S., & Hardingham, G. E. (2016). Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 100, pp. 147–152). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.027>
- Baxter, R. V., Othmane, K. Ben, Rochelle, J. M., Stajich, J. E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Hamida, M. Ben, Bel, S., Stenger, J. E., Gilbert, J. R., Pericak-Vance, M. A., & Vance, J. M. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nature Genetics*, *30*(1), 21–22. <https://doi.org/10.1038/ng796>
- Benard, G., & Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(8), 1313–1342. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.2000>
- Bender, T., Lewrenz, I., Franken, S., Baitzel, C., & Voos, W. (2011). Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(5), 541–554. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0718>
- Berger, P., Young, P., & Suter, U. (2002). Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics*, *4*(1), 1–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12030326>
- Bernard-Marissal, N., van Hameren, G., Juneja, M., Pellegrino, C., Louhivuori, L., Bartesaghi, L., Rochat, C., El Mansour, O., Médard, J.-J., Croisier, M., Maclachlan, C., Poirot, O., Uhlén, P., Timmerman, V., Tricaud, N., Schneider, B. L., & Chrast, R. (2019a). Altered interplay between endoplasmic reticulum and mitochondria in Charcot-Marie-Tooth type

-
- 2A neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(6), 2328–2337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810932116>
- Bernard-Marissal, N., van Hameren, G., Juneja, M., Pellegrino, C., Louhivuori, L., Bartesaghi, L., Rochat, C., El Mansour, O., Médard, J.-J., Croisier, M., Maclachlan, C., Poirot, O., Uhlén, P., Timmerman, V., Tricaud, N., Schneider, B. L., & Chrast, R. (2019b). Altered interplay between endoplasmic reticulum and mitochondria in Charcot–Marie–Tooth type 2A neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(6), 2328–2337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810932116>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bucci, C., Bakke, O., & Progidà, C. (2012). Charcot–Marie–Tooth disease and intracellular traffic. *Progress in Neurobiology*, 99(3), 191–225. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2012.03.003>
- Calvo, J., Funalot, B., Ouvrier, R. A., Lazaro, L., Toutain, A., De Mas, P., Bouche, P., Gilbert-Dussardier, B., Arne-Bes, M.-C., Carrière, J.-P., Journal, H., Minot-Myhie, M.-C., Guillou, C., Ghorab, K., Magy, L., Sturtz, F., Vallat, J.-M., & Magdelaine, C. (2009). Genotype-Phenotype Correlations in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2 Caused by Mitofusin 2 Mutations. *Archives of Neurology*, 66(12), 1511–1516. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.284>
- Cartoni, R., Arnaud, E., Médard, J.-J., Poirot, O., Courvoisier, D. S., Chrast, R., & Martinou, J.-C. (2010). Expression of mitofusin 2R94Q in a transgenic mouse leads to Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 2A. *Brain*, 133(5), 1460–1469. <https://doi.org/10.1093/brain/awq082>
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., & Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, 160(2), 189–200. <https://doi.org/10.1083/JCB.200211046>
- Chen, Y., & Dorn, G. W. (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, 340(6131), 471–475. <https://doi.org/10.1126/science.1231031>
- Chomzynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Choubey, V., Cagalinec, M., Liiv, J., Safiulina, D., Hickey, M. A., Kuum, M., Liiv, M., Anwar, T., Eskelinen, E.-L., & Kaasik, A. (2014). BECN1 is involved in the initiation of mitophagy. *Autophagy*, 10(6), 1105–1119. <https://doi.org/10.4161/auto.28615>

-
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, *456*(7222), 605–610. <https://doi.org/10.1038/nature07534>
- De Mario, A., Quintana-Cabrera, R., Martinvalet, D., & Giacomello, M. (2017). (Neuro)degenerated Mitochondria-ER contacts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *483*(4), 1096–1109. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.07.056>
- Dorn, G. W. (2013). Mitochondrial dynamism and cardiac fate--a personal perspective. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *77*(6), 1370–1379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615052>
- El-Hattab, A. W., Suleiman, J., Almannai, M., & Scaglia, F. (2018). Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Molecular Genetics and Metabolism*, *125*(4), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.003>
- El Fissi, N., Rojo, M., Aouane, A., Karatas, E., Poliacikova, G., David, C., Royet, J., & Rival, T. (2018). Mitofusin gain and loss of function drive pathogenesis in Drosophila models of CMT 2A neuropathy. *EMBO Reports*, *19*(8). <https://doi.org/10.15252/embr.201745241>
- Filadi, R., Pendin, D., & Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death & Disease*, *9*(3), 330. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0023-6>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquiret, V., Angebault, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Martinou, J. C., & Reynier, P. (2011). Bioenergetic defect associated with mKATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *FASEB Journal*, *25*(5), 1618–1627. <https://doi.org/10.1096/fj.10-173609>
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, *142*(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., & Su, T.-P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology*, *19*(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2008.12.002>
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J., & Harper, J. W. (2015). The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular Cell*, *60*(1), 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.016>
- Huang, P., Galloway, C. A., & Yoon, Y. (2011). Control of Mitochondrial Morphology Through Differential Interactions of Mitochondrial Fusion and Fission Proteins. *PLoS ONE*, *6*(5), e20655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020655>
- Jerath, N. U., & Shy, M. E. (2015). Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding

-
- molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(4), 667–678. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2014.07.031>
- Katayama, H., Kogure, T., Mizushima, N., Yoshimori, T., & Miyawaki, A. (2011). A Sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery. *Chemistry & Biology*, 18(8), 1042–1052. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.05.013>
- Kawalec, M., Boratyńska-Jasińska, A., Beręsewicz, M., Dymkowska, D., Zabłocki, K., & Zabłocka, B. (2015). Mitofusin 2 Deficiency Affects Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in MEF Cells. *PLOS ONE*, 10(7), e0134162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134162>
- Kazamel, M., & Boes, C. J. (2015). Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution. *Journal of Neurology*, 262(4), 801–805. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7490-9>
- Kazlauskaite, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D. G., Ritorto, M. S., Hofmann, K., Alessi, D. R., Knebel, A., Trost, M., & Muqit, M. M. K. (2014). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *The Biochemical Journal*, 460(1), 127–139. <https://doi.org/10.1042/BJ20140334>
- Kim, I., & Lemasters, J. J. (2011). Mitophagy selectively degrades individual damaged mitochondria after photoirradiation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(10), 1919–1928. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3768>
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5685), 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>
- Krols, M., van Isterdael, G., Asselbergh, B., Kremer, A., Lippens, S., Timmerman, V., & Janssens, S. (2016). Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, 131(4), 505–523. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1528-7>
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565), 309–314. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- López Del Amo, V., Seco-Cervera, M., García-Giménez, J. L., Whitworth, A. J., Pallardó, F. V., & Galindo, M. I. (2015). Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila* Gdap1: implications for the Charcot–Marie–Tooth neuropathy. *Human Molecular Genetics*, 24(1), 21–36. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu416>

-
- Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 288–314. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.02.005>
- Mailloux, R. J., & Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), 1106–1115. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.06.022>
- Mattie, S., Riemer, J., Wideman, J. G., & McBride, H. M. (2018). A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of Cell Biology*, 217(2), 507–515. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611194>
- McCorquodale, D. S., Montenegro, G., Peguero, A., Carlson, N., Speziani, F., Price, J., Taylor, S. W., Melanson, M., Vance, J. M., & Züchner, S. (2011). Mutation screening of mitofusin 2 in Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Journal of Neurology*, 258(7), 1234–1239. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-5910-7>
- McLelland, G.-L., Goiran, T., Yi, W., Dorval, G., Chen, C. X., Lauinger, N. D., Krahn, A. I., Valimehr, S., Rakovic, A., Rouiller, I., Durcan, T. M., Trempe, J.-F., & Fon, E. A. (2018). Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.32866>
- Misko, A. L., Sasaki, Y., Tuck, E., Milbrandt, J., & Baloh, R. H. (2012). Mitofusin2 Mutations Disrupt Axonal Mitochondrial Positioning and Promote Axon Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 32(12), 4145–4155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6338-11.2012>
- Mourier, A., Motori, E., Brandt, T., Lagouge, M., Atanassov, I., Galinier, A., Rappl, G., Brodesser, S., Hultenby, K., Dieterich, C., & Larsson, N.-G. (2015). Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *The Journal of Cell Biology*, 208(4), 429–442. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411100>
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of Cell Biology*, 183(5), 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- Neusch, C., Senderek, J., Eggermann, T., Elloff, E., Bähr, M., & Schneider-Gold, C. (2007). Mitofusin 2 gene mutation (R94Q) causing severe early-onset axonal polyneuropathy (CMT2A). *European Journal of Neurology*, 14(5), 575–577. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01688.x>
- Nickel, N., Cleven, A., Enders, V., Lisak, D., Schneider, L., & Methner, A. (2016). Androgen-inducible gene 1 increases the ER Ca²⁺ content and cell death susceptibility against oxidative stress. *Gene*, 586(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2016.03.055>
- Niemann, A., Berger, P., & Suter, U. (2006). Pathomechanisms of mutant proteins in charcot-marie-tooth disease. In *NeuroMolecular Medicine* (Vol. 8, Issues 1–2, pp. 217–241). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/NMM:8:1-2:217>
- Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., Dehmel, T., Meyer zu

- Hörste, G., Stettner, M., Kieseier, B. C., Summer, H., Golz, S., Kochanski, A., Wiedau-Pazos, M., Arnold, S., Lewerenz, J., & Methner, A. (2012). Charcot–Marie–Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Human Molecular Genetics*, 21(1), 150–162. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr450>
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P., Ducommun, B., Lenaers, G., & Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Letters*, 523(1–3), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02985-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02985-X)
- Picci, C., Wong, V. S. C., Costa, C. J., McKinnon, M. C., Goldberg, D. C., Swift, M., Alam, N. M., Prusky, G. T., Shen, S., Kozikowski, A. P., Willis, D. E., & Langley, B. (2020). HDAC6 inhibition promotes α -tubulin acetylation and ameliorates CMT2A peripheral neuropathy in mice. *Experimental Neurology*, 328. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113281>
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., & Zorzano, A. (2005). The Charcot–Marie–Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Human Molecular Genetics*, 14(11), 1405–1415. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi149>
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044138>
- Rizzo, F., Ronchi, D., Salani, S., Nizzardo, M., Fortunato, F., Bordoni, A., Stuppia, G., Del Bo, R., Piga, D., Fato, R., Bresolin, N., Comi, G. P., & Corti, S. (2016). Selective mitochondrial depletion, apoptosis resistance, and increased mitophagy in human Charcot-Marie-Tooth 2A motor neurons. *Human Molecular Genetics*, 25(19), 4266–4281. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw258>
- Rottenberg, H., & Scarpa, A. (1974). Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry*, 13(23), 4811–4817. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4429666>
- Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(10), 607–625. <https://doi.org/10.1038/nrm3440>
- Santel, A., & Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 5), 867–874. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181170>
- Saotome, M., Katoh, H., Satoh, H., Hayashi, H., & Hajnóczky, G. (2014). “Mitochondrial remodeling” in coronary heart disease. *Research Reports in Clinical Cardiology*, 5, 111. <https://doi.org/10.2147/RRCC.S43364>
- Sebastián, D., Sorianello, E., Segalés, J., Irazoki, A., Ruiz-Bonilla, V., Sala, D., Planet, E.,

-
- Berenguer-Llargo, A., Muñoz, J. P., Sánchez-Feutrie, M., Plana, N., Hernández-Álvarez, M. I., Serrano, A. L., Palacín, M., & Zorzano, A. (2016). Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *The EMBO Journal*, *35*(15), 1677–1693. <https://doi.org/10.15252/embj.201593084>
- Shamseldin, H. E., Alasmari, A., Salih, M. A., Samman, M. M., Mian, S. A., Alshidi, T., Ibrahim, N., Hashem, M., Faqeih, E., Al-Mohanna, F., & Alkuraya, F. S. (2017). A null mutation in MICU2 causes abnormal mitochondrial calcium homeostasis and a severe neurodevelopmental disorder. *Brain*, *140*(11), 2806–2813. <https://doi.org/10.1093/brain/awx237>
- Shutt, T., Geoffrion, M., Milne, R., & McBride, H. M. (2012). The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Reports*, *13*(10), 909–915. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.128>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, *11*, 613–619. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2016.12.035>
- Suen, D. F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. In *Genes and Development* (Vol. 22, Issue 12, pp. 1577–1590). Genes Dev. <https://doi.org/10.1101/gad.1658508>
- Suzuki, S., Murotomi, K., Nakajima, Y., Kawai, K., Ohta, K., Warita, K., Miki, T., & Takeuchi, Y. (2014). Development of an Artificial Calcium-Dependent Transcription Factor To Detect Sustained Intracellular Calcium Elevation. *ACS Synthetic Biology*, *3*(10), 717–722. <https://doi.org/10.1021/sb500070c>
- Szabadkai, G., & Duchen, M. R. (2008). Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *23*(2), 84–94. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2007>
- Szigeti, K., & Lupski, J. R. (2009). Charcot–Marie–Tooth disease. *European Journal of Human Genetics*, *17*(6), 703–710. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.31>
- Tan, S., Schubert, D., & Maher, P. (2001). Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *1*(6), 497–506. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895126>
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O. S. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1777*(9), 1092–1097. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.05.001>
- Vallat, J.-M. (2003). Dominantly Inherited Peripheral Neuropathies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *62*(7), 699–714. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.7.699>
- van Hameren, G., Campbell, G., Deck, M., Berthelot, J., Gautier, B., Quintana, P., Chrast, R., & Tricaud, N. (2019). In vivo real-time dynamics of ATP and ROS production in axonal mitochondria show decoupling in mouse models of peripheral neuropathies. *Acta*

-
- Neuropathologica Communications*, 7(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0740-4>
- Watanabe, S., Ilieva, H., Tamada, H., Nomura, H., Komine, O., Endo, F., Jin, S., Mancias, P., Kiyama, H., & Yamanaka, K. (2016). Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in *SIGMAR1* - and *SOD1* -linked ALS. *EMBO Molecular Medicine*, 8(12), 1421–1437. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606403>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Wolf, C., Zimmermann, R., Thaher, O., Bueno, D., Wüllner, V., Schäfer, M. K. E., Albrecht, P., & Methner, A. (2019). The Charcot–Marie Tooth Disease Mutation R94Q in MFN2 Decreases ATP Production but Increases Mitochondrial Respiration under Conditions of Mild Oxidative Stress. *Cells*, 8(10), 1289. <https://doi.org/10.3390/cells8101289>
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Zhou, Y., Carmona, S., Muhammad, A. K. M. G., Bell, S., Landeros, J., Vazquez, M., Ho, R., Franco, A., Lu, B., Dorn, G. W., Wang, S., Lutz, C. M., & Baloh, R. H. (2019). Restoring mitofusin balance prevents axonal degeneration in a Charcot-Marie-Tooth type 2A model. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1756–1771. <https://doi.org/10.1172/JCI124194>

9 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater bedanken, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Es war ein sehr spannender Einblick in die Welt der experimentellen Forschung, den wir Mediziner im Rahmen des regulären Studiums sonst nicht erhalten. Ich bin dankbar für seine Unterstützung und dass er trotz stressigem Klinikalltag jederzeit ein offenes Ohr für mich und mein Projekt hatte.

Natürlich möchte ich mich ebenso bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mich liebevoll in ihr Team aufgenommen haben und mir als laborunerfahrene Medizinerin erst einmal die Grundlagen des Laboralltags beibringen mussten und mich immer getröstet und aufgebaut haben, wenn ein Versuch nicht funktioniert hat.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, insbesondere meiner Mama für die Unterstützung und Motivation bedanken. Ohne dich hätte diese Arbeit vermutlich nie ein Ende gefunden.

