

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Adaption der mitochondrialen Form und Funktion an oxidativen Stress
durch Mitofusin-2

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

Vorgelegt von

Osamah Mahmud Ali Yosif Hamdan Thaher
aus Darmstadt

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Methner

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M.K.E. Schäfer

3. Gutachter: Prof. Dr. A. Reichert

Tag der Promotion: 06. Juli 2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1. Mitochondrien	3
2.1.1. Aufbau und Funktion	3
2.1.2. Mitochondriale Dynamik	5
2.1.3. Oxidative Phosphorylierung.....	6
2.2. Mitofusin 2	9
2.2.1. Struktur und Rolle in der mitochondrialen Fusion	9
2.2.2. MFN2 und mitochondriale Bioenergetik.....	13
2.2.3. Interaktion zwischen Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum	14
2.2.4. Rolle im Kalziumhaushalt	16
2.2.5. Mitophagie, Zellzyklus, Apoptose, Onkologie	16
2.2.6. MFN2 in der Pathophysiologie von Neurodegeneration.....	18
2.2.7. R94Q-Mutation verursacht den Morbus Charcot-Marie-Tooth 2A.....	20
2.2.8. C684 vermittelt die GSSG-induzierte MFN2-Oligomerisation.....	23
2.2.9. K109A-Mutation.....	24
2.3. Oxidativer Stress.....	25
2.3.1. Ursachen oxidativen Stresses	25
2.3.2. Antioxidativer Apparat	28
2.3.3. Glutathion (GSH).....	29
2.4. Zelluläre Kalziumhomöostase und Kalziumkanäle	30
2.4.1. Kalziumhaushalt im Endoplasmatisches Retikulum	31
2.4.2. Mitochondrialer Kalziumeinstrom.....	32
2.4.3. Mitochondrialer Kalziumausstrom.....	34
3. Material	36
3.1. Zelllinien.....	36
3.2. Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien und Zusätze	37
3.3. Bakterien.....	39
3.4. Primer	39
3.5. Plasmide und Klonierungsvektoren	39
3.6. Enzyme, Farbstoffe, Marker	40
3.7. Antikörper	41
3.8. Kits.....	41
3.9. Verbrauchsmaterial	41
3.10. Geräte.....	42
3.11. Datenverarbeitungsprogramme.....	44
4. Methoden.....	45
4.1. Molekularbiologie	45
4.1.1. Generierung der Punktmutationen und Klonierung	45
4.1.2. Hitzeschocktransformation und Plasmid-DNA-Isolierung.....	45
4.1.3. Generierung stabiler Zelllinien	46
4.1.4. Isolierung genomischer DNA	49
4.1.5. Polymerase-Kettenreaktion	50
4.1.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	51

4.1.7.	PCR-Aufreinigung	52
4.1.8.	Sequenzierung von DNA.....	52
4.1.9.	Transiente Transfektion eines Plasmides in MEF-Zellen	52
4.2.	MEF-Zellkultur.....	53
4.2.1.	Kultivierung stabiler Zelllinien	53
4.2.2.	Kryokonservierung	54
4.2.3.	Auftauen und Inkulturnahme.....	55
4.2.4.	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	56
4.2.5.	Messung der Zellproliferation	56
4.3.	Proteinbiochemie	57
4.3.1.	Proteinisolierung und -gewinnung durch Zellyse.....	57
4.3.2.	Konzentrationsbestimmung der Proteinproben.....	57
4.3.3.	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE	58
4.3.4.	Proteinnachweis durch Immunodetektion nach Western Blot	59
4.4.	Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie	61
4.4.1.	Färbung von Mitochondrien.....	61
4.4.2.	Analyse der mitochondrialen Morphologie.....	62
4.5.	Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs	63
4.5.1.	Biochemische Grundlagen und Aufbau des Oxygraph-2k.....	63
4.5.2.	Messung in nicht permeabilisierten, intakten Zellen.....	65
4.5.3.	Änderung der mitochondrialen Atmung in intakten Zellen als Reaktion auf oxidativen Stress	66
4.5.4.	Messung in permeabilisierten Zellen	66
4.5.5.	Änderung der mitochondrialen Atmung in permeabilisierten Zellen als Reaktion auf Änderung des Redox-Milieus.....	68
4.5.6.	Messung und Auswertung.....	68
4.6.	Messung des zellulären ATP-Gehaltes	69
4.7.	Messung des mitochondrialen Membranpotentials.....	70
4.8.	Messung des zellulären Glutathion-Gehalts	71
4.9.	Messung des zellulären Gehaltes an reaktiven Sauerstoffspezies	72
4.10.	Kalziumhaushalt.....	73
4.10.1.	Messung der mitochondrialen Kalziumkonzentration.....	73
4.10.2.	<i>Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)</i>	73
4.11.	Statistische Analyse.....	74
5.	Ergebnisse	75
5.1.	Erfolgreiche Generierung stabiler Zelllinien mit MFN2-Mutationen.....	75
5.2.	WT- und C684A-MFN2 machen durch MFN2-Mangel verursachte mitochondriale Fragmentierung rückgängig, während R94Q- und K109A-MFN2 eine vermehrte mitochondriale Fragmentierung verursachen	77
5.3.	Mutiertes Mitofusin-2 reagiert mit vermehrter mitochondrialer Fragmentierung auf oxidativen Stress.....	78
5.4.	Unter Basalbedingungen vermehrter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch MFN2-defizienter Zellen bei reduziertem Membranpotenzial ($\Delta\Psi_{mt}$) und gleicher ATP-Konzentration.....	80
5.5.	Milder oxidativer Stress macht die durch MFN2-KO gesteigerte mitochondriale Respiration rückgängig und führt bei mutiertem MFN2 zu erhöhter Zellatmung	83
5.6.	GSH reduziert in C684A-Zellen Leak- und ETS-Atmung	84
5.7.	Wildtyp-MFN2 inhibiert die Zellproliferation und zeigt sich resistent gegen oxidativen Stress	87
5.8.	Reduzierter GSH-Gehalt in MFN2-defizienten Zellen und erhöhter ROS-Gehalt in R94Q- und K109A-Zellen.....	88
5.9.	Erhöhter Kalziumgehalt in EV-, C684A- und R94Q-Zellen	90

6.	Diskussion	94
6.1.	MFN2 ist in der Regulation zahlreicher mitochondrialer und zellulärer Prozesse involviert.....	94
6.2.	Posttranslationale Modifikation des Cysteins 684 könnte für die Adaption der mitochondrialen Form und Funktion an oxidativen Stress wichtig sein	100
6.3.	R94Q-Mutation in MFN2 verursacht eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit für oxidativen Stress sowie eine für die Pathophysiologie möglicherweise wichtige Entkopplung von Atmungskette und ATP-Produktion	103
6.4.	K109A-Zellen zeigen verminderte mitochondriale Respiration im ETS-Stadium sowie eine reduzierte maximale Kalziumaufnahme	112
6.5.	Vermehrte mitochondriale Fragmentierung geht mit erhöhter Zellatmung einher .	114
7.	Zusammenfassung.....	116
8.	Literaturverzeichnis	118
	Danksagung.....	136
	Lebenslauf	137

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Präfix	Potenz
p	Piko-	(10 ⁻¹²)
n	Nano-	(10 ⁻⁹)
μ	Mikro-	(10 ⁻⁶)
m	Milli-	(10 ⁻³)
c	Zenti-	(10 ⁻²)
d	Dezi-	(10 ⁻¹)
		(10 ⁰)
k	Kilo-	(10 ³)
M	Mega-	(10 ⁶)
G	Giga-	(10 ⁹)
T	Tera-	(10 ¹²)

Symbol	Einheit
°C	Grad Celsius
c	Konzentration (g/l oder mol/l)
m	Meter
g	Gramm
h	<i>hora</i> (Stunde)
l	Liter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumeneinheit)

Abkürzung	Bedeutung
ADP	Adenosindiphosphat
Ama	Antimycin A
Amp	Ampicillin
ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Ca ²⁺	zweiwertiges Kalziumkation
CMT2A	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
DRP1	<i>Dynamin-related protein-1</i>
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMRE	<i>Essential MCU regulator</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
ETS	Elektronentransfersystem
Ex./ Em	Exzitation/ Emission
EV	<i>empty vector</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
Fis1	<i>Mitochondrial fission protein 1</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Fzo	<i>Fuzzy onions</i>
G	Glutamat
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HR	Heptadenmuster (<i>heptad repeat</i>)
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IRE1	<i>Inositol-requiring protein 1</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ITR	<i>inverted terminal repeat sequences</i>
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>Knockout</i>
LETM1	<i>Leucine zipper EF-hand containing protein 1</i>
M	Malat
MAM	<i>Mitochondria-associated membranes</i>
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MFN2	Mitofusin-2
MICU	<i>Mitochondrial calcium uptake protein</i>
MCUR1	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1</i>
Mff	<i>Mitochondrial fission factor</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MP	Milchpulver
mPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> , Boten-RNA
mseCFP	<i>monomeric super enhanced variant of the cyan fluorescent protein</i>
mtDNA	mitochondriales Genom
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
O ₂	Sauerstoff
Omy	Oligomycin
Opa1	<i>Optic atrophy protein 1</i>
Orai1	<i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS + Tween® 20
PERK	<i>Protein kinase RNA PKR-like ER kinase</i>
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PLL	Poly-L-Lysin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	<i>Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion</i>
PR	<i>Proline-rich domain</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
Rot	Rotenon
ROX	<i>residual oxygen consumption</i>
S	Succinat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
S.O.C.	<i>Super Optimal Broth</i>
SOCE	Store-operated Ca ²⁺ entry
SOCs	Store-operated Ca ²⁺ channels
SOD	Superoxiddismutase
SSA	<i>Sulfosalicylic acid</i>
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
SUIT	<i>Substrate-uncoupler-inhibitor-titration</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEA	Triethanolamin
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester
TNB ⁻	2-Nitro-5-thiobenzoat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylenesorbitan
UPR	<i>unfolded protein response</i>
WT	Wildtyp
α-	Anti- (bei Antikörpern)
λ	Wellenlänge
ΔΨ _m	Mitochondriales Membranpotential

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Energiestoffwechsel und Ultrastruktur von Mitochondrien	4
Abbildung 2: Schema des mitochondrialen Fusions- und Fissionsapparats.....	6
Abbildung 3: Komplexe von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung	8
Abbildung 4: Struktur von MFN2	11
Abbildung 5: Mitochondriale Form nach Ausschaltung der GTPase-Domäne.....	12
Abbildung 6: Rolle von MFN2 während der Mitophagie	17
Abbildung 7: Neurodegeneration im Cerebellum durch MFN2-KO.....	19
Abbildung 8: Charakteristische Hohlfußbildung und Muskelatrophie eines CMT- Patienten	21
Abbildung 9: Schematische Darstellung der häufigsten CMT2A verursachenden Mutationen in MFN2	22
Abbildung 10: Cystein 684 vermittelt die GSSG-induzierte Oligomerisation	24
Abbildung 11: Positive Rückkopplung der mitochondrialen ROS-Erzeugung.....	27
Abbildung 12: Kalziumtransport vom Endoplasmatischen Retikulum in Mitochondrien	33
Abbildung 13: Stabil in MFN2 KO-Zellen transfizierte Plasmide.....	48
Abbildung 14: Screenshot des selbst-programmierten Online-Tools „Tyche“	62
Abbildung 15: Aufbau des Oxygraph 2k (Oroboros Instruments).	64
Abbildung 16: Repräsentative Kurven einer Messung mit dem Oroboros Oxygraph 2k.	69
Abbildung 17: Western Blot und PCR validieren erfolgreiche Generierung stabiler Zelllinien.....	76
Abbildung 18: Vermehrte mitochondriale Fragmentierung in EV-, R94Q- und K109A-Zellen.....	78
Abbildung 19: Mutiertes Mitofusin-2 reagiert mit vermehrter mitochondrialer Fragmentierung auf oxidativen Stress.	79
Abbildung 20: Vermehrter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch MFN2- defizienter Zellen bei reduziertem Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) und gleicher ATP-Konzentration.....	82
Abbildung 21: Gesteigerter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch in Zellen mit mutiertem MFN2 bei mildem oxidativem Stress.	84
Abbildung 22: GSH reduziert in permeabilisierten C684A-Zellen die Zellatmung.	86
Abbildung 23: Wildtyp-MFN2 inhibiert die Zellproliferation und zeigt sich resistent gegen oxidativen Stress.....	88
Abbildung 24: Reduzierter GSH-Gehalt in MFN2-defizienten Zellen und erhöhter ROS-Gehalt in R94Q- und K109A-Zellen.....	89
Abbildung 25: Erhöhter Kalziumgehalt in EV-, C684A- und R94Q-Zellen.	91
Abbildung 26: <i>Store-operated Ca²⁺ entry</i> (SOCE).....	93
Abbildung 27: Reduzierte ATP-Produktion in R94Q-Zellen nach H ₂ O ₂ - Behandlung,	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhibitoren und Entkoppler der Atmungskette	8
Tabelle 2: Mitofusine 1 und 2	9
Tabelle 3: Zelllinien	36
Tabelle 4: Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien und Zusätze	37
Tabelle 5: Bakterien	39
Tabelle 6: Primer	39
Tabelle 7: Plasmide zur Herstellung stabiler Zelllinien	39
Tabelle 8: Plasmide zur transienten Transfektion.....	40
Tabelle 9: Klonierungsvektoren	40
Tabelle 10: Enzyme, Farbstoffe, Marker	40
Tabelle 11: Antikörper	41
Tabelle 12: Kits.....	41
Tabelle 13: Verbrauchsmaterial.....	41
Tabelle 14: Geräte.....	42
Tabelle 15: Datenverarbeitungsprogramme	44
Tabelle 16: Ansatzrezept zur stabilen Transfektion von MEF-Zellen.....	48
Tabelle 17: PCR-Ansatzrezept	50
Tabelle 18: PCR-Ablauf.....	51
Tabelle 19: Zusammensetzung des 1x TAE-Puffers	52
Tabelle 20: Protokoll zur transienten Transfektion von MEF-Zellen	53
Tabelle 21: Zusammensetzung des MEF-Zellkulturmedium	54
Tabelle 22: Antikörper der Immunodetektion.....	60
Tabelle 23: Zusammensetzung des 5x Probenpuffer und 10x PBS-T.....	61
Tabelle 24: Zusammensetzung des MiRO5-Puffers.....	67
Tabelle 25: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung	71

1. Einleitung

Mitochondrien sind wichtige eukaryotische Zellorganellen, die laut Endosymbiontentheorie als ursprüngliche Prokaryonten eine Symbiose mit ursprünglichen Eukaryonten eingegangen sind, wobei beide im Laufe der Zeit ihre Eigenständigkeit verloren haben (O'Malley, 2015). Die wichtigste Funktion von Mitochondrien ist ihre Aufgabe als Hauptproduzent von Adenosintriphosphat (ATP), dem Energieträger der Zellen. Sie werden daher auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet (Javadov and Kuznetsov, 2013). Daneben haben sie regulatorische Einflüsse auf die Apoptose und die Kalziumhomöostase, dienen gemeinsam mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) als wichtigster zellulärer Kalziumspeicher und sind Lokalisation mehrerer Stoffwechselreaktionen wie der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion, des Citratzyklus, der β -Oxidation sowie von Großteilen des Harnstoffzyklus und der Hämbiosynthese (Apostolova and Victor, 2015).

Wegen der Vielzahl an Aufgaben und der Unentbehrlichkeit von Mitochondrien für die ATP-Bereitstellung spielt die mitochondriale Dysfunktion in der Pathophysiologie vieler Krankheiten eine erhebliche Rolle (Westermann, 2010b), bspw. neurodegenerativer Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer, dem Morbus Parkinson, der Chorea Huntington und der Amyotrophen Lateralsklerose (Elfawy and Das, 2019). Auch in der Pathogenese internistischer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit oder der diabetischen Nephropathie spielen Mitochondrien eine Rolle (Chistiakov et al., 2018, Forbes and Thorburn, 2018). Neben diesen gibt es auch Erkrankungen, die aus einer direkten mitochondrialen Störung entstehen, wie z. B. das MELAS-Syndrom (*Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*), dessen Ursache in einer gestörten mitochondrialen ATP-Produktion liegt (El-Hattab et al., 2015).

Mitochondrien sind sehr dynamische Organellen und unterliegen einem ständigen Zyklus aus Fusion und Fragmentierung, wodurch sie in unterschiedlichen Formen von rundlich fragmentiert bis hin zu tubulär vorliegen (Tilokani et al., 2018). Diese ständige dynamische Reorganisation des mitochondrialen Netzwerks hat eine wichtige funktionelle Bedeutung und dient u.a. der Durchmischung mitochondrialer Komponenten und somit einer Komplementation geschädigter Genprodukte (Nunnari et al., 1997). Die Teilung spielt u.a. im Mitochondrientransport entlang langer Axone oder in der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle (Neuspiel et al., 2005). Auch

hat die mitochondriale Form Einfluss auf den Energiemetabolismus der Mitochondrien. All diese Beispiele verdeutlichen die Wichtigkeit der mitochondrialen Dynamik.

Untersuchungsobjekt dieser Arbeit war das mitochondriale Protein Mitofusin 2 (MFN2). MFN2 ist eine GTPase, welche in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, wo es als unentbehrlicher Bestandteil dieser mitochondrialen Dynamik für die mitochondriale Fusion verantwortlich ist (Chen et al., 2003). Im Prozess der mitochondrialen Fusion führen Interaktionen zwischen den hochkonservierten C-terminalen Coiled-Coil-Domänen von MFN2 zweier benachbarter Mitochondrien zur räumlichen Annäherung, während die endgültige Fusion über die GTPase-Domäne von MFN2 vollzogen wird (Santel and Fuller, 2001).

Ein Knockout des MFN2-Gens führt zu embryonaler Letalität (Chen et al., 2003). Die Mutation R94Q verursacht den Morbus Charcot-Marie-Tooth 2A (CMT2A), eine häufige hereditäre periphere Polyneuropathie (Calvo et al., 2009), die Mutation K109A liegt mitten in der GTPase und die Mutation C684A scheint eine Rolle in der Regulation der mitochondrialen Form in Abhängigkeit des oxidativen Milieus zu spielen (Shutt et al., 2012).

Neben der Funktion in der mitochondrialen Dynamik beeinflusst MFN2 zahlreiche weitere mitochondriale und zelluläre Prozesse wie den Kalziumhaushalt, die Apoptose oder die mitochondriale Bioenergetik (Kawalec et al., 2015, Bach et al., 2003) und spielt außerdem in der Pathophysiologie vieler weiterer Erkrankungen eine Rolle (Filadi et al., 2018). Das Protein MFN2 ist also zweifelslos sehr wichtig für die mitochondriale Dynamik und Funktion und somit auch für das zelluläre Überleben (Westermann, 2010a). Ein besseres Verständnis der Rolle und Funktion von MFN2 ist deshalb notwendig und erstrebenswert.

Entsprechend war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von MFN2 auf die mitochondriale Form und Funktion zu untersuchen, um neue Erkenntnisse in den Grundlagen der mitochondrialen Physiologie und Biochemie sowie in der Pathogenese der CMT2A zu gewinnen. Hierfür wurde u. a. der mitochondriale Sauerstoffverbrauch, der Gehalt an ATP, Kalzium, Glutathion und reaktiven Sauerstoffspezies sowie die mitochondriale Form untersucht. Für die Aminosäuren an Position 94, 109 und 684 sind besondere Rollen beschrieben. Entsprechend wurden diese durch Punktmutationen verändert und neben Wildtyp-MFN2 und *Empty Vector* in Knockout-Zellen stabil überexprimiert.

2. Literaturdiskussion

2.1. Mitochondrien

2.1.1. Aufbau und Funktion

Mitochondrien sind der Hauptproduzent von ATP, dem Energieträger in Zellen, und werden daher auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet (Javadov and Kuznetsov, 2013). Durchschnittlich enthält eine eukaryontische Zelle ca. 2.000 Mitochondrien, die je bis zu 2 μm groß sind und insgesamt ca. ein Viertel des Zellvolumens ausmachen (Rassow et al., 2012). Je höher der Energieverbrauch einer Zelle, desto höher ist die Anzahl an Mitochondrien. Zellen mit hohem Energieverbrauch sind bspw. Nerven-, Sinnes- und Muskelzellen. So beträgt der Volumenanteil von Mitochondrien in Herzmuskelzellen bspw. ca. 36 % (Klinke et al., 2005).

Mitochondrien sind Zellorganellen, die laut der Endosymbiontentheorie durch Endosymbiose entstanden sind. Diese Theorie besagt, dass ein urtümlicher Eukaryont mittels Endozytose einen urtümlichen Prokaryonten phagozytiert hat. Diese sind eine Symbiose eingegangen und verloren im Laufe der Zeit ihre Eigenständigkeit (O'Malley, 2015). Letztlich sind daraus die heute bekannten Eukaryonten entstanden. Mehrere mitochondriale Besonderheiten stützen diese These. So vermehren sich Mitochondrien durch Teilung, besitzen für Prokaryonten typische Ribosomen und ein eigenes Genom (mtDNA), welches fast ausschließlich für Proteinuntereinheiten der Atmungskette kodiert (Nass and Nass, 1963). Sonstige mitochondriale Proteine werden im Kerngenom kodiert, im Zytosol synthetisiert und ins Mitochondrium importiert. Außerdem sind Mitochondrien von einer Doppelmembran umgeben, wobei die innere Membran die ursprüngliche Prokaryontenmembran darstellt, während die äußere Membran durch die Endozytose hinzugekommen ist (Rassow et al., 2012). Die innere Mitochondrienmembran unterscheidet sich in ihrer Lipidzusammensetzung von den typischen Eukaryontenmembranen, enthält bspw. das üblicherweise nur in Bakterien vorkommende Cardiolipin (Ikon and Ryan, 2017).

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Überblick über den Mitochondrienaufbau sowie eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums. Die äußere Mitochondrienmembran ist wie eine typische Eukaryontenmembran aufgebaut, zusammengesetzt und glatt strukturiert. Im Gegensatz dazu ist die innere Mitochondrienmembran multipel eingestülpt und stark gefaltet. Dadurch wird die Fläche um ein Vielfaches vergrößert. Diese Einstülpungen werden als Cristae-

Membran bezeichnet und stülpen sich an den sogenannten *Cristae junctions* in die Mitochondrienmatrix ein (Cogliati et al., 2016). Die Enzymkomplexe der Atmungskette sind in jener Cristae-Membran lokalisiert. Mitochondrien von Zellen mit hohem Energiebedarf besitzen einen entsprechend hohen Anteil an Cristae-Membranen (Vogel et al., 2006). Zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran liegt der Intermembranraum. Porine in der äußeren Mitochondrienmembran sind durchlässig für Moleküle bis zu einer Größe von ca. 10 Kilodalton. Diese fehlen in der inneren Mitochondrienmembran, die stattdessen nur für Wasser (H₂O), Sauerstoff (O₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) permeabel ist. Der Stoffaustausch sämtlicher anderer Moleküle wird über viele spezifische Transportsysteme reguliert (Rassow et al., 2012). Die mitochondriale Matrix ist gemeinsam mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ein wichtiger Kalziumspeicher der Zelle. In der mitochondrialen Matrix laufen außerdem die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion, der Citratzyklus, die β -Oxidation sowie Großteile des Harnstoffzyklus und der Hämbiosynthese ab (Ikon and Ryan, 2017). Die wichtigste Funktion von Mitochondrien ist jedoch die Synthese von ATP durch die oxidative Phosphorylierung, dessen Enzymkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind.

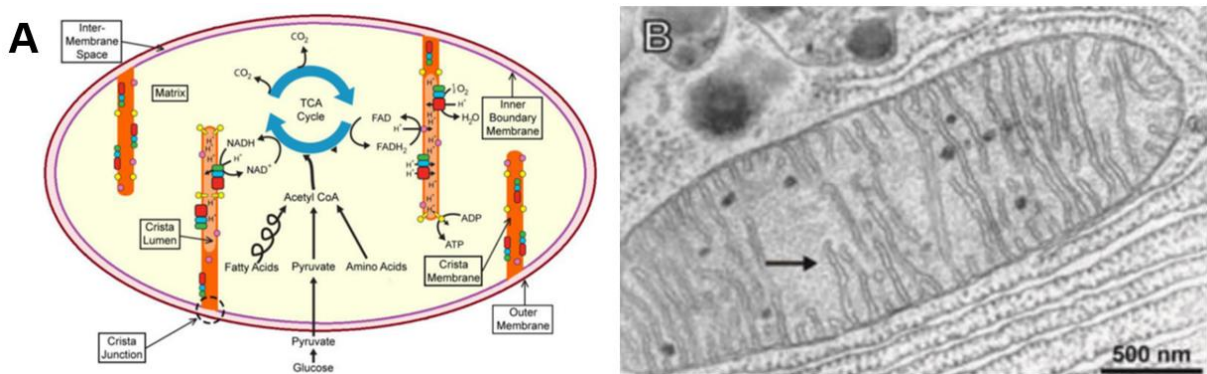


Abbildung 1: Energiestoffwechsel und Ultrastruktur von Mitochondrien, aus (Ikon and Ryan, 2017). **A.** Acetyl-CoA entsteht beim Abbau von Lipiden (β -Oxidation), Glucose (Glykolyse) und Aminosäuren und dient als Substrat des Citratzyklus, in dem die reduzierten NADH+H⁺ und FADH₂ entstehen. Diese wiederum geben die Elektronen an Komplex I und II der Atmungskette ab, wo mehrere Redox-Reaktionen nacheinander ablaufen und mit der freigesetzten Energie ein Protonengradient über der Cristae-Membran aufgebaut wird, der der ATP-Synthase (Komplex V) als treibende Kraft dient. Die Komplexe der Atmungskette sind in der Cristae-Membran lokalisiert, welche sich an den *Cristae Junctions* in die Matrix einstülpt. Der Intermembranraum liegt zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran. Die Komplexe der Atmungskette sind bunt, die ATP-Synthase gelb dargestellt. **B.** In der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Mitochondriums sieht man die eng aneinandergelagerten Cristae-Membranen. Eine ist exemplarisch mit einem Pfeil markiert.

2.1.2. Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind sehr dynamische Organelle, die sich kontinuierlich fusionieren und trennen und daher in verschiedensten Formen, von fragmentiert bis hin zu tubulär, vorliegen. Fusion und Trennung laufen höchstdynamisch ab und sind essenziell für die mitochondriale Biochemie und Physiologie und somit auch für das zelluläre Überleben (Westermann, 2010a).

Die mitochondriale Fusion und Spaltung werden durch viele zelluläre Mechanismen reguliert, z. B. durch Ubiquitinylierung, Phosphorylierung oder proteolytischer Prozessierung. Durch die Fusion zweier Mitochondrien wird der Austausch von Lipiden, Proteinen und mitochondrialer DNA ermöglicht. Die mitochondriale Dynamik wirkt der Zellalterung entgegen, indem sie die Komplementierung von Genprodukten nach Fusion beeinträchtigter Mitochondrien ermöglicht. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der Qualitätskontrolle der Organellen, da sie die Beseitigung beschädigter Mitochondrien durch Autophagie ermöglicht. Darüber hinaus ist die mitochondriale Teilung ein wichtiger Schritt in der Signalkaskade der Apoptose. Funktionsstörungen der mitochondrialen Dynamik tragen zu mehreren hereditären und neurodegenerativen Erkrankungen bei (Westermann, 2010a).

In der Regulation der mitochondrialen Dynamik spielen mehrere Proteine eine wichtige Rolle. Die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran wird durch die GTPasen Mitofusin 1 und 2 (MFN1/2), die der inneren durch das *Optic atrophy protein 1* (Opa1) vermittelt. Die Mitofusine sind entsprechend in der äußeren, Opa1 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Cipolat et al., 2004).

Die Spaltung von Mitochondrien wird durch die Proteine *Dynamamin-related protein 1* (DRP1) aus dem Zytosol und dem *Mitochondrial fission protein 1* (Fis1) reguliert. Pro-apoptotische Stimuli können ein Auslöser der mitochondrialen Spaltung sein und fragmentierte Mitochondrien sind anfälliger für Apoptose (Suen et al., 2008). Ein fragmentiertes Mitochondriennetzwerk ist speziell im Nervengewebe wichtig für den Transport von Mitochondrien an die Axone und Dendriten während des Nervenwachstums (Li et al., 2004).

Umweltfaktoren lösen die Fusion bzw. Spaltung von Mitochondrien aus. Dazu zählen z. B. die bereits erwähnte Apoptose-Frühphase, oxidativer Stress oder DNA-Schädigung (Youle and van der Bliek, 2012). Folgende Abbildung zeigt einen schematischen Überblick über den Proteinapparat der mitochondrialen Dynamik.

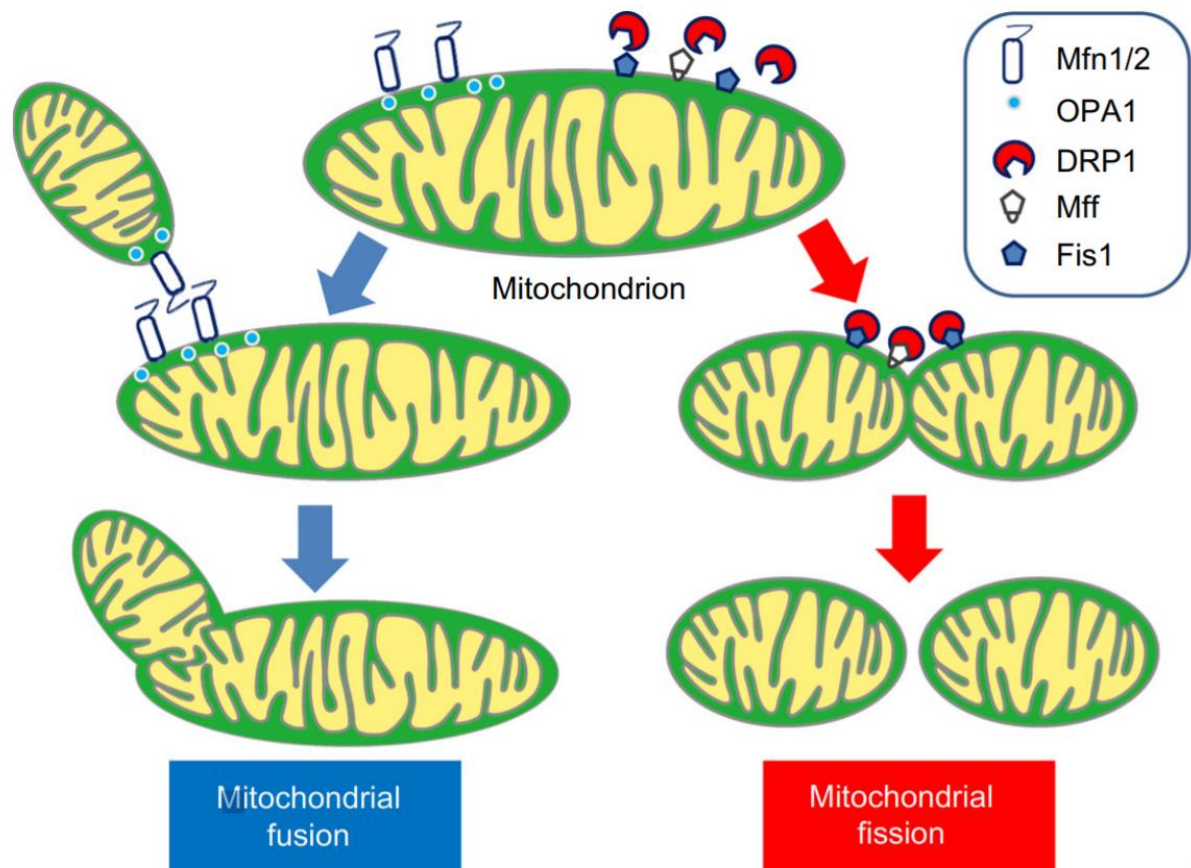


Abbildung 2: Schema des mitochondrialen Fusions- und Fissionsapparats, aus (Saotome et al., 2014). Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase verändern Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen dynamisch ihre Morphologie durch Fusion (links) und Spaltung (rechts). Mitofusin 1 (Mfn1), Mitofusin 2 (Mfn2) und *Optic atrophy protein 1* (OPA1) sind die Hauptregulatoren der mitochondrialen Fusion. Mfn1 und Mfn2 sind in der äußeren Mitochondrienmembran, ihre GTPase dem Zytosol zugewandt, lokalisiert und regulieren die Fusion der äußeren Membran. Demgegenüber koordiniert OPA1 im Intermembranraum die Fusion der inneren Mitochondrienmembran. Für die mitochondriale Spaltung sind hauptsächlich *Dynamamin-related protein-1* (DRP1), *Mitochondrial fission factor* (Mff) und *Fission protein-1* (Fis1) zuständig. DRP1 befindet sich normalerweise im zytosolischen Raum und wird während des Spaltprozesses in die äußere Mitochondrienmembran rekrutiert. Fis1 und Mff befinden sich in der äußeren Mitochondrienmembran und wirken als Adapterprotein für DRP1 (Saotome et al., 2014).

2.1.3. Oxidative Phosphorylierung

ATP ist der wichtigste Energieträger für Zellen und wird zum allergrößten Anteil in den Mitochondrien produziert (Javadov and Kuznetsov, 2013). Die Oxidation der Nahrungsbestandteile liefert Elektronen, die von der Atmungskette genutzt werden, um einen Protonengradienten aufzubauen, welcher wiederum der Antrieb der ATP-Synthase für die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat zu Adenosintriphosphat darstellt (Ackerman and Tzagoloff, 2005, Papa et al., 2012). Daraus erklärt sich der Oberbegriff für alle der an der ATP-Synthese beteiligten Reaktionen, nämlich die oxidative Phosphorylierung, die im Folgenden näher erläutert wird.

Die Funktion der Atmungskette ist die Generierung und Aufrechterhaltung des mitochondrialen Protonengradienten. Sie besteht im Wesentlichen aus den vier großen Proteinkomplexen (I-IV), die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (Larosa and Remacle, 2018). Auch das lipophile Ubichinon in der inneren Mitochondrienmembran und das Protein Cytochrom *c*, welches der inneren Mitochondrienmembran aufgrund seiner Hydrophilie außen anliegt, sind Komponenten der Atmungskette und dienen sozusagen als mobile Substrate des Elektronentransports (Larosa and Remacle, 2018).

Beim Abbau der Hauptnahrungsbestandteile (Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren) fallen Elektronen an, die auf Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen werden. NAD^+ bzw. FAD werden so zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ bzw. FADH_2 reduziert. Die Atmungskettenkomplexe, Cytochrom *c* und Ubichinon können allesamt Elektronen aufnehmen und wieder abgeben, sind also zu Redox-Reaktionen befähigt. $\text{NADH}+\text{H}^+$ gibt die Elektronen an Komplex I, FADH_2 an Komplex II ab. Die Elektronen wandern nun in dieser Elektronentransportkette und durchlaufen eine Redox-Reaktion nach der anderen, wobei das Energieniveau schrittweise sinkt. Die finale Redoxreaktion in diesem System ist die sogenannte Knallgasreaktion. Dabei wird der molekulare Sauerstoff ionisiert und nimmt in einer stark exergonen Reaktion 2 Protonen auf, wobei Wasser entsteht (Rassow et al., 2012). Das ist der Sauerstoff, den wir mit der Atemluft einatmen.

Die freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum zu pumpen, wobei das Innere der inneren Mitochondrienmembran negativ und die Außenseite positiv geladen wird. So entsteht ein Konzentrationsgefälle der Protonen (chemischer pH-Gradient) und ein Spannungsgradient (elektrischer Gradient) vom Intermembranraum in die Matrix. Dieser elektrochemische Gradient, das mitochondriale Membranpotential, treibt die ATP-Synthase (auch Komplex V genannt) zur ATP-Produktion an. Ein erhaltenes mitochondriales Membranpotential ist dementsprechend wichtig für die Funktion von Mitochondrien und kann daher zur Beurteilung des Zustandes von Mitochondrien herangezogen werden (Löffler, 2008).

Bei der Knallgas-Reaktion kann es zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie Hyperoxid oder Wasserstoffperoxid kommen, welche potenziell mutagen sind und die Zelle schädigen können (Kapitel 2.3.1). Abbildung 3 zeigt die Prozesse und das Prinzip der Atmungskette im Überblick.

Bestimmte Chemikalien können einzelne Komplexe der Atmungskette inhibieren und wirken bei entsprechender Dosierung toxisch. Tabelle 1 beinhaltet die Namen der Komplexe sowie deren Inhibitoren, von denen einige auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

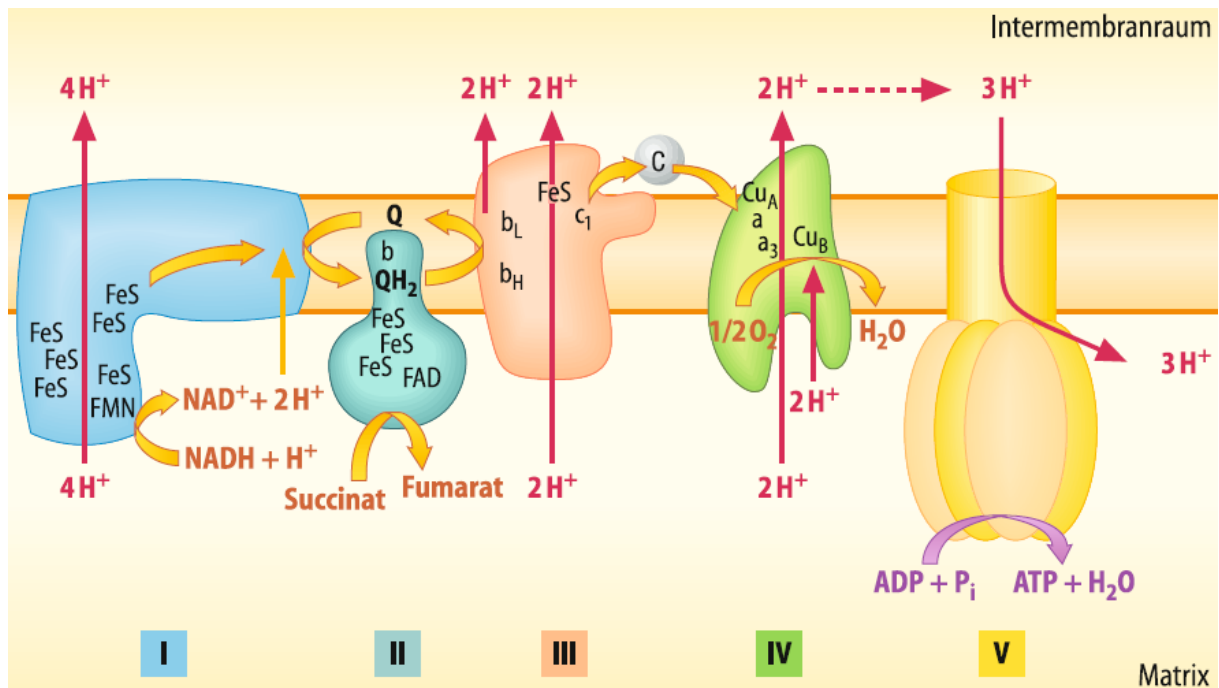


Abbildung 3: Komplexe von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung, aus (Löffler, 2008). Aus dem Nährstoffabbau entstehen die Reduktionsmittel $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 , welche ihre Elektronen an Komplex I respektive Komplex II der Atmungskette abgeben. Coenzym Q und Cytochrom c dienen als mobile Substrate und übertragen die Elektronen zwischen den Komplexen. Die schrittweise freiwerdende Energie der Redox-Reaktionen wird genutzt, um einen Protonengradienten aufzubauen, welcher der ATP-Synthase, auch Komplex V genannt, zum Antrieb für die ATP-Synthese aus ADP und Phosphat dient.

Tabelle 1: Inhibitoren und Entkoppler der Atmungskette

Komplex	Inhibitor
NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (I)	Rotenon (Li et al., 2003)
Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (II)	Malonat (Belyaeva, 2018)
Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase (III)	Antimycin A (Calvayrac and Butow, 1971)
Cytochrom c- O_2 -Oxidoreduktase (IV)	Cyanid (Yuan et al., 2017)
ATP-Synthase (V)	Oligomycin (Hong and Pedersen, 2008)

Neben diesen Inhibitoren kann das Ionophor Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) genutzt werden, um die Atmungskette zu entkoppeln, indem Poren in der inneren Mitochondrienmembran gebildet werden (To et al., 2010).

2.2. Mitofusin 2

2.2.1. Struktur und Rolle in der mitochondrialen Fusion

Die Familie der Mitofusine besteht aus zwei Proteinen, MFN1 und MFN2. Es handelt sich um GTPasen, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. 1997 wurden diese in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten GTPasen erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als „Fuzzy onions“ (Fzo-Gen) beschrieben (Hales and Fuller, 1997). MFN1 und MFN2 der Säugetiere sind mit einer Übereinstimmung von 80% sehr ähnliche Proteine (Filadi et al., 2018). Grundinformationen beider Mitofusine sind in Tabelle 2 zusammengestellt. In dieser Arbeit haben wir uns auf MFN2 konzentriert. Experimente wurden an Zellen durchgeführt, welche Wildtyp (WT)-, mutiertes bzw. kein MFN2 exprimieren (für Details s. Kap 3.1).

Tabelle 2: Mitofusine 1 und 2

	MFN1	MFN2
Genlokalisierung	3q26.33	1p36.22
Basen	47.245	33.335
Aminosäuren	741	757
Molekulargewicht	84.160 Dalton	86.402 Dalton
	(GeneCards human gene database, 2019a)	(GeneCards human gene database, 2019b)

N-Terminal ist MFN2 mit einer großen, zytosolisch gelegenen GTPase-Region (Aminosäuren 103-309) ausgestattet. Wie für GTPasen typisch, besitzt diese Region 5 Subsequenzen (GTPase-Region 1-5, G1-5) mit spezifischen Funktionen. G1, G2 u. G3 bilden zusammen das katalytische Zentrum. Während G1 das Phosphat des Guanosintriphosphats (GTP) bindet, ist G3 die Bindungsstelle für Magnesiumionen (Mg^{2+}). G4 und G5 enthalten die zur GTP-Bindung benötigte Struktur (Bourne et al., 1990, Bourne et al., 1991, Chandhok et al., 2018). Nach der GTPase folgt die erste Sequenz im Heptadenmuster (*heptad-repeat*, HR1). Dabei handelt es sich um eine Sequenz, bei der die Aminosäuren an erster und vierter Position einer sieben Aminosäuren umfassenden Sequenz hydrophob sind. Diese HR sind Bestandteile von sogenannten Doppelwendel-Regionen (*coiled-coil domain*) eines Proteins. Dabei dienen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäuren des HR zur Stabilisierung der Coiled-Coil-Region. Die erste *Coiled-Coil*

heptad repeats Region in MFN2 (HR1) findet sich von der Aminosäure 366 bis zur Aminosäure 422. Es folgt eine Transmembrandomäne (Aminosäure 628-647). Die HR2 beginnt an Position 693 und endet bei Aminosäure 747. Das C-terminale Ende von MFN2 liegt entsprechend im mitochondrialen Intermembranraum. Abbildung 4 gibt einen guten Überblick über die Struktur von MFN2 (Mattie et al., 2018).

Mitofusine sind fundamental für die Gruppierung bzw. räumliche Ansammlung von Mitochondrien und Fusion der äußeren Mitochondrienmembran und tragen somit erheblich zur mitochondrialen Dynamik bei (Cao et al., 2017, Rojo et al., 2002). Daher führt das Fehlen von MFN2 zu einer erheblichen Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes (Chen et al., 2003), die Überexpression entsprechend zu perinukleären Häufung über eine C-terminale *Coiled-Coil*-Domäne und mitochondrialer Fusion über die N-terminale GTPase-Domäne (Santel and Fuller, 2001).

Zusammen mit dem Protein Opa1 regulieren die Mitofusine die Ansammlung und Fusion von Mitochondrien (Burte et al., 2015, Chen et al., 2003). Abbildung 2 zeigt die an Fusion und Spaltung beteiligten Proteine im Überblick.

Der genaue Fusionsmechanismus ist bis heute ungeklärt. Sehr sicher ist jedoch, dass die Interaktion vor der eigentlichen Fusion auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäuren der zwei 95 Ångström (entspricht $95 \cdot 10^{-10}$ m) langen *Coiled-Coil*-Domänen der HR2-Region basiert (Koshiba et al., 2004). Nach Ausschaltung der GTPase-Region aggregierten die Mitochondrien zwar nach wie vor über die HR2-Interaktionen, jedoch kommt es nicht zur endgültigen Fusion (s. Abbildung 5). Dies bekräftigt die Vermutung, dass für die räumliche Annäherung und die endgültige Fusion verschiedene Domänen der Mitofusine zuständig sind. Schlussendlich sorgt die HR2-Interaktion zwischen zwei Mitochondrien für die Aggregation, die GTPase ist für die endgültige Fusion unentbehrlich (Koshiba et al., 2004).

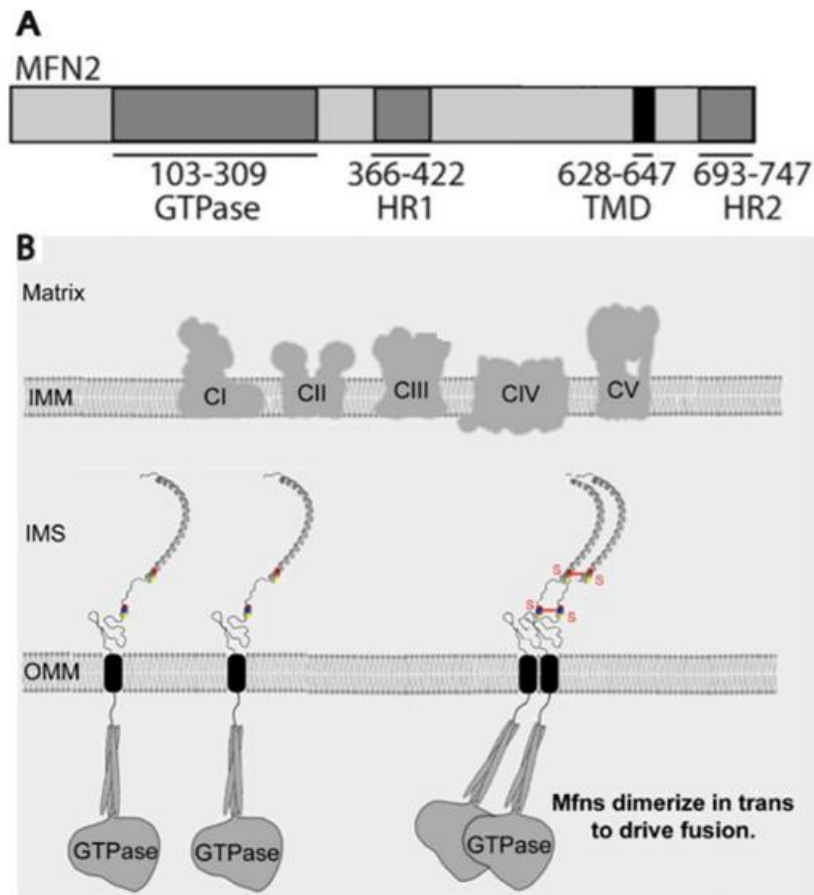


Abbildung 4: Struktur von MFN2 , modifiziert nach (Mattie et al., 2018). **A.** Die Zahlen beziffern die erste und letzte Aminosäure einer Region. Diese lineare Darstellung der Struktur von MFN2 zeigt die verschiedenen Domänen des Proteins beginnend vom N-Terminus: GTPase, HR1-Domäne, Transmembrandomäne (TMD), HR2-Domäne. **B.** Man sieht die GTPase und die Transmembrandomäne. Die Helices im Intermembranraum (IMS, *intermembrane space*) stellen die Heptadenmuster-Domänen (HR2) zur Bildung der intermolekularen Interaktion, evtl. durch Disulfidbrückenbildung, dar. Das Schema zeigt den Ablauf der Fusion der äußeren Mitochondrienmembran (*outer mitochondrial membrane*, OMM). Die Annäherung wird durch HR2-HR2-Interaktion, die endgültige Fusion zweier Mitochondrien durch die GTPase-Region vollzogen.

Folgende Abbildung verdeutlicht ebenfalls die Wichtigkeit der GTPase-Domäne für die eigentliche Fusion, in diesem Falle des Homologs MFN1. Die mitochondriale Aggregation ist bei erhaltener HR2-Region trotz fehlender GTPase nicht beeinträchtigt, wohingegen die Fusion ausgefallen ist.

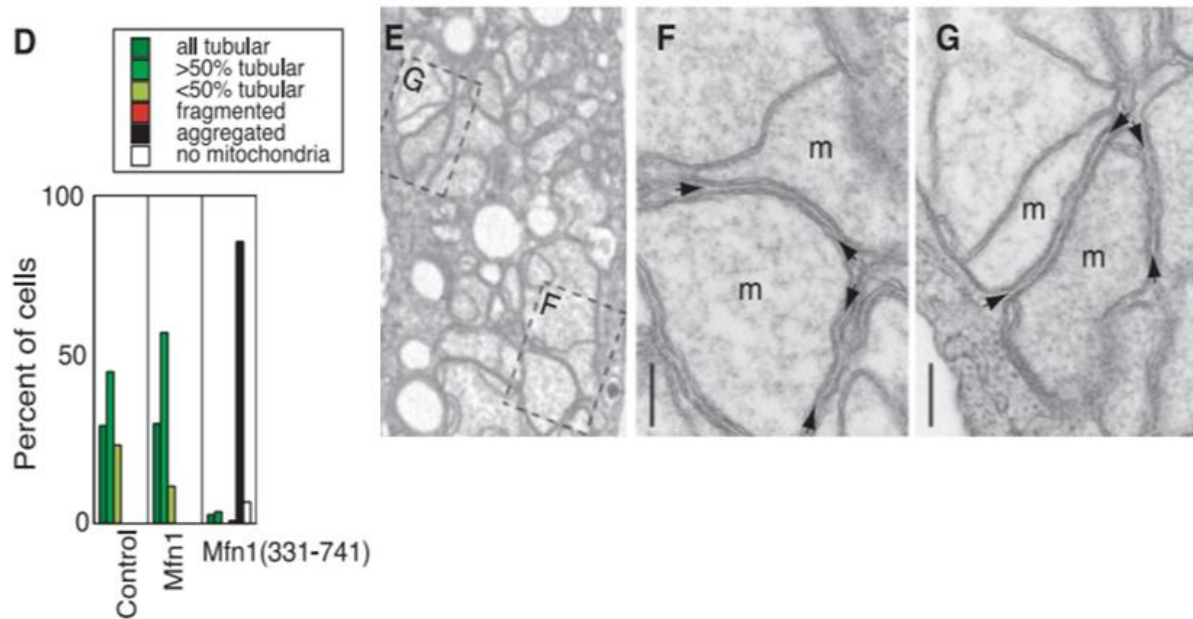


Abbildung 5: Mitochondriale Form nach Ausschaltung der GTPase-Domäne , modifiziert nach (Koshiba et al., 2004). D. NIH 3T3 Zellen wurden mit einem Retrovirus infiziert, welcher gekürztes WT-MFN1 (Aminosäuren 331 bis 741 verbleiben, GTPase wird nicht exprimiert) exprimiert. Trotz intakter HR2-Region ist die mitochondriale Fusion bei WT-MFN1 ohne GTPase erheblich eingeschränkt. Mitochondrien aggregieren lediglich (schwarzer Balken), vermittelt durch die intakte HR2-Domäne, können bei fehlender GTPase aber nicht fusionieren. Dies bestätigt die Annahme, dass verschiedene Regionen der Mitofusine für Annäherung (HR2) und für die eigentliche Fusion (GTPase) verantwortlich sind. E, F, G. Elektronenmikroskopische Aufnahme der mitochondrialen Bindung bei gekürztem MFN1. Die Pfeilspitzen liegen zwischen Doppelmembranen benachbarter Mitochondrien (m). Maßstab Balken für E 1 µm, für F u. G 0,2 µm.

Jahrelang ging man davon aus, dass MFN2 U-förmig mit nur einer Aminosäure im Intermembranraum, die zwei Transmembrandomänen voneinander trennt, die äußere Mitochondrienmembran durchspannt, somit also sowohl mit dem N- als auch C-terminalen Ende im Zytosol liegt. Interessante Studien vermuteten passend zu dieser Topologie, dass MFN2 wohl in zwei verschiedenen Konformationen vorläge. Im Ruhezustand (in der Originalpublikation als *resting or tethering non-permissive state* bezeichnet) läge eine intramolekulare antiparallele Wechselwirkung zwischen HR1- und HR2-Region eines MFN2-Moleküls vor. Die zur Annäherung zweier Mitochondrien benötigte HR2-Region sei in diesem Zustand somit durch eine intramolekulare Interaktion blockiert, wodurch keine Aggregation mit anschließender Fusion möglich sei. Eine Fusion zweier Mitochondrien bliebe entsprechend aus. Eine Destabilisierung dieser intramolekularen HR1-HR2-Interaktion überführe MFN2 in den aktivierten Zustand (in der Originalpublikation als *tethering-permissive state* bezeichnet) und ermögliche die freie Entfaltung der HR2-Domäne in das Zytosol und folglich das Eingehen einer Interaktion mit einer HR2-Domäne eines MFN2-Moleküls eines anderen Mitochondriums mit folgender Annäherung und GTPase-abhängiger Fusion

(Franco et al., 2016). In Anbetracht aktueller Publikationen (Mattie et al., 2018), die die bereits beschriebene Topologie von MFN2 offenbaren (Abbildung 4) ist mehr als fraglich, ob diese Überlegungen zum Prozess der mitochondrialen Fusion noch dem aktuellen Stand der Wissenschaft entsprechen. Umso spannender ist es, die Auswirkungen der C684A-Mutation, welche unmittelbar vor der HR2-Domäne und somit nach aktueller Topologie im Intermembranraum, nach alter Topologie jedoch im Zytosol, liegt, auf die mitochondriale Form und Funktion zu untersuchen.

Trotz der starken strukturellen Ähnlichkeit unterscheidet sich die physiologische Rolle der beiden Mitofusine geringfügig voneinander. So wurde gezeigt, dass MFN1 im Vergleich zu MFN2 eine höhere GTPase-Aktivität aufweist (Ishihara et al., 2004). Spannenderweise ist es möglich, durch Überexpression von MFN2 in MFN1-Knockout (KO)-Zellen bzw. Überexpression von MFN1 in MFN2-KO-Zellen das komplette Fehlen des Partnerproteins zu kompensieren und die mitochondriale Form zu normalisieren (Chen et al., 2003).

Während die Funktion von MFN1 in der mitochondrialen Fusion liegt (Cipolat et al., 2004), spielt MFN2 neben der unbestritten wichtigen Rolle in der Regulation der mitochondrialen Form auch in vielen weiteren mitochondrialen und zellulären Prozessen eine Rolle.

2.2.2. MFN2 und mitochondriale Bioenergetik

Neben seiner eindeutigen Bedeutung für die mitochondriale Fusion hat MFN2 auch einen Einfluss auf Regulation der Bioenergetik von Mitochondrien, u. a. also auf das Membranpotential, die ATP-Synthese und den Sauerstoffverbrauch. So wurde einerseits gezeigt, dass eine Herunterregulierung des MFN2-Gens mittels Antisense-Oligonukleotiden zu einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential mit einer reduzierten zellulären Atmung sowie Glucose-Oxidation und zu einem reduzierten Protonenleck führt (Bach et al., 2003). Bach et al. sahen in diesen Ergebnissen auch Hinweise für eine Rolle von MFN2 in der Pathogenese der Adipositas. Auch wurde in einer aktuelleren Studie gezeigt, dass MFN2 für die Herstellung von Coenzym Q, welches wie in Kap. 2.1.3. bereits erwähnt ein Bestandteil der Atmungskette ist, benötigt wird (Mourier et al., 2015). Die Zugabe von Coenzym Q zu MFN2-defizienten Zellen erhöht wiederum die reduzierte mitochondriale Atmung teilweise und steigert die mitochondriale Fusion (Mourier et al., 2015).

Andererseits wiederum wurde beschrieben, dass *MFN2-Knockout* in MEF-Zellen zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch in Mitochondrien bei gleichbleibendem zellulärem ATP-Gehalt führte. Kawalec et al. führte dies auf eine ineffizientere oxidative Phosphorylierung bei veränderter Zusammensetzung der ATP-Synthase in MFN2-defizienten Zellen zurück. Zur Aufrechterhaltung einer suffizienten ATP-Synthese müsse die ineffektive Atmungskette durch erhöhten Umsatz, welcher sich in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch zeigt, kompensiert werden. Zusätzlich beobachtete man eine erhöhte Laktat-Synthese, was auf eine erhöhte anaerobe Glykolyse als weiterer Kompensationsmechanismus des zellulären Metabolismus zurückzuführen ist (Kawalec et al., 2015).

Insgesamt verdeutlichen diese widersprüchlichen Forschungsergebnisse, dass MFN2 eine noch ungeklärte Rolle in der mitochondrialen Bioenergetik zu spielen scheint.

2.2.3. Interaktion zwischen Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum

MFN2 ist auch ein Schlüsselprotein für sogenannte Mitochondrien-ER-Kontaktstellen (MERCs), die auch als *Mitochondria-associated membranes* (MAMs) bezeichnet werden und als Hotspots für Wechselwirkungen zwischen ER und Mitochondrien und als wichtige Knotenpunkte für Signalwege fungieren. So wurde gezeigt, dass sich MFN2 neben seiner Lokalisation in der äußeren Mitochondrienmembran auch in der Membran des ER in diesen MAMs findet (de Brito and Scorrano, 2008, de Brito and Scorrano, 2009, Giorgi et al., 2015).

Es wird vermutet, dass das MFN2 des ER hierbei die Bindung von Mitochondrien und ER über homo- bzw. heterotypische Interaktionen mit mitochondrialem MFN2 bzw. MFN1 vermittelt (de Brito and Scorrano, 2008). Laut dieser Theorie führt das Fehlen von MFN2 zu einem verminderten Kontakt zwischen Mitochondrium und ER mit verringerter Aktivierung von Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren und somit zu einer verringerten Kalzium-Übertragung von ER auf Mitochondrium (de Brito and Scorrano, 2008).

Neuere Studien stellen diesen ehemals weitverbreiteten und vorherrschenden Konsens immer mehr in Frage. Durch die Verwendung aufwendiger elektronenmikroskopischer Techniken konnte festgestellt werden, dass der Kontakt zwischen äußerer Mitochondrienmembran und ER in MFN2-KO-Zellen nicht reduziert, sondern sogar erhöht ist (Cosson et al., 2012), was dem Gegenteil des bisherigen

Konsenses entspricht. Filadi et al. konnten diese neuen Erkenntnisse mittels vieler weiterer Methoden reproduzieren und es wurde der Schluss gezogen, dass MFN2 die Nähe zwischen Mitochondrium und ER eher antagonisiert und so einen übermäßigen und potenziell toxischen Kontakt verhindert (Filadi et al., 2015).

Es scheint demnach sicher zu sein, dass MFN2 eine Rolle in der Interaktion von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum, in welche Richtung auch immer, zu spielen scheint.

Mehrere Studien deuteten außerdem auf eine Rolle von MAMs bei der Formation von Autophagosomen hin (Hailey et al., 2010, Hamasaki et al., 2013, Sugiura et al., 2013, Filadi et al., 2017).

Die Rolle von MFN2 bei der räumlichen Interaktion zwischen Mitochondrien und ER legt natürlich nahe, dass Mitochondrien und ER auch funktionell eng gekoppelt sind und MFN2 auch hierbei einen Einfluss hat.

Wichtige Funktionen des ER sind die Synthese von Cholesterin und Lipidbestandteilen von Membranen, es ist gemeinsam mit den Mitochondrien der wichtigste intrazelluläre Kalziumspeicher und reguliert den Kalziumhaushalt und Proteinsynthese inkl. posttranslationaler Proteinfaltung (Berridge et al., 2003, Grolach et al., 2006, Park and Blackstone, 2010, Penno et al., 2013). Die Proteinfaltung kann z. B. durch Ungleichgewicht im Kalziumhaushalt oder oxidativen Stress eingeschränkt sein und zu einer Akkumulation ungefalteter Proteine im ER kommen. Als Reaktion auf diese Ansammlung von ungefalteten Proteinen besitzt die Zelle einen komplexen Mechanismus als Stressreaktion, genannt *unfolded protein response* (UPR). IRE1 (*Inositol-requiring protein 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und PERK (*Protein Kinase RNA PKR-like ER Kinase*) detektieren ungefaltete Proteine, werden aktiviert und führen zur ER-Expansion, zum Translations-Stopp und fördern die Chaperon-Synthese (van Vliet and Agostinis, 2018). ATP-Produktion, Membranpotential und Kalziumaufnahme von Mitochondrien nach Behandlung mit Tunicamycin, welches UPR induziert, waren erhöht (Bravo et al., 2011). Daraus lässt sich schließen, dass bei ER-Stress der erhöhte Energiebedarf im ER durch eine Hochregulierung des mitochondrialen Stoffwechsels gedeckt wird. Sollte der ER-Stress nicht mehr reversibel sein kommt es dann häufig zum Mitochondrien-vermittelten Zelltod (Senft and Ronai, 2015). In zwei Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von MFN2 in MEF-Zellen zu erhöhtem ER-Stress, verzögerter Wiederaufnahme der Translation sowie Induktion der UPR-Signaltransduktion führt. Umgekehrt führt ER-Stress zu einer Hochregulierung der MFN2-Expression. Unter normalen Bedingungen

fürhte das Ausschalten von MFN2 zu erhöhtem mitochondrialem Kalziumgehalt, erhöhter ROS-Produktion und geschwollenen Mitochondrien. Einige dieser Effekte konnten durch Ausschalten von PERK rückgängig gemacht werden, woraus der Rückschluss gezogen werden kann, dass MFN2 in der Signalkaskade oberhalb von PERK liegt und unter basalen Bedingungen einen inhibierenden Einfluss auf PERK ausübt. Bei ER-Stress wird die Inhibierung aufgehoben und die UPR inkl. PERK aktiviert (Munoz et al., 2013, Ngoh et al., 2012).

Wechselwirkungen zwischen MFN2 und den Hauptmotorproteinen Miro und Milton62 vermitteln den Transport von Mitochondrien entlang von Mikrotubuli. Ohne MFN2 ist der Transport von Mitochondrien an das axonale Nervenende beeinträchtigt. Dieser Effekt ist auf MFN2 und nicht etwa generell auf die vermehrte mitochondriale Fragmentierung zurückzuführen, da in OPA1-KO-Zellen dieser Defekt nicht gesehen wurde (Misko et al., 2010).

2.2.4. Rolle im Kalziumhaushalt

Über MAMs stehen Mitochondrien und ER in engem Kontakt, welcher für Austausch und Regulierung des Kalziumhaushalts unabdingbar ist (Rizzuto et al., 1993, Rizzuto et al., 1998). Ob MFN2 hierbei einen stimulierenden (de Brito and Scorrano, 2008) oder hemmenden Einfluss (Cosson et al., 2012) auf die MAM-Formation hat, ist noch nicht sicher. In MFN2-KO-Zellen wurde eine Reduktion des mitochondrialen Kalziums beschrieben, was auf einen verminderten Kontakt zwischen ER und Mitochondrien zurückgeführt wurde (de Brito and Scorrano, 2008). Filiadi et al. gehen jedoch von einem hemmenden Effekt von MFN2 auf die Bildung von MAM zur Verhinderung einer toxischen mitochondrialen Kalziumüberladung aus und erklärten erniedrigte mitochondriale Kalziumwerte in MFN2-KO-Zellen mit einer verminderten Expression des *Mitochondrial Calcium uniporter (MCU)* (Filiadi et al., 2015).

Darüber hinaus zeigte sich nach akuter Ausschaltung von Mfn2, die somit die MCU-Expression nicht beeinflusst, einer Erhöhung der mitochondrialen Kalziumaufnahme (Filiadi et al., 2015).

2.2.5. Mitophagie, Zellzyklus, Apoptose, Onkologie

Beschädigte oder gealterte Mitochondrien werden durch den Prozess der sogenannten Mitophagie gezielt abgebaut. Dabei spielen das Protein PTEN-induced

kinase 1 (PINK1) und die Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin E3 eine Schlüsselrolle. Während ersteres an bspw. durch FCCP depolarisierten Mitochondrien an der äußeren Mitochondrienmembran akkumuliert, ubiquitinyliert Parkin abzubauen Proteine. Beide Vorgänge sind miteinander verknüpft und führen letztlich zum Abbau von MFN2 mit folgender mitochondrialer Fragmentierung und Abbau von Mitochondrien (Gegg et al., 2010). Parkin bindet hierbei an von PINK1 phosphoryliertes MFN2 (Chen and Dorn, 2013) und löst eine nachgeschaltete Signalkaskade aus (s. Abbildung 6).

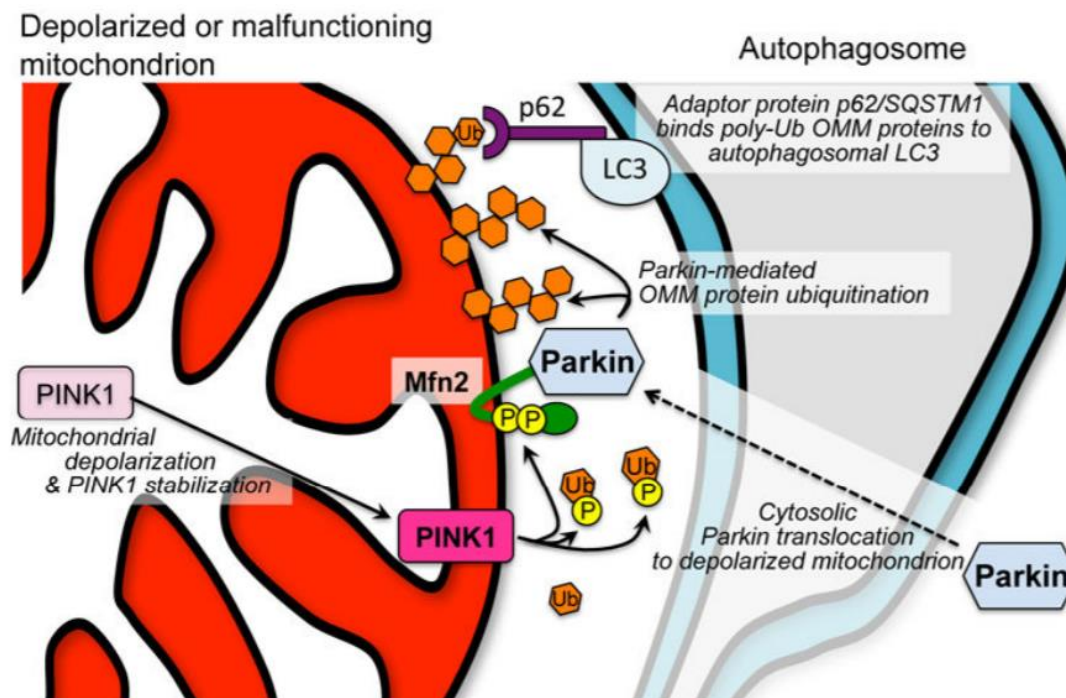


Abbildung 6: Rolle von MFN2 während der Mitophagie, aus (Shirihai et al., 2015). Bei mitochondrialer Depolarisation oder anderen Schäden akkumuliert PINK1 in der äußeren Mitochondrienmembran und phosphoryliert MFN2 und Ubiquitin (Ub). Parkin wird rekrutiert und polyubiquitinyliert Proteine der äußeren Mitochondrienmembran, welche wiederum p62 binden. P62 ist mit LC3 eines Autophagosoms verknüpft und die Mitophagie wird initiiert.

Nicht nur bei der Mitophagie, auch in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose scheint MFN2 beteiligt zu sein. Über Bindung und Inhibierung des Proto-Onkogens Ras, und somit Herunterregulierung der nachgeschalteten Ras-Raf-ERK1/2-Signalkaskade, reguliert MFN2 die Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen und hat einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation (Chen et al., 2004, de Brito and Scorrano, 2009).

Bzgl. der Rolle während der Apoptose wurde einerseits gezeigt, dass MFN2 die Aktivität des pro-apoptischen Proteins Bax, sowie die folgende Cytochrom c-Freisetzung hemmt und somit anti-apoptotisch wirkt (Neuspiel et al., 2005). Ebenso wurde beschrieben, dass die stressinduzierte Phosphorylierung und der

anschließende Abbau von MFN2 durch c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) zur mitochondrialen Fragmentierung und Apoptose führt, was letztlich einem pro-apoptischen Effekt nach MFN2-Abbau entspricht (Leboucher et al., 2012).

In mehreren Karzinomtypen wurde ein niedriger MFN2-Gehalt mit fragmentiertem mitochondrialem Netzwerk, meist einhergehend mit einer Umstellung der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung hin zur Glykolyse (Warburg-Effekt), nachgewiesen werden. Dazu zählen u.a. das Lungenkarzinom (Rehman et al., 2012), das hepatozelluläre Karzinom (Wang et al., 2012) und das kolorektale Karzinom (Cheng et al., 2013). Im Mammakarzinom konnte eine aus der Verminderung von MFN2 resultierende vermehrte Aktivität des pro-proliferativen mTORC2/Akt-Signalweges festgestellt werden. MFN2-Überexpression wiederum hemmt diesen Signalweg und daher das Tumorwachstum (Xu et al., 2017).

2.2.6. MFN2 in der Pathophysiologie von Neurodegeneration

Wenn man sich die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene Relevanz von MFN2 für die Morphologie von Mitochondrien und die Zellphysiologie vor Augen führt, liegt es nahe, dass Dysfunktionen von MFN2 in der Pathophysiologie verschiedenster Krankheiten eine Rolle spielt. Unter allen verschiedenen Zelltypen reagieren speziell Neurone sehr sensibel auf MFN2-Abnormalitäten, weil sie auf funktionierende Mitochondrien im gesamten Neuron, egal ob Dendrit oder synaptische Nervenendigung, zur adäquaten ATP-Produktion und als Kalziumpuffer angewiesen sind (Celsi et al., 2009). Neurodegenerative Erkrankungen sind durch den progredienten Verlust von Neuronen gekennzeichnet und führen zu multiplen neurologischen Manifestationen wie Beeinträchtigung von Motorik, Sensibilität, Kognition, Emotion und vieles mehr. Als wichtigste Gründe und Risikofaktoren gelten v.a. das Alter, Toxine und genetische Mutationen.

Beim Morbus Alzheimer handelt es sich um die häufigste Demenzform. Im Frontalkortex und Hippocampus postmortaler Alzheimer-Patienten sind verminderte Level am Protein MFN2 sowie dessen mRNA festgestellt worden (Manczak et al., 2011, Wang et al., 2009). In Korea wurde eine Korrelation zwischen einem MFN2-Einzelnukleotidpolymorphismus (rs1042837) und dem Alzheimer-Erkrankungsrisiko entdeckt (Kim et al., 2017). Physiologisch erhöht Presenilin-2, dessen Mutation zur familiären Form der Alzheimer-Erkrankung führt, den Kontakt zwischen ER und Mitochondrium (Zampese et al., 2011) durch Bindung und daraus folgender

Antagonisierung von MFN2 (Filadi et al., 2016). Die Herunterregulierung der MFN2-Wirkung führt zu einer verminderten Reifung und Aktivität der γ -Sekretase mit resultierender verminderter Produktion von A β -Plaques (Leal et al., 2016), denen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer nachgesagt wird.

Auch beim Morbus Parkinson scheint MFN2 in der Pathophysiologie eine Rolle zu spielen. Es ist unentbehrlich zur Aufrechterhaltung axonaler Projektionen dopaminerger Neurone im Mittelhirn. Die Translokation von Parkin an die äußere Mitochondrienmembran ist in dopaminergen MFN2-KO-Neuronen gestört, was zur Akkumulation abnormer Mitochondrien führt (Celardo et al., 2016). Dies wiederum beeinträchtigt wahrscheinlich die Zellphysiologie und führt zum darauf resultierenden Zelltod.

Das Ausschalten sowohl des *MFN1*- als auch des *MFN2*-Gens führt zu erhöhter embryonaler Letalität (Chen et al., 2003). Die folgende Abbildung verdeutlicht die Wichtigkeit von intaktem MFN2 zur Vermeidung der Neurodegeneration im Cerebellum von Mäusen (Chen et al., 2007).

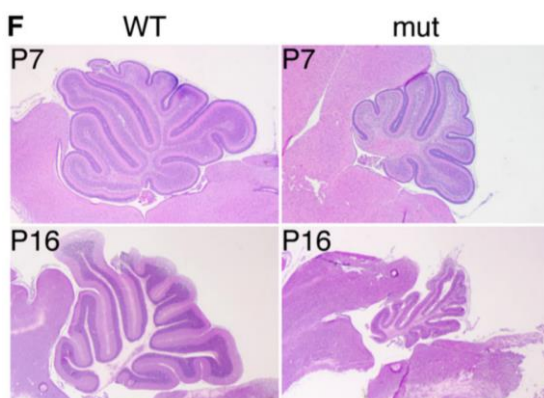


Abbildung 7: Neurodegeneration im Cerebellum durch MFN2-KO , aus (Chen et al., 2007). Hämatoxylin-Eosin-Kleinhirnpräparate von WT-Mäusen (links) bzw. MFN2-defizienten Mäusen (rechts, MFN2 ausgeschaltet mittels Cre/loxP-System). Man sieht deutlich die zerebellare Neurodegeneration im Laufe der Zeit in MFN2-defizienten Mäusen.

In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass Mutationen von MFN2 den Morbus Charcot-Marie-Tooth verursachen können (Calvo et al., 2009, Feely et al., 2011). In Kapitel 2.2.7 ist diese Thematik ausführlich erläutert.

Nicht nur im Bereich der Neurodegeneration spielt MFN2 eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von MFN2 die Insulinresistenz erhöht und dadurch auch Bedeutung für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ II haben könnte (Sebastian et al., 2012). Bei Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II zeigten sich eine verminderte MFN2-Expression (Bach et al., 2005, Bach et al., 2003). Im Herzen kommt es bei MFN1/2-Deletion zur Kardiomyopathie (Chen et al., 2011).

MFN2 hat auch Einfluss auf die Tumorentstehung. Details hierzu sind im Kapitel zum Thema MFN2 und Apoptose geschildert (Kapitel 2.2.5).

2.2.7. R94Q-Mutation verursacht den Morbus Charcot-Marie-Tooth

2A

Der Morbus Charcot-Marie-Tooth (CMT) ist mit einer Prävalenz von 1:2500 die häufigste hereditäre Polyneuropathie (Skre, 1974). Klinisch zeigt sich eine distal beginnende symmetrische sensomotorische Polyneuropathie mit Atrophie der Wadenmuskulatur („Storchenbeine“) und Hohlfußbildung (Abbildung 8). Die Symptome setzen meist im Kindesalter ein, wobei initial i.d.R. die Peronealmuskulatur atrophiert, gefolgt von der Ausbreitung über den ganzen Unterschenkel mit Entstehung des sogenannten Steppergangs. Es folgen weitere Muskeln v.a. der unteren Extremität (Charcot and Marie, 1886, Tooth, 1886). Sensible Defizite sowie motorische Symptome der oberen Extremität treten im fortgeschrittenen Stadium auf. Der Verlauf der Erkrankung ist meist sehr langsam und verläuft über Jahrzehnte hinweg. Eine Therapie ist nicht möglich. Neurophysiologisch kann die CMT-Erkrankung in eine demyelinisierende (Typ I, III, IV) und eine axonale (Typ II) Form unterteilt werden. Der demyelinisierende Typ zeigt in der Elektroneurographie eine Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit, Typ II hingegen eine Amplitudenabnahme bei unbeeinträchtigter Nervenleitgeschwindigkeit (Banchs et al., 2009). Neben der neurophysiologischen Einteilung wird die CMT-Erkrankung auch nach Erbgang eingeteilt. Typ I wird vorwiegend autosomal-dominant, Typ IV autosomal-rezessiv vererbt. Typ II und III können sowohl autosomal-dominant als auch rezessiv vererbt werden (Banchs et al., 2009).

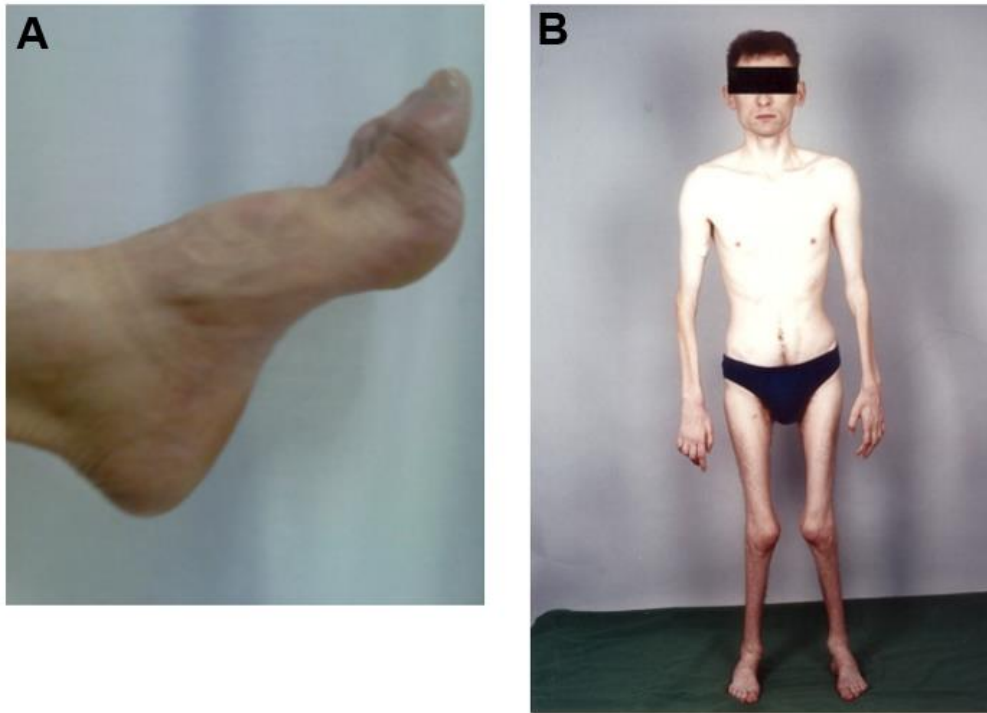


Abbildung 8: Charakteristische Hohlfußbildung und Muskelatrophie eines CMT-Patienten , aus (Banchs et al., 2009) und (Kabzinska et al., 2006). A. Hier sieht man den charakteristischen Hohlfuß, der im Verlauf der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung entsteht. **B.** Eine Atrophie der Muskulatur der unteren Extremität verursacht die sogenannten Storchbeine.

Mutationen im Protein MFN2 verursachen den axonalen Subtyp CMT2A, der autosomal-dominant vererbt wird und dessen Symptome i. d. R. früher und gravierender auftreten (Feely et al., 2011). So wurde bereits von einigen Wissenschaftlern empfohlen, die Testung auf Mutationen in MFN2 als Erstliniendiagnostik im axonalen Subtypen unabhängig von Erbgang und Schwere der Symptomatik durchzuführen (Calvo et al., 2009, Feely et al., 2011). Wie auch in weiteren Studien beschrieben wurde (Kijima et al., 2005), liegen die meisten dieser Mutationen entweder in der GTPase- oder Coiled-Coil-Domäne von MFN2. Folgendes Schema zeigt die häufigsten Mutationen von MFN2, welche eine CMT2A verursachen.

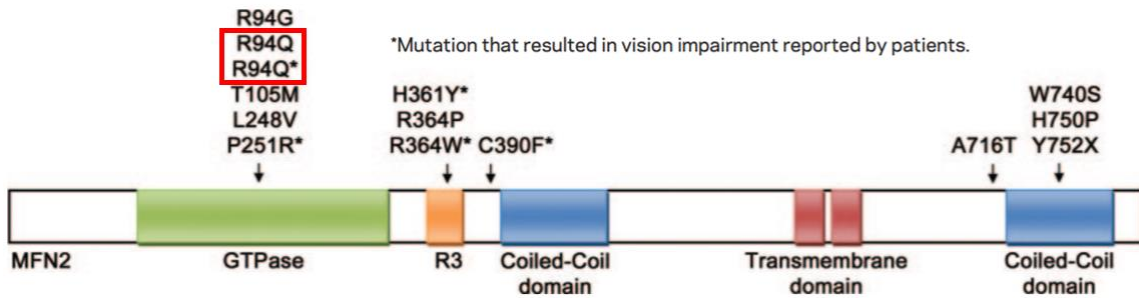


Abbildung 9: Schematische Darstellung der häufigsten CMT2A verursachenden Mutationen in MFN2 , modifiziert nach (Feely et al., 2011). Das Schema zeigt das Protein MFN2 mit dessen Domänen sowie CMT2A verursachende Mutationen. Auffällig ist eine Häufung dieser Mutationen v.a. in der GTPase-Domäne, aber auch in der Coiled-Coil-Region. Rot hervorgehoben ist die R94Q-Mutation, welche in dieser Arbeit untersucht wurde. Diese Mutation verursacht Formen der CMT2A sowohl ohne als auch mit Beeinträchtigung des Visus, weshalb sie hier zweimal gelistet wurde.

Zwei Punktmutationen der Basen an Position 280 und 281 des MFN2-Gens führen zu einer Missense-Mutation im Sinne eines Austausches der Aminosäure Arginin mit Glutamin an Position 94 (R94Q) in einer Helixstruktur am Anfang der GTPase-Domäne des MFN2-Proteins (Abbildung 9). Dabei werden Adenin und Guanin durch Cytosin bzw. Adenin substituiert. Diese R94Q-Mutation wurde erstmals 2004 entdeckt und führte in einer russischen Familie zum frühen Ausbruch einer CMT2A im Alter zwischen 3 und 17 Jahren (Zuchner et al., 2004). Transgene Mäuse mit R94Q-mutiertem MFN2 entwickelten ebenfalls eine Polyneuropathie mit Bewegungs- und Gangstörungen. Hierbei fiel eine Anhäufung von Mitochondrien im distalen Axon von peripheren Nerven bei unbeeinträchtigter mitochondrialer Morphologie auf (Cartoni et al., 2010). Außerdem zeigten diese Mäuse eine kombinierte Funktionseinschränkung im Komplex II und V der Atmungskette einhergehend mit erheblich reduzierter ATP-Produktion (Guillet et al., 2011), möglicherweise bedingt durch ein zusammengebrochenes Membranpotenzial (Rocha et al., 2018).

Auch wurde beschrieben, dass in R94Q-Mitochondrien die ATP-Produktion nach Aktivierung des Axons im Gegensatz zur H_2O_2 -Produktion nicht ansteigt (van Hameren et al., 2019). Dies spricht für die Entkopplung von ROS- und ATP-Produktion unter neuropathologischen Bedingungen, welche die axonale Funktionalität beeinträchtigen könnte. Sowohl in Fibroblasten aus Patienten als auch in Primärneuronen und in vivo Motoneuronen von R94Q-exprimierenden Mäusen ist der Kontakt zwischen Mitochondrien und ER reduziert, was zu Defiziten in der Kalziumaufnahme, zu erhöhtem ER-Stress sowie Änderungen in der mitochondrialen Morphologie führt (Bernard-Marissal et al., 2019). Auch der beeinträchtigte axonale Mitochondrientransport durch MFN2-KO konnte durch Überexpression von R94Q-mutiertem MFN2 nicht wiederhergestellt werden (Misko et al., 2010).

Insgesamt ist also davon auszugehen, dass das Arginin 94 eine wichtige Rolle für die Funktion von MFN2 spielt und in viele Aufgaben involviert ist. In diesem Zusammenhang untersuchte ich u. a. die mitochondriale Atmung und Form sowie den Kalziumhaushalt in MEF-Zellen, welche R94Q-mutiertes MFN2 exprimieren.

2.2.8. C684 vermittelt die GSSG-induzierte MFN2-Oligomerisation

Eine aktuelle Publikation hat aufgezeigt, dass MFN2 in der Regulation der mitochondrialen Fusion als Reaktion auf Änderungen im intrazellulären Redoxmilieu involviert ist (Shutt et al., 2012). Dabei wurde beobachtet, dass bei Zugabe von Glutathiondisulfid (GSSG), dem zellulären Indikator für oxidativen Stress, zu Mitochondrien die mitochondriale Fusion durch Bildung von Oligomeren mittels Disulfidbrücken zwischen MFN2-Molekülen induziert wird. Zellen, in denen das MFN2-Protein die C684A-Mutation trägt, zeigten eine deutlich reduzierte Oligomerisation (Abbildung 10), woraus sich auf eine Disulfidbrückenbildung zwischen dem Aminosäurerest genau dieses Cysteins an Position 684 mit benachbarten Mitofusinen oder anderen Proteinen schließen lässt. Das Cystein 684 scheint für das beobachtete Phänomen der Oligomerisation bei GSSG-Zugabe als Vorbereitung auf die mitochondriale Fusion also eine entscheidende Rolle zu spielen (Shutt et al., 2012).

Um zu untersuchen, welche Veränderungen bei Mutation dieses Cysteins auftreten, habe ich mittels zwei Punktmutationen an Position 2050 und 2051 (TG→GC) des MFN2-Gens einen Austausch der Aminosäure Cystein mit Alanin (C684A) verursacht. Da Alanin nicht in der Lage ist Disulfidbrücken auszubilden, kann man so beobachten, zu welchen Veränderungen der mitochondrialen Form und Funktion die fehlende Fähigkeit der Disulfidbrückenbildung führt.

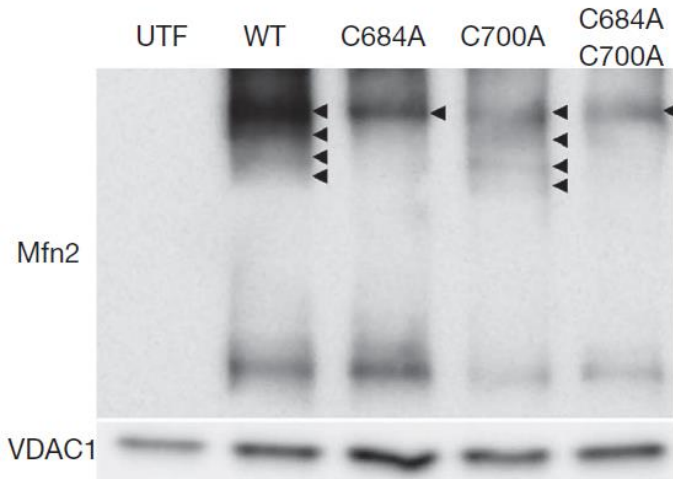
Außerdem liegt das C684A unmittelbar vor der HR2-Domäne von MFN2 im mitochondrialen Intermembranraum, die Bedeutung für die Interaktion zweier Mitochondrien für die anschließende Fusion hat (Koshiba et al., 2004).

Diese mitochondriale Hyperfusion dient wahrscheinlich dem Schutz gegen Apoptose und Mitophagie. So wurde beschrieben, dass es einhergehend mit dieser mitochondrialen Hyperfusion zur vermehrten ATP-Produktion kommt (Tondera et al., 2009).

Daher habe ich in dieser Arbeit in vorbeschriebene MFN2-defiziente MEF-Zellen (Chen et al., 2003) Wildtyp- bzw. C684A mutiertes MFN2 stabil transfiziert und anschließend unter Basalbedingungen und unter mildem oxidativem Stress

vergleichend zwischen WT- und C684A-Zellen mitochondriale Atmung und Form untersucht.

D



E

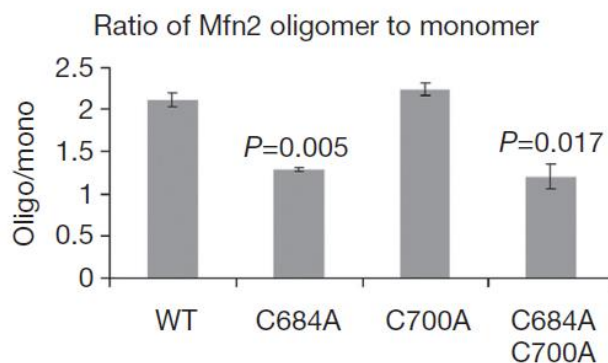


Abbildung 10: Cystein 684 vermittelt die GSSG-induzierte Oligomerisation, aus (Shutt et al., 2012). In MFN2-defiziente MEF-Zellen wurde WT-, C684A- und/oder C700A-MFN2 transfiziert. Mitochondrien wurden isoliert und mit 0,5 mM GSSG behandelt. **D.** Die Bildung von MFN2-Oligomeren wurde mittels nicht-reduzierender Elektrophorese und anschließendem Western Blot untersucht. VDAC1 diente als Ladekontrolle. Die Pfeilspitzen markieren die oligomeren Formen von Mfn2. **E.** Die densitometrische Auswertung zeigt eine Reduzierung der oligomeren Formen in C684A-Zellen.

2.2.9. K109A-Mutation

MFN2 spielt eine erhebliche Rolle in der Fusion von Mitochondrien. Wie bereits detailliert beschrieben sorgen dabei die Interaktionen zwischen den HR2-Domänen benachbarter Mitofusine zweier Mitochondrien für die Aggregation, während die GTPase für die endgültige Fusion unentbehrlich ist (Koshiba et al., 2004). Mittels drei Punktmutationen an Position 325 bis 327 (AAG→GCT) des MFN2-Gens kommt es zu einer Missense-Mutation im Sinne eines Austauschs der Aminosäure Lysin mit Alanin (K109A). Diese Aminosäure liegt in der GTPase-Domäne von MFN2.

Daher liegt es nahe, dass diese Mutation die mitochondriale Fusion durch Funktionseinschränkung der GTPase wahrscheinlich beeinträchtigen könnte. Tatsächlich ist bereits beschrieben worden, dass diese Mutation zu einer vermehrten Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks führt (Chen et al., 2003, Niemann et al., 2005).

In braunem Fettgewebe führte der Knockout von MFN2 zu einer reduzierten Zellatmung mit einhergehender gestörter Thermogenese durch verminderte Entkopplung der Atmungskette sowie zu einer verminderten Reaktion auf adrenerge lipolytische Reize im Vergleich zu Wildtyp-Adipozyten. Begründet wurde diese Beobachtung damit, dass MFN2 direkt mit Perlipin 1 auf der Oberfläche von Lipidtröpfchen interagiert und die adrenerge Stimulation umsetzt. Interessanterweise scheint für diese Interaktion eine funktionsfähige GTPase-Domäne vonnöten zu sein, da MFN2 mit der Mutation K109A die Funktionseinschränkung durch den MFN2-Knockout nicht wiederherstellen konnte (Boutant et al., 2017). Wie auch für die R94Q-Mutation beschrieben, zeigten Rocha et al. in K109A-Mitochondrien neben der vermehrten Fragmentierung auch ein reduziertes mitochondriales Membranpotenzial (Rocha et al., 2018).

Ich untersuchte die mitochondriale Form und Funktion in K109A mutierten Zellen, um einerseits den Einfluss auf die mitochondriale Morphologie zu bestätigen und Erkenntnisse über den Einfluss auf Atmungskette und Kalziumhaushalt zu erlangen, worüber bisher keine Untersuchungen vorliegen.

2.3. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress bezeichnet den Stoffwechszustand, in dem die Menge an reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) das physiologische Maß überschreitet. Dieser Zustand kann entweder durch eine vermehrte Produktion an ROS oder aber durch einen eingeschränkten antioxidativen Apparat verursacht werden (Davies, 1995).

2.3.1. Ursachen oxidativen Stresses

Aus dem Sauerstoffmolekül (O_2) entstehen in verschiedenen Prozessen verschiedene Arten von ROS, u. a. das Superoxidanionradikal (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylanion (OH^-) und Hydroxylradikal ($HO\cdot$), wobei letzteres das reaktivste aller

ROS darstellt. Es gibt exo- und endogene Ursachen der ROS-Entstehung. So entstehen ROS exogen durch UV- und Röntgenstrahlung, Schwermetalle, Ozon, Hitze und weiteren Toxinen (Gosslau and Rensing, 2002).

Endogen führen viele verschiedene Prozesse zur ROS-Bildung. Ein kleiner Teil der ROS entsteht im Rahmen der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-Systems zur Immunabwehr oder auch durch sauerstoffverbrauchende Enzyme wie der Xanthin-Oxidase zur Entgiftung toxischer Metaboliten (Ames et al., 1993).

Der allergrößte Anteil entsteht jedoch in Mitochondrien. Da Mitochondrien fast den gesamten Sauerstoff in der Atmungskette mit anschließender oxidativer Phosphorylierung umsetzen, entsteht in diesen auch der größte Anteil von Wasserstoffperoxid. Durch die sogenannte Elektronenleckage entweichen stets schon bei physiologischer Atmungsketteaktivität Elektronen an den Komplexen der Atmungskette vorbei (Jastroch et al., 2010), die zunächst den reichlich in der mitochondrialen Matrix vorhandenen Sauerstoff zum Superoxidationradikal reduzieren, welches dann wiederum durch die Superoxiddismutase oder spontan autokatalytisch zum membranpermeablen und verhältnismäßig stabilen Wasserstoffperoxid reagiert (Gosslau and Rensing, 2002). Aufgrund dieser Membranpermeabilität und Stabilität wurde H_2O_2 in dieser Arbeit verwendet, um milden oxidativen Stress in Zellen auszulösen. Durch die sogenannte Fenton-Reaktion durch Eisenkomplexe der Mitochondrien wird Wasserstoffperoxid weiter zu Hydroxylradikalen abgebaut (Kowaltowski and Vercesi, 1999). Wie bereits erwähnt ist dieses Hydroxylradikal das reaktivste aller ROS und führt nun zur oxidativen Schädigung der mtDNA, die einige Bestandteile der Atmungskette kodiert. Es kommt zu Einzel-, Doppelstrangbrüchen oder Basenmodifikationen (Gosslau and Rensing, 2002). Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist für oxidativen Stress deutlich anfälliger als die nukleäre, wahrscheinlich da sie keine Introns oder assoziierte Histone und weniger DNA-Reparaturmechanismen aufweist (Beckman and Ames, 1999). Da nicht jede Reaktion der ca. 10^6 Reaktionen zwischen ROS und DNA repariert werden kann, akkumulieren die DNA-Schäden mit zunehmendem Alter, was das steigende Krebsrisiko im Alter zum Teil erklärt (Marnett, 2000). Die fehlerhafte Expression dieser in der mtDNA kodierten Bestandteile der Atmungskette führt zu einer vermehrten Elektronenleckage, was wiederum die ROS-Produktion ankurbelt und womit ein Teufelskreis mitochondrialer Schädigung auftritt (Abbildung 11) (Wei et al., 1998).

Da ROS sehr stark elektronegativ sind, können sie neben Nucleinsäuren wie DNA jegliche Moleküle oxidieren. Anfällig für ROS sind auch die Thiolgruppen der Cysteinreste und Hydroxylgruppen der Tyrosinreste von Proteinen (Stadtman, 1993). Über Disulfidbrücken und Dimerisierungen kommt es zu Strukturänderungen in Proteinen mit einhergehender bspw. enzymatischer Funktionsstörung.

Bei der sogenannten Lipidperoxidation werden v. a. die ungesättigten Phospholipide der Zellmembran oxidiert (Antunes et al., 1996). Die Schäden der Zell- und Organellenmembranen beeinflussen membrangebundene Proteine und die Membranpermeabilität und es kommt zu einem Kalziumeinstrom ins Zytosol. Kalzium-abhängige Endonukleasen, Proteasen und Phospholipasen werden aktiviert (Trump and Berezesky, 1996), was degenerative Prozesse einleitet und letztlich zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose führt. Die verstärkte ROS-Produktion durch Kalzium-aktivierte Enzyme wie der NO-Synthase oder Xanthin-Oxidase verstärken diese Prozesse (Olanow, 1993).

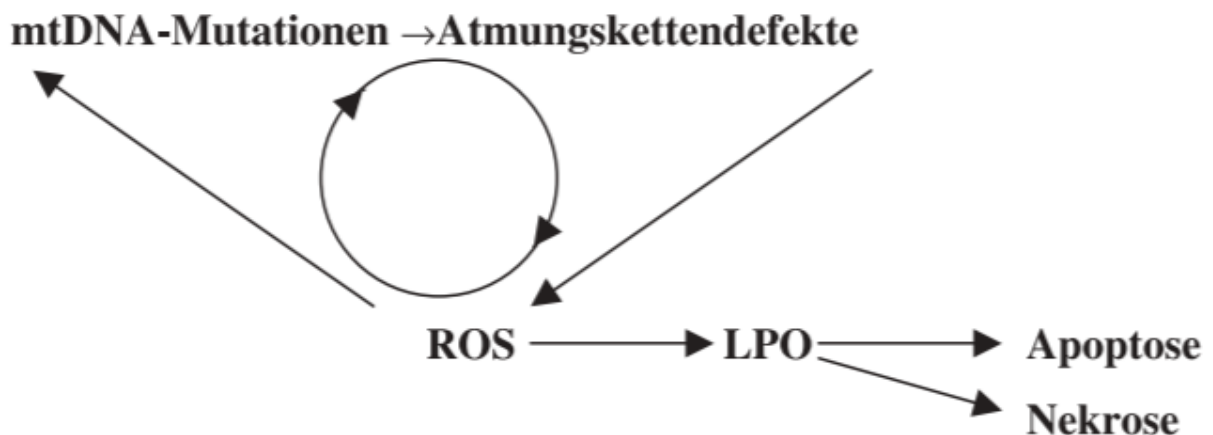


Abbildung 11: Positive Rückkopplung der mitochondrialen ROS-Erzeugung , aus (Gosslau and Rensing, 2002). In Mitochondrien wird ein Großteil des Sauerstoffs in der Atmungskette umgesetzt. Dabei entstehen durch Elektronenleckage ROS, die Mutationen im mitochondrialen Genom (mtDNA) verursachen können. Diese Mutationen führen wiederum zur fehlerhaften Expression von Atmungskettenbestandteilen, was die ROS-Produktion weiter ankurbelt (positive Rückkopplung). Die Oxidation von Lipiden der Biomembranen wird als Lipidperoxidation (LPO) bezeichnet und führt über Zwischenschritte zur Apoptose oder Nekrose der Zelle.

Viele Publikationen konnten zeigen, dass eine erhöhte Zufuhr von Antioxidantien den Alterungsprozess und die Krankheitsentstehung verlangsamt und Antioxidantien v.a. bei erhöhtem Risiko für oxidativen Stress, z. B. bei Sport, Adipositas, Rauchen oder Altern, vermehrt mit der Nahrung aufgenommen werden sollten (Meydani et al., 1998, Yu et al., 1998). Auch wurde beschrieben, dass mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch die Lebensdauer abnimmt und eine Überexpression von anti-oxidativen Enzymen wie der Superoxiddismutase (SOD) oder der Katalase zu einer ROS-Reduktion einhergehend mit verlängerter Lebensdauer führt, während Defekte dieser Proteine einen

gegenteiligen Effekt verursachen (Orr and Sohal, 1994, Phillips et al., 1989). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass oxidativer Stress ein erheblicher Faktor im Altern des Organismus darstellt. So zeigte sich in langlebigen Organismen eine deutlich verminderte Elektronenleckage der Atmungskette (Sanz et al., 2006), welche in Mutationen der mtDNA mündet. Je mehr mtDNA-Mutationen vorliegen, umso kürzer überlebt ein Organismus (Linnane et al., 1989). Mitochondrien werden daher auch als biologische Uhr vermutet (Harman, 1972).

2.3.2. Antioxidativer Apparat

Um der stetigen Entstehung von ROS zu begegnen, besitzt die Zelle einen mehrere Mechanismen umgreifenden Abwehrapparat. Der umfangreiche antioxidative Abwehrapparat der Zelle kann auf mehreren Ebenen eingreifen.

Präventiv dient die Chelatisierung von Schwermetallionen, die wie bereits erwähnt ROS verursachen können, durch mehrere Proteine (Metallothionein, Coeruloplasmin, Transferrin, Ferritin) der Vermeidung von oxidativem Stress, indem die Entstehung des Hydroxylradikals in der Fenton-Reaktion entgegengewirkt wird (Halliwell, 2012).

Einige Antioxidantien können Radikale direkt reduzieren. Dazu gehören die essenziellen L-Ascorbat (Vitamin C) und Tocopherol (Vitamin E) sowie das nicht-essenzielle Glutathion (GSH) (Halliwell, 2012).

Außerdem werden durch die antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und Glutathion-Peroxidase reaktive Sauerstoffspezies durch Reduktion entschärft. Die SOD katalysiert die Reaktion vom Superoxidanionradikal zu Wasserstoffperoxid, welches durch die Katalase weiter zu Wasser und Sauerstoff entgiftet wird (Fridovich, 1989). Die Glutathion-Peroxidase (GPO) reduziert angefallene ROS mittels reduzierten Glutathions (GSH) und mit Selen als Cofaktor (Gosslau and Rensing, 2002). Vermittelt durch die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) und *Activator protein 1* (AP-1) erhöht oxidativer Stress die Expression dieser Enzyme (Meyer et al., 1993). V. a. im Nervengewebe ist eine solche Regulation der Expression von Bedeutung, da es im Vergleich zu anderen Geweben besonders anfällig für oxidativen Stress ist. Das liegt daran, dass die Energiebereitstellung hauptsächlich in der oxidativen Phosphorylierung erfolgt und antioxidative Mechanismen im Gehirn geringer ausgeprägt sind (Cassereau et al., 2011).

Vitamin C und E sowie GSH müssen zur Aufrechterhaltung der antioxidativen Mechanismen stets regeneriert werden. Verschiedene Prozesse sorgen für die Regenerierung von Vitamin C und E (Gosslau and Rensing, 2002). Oxidiertes Glutathion wird durch die GSH-Reduktase zu GSH reduziert oder mittels Glutamylcysteinyligase und Glutathionsynthase neu synthetisiert. Zur Regeneration dient u. a. NADPH als Elektronendonator, welches im Pentosephosphatweg produziert wird (Ben-Yoseph et al., 1996).

Falls die Kapazitäten der bisher erwähnten Antioxidantien ausgeschöpft sind, gibt es weitere Moleküle, die neben Ihrer jeweiligen Hauptfunktion auch antioxidativ wirken können. Dazu gehören Cholesterol, Liponsäure, Ubichinon, Thioredoxin und das Hormon Melatonin (Sies, 1993). Auch Stoffwechselmetabolite wie bspw. Bilirubin (Yao et al., 2019) und Thiolgruppen von Proteinen wirken antioxidativ (Del Corso et al., 1994).

Das antioxidative System ist nicht in der Lage, die Bildung von ROS komplett zu verhindern. Ist es nun durch oxidativen Stress bereits zu Schäden von Makromolekülen, also Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren, gekommen, gibt es einige Reparatur- oder Abbaumechanismen, die diese beheben. Dazu gehören v.a. Stressproteine, DNA- Reparaturenzyme und Phospholipasen, die oxidierte Phospholipide spalten (Halliwell, 2012). Expression der sogenannten Stressproteine, auch als Hitzeschockproteine wegen des ersten Stressors Hitze bezeichnet, wird durch verschiedene Stressoren, u.a. eben oxidativem Stress, induziert. Diese Proteine reparieren renaturierbare Proteine bzw. bauen nicht renaturierbare Proteine ab (Sun et al., 2019).

2.3.3. Glutathion (GSH)

Bei Glutathion (GSH) handelt es sich in zweierlei Hinsicht um ein besonderes Tripeptid aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat. Einerseits geht das Gamma-Kohlenstoffatom des Glutamats, nicht wie üblich bei Peptidbindungen das alpha-Kohlenstoffatom, die Peptidbindung zum Cystein ein. Andererseits wird es – unabhängig vom Proteinbiosyntheseapparat der Zelle – in zwei enzymatischen Reaktionen im Zytosol unter ATP-Verbrauch synthetisiert:

1. Glutamylcysteinyligase (GCL): Glutaminsäure + Cystein \rightarrow γ -Glutamylcystein;
2. Glutathionsynthase (GSS): γ -Glutamylcystein + Glycin \rightarrow Glutathion

Dabei stellt die erste Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese dar (Anderson, 1998). Die Synthese von Glutathion findet v. a. in der Leber statt, prinzipiell sind aber alle Zellen dazu befähigt.

Die wichtigste biologische Funktion von Glutathion ist seine Aufgabe als Antioxidans. Entsprechend liegt es in hohen intrazellulären Konzentrationen vor, typischerweise zwischen 1 und 8 mM als dynamisches Gleichgewicht je nach Geschwindigkeit der GSH-Synthese und des GSH-Verbrauchs in der Zelle (Griffith, 1999). Die antioxidative Wirkung von Glutathion basiert auf der Reduktion der Thiolgruppe des Cysteins. Durch Aufnahme von Elektronen durch die Thiolgruppe verbindet es sich mit der analogen Thiolgruppe eines weiteren Glutathion-Moleküls zu Glutathiondisulfid (GSSG). Diese Reduktion wird durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert. Um Glutathion zu regenerieren, wird die Disulfidbrücke des GSSG mithilfe der Glutathion-Reduktase NADPH-abhängig reduziert. NADPH wird hierbei aus dem Pentosephosphatweg generiert (Ben-Yoseph et al., 1996). Neben der enzymatischen Reduktion kann Glutathion auch nicht-enzymatisch freie Radikale und oxidierte Moleküle reduzieren und Antioxidantien regenerieren. So verhindert es Schäden der Zelle durch reaktive Sauerstoffspezies.

Wichtig ist die Funktion als Antioxidans v. a. in Erythrozyten, in denen Glutathion Methämoglobin zu funktionsfähigem Hämoglobin reduziert. Des Weiteren spielt Glutathion im Rahmen der Biotransformation eine wichtige Rolle (Griffith and Meister, 1979).

Es wurde gezeigt, dass bei niedrigem GSH-Level der Zelle diese vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt ist, womit sich sagen lässt, dass der Oxidationsschutz der Zelle mit der Menge an GSH korreliert (Griffith and Meister, 1979).

Um den Einfluss von MFN2 auf das oxidative Milieu der Zelle zu untersuchen, bestimmte ich daher den Gehalt an GSH in allen Zelllinien (Kapitel 4.8) sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach 24-stündiger H₂O₂-Behandlung, um so Rückschlüsse auf den Zustand der antioxidativen Abwehr zu ziehen. Auch wurde die ROS-Konzentration ermittelt (Kapitel 4.9).

2.4. Zelluläre Kalziumhomöostase und Kalziumkanäle

Kalziumionen (Ca²⁺) sind neben dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) der wichtigste Second-Messenger in der Signaltransduktion. Es spielt bspw. eine Rolle in

der Gentranskription und Apoptose (Orrenius et al., 2015). Eine Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase ist essenziell für die zelluläre Funktion und das zelluläre Überleben. Die zytosolische Kalziumkonzentration liegt je nach Zelltyp zwischen 0,1 und 1 mM (Clapham, 2007) und ist somit um ein Vielfaches niedriger als die Konzentration im ER und Extrazellulärraum. Das ER ist ein wichtiger Regulator und Kalziumspeicher, welcher nach Stimulation rasch Ca^{2+} freisetzen kann und auf diesem Wege über viele verschiedene Signaltransduktionswege mehrere Effektorproteine wie Ionenkanäle, Kinasen und Phosphatasen aktiviert, sowie für kalziumabhängige Funktionen wie Muskelkontraktion bis hin zu komplexen Hirnleistungen wie Gedächtnisfunktionen verantwortlich ist (Raffaello et al., 2016). Durch den Efflux von Kalziumionen aus dem ER wird wiederum die Kalziumfreisetzung durch die Plasmamembran stimuliert, was die ausgelösten Signalwege und Prozesse verstärkt. Um die zytosolische Ruhe-Kalziumkonzentration und den Kalziumgradienten wiederherzustellen, muss das Kalzium aktiv in das ER und in den Extrazellulärraum zurück transportiert werden. In diesem Zyklus spielen viele Proteine und Kanäle sowie Kontakte zwischen ER, Plasmamembran, Mitochondrien und weiteren Organellen eine regulierende Rolle (Raffaello et al., 2016). Die Regulation der Kalziumhomöostase ist außerdem von Bedeutung, da Ca^{2+} in zu hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt.

2.4.1. Kalziumhaushalt im Endoplasmatisches Retikulum

Für den Kalziumstrom aus dem ER in das Zytosol sind mit den Inositoltrisphosphat- und Ryanodin-Rezeptoren hauptsächlich zwei Rezeptorfamilien verantwortlich (Marchi et al., 2014).

Die Aktivierung von Phospholipase C löst die Freisetzung von IP_3 aus Phospholipiden der Biomembranen aus. IP_3 bindet an seinen Rezeptor, was die Freisetzung von Kalzium aus dem ER in das Zytosol löst. Die Kalziumfreisetzung über den Ryanodinrezeptor ist v. a. in quergestreifter und Herzmuskulatur präsent (Lanner et al., 2010).

Durch Kalziumfreisetzung aus dem ER in das Zytosol sinkt die Konzentration von Kalzium im ER und es treten durch den Mechanismus des sogenannten *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) Kalziumionen durch die *store-operated Ca^{2+} channels* (SOCs) von extra- nach intrazellulär. Dadurch wird einerseits das zytosolische Kalziumsignal verlängert, andererseits werden die Kalziumspeicher des ER wieder aufgefüllt und der Kalziumeintritt in die Zelle durch negative Rückkopplung gestoppt

(Prakriya and Lewis, 2015, Raffaello et al., 2016). SOCE wird gewährleistet durch zwei Proteinfamilien: *Stromal interaction molecule* (STIM) dient als Sensor für die abnehmende Kalziumkonzentration im ER und aktiviert dann den Kalziumkanal *Calcium release-activated calcium channel protein 1* (ORAI), durch den dann Kalzium aus dem Zytosol in das ER fließt und die Speicher auffüllt (Hogan and Rao, 2015). Das mittels SOCE aufgenommene Kalzium wird außerdem aktiv durch die *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) ins ER gepumpt. Diese kann durch das pflanzliche Thapsigargin blockiert werden (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007).

2.4.2. Mitochondrialer Kalziueinstrom

Über MAMs stehen Mitochondrien und ER in engem Kontakt, welcher für den Austausch und Regulierung des Kalziumhaushalts unabdingbar ist (Rizzuto et al., 1993, Rizzuto et al., 1998). Wie in Kapitel 2.2.3 bereits erläutert, spielt bei der Regulation dieser MAMs MFN2 eine entscheidende Rolle, wobei in der Literatur unterschiedliche Meinungen darüber bestehen, ob MFN2 den Kontakt fördert oder hemmt. Durch Interaktion der MAMs mit Mitochondrien sind diese in der Lage, vom ER freigesetztes Kalzium aufzunehmen und Kalziumsignale durch Verlängerung oder Terminierung zu beeinflussen (Demaurex and Distelhorst, 2003). Mitochondrien nehmen also eine wichtige Rolle im Kalziumhaushalt ein. Kalzium stimuliert in Mitochondrien die Aktivität der Atmungskette und ATP-Synthase mit einhergehendem erhöhten ATP-Spiegel im Zytosol (Jouaville et al., 1999). Dem zugrunde liegt wohl eine Aktivierung von Enzymen des Citratzyklus mit entsprechend vermehrter Synthese von $\text{NADH}+\text{H}^+$, welches in die Atmungskette eingespeist wird und zu einer gesteigerten mitochondrialen Atmung und ATP-Produktion mit entsprechend erhöhter ROS-Produktion führt (Orrenius et al., 2015). Diese Beobachtungen verdeutlichen die Wichtigkeit eines eng regulierten Kalzium-Haushalts für Mitochondrien sowie die ganze Zelle.

In Kapitel 2.1.1 wurde bereits erläutert, dass die äußere Mitochondrienmembran aufgrund sogenannter Porine eine hohe Permeabilität für Ionen und kleine Moleküle aufweist. Über eines dieser Porine, dem *Voltage-dependent anion channel* (VDAC), wird der Kalziumtransport vermittelt (Shoshan-Barmatz and Gincel, 2003). Die innere Membran ist für die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials, für die Ionenhomöostase und für die mitochondriale Funktion wichtig und jede Änderung von

Ionenflüssen wird daher durch spezifische Transportsysteme reguliert. Für Kalziumionen dient der sogenannte *Mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU)* als Kanal über die innere Mitochondrienmembran (De Stefani et al., 2015). Die Triebkraft hierbei ist das Membranpotenzial, welches die Atmungskette in Form des negativen elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufbaut (Rottenberg and Scarpa, 1974).

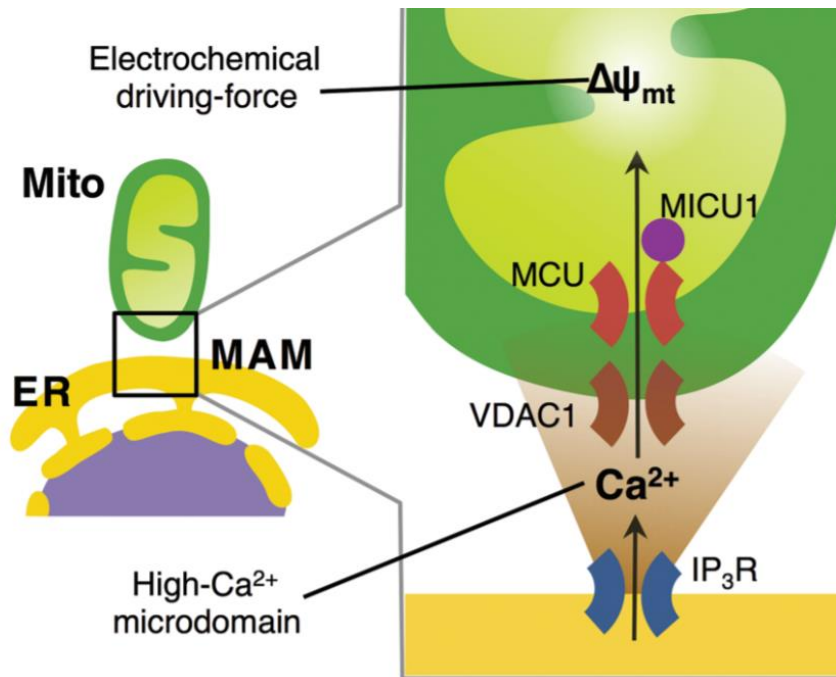


Abbildung 12: Kalziumtransport vom Endoplasmatischen Retikulum in Mitochondrien, aus (Bravo-Sagua et al., 2017). Der Ca²⁺-Transfer von ER zu Mitochondrien findet an mitochondrienassoziierten ER-Membranen (MAM) statt, in denen sich spezialisierte Ca²⁺-Kanäle befinden. Die Stimulierung von Inositoltriphosphatrezeptoren (IP₃R) an der ER-Oberfläche führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER-Lumen, wobei eine lokale Mikrodomäne mit hoher Ca²⁺-Konzentration gebildet wird. In der Nähe befindliche Mitochondrien nehmen Ca²⁺ über ihr mitochondriales Membranpotenzial ($\Delta\Psi_{mt}$) als treibende Kraft auf. Ca²⁺ passiert die äußere Mitochondrienmembran über den Kanal VDAC1 und die innere Mitochondrienmembran über den mitochondrialen Ca²⁺-Uniporter (MCU). MICU1 ist Teil des MCU-Komplexes, der als Gatekeeper fungiert und den Eintritt von Ca²⁺ in die Mitochondrien nur bei hohen Kalziumkonzentrationen ermöglicht.

Einerseits zeigte sich in MCU überexprimierenden Zellen nach Stimulation der IP₃-Rezeptoren und damit einhergehender Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER ein deutlicher Anstieg der mitochondrialen Kalziumkonzentration, andererseits führte eine Stilllegung des MCU-Gens entsprechend zu einer Abnahme des Kalziumflusses über die innere Mitochondrienmembran (Baughman et al., 2011, De Stefani et al., 2015). Auch Störungen der sogenannten *Mitochondrial calcium uptake proteins 1 & 2 (MICU1/2)*, Regulatoren des MCU, führen zu Regulationsstörung des Kalziumhaushalts (Shamseldin et al., 2017). Der MCU wird bei hohen zytosolischen Kalziumkonzentrationen durch die MICU1/2 blockiert, während MICU 1 bei niedrigen Konzentrationen die MCU Offenwahrscheinlichkeit erhöht (Patron et al., 2014). EF-

Hand-Domänen in MICU1/2 enthalten mehrere negativ geladenen Aminosäuren, die durch Kalziumbindung eine Änderung der Konformation bewirken und somit die Funktion der MICU-Proteine beeinflusst (Plovanich et al., 2013). Ein weiterer Regulator des MCU ist der *Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1 (MCUR1)*, dessen Knockout zu verminderter mitochondrialer Kalziumaufnahme und reduziertem Membranpotenzial mit korrespondierender verminderter Aktivität der Atmungskette und ATP-Produktion einhergeht (Mallilankaraman et al., 2012, Paupe et al., 2015, Vais et al., 2015). Ein weiterer MCU-Regulator ist der *Essential MCU regulator (EMRE)*, welches für die physiologische Interaktion zwischen MCU und MICU1/2 von Bedeutung ist (Vais et al., 2016).

2.4.3. Mitochondrialer Kalziumausstrom

Die Exportmechanismen von Kalzium aus dem Mitochondrium sind weniger gut verstanden. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher transportiert ein Kalziumion im Austausch mit drei Natriumionen aus der Mitochondrienmatrix heraus (Palty and Sekler, 2012). Der dafür benötigte Natriumgradient wird über den Na^+/H^+ -Austauscher generiert, dessen Triebkraft wiederum der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran darstellt (Alvarez and Villa-Abrille, 2013). Der Protonengradient scheint auch die Triebkraft für den Kanal *leucine zipper EF-hand containing protein 1 (LETM1)* zu sein. Es ist noch nicht ganz klar, ob es sich hierbei wirklich um einen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter handelt, jedoch deuten mehrere Studien auf seine Rolle im Kalziumtransport hin (Shao et al., 2016, Tsai et al., 2014).

Da die maximale Aufnahmekapazität über den MCU die maximale Ausströmkapazität von Kalzium überschreitet, sind Mitochondrien der Gefahr einer Kalziumüberladung ausgesetzt (Bernardi and von Stockum, 2012). Bei sehr hohen mitochondrialen Kalziumkonzentration kommt es daher zur Öffnung der unselektiven *mitochondrial permeability transition pore (mPTP)*, welche diesen gefährlichen Kalziumüberschuss verhindert (Bernardi and von Stockum, 2012). Allerdings führt eine übermäßig lange Öffnung der mPTP durch die Unselektivität auch zum Zusammenbruch des Membranpotenzials durch Protonenfluss, zur Mitochondrienschwellung, zur Freisetzung von Cytochrom c und letztlich zum Zelltod (Orrenius et al., 2015). Zusammenfassend ist die genaue Rolle der mPTP noch nicht ausreichend geklärt und bedarf intensiver Forschung (Hurst et al., 2017). Interessanterweise bildet die ATP-

Synthase unter oxidativem Stress Dimere in Form einer Pore, die in vielen Charakteristika der mPTP ähnelt (Bernardi et al., 2015).

Um Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von MFN2 auf den Kalziumhaushalt zu erlangen, untersuchte ich in dieser Arbeit sowohl die statische mitochondriale Kalziumkonzentration als auch die dynamische Änderung der Kalziumverhältnisse nach Zugabe von Thapsigargin, Kalzium und FCCP im Rahmen des SOCE. Dabei zeigten EV-, C684A- und R94Q-Zellen einen erhöhten Kalziumgehalt. In K109A-Zellen hingegen zeigte sich sowohl zytosolisch als mitochondrial eine reduzierte Kapazität des SOCE. Auch in der Untersuchung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs zeigten sich interessante Unterschiede. EV-Zellen wiesen einen deutlich erhöhten Sauerstoffumsatz im Vergleich zu den anderen Zelllinien auf. Nach mildem oxidativem Stress zeigte sich stets nur der Wildtyp unverändert, sei es bei Analyse der Atmungskette, der Zellproliferation oder der mitochondrialen Form, während v. a. Mitochondrien mit der krankheitsverursachenden Mutation R94Q sehr sensibel auf Änderungen des Redoxmilieus reagierten. All diese spannenden Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle von MFN2 in der mitochondrialen und zellulären Physiologie.

3. Material

3.1. Zelllinien

Mouse embryonic fibroblasts (MEF-Zellen) wurden aus Embryonen von Mäusen gewonnen und sind in der medizinischen Forschung zur Untersuchung von Stammzellen weit verbreitet. Es handelt sich um adhärenz wachsende Fibroblasten, welche zu stabilen Zelllinien immortalisiert werden können. Die folgende Tabelle listet die in dieser Arbeit verwendeten 7 Zelllinien sowie die vereinfachten Bezeichnungen auf.

Tabelle 3: Zelllinien

Nr.	Zelllinie	Herkunft	Vereinfachte Bezeichnungen
1	WT MEFs (ATCC® CRL-2991™)	Masatsugu Oh-Hora, Harvard University	MEF-WT / WT
2	Mfn2-null MEFs MFN2 -/- (ATCC® CRL-2993™)	Timothy Shutt, University of Calgary	MFN2-KO / KO
3	MEF-Zellen MFN2 -/- überexprimiert mit WT-Mfn2	Selbst generiert (s. Kap. 4.1.3)	KO+MFN2(WT) / KO+WT / Rescue
4	MEF-Zellen MFN2 -/- überexprimiert mit einem <i>empty vector</i> (EV)	Selbst generiert (s. Kap. 4.1.3)	KO+EV / EV
5	MEF-Zellen MFN2 -/- überexprimiert mit mutiertem MFN2 (C684A)	Selbst generiert (s. Kap. 4.1.3)	KO+MFN2(C684A) / KO+C684A / C684A
6	MEF-Zellen MFN2 -/- überexprimiert mit mutiertem MFN2 (R94Q)	Selbst generiert (s. Kap. 4.1.3)	KO+MFN2(R94Q) / KO+R94Q / R94Q
7	MEF-Zellen MFN2 -/- überexprimiert mit mutiertem MFN2 (K109A)	Selbst generiert (s. Kap. 4.1.3)	KO+MFN2(K109A) / KO+K109A / K109A

Die normalen MEF-Zellen werden vereinfacht als WT, MEF-Zellen mit fehlender MFN2-Expression werden als KO-Zellen bezeichnet. KO-Zellen, welche mit dem WT-Protein MFN2 transfiziert wurden, werden zur Abgrenzung gegen die WT-MEF-Zellen (Zelllinie Nr.1) entweder als *Rescue*-Zellen oder als KO+WT bezeichnet. KO-Zellen,

die mit einem leeren Vektor (*empty vector*) transfiziert wurden, werden im Folgenden zur Abgrenzung gegen die Mfn2 ^{-/-} Zellen (Zelllinie Nr.2) als EV oder KO+EV bezeichnet.

3.2. Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien und Zusätze

Tabelle 4: Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien und Zusätze

Name	Firma
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich®
Agarose Basic	AppliChem
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich®
Antimycin A	Sigma-Aldrich®
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich®
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich®
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth®
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche
Cytochrom c	Sigma-Aldrich®
Digitonin	Sigma-Aldrich®
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich®
dNTP Mix 10 mM	Fermentas
5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoicacid) (DTNB)	Sigma-Aldrich®
1,4- Dithiothreitol (DTT)	Roth®
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose</i> mit 4,5 g Glucose, L-Glutamin und Pyruvat	Sigma-Aldrich®
Ethanol 70% vergällt	Roth®
Ethanol Rotipuran® 99,8%	Roth®
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich®
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth®
<i>Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)</i>	Sigma-Aldrich®
Glucose	Sigma-Aldrich®
Glutamat (G)	Sigma-Aldrich®
Glycerin	Roth®
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich®
Glutathionsisulfid (GSSG)	Sigma Aldrich®
Glutathion-Reduktase	Sigma-Aldrich®
<i>Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), no calcium, no magnesium</i>	Life Technologies™

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich ®
5x Herculanase II <i>Reaction Buffer</i>	Agilent Technologies
<i>Fetal Calf Serum</i> HyClone™	Thermo Fisher Scientific™
Kaliumchlorid (KCl)	Roth®
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth®
<i>Lactobionic acid</i>	Sigma-Aldrich®
LB Agar, <i>powder</i> (Lennox L agar)	Invitrogen™
<i>LB Broth Base (LB-Medium)</i>	Invitrogen™
Lipofectamine® 2000 <i>Reagent</i>	Invitrogen™
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth®
Malat	Sigma-Aldrich®
Milchpulver (MP)	Roth®
Natriumchlorid (NaCl)	Roth®
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Roth®
Natriumhydroxid (NaOH)	ApliChem
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)	Sigma-Aldrich ®
Nuclease-freies Wasser	Ambion®
Oligomycin	Sigma-Aldrich®
Opti-Mem™ I (1x) Serumreduziertes Medium	Life Technologies™
10.000 <i>Units/ml</i> Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich®
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich®
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich®
RIPA-Puffer Pierce™	Thermo Fisher Scientific™
Rotenon	Sigma-Aldrich®
<i>Sodium dodecyl sulfate (SDS, Natriumdodecylsulfat)</i>	MP Biomedicals
S.O.C. Medium	Invitrogen™
10x <i>sodium dodecyl sulfate</i> -Puffer (SDS)	Life Technologies™
Succinat	Sigma-Aldrich®
Sucrose	Sigma-Aldrich®
<i>Sulfosalicylic acid (SSA)</i>	Sigma-Aldrich®
Taurin	Sigma-Aldrich®
Thapsigargin	Life Technologies™
Triethanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich®
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth®
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin/EDTA)	Sigma Aldrich®
TurboFectin 8.0	OriGene

Tween® 20	Roth®
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Merck

3.3. Bakterien

Tabelle 5: Bakterien

Bakterien	Firma
E. coli DH5 α -Bakterien (F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1)	Invitrogen™

3.4. Primer

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt.

Tabelle 6: Primer

Name	Sequenz
MFN2 (F Mfn2 XhoI Sall) <i>Forward</i>	TCCCTGCTCTTTTCTCGATG
MFN2 (R Mfn2 AgeI EcoRI) <i>Reverse</i>	TCACACCGTTCAAATCTTCTTCAG
GATC Primer	

3.5. Plasmide und Klonierungsvektoren

Tabelle 7: Plasmide zur Herstellung stabiler Zelllinien

Konstrukt	Rückgrat	Vektor	Hersteller
MFN2 Wildtyp	pPB-CAG-HA- IRES-mCherry- NLS	pPB-CAG-HA-MFN2- IRES-mCherry-NLS	Christina Wolf (AG Methner)
MFN2 Empty Vector	pPB-CAG-HA- IRES-mCherry- NLS	pPB-CAG-HA- mCherry-IRES- mCherry-NLS	Christina Wolf (AG Methner)
MFN2 C684A	pPB-CAG-HA- IRES-mCherry- NLS	pPB-CAG-HA- MFN2(C684A)-IRES- mCherry-NLS	Christina Wolf (AG Methner)
MFN2 R94Q	pPB-CAG-HA- IRES-mCherry- NLS	pPB-CAG-HA- MFN2(R94Q)-IRES- mCherry-NLS	Christina Wolf (AG Methner)

MFN2 K109A	pPB-CAG-HA-IRES-mCherry-NLS	pPB-CAG-HA-MFN2(K109A)-IRES-mCherry-NLS	Christina Wolf (AG Methner)
<i>hyperactive piggyBac transposase</i>	pPB-pCMV-HA	pPB-pCMV-HA-hyPBase	(Yusa et al., 2011)

Tabelle 8: Plasmide zur transienten Transfektion

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
pCMV CEPIA 3mt	Grün fluoreszierender Sensor für mitochondriales Ca ²⁺	Addgene (Plasmid # 58219)
pTurbo635N-Mito (Mito-TurboFarRed)	Rot fluoreszierender mitochondrialer Marker	Ali Pouya (AG Methner)
pDR-GW AT1.03YEMK	ATP-Sensor basierend auf dem FRET	Addgene (Plasmid #28004)

Tabelle 9: Klonierungsvektoren

Vektor	Firma
Eingangsvektor Gateway™ pENTR™ 1A Dual Selection Vector	Invitrogen™
Zielvektor Gateway™ pDEST™ 17 Vector	Invitrogen™

3.6. Enzyme, Farbstoffe, Marker

Tabelle 10: Enzyme, Farbstoffe, Marker

Name	Firma
1 Kb Plus DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific™
<i>BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X)</i>	Thermo Fischer Scientific™
CalciFluor™ Fluo-8 AM (Fluo8)	Santa Cruz Biotechnologie
CellROX® Green Reagent	Life Technologies™
<i>Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder</i>	LI-COR®
<i>Glutathione Reductase from baker's yeast</i>	Sigma Aldrich®
<i>Herculase II Fusion DNA Polymerase</i>	Agilent Technologies
MG Midori Green Advance	Biozym Scientific
MitoTracker™ Red CMXRos	Thermo Fischer Scientific™
<i>RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay</i>	Promega
Rhod-2 AM (Rhod2)	Life Technologies™
Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM)	Sigma-Aldrich®
<i>Trypan Blue Solution 0,4%</i>	Thermo Fischer Scientific™

3.7. Antikörper

Tabelle 11: Antikörper

Spezifität	Verdünnung	Firma
<i>Anti-Actin</i> , Maus, Klon C4, monoklonal	1:4000	Biolegend®
<i>Anti-MFN2</i> , Maus, Klon 4H8, monoklonal	1:500	Abnova
<i>Anti-Mouse IgG</i> (H+L) (DyLight 800 Conjugate), Ziege	1:15.000	Cell Signaling Technology®

3.8. Kits

Tabelle 12: Kits

Kit	Firma
<i>BC Assay Protein Quantification Kit</i>	Interchim®
<i>MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit</i>	iNtRON Biotechnology
<i>Nucleobond® XTRA Plasmid Purification System-Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	New England Biolabs®
<i>Quick-gDNA™ MiniPrep Kit</i>	Zymo Research

3.9. Verbrauchsmaterial

Tabelle 13: Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Combitips advanced® (0,5; 2,5; 5 ml)	Eppendorf
Einfrierbox CoolCell®	BioCision
Entsorgungsbeutel	Roth®
Erlenmeyerkolben (100; 250; 500 ml)	Duran®
<i>Gastight Syringe</i> Mikropipette	Hamilton®
Handschuhe, XCEED® Blaue Nitril	Starlab

Immersionsöl	Sigma-Aldrich®
Kryobox	JG Labor-Center e.k.
Kryoröhrchen 2 ml	TPP® Techno Plastics Products AG
Laborglasflasche (250; 500; 1000 ml)	Duran®
LB-Agarplatten	Invitrogen™
Mini-PROTEAN™ TGX Stain-Free™ Protein Gels, 4-15%	Bio-Rad
Multiwell-Platten, TC (6; 12; 24; 48)	Greiner Bio-One
Multiwell-96-Well-Mikroplatten (klar mit klarem, schwarzem oder weißem Boden)	Greiner Bio-One
<i>PCR Tubes 0,2ml strip (125x8)</i>	Starlab
Petrischale 100x15mm, m.Nocken, PS	Greiner Bio-One
Pipetten, serologisch (2; 5; 10; 25; 50 ml)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen (10; 100; 200; 1000 µl)	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäß (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäß, schwarz, Rotilabo® (1,5 ml)	Roth®
<i>Safe Lock Tubes 2 ml, amber</i>	Eppendorf
µ-Slide 8 Well	Ibidi®
TipOne® RPT-Filterpipettenspitzen, (10; 100; 250; 1000 µl)	Starlab
<i>Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose Transfer Packs</i>	Bio-Rad
Weithals-Spritzflaschen (500 ml) für H ₂ O, Ethanol, Isopropanol	neoLab
Zählkammer nach Neubauer	Precicolor HBG
Zellkulturkolben mit niederem Profil, CELLSTAR™ TC	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 100 x 20 mm, TC	Sarstedt
Zellschaber, blau, 28 cm lang, steril	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen/Falcons (15, 50 ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen/Falcons UV-geschützt (15 ml)	Greiner Bio-One

3.10. Geräte

Tabelle 14: Geräte

Gerät	Firma
Abzugshaube	Infralab
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Panasonic®
Eiswürfel-Eisbereiter	Hoshizaki

Feinwaage CPA 10035	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop IX51	Olympus
Fluoreszenzverstärker TL4	Olympus
Fusion FX7 Geldokumentation	Peqlab
Gelelektrophorese-Standardkämme	Peqlab
Grobwaage ALC-810.2	Acculab
Handzähler	UPGREEN®
Heratherm™ Inkubator	Thermo Fisher Scientific™
Infinite® 200 PRO	Tecan
Kanister, Weithals, mit Ablasshahn	Nalgene®
Kühlraum 4 °C	Viessmann
Kühlschrank (4 °C; -20 °C)	Liebherr Comfort
Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems
Lichtmikroskop Veasy Scope	VWR®
Mikroskop Motic AE20 Series	Motic®
Mikrowelle	Sharp
Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem	Millipore
<i>Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell</i>	Bio-Rad
Moufle	Versilic
MR Hei-Standard Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph
Multipette® M4	Eppendorf
MSC-Advantage Sterilbank	Thermo Fisher Scientific™
NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific™
Odyssey® Fc	LI-COR
Oxygraph-2k	Oroboros Instruments
<i>PCR PerfectBlue™ Gelsystem Mini S, 40-0708</i>	Peqlab
PCR MultiCast™ Gelgießstand (Gießschiene und Gelträger), 40-0708-MC	Peqlab
Pipette (10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Eppendorf
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Power-Supply-Vorschaltgerät U-RFL-T	Olympus
Reaktionsgefäß-Ständer	VWR®
Schüttler Vibrax®-VXR	IKA
Thermocycler, peqSTAR	Peqlab
ThermoMixer® F1.5	Eppendorf
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (midi 0,2 µm)	Bio-Rad
Ultratiefkühlschrank (-80 °C)	Sanyo

Vacusafe	Integra Biosciences™
Vortex-Genie™ 2	Thermo Fisher Scientific™
Vortex Mixer	neoLab®
Wasserbad, Aqualine AL12	Lauda
Wasserbad, JB Aqua 5 Plus	Grant
Zentrifugen	
Centrifuge 5430	Eppendorf
Heraeus™ Biofuge Fresco	Thermo Fisher Scientific™
Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific™
Heraeus Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific™
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific™
Heraeus™ Pico™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific™
Megafuge 1.0R	Heraeus
Megafuge 8R	Thermo Fisher Scientific™
Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific™
Mini-Zentrifuge	Labnet

3.11. Datenverarbeitungsprogramme

Tabelle 15: Datenverarbeitungsprogramme

Programm	Firma
DatLab 5.1 O2k Software	Oroboros Instruments
EndNote X9	Clarivate Analytics
GraphPad Prism 8	GraphPad
Image Studio Lite Version 4.0	Li-Cor®
ImageJ	OpenSource
Illustrator CS6	Adobe
Leica LAS AF Lite Software	Leica Microsystems
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation
ODYSSEY 5a	Li-Cor®
Photoshop CS6	Adobe
Snapgene®	GSL Biotech
Tyche Mitoshape	Eigenentwicklung (██████████, AG Methner)

4. Methoden

4.1. Molekularbiologie

4.1.1. Generierung der Punktmutationen und Klonierung

Die Punktmutationen der Plasmide wurden mittels *PCR site-directed mutagenesis* mit dem Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®) generiert. Die Plasmide wurden dann über das LR Gateway System von pENTR (Gateway™ pENTR™ 1A Dual Selection Vector, Invitrogen™) in den Zielvektor (Gateway™ pDEST™17 Vector, Invitrogen™) kloniert und anschließend in DH5α-E.coli.-Zellen transformiert. Das MFN2-Gen war dabei als Wildtyp schon im pENTR enthalten. Die Punktmutationen wurden generiert und mussten anschließend nur noch in den Zielvektor kloniert werden.

4.1.2. Hitzeschocktransformation und Plasmid-DNA-Isolierung

Als Transformation bezeichnet man die nicht-virale Übertragung freier DNA, z. B. Plasmide, auf Bakterien. Plasmide replizieren sich selbstständig und unabhängig vom Bakterienchromosom. Aus diesem Grund kann die Transformation eines Plasmids in Bakterien zur Vervielfältigung des Plasmids genutzt werden.

Zunächst wurden E.coli von Stamm DH5α aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und auf Eis aufgetaut. Es folgt die Zugabe und Vermischung von ca. 200 ng Plasmid-DNA. Nach anschließender Inkubation auf Eis für 30 Minuten folgt der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Unmittelbar danach wird der Ansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, 250 µl *Super optimal broth* (S.O.C.)-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die gesamte Bakteriensuspension wird dann auf eine *Lysogeny broth* (LB)-Ampicillin-Agarplatte (c_{Amp} : 50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Über Nacht wachsen vereinzelt Kolonien auf der Agarplatte, von denen eine mit einer Pipettenspitze gepickt und in 200 ml LB-Ampicillin-Medium (c_{Amp} : 50 µg/ml) aufgenommen (Bertani, 1951) und für 16 h bei 220 rpm und 37 °C inkubiert wird.

Im nächsten Schritt erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus den DH5-E.coli-Zellen mittels Nucleobond® XTRA Plasmid Purification System-Kit (Macherey-Nagel). Dabei wurde exakt nach Protokoll des Herstellers vorgegangen mit Ausnahme davon, dass

zur Elution anstatt des mitgelieferten Elutionspuffers Nuklease-freies Wasser verwendet wurde. Dieses Kit bedient sich dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien, bei der durch Alkalisierung des Milieus Wasserstoffbrückenbindungen sowohl der chromosomalen als auch extrachromosomalen Plasmid-DNA aufgebrochen werden. Die Plasmid-DNA kann nach Neutralisierung des pH-Wertes jedoch wieder renaturieren und findet sich nach Zentrifugation im Überstand. Im Gegensatz dazu sammelt sich die denaturierte chromosomale DNA nach Zentrifugation im Pellet, welches u. a. auch Zellmembran-, Zellwandbestandteile sowie Proteine beinhaltet. Es folgt eine Aufreinigung der Plasmid-DNA über ein Säulensystem mit anschließender Aufnahme in destilliertem Nuklease-freiem Wasser und photometrisch Bestimmung der Konzentration der extrahierten DNA mittels Nanodrop™ 2000c.

4.1.3. Generierung stabiler Zelllinien

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten 7 Zelllinien. Im Folgenden wird die Herstellung dieser Zellen näher erläutert.

Normale Wildtyp-MEFs (ATCC® CRL-2991™) sowie MFN2 ^{-/-} MEFs (ATCC® CRL-2993™) stammen von der *American Type Culture Collection* (ATCC®).

WT-MEFs (MEF-WT, Zelllinie Nr. 1) wurden nach 10,5 Tagen Schwangerschaft aus Mäuseembryonen entnommen, durch wiederholte Passage einer P1000-Pipettenspitze verfeinert und isoliert, in MEF-Medium (s. Tabelle 21) aufgenommen und anschließend durch Transduktion mit dem großen Simian-Virus 40 (SV40) T-Antigen immortalisiert (Chen et al., 2003, Jat et al., 1986, Katakura et al., 1998).

MFN2-KO-Zellen (MFN2 ^{-/-}, Zelllinie Nr. 2, ATCC® CRL-2993™) wurden erstmals von Chen et al. aus MFN2-*knock-out* Mäusen generiert (Chen et al., 2003).

Die in Abbildung 13 schematisch dargestellten Plasmide wurden stabil in MFN2-KO-Zellen transfiziert:

1. Humanes Wildtyp-MFN2 zur Wiederherstellung des physiologischen Phänotyps. Die Zelle wird vom MFN2-KO gerettet, weshalb von „*Rescue*“-Zellen gesprochen wird.
2. Empty Vektor (EV) als Negativkontrolle zur Beobachtung, was eine MFN2-Ablation bewirkt

3. Mutiertes humanes MFN2, bei dem zwei Punktmutationen an Basenposition 2050 und 2051 des MFN2-Gens zu einem Austausch von Cystein durch Alanin (C684A) im Protein führt.
4. Mutiertes humanes MFN2, bei dem zwei Punktmutationen an Basenposition 280 und 281 des MFN2-Gens zu einem Austausch von Arginin durch Glutamin (R94Q) im Protein führt.
5. Mutiertes humanes MFN2, bei dem drei Punktmutationen an Basenposition 325-327 des MFN2-Gens zu einem Austausch von Lysin durch Alanin (K109A) im Protein führt.

Die Zelllinien wurden mittels PiggyBac-Transposon-Systems generiert. *Inverted terminal repeat sequences* (ITR) flankieren die zu transfizierende DNA. Das Enzym PiggyBac-Transposase (PBase), dessen Gen in die Zellen co-transfiziert wurde (s. Tabelle 16), bindet an diese ITR-Sequenzen und schneidet die DNA an diesen Stellen. Repetitive TTAA-Sequenzen im Kerngenom der Zielzelle werden von der PBase erkannt, in welche sie dann die ausgeschnittene, ITR-flankierte DNA einfügt (Elick et al., 1996).

Dem MFN2-Gen vorgeschaltet ist der CAG-Promoter und der HA-Proteintag. Der CAG-Promoter wurde im Labor von Dr. Kenichi Yamamura konstruiert und beinhaltet das Humane Cytomegalievirus (HCMV) early Enhancerelement (C), den Promoter, das erste Exon und Intron des β -Actin-Gens des Huhns (A) und den 3'-Teil des zweiten Introns und das 5'-Teil des dritten Exons des β -Globin-Gens von Kaninchen (G) (Miyazaki et al., 1989).

Der HA-Tag ist Teil des Proteins und kann bspw. bei Immunoblots mit spezifischen Antikörpern detektiert werden, sollten die MFN2-Antikörper nicht ausreichend binden. Er beinhaltet die Aminosäuresequenz YPYDVPDYA und stützt sich auf einen Teil des Hämagglutinins (Field et al., 1988).

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz enthalten alle Plasmide nach der MFN2-Sequenz (Wildtyp oder mutiert) eine mCherry-Sequenz. Die mCherry-Sequenz wird zu einem rot fluoreszierenden Protein exprimiert und mittels Lichtmikroskopie zur Differenzierung von erfolgreich transfizierten und nicht transfizierten Zellen und mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) zur Zellsortierung genutzt, wodurch die Verwendung zur Generierung stabiler Zelllinien oft genutzter potenziell toxischer Antibiotika wie Puromycin oder G418 mit eventuellem Einfluss auf Zellphysiologie oder mitochondriale Form und Funktion vermieden werden konnte. Der mCherry-Sequenz ist die sogenannte interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) vorgeschaltet. Dabei

handelt es sich um speziell gefaltete Domänen in der Sekundärstruktur eines RNA-Einzelstrangs, der es ermöglicht, die ribosomale Translation unabhängig von der 5'-Cap-Struktur der mRNA zu starten und ein nachgeschaltetes Reportergen, in diesem Fall mCherry, zu exprimieren. Somit werden die MFN2- und mCherry-Sequenz getrennt voneinander translatiert und exprimiert, wodurch verhindert wird, dass eine Anheftung von mCherry an MFN2 die Funktion von MFN2 beeinflusst (Thompson, 2012).

Der Empty-Vektor (EV) bildet als Negativkontrolle die Ausnahme dieses allgemeinen Aufbaus der Plasmide und enthält anstelle des MFN2-Gens eine weitere mCherry-Sequenz. Folgende Abbildung zeigt die Plasmide schematisch im Überblick.

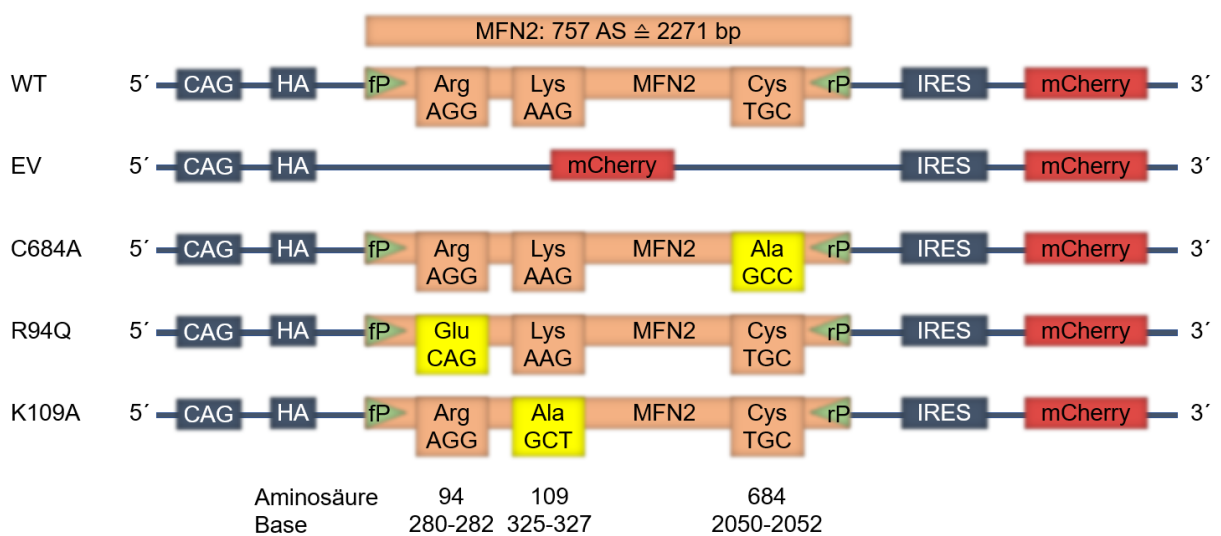


Abbildung 13: Stabil in MFN2 KO-Zellen transfizierte Plasmide. Mit Ausnahme des *Empty Vectors*, welcher anstelle des MFN2-Gens eine zweite mCherry-Sequenz enthält, sind die Plasmide gleich aufgebaut: Auf den CAG-Promoter und den HA-Tag folgt das MFN2-Gen, die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und zuletzt die mCherry-Sequenz. Die IRES dient als Translationsstart für das zu exprimierende Reportergen mCherry, das als Protein fluoresziert und als Kontrolle der Transfektionseffizienz und dem Zell-Sorting mittels FACS dient. Die mutierten Aminosäuren mit entsprechender Änderung der Basenfolge sind gelb, die in der PCR genutzten Primer (fP: *forward* Primer; rP: *reverse* Primer) grün hinterlegt. Zwei Punktmutationen an Position 2050 und 2051 führen zum Austausch von Cystein durch Alanin (C684A). Das Arginin an Position 94 wird durch Glutamin ersetzt (R94Q). Zugrunde liegen zwei Punktmutationen der Basen 280 und 281. Drei Punktmutationen der Basen 325-327 führen zur Substitution der Aminosäure Lysin durch Glycin. Bei allen drei Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen.

In eine 6 Well-Platte wurden 100.000 KO-Zellen pro Well ausgesät und inkubiert. Nach 24 h wird das Transfektionsreagenz nach folgender Tabelle angesetzt.

Tabelle 16: Ansatzrezept zur stabilen Transfektion von MEF-Zellen

Ansatzrezept zur stabilen Transfektion in MFN2-KO-Zellen	
250 μ l	Opti-Mem™ I (1x) Serumreduziertes Medium
1 μ l	Plasmid: WT-MFN2 bzw. mutiertes MFN2 (c _{Stock} = 1 μ g/ μ l)

1 μ l	Plasmid: Piggybac Transposase (PBase (c = 1 μ g/ μ l))
3 μ l	TurboFectin 8.0

Man pipettiert der Reihenfolge nach den Transfektionansatz zusammen, vortext das 1,5 ml-Reaktionsgefäß nach der PBase-Zugabe kurz und gibt anschließend das Transfektionsreagenz TurboFectin 8.0 hinzu. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur gibt man das ganze Volumen des Transfektionsansatzes (255 μ l pro Well) vorsichtig und tröpfchenweise auf die Zellen, deren MEF-Medium zwischenzeitlich gewechselt wurde. Man schwenkt die 6 Well-Schale vorsichtig und stellt sie zurück in den Inkubator. Nun wechselt man täglich das MEF-Medium, passagiert die Zellen bei ausreichender Dichte und begutachtet unter dem Fluoreszenzmikroskop wie viele Zellen rot fluoreszieren, also erfolgreich transfiziert wurden. Nach ca. einer Woche werden die erfolgreich transfizierten Zellen mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) nach Herstellerangaben sortiert. Dabei handelt es sich um eine Unterform der Durchflusszytometrie, bei der durch Proteine – hier mCherry – fluoreszierende Zellen und nicht fluoreszierende Zellen – hier MFN2-KO-Zellen, die nicht erfolgreich transfiziert wurden und somit kein mCherry exprimieren – je nach Fluoreszenz in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert werden. Die erfolgreich transfizierten Zellen werden wieder in Kultur aufgenommen und mehrmals sortiert, bis eine Reinheit von nahezu 100% erreicht wird.

Nachdem die stabilen Zelllinien vorliegen, muss die Korrektheit der angestrebten Mutation bzw. des Wildtyps und des *Empty Vectors* nachgewiesen werden. Dafür wird aus den Zelllinien nun genomische DNA isoliert (s. Kapitel 4.1.4), welche dann mittels PCR (s. Kapitel 4.1.5) vervielfältigt, nach Größe aufgetrennt (s. Kapitel 4.1.6), aufgereinigt (s. Kapitel 4.1.7) und letztlich zur Kontrolle sequenziert wird (s. Kapitel 4.1.8).

4.1.4. Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA der generierten stabilen Zelllinien wurde mittels Quick-gDNA™ MiniPrep Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA mit dem NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific™) ermittelt.

4.1.5. Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können spezifische DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Hierfür lässt man die DNA-Replikation *in vitro* in einem PCR-Thermocycler (Peqlab) ablaufen.

Für eine PCR benötigt man die DNA-Matrize (Template), eine thermostabile DNA-Polymerase, 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (dNTPs), Puffer (MgCl₂ enthaltend) und zwei verschiedene Primer. Bei Primern handelt es sich um Oligonukleotide (ca. 15 Basen), die als Startpunkt für die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase dient. Die Sequenz ist jeweils komplementär zu der Sequenz jeweils eines Einzelstranges der zu amplifizierenden DNA. So wird der Startpunkt für die DNA-Polymerase von beiden Seiten der zu vermehrenden DNA (hier also beidseits des MFN2-Gens) lokalisiert und begrenzt, sodass nach Ende der PCR allein das MFN2-Gen amplifiziert wurde. Die Reagenzien wurden in einem PCR-Tube angesetzt (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: PCR-Ansatzrezept

PCR-Ansatz	Totalvolumen 50 µl
Zu replizierende DNA (DNA-Matrize, Template)	247 ng
MFN2-Forward-Primer	0,25 µM
MFN2-Reverse-Primer	0,25 µM
dNTPs	2,5 mM
Herculase II Fusion DNA-Polymerase	0,5 µl
5x Herculase PCR-Puffer	10 µl
Nuklease-freiem Wasser	Ad 50 µl

Die PCR läuft in Zyklen ab, wobei jeder Zyklus aus drei Phasen besteht:

1. Denaturierung: Die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstrangs werden durch eine sehr hohe Temperatur (in dieser Arbeit: 95 °C für 20 Sekunden) gelöst, wodurch DNA-Einzelstränge entstehen.
2. Primerhybridisierung (*primer annealing*): In diesem Schritt lagern sich die Primer spezifisch an die komplementäre Sequenz der entstandenen Einzelstränge an und bilden den Anfang eines neuen DNA-Doppelstrangstrangs. Die Temperatur ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung des zu replizierenden DNA-Abschnitts und der Primer. Für das MFN2-Gen, den MFN2-*Forward* und den MFN2-*Reverse*-Primer stellten sich 70 °C für 20 Sekunden als optimal heraus.

3. Amplifikation: Nach Anlagerung der Primer lagert sich die DNA-Polymerase nun an das jeweilige freie 3'-OH-Ende der Primer an und startet mit dem Anhängen komplementärer Nukleotide in 5'-3'-Richtung. Der ursprüngliche DNA-Gehalt verdoppelt sich pro Zyklus „n“ (2^n). Die Temperatur dieses Schrittes hängt von der verwendeten DNA-Polymerase und ihrem Wirkungsoptimum ab. Für die in dieser Arbeit verwendete Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies) liegt dieses Optimum bei 68 °C für 69 Sekunden pro Zyklus.

Tabelle 18 gibt einen Überblick über die hier verwendeten Temperaturen und Dauer der einzelnen Zyklen.

Tabelle 18: PCR-Ablauf

	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initialisierung	95 °C	120 s	1
Denaturierung	95 °C	20 s	30
Annealing	70 °C	20 s	
Amplifikation	68 °C	69 s	
Amplifikation	68 °C	8 min	1
Überbrückung bis zur Agarose-Gelelektrophorese	4 °C	∞	1

4.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

Im nächsten Schritt wird die amplifizierte DNA nach Größe aufgetrennt. Das Prinzip der Elektrophorese liegt in der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. DNA als Polyanion wandert zur Anode. Die Agarose bildet ein Netzwerk aus intermolekularen Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen, der als Filter fungiert. Je höher die Agarose-Gelmatrix konzentriert ist, desto feiner ist der Filter und desto kleinere Fragmente können getrennt werden. Kleinere Moleküle wandern entsprechend schneller zur Anode und weiter im Gel als größere, da sie das Filternetzwerk der Agarose leichter passieren können. Für das MFN2-Gen mit einer Größe von ca. 2.500 Basenpaaren ist ein 1,2 %-Agarose-Gel (w/v) gut geeignet.

Zur Herstellung des Gels wurden 0,7 g Agarose in 60 ml TAE-Puffer (1x) durch ca. einminütiges Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Man lässt die Lösung auf 70 °C abkühlen und gibt 1 µl Midori Green Advance (Biozym®) zum Anfärben der DNA hinzu. Nun gießt man die Lösung in eine Form mit Kamm und lässt sie für 20 min zu einem Gel verhärten. Das Gel wird dann in eine Kammer, gefüllt mit 1x TAE-Puffer (Tabelle 19), gegeben und der Kamm entfernt. In die erste Tasche des Gels wurde als

Größenmarker 5 µl des 1 Kb Plus DNA *Ladder* (Thermo Fischer Scientific™) aufgetragen, in die weiteren Taschen jeweils 10 µl der PCR-Probe (von den 50 µl Totalvolumen), vorher versetzt mit 1,1 µl 10x BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Thermo Fischer Scientific™) zur Verfolgung des Standes im Gel. Nach Anlegen einer Spannung von 120 V für ca. 30 min wurde das Gel im Odyssey Fc (Li-Cor®) detektiert.

Tabelle 19: Zusammensetzung des 1x TAE-Puffers

1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (1x TAE-Puffer)	
40 mM	TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA
8,4	pH

4.1.7. PCR-Aufreinigung

Bei erfolgreicher PCR zeigt sich im Gel eine Bande bei ca. 2500 Basenpaaren, welche dem MFN2-Gen (WT, C684A, R94Q oder K109A) bzw. keine Bande (EV). Im nächsten Schritt wurden die restlichen 40 µl der PCR-Probe, die nicht auf das Gel aufgetragen wurden, mit dem MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology) aufgereinigt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

4.1.8. Sequenzierung von DNA

Die aufgereinigten PCR-Proben wurden in Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt und bei der GATC Biotech AG (Eurofins Genomics) mittels Sanger-Sequenzierung die Basenabfolge des DNA-Fragments bestimmt.

4.1.9. Transiente Transfektion eines Plasmides in MEF-Zellen

Als Plasmide werden ringförmige und doppelsträngige DNA-Moleküle bezeichnet, die in den meisten Bakterien vorkommen. Plasmide liegen extrachromosomal vor – sind also kein Bestandteil des Bakterienchromosoms – und replizieren sich selbstständig und unabhängig vom Bakterienchromosom.

Transfektion bezeichnet das Eindringen von fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet dabei eine vorübergehende transiente von einer dauerhaften stabilen Transfektion. Auf diese Weise können verschiedene Proteine überexprimiert werden. In dieser Arbeit wurde für die transiente Transfektion die

Methode der Lipofektion mittels Lipofectamine® 2000 Reagent genutzt. Lipofectamin besteht aus kationischen Liposomen, die mit der negativ geladenen zu transfizierenden DNA einen Komplex bildet, um die elektrostatische Abstoßung der Zellmembran zu überwinden (Dalby et al., 2004). Es entstehen an der Oberfläche positiv geladenen DNA-haltige Liposomen, die durch neutral geladene Co-Lipide mit der Zellmembran verschmelzen, wodurch das Plasmid in die Zelle gelangt und anschließend repliziert und exprimiert wird (Dalby et al., 2004). Nach der transienten Transfektion wird das Protein nur für einige Tage exprimiert, da die kodierende DNA nicht in das Genom der Zelle integriert wird und das Plasmid daher nach einigen Zellteilungen ausgestoßen wird.

Transfektion und Experiment verteilen sich über insgesamt vier Tage. Am ersten Tag wurden 5000 Zellen pro Well in ein μ -Slides 8 well (ibidi®) ausplattiert. Am zweiten Tag wird die eigentliche Transfektion durchgeführt. Hierfür benötigt man außer dem Plasmid (c = 1 μ g/ μ l) auch serumreduziertes Medium Opti-MEM™ und ein Transfektionsreagenz – in dieser Arbeit Lipofectamine® 2000 Reagent. Daraus pipettiert man zwei Ansätze wie in Tabelle 20 dargestellt, aus denen man dann den dritten Ansatz zusammenpipettiert. Ansatz Nr. 3 wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 μ l dieses Ansatzes pro Well auf die Zellen im μ -Slides 8 well (ibidi®) gegeben. Entsprechend wurden nun 100 μ g Plasmid-DNA pro Well transfiziert. Nun inkubiert man das Ibidi-Slide für 48 h bei 37 °C. Am Tag 4 erfolgt abschließend das eigentliche Experiment.

Tabelle 20: Protokoll zur transienten Transfektion von MEF-Zellen

Transienten Transfektion von MEF-Zellen		
Ansatz 1	100 μ l Opti-MEM™ (1x)	8 μ l Lipofectamine® 2000
Ansatz 2	125 μ l Opti-MEM™ (1x)	2,5 μ l Plasmid-DNA (c= 1 μ g/ μ l)
Ansatz 3	90 μ l von Ansatz 1	90 μ l von Ansatz 2

4.2. MEF-Zellkultur

4.2.1. Kultivierung stabiler Zelllinien

Alle sieben MEF-Zelllinien dieser Arbeit wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zusammensetzung des Zellkultur-Wachstumsmedium für MEF-Zellen (MEF-Medium) ist in Tabelle 21 aufgelistet. Zur Passage wurden die Zellen alle drei Tage bei einer Konfluenz von ca. 95 % im Verhältnis 1:20 gesplittet. Hierfür

wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und unter dem Lichtmikroskop beurteilt, ob die angestrebte Konfluenz von ca. 95% erreicht wurde. Das MEF-Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit ca. acht Milliliter (ml) *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Anschließend wurde das PBS wieder abgesaugt und 1 ml 0,05 %-Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin/EDTA) auf die Zellen gegeben. Das Trypsin-EDTA lässt man ca. 2 min auf die Zellen einwirken. Anschließend werden 9 ml MEF-Zellkulturmedium hinzugegeben, um die Trypsinierung zu stoppen und damit eine Schädigung der Zellen durch zu lange Trypsineinwirkung und das zytotoxische EDTA zu vermeiden. Das Gesamtvolumen der Zellsuspension betrug nun 10 ml. In eine neue 10 cm-Zellkulturplatte werden 9,5 ml frisches MEF-Zellkulturmedium und 0,5 ml aus der Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden somit nun 1:20 gesplittet und wieder bis zur nächsten Passage inkubiert. Die Volumina variieren je nach gewünschtem Split-Verhältnis. Der Waschschrift mit PBS ist nötig, um restliches fetales Kälberserum (FCS; *fetal calf serum*) in der Zellkulturplatte zu minimieren, andernfalls würde die Wirkung von Trypsin durch FCS inhibiert werden. Das Trypsin ist nötig, um die adhären auf der 10 cm-Zellkulturplatte wachsenden MEF-Zellen durch Auf- und Abpipettieren des Trypsins zu lösen. Dabei spaltet Trypsin mit der höchsten Substratspezifität aller Verdauungspeptidasen nur Lysin-, Arginin- und modifizierte Cysteinbindungen und löst somit den Zellverband auf. EDTA als Chelatbildner komplexiert zweiwertige Kationen wie Kalzium (Ca^{2+}). Ca^{2+} stabilisiert Membranproteine, so dass es durch Komplexbildung mit EDTA zu einer Auflösung von Zellhaftungs- und Zellstrukturen und letztendlich zur Auflösung des Zellrasens kommt (Schrödel, 2009).

Tabelle 21: Zusammensetzung des MEF-Zellkulturmedium

MEF-Zellkulturmedium (MEF-Medium)
DMEM High Glucose mit 4,5 g Glucose, L-Glutamin und Pyruvat
10 % FCS (<i>fetal calf serum</i>)
1 % P/S (Penicillin/ Streptomycin)

4.2.2. Kryokonservierung

Durch Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff können Stoffwechselfvorgänge nahezu stillgelegt und die Vitalität von Zellen entsprechend nahezu unbegrenzt aufrechterhalten werden. Dieser Vorgang wird als Kryokonservierung bezeichnet und ermöglicht, Zellen aus Kulturen zu lagern. Nach Herstellung stabiler Zelllinien ist es von Vorteil, bereits nach wenigen Passagen Zellen einzufrieren, da MEF-Zellen einen

Alterungsprozess durchlaufen und nach ca. 100 Passagen optimalerweise verworfen werden sollten. Zur Vorbereitung auf die Kryokonservierung wurden zwei Tage vor Konservierung je Zelllinie fünf 10 cm-Zellkulturschalen 1:10 ausplattiert, sodass die Zellkulturschalen am Konservierungstag mit ca. 95% Konfluenz dicht bewachsen waren. Nun wurde bei den fünf Schalen das Medium abgesaugt, vorsichtig mit PBS gewaschen, das PBS entfernt und 1 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Man lässt das Trypsin/EDTA ca. zwei Minuten auf die Zellen einwirken und gibt anschließend 9 ml MEF-Medium pro Schale hinzu und löst die Zellen vom Schalenboden. Die je 10 ml Zellsuspension aus den fünf Schalen werden nun in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen zusammengeführt und 5 min bei 1500 *revolutions per minute* (rpm) zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet vorsichtig mit PBS gespült und erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Ab jetzt sollte sehr zügig gearbeitet werden. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium besteht aus 90 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid. 1 ml dieser Suspension werden nun auf 5 Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen werden zunächst in einer Einfrierbox bei -80 °C für 24 h gelagert. Die Einfrierbox garantiert ein schonendes Einfrieren mit einer Temperatursenkung von 1 °C pro Minute. Nach den 24 h werden die Kryoröhrchen aus der Einfrierbox in eine Kryobox überführt und in einem Stickstofftank bei ca. -174 °C dauerhaft aufbewahrt.

4.2.3. Auftauen und Inkulturnahme

Um kryokonservierte MEF-Zellen wieder aufzutauen und zu kultivieren, wurde zur Vorbereitung 20 ml MEF-Medium, welches in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt wurde, in einer 10 cm- Zellkulturschale vorgelegt. Anschließend wurde das Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank geholt und ein wenig im 37 °C- Wasserbad geschwenkt, bis von den 2 ml Zellsuspension ca. 1 ml auftaute. Der aufgetaute Anteil wird in die vorbereitete Zellkulturschale pipettiert. Anschließend entnimmt man aus der Schale wiederum 1 ml warmes MEF-Medium und löst damit den noch im Kryoröhrchen verbliebenen festen Anteil. Diesen Vorgang wiederholt man ca. fünf Mal, um möglichst alle Zellen in Kultur zu bringen. Anschließend stellt man die Zellkulturschale in den Inkubator und wechselt nach 24 h wird das Medium. Bei ausreichender Konfluenz splittet man die Zellen, die nun wie gewohnt weiter passagiert werden können.

4.2.4. Bestimmung der Lebendzellzahl

Trypanblau ist ein Farbstoff, welcher nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird, womit sich diese nach Zugabe von Trypanblau blau färben, während lebende Zellen mit intakter Zellmembran ungefärbt bleiben. Lebende und abgestorbene Zellen können auf diese Weise unterschieden werden. Dazu werden 10 µl Trypanblau zu 10 µl einer Zellsuspension gegeben und anschließend 10 µl der Mischung zwischen eine Zählkammer nach Neubauer und einem Deckglas pipettiert. Diese Art von Zählkammer beinhaltet 3 x 3 Großquadranten mit 1 mm Kantenlänge und somit je 1 mm² Fläche. Zur Zellzählung zählt man alle lebenden - also nicht gefärbten - Zellen in vier äußeren Quadranten. Hierfür sind innerhalb eines Quadranten Hilfslinien zur Erleichterung eingezeichnet. Aus den vier Werten ermittelt man den Durchschnitt, multipliziert diesen mit 2 und den ermittelten Wert nochmals mit 10.000. So hat man letztendlich die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter ermittelt. (Anzahl lebender Zellen pro Quadranten x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10.000 = Anzahl lebender Zellen pro Milliliter)

4.2.5. Messung der Zellproliferation

Zur Messung der Proliferationsgeschwindigkeit wurde der RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega) verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Man gibt ein Substrat und ein Enzym zu den Zellen. Lebende Zellen können das Substrat aufnehmen und anschließend durch das Enzym reduzieren. Die entstehende Lumineszenz ist proportional zur Anzahl an lebenden Zellen in der Probe. Metabolisch nicht aktive Zellen können das Substrat nicht reduzieren und die Fluoreszenzentwicklung bleibt aus.

MEF-Zellen wurden in eine weiße 96-Well-Platte mit einer Dichte von 750 Zellen/Well ausgesät. Am selben Tag wurde das RealTime-Glo™-Reagenz (Promega, G9711) nach Herstellerangaben zu den Wells gegeben und die Gesamtlumineszenz mit einem Infinite® 200 PRO (Tecan-Reader) gemessen (Zeitpunkt (t)=0 h). Nach 24 h wurde die Lumineszenz ein zweites Mal gemessen und die Zellen wurden mit 100 µM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) behandelt. Die Lumineszenz wurde nach erneuten 24 h und 48 h erneut gemessen. Messwerte einer Leerprobe ohne Assay-Reagenz wurden subtrahiert, um die Hintergrundmessung zu berücksichtigen.

4.3. Proteinbiochemie

4.3.1. Proteinisolierung und -gewinnung durch Zellyse

Als Ausgangsmaterial für die Proteinisolation benötigt man 10 cm-Zellkulturschalen, die zu 95 % adhärent mit MEF-Zellen bewachsen sind. Das MEF-Zellkulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen mit ca. 8 ml PBS gewaschen, das PBS abgesaugt und anschließend mittels 1 ml Trypsin die Zellen von der Schale gelöst. Mittels 9 ml MEF-Zellkulturmedium wurde die Trypsinierungsreaktion gestoppt und die Suspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Nach Zentrifugation bei 1300 rpm für 3 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet wiederum mit 5 ml PBS gewaschen. Erneut wurde die Suspension für 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde nun in ca. 200-300 µl kaltem RIPA-Puffer (*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*) gelöst, in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen überführt und sofort auf Eis gelegt. Dies ist der eigentliche Schritt zur Proteinisolierung und -gewinnung. Durch die Zellyse mittels RIPA-Puffer werden Proteasen, welche zahlreich in Zellen und Gewebe enthalten sind, freigesetzt. Um zu vermeiden, dass diese Protease die isolierten Proteine abbauen, gibt man vor Nutzung pro 20 ml RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific™) eine Tablette Proteaseinhibitor (Complete Mini Protease Inhibitor, Roche) hinzu. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei einer Drehbeschleunigung von 21.100 g (g steht hierbei für Erdbeschleunigung von 9,81 m/s²), wobei in diesem Schritt die Zentrifuge auf 4 °C vorgekühlt wurde. Nach Ende der Zentrifugation befinden sich die Proteine im Überstand, der Zelldebris im Pellet des 1,5 ml-Reaktionsgefäßes.

4.3.2. Konzentrationsbestimmung der Proteinproben

Damit in den folgenden Schritten für alle Zelllinien die gleiche Proteinmenge zur Analyse aufgetragen werden kann, muss nach der erfolgten Proteinisolierung zunächst die Proteinkonzentration bestimmt werden. Hierfür wurde der sogenannte Bicinchonsäure-Test (BCA-Test, *Bicinchoninic acid-test*, Interchim®) angewandt. Das Prinzip dieses Tests basiert auf einer Komplexbildung zwischen den quantitativ zu untersuchenden Proteinen der Probe und zweiwertigen Kupfer-Ionen (Cu²⁺) der Testkit-Lösung. Proteine sind überwiegend negativ geladen, daher werden Cu²⁺-Ionen durch die Proteine der Probe entsprechend zu einwertigen Cu⁺-Ionen reduziert. Die Bicinchonsäure bindet nun die einwertigen Cu⁺-Ionen und es entsteht ein

wasserlöslicher violetter Komplex, dessen Fluoreszenz photometrisch bei 562 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Fluoreszenz-Absorption ist dabei direkt proportional zur Proteinmenge der entsprechenden Probe.

Zur Durchführung des BCA-Tests wird zunächst eine Standardreihe von Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) mit bekannten Proteinkonzentrationen (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/ml) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei wird jede Konzentration als Triplets mit je 15 µl pro Well pipettiert. Nachdem die Standardreihe pipettiert wurde, werden die Proteinproben aus dem Überstand (s. Kapitel 4.3.1.) 1:10 verdünnt - wichtig hierbei ist die Nutzung von Nuklease-freiem Wasser und gestopften Pipettenspitzen - und anschließend in Triplets mit je 15 µl pro Well in die 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Den bereits pipettierten Proteinproben werden 200 µl BCA-Reagenzgemisch (Reagenz A 1:50 in Reagenz B verdünnt) pro Well zugeführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgt die photometrische Messung am Tecan-Reader (Infinite®) bei einer Wellenlänge (λ) von 562 nm. Die Analyse und Berechnung der Proteinkonzentration erfolgten mittels Microsoft Excel. Dabei wurden die Fluoreszenz der Standardreihe als Eichung für die Messwerte der Proben genutzt. So wurden mittels Werte der Standardreihe die unbekannt Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

4.3.3. Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Page) nach Molekulargewicht aufgetrennt. Diese Methode wurde erstmals vom Schweizer Biochemiker Ulrich Karl Laemmli beschrieben (Laemmli, 1970). Bei dieser Methode dient ein Gel als Trennmedium. Proteinansatz (Nuklease-freies Wasser, Proteinprobe, fünffacher Probenpuffer) werden je in eine Tasche dieses Gels gegeben und dann eine Spannung angelegt, durch welche die Proteine letztlich getrennt werden. Die Komponenten den fünffachen Probenpuffers (s. Tabelle 23) haben hierbei wichtige Aufgaben, damit diese Trennung möglichst optimal abläuft. Das im Überschuss enthaltene SDS hat zwei Funktionen. Einerseits werden nichtkovalente Bindungen der Proteine – und somit Tertiär- und Quartätstruktur – durch Anlagerung aufgehoben. Andererseits ist SDS negativ geladen und überlagert die Eigenladung der Proteine, wodurch die Proteine allesamt gleichmäßig negativ geladen sind. Dadurch wandern sie zur Anode, stoßen sich gegenseitig ab und durch die gleichmäßige Ladung werden

sie nur nach Molekülgröße, unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt, aufgetrennt. Das dreiminütige Erhitzen der Proben dient ebenfalls der Denaturierung und Linearisierung der Proteine. Das Dithiothreitol (DTT) löst die Disulfidbrücken auf. Der TRIS-Puffer des fünffachen Probenpuffers dient der Stabilisierung des pH-Werts. Das Glycerin erleichtert das Absinken der Proben im Gel. Der Farbstoff Bromphenolblau wandert aufgrund seiner kleineren Größe im Gel schneller ab als die Proteine. Somit kann durch Beobachtung der blauen Bande des Bromphenolblau die Spannung ausgeschaltet werden, bevor die Proteine zu weit wandern und im SDS-Puffer der Elektrophoresekammer auslaufen.

Nach Ermittlung der Proteinkonzentration mittels BCA-Tests (s. Kap. 4.3.2.) gibt man in einer Excel-Vorlage die gewünschte Proteinmenge pro Probe an, die später auf das Gel aufgetragen werden soll. Nun wird ein Rezept zur Vorbereitung der Proben mittels Excel-Vorlage errechnet. In dieser Arbeit wurde pro Tasche des Gels eine Menge von 100 µg Protein in 50 µl Volumen aufgetragen. Der aufzutragende Proteinansatz setzt sich zusammen aus der errechneten Menge Nuklease-freiem Wasser, der errechneten Menge Proteinprobe und einem konstanten Volumen eines fünffachen Probenpuffers (*5x sample buffer*, für Zusammensetzung s. Tabelle 23), welche in genannter Reihenfolge zusammenpipettiert, kurz gevortext und anschließend für 3 min bei 95 °C erwärmt werden.

Für die SDS-PAGE in dieser Arbeit wurden vorgegossene Gele mit 10 Geltaschen bzw. Wells genutzt. Diese werden von der Firma Bio-Rad hergestellt (4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels). Eine Gelelektrophorese-Kammer wurde mit 1-fachem SDS-Laufpuffer gefüllt und das vorgegossene Polyacrylamid-Gel von Bio-Rad in die Kammer eingespannt. Anschließend wurden die Geltaschen beladen. In die erste Geltasche wurden 5 µl eines Markers geladen (Chameleon Duo Prestained Protein Ladder, LI-COR®). Dessen Banden dienen nachher der ungefähren Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine. In die anderen Geltaschen wurden 50 µl des Proteinansätze geladen. Es wurde eine Spannung von 300 V angelegt und eine Laufzeit von 14-20 Minuten angesetzt. Anschließend wird mit dem Western <blot fortgeföhren.

4.3.4. Proteinnachweis durch Immunodetektion nach Western Blot

Als Western Blot bezeichnet man ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Die mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine

wurden mithilfe des *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (midi 0,2 µm)* von Bio-Rad auf eine Nitrocellulose-Membran (*Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose-Membran*, Bio-Rad) übertragen. Durch Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamidgels gerichteten elektrischen Feldes binden die Proteine durch hydrophobe Bindungen an der Nitrocellulose-Membran. Die Trennmuster der Elektrophorese bleiben dabei erhalten. Spezifische Antikörper ermöglichen nun den Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran. Dieser Vorgang ermöglicht den Nachweis bereits sehr geringer Proteinkonzentrationen und wird als Immunodetektion bezeichnet. Dabei werden Primär- von Sekundärantikörpern unterschieden (Tabelle 22). Primärantikörper binden spezifisch die gesuchten Proteine und werden in Tieren (Mäusen, Ratten, Hamster und weitere Tierarten) generiert. Die verwendeten Sekundärantikörper binden wiederum an den F_c-Teil des Primärantikörper der jeweiligen Spezies, in der der Primärantikörper hergestellt wurde. Durch Anregung mit kurzwelligem Licht entsteht eine Lichtemission größerer Wellenlänge durch den Fluoreszenzfarbstoff, der am F_c-Teil des Sekundärantikörper gebunden ist. Diese Emission wird mittels Odyssey Fc (Li-Cor®) Infrarot-Detektion gemessen und das gesuchte Protein letztlich auf der Membran lokalisiert (Rassow et al., 2012).

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit dreiprozentiger Milchpulverlösung in PBS-T-Puffer (3% MP in PBS-T) bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt. So wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Es folgte die Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper (Anti-MFN2 1:500 in 3% MP in PBS-T, Anti-Actin 1:4000 in 3% MP in PBS-T) auf dem Schüttler bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-T auf einer Schüttelplatte gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG 1:15.000 in 3% MP in PBS-T) unter Lichtausschluss für 1 h bei Raumtemperatur. Durch drei 10-minütige Waschschrte mit PBS-T auf einer Schüttelplatte wurden unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran gelöst. Nach dem letzten Waschschrte wurde PBS auf die Membran gegeben und die Fluoreszenzemission der Membran nachgewiesen.

Tabelle 22: Antikörper der Immunodetektion

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-MFN2 (Abnova): 1:500 in 3% MP in PBS-T	Anti-Mouse IgG (DyLight 800 Conjugate): 1:15.000 in 3% MP in PBS-T (Cell Signaling Technology®)
Anti-Actin (Biolegend®): 1:4000 in 3% MP in PBS-T	Anti-Mouse IgG (DyLight 800 Conjugate): 1:15.000 in 3% MP in PBS-T (Cell Signaling Technology®)

Tabelle 23: Zusammensetzung des 5x Probenpuffer und 10x PBS-T

Puffer	Zusammensetzung
5x Probenpuffer	50% (v/v) Glycerol
	25% (v/v) 1M TRIS (pH 6,8)
	100 mg/ml SDS
	77 mg/ml DTT
	2 mg/ml Bromphenolblau
	ad 10 ml Milli-Q-H ₂ O
10x PBS-T, pH = 7,4	2 g Kaliumchlorid (KCl)
	2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
	11,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihdrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)
	80 g Natriumchlorid (NaCl)
	5 ml Tween 20
	ad 1 L Mili-Q-H ₂ O

4.4. Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie

4.4.1. Färbung von Mitochondrien

Zur Färbung und Analyse der mitochondrialen Form wurde der Farbstoff MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen rot fluoreszierenden Farbstoff, welcher Mitochondrien in lebenden Zellen anfärbt. Zur Analyse der mitochondrialen Form bei normalem Redox-Milieu wurden 10.000 Zellen pro Well in *μ-Slides 8 well* (ibidi®) in 250 μ l MEF-Zellkulturmedium ausplattiert. Alternativ wurden die Zellen nicht in normalem MEF-Zellkulturmedium ausplattiert, sondern in Medium, welches 100 μ M H₂O₂ bzw. 1 mM Glutathion (GSH) enthält. Nach 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator wird das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen einmal in FCS-freiem Medium gewaschen. Nun werden die Zellen pro Well mit 250 μ l von 0,2 μ M MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific) - auch dieser verdünnt in Medium ohne FCS - für 15 min inkubiert und gefärbt. Nach Inkubation wird die Färbelösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen. Nun werden die Zellen nochmals für 15 min in 250 μ l normalem MEF-Zellkulturmedium - also FCS enthaltend - inkubiert. Alternativ inkubiert man die Zellen bei 100 μ M H₂O₂ bzw. 1 mM GSH. Anschließend können die Zellen durch konfokale Mikroskopie am Leica TCS SP5 bei einer Fluoreszenzexcitation von 56 nm

und Fluoreszenzemission von 610 nm bei einer 63-fachen Vergrößerung mittels Immersionsöl live betrachtet, Bilder aufgenommen und gespeichert werden. Pro Zelllinie und Bedingung wurden an ca. 6 unabhängigen Versuchstagen ca. 50 Bilder pro Durchgang aufgenommen.

4.4.2. Analyse der mitochondrialen Morphologie

Die Live-Bilder vom Versuchstag werden gespeichert und verblindet analysiert. Ich unterschied hierfür drei Kategorien an Formen: „*fragmented*“, „*mixed*“ und „*tubular*“. Zur Vermeidung von verzerrter und voreingenommener Analyse wurden die Bilder verblindet, mehrfach analysiert, die Ergebnisse gepoolt und anschließend statistisch ausgewertet. Zur Verblindung wurde ein Programm namens „Tyche“ genutzt, Dieses ermöglicht es, Bilder hochzuladen und dann auszuwerten, ohne dass angezeigt wird, zu welcher Zelllinie und welchem Redox-Milieu dieses Bild gehört (Abbildung 14). Dieses Programm wurde von meinem ehemaligen Kommilitonen und gleichzeitigen Labor-Kollegen ██████████ programmiert und ebenso wie folgender Screenshot freundlicherweise für mich zur Nutzung zur Verfügung gestellt.

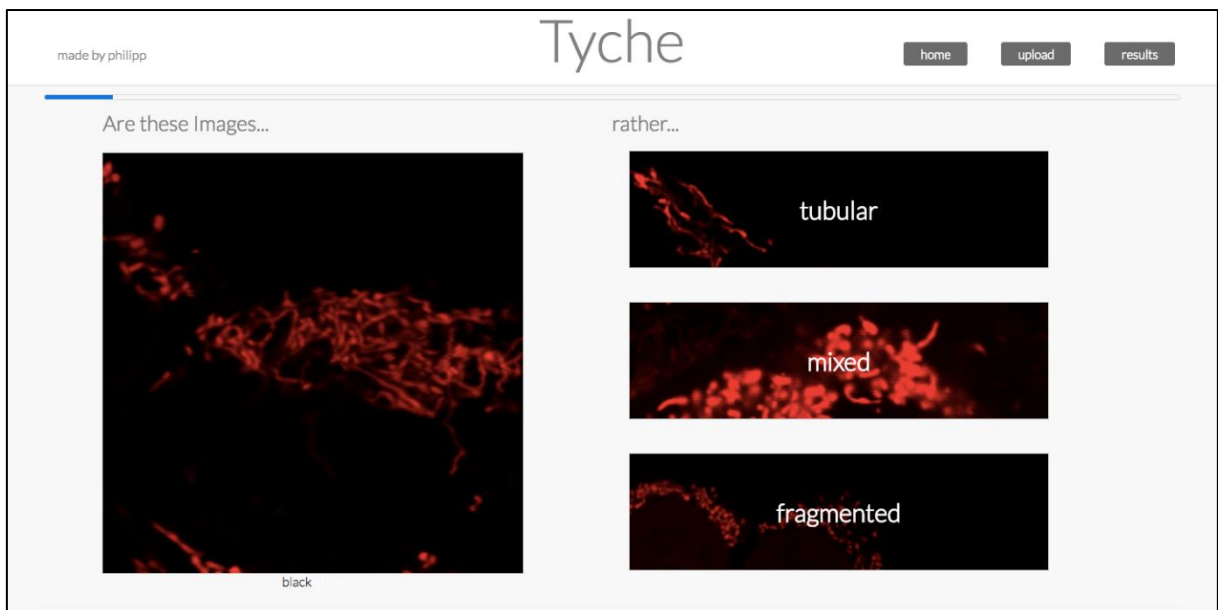


Abbildung 14: Screenshot des selbst-programmierten Online-Tools „Tyche“. Man lädt eine Datenmenge an Bildern hoch. Anschließend zeigt das Programm ein beliebiges Bild dieser Datenmenge an, wobei nicht angezeigt wird, um welche Zelllinie und um welches Redox-Milieu es sich handelt. Somit können die gesamten Bilder aller Versuchsbedingungen verblindet und unvoreingenommen analysiert werden. Nach Ende der Bewertung zeigt das Programm das Ergebnis an, welches nun mittels statistischer Analyse ausgewertet wird.

4.5. Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

4.5.1. Biochemische Grundlagen und Aufbau des Oxygraph-2k

Elektronen, die aus dem Abbau der verschiedenen Nährstoffe stammen, werden letztlich in der gemeinsamen Endstrecke des katabolen Stoffwechsels auf den letzten Elektronenakzeptor – den molekularen Sauerstoff – übertragen. Diese Endstrecke wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet und befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran. Dabei wird der molekulare Sauerstoff ionisiert und nimmt in einer stark exergonen Reaktion – auch Knallgasreaktion genannt – 2 Protonen auf, wobei Wasser entsteht. Die freiwerdende Energie wird genutzt, um einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen, der wiederum die Energie für die ATP-Synthese bereitstellt. Mehr Details zu den biochemischen Grundlagen wurden bereits in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Diese Prozesse verbrauchen in aeroben Zellen den erheblich größten Anteil des Sauerstoffs. Dieser mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde mit dem *high-resolution respirometer Oxygraph-2k* (O2k, Oroboros Instruments) gemessen. Es enthält zwei Kammern, die jeweils ein Volumen von 2 ml fassen. Jede Kammer enthält einen Sauerstoffsensor. Das Gerät ist verbunden mit einem Computer, auf dem die Oroboros-Software die kontinuierlich ermittelten absoluten Sauerstoffkonzentrationen graphisch darstellt. Die absolute Sauerstoffkonzentration (blaue Kurve) wird auf der y-Achse in nmol/ml (μM) gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen. Die Software errechnet außerdem den O_2 -Fluss pro Zellzahl (rote Kurve auf der y-Achse in $\text{pmol/s} \cdot 10^6$ Zellen), welcher mathematisch durch die negative erste Ableitungsfunktion – also die negative Steigung der Kurve der absoluten Sauerstoffkonzentration – dargestellt wird. Grundlage ist folgende Überlegung: Jede Kammer besitzt einen Stopper, welcher zu Beginn des Experiments geöffnet und somit die Kammer mit Sauerstoff gefüllt wird. In diesem Moment verbrauchen die Zellen noch den Sauerstoff aus der Raumluft. Die Sensoren kalibrieren nun und die Sauerstoffkonzentration steigt an, bis ein Maximum erreicht wird. Nachdem pro Kammer die maximal mögliche Sauerstoffkonzentration erreicht wurde, wird der Stopper geschlossen. Die Zellen in der Kammer sind nun von der Raumluft isoliert und verbrauchen den Sauerstoff der Kammern. Der Gehalt an absolutem Sauerstoff nimmt entsprechend kontinuierlich ab (blaue Kurve). Aus der Geschwindigkeit der Sauerstoffkonzentrationsabnahme (negative erste Ableitung) kann auf die „zelluläre Atmung“ zurückgeschlossen werden (rote Kurve). Je mehr bzw.

schneller die Zellen atmen, desto schneller nimmt die Sauerstoffkonzentration ab und entsprechend ist der Sauerstoffverbrauch pro Zeit höher.

Pro Kammer werden 2-4 Millionen MEF-Zellen untersucht und nach Füllen der Kammern diese durch die „Stopper“ geschlossen. Nun kann die „Routine“-Atmung bestimmt werden. Die Stopper enthalten in der Mitte eine kleine Öffnung, durch die mittels Mikropipetten von Hamilton® verschiedene Substanzen hinzugegeben werden, um verschiedene Stadien der Zellatmung zu untersuchen. Vor Beginn und nach Ende des Experiments wird das Gerät nach Herstellerangaben mit Reinstwasser und Ethanol (70% und 99,8%) gereinigt.

Nicht-permeabilisierte Zellen wurden unter Standardbedingungen oder nach 24h Behandlung mit 100 μM H_2O_2 , permeabilisierte Zellen unter Standardbedingungen, nach Behandlung mit 1 mM Glutathion (GSH) oder 1 mM Glutathiondisulfid (GSSG) untersucht. Pro Zelllinie und Redox-Milieu wurden an verschiedenen Tage 3-5 unabhängige Experimente durchgeführt.

Der Aufbau des Oroboros Oxygraph-2k wird in Abbildung 15 nochmals veranschaulicht.

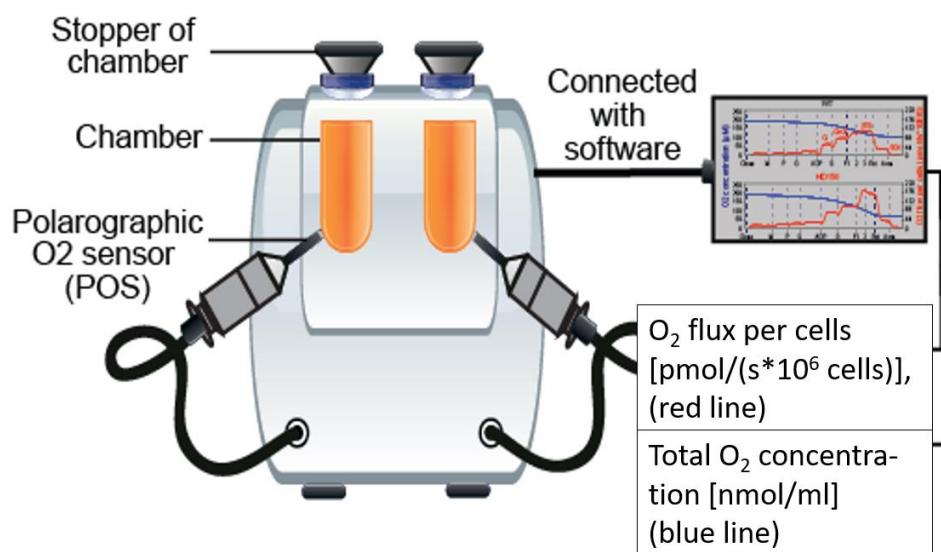


Abbildung 15: Aufbau des Oxygraph 2k (Oroboros Instruments). In zwei Kammern mit je 2 ml Volumen werden 2-4 Mio. Zellen gegeben und die Stopper werden geöffnet. Die Sauerstoffsensoren kalibrieren nun und die Sauerstoffkonzentration steigt an. Nach Kalibrierung werden die Stopper geschlossen und die Kammern somit verschlossen. Von nun an wird der Sauerstoff in der Kammer verbraucht und die Konzentration des Sauerstoffs sinkt. Das Gerät ist verbunden mit einem Computer, auf dem die Oroboros-Software (DatLab 5.1 O2k Software) die aktuelle Sauerstoffkonzentration berechnet. Die absolute Sauerstoffkonzentration (blaue Kurve) wird auf der y-Achse in nmol/ml (μM) gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen. Die Software errechnet aus der negativen Steigung der absoluten Sauerstoffkonzentration den O₂-Fluss pro Zellzahl (rote Kurve auf der y-Achse in pmol/s*10⁶ Zellen), welcher mathematisch durch die negative erste Ableitungsfunktion dargestellt wird.

4.5.2. Messung in nicht permeabilisierten, intakten Zellen

Intakte MEF-Zellen wurden einige Tage vor der Messung in eine 10 cm- Zellkulturschale ausplattiert, so dass sie am Versuchstag dicht bewachsen war. Vor der Messung wird nun das MEF-Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert, mit ca. 10 ml MEF-Zellkulturmedium resuspendiert und in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen für 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und nach Beurteilung des Zellpellets am Boden des Zentrifugenröhrchen so viel MEF-Zellkulturmedium hinzugegeben, dass eine Zellkonzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml vorliegt. Die Zellzahl wird mittels Zählkammer nach Neubauer (s. Kap. 4.2.5.) bestimmt. Nun werden 2 ml der Zellsuspension pro Glaskammer unter kontinuierlichem Rühren mit 750 rpm bei 37 °C hinzugegeben. Die Vorbereitung ist nun abgeschlossen und der Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) wird für einige Minuten kalibriert.

Nach Schließen der Glaskammern lässt sich die Ruheatmung (*routine respiration*) bestimmen. Nun wurden verschiedene Chemikalien hinzugegeben, um weitere Parameter zu bestimmen.

Zunächst werden 2,5 µM Oligomycin zur unmittelbaren Inhibition der ATP-Synthase (Komplex V) zugegeben. Normalerweise gelangen die Protonen durch den Protonengradienten, der vom Intermembranraum in die Matrix gerichtet ist, mit hoher Energiefreisetzung und Entwicklung von Wasser in die Matrix (s. Kapitel 2.1.3). Durch das Oligomycin ist der Durchtritt von Protonen durch diesen Komplex V nicht mehr möglich. Folglich diffundieren die Protonen durch die innere Mitochondriemembran, was jedoch deutlich langsamer abläuft als der Durchtritt durch Komplex V. Entsprechend ist nun ein reduzierter Sauerstoffverbrauch zu verzeichnen. Das nun gemessene Stadium wird als Leck-Atmung (*leak respiration*) bezeichnet.

Anschließend wurde schrittweise das Ionophor Carbonylzyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) in 0,5 µM-Schritten appliziert, bis ein Maximum des Sauerstoffverbrauchs erreicht wurde, also eine weitere FCCP-Applikation keine Steigerung mehr bewirkte. Schrittweise Titration von FCCP ist nötig, da es in zu hoher und zu schneller Applikation zytotoxisch wirkt. Ionophore bauen Poren in die innere Mitochondrienmembran ein, wobei das hier verwendete FCCP v.a. für Protonen sehr gut durchlässig ist. Anstelle mittels Diffusion gelangen die Protonen, welche sich im *leak*-Stadium im Intermembranraum angesammelt haben, nun durch mit jeder schrittweisen FCCP-Applikation ansteigenden Anzahl an Poren in den Matrixraum. Die Atmungskette ist nun vollständig entkoppelt und der ermittelte

maximale Sauerstoffverbrauch ist nun allein abhängig von der Geschwindigkeit der Elektronenübertragung bzw. Kapazität des Elektronentransports von Komplex I bis IV. Das Stadium nach FCCP-Titration wird daher *electron transfer system capacity* (ETS) genannt.

Der Hauptteil des Sauerstoffs wird durch die Atmungskette verbraucht. Allerdings gibt es einige Prozesse in der Zelle, die ebenfalls einen Anteil am Sauerstoffverbrauch haben. All diese sauerstoffverbrauchenden Prozesse, welche nicht der Atmungskette zuzuordnen sind, entsprechen dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Um diese nicht-mitochondrialen Prozesse zu quantifizieren werden nun mittels Applikation von 0,5 µM Rotenon und 2,5 µM Antimycin A Komplex I bzw. Komplex III gehemmt. Der Elektronentransfer der Atmungskette ist nun komplett unterbrochen. Der Sauerstoffverbrauch, welcher jetzt noch vom Oxygraph-2k gemessen wird, ist auf sämtliche nicht-mitochondriale sauerstoffverbrauchende Prozesse wie sauerstoffabhängige enzymatische Reaktionen zurückzuführen. Dieses Stadium wird daher *residual oxygen consumption* (ROX) genannt.

Ein beispielhafter Kurvenverlauf, wie ihn die Oroboros-Software (DatLab 5.1) aufzeichnet, ist in Abbildung 16 dargestellt.

4.5.3. Änderung der mitochondrialen Atmung in intakten Zellen als Reaktion auf oxidativen Stress

Zur Untersuchung von Änderungen in der mitochondrialen Atmung als Reaktion auf Variation des oxidativen Milieus wurde 24 h vor Messzeitpunkt das normale MEF-Medium durch 100 µM H₂O₂ enthaltendes MEF-Medium ersetzt. Am Versuchstag wurde vorgegangen wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben.

4.5.4. Messung in permeabilisierten Zellen

Zur Untersuchung der oxidativen Phosphorylierung in permeabilisierten Zellen wurde ein *mitochondrial substrate-uncoupler-inhibitor-titration* (SUIT) protocol durchgeführt (Pesta and Gnaiger, 2012). Zunächst werden die Zellen wie in Kap. 4.5.2. vorbereitet. Im Unterschied zu intakten Zellen muss bei später zu permeabilisierenden Zellen nach der Zentrifugation allerdings anstelle von MEF-Medium der MiRO5-Puffer (Pesta and Gnaiger, 2012) (für Zusammensetzung s. Tabelle 24) auf das Zellpellet gegeben werden. 2 ml der MiRO5-Zellsuspension werden nun pro Glaskammer in den Oxygraph-2k gegeben und kontinuierlich bei 37 °C und 750 rpm gerührt.

Nach Schließen der Glaskammern kann die Routine-Atmung (*Routine*) bestimmt werden. Nun werden 2 mM Malat (M) und 10 mM Glutamat (G) appliziert, welche die spätere Bestimmung der Aktivität von Komplex I ermöglicht. Zur Permeabilisation der Zellmembran wird nun 2 µM Digitonin pro 10⁶ Zellen hinzugegeben. Nach ca. 15 min Einwirkzeit sind alle Zellen permeabilisiert und das Stadium GM_N (Glutamat, Malat, *No Adenylates added*) kann jetzt gemessen werden.

Die Gabe von 2 mM ADP – zuvor mit 1 M Magnesiumchlorid (MgCl₂) versetzt – initiiert Zellatmung und ermöglicht die Messung des Stadiums GM_P, welches die Aktivität von Komplex I (CI) widerspiegelt.

Nun gibt man 10 mM Succinat als Substrat für Komplex II hinzu. Dies führt zu paralleler Aktivität und Elektronenaufnahme von Komplex I und II. Anschließend wird ein zweites Mal 2 mM ADP appliziert und dann das Stadium GM_{SP} (CII) bei gesättigter ADP-Konzentration gemessen. Die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran wird durch Zugabe von 10 µM Cytochrom *c* überprüft. Wenn die äußere Mitochondrienmembran intakt ist, nimmt die Respiration nach Zugabe von Cytochrom *c* um ca. 15 % zu. Anschließend wurde die ATP-Synthase mit 2,5 µM Oligomycin (Omy) inhibiert und das Stadium GMS_L (Leak-Stadium) gemessen. Mittels Titration von FCCP in 0,5 µM-Schritten wurde die maximale ETS-Kapazität (ETS, GMS_E) ermittelt. Komplex I wird durch Zugabe von 0,5 µM Rotenon inhibiert und das Stadium ETS CII (S(Rot)E) bestimmt. Die finale Gabe von 2,5 µM Antimycin A blockiert Komplex III und bringt somit die gesamte Atmungskette zum Stillstand. Der nun gemessene Sauerstoffverbrauch entspricht dem Stadium *residual oxygen consumption* (ROX), welches auf sämtliche nicht-mitochondriale sauerstoffverbrauchende Prozesse zurückzuführen ist.

Tabelle 24: Zusammensetzung des MiRO5-Puffers

Zusammensetzung des MiRO5-Puffers (Perry et al., 2013)	
EGTA	0.5 mmol/L
Taurin	20 mmol/L
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	3 mmol/L
Sucrose	110 mmol/L
Kaliumlactobionat	60 mmol/L
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	10 mmol/L
K ⁺ -HEPES	20 mmol/L
Bovine serum albumine	1 mg/mL
pH	7,1

4.5.5. Änderung der mitochondrialen Atmung in permeabilisierten Zellen als Reaktion auf Änderung des Redox-Milieus

Zur Untersuchung von Änderungen in der mitochondrialen Atmung permeabilisierter Zellen als Reaktion auf Variation des oxidativen Milieus wurde nach Permeabilisierung der Zellen mittels Digitonin – nach Messung der Ruheatmung („*Routine*“) und Zugabe von 2 mM Malat und 10 mM Glutamat – entweder 1 mM GSH oder 1 mM GSSG zu den Zellen gegeben und für ca. 15 min einwirken lassen. Anschließend wurde wie in Kapitel 4.5.4 mit der Gabe von ADP usw. fortgefahren.

4.5.6. Messung und Auswertung

Der Oroboros Oxygraph-2k ist mit einem Laptop verbunden. Die ermittelten Sauerstoffkonzentrationen und der Sauerstofffluss pro Zeit und pro Zellzahl wurden mithilfe der DatLab 5.1 O2k Software (Oroboros Instruments) kontinuierlich aufgezeichnet. Während des Experiments werden die Zugabe der einzelnen Substanzen markiert (s. Abbildung 16). Die Atmungsparameter werden über eine gewisse Zeit markiert und die Software errechnet den Mittelwert über die markierte Zeit. Die ermittelten Werte werden in eine Excel-Vorlage eingegeben, in der die *residual oxygen consumption* (ROX) von allen anderen Parametern abgezogen wird. So wird der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch und das Hintergrundsignal abgezogen und lediglich der mitochondriale Sauerstoffverbrauch der Atmungskette statistisch analysiert.

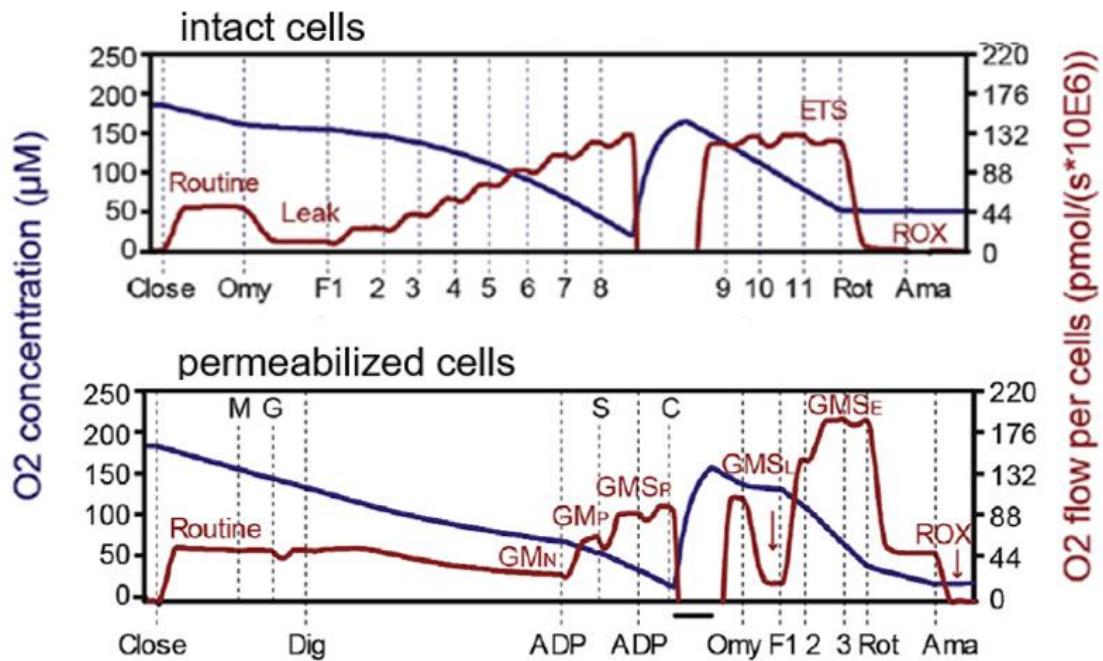


Abbildung 16: Repräsentative Kurven einer Messung mit dem Oroboros Oxygraph 2k. Die repräsentativen Kurven einer Messung mit der *high-resolution respirometry* zeigt die absolute Sauerstoffkonzentration (blaue Linie) und den Sauerstofffluss pro Zellen (rote Linie) von intakten (obere Kurve) bzw. permeabilisierten Zellen (untere Kurve). Die Applikation von Malat (M), Glutamat (G), Digonin (Dig), Adenosindiphosphat (ADP), Succinat (S), Cytochrom c (C), Oligomycin (Omy), FCCP (F), Rotenon (Rot) und Antimycin A (Ama) wird durch gestrichelte vertikale Linien markiert, während Reoxygenierung (Öffnen der Kammern bei nahezu aufgebrauchten Sauerstoff) und Wiederschließen der Kammern durch eine durchgezogene horizontale Linie markiert ist. Die verschiedenen Respirationsstadien sind in roter Schrift markiert.

4.6. Messung des zellulären ATP-Gehaltes

Für die Bestimmung des zellulären ATP-Gehalt wurde das Plasmid AT1.03^{YEMK} verwendet (Bermejo et al., 2010). Dieses wurde wie in Kapitel 4.1.9 beschrieben transient transfiziert. N-terminal ist das blau fluoreszierende Protein mseCFP (*Monomeric super enhanced variant of the cyan fluorescent protein*) und C-terminal das gelb fluoreszierende Protein mVenus angehängt. Die Messung basiert auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Hierbei wird nach Anregung eines ersten Farbstoffes die Energie auf einen zweiten Farbstoff übertragen. Bindung von ATP führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und zu einem Energietransfer. Die Exzitation erfolgte mit Licht der Wellenlänge 405 nm und anschließend wurde das Verhältnis mVenus (525nm/600nm) zu mseCFP (465nm/508nm) der Emissionspeaks ermittelt. Dies entspricht dem relativen ATP-Gehalt der Zelle. Die Messung erfolgte am konfokalen Mikroskop Leica TCS SP5 bei 63-facher Vergrößerung mithilfe eines Immersionsöls. Die Fluoreszenz-Intensität wurde mittels ImageJ ausgewertet und letztlich mit GraphPad Prism 8 analysiert.

4.7. Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Atmungskette und ATP-Synthase sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. NADH + H⁺ und FADH₂, die v.a. aus dem Nährstoffabbau im Citratzyklus entstehen, werden in den Komplexen I bis IV der Atmungskette in exergonen Redox-Reaktionen reduziert. Die freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum zu pumpen – wobei das Innere der inneren Mitochondrienmembran negativ und die Außenseite positiv geladen wird. So entsteht ein Konzentrationsgefälle der Protonen (chemischer Gradient) und ein Spannungsgradient vom Intermembranraum in die Matrix (elektrischer Gradient). Dieser elektrochemische Gradient, das mitochondriale Membranpotential, treibt Komplex V (ATP-Synthase) zur ATP-Produktion an. Ein erhaltenes mitochondriales Membranpotential ist dementsprechend wichtig für die Funktion von Mitochondrien und kann zur Beurteilung des Zustandes von Mitochondrien herangezogen werden. Zur Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials wurde der Farbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) verwendet. Dabei handelt es sich um einen zellmembrangängigen roten Farbstoff, welcher sich in intakten Mitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) anreichert. Je höher das mitochondriale Membranpotential, desto höher ist die Intensität des Fluoreszenzsignals.

Zwei Tage vor Durchführung des Experiments wurde ein μ -Slide 8 Well (ibidi ®) mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Nach 24 h wurden pro Well 20.000 Zellen ausplattiert und über Nacht in MEF-Zellkulturmedium inkubiert. Am Versuchstag wurde das MEF-Medium entfernt und die Zellen in 25 nM TMRM in Tyrode-Lösung (für Zusammensetzung s. Tabelle 25) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit gefärbt. Nach 30 Minuten wird der Färbeansatz entfernt und die Zellen mit Tyrode-Lösung gewaschen und letztlich für die Live-Messung mittels konfokaler Mikroskopie in 250 μ l Tyrode-Lösung belassen. Um Zellschäden zu vermeiden, wurde für die Exzitation der Laser mit 561 nm mit der geringstmöglichen Intensität (für Fotos ca. 10%, für Videos ca. 3%) benutzt. Die Emission wurde bei ca. 590 nm Wellenlänge registriert.

Zu Beginn wurde das basale Membranpotential für 2 min gemessen, anschließend wurden Oligomycin (Hemmer von Komplex V, $C_{\text{end}}=0,25 \mu\text{M}$), Rotenon (Hemmer von Komplex I, $C_{\text{end}}=5 \mu\text{M}$) und FCCP (als Entkoppler der Atmungskette, $C_{\text{end}}=1 \mu\text{M}$) zu den Zellen gegeben und Änderungen des Fluoreszenzsignals für jeweils 5 min gemessen.

Die Signalintensität der Zellen in den aufgenommenen Videos wurden mit der Leica LAS AF Lite Software gemessen und anschließend mit GraphPad Prism 8 statistisch ausgewertet.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Tyrode-Lösung

Zusammensetzung der Tyrode-Lösung	
Natriumchlorid (NaCl)	145 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5 mM
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	1,5 mM
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1 mM
Glucose	10 mM
HEPES	10 mM
pH	7,4

4.8. Messung des zellulären Glutathion-Gehalts

Die wichtigste biologische Funktion von Glutathion ist seine Aufgabe als Antioxidans. Durch Aufnahme der Elektronen wird die Thiolgruppe des Cysteins reduziert, Elektronen reaktiver Sauerstoffspezies entgiftet, oxidativer Stress verringert und Zellschäden gelindert. Bei niedrigem GSH-Level ist die Zelle vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt ist (Griffith and Meister, 1979). Der Oxidationsschutz der Zelle korreliert also mit der GSH-Menge, weswegen die Bestimmung des GSH-Gehalts einen Rückschluss auf den Zustand des antioxidativen Apparats zulässt.

Basierend auf den biochemischen Reaktionen lässt sich experimentell der GSH-Gehalt in Zellen messen. Das Experiment verteilt sich auf insgesamt 4 Tage. An Tag 1 werden 200.000 MEF-Zellen pro Well in eine 6 Well-Zellkulturplatte ausplattiert. An Tag 2 wird das MEF-Medium entfernt und entweder wiederum mit MEF-Medium ohne H₂O₂ oder aber mit MEF-Medium inkl. 100 µM H₂O₂ – je nach gewünschtem Redox-Milieu – ersetzt. An Tag 3 werden die Zellen einmal mit kaltem PBS (vorher bei -20 °C gekühlt) gewaschen. Die Zugabe von 200 µl PBS/2mM EDTA (50 ml PBS + 200 µl 0,5 M EDTA) pro Well und der Einsatz eines Zellschabers führen zur Ablösung der Zellen, die jetzt in ein 1,5 ml- Reaktionsgefäß – bereits mit 100 µl 10% Sulfosalicylsäure (0,5g *Sulfosalicylic acid* (SSA) in 5 ml dH₂O) gefüllt – pipettiert werden. Das SSA präzipitiert die Proteine. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis und einem Schüttler werden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. 280 µl des Überstands werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, das schon 24 µl

Triethanolamin (TEA) / H₂O (1:1, 500 µl TEA + 500 µl dH₂O) enthält. Nachdem der restliche Überstand verworfen wurde, wird das Zellepellet in 100 µl 0,2 N NaOH aufgenommen und über Nacht bei 37 °C gelagert. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Überstand und TEA wird nun für den GSH-Assay genutzt. In eine 96-Well-Platte werden pro Well je 20 µl der GSH-Standardreihe (0; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5, 10, 20 µg/ml) als Duplikate und 20 µl der Proben mit je 80 µl dH₂O pipettiert. 100 µl des Assay-Mix (0,6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoicacid) (DTNB), 0,8 mM NADPH und Glutathion-Reduktase in Assay-Puffer (100 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 7,5)) werden jetzt pro Well hinzu pipettiert und anschließend unmittelbar die Lumineszenz bei 390 nm mit dem Tecan 2000 Reader minütlich für 30 Minuten gemessen. Die GSH-Reduktase reduziert oxidiertes Glutathion (GSSG) zu GSH (Reaktion 1). Das GSH wiederum wird in einer zweiten nichtenzymatischen Reaktion zum gelb fluoreszierenden 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB⁻) oxidiert. Diese Fluoreszenz misst man letztendlich.

Reaktion 1: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$

Reaktion 2: $2 GSH + DTNB \rightarrow GSSG + 2 TNB^-$

An Tag 4 wird ein BC-Assay mit den bei 37 °C in 0,2 N NaOH aufgenommenen Zellpellet durchgeführt (s. Kapitel 4.3.2) und somit die Proteinkonzentration bestimmt. Mittels Microsoft Excel werden die ermittelten GSH-Werte auf die ermittelte Gesamtproteinkonzentration der Probe normalisiert, wodurch man letztlich den GSH-Gehalt der Zelle in der Einheit nmol/mg Protein herauskriegt.

4.9. Messung des zellulären Gehaltes an reaktiven Sauerstoffspezies

CellROX® *Green Reagent* (Life Technologies™) ist ein membrangängiger grüner Farbstoff, der die Messung von oxidativem Stress in lebenden Zellen ermöglicht. In reduziertem Zustand zeigt er nur eine schwache Fluoreszenz. Nach Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entsteht eine hellgrüne Fluoreszenz mit Absorptions- bzw. Emissionsmaximum bei 490 bzw. 530 nm.

15.000 Zellen pro Well werden in ein µ-Slide 8 Well (ibidi®) ausplattiert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit MEF-Medium ohne FCS gewaschen und anschließend 5 µM CellROX® *Green Reagent* (verdünnt in FCS-freiem MEF-Medium) auf die Zellen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wird die Färbe-Lösung entfernt und

die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Als letzter Schritt wird nun 250 µl normales MEF-Zellkulturmedium (inkl. FCS) pro Well verabreicht und die Messung an lebenden Zellen an einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP5 bei 63-facher Vergrößerung durch Immersionsöl) durchgeführt. Dafür wurde als Absorptionsmaximum 490 nm und als Emissionsmaximum 530 nm eingestellt. Mittels ImageJ wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen und die unspezifische Hintergrundfärbung abgezogen. Pro Zelllinie wurden 5 unabhängige Messungen an verschiedenen Tagen mit je 20 Zellen durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 8.

4.10. Kalziumhaushalt

4.10.1. Messung der mitochondrialen Kalziumkonzentration

Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle im zellulären und mitochondrialen Kalziumhaushalt (Rizzuto et al., 1992). Zur Messung des Kalziumgehalts in Mitochondrien wurden zwei Plasmide (CEPIA3mt und Mito-TurboFarRed) transient in MEF-Zellen transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsprotokoll aus Kapitel 4.1.9 verwendet. CEPIA3mt ist das Plasmid für die eigentlichen Kalzium-Messung (Suzuki et al., 2014). Das exprimierte Protein fluoresziert bei Kalziumbindung grün. Die Fluoreszenz korreliert dabei mit der mitochondrialen Kalziumkonzentration und dem Level der Genexpression. Um den Effekt der Genexpression zu neutralisieren, wurden die Zellen mit einem weiteren Plasmid kotransfiziert. Bei diesem handelt es sich um Mito-TurboFarRed, einem rot fluoreszierenden mitochondrialen Marker. Die Intensität der Fluoreszenz (Ex. 490 nm/ Em. 540 nm) von CEPIA3mt wurde mittels ImageJ gemessen und auf die Fluoreszenz von Mito-TurboFarRed (Ex. 570 nm / Em. 640 nm) normalisiert. Pro Zelllinie wurden 3 unabhängige Messungen an verschiedenen Tagen mit je 50 Zellen am konfokalen Mikroskop Leica TCS SP5 bei 63-facher Vergrößerung mit Immersionsöl durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 8.

4.10.2. Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)

Durch den Kalziumfluss aus dem ER in das Zytosol sinkt die Konzentration von Kalzium im ER. Im sogenannten *store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)* fließen Kalziumionen durch die *store-operated Ca^{2+} channels (SOCs)* von extra- nach intrazellulär. Dadurch werden die Kalziumspeicher des ER wieder aufgefüllt und der

Kalziumeintritt in die Zelle durch negative Rückkopplung gestoppt (Prakriya and Lewis, 2015, Raffaello et al., 2016).

Eine 96-Well-Platte mit schwarzem Boden wurde mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Am nächsten Tag wurde das PLL entfernt, die Platte wurde einmal mit PBS gewaschen und 7500 MEF-Zellen pro Well wurden in 100 µl MEF-Medium ausplattiert. Nach 24 h wurde das MEF-Medium durch eine Färbelösung (HBSS -/- (ohne Magnesium, ohne Kalzium) + 0,5 mM EGTA + 30 mM HEPES + 1 mM MgCl₂ + 5,6 mM Glucose und 2 µM Rhod-2 AM bzw. 5 µM Fluo-8) ersetzt und 30 Minuten inkubiert. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Ca²⁺-Marker verwendet. Nach Ca²⁺-Bindung nimmt die Fluoreszenzintensität zu. Rhod-2-AM (Ex / Em: 552/581 nm) ist ein mitochondrialer, Fluo-8-AM (Ex / Em 490/520 nm) ein zytosolischer Ca²⁺-Marker. Nach der Inkubation wurde die Färbelösung durch HBSS -/- (+ 0,5 mM EGTA + 30 mM HEPES + 1 mM MgCl₂ + 5,6 mM Glucose) ersetzt und die Messung mit einem Tecan Infinite® 200 PRO Multimode-Lesegerät durchgeführt. Die Basiswerte wurden eine Minute lang gemessen, dann wurden 3 µM Thapsigargin, 2,7 mM Ca²⁺ und 1 µM FCCP manuell appliziert und nach jeder Injektion jeweils 5 Minuten lang messen. Thapsigargin hemmt die Kalziumwiederaufnahme des ER durch die SERCA (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007) und induziert einen *store operated calcium entry* (SOCE).

4.11. Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Programm GraphPad Prism 8 mittels dem One-Way ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests ermittelt, wobei $\alpha = 5\%$ festgelegt wurde. Ermittelte Werte wurden graphisch unter Abbildung des Standardfehlers des Mittelwerts (*standard error of the mean, SEM*) dargestellt. Je höher die statistische Signifikanz, desto mehr Sternchen sind über den verglichenen Wertsäulen dargestellt (p-Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); p ≤ 0.05 (*); p ≤ 0.01 (**); p ≤ 0.001 (***) ; p ≤ 0.0001 (****)).

5. Ergebnisse

5.1. Erfolgreiche Generierung stabiler Zelllinien mit MFN2-Mutationen

Um den Effekt von Mutationen im MFN2-Protein bzw. von MFN2-KO auf die Form und Funktion der Mitochondrien zu untersuchen, wurden Zelllinien generiert, welche in vorbeschriebenen MFN2-KO-MEF-Zellen (Chen et al., 2003) Wildtyp-Mitofusin 2 oder mutiertes MFN2 (C684A, R94Q oder K109A) exprimieren. Die transfizierten Plasmide sind in Abbildung 17A schematisch dargestellt.

Die Zelllinien wurden mit dem PiggyBac-Transposon-System generiert. *Inverted terminal repeat sequences* (ITR) flankieren die zu transfizierende DNA. Das Enzym PiggyBac-Transposase (PBase), dessen Gen in die Zellen co-transfiziert wird, bindet an diese ITR-Sequenzen und schneidet die DNA an diesen Stellen. Repetitive TTAA-Sequenzen im Kerngenom der Zielzelle werden von der PBase erkannt, in welche sie dann die ausgeschnittene, ITR-flankierte DNA einfügt (Elick et al., 1996).

Die Plasmide kodieren außer für MFN2 auch für das rot fluoreszierende mCherry, welches als Kontrolle für den Transfektionserfolg genutzt wird. So folgte der Transfektion die Sortierung der mCherry-positiven Zellen, also der erfolgreich transfizierten Zellen, mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Der EV enthält eine weitere mCherry-Sequenz anstelle des MFN2-Gens und dient als Negativkontrolle.

Zur Validierung des Fehlens von MFN2 in den KO-Zellen und EV exprimierenden Zellen sowie zur Bestätigung des quantitativen gleichen MFN2-Gehalts in den stabil generierten Zelllinien wurde eine Proteinisolierung mit anschließender Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot durchgeführt (Abbildung 17C). Die Quantifizierung bestätigte, dass die KO- und EV-Zellen keine MFN2-Bande zeigten, also kein MFN2 exprimieren. Die Zelllinien, die durch Transfektion der KO-Zellen entstanden sind, zeigten quantitativ vergleichbare Mengen an MFN2. Die unbehandelten Wildtyp-MEFs weisen eine im Vergleich zum Mausgehirn (Brain) und den überexprimierten KO-MFN2-MEFs eine geringere MFN2-Menge auf (Abbildung 17D). Unterschiedliche Expressionslevel von MFN2 in verschiedenen Geweben wurde bereits beschrieben. So wurde gezeigt, dass die stärkste MFN2-Expression aller

Gewebe im Nervengewebe vorliegt, was die geringere Expression in Wildtyp-MEFs im Vergleich zum Gehirnlisat erklären könnte (Eura et al., 2003).

Mittels Isolierung genomischer DNA und anschließender PCR mit folgender Agarose-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, welche der generierten Zelllinien MFN2-Banden vorweisen, also das MFN2-Gen enthalten. Die folgende Abbildung 17B zeigt die Banden der Gelelektrophorese. Hierbei kann man schon verifizieren, dass mit EV transfizierte MFN2-KO-Zellen keine MFN2-Bande vorweisen, während die mit WT- bzw. mutiertem MFN2 transfizierten KO-Zellen eine Bande aufweisen. Um zu verifizieren, dass dieses in den Banden nachgewiesene MFN2-Gen die gewünschte Mutation vorweist, wurde eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Die Punktmutationen im MFN2-Gen wurden hierbei als korrekt validiert.

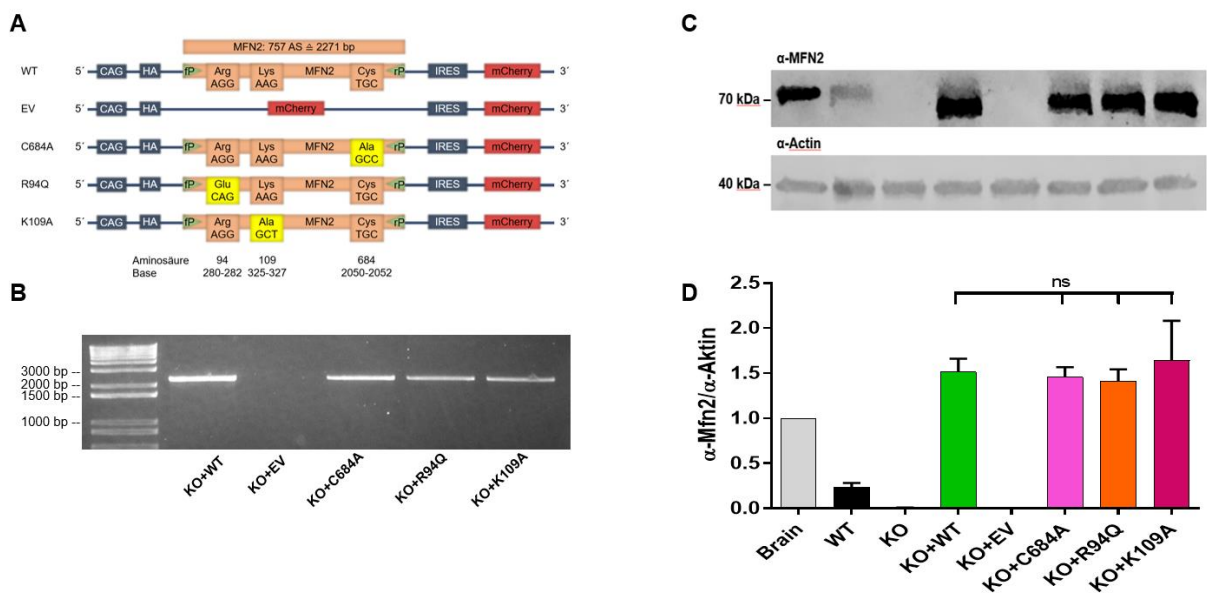


Abbildung 17: Western Blot und PCR validieren erfolgreiche Generierung stabiler Zelllinien. Abbildung **A** zeigt schematisch die stabil transfizierten Plasmide und Teil **B** das Ergebnis der PCR mit fehlender MFN2-Bande in EV-Zellen. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und die Mutationen als korrekt bestätigt. Nach Proteinisolierung aus den generierten Zelllinien und einer Kontrolle (Gehirnlisat) mit anschließender Gelelektrophorese und Western Blot wurde die Membran immunodetektiert. **C** zeigt die immunodetektierte Nitrocellulosemembran mit Größenmarker und Banden für MFN2 und Aktin. **D** zeigt die densitometrische Quantifizierung von vier verschiedenen Western Blots, wobei man sieht, dass in KO-Zellen überexprimiert mit MFN2(WT), MFN2(C684A) MFN2(R94Q) und MFN2(K109A) die gleichen Mengen an MFN2 exprimiert werden, sowie dass in KO- und EV-Zellen die Expression vollständig fehlt.

5.2. WT- und C684A-MFN2 machen durch MFN2-Mangel verursachte mitochondriale Fragmentierung rückgängig, während R94Q- und K109A-MFN2 eine vermehrte mitochondriale Fragmentierung verursachen

Nach Färbung der Zellen mit dem mitochondrialen Farbstoff MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific™) untersuchte ich die mitochondriale Form mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür wurden die Kategorien „fragmentiert“, „gemischt“ und „tubulär“ definiert (Beispielbilder in Abbildung 18A).

Diese Analyse offenbarte den erwarteten Anstieg fragmentierter Mitochondrien in KO-Zellen und in KO-Zellen, die EV exprimieren, aber keinen Unterschied zwischen WT und C684A-MFN2 exprimierenden Zellen (Abbildung 18A), woraus sich schließen lässt, dass dieser Cysteinrest bei der Kontrolle der mitochondrialen Form unter Ruhebedingungen nicht beteiligt ist. Allerdings zeigte sich, wie bereits in der Literatur für die K109A-Mutation beschrieben (Niemann et al., 2005), bei Expression der Mutationen R94Q und K109A, welche in der GTPase-Region des Mfn2-Proteins liegen, eine vermehrte Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes (Abbildung 18 A). Diese Beobachtung unterstreicht Defizite in der mitochondrialen Fusion bei veränderter GTPase-Region und bestärkt die in der Literatur beschriebene Wichtigkeit der GTPase-Region für diesen Prozess (Koshihara et al., 2004).

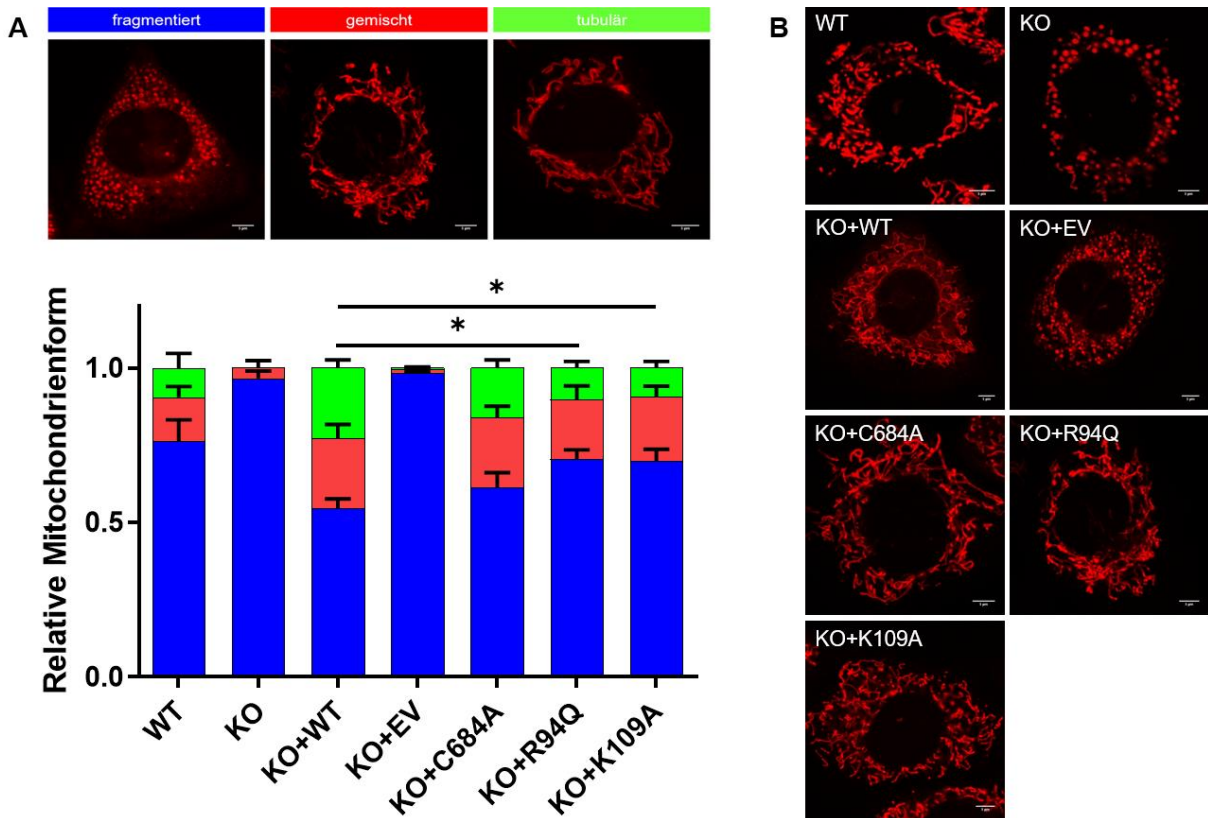


Abbildung 18: Vermehrte mitochondriale Fragmentierung in EV-, R94Q- und K109A-Zellen. Abbildung A zeigt im oberen Teil repräsentative Bilder jeder Kategorie. Die Zellen wurden nach der Form ihrer Mitochondrien als tubulär, gemischt oder fragmentiert kategorisiert. Im unteren Teil ist die Quantifizierung nach verblindeter Auswertung dargestellt. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM der relativen mitochondrialen Form von mindestens 4 verschiedenen Experimenten mit je mehr als 50 Zellen an. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***) ; $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde. Nicht dargestellt ist die sehr starke Signifikanz zwischen Zellen ohne MFN2 und allen anderen Zelllinien (****). **B.** Beispielbilder der mitochondrialen Morphologie der verschiedenen Zelllinien, welche mit MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific™) gefärbt wurden. Es fällt eine deutliche Fragmentierung in Zellen ohne MFN2 (KO und KO+EV) sowie eine im Vergleich weniger deutliche, jedoch signifikante, vermehrte Fragmentierung in R94Q und K109A-Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf.

5.3. Mutiertes Mitofusin-2 reagiert mit vermehrter mitochondrialer Fragmentierung auf oxidativen Stress

Neben Bestimmung der Mitochondrienform unter Basalbedingungen wurde das Experiment unter mildem oxidativem Stress wiederholt. Dafür versetzte ich das MEF-Medium 24 h vor Untersuchung der mitochondrialen Form mit geringen Konzentrationen Wasserstoffperoxid (100 μ M). Diese Konzentration entspricht einer intrazellulären H_2O_2 -Konzentration von 1 μ M und gilt als milder oxidativer Stress (Sies, 2017). Mittels Mikroskopie konnte dies bestätigt werden, da es bei dieser

Konzentration zu keinem sichtbaren Zelltod in Wildtyp-Zellen kam. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen 24 h vor Messung mit 1 mM GSH versetzt. Es zeigte sich, dass mutiertes MFN2, egal ob C684A, R94Q oder K109A, unter oxidativem Stress eine vermehrte mitochondriale Fragmentierung im Vergleich zur Messung unter Basalbedingungen zeigte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mutationen im MFN2-Protein die Mitochondrien anfälliger für oxidativen Stress machen, was im Falle der R94Q-Mutation möglicherweise bei der Pathogenese der CMT2A eine Rolle spielen könnte. Auf der anderen Seite verursachte die Behandlung mit GSH ein vermehrt tubuläres mitochondriales Netzwerk, wobei sich hierbei lediglich bei K109A und R94Q signifikante Ergebnisse zeigten und der Effekt geringer als der korrespondierende Effekt nach Wasserstoffperoxid-Behandlung war (Abbildung 19). Intaktes MFN2 könnte also eine Rolle in den Mechanismen gegen oxidativen Stress spielen. Oxidativer Stress führte in dieser Arbeit zu einer mitochondrialen Fragmentierung, jedoch nur bei Expression von mutiertem MFN2. Wildtyp-MFN2 zeigte sich resistent gegen milden oxidativen Stress.

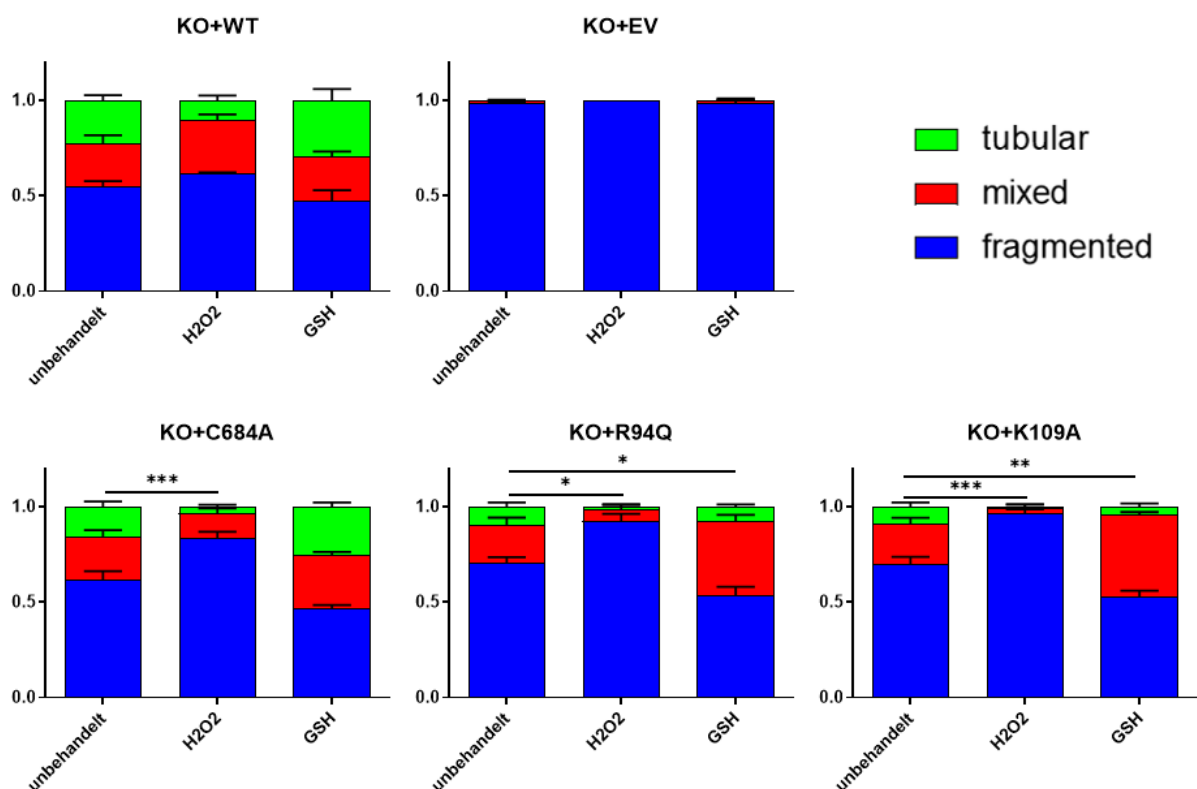


Abbildung 19: Mutiertes Mitofusin-2 reagiert mit vermehrter mitochondrialer Fragmentierung auf oxidativen Stress. Während sich der Wildtyp weitgehend unverändert vor und nach oxidativem Stress oder Zugabe von GSH zeigt, zeigt sich mutiertes MFN2 sensibel auf Änderungen des oxidativen Milieus. Es zeigt sich eine Fragmentierung als Reaktion auf oxidativen Stress, während GSH zu vermehrt tubulären oder gemischten Mitochondrien führt. EV-Zellen zeigten sich unter allen Bedingungen fast ausschließlich fragmentiert. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***) ; $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde.

5.4. Unter Basalbedingungen vermehrter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch MFN2-defizienter Zellen bei reduziertem Membranpotenzial ($\Delta\Psi_{mt}$) und gleicher ATP-Konzentration

Durch hochauflösende Respirometrie mit dem Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) wurde die Zellatmung quantifiziert, um zu bestimmen, ob sich die Zelllinien in ihrer basalen Mitochondrienatmung unterscheiden.

Nach Aufnahme der Ruheatmung (*Routine*) folgte die Zugabe von Oligomycin, wodurch die ATP-Synthase (Komplex V) gehemmt wurde. Nun diffundieren die Protonen nicht-phosphorylierend durch die innere Mitochondriemembran, was deutlich langsamer abläuft als der Durchtritt durch Komplex V. Entsprechend ist nach Zugabe von Oligomycin ein Stadium reduzierten Sauerstoffverbrauchs zu beobachten, welches als Leck-Atmung (*leak-respiration*) bezeichnet wird. Dieses Stadium entspricht dem Sauerstofffluss, welcher Protonenleck, Protonenschlupf, Elektronenschlupf und Kationencycling (Ca^{2+} , K^+) ausgleicht.

Sowohl im Stadium *Routine* als auch *Leak* war in Zellen ohne MFN2-Expression eine im Vergleich zu den restlichen Zelllinien deutlich erhöhte Zellatmung zu verzeichnen. Dies war sowohl für die ursprünglichen KO-Zellen (Chen et al., 2003) als auch für die KO-Zellen, in welchen ein *Empty Vector* ohne MFN2-Gen (Abbildung 13) exprimiert wird, zu beobachten.

Durch Titration des Entkopplers und Protonophors FCCP wurde der Sauerstoffverbrauch stimuliert, um die maximale Kapazität des Elektronentransferssystems (ETS-Stadium) zu bestimmen. Die optimale FCCP-Konzentration sorgt hierbei für einen maximalen Sauerstofffluss, welcher der maximalen entkoppelten Zellatmung entspricht (Pesta and Gnaiger, 2012). Auch in diesem ETS-Stadium zeigte sich in Zellen ohne Mfn2 eine im Vergleich zu Wildtyp- und mutiertem Mfn2 gesteigerte Zellatmung.

Zur Korrektur von nicht-mitochondrialem Sauerstoffverbrauch wurde mittels Rotenon Komplex I und mittels Antimycin A Komplex III gehemmt. Die Atmungskette ist nun komplett zum Stillstand gekommen, wodurch der nun gemessene Sauerstoffverbrauch auf Autooxidationsreaktionen und anderen zellulären Sauerstoffverbrauch wie enzymatisch durch Oxidase und Peroxidase katalysierte Reaktionen zurückzuführen ist (Pesta and Gnaiger, 2012). Dieser ermittelte ROX-Wert zeigte sich in allen Zelllinien

gleich hoch und wurde von den zuvor gemessenen Werten des Sauerstoffflusses abgezogen, womit nur der mitochondriale Sauerstoffverbrauch in die Analyse eingebracht wurde.

Zusammenfassend war der Sauerstofffluss pro Zelle [$\text{pmol}/(\text{s} \cdot 10^6 \text{ Zellen})$] in den Stadien *Routine*, *Leak* und *ETS* in Zellen ohne MFN2 im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp- oder mutiertem MFN2 signifikant erhöht (Abbildung 20A/B). Diese Beobachtung wurde bereits zuvor beschrieben (Kawalec et al., 2015).

Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Zellatmung sich auch auf die ATP-Produktion auswirken, wurde mittels transienter Transfektion des Plasmids AT1.03^{YEMK} der ATP-Gehalt in allen Zelllinien bestimmt (Bermejo et al., 2010). Die Messung basiert auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) und erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Dabei zeigten sich in allen Zelllinien vergleichbare ATP-Konzentrationen (Abbildung 20C). Eine vermehrte ATP-Menge, wie man sie aufgrund der im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhten Zellatmung in MFN2-defizienten Zellen vermuten könnte, war also nicht feststellbar. Anschließend untersuchte ich das mitochondriale Membranpotential mittels des Farbstoffs Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM), einem zellmembrangängigen roten Farbstoff, welcher sich in intakten Mitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) anreichert. Zu Beginn wurde das basale Membranpotential für 2 min gemessen, anschließend wurden Oligomycin (Hemmer von Komplex V), Rotenon (Hemmer von Komplex I) und FCCP (als Entkoppler der Atmungskette) zu den Zellen gegeben und Änderungen des Fluoreszenzsignals für jeweils 5 min gemessen. Hierbei zeigte sich in MFN2-defizienten Zellen ein ca. um 50 % niedrigeres mitochondriales Membranpotential als in Wildtyp-Zellen (Abbildung 20 D). Zusammenfassend zeigte sich in Mitochondrien MFN2-defizienter MEF-Zellen also ein vermindertes Membranpotential und ein erhöhter Sauerstoffverbrauch bei gleichbleibendem ATP-Gehalt im Vergleich zu Wildtyp Zelle. Dies könnte so gedeutet werden, dass der beobachtete erhöhte mitochondriale Sauerstoffverbrauch als Kompensation des zusammengebrochenen Membranpotenzials dient, um die ATP-Produktion auf physiologischem Level zu halten und die Energiebereitstellung für die Zelle zu gewährleisten. MFN2 scheint also eine Rolle in der Gewährleistung einer effizienten ATP-Produktion zu spielen.

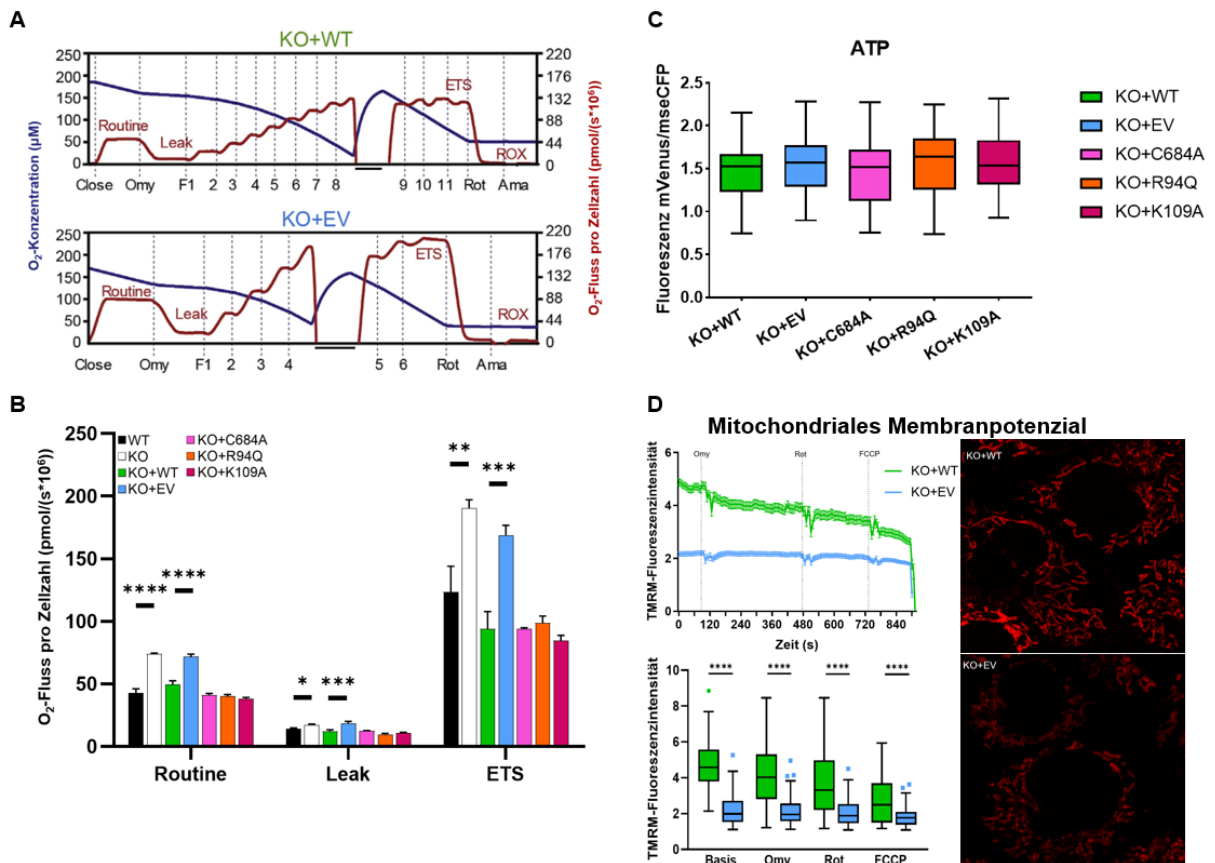


Abbildung 20: Vermehrter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch MFN2-defizienter Zellen bei reduziertem Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und gleicher ATP-Konzentration. **A.** Repräsentative Kurven (oben KO+WT, unten KO+EV, jeweils unbehandelt in intakten Zellen) der Respirometrie mittels Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) zeigen die Sauerstoffkonzentration (blaue Linie) und den Sauerstofffluss pro Zelle (rote Linie) an. Die Applikation von Oligomycin (Omy), FCCP (F), Rotenon (Rot) und Antimycin A (Ama) ist markiert. Ebenso sind die verschiedenen Stadien der Zellatmung (Routine, Leak, ETS, ROX) angegeben. **B.** Sauerstofffluss pro Zellzahl korrigiert auf ROX. Basale zelluläre Routineatmung, Leak-Atmung und ETS-Kapazität waren allesamt erhöht in Zellen ohne MFN2 (KO und KO+EV) im Vergleich zum Wildtyp und mutierten MFN2. Die Balkendiagramme zeigen den mittleren O₂-Fluss pro Zelle \pm SEM von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in zweifacher Ausfertigung. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***); $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde. **C.** Der Box-Plot zeigt das Verhältnis des gelben Kanals mVenus (525nm/600nm) zum blauen Kanal mseCFP (465nm/508nm) der Emissionspeaks an, was dem zellulären ATP-Gehalt entspricht. Hierbei fand sich k in allen Zelllinien ein gleicher ATP-Gehalt wieder. **D.** Die Intensität des Farbstoffs Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM), welcher sich in intakten Mitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) anreichert, offenbarte ein deutlich reduziertes mitochondriales Membranpotential in MFN2-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-MFN2-exprimierenden Zellen zu jedem Zeitpunkt des Experiments (**D**, unten links). Ein repräsentativer Verlauf eines Experiments ist in **D** oben links dargestellt. Die Zeitpunkte der Zugabe von Oligomycin (Omy), Rotenon (Rot) und FCCP sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Rechts sieht man Beispielbilder des basalen Membranpotenzials sind in, wobei man eindeutig ein schwächeres Signal in EV-Zellen bemerkt. Ebenso sieht man das deutlich fragmentierte Mitochondriennetzwerk im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten wurden erhoben aus jeweils 4 unabhängigen Experimenten mit Untersuchung von je 20 Zellen (TMRM) bzw. mindestens je 50 Zellen (AT1.03^{YEMK})

5.5. Milder oxidativer Stress macht die durch MFN2-KO gesteigerte mitochondriale Respiration rückgängig und führt bei mutiertem MFN2 zu erhöhter Zellatmung

In einem weiteren Experiment wurde der mitochondriale Sauerstoffverbrauch 24 h nach Behandlung mit 100 μM H_2O_2 gemessen, welches intrazellulär mildem oxidativen Stress von 1 μM H_2O_2 entspricht (Sies, 2017). Die Messung an sich wurde exakt wie unter Basalbedingungen durchgeführt.

Unter Basalbedingungen ergab sich ein erhöhter Sauerstoffverbrauch in Zellen ohne MFN2 (Abbildung 20A/B). Interessanterweise war dieser Effekt nach Behandlung mit oxidativem Stress rückläufig und der Sauerstoffverbrauch in H_2O_2 -behandelten Zellen kehrte auf Werte auf dem Niveau der Wildtyp-Zellen zurück (Abbildung 21B).

Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche mutiertes MFN2 (C684A, R94Q oder K109A) exprimierten, nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid eine erhöhte mitochondriale Atmung. Wildtypzellen wiederum zeigten sich resistent und reagierten nicht auf Änderungen des Redox-Milieus (Abbildung 21B). Exemplarische Kurven für Wildtyp- und R94Q-Zellen sind in Abbildung 21A dargestellt.

MFN2-defiziente Zellen und mutiertes MFN2 zeigten sich also im Gegensatz zum Wildtyp sensibel auf Redoxveränderungen. Dieser Trend war bereits bei der Untersuchung der mitochondrialen Form 5.3) zu beobachten, da sich lediglich Zellen mit Wildtyp-MFN2 resistent gegen Redoxveränderungen zeigten. Daraus lässt sich schließen, dass das Fehlen von MFN2 die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress erhöht. Außerdem scheinen sowohl die GTPase-Region (K109), als auch das Cystein 684, möglicherweise über Disulfidbrückenbildung, die Zellen vor zu hohem Sauerstoffverbrauch zu schützen. Interessanterweise reagierten die Zellen mit der krankheitsverursachenden Mutation R94Q mit dem höchsten Anstieg der Zellatmung auf die Wasserstoffperoxidbehandlung (Abbildung 21: Gesteigerter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch in Zellen mit mutiertem MFN2 bei mildem oxidativem Stress. Abbildung 21B). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Mutation R94Q zu einer veränderten Funktion des Proteins im Sinne einer *toxic gain of function* führt.

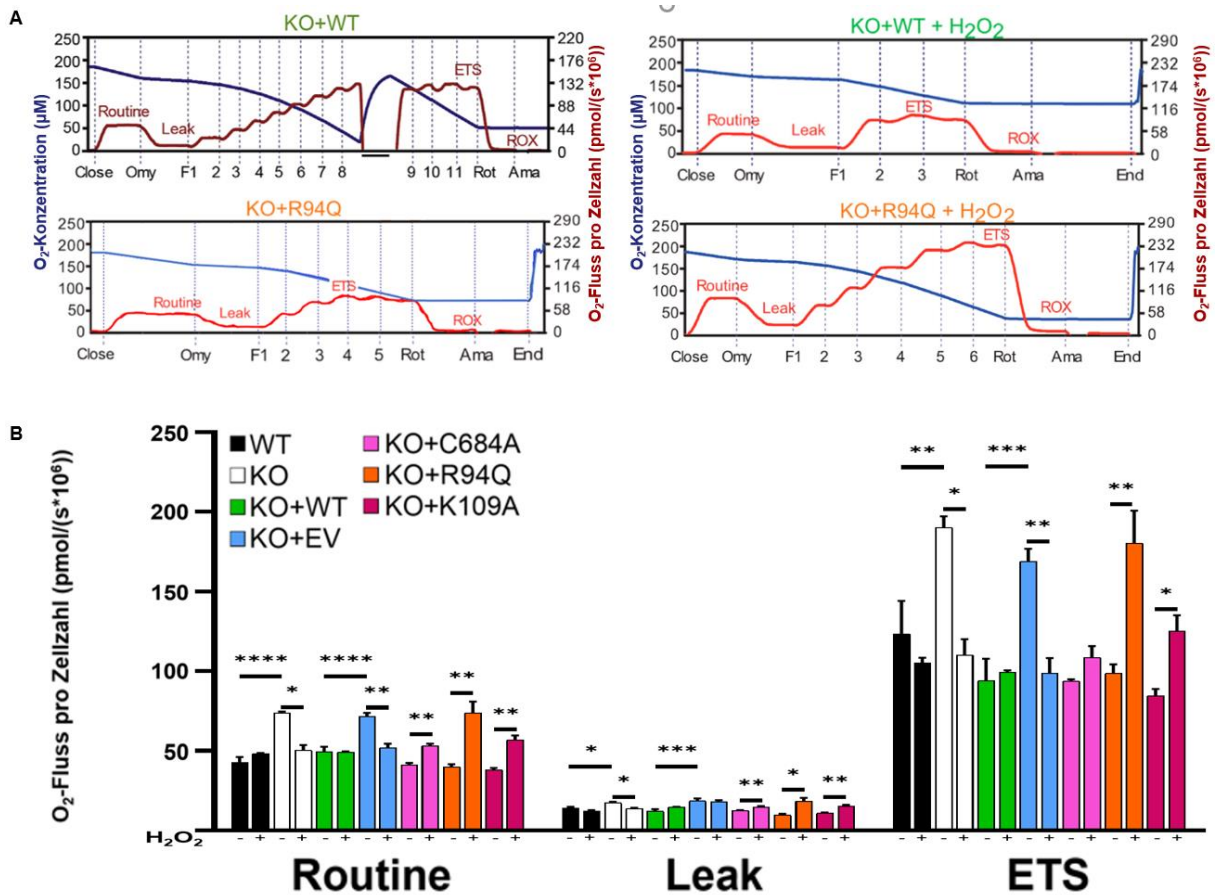


Abbildung 21: Gesteigerter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch in Zellen mit mutiertem MFN2 bei mildem oxidativem Stress. Repräsentative Kurven (oben KO+WT±H₂O₂, unten KO+R94Q±H₂O₂) der Respirometrie mittels Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) zeigen die Sauerstoffkonzentration (blaue Linie) und den Sauerstofffluss pro Zelle (rote Linie) an. Die Zugabe von Oligomycin (Omy), FCCP (F), Rotenon (Rot) und Antimycin A (Ama) ist markiert. Ebenso sind die verschiedenen Stadien der Zellatmung (Routine, Leak, ETS, ROX) angegeben. Abbildung B zeigt die quantitative Auswertung des Sauerstoffflusses pro Zelle, korrigiert auf ROX, im jeweiligen Stadium. Es zeigt sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen in MFN2-defizienten Zellen eine verminderte Zellatmung mit Rückfall auf WT-Niveau, während Zellen, welche mutiertes MFN2 exprimieren, eine erhöhte Zellatmung nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid aufzeigen. Einzig der Wildtyp zeigt sich resistent und weist keinerlei Reaktionen auf. Die Balkendiagramme zeigen den mittleren O₂-Fluss pro Zelle ± SEM von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in zweifacher Ausfertigung. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p-Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); p ≤ 0.05 (*); p ≤ 0.01 (**); p ≤ 0.001 (***); p ≤ 0.0001 (****)), wobei α=5% festgelegt wurde.

5.6. GSH reduziert in C684A-Zellen Leak- und ETS-Atmung

In weiteren Experimenten wurde die Zellatmung in permeabilisierten Zellen untersucht. Neben der Untersuchung unter Basalbedingungen wurde zu den Zellen nach Ermittlung der Ruheatmung und Permeabilisierung mittels Digitonin wahlweise 1 mM GSH zur Stärkung des antioxidativen Apparats oder 1 mM GSSG als Indikator für oxidativen Stress hinzugegeben und für einige Minuten eingewirkt. Repräsentative Kurvenverläufe sind in Abbildung 22A dargestellt. Die Permeabilisierung ist hierbei

notwendig, da sowohl GSH als auch GSSG nicht membrangängig ist. Die Ermittlung der Routineatmung, zu deren Zeitpunkt die Zellen noch intakt waren, zeigte eine erhöhte Atmung in MFN2-defizienten Zellen, wie aufgrund der Experimente in intakten Zellen zu erwarten war (s. hierfür Kapitel 5.4 bzw. Abbildung 20). Zwischen Wildtyp und mutiertem MFN2 zeigten sich kaum Unterschiede. Lediglich im Stadium GM_{SE} und $S(Rot)_E$ zeigten Zellen mit K109A-Mutation einen geringfügig reduzierten Sauerstofffluss im Vergleich zum Wildtyp.

Nach Zugabe von Glutamat und Malat erfolgte die Permeabilisierung mittels Digitonin und wahlweise Zugabe von 1 mM GSH oder 1 mM GSSG, jeweils mit einer Einwirkzeit von ca. 15 min, mit anschließender Bestimmung des Stadiums GM_N (Glutamat, Malat, *No Adenylates added*). Die Zugabe von 2 mM ADP ermöglichte die Quantifizierung des Stadiums GM_P , der vom Elektroneneinschluss in den Komplex I der Atmungskette (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) abhängig ist. Dann wurde Succinat, Substrat des Komplexes II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), zugegeben und das Stadium GM_{SP} mit konvergierendem Elektronenübertragung der Komplexe I und II auf Ubichinon aufgezeichnet. Die zweite Gabe von ADP zeigte keine signifikante Zunahme der Atmung, woraus sich schließen lässt, dass der GM_{SP} -Zustand bei gesättigter ADP-Konzentration quantifiziert wurde. Die Unversehrtheit der äußeren Mitochondrienmembran wurde durch die Applikation von Cytochrom *c*, die einen Anstieg von weniger als 15% in den für diese Analyse verwendeten Experimenten verursachte. Oligomycin hemmt den Komplex V und ermöglicht die Bestimmung des Stadiums GM_{SL} . Nach Titration des Entkopplers FCCP wurde der ETS-Zustand GM_{SE} ermittelt. Nach Blockade von Komplex I mittels Rotenon liegt das ETS-Stadium für Komplex II ($S(Rot)_E$ oder ETS CII) vor. Zum Schluss wird wie bei intakten Zellen durch Antimycin A Komplex III und somit die gesamte Atmungskette zum Stillstand gebracht und der ermittelte ROX-Wert von den zuvor bestimmten Stadien subtrahiert.

In diesen Experimenten fand ich heraus, dass die Zugabe von GSH die Zellatmung in den Stadien *Leak* und *ETS* in C684A-MFN2 exprimierenden Zellen signifikant reduziert, was auf eine Rolle dieses Cysteins in der homöostatischen Regulation der mitochondrialen Atmung in Reaktion auf Änderungen des Redox-Milieus hindeutet. Wildtyp-, EV- und R94Q- sowie K109A-Zellen zeigten keine Reaktion auf die Gabe von GSH oder GSSG. Unter Basalbedingungen fand sich lediglich eine erhöhte Zellatmung in Zellen ohne MFN2-Expression, wie es bereits in intakten Zellen zu beobachten war. Zusammenfassend reagierten also alle drei Mutationen auf die Behandlung mit Wasserstoffperoxid mit erhöhter Zellatmung, während nur C684A-

Zellen auf GSH mit verminderter Respiration reagierten. Dies legt nahe, dass der Anstieg der Respiration bei C684A-, R94Q- und K109A-Zellen durch 100 μM H_2O_2 durch verschiedene Mechanismen verursacht werden müsste.

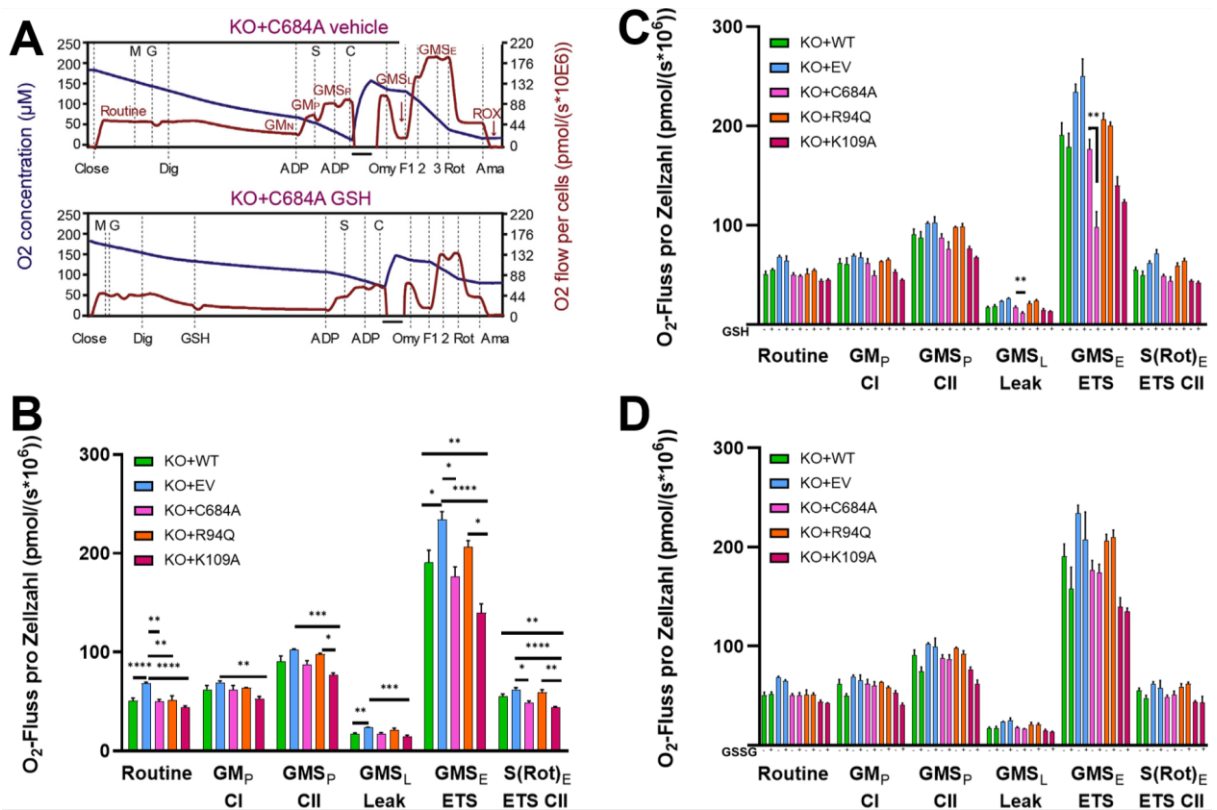


Abbildung 22: GSH reduziert in permeabilisierten C684A-Zellen die Zellatmung. **A.** Repräsentative Kurven (oben KO+C684A unbehandelt, unten KO+C684A nach GSH-Einwirkung, jeweils in permeabilisierten Zellen) der Respirometrie mittels Oxygraph-2k (Oroboros Instruments) zeigen die Sauerstoffkonzentration (blaue Linie) und den Sauerstofffluss pro Zelle (rote Linie) von Digitonin-permeabilisierten Zellen an. Die Applikation von Malat (M), Glutamat (G), Digitonin (Dig), ggf. GSH bzw. GSSG, ADP, Succinat (S), Cytochrom c (C), Oligomycin (Omy), FCCP (F), Rotenon (Rot) und Antimycin A (Ama) ist mit gepunkteten Linien gekennzeichnet, während die Öffnung der Kammern zur Sauerstofffüllung mit durchgezogenen Linien markiert ist. Die verschiedenen Stadien sind in roter Schrift an der entsprechenden Stelle der Kurve beschriftet, aus (Thaher et al., 2018). **B-D** zeigen die quantitative Auswertung des Sauerstoffflusses pro Zelle, korrigiert auf ROX, im jeweiligen Stadium (**B** unbehandelt, **C** nach GSH-Gabe, **D** nach GSSG-Gabe). In C684A-Zellen zeigt sich nach GSH-Applikation eine Abnahme der Zellatmung in den Stadien Leak und ETS, während GSSG keinen Einfluss auf die Atmung hatte. Alle anderen Zelllinien zeigten keine Änderung sowohl weder GSH- noch nach GSSG-Applikation. Die Balkendiagramme zeigen den mittleren O_2 -Fluss pro Zelle \pm SEM von 4-10 unabhängigen Experimenten in zweifacher Ausfertigung. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***) ; $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde.

5.7. Wildtyp-MFN2 inhibiert die Zellproliferation und zeigt sich resistent gegen oxidativen Stress

Es ist in der Literatur bereits beschrieben worden, dass MFN2 an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose mitbeteiligt ist. Hierbei bindet und inhibiert es das Proto-Onkogen Ras, und reguliert somit die nachgeschaltete Ras-Raf-ERK1/2-Signalkaskade herunter, wodurch MFN2 letztlich einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation haben soll (Chen et al., 2004, de Brito and Scorrano, 2009). Auch in der Onkologie konnte der hemmende Einfluss von MFN2 auf die Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen gezeigt werden. So führte eine MFN2-Überexpression zur Hemmung des mTORC2/Akt-Signalweg und hemmte so das Tumorwachstum (Xu et al., 2017).

Ich verwendete den RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega) zur Untersuchung der Zellproliferation. Dieser beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Lebende Zellen können das enthaltene Substrat aufnehmen und anschließend durch das enthaltene Enzym reduzieren. Dabei entsteht eine Lumineszenz, die proportional zur Anzahl an lebenden Zellen in der Probe ist. Tote, metabolisch nicht aktive Zellen können das Substrat nicht reduzieren und die Entstehung der Lumineszenz bleibt entsprechend aus bzw. ist schwächer ausgeprägt.

Ich konnte die Ergebnisse aus der Literatur hierbei reproduzieren: Zellen mit WT-MFN2 zeigten die geringste Proliferationsrate. Zwischen Rescue- und EV- Zellen zeigte sich nach 96 h ein signifikanter Unterschied mit schnellerer Zellproliferation in EV-Zellen (Abbildung 23A).

Es zeigte sich bereits in vielen Experimenten dieser Arbeit, dass sich v. a. der Wildtyp resistent gegen die Behandlung mit 100 μM H_2O_2 zeigte. Dies war auch bei der Messung der Zellproliferation zu beobachten. Um die Auswirkung von mildem oxidativem Stress auf das Zellwachstum zu untersuchen, behandelten wir einen Teil der Zellen kontinuierlich mit 100 μM H_2O_2 , den anderen Teil kultivierten wir unter Basalbedingungen in normalem MEF-Medium. Lediglich Wildtyp-Zellen proliferierten unbehandelt und nach H_2O_2 -Behandlung mit gleicher Geschwindigkeit (Abbildung 23B). In allen anderen Zelllinien zeigte sich nach Behandlung mit H_2O_2 eine signifikant reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit (Abbildung 23C-F). Dieser Effekt war in R94Q-Zellen am stärksten ausgeprägt (Abbildung 23E). Diese Ergebnisse geben erneut Hinweise darauf, dass in der Pathogenese der CMT2A eine Anfälligkeit gegenüber

oxidativem Stress mit damit einhergehender erhöhter Neurodegeneration eine Rolle spielen könnte.

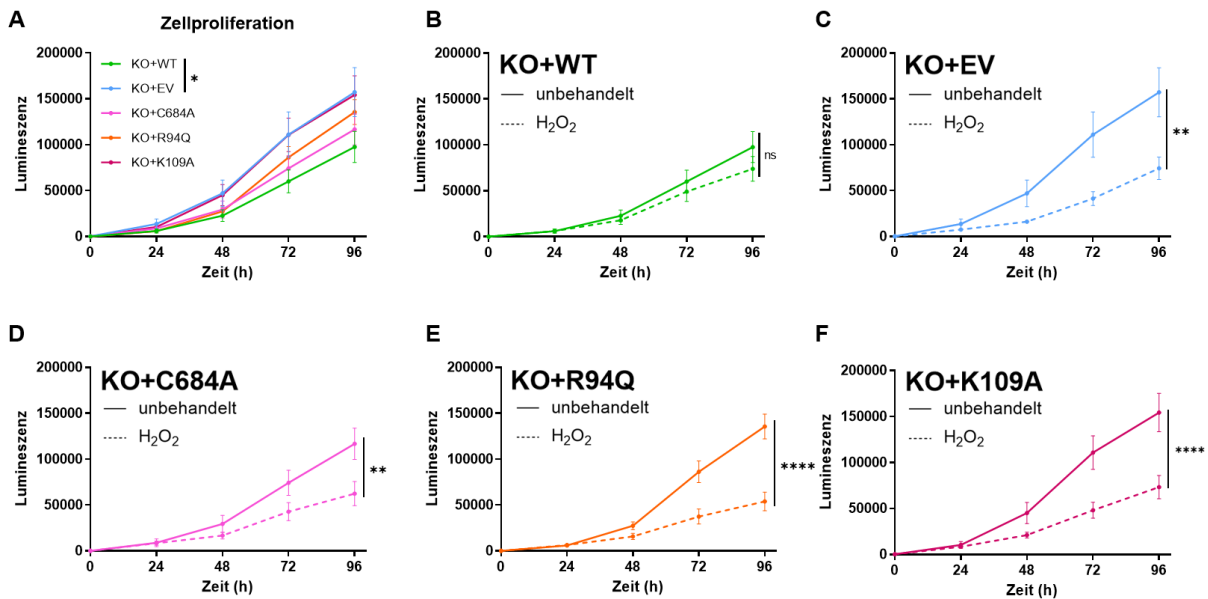


Abbildung 23: Wildtyp-MFN2 inhibiert die Zellproliferation und zeigt sich resistent gegen oxidativen Stress. A. Unter Basalbedingungen reduzierte Proliferationsrate in WT-Zellen. B. WT-Zellen zeigten nach oxidativem Stress eine unveränderte Proliferationsrate und zeigten sich als einzige Zelllinie resistent. C.-F. Alle anderen Zelllinien reagierten auf oxidativen Stress mit einer reduzierten Proliferationsgeschwindigkeit. Die Zellen wurden ausgesät und 24 h später mit 100 µM H₂O₂ behandelt. Die Lumineszenz wurde für 96 h alle 24 h gemessen. Die Daten sind als mittlere Lumineszenz ± SEM von n = 4 unabhängigen in Triplikaten durchgeführten Experimenten angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p-Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); p ≤ 0.05 (*); p ≤ 0.01 (**); p ≤ 0.001 (***) ; p ≤ 0.0001 (****)), wobei α=5% festgelegt wurde.

5.8. Reduzierter GSH-Gehalt in MFN2-defizienten Zellen und erhöhter ROS-Gehalt in R94Q- und K109A-Zellen

Die enzymatisch ermittelten GSH-Konzentrationen waren ohne und 24 h nach H₂O₂-Behandlung unverändert in allen Zelllinien. In EV-Zellen zeigte sich v. a. unter Basalbedingungen eine erniedrigte Konzentration an GSH im Vergleich zu Wildtyp- oder zu mutiertes MFN2 exprimierenden Zellen.

Der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies wurden mit dem Farbstoff CellROX® *Green Reagent* (Life Technologies™) bestimmt. Dieser ist ein membrangängiger grüner Farbstoff, der nach Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine hellgrüne Fluoreszenz verursacht. Wir konnten keinen erhöhten Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies in EV-Zellen gegenüber WT-Zellen feststellen. Die erniedrigten Level an GSH als Bestandteil des antioxidativen Apparats in EV-Zellen könnten

einerseits für eine regulative Rolle von MFN2 im antioxidativen Apparat sprechen. Andererseits könnte man das erniedrigte GSH in EV-Zellen auch so interpretieren, dass EV-Zellen als nicht gesunde Zellen einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind und das GSH entsprechend vermehrt in der antioxidativen Abwehr verbraucht wird. In C684A-Zellen fand sich kein Unterschied im ROS-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp. Zellen wiederum, welche die Mutationen R94Q und K109A in sich tragen, zeigten erhöhte ROS-Level. Die Region der GTPase könnte also im Gegensatz zum Cystein an Position 684 eine Rolle in der Funktion von MFN2 in der antioxidativen Abwehr haben bzw. könnte bei Mutationen in dieser Region eine erhöhte Anfälligkeit gegen oxidativen Stress verursachen. Auch könnte eine mangelnde Effizienz der antioxidativen Antwort in der Pathogenese der CMT2A eine Rolle spielen, wie die erhöhte ROS-Konzentration in R94Q-Zellen vermuten lässt. In allen Zelllinien zeigte sich kein Unterschied im GSH-Gehalt vor und nach Behandlung mit H₂O₂.

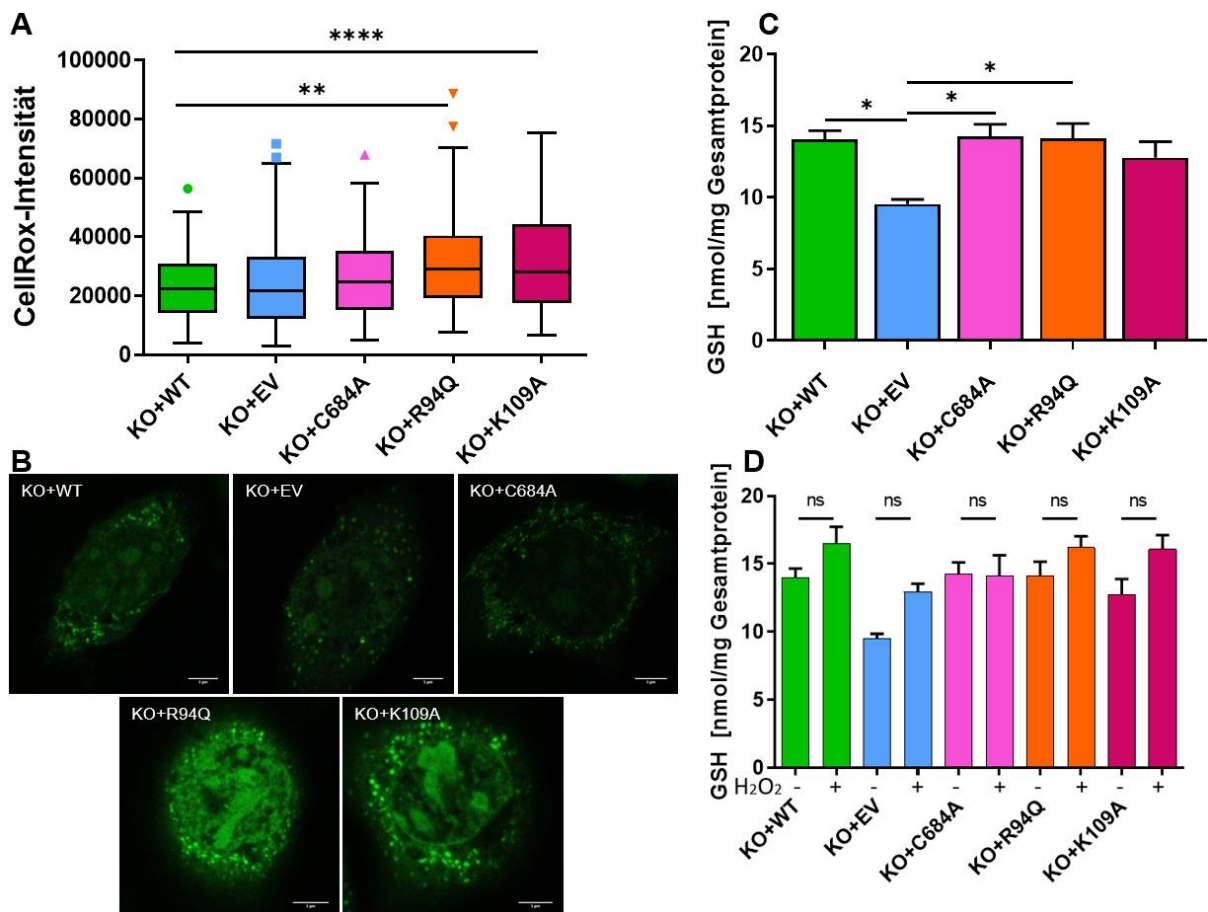


Abbildung 24: Reduzierter GSH-Gehalt in MFN2-defizienten Zellen und erhöhter ROS-Gehalt in R94Q- und K109A-Zellen. **A.** Zur Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde der Farbstoff CellROX® Green Reagent (Life Technologies™) verwendet. Dabei zeigte sich in R94Q- und K109A-Zellen ein erhöhter Gehalt an ROS im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp-MFN2. In Teil **B** der Abbildung sieht man in repräsentativen Bildern die erhöhte Intensität der Fluoreszenz in besagten Zelllinien. Der GSH-Gehalt wurde enzymatisch ermittelt und auf die Gesamtproteinmenge der Zelle normalisiert. Es zeigte sich in EV-Zellen ein erniedrigter Gehalt an GSH (**C**), während sich die GSH-Konzentration in

allen Zelllinien vor und nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid als konstant erwies (D). Die Werte sind mit dem SEM von 5 (ROS-Bestimmung) bzw. 4 (GSH-Bestimmung) unabhängigen Experimenten abgebildet. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***) ; $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde.

5.9. Erhöhter Kalziumgehalt in EV-, C684A- und R94Q-Zellen

MFN2 ist sowohl in der äußeren Mitochondrienmembran als auch in der ER-Membran lokalisiert (de Brito and Scorrano, 2008, de Brito and Scorrano, 2009, Giorgi et al., 2015) und ein Schlüsselprotein in der Bildung von MAMs, die als Hotspots für Wechselwirkungen zwischen ER und Mitochondrien und als wichtige Knotenpunkte für Signalwege fungieren. Es gibt mehrere Theorien dazu, ob MFN2 den Kontakt zwischen Mitochondrien und ER fördert oder hemmt.

Einerseits wurde publiziert, dass das Fehlen von MFN2 zu einem verminderten Kontakt zwischen Mitochondrium und ER und somit zu einer verringerten Kalzium-Übertragung von ER auf Mitochondrium führt (de Brito and Scorrano, 2008).

Neuere Studien stellen diesen ehemals weitverbreiteten und vorherrschenden Konsens immer mehr in Frage. Durch die Verwendung aufwendiger elektronenmikroskopischer Techniken konnte festgestellt werden, dass der Kontakt zwischen äußerer Mitochondrienmembran und ER in MFN2-KO-Zellen nicht reduziert, sondern sogar erhöht ist (Cosson et al., 2012, Filadi et al., 2015), was dem Gegenteil des bisherigen Konsenses entspricht.

Die mitochondriale Kalziumkonzentration könnte einen Hinweis darauf geben, welches Meinungslager tendenziell richtig liegt. In der Zelllinie, welche einen erhöhten Kontakt zwischen Mitochondrien und ER vorweist, müsste folglich auch ein erhöhter Kalziumeinstrom in die Mitochondrien vorliegen.

Zur Bestimmung der mitochondrialen Kalziumkonzentration wurden die Zellen mit zwei Plasmiden kotransfiziert. Cepia3mt dient hierbei als Kalziumsensor (Suzuki et al., 2014) und fluoresziert bei Kalziumbindung grün (Ex. 490 nm/ Em. 540 nm), während Mito-TurboFarRed als rot fluoreszierender mitochondrialer Marker als Korrektur für die Transfektionseffizienz dient (Ex. 570 nm / Em. 640 nm). Hierfür wird das Cepia-Signal ins Verhältnis mit dem TurboFarRed-Signal gesetzt, welches dann als Maß für das mitochondriale Kalzium verwendet wird. Es zeigte sich in Zellen, welche EV, C684A- oder R94Q-MFN2 exprimieren, ein erhöhter Kalziumgehalt im Vergleich zum Wildtyp.

Die erhöhte Kalziumkonzentration in EV-Zellen im Vergleich zum Wildtyp könnte darauf hindeuten, dass MFN2 einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von MAMs hat. In EV-Zellen liegt somit ein erhöhter Kontakt zwischen Mitochondrien und ER vor, was folglich mit einem gesteigerten Kalziumfluss aus dem ER in die Mitochondrien einhergeht und sich letztlich in der erhöhten Kalziumkonzentration widerspiegelt.

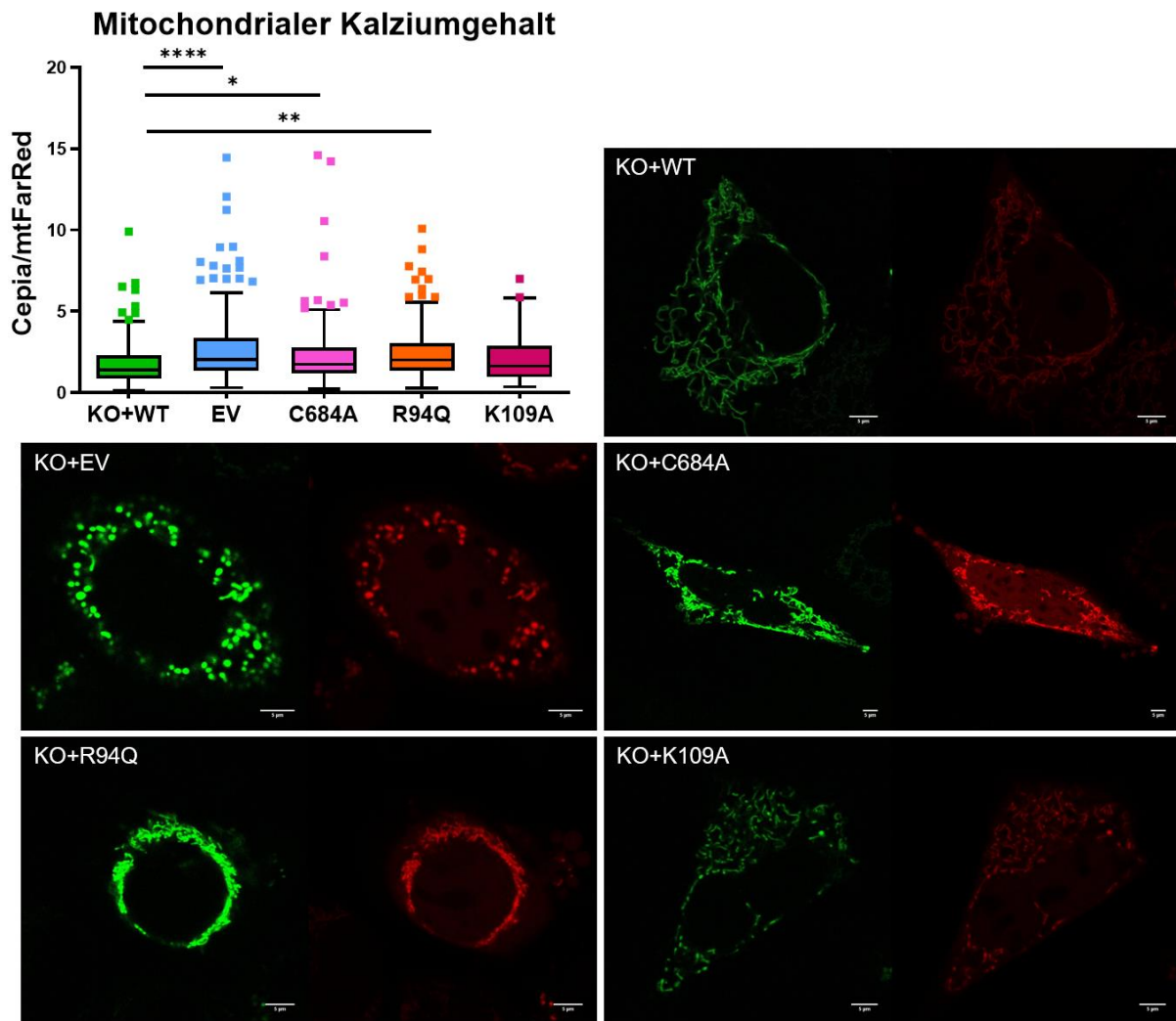


Abbildung 25: Erhöhter Kalziumgehalt in EV-, C684A- und R94Q-Zellen. Zur Bestimmung der mitochondrialen Kalziumkonzentration wurden die Zellen mit zwei Plasmiden kotransfiziert. Es zeigte sich in Zellen, welche EV, C684A- oder R94Q-MFN2 exprimieren, eine erhöhter Kalziumgehalt im Vergleich zum Wildtyp. Boxplots sind mit Tukey-Whiskers abgebildet. Die abgebildeten Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen (grün: Cepia; rot: Mito-TurboFarRed) aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 50 Zellen pro Zelllinie. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***) ; $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde.

Unter physiologischen Bedingungen folgt der SOCE der Ca^{2+} -Abnahme im ER, indem sich *store-operated Ca^{2+} channels* (SOCs) der Plasmamembran öffnen. Dies führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Ich induzierte SOCE mittels

Thapsigargin (Thp). Dieses hemmt die SERCA und führt somit zu einem Abfall von Ca^{2+} im ER, was wiederum den SOCE aktiviert (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007).

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausplattiert und mit zwei verschiedenen Farbstoffen, Fluo-8-AM und Rhod-2-AM, angefärbt. Beides sind Ca^{2+} -Marker, deren Fluoreszenz bei Ca^{2+} -Bindung zunimmt. Fluo-8-AM ist ein zytosolischer, Rhod-2-AM ein mitochondrialer Kalziummarker, wodurch Veränderungen sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien beobachtet werden konnten. Die Grundlinie wurde für eine Minute gemessen. Anschließend wurden 3 μM Thapsigargin, 2,7 mM Ca^{2+} und 1 μM FCCP manuell appliziert und nach jeder Injektion jeweils 5 Minuten lang gemessen.

Dem beobachteten Anstieg des Kalziumsignals im Zytosol (Fluo-8) als auch in Mitochondrien (Rhod-2) nach Thapsigargin-Applikation liegt eine Kalziumfreisetzung aus dem ER in das Zytosol mit teilweiser Aufnahme dieses Kalziums in die Mitochondrien zugrunde. Die anschließende Zugabe von Ca^{2+} zum Medium führt zu einem drastischen Anstieg der Fluoreszenz beider Farbstoffe, was auf einen raschen Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen und eine Aufnahme durch die Mitochondrien hinweist. Besagter Kalziumeinstrom in das Cytosol wird durch SOCs in der Plasmamembran vermittelt, die aufgrund des verringerten Kalziumgehalts im ER aktiviert werden. Da Mitochondrien als Kalziumspeicher und -puffer dienen, ist die mitochondriale Kalziumkonzentration deutlich höher als die zytosolische. Entsprechend liegt ein Konzentrationsgradient in Richtung Zytosol vor und Kalzium wird in Gegenwart des Protonophors FCCP, das Kanäle in der inneren Mitochondrienmembran bildet, aus den Mitochondrien freigesetzt, was zu einem deutlichen Abfall des Rhod-2-Signals führte.

Diese typische Kinetik konnte in allen Zelllinien so nachgewiesen werden (Abbildung 26A-D). Es zeigten sich jedoch einige Unterschiede. Wie bereits bei der Transfektion mit dem Kalziummarker Cepia3mt konnte man einerseits in der Basislinie vor jeglicher Applikation von Chemikalien eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration in EV- und C684A-Zellen, andererseits eine erniedrigte zytosolische Kalziumkonzentration in EV-Zellen nachweisen (Abbildung 26E). Die Reaktion auf Thapsigargin war in allen Zelllinien ähnlich und ohne signifikanten Unterschied, tendenziell zeigte sich in den Zellen KO+WT jedoch eine in Bezug auf die eigene Basislinie erhöhte Kalziumaufnahme (Abbildung 26 B). Der SOCE in das Zytosol nach Ca^{2+} -Zugabe war in K109A-Zellen sowohl mitochondrial als auch zytosolisch reduziert (Abbildung 26 F).

EV- und R94Q-Zellen zeigten einen gesteigerten zytosolischen SOCE (Abbildung 26 F). Der Effekt nach mitochondrialer Depolarisation durch FCCP zeigte sich in allen Zelllinien ähnlich stark ausgeprägt.

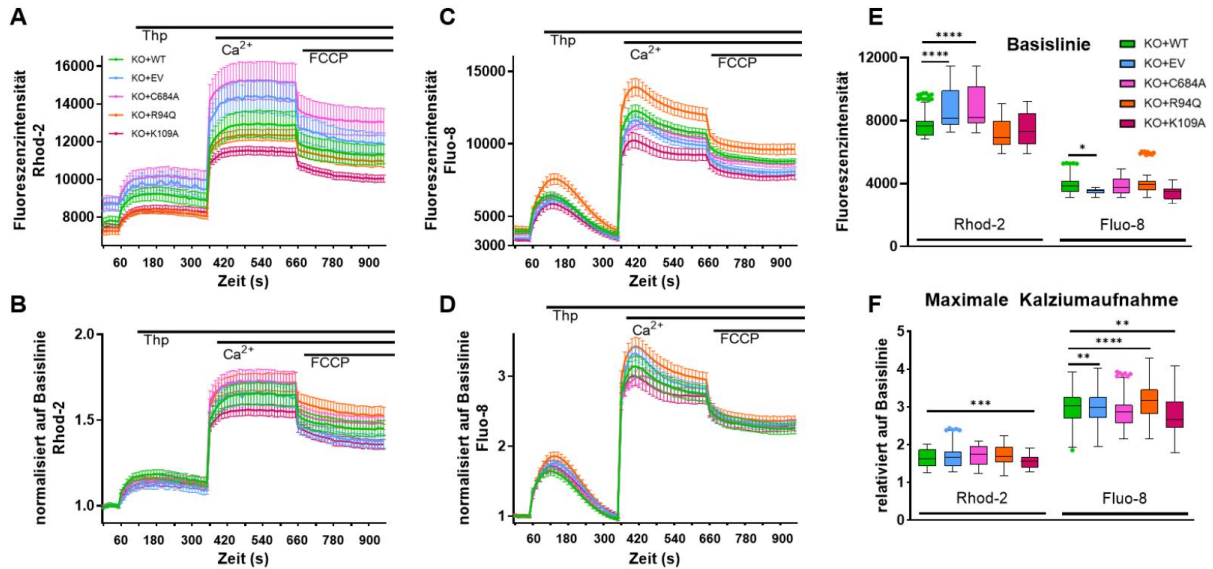


Abbildung 26: Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). Unter Verwendung von 2 μM Rhod-2-AM (**A** und **B**) bzw. 5 μM Fluo-8-AM (**C** und **D**) konnten Veränderungen im mitochondrialen bzw. zytosolischen Kalziumhaushalt beobachtet werden. Anschließend wurden 3 μM Thapsigargin (Thp), 2,7 mM Ca²⁺ und 1 μM FCCP (**A-D**) appliziert. **E** zeigt die Fluoreszenzintensität während der ersten Minute des Experiments (sog. Basislinie vor Applikation der Chemikalien), wobei sich eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration in EV- und C684A-Zellen und eine verminderte zytosolische Kalziumkonzentration in EV-Zellen zeigte. Das Fluoreszenzsignal wurde dann auf die eigene Basislinie normalisiert, um zu ermitteln, wie viel die entsprechende Zelle im Verhältnis zur eigenen Kalziumkonzentration im Ruhezustand aufnimmt (**F**). Hierbei zeigte sich in K109A-Zellen eine reduzierte Kapazität des SOCE sowohl mitochondrial als auch zytosolisch. Boxplots sind mit Tukey-Whiskers abgebildet (**E, F**). **A-D** bildet die Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten ab. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA und Tukeys multiplen Mittelwertvergleichs-t-Tests bestimmt (p -Wert > 0.05 (nicht signifikant (ns)); $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.01$ (**); $p \leq 0.001$ (***) ; $p \leq 0.0001$ (****)), wobei $\alpha=5\%$ festgelegt wurde.

6. Diskussion

6.1. MFN2 ist in der Regulation zahlreicher mitochondrialer und zellulärer Prozesse involviert

Mitochondrien sind in einem dynamischen Netzwerk von kontinuierlicher Fusion und Trennung organisiert. Für die Fusion und Trennung stehen jeweils verschiedene Proteinapparate zur Verfügung. Für die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran spielen die GTPasen MFN1 und dessen Homolog MFN2 die entscheidende Rolle (Santel and Fuller, 2001). In dieser Arbeit wurden Zellen mit Wildtyp- und mutiertem MFN2 sowie Zellen ohne MFN2-Expression auf verschiedene mitochondriale Funktionen und Form untersucht.

Bei der Untersuchung der mitochondrialen Form lag, wie zu erwarten, in Zellen ohne MFN2-Expression eine deutliche Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks vor. Zwei der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen (R94Q und K109A) liegen in der GTPase-Domäne von MFN2. Diese Domäne scheint essenziell für die Fusion von Mitochondrien zu sein (Koshiba et al., 2004). Tatsächlich fand ich in Zellen, welche eben diese Mutationen exprimieren eine vermehrte mitochondriale Fragmentierung vor, während die ebenfalls untersuchte Mutation C684A eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unveränderte mitochondriale Form aufwies (Abbildung 18). Diese Beobachtungen bestätigen die in der Literatur beschriebene Wichtigkeit der GTPase-Region für die Funktion von MFN2 in der mitochondrialen Fusion. Da in R94Q- und K109A-Zellen die Fragmentierung nicht so ausgeprägt war wie in KO- und EV-Zellen, gibt es wohl weitere wichtige Domänen im MFN2-Protein für die Fusion. Das Cystein 684 scheint, zumindest unter Basalbedingungen, für die Fusion entbehrlich zu sein.

In WT-MFN2 überexprimierenden Zellen (KO+WT) lag interessanterweise eine tendenziell vermehrte tubuläre Form von Mitochondrien vor als in den Wildtyp-MEFs. Es scheint also eine Korrelation zwischen Ausmaß der MFN2-Expression und der mitochondrialen Form zu geben, da in den WT-MEF-Zellen, in denen eine geringere Menge MFN2 exprimiert wird als in den Zellen KO+WT (Abbildung 17), eben eine vermehrte Fragmentierung der Mitochondrien vorlag.

Eine wichtige Funktion von Mitochondrien ist die ATP-Produktion, also die Produktion des universellen zellulären Energieträgers. Dabei werden Nährstoffe aus der Nahrung

abgebaut und daraus angefallene Elektronen letztlich in die Atmungskette eingespeist. Aus der freiwerdenden Energie der durchlaufenen Redoxreaktionen, u. a. der Sauerstoff verbrauchenden Knallgasreaktion, wird ein Protonengradient aufgebaut, der letztlich der ATP-Synthase als Antrieb dient (Ackerman and Tzagoloff, 2005). Dieser Protonengradient ist Bestandteil des mitochondrialen Membranpotenzials. Der verbrauchte Sauerstoff stellt den allergrößten Teil des Sauerstoffs dar, den wir mit der Atemluft aufnehmen. Während der Knallgasreaktion entsteht außerdem der wesentliche Anteil an ROS (Gosslau and Rensing, 2002). Um Auffälligkeiten im gesamten Prozess der ATP-Produktion festzustellen untersuchte ich also den Sauerstoffverbrauch der Atmungskette, den ATP-Gehalt, das mitochondriale Membranpotenzial und den ROS-Gehalt in KO-Zellen, welche WT-MFN2 bzw. einen EV exprimieren. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs in intakten Zellen wurde außerdem in den normalen WT-MEF-Zellen und in den KO-Zellen durchgeführt.

Bei der Untersuchung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in intakten Zellen war sehr auffällig, dass der Sauerstoffverbrauch in Zellen ohne MFN2 deutlich höher war im Vergleich zu Zellen, welche Wildtyp-MFN2 exprimieren (Abbildung 20). Diese Beobachtung ist von anderen Forschungsgruppen, auch für MEF-Zellen, ebenfalls beschrieben worden (Kawalec et al., 2015). Andere wiederum haben in MFN2-defizienten Zellen einen reduzierten Sauerstoffverbrauch und ein vermindertes mitochondriales Membranpotenzial beobachtet (Bach et al., 2003). Auch in Mitochondrien von Herzmuskelzellen aus MFN2-KO-Mäusen war die Respiration reduziert, was auf ein vermindertes Vorliegen von Ubichinon zurückgeführt wurde (Mourier et al., 2015). Supplementierung dieses fehlenden Ubichinons machte diese Beobachtungen rückgängig und führte zu einer vermehrten Fusion von Mitochondrien (Mourier et al., 2015). Es ist unklar, wie diese gegensätzlichen Beobachtungen begründet werden könnten, aber der Fakt, dass sich die KO-Kontrollzellen, welche lediglich das fluoreszierende Protein mCherry ohne MFN2 exprimieren, genauso verhalten wie KO-Zellen, sowie der Fakt, dass sich die WT-MEF-Zellen genauso verhalten wie die KO-Zellen, welche Wildtyp-MFN2 überexprimieren, spricht gegen eine rein zufällige Beobachtung. Ebenso zeigte sich nicht nur in intakten MEF-Zellen (Abbildung 20), sondern auch nach Permeabilisierung mittels Digitonin eine erhöhte Zellatmung in MFN2-defizienten Zellen (Abbildung 22).

Anschließend untersuchte ich das mitochondriale Membranpotenzial in WT bzw. EV exprimierenden KO-Zellen. Hierbei konnte ich die Ergebnisse von Kawalec et al. aus dem Jahre 2015 erneut reproduzieren (Kawalec et al., 2015) und es zeigte sich ein

reduziertes Membranpotenzial in EV-Zellen (Abbildung 20). Die Untersuchung des ATP-Gehalts erbrachte keine Unterschiede zwischen den Zelllinien (Abbildung 20). Auch die Untersuchung der ROS erbrachte zwischen WT- und EV-exprimierenden Zellen keine Unterschiede, während bei der Untersuchung des GSH-Gehalts interessanterweise eine signifikante Verminderung in EV-Zellen zu verzeichnen war (Abbildung 24).

Durch folgende Überlegung könnten all diese Beobachtungen begründet werden: Aus bisher unklaren Gründen ist das mitochondriale Membranpotenzial in MFN2-defizienten Zellen im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die verminderte Antriebskraft für Komplex V (ATP-Synthase) der Atmungskette müsste theoretisch zu einer verminderten ATP-Produktion führen, da die ATP-Synthase den allergrößten Anteil an ATP produziert. Einerseits kompensieren die Zellen dies durch eine gesteigerte anaerobe Glykolyse als alternative ATP-Synthese, welches sich in einem erhöhten Laktat-Gehalt in MFN2-defizienten Zellen widerspiegelt (Kawalec et al., 2015). Andererseits erhöhen die Mitochondrien nun den Sauerstoffumsatz, also die mitochondriale Atmung, um die Energieversorgung der Zelle aufrechtzuerhalten. Der ATP-Gehalt kann somit auf Normalniveau gehalten werden. Durch den erhöhten Sauerstoffumsatz kommt es neben der ATP-Produktion auch zu vermehrtem Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies. Dieser Anfall wird durch den antioxidativen Apparat der Zelle aufgefangen und kompensiert. Es wurde beschrieben, dass ROS in begrenztem physiologischem Rahmen notwendig für den Zellmetabolismus sind und erst in zu hohen Konzentrationen pathologisch wirken und u. a. die Apoptose einleiten (Ristow, 2014, Shadel and Horvath, 2015). Der ROS-Gehalt wird somit in jenem gesunden und physiologischen Rahmen gehalten, der erniedrigte GSH-Gehalt deutet auf den dafür benötigten erhöhten Einsatz dieses antioxidativ wirkenden Moleküls zur Kompensation hin. Tatsächlich zeigten Kawalec et al. eine vermehrte Expression der Atmungskettenkomplexe II, IV und V in MFN2-defizienten MEF-Zellen auf (Kawalec et al., 2015). Dies verstärkt meine Vermutung einer Heraufregulierung der Atmungskette als Hinweis auf eine Reaktion auf das zusammengebrochene mitochondriale Membranpotenzial, welche letztlich im beobachteten vermehrten Sauerstoffverbrauch deutlich wird (Abbildung 20 und Abbildung 22). Auch wurde beschrieben, dass bei niedrigem GSH-Level der Zellen diese vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind (Griffith and Meister, 1979), womit sich meine Deutung des niedrigen GSH-Gehalts als Kompensation der anfallenden ROS erhärten lässt.

Die verschiedenen Beobachtungen verschiedener Forschungsgruppen deuten darauf hin, dass die Effekte des Fehlens von MFN2 von der Zellart abhängig sein könnten. In einer aktuellen Arbeit haben Ding et al (2015) gezeigt, dass das akute Ausschalten des Mfn2-Gens mittels *Small Hairpin RNA* (shRNA) nicht nur den Sauerstoffverbrauch inhibiert, sondern auch zur verminderten Glykolyse, vermindertem ATP-Gehalt und reduzierter Zellproliferation führt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu meinen beobachteten Ergebnissen, in denen ein chronischer MFN2-Mangel zu vermehrtem Sauerstoffverbrauch bei gleichbleibendem ATP-Gehalt führte. Insgesamt macht dies Unterschiede der zellulären Reaktion auf akuten oder chronischen MFN2-Mangel wahrscheinlich (Ding et al., 2015). Mögliche kompensatorische Vorgänge bei chronischem MFN2-Mangel, die bei akutem Mangel nicht ablaufen, sind möglicherweise die erwähnte kompensatorische Heraufregulierung von verschiedenen Komplexen der Atmungskette (Kawalec et al., 2015). Diese vermehrte Expression mehrerer Proteine soll einer Desorganisation des Zellmetabolismus entgegenwirken und schwere Anomalien verhindern. Auch sollte ein möglicher kompensatorischer Effekt von MFN1 in Betracht gezogen werden.

Interessanterweise zeigte sich in MFN2-defizienten MEF-Zellen ein erhöhter Gehalt an Lactat, was ebenfalls ein Kompensationsmechanismus der ineffizienten oxidativen Phosphorylierung angesehen werden kann, indem ATP vermehrt durch anaerobe Glykolyse mit beschleunigter Lactatsynthese generiert wird (Kawalec et al., 2015). Bekräftigt werden kann diese Beobachtung durch eine aktuelle Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass Mangel von MFN1 oder MFN2 in MEF-Zellen zu einer erleichterten glykolytischen Stoffwechsellage durch Aktivierung der Ras/Raf- und Hypoxie-induzierten Faktor 1 α (HIF1 α)-Signalkaskade im Sinne einer metabolischen Reprogrammierung führt (Son et al., 2015).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass MFN2 einen wichtigen Einfluss auf den zellulären Energiemetabolismus zu haben scheint. Ursachen für die ineffiziente Funktion der oxidativen Phosphorylierung müssen zukünftig weiter untersucht werden. Unterschiede im GSH-Gehalt sowie das beobachtete Phänomen, dass Wasserstoffperoxid die erhöhte mitochondriale Atmung von EV-Zellen auf Wildtyp-Niveau reduziert (Abbildung 21), deutet auf Unterschiede im Redox-Milieu als Ursache für die Veränderungen der mitochondrialen Atmung bei MFN2-Mangel hin.

Mitochondrien und ER stehen über Mitochondrien assoziierte Membranen (MAMs) in engem Kontakt, welche für die Regulierung und den Austausch des Kalziumhaushalts

unabdingbar sind (Rizzuto et al., 1993, Rizzuto et al., 1998). Hierbei herrschen verschiedene Meinungen darüber, ob MFN2 einen stimulierenden (de Brito and Scorrano, 2008) oder hemmenden Einfluss (Cosson et al., 2012) auf die MAM-Formation hat. Einige Forschungsgruppen haben in MFN2-KO-Zellen verminderte mitochondriale Kalziumkonzentration gemessen, auf einen verminderten Kontakt zwischen ER und Mitochondrien zurückgeführt (de Brito and Scorrano, 2008). Andere wiederum gehen von einem hemmenden Einfluss von MFN2 auf die MAM-Formation zur Verhinderung einer toxischen mitochondrialen Kalziumüberladung aus und haben dazu passend erhöhte Kalziumkonzentrationen in MFN2-defiziente Zellen gemessen (Filadi et al., 2015). In den Experimenten von Filadi et al. wurde in MFN2-defizienten Zellen auch die vermehrte Expression von an der MAM-Formation beteiligten Proteinen wie bspw. dem Sigma-1-Rezeptor nachgewiesen (Filadi et al., 2015).

In meinen Experimenten mittels transienter Transfektion des mitochondrialen Kalziummarkers Cepia3mt wies ich in EV-Zellen eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration nach (Abbildung 25). Diese Ergebnisse ließen sich in den Untersuchungen zum *Store-operated Ca²⁺ entry* (SOCE) mittels Rhod-2-AM nach Quantifizierung und statistischen Analyse der Basislinie reproduzieren (Abbildung 26). Interessanterweise zeigte sich gleichzeitig bei Quantifizierung der Basislinie der zytosolischen Kalziummarkers Fluo-8-AM ein erniedrigter Kalziumgehalt in EV-Zellen (Abbildung 26). Eine Kalziumverschiebung von ER in die Mitochondrien könnte diese Ergebnisse erklären. Aber auch der Kontakt zwischen ER und Mitochondrien sollte betrachtet werden. Die aktuell vorherrschende Meinung geht von einem hemmenden Einfluss von MFN2 auf die MAM-Formation aus (Filadi et al., 2015). Entspricht dieser Konsens der Realität, so wäre dies ein Erklärungsansatz für die erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration in MFN2-defizienten Zellen. Nimmt man an, dass der Abstand zwischen ER und Mitochondrien in diesen Zellen nun verkleinert ist, kommt es bei Aktivierung von IP3-Rezeptoren mit konsekutiver Freisetzung von Kalziumionen aus dem ER-Lumen zu einer entsprechend verstärkten Kalziumaufnahme in die in ER-Nähe befindlichen Mitochondrien.

Die Stimulierung von Inositoltriphosphatrezeptoren an der ER-Oberfläche führt zur Freisetzung von Kalzium aus dem ER-Lumen, wobei eine lokale Mikrodomäne mit hoher Kalziumkonzentration gebildet wird. In der Nähe befindliche Mitochondrien nehmen Kalzium über ihr mitochondriales Membranpotenzial als treibende Kraft auf. Kalzium passiert die äußere Mitochondrienmembran über den Kanal VDAC1 und die

innere Mitochondrienmembran über den MCU. Die erhöhte Kalziumaufnahme in die Mitochondrien der EV-Zellen könnte so erklärt werden.

Die Exportmechanismen von Kalzium aus Mitochondrien heraus in das Zytosol sind hingegen weniger klar verstanden. U. a. spielt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter eine wichtige Rolle. Dieser transportiert ein Kalziumion im Austausch mit drei Natriumionen aus der Mitochondrienmatrix heraus (Palty and Sekler, 2012), wofür ein Natriumgradient nötig ist. Dieser Natriumgradient wiederum wird über den Na^+/H^+ -Austauscher generiert. Dessen Triebkraft wiederum ist der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran (Alvarez and Villa-Abrille, 2013). Letztlich ist also für einen effizienten Kalziumexport ein erhaltenes mitochondriales Membranpotenzial von Nöten. Wenn man sich jetzt noch mal die Ergebnisse der Messung des mitochondrialen Membranpotenzials vor Augen führt, könnte man das zusammengebrochene Membranpotenzial in EV-Zellen als Begründung für einen gestörten Kalziumexport anführen. Einerseits akkumuliert Kalzium dadurch in Mitochondrien, andererseits liegt es in vermindertem Maß im Zytosol vor, wie es bei Messungen mit Fluo-8-AM zu beobachten war (Abbildung 26). Es gibt zusätzlich noch weitere Kalziumexport-Mechanismen, die höchstwahrscheinlich auf ein intaktes Membranpotenzial in Mitochondrien angewiesen sind, wie z. B. der Kanal *leucine zipper EF-hand containing protein 1* (LETM1), bei dem es sich evtl. um einen $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter handelt (Shao et al., 2016, Tsai et al., 2014).

Mitochondrien sind der Gefahr einer Kalziumüberladung ausgesetzt, wenn die maximale Aufnahmekapazität über den MCU die maximale Ausströmkapazität von Kalzium überschreitet (Bernardi and von Stockum, 2012). Ist dies der Fall und die Kalziumkonzentration in Mitochondrien steigt an, öffnen sich unselektive *mitochondrial permeability transition pores* (mPTP), wodurch ein gefährlicher Kalziumüberschuss abgemildert wird (Bernardi and von Stockum, 2012). Stellt man sich nun vor, es kommt in MFN2-defizienten Zellen durch die erhöhte Kalziumkonzentration zu einer übermäßig langen Öffnung der mPTP, würde es auch zum Zusammenbruch des Membranpotenzials kommen, da durch die Unselektivität neben Kalziumionen auch Protonen durch diese Poren treten könnten (Orrenius et al., 2015). Dieser Mechanismus wäre ein möglicher Erklärungsansatz für das beobachtete eingebrochene Membranpotenzial mit all seinen Folgen in MFN2-defizienten Zellen.

MFN2 spielt nicht nur in der Regulation von mitochondrialer Form, Atmung und Kalziumhaushalt eine Rolle. Auch bei den Prozessen der Mitophagie, der Regulation

des Zellzyklus und der Apoptose scheint MFN2 beteiligt zu sein. Details zur Rolle in der Mitophagie sind im Kapitel 6.3 beschrieben.

MFN2 hat über Bindung und Inhibierung des Proto-Onkogens Ras, wodurch die nachgeschaltete Ras-Raf-ERK1/2-Signalkaskade herunterreguliert wird, einen hemmenden Einfluss auf die Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen (Chen et al., 2004, de Brito and Scorrano, 2009). Ich konnte diese Ergebnisse mit einem Proliferationsassay reproduzieren. Dabei zeigte sich der Wildtyp mit der langsamsten Proliferationsgeschwindigkeit gegenüber allen anderen Zelllinien. Signifikant schneller wuchsen jedoch nur die EV-Zellen (Abbildung 23). Natürlich kommt bei solchen Daten die Frage nach der Rolle von MFN2 in der Onkologie auf. Tatsächlich konnte in mehreren Karzinomtypen eine verminderte MFN2-Expression einhergehend mit mitochondrialer Fragmentierung und Umstellung der Energiegewinnung von oxidativer Phosphorylierung auf anaerobe Glykolyse (Warburg-Effekt) nachgewiesen werden (Cheng et al., 2013, Rehman et al., 2012, Wang et al., 2012). In humanen Mammakarzinom-Zellen resultierte aus einem MFN2-Mangel eine erhöhte Aktivität des pro-proliferativen mTORC2/Akt-Signalwegs. Diese Überaktivität wiederum konnte durch Hemmung dieses Signalwegs rückgängig gemacht werden und das Tumorwachstum verlangsamen (Xu et al., 2017).

6.2. Posttranslationale Modifikation des Cysteins 684 könnte für die Adaption der mitochondrialen Form und Funktion an oxidativen Stress wichtig sein

In dieser Arbeit wurde u. a. auch eine Punktmutation im Sinne eines Austausches der Aminosäure Cystein mit Alanin an Position 684 (C684A) des mitochondrialen Proteins MFN2 generiert. Diese Mutation liegt unmittelbar vor der HR2-Domäne von MFN2, die wichtig für die Interaktion zweier Mitochondrien für die anschließende mitochondriale Fusion ist (Koshiba et al., 2004). Die Untersuchung der mitochondrialen Form ergab dennoch keinen Unterschied zum Wildtyp unter Ruhebedingungen (Abbildung 18). Auch andere Experimente zeigten im Vergleich zum Wildtyp unter Ruhebedingungen keine signifikanten Unterschiede. ROS-Gehalt, Zellatmung, Zellproliferation und auch GSH-Gehalt zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp unauffällig. Die einzige Auffälligkeit unter Ruhebedingungen war eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration. Dies

deutet darauf hin, dass das Cystein 684 nicht an der Regulation von mitochondrialer Form und Funktion unter Steady-State-Bedingungen beteiligt ist.

Erst nach Behandlung mit 100 μM H_2O_2 offenbarten sich zahlreiche Auffälligkeiten in C684A-Zellen: Die Zellproliferation nahm ab, die Zellatmung nahm zu und die Mitochondrien zeigten eine vermehrte Fragmentierung. Die Konzentration des Wasserstoffperoxids im Medium von 100 μM entspricht dabei einer intrazellulären Konzentration von 1 μM und somit mildem oxidativem Stress (Sies, 2017) und wurde gewählt, da sie keinen offensichtlichen Zelltod in Wildtyp-Zellen verursachte, welches mittels Lichtmikroskopie bestätigt wurde. Nach GSH-Behandlung nahm außerdem die Zellatmung in permeabilisierten C684A-Zellen ab. All diese Effekte waren in Wildtyp-Zellen nicht zu beobachten. Dieser zeigte sich stets resistent gegen Änderungen des Redox-Milieus.

Laut einer aktuellen Publikation ist MFN2 in die Regulation der mitochondrialen Fusion als Reaktion auf Änderungen im intrazellulären Redoxmilieu involviert (Shutt et al., 2012). Zugabe von Glutathiondisulfid (GSSG) zu Mitochondrien induzierte hierbei die mitochondriale Fusion durch Bildung von Oligomeren mittels Disulfidbrücken zwischen MFN2-Molekülen. C684A-Zellen zeigten eine deutlich reduzierte Oligomerisation (Abbildung 10), was eine Disulfidbrückenbildung zwischen dem Aminosäurerest genau dieses Cysteins an Position 684 mit benachbarten Mitofusinen oder anderen Proteinen vermuten lässt. Die hier beobachtete vermehrte mitochondriale Fragmentierung nach H_2O_2 -Behandlung lässt auf den ersten Blick an einen Widerspruch denken, da GSSG nach Wasserstoffperoxideinwirkung logischerweise ansteigen müsste und somit eine mitochondriale Hyperfusion einleiten müsste. Ich vermute jedoch, dass das Fehlen des Cystein 684 bzw. der Fähigkeit zur Oligomerisation mittels Disulphidbrücken MFN2 deutlich anfälliger für Änderungen des oxidativen Milieus macht. Die normalerweise nur mildem oxidativem Stress entsprechenden 100 μM H_2O_2 könnten auf Zellen mit mutiertem MFN2 als deutlich stärkerer Stressfaktor wirken, was letztlich zu einem Abbau von MFN2 und mitochondrialer Degradation mit einhergehender Fragmentierung durch Mitophagie führt (Gegg et al., 2010). Bei Wildtyp-Mfn2 liegt diese Anfälligkeit gegen Redox-Änderungen nicht vor und auf GSSG-Zugabe reagieren die Zellen mit einer mitochondrialen Hyperfusion (Shutt et al., 2012), welche die Zellen stabil und resistent gegen oxidativen Stress mit anschließender Mitophagie und Zelltod werden lässt (Gomes et al., 2011, Rambold et al., 2011, Tondera et al., 2009). Auch die Ergebnisse des Zellproliferations-Assay unterstützen diesen Ansatz:

WT-Zellen reagierten nicht auf 100 μM H_2O_2 , während C684A-Zellen mit einer reduzierten Zellproliferation auffielen. Da Kalzium ein wichtiges Signalmolekül in der apoptotischen Signalkaskade darstellt, könnte die erhöhte Kalziumkonzentration in C684A-Mitochondrien auf eine vermehrte Neigung zur Apoptose hindeuten. Auf den identischen Stimulus folgen in WT- und C684A-Zellen also verschiedene Signalwege, da die Grundbedingungen, bedingt durch die Mutation, verschieden sind.

Die gesteigerte Zellatmung als Reaktion auf Wasserstoffperoxid lässt die Vermutung zu, dass das Cystein 684 in Wildtyp Zellen die erhöhte Zellatmung bei mildem oxidativem Stress inhibiert. In C684A-Zellen fehlt diese Hemmung und die Atmungskette entkoppelt sich. Korrespondierend zu einer gesteigerten Atmung bei oxidativem Stress, also Verschiebung des Redox-Gleichgewichts in Richtung Oxidation, führte die Zugabe von 1 mM GSH, also die Verschiebung des Redox-Gleichgewichts in Richtung Reduktion, zu permeabilisierten C684A-Zellen zu einem reduzierten Sauerstoffumsatz. In den Stadien Leak und ETS war diese Reduktion signifikant, jedoch war auch in den Stadien der Komplexe I und II eine Tendenz sichtbar, dass GSH die Atmung verringert (Abbildung 22). Vor Permeabilisierung lagen keine Unterschiede zwischen Wildtyp und C684A vor (Abbildung 20). Die Einwirkung von GSSG verursachte keine Änderungen in der Zellatmung. Dieser mangelnde Effekt von GSSG ist möglicherweise durch die rasche Reduktion zu GSH bei intakter GSH-Reduktase zu erklären (Thaher et al., 2018). Auch die GSH-Messung offenbarte keine Defizite in der GSH-Menge in C684A-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abbildung 24), was auf einen intakten antioxidativen Apparat mit schneller Reduktion des GSSG zu GSH hindeutet und den mangelnden Effekt erklären könnte.

Diese Beobachtungen bestärken die Vermutung, dass das Fehlen des Cysteins 684 und die somit fehlende Fähigkeit zur Bildung von Disulphidbrücken zu einer Anfälligkeit von MFN2 für Änderungen in der Redox-Umgebung führt.

Neben der Fähigkeit der Bildung von Disulphidbrücken, können Thiolgruppen (-SH) auch durch direkte Oxidation modifiziert werden, wobei Sulfensäurederivate (-SOH) entstehen. Sobald diese SOH-Gruppe entstanden ist, reagiert sie sehr schnell mit einer Vielzahl an Molekülen, was die Spezifität dieser Modifikation stark reduziert.

Eine weitere reversible posttranslationale Modifikation von Cysteinthiolen ist die S-Glutathionylierung. Diese beinhaltet die Konjugation bzw. Entfernung von Glutathioneinheiten durch Bildung bzw. Auflösung eines gemischten Disulfids

zwischen Glutathion und einer frei zugänglichen Thiolgruppe eines Proteins. Diese Art der Reaktion wird hauptsächlich durch das Verhältnis von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG bestimmt und ist daher sehr empfindlich auf Veränderungen der Glutathion-Menge als Reaktion auf unterschiedliche H₂O₂-Konzentrationen. Es wurde kürzlich die Theorie angeregt, dass Redox-Signale, welche vom mitochondrialen Energiestoffwechsel generiert wurden, indirekt vermittelt werden durch H₂O₂ und GSH innerhalb und außerhalb der Mitochondrien (Mailloux and Treberg, 2016). Folglich ist es möglich, dass der Verlust der S-Glutathionylierung der C684A-Mutante die Zunahme der Zellatmung als Reaktion auf H₂O₂ bzw. die Abnahme der Zellatmung in GSH-behandelten Mitochondrien verursacht (Thafer et al., 2018).

Es sollte weiter untersucht werden, ob Glutathionylierung oder auch andere posttranslationale Modifikationen dieses Cysteins, einschließlich S-Nitrosylierung (Piantadosi, 2012), S-Prenylierung (Wang and Casey, 2016) oder S-Palmitoylierung (Frohlich et al., 2014) bei der Anpassung von mitochondrialer Form und Funktion an die intrazelluläre Redox-Umgebung eine Rolle spielen (Thafer et al., 2018).

6.3. R94Q-Mutation in MFN2 verursacht eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit für oxidativen Stress sowie eine für die Pathophysiologie möglicherweise wichtige Entkopplung von Atmungskette und ATP-Produktion

In dieser Arbeit untersuchte ich u. a. auch eine Missense-Mutation im Sinne eines Austausches der Aminosäure Arginin mit Glutamin an Position 94 (R94Q) des mitochondrialen Proteins MFN2. Diese Mutation liegt im Anfangsbereich der GTPase-Domäne des Proteins und verursacht eine periphere neuronale Degeneration im Rahmen des schwer und schnell progredient verlaufenden Subtyps 2A der hereditären Polyneuropathie Morbus Charcot-Marie-Tooth (Calvo et al., 2009, Feely et al., 2011). Um mögliche pathophysiologischen Erkenntnisse zu gewinnen, wurden die Zellatmung und ATP-Synthese als mitochondriale Schlüsselfunktion sowie die mitochondriale Form untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob sich Auffälligkeiten in der Zellproliferation, im GSH- und ROS-Gehalt oder im Kalziumhaushalt finden. Experimente wurden hierbei unter Basalbedingungen und unter mildem oxidativem Stress untersucht.

Zusammenfassend zeigten sich unter Basalbedingungen eine vermehrte mitochondriale Fragmentierung, eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration sowie ein erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in R94Q-Zellen im Vergleich zum Wildtypprotein.

Es ist bereits beschrieben worden, dass die GTPase-Domäne des Proteins MFN2 die entscheidende Domäne für die mitochondriale Fusion ist (Franco et al., 2016, Koshiba et al., 2004). Die R94Q-Mutation liegt, wie bereits erwähnt, in eben jener GTPase-Region, woraus sich eine Funktionsstörung in der GTPase-Region ergeben könnte, was wiederum eine mögliche Erklärung für die vermehrte mitochondriale Fragmentierung in R94Q-Zellen unter Basalbedingungen darstellt.

Interessanterweise zeigten sich jedoch v. a. nach Auslösung milden oxidativen Stresses mittels 100 μM H_2O_2 Auffälligkeiten in R94Q-Zellen. Während sich der Wildtyp in allen Experimenten resistent auf Änderungen im Redoxmilieu zeigte, reagierten R94Q Zellen in eben jenen Experimenten mit deutlichen Veränderungen. So führte milder oxidativer Stress zu einem Anstieg in der mitochondrialen Atmung, zu einer stärkeren mitochondrialen Fragmentierung und zu einer reduzierten Proliferationsgeschwindigkeit.

Dieser zusätzliche Stress bewirkte, dass sich diese mutierten Mitochondrien wie MFN2-defiziente Zellen verhalten, bei denen ebenfalls eine erhöhte mitochondriale Atmung sowohl in meinen Experimenten (siehe Abbildung 20 B) als auch in anderen Publikationen (Kawalec et al., 2015) festgestellt wurde.

Es zeigte sich auch in C684A-Zellen eine gesteigerte Zellatmung nach oxidativem Stress. Wie bereits erwähnt, zeigten sich in C684A-Zellen außerdem eine reduzierte Zellatmung nach Behandlung mit 1 mM GSH. Um zu klären, ob R94Q-Zellen ebenso auf eine Behandlung mit GSH reagieren, behandelte ich permeabilisierte R94Q-Zellen ebenfalls mit GSH und beobachtete die Zellatmung. Hierbei zeigten sich im Gegensatz zu C684A-Zellen keine Veränderungen im Sauerstoffverbrauch, was vermuten lässt, dass die Zunahme der Zellatmung nach Wasserstoffperoxid-Behandlung in C684A- und R94Q-Zellen auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist. Das Cystein 684 scheint eine wichtige Rolle im Prozess der mitochondrialen Hyperfusion als Reaktion auf oxidativen Stress zu spielen (Shutt et al., 2012). In R94Q-Zellen scheint diese Reaktion auf oxidativen Stress jedoch zu fehlen.

Oxidativer Stress führt nicht nur zur reversiblen Modifikation von Thiolgruppen des Cysteins, welche für Signalkaskaden und Regulation im Redoxsystem wichtig ist (Groitl and Jakob, 2014, Leichert and Dick, 2015). Es kommt auch zur Bildung von *Second Messengern* wie 4-Hydroxynonenal, welches nach Lipidperoxidation gebildet wird und viele Proteinreste, auch in Mitochondrien, kovalent modifizieren kann (Milkovic et al., 2015). Bislang ist keine Interaktion zwischen 4-Hydroxynonenal und MFN2 beschrieben.

Um nun die Auswirkungen dieser Beobachtungen in der Zellatmung auf die ATP-Produktion zu beurteilen, wurden die ATP-Level bestimmt. Unter Basalbedingungen zeigten sich dabei, wie bei Untersuchung der Zellatmung, keine Unterschiede zum Wildtyp. In einer gemeinsamen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte in zusätzlichen Experimenten festgestellt werden, dass trotz eines erhöhten Sauerstoffverbrauchs (s. Kapitel 5.5) die ATP-Produktion nur in R94Q-Zellen, jedoch nicht in Wildtyp-Mfn2 exprimierenden Zellen, nach H₂O₂-Behandlung zusammenbricht (Wolf et al., 2019). Es lässt sich also sagen, dass unter Basalbedingungen die R94Q-Mutation tragenden Zellen keine Einschränkungen in Atmung und ATP-Produktion zeigten. Kommt es jedoch bereits zu minimalem oxidativem Stress, bricht die ATP-Produktion zusammen, begleitet von einem erhöhten mitochondrialen Sauerstoffumsatz. Dies alles geht außerdem einher mit einer deutlich vermehrten mitochondrialen Fragmentierung nach oxidativem Stress (s. Kapitel 5.3). Weiterhin beobachteten wir eine erhöhte Glucoseaufnahme und Raufregulierung der Hexokinase 1 und Pyruvatkinase 2, was die Vermutung zulässt, dass vermehrt Pyruvat in die Mitochondrien und den Citratzyklus geschleust werden (Wolf et al., 2019), möglicherweise zur Kompensation des ATP-Abfalls nach H₂O₂-Behandlung.

In Experimenten mit Mäusen, welche die R94Q-Mutation exprimieren, sind kombinierte Defekte der Atmungskettenkomplexe II und V nach Succinatoxidation mit einhergehender reduzierter ATP-Produktion beschrieben worden (Guillet et al., 2011). Diese Beobachtungen waren spannenderweise nach Inhibition des mitochondrialen ATP-sensitiven Kaliumkanals rückläufig. Diese Beobachtungen könnten auch als Ursache für die beobachteten Auffälligkeiten in der Zellatmung von R94Q-Zellen interpretiert werden. Allem Anschein nach hat die Behandlung mit Wasserstoffperoxid zur Funktionseinschränkung der Komplexe II und V und zur Entkopplung der Atmungskette geführt, welches die Effektivität der Atmungskette deutlich reduziert hat. Zur Kompensation auf diese Ineffektivität erhöhen die Mitochondrien den

Sauerstoffumsatz, schaffen es jedoch trotzdem nicht, die ATP-Produktion auf Normalniveau zu halten (siehe folgende Abbildung 27).

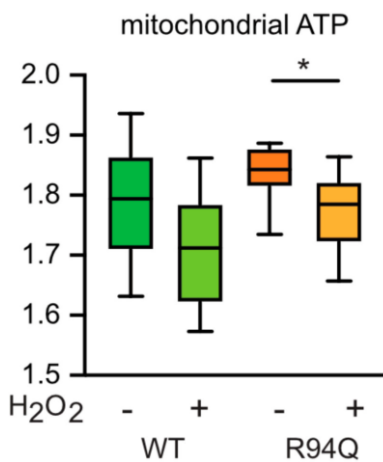


Abbildung 27: Reduzierte ATP-Produktion in R94Q-Zellen nach H₂O₂-Behandlung, aus der Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Wolf et al., 2019). Wie in Kapitel 5.4 bereits dargestellt, liegen unter Basalbedingungen keine Unterschiede im ATP-Gehalt zwischen WT und R94Q vor. Nach Aussetzen der Zellen gegenüber mildem oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid kommt es nur in R94Q-Zellen zu einer reduzierten ATP-Produktion.

Außerdem fehlte in R94Q-Mitochondrien nach Aktivierung des Neurons eine Heraufregulierung der ATP-Produktion (van Hameren et al., 2019). Während in Wildtyp-Neuronen nach Aktivierung sowohl ATP als auch H₂O₂ anstiegen, blieb in R94Q-Neuronen der ATP-Anstieg aus. Dies spricht für die Entkopplung von ROS- und ATP-Produktion unter neuropathologischen Bedingungen und ist in Übereinklang mit unseren Ergebnissen, dass die H₂O₂-Aussetzung die ATP-Produktion in R94Q-Zellen beeinflusst, wodurch die axonale Funktionalität beeinträchtigt sein könnte. Dies könnte ein pathophysiologischer Ansatz für die Neurodegeneration im Rahmen der CMT2A darstellen.

Wir stellten in weiteren Experimenten durch Analyse mittels Western Blot nach Behandlung der Zellen mit dem Entkoppler Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) und folgender Depolarisation der Mitochondrien fest, dass die mitochondriale Entkopplung der Atmungskette, ausgelöst durch milden oxidativen Stress, ebenfalls einhergeht mit einer eingeschränkten mitochondrialen Qualitätskontrolle (Wolf et al., 2019), genauer gesagt im Prozess der sog. Mitophagie. Während der Mitophagie werden beschädigte oder gealterte Mitochondrien abgebaut.

In gesunden Mitochondrien spielen für den Prozess der Mitophagie das Protein *PTEN-induced kinase 1* (PINK1) und die Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin E3 eine Schlüsselrolle. Das Protein PINK1 wird unter physiologischen Zuständen kontinuierlich

synthetisiert und unmittelbar wieder abgebaut (Narendra et al., 2008). Kommt es jedoch zu einer Schädigung von Mitochondrien, bspw. durch eine Depolarisation mittels FCCP, akkumuliert PINK1 an der äußeren Mitochondrienmembran und die Kinase-Aktivität ist hoch genug, um die Translokation von Parkin zu jenen beschädigten Mitochondrien auszulösen (Clark et al., 2006). Das translozierte Parkin ubiquitinyliert abzubauen Proteine. MFN2 ist hierbei ein Zielprotein von PINK1 und wird von diesem phosphoryliert und anschließend dann von Parkin ubiquitinyliert, was wiederum eine nachgeschaltete Signalkaskade auslöst (Chen and Dorn, 2013). Diese Prozesse münden letztlich in den Abbau von MFN2 mit folgender mitochondrialer Fragmentierung und Abbau der Mitochondrien durch Autophagosomen (Gegg et al., 2010). In unseren Experimenten führte der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials mittels des Entkopplers Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP), der Parkin durch Anstieg der PINK1-Konzentration aktiviert, tatsächlich zu einer adäquaten Ubiquitinylierung mit anschließendem Abbau von Wildtyp-MFN2. R94Q-MFN2 jedoch wurde deutlich weniger abgebaut, gleichbedeutend mit einer Akkumulation beschädigter Mitochondrien in R94Q-Zellen (Wolf et al., 2019). Diese Ergebnisse konnten durch Experimente mit dem Plasmid mitoKeima reproduziert werden. Mittels diesen Plasmids kann der lysosomale Abbau von Mitochondrien quantifiziert werden (Katayama et al., 2011). In unseren Experimenten zeigte sich ein verringerter Abbau von Mitochondrien in R94Q-Zellen (Wolf et al., 2019). Dieser beeinträchtigte Abbau von geschädigten Mitochondrien bei mildem oxidativem Stress könnte eine Erklärung für eine weniger effiziente Kopplung von Zellatmung und ATP-Produktion sein und die gesteigerte Zellatmung und abfallende ATP-Produktion in R94Q-Mitochondrien nach Wasserstoffperoxid-Behandlung erklären.

Interessanterweise bildet die ATP-Synthase unter oxidativem Stress Dimere in Form einer Pore, die der mPTP ähnelt (Bernardi et al., 2015). In diesem Zusammenhang wäre somit auch denkbar, dass durch den Protonenfluss durch jene Poren das Membranpotenzial zusammenbricht mit konsekutiver erhöhter Zellatmung bzw. erhöhtem Sauerstoffumsatz, die ich hier offenbart habe. Eine andere Arbeit zeigte einen weiteren interessanten Aspekt auf: In Muskelbiopsien von Patienten mit CMT fanden sich Anomalien in Struktur und Aktivität im F₀-Teil der ATP-Synthase (Pitceathly et al., 2012). Zu beachten in der Arbeit von Pitceathly et al. ist jedoch, dass es sich nicht um Fälle mit R94Q-Mutation handelte. Dennoch scheint es ubiquitär einen Zusammenhang zwischen der Krankheit und einer Dysfunktion im System der oxidativen Phosphorylierung zu geben.

Über den genauen Mechanismus hinter dieser beeinträchtigten Mitophagie in R94Q-Zellen kann derzeit nur spekuliert werden. Ein Protein namens Beclin-1 spielt eine wichtige Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung von Autophagosomen. Der Verlust dieses Proteins Beclin-1 inhibiert die CCCP-induzierte Parkin-Translokation zu Mitochondrien mit konsekutiver MFN2-Ubiquitinylierung und -Abbau. Außerdem führte ein Beclin-1-Defizit in MFN2-defizienten Zellen zu einer vermehrten mitochondrialen Fusion im Sinne einer Umkehr der mitochondrialen Fragmentierung durch MFN2-Defizit (Choubey et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass die R94Q-Mutation diesen Signalweg auf bestimmte Weise beeinflusst. Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die R94Q-Mutation die Phosphorylierung von MFN2 durch PINK1 behindert, was die darauffolgende Bindung von Parkin beeinträchtigt und letztlich in einer beeinträchtigten Mitophagie endet (Gong et al., 2015).

Allerdings zeigten andere Forschungsgruppen wiederum ein gegenteiliges Ergebnis im Sinne einer gesteigerten und nicht reduzierten Mitophagie in Motoneuronen von CMT2A-Patienten. Diese Beobachtung war begleitet von einer geringeren Menge an Mitochondrien, jedoch ohne Einfluss auf Überleben oder Axonwachstum (Rizzo et al., 2016). Meine Ergebnisse, dass die Zellatmung in R94Q-Mitochondrien unter Basalbedingungen normal, bei mildem oxidativem Stress jedoch stark erhöht ist, könnten durch einen Versuch der R94Q-mutierten Zellen bei oxidativem Stress angesehen werden, die verringerte Mitochondrienanzahl zu kompensieren, indem der Sauerstoffumsatz der Atmungskette gesteigert wird, während die mitochondriale ATP-Produktion unter Ruhebedingungen trotz reduzierter Anzahl an Mitochondrien ausreichend sind. Außerdem lag in diesen Motoneuronen von CMT2A-Patienten eine Überexpression von PINK1, PARK2, BNIP3 und einer Splice-Variante von Beclin-1 vor, welche die Mitophagie höchstwahrscheinlich anregt. Möglicherweise wird diese besondere Splice-Variante nur in humanen Motoneuronen exprimiert, was die verschiedenen Ergebnisse erklären könnte. Nun liegen also zwei verschiedene Tendenzen im Aspekt der Mitophagie vor, die von uns beobachtete reduzierte Mitophagie in R94Q-Zellen und die Beobachtungen von Rizzo et. al. Unsere Beobachtungen werden untermauert durch Publikationen, in denen gezeigt werden konnte, dass MFN2-Knockout in murinen Muskelzellen zu einer verminderten Mitophagie und beeinträchtigten mitochondrialen Qualitätskontrolle führt, was wiederum zu einer im Alter zunehmenden mitochondrialen Dysfunktion führt (Sebastian et al., 2016). Eine weitere Forschungsgruppe wiederum zeigte, dass nicht

nur MFN2 eine Rolle in der Pathophysiologie der CMT2A zu spielen scheint. Das Verhältnis von MFN2 zu seinem engen Homolog MFN1 beeinflusste in transgenetischen Mäusen mit R94Q-Mutation im MFN2-Protein den Phänotyp der Mäuse, in der Richtung, dass eine Erhöhung des MFN1-Gehalts im Gehirn dieser Mäuse die Symptome erheblich verbesserte (Zhou et al., 2019).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich in meinen Experimenten unter Ruhebedingungen ein unveränderter GSH-Gehalt jedoch erhöhter ROS-Gehalt in R94Q-Zellen. Nicht nur bei mildem oxidativem Stress, sondern auch unter Basalbedingungen liegen also Unterschiede bzgl. des Redox-Milieus vor. Der erhöhte ROS-Gehalt in R94Q-Zellen könnte durch die beobachtete ineffiziente, entkoppelte Atmungskette mit größerer Elektronenleckage und entsprechend erhöhten ROS-Bildung zu erklären sein. Passend zu diesen Ergebnissen beschrieb eine Forschungsgruppe, dass altersbedingte Reduktion im MFN2-Gehalt und Knockout von MFN2 in jungen Mäusen eine ROS-abhängigen Signalkaskade auslöst. Hierbei wird der Transkriptionsfaktor HIF 1 α induziert, um die von *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3* (BNIP3) abhängige Degradation von Mitochondrien zu stimulieren, was als Kompensationsmechanismus für die eingeschränkte Autophagie von Mitochondrien und dadurch als Schutz vor Akkumulation beschädigter Mitochondrien angesehen werden kann (Sebastian et al., 2016). Nach Inhibition des HIF1 α mittels NSC-134754 stieg der Gehalt an H₂O₂ sowohl in Kontroll- als auch in *Knockdown*-Mäusen (Sebastian et al., 2016). Dass es eine Interaktion zwischen MFN2 und HIF1 α gibt, wurde in weiteren Arbeiten beschrieben (Son et al., 2015).

Fasst man die bisherigen Erkenntnisse zusammen, ergibt sich folgende Überlegung: Nach Behandlung mit H₂O₂ reagierten R94Q-Zellen mit erhöhtem Sauerstoffumsatz, reduzierter ATP-Produktion, vermehrter mitochondrialer Fragmentierung und verminderter Zellproliferation. Der Wildtyp zeigte sich jedoch in all diesen Experimenten resistent. Auch unter Ruhebedingungen zeigten sich Unterschiede. In R94Q-Zellen lag ein erhöhter Gehalt an ROS vor. Der GSH-Gehalt war unverändert. Insgesamt scheint es also möglich zu sein, dass die R94Q-Mutation in der GTPase-Region von MFN2 eine Rolle in der Regulation des antioxidativen Apparats spielt. Nicht von der Hand zu weisen ist aber, dass R94Q-Zellen empfindlicher auf oxidativen Stress reagieren als Wildtyp-Zellen.

Der allergrößte Anteil an ROS entsteht in Mitochondrien, die fast den gesamten Sauerstoff in der Atmungskette mit anschließender oxidativer Phosphorylierung umsetzen. In der sogenannten Elektronenleckage entweichen stets schon bei physiologischer Atmungsketteaktivität Elektronen an den Komplexen der Atmungskette vorbei (Jastroch et al., 2010), welche letztlich zu ROS werden (Gosslau and Rensing, 2002). Ist jetzt wie in R94Q-Zellen die Atmungskette noch aktiver, wie bei mildem oxidativem Stress, entstehen entsprechend noch mehr ROS, welches zu DNA-Schäden und einhergehendem schnellerem Alterungsprozess einhergeht. Dieser erhöhte ROS-Gehalt konnte in meinen Experimenten nachgewiesen werden. Dieser ROS-Anstieg wird noch verstärkt durch eine ineffektive Atmungskette durch Schädigung von Mitochondrien in Folge einer verminderten Mitophagie (Sebastian et al., 2016). In einer ROS-abhängigen Signalkaskade über HIF1 α und BNIP3 wird versucht, die Mitophagie aufrechtzuerhalten, um die ATP-Produktion mithilfe intakter Mitochondrien aufrechtzuerhalten, welches aber erwiesenermaßen nicht komplett gelingt (Sebastian et al., 2016, Wolf et al., 2019).

Letztlich beobachtete ich noch einen erhöhten mitochondrialen Kalziumgehalt und eine verminderte Proliferationsrate als Reaktion auf oxidativen Stress. Mitochondrien und ER stehen über MAMs in engem Kontakt (Rizzuto et al., 1993, Rizzuto et al., 1998). Es gibt verschiedene Theorien darüber, ob MFN2 einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Formation von MAMs hat. Die heute weiter verbreitete Meinung geht von einem hemmenden Effekt von MFN2 auf die MAM-Bildung aus, um eine toxische mitochondriale Kalziumüberladung zu verhindern (Filadi et al., 2015). In Ruhe war in R94Q-Zellen eine erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration zu verzeichnen. Es scheint möglich zu sein, dass dieser hemmende Effekt bei einer R94Q-Mutation des MFN2 beeinträchtigt ist. Es kommt zu einer vermehrten Formation von MAMs, wodurch der Kontakt zwischen ER und Mitochondrien steigt, der Kalziumfluss vom Kalziumspeicher ER in die Mitochondrien ansteigt und letztlich führt dies zu einer erhöhten mitochondrialen Kalziumkonzentration (Abbildung 25), wobei eine toxische Überladung möglicherweise nicht verhindert werden kann. Eine erhöhte Kalziumkonzentration in Mitochondrien kann mehrere nachgeschaltete Kaskaden auslösen. So kann es bspw. als Signal und Regulation für die „Alles oder Nix“-Freisetzung von Cytochrom c fungieren, welches als Bestandteil der Signalkaskade der Apoptose von Bedeutung ist (Brookes et al., 2004). Verstärkt werden kann der proapoptische Zustand der Zelle durch die beobachtete ROS-Erhöhung in R94Q-Zellen.

Durch Apoptose bei bereits mildem oxidativem Stress könnte auch die verminderte Zellproliferation in R94Q-Zellen erklärt werden (Abbildung 23). Interessanterweise zeigte sich in K109A-Zellen keine erhöhte Kalziumkonzentration und sogar eine verminderte maximale Kapazität der Kalziumaufnahme nach Induktion des SOCE. Dies deutet auf verschiedene Mechanismen als Ursache der beobachteten Phänomene und nicht auf eine Ursache wegen der gemeinsamen Lokalisation in der GTPase-Region der beiden Mutationen hin.

Zusammenfassend könnte all die beschriebenen Beobachtungen eine Rolle in der Pathogenese der CMT2A bei Menschen spielen. Erhöhte ROS-, Kalzium-, zusätzlich von der ATP-Produktion entkoppelte Zellatmung und reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit v. a. bei mildem oxidativem Stress könnten, zusätzlich durch den physiologisch im Alter zunehmenden ROS-Gehalt aggraviert, zu einer frühzeitigen Neurodegeneration mit Ausbruch der hereditären Polyneuropathie führen. Tendenziell ähnliche Ergebnisse zeigten ebenfalls eine ineffiziente und von der ATP-Produktion teilweise entkoppelte Atmungskette als mögliche Pathophysiologie der axonalen Degeneration im Verlauf der CMT2A auf, wobei in dieser Arbeit andere Mutationen die CMT2A der Patientenstichprobe verursachten (Loiseau et al., 2007). Die selbe Forschungsgruppe beschrieb eine erhöhte Expression und Aktivität der ATP/ADP-Translokase, welche wahrscheinlich die reduzierte Kopplung und Effizienz der oxidativen Phosphorylierung mitverursacht, und deren erhöhte Aktivität den Sauerstoffverbrauch ankurbelt (Guillet et al., 2010).

Eine andere neurologische Erkrankung, bei der bereits eine antioxidativ wirksame Substanz namens Idebenon zugelassen ist, ist die Lebersche Optikusatrophie (Priglinger et al., 2019). Bevor an eine klinische Anwendung gedacht werden kann, sollten entsprechende Experimente natürlich in besseren Modellen wie Primärkulturen von Neuronen und in Mäusen reproduziert sowie die genauen Mechanismen besser verstanden werden, dennoch bieten meine Erkenntnisse spannende Aussichten für die Zukunft und zeigen eindeutig eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich gesteigerte Anfälligkeit für oxidativen Stress in R94Q-Zellen. Als Ursache hierfür konnten wir in unserer gemeinsamen Arbeit eine verminderte Expression von Enzymen des antioxidativen Systems ausschließen. Hierfür quantifizierten wir per qPCR die mRNA-Level der Glutamat-Cystein-Ligase, Glutathion-S-Transferase Omega 1, NADPH-Chinon-Oxidoreduktase-1, Glutathionperoxidase 1 und Hämoxigenase, wobei sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und R94Q-Zellen. Hierbei muss bedacht

werden, dass in R94Q-Zellen diese Enzyme zur Minimierung des oxidativen Stresses bereits maximal heraufreguliert sein könnten.

6.4. K109A-Zellen zeigen verminderte mitochondriale Respiration im ETS-Stadium sowie eine reduzierte maximale Kalziumaufnahme

Die dritte Mutation, die in dieser Arbeit untersucht wurde, ist eine Missense-Mutation im Sinne eines Austauschs der Aminosäure Lysin mit Alanin (K109A). Diese Aminosäure liegt in der GTPase-Domäne von MFN2, die für die mitochondriale Fusion unentbehrlich ist (Filadi et al., 2018, Koshihara et al., 2004).

Entsprechend naheliegend ist eine Funktionseinschränkung im Prozess der mitochondrialen Fusion. Tatsächlich offenbarte die Untersuchung der mitochondrialen Form eine signifikant vermehrte Fragmentierung im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 18), welche unter H_2O_2 -Einwirkung signifikant weiter zunahm (Abbildung 19). Eine vermehrte Fragmentierung unter Basalbedingungen wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben (Chen et al., 2003, Niemann et al., 2005). Eine signifikante Zunahme bei oxidativem Stress ist jedoch noch nie beobachtet worden und lässt die Vermutung nahe, dass die GTPase-Region Wechselwirkungen mit der antioxidativen Abwehr hat, welche dem Wildtyp Resistenz gegen oxidativen Stress verleiht. Die Vermutung wird verstärkt durch die Tatsache, dass nicht nur bei Untersuchung der mitochondrialen Form, sondern auch bei vielen anderen Experimenten wie der Messung der Zellatmung und der Zellproliferation der Wildtyp sich stets resistent zeigte, während die K109A-Zellen, aber auch andere mutierte Zellen, mit Änderungen reagierten.

Bei der Untersuchung der Zellatmung in intakten Zellen zeigten sich unter Basalbedingungen keine Unterschiede zwischen K109A- und WT-Zellen. Bei mildem oxidativem Stress erhöhte sich die Respiration in K109A-Zellen, während der Wildtyp konstant auf dem gleichen Niveau blieb (Abbildung 21). In permeabilisierten Zellen zeigte sich interessanterweise eine im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Zelllinien signifikant reduzierte Zellatmung im Stadium ETS und ETS CII, also in jenen Stadien, in denen die maximale Kapazität der Atmungskette ausgeschöpft und ermittelt wird (Abbildung 22 B). In den übrigen Stadien lagen keine Unterschiede zum Wildtyp vor. Es scheint also v. a. Beeinträchtigungen zu geben, wenn die

Mitochondrien gefordert sind, die Atmung erheblich zu erhöhen. Eine aktuelle Arbeit beschreibt, dass K109A-Adipozyten im Gegensatz zu Wildtyp-Adipozyten im braunen Fettgewebe die durch MFN2-KO verminderte Zellatmung nicht wiederherstellen konnte (Boutant et al., 2017). Dabei wurde auch beobachtet, dass v. a. die Reaktion auf adrenerge Stimuli, die zu einer erhöhten Zellatmung führen sollten, in K109A-Zellen beeinträchtigt sei. Begründet wurde diese mit einer GTPase-abhängigen Interaktion von MFN2 mit Perlipin 1 in Adipozyten (Boutant et al., 2017). Sowohl in meinen Experimenten als auch in der Arbeit von Boutant et al. zeigte sich also v. a. bei einer forcierten induzierten Zellatmung, dass K109A-Zellen nicht auf das Niveau vom Wildtyp heranreichen. Verstärkt wird dieser Gedanke durch die Beobachtung, dass auch in intakten Zellen K109A-Zellen im Stadium ETS eine tendenziell, jedoch nicht signifikante, reduzierte Respiration im Vergleich zu den anderen Zelllinien zeigten (Abbildung 20) und dass auch nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid der Anstieg der Respiration im ETS-Stadium im Vergleich zu den anderen Mutanten deutlich abgeschwächt war (Abbildung 21), während der Wildtyp sich, wie in allen Experimenten, gegen milden oxidativen Stress resistent zeigte.

Bei der Untersuchung des *Store-operated Ca²⁺ entry* zeigte sich sowohl eine verminderte mitochondriale als auch zytosolische maximale Kalziumaufnahme nach SOCE-Induktion durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin im Vergleich zum Wildtyp. Auffällig war, dass nur diese Mutation, nicht jedoch die Mutationen R94Q oder C684A, Unterschiede zum Wildtyp zeigte. Die K109A-Mutation scheint also eine Rolle in der Regulation des SOCE zu spielen, evtl. bedingt durch eine gestörte Funktion der Domäne, eine gestörte wichtige posttranslationale Modifikation oder beeinträchtigte Protein-Protein-Interaktion. Es gilt zukünftig, genauere Mechanismen dieser Beobachtungen abzuklären. Kalzium gilt schon lange als Stimulator des aeroben Stoffwechsels (Pettit et al., 1972, Patron et al., 2013). Die verminderte maximale Kalziumaufnahme in Mitochondrien könnte möglicherweise auch eine Erklärung für die verminderte Respiration in den ETS-Stadien sein.

6.5. Vermehrte mitochondriale Fragmentierung geht mit erhöhter Zellatmung einher

Betrachtet man die Ergebnisse meiner Experimente genauer, so lässt sich tendenziell ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Form und Sauerstoffverbrauch feststellen:

EV-Zellen, welche zu nahezu 100 % fragmentierte Mitochondrien aufweisen, haben im Vergleich zu den anderen Zelllinien, alle im Vergleich mit ähnlichem Anteil fragmentierter Mitochondrien, eine deutlich erhöhte Zellatmung gezeigt (Abbildung 20). Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid zeigten alle Mutation tragenden Zellen eine erhöhte mitochondriale Fragmentierung. Gleichzeitig erhöhte sich auch ihr Sauerstoffverbrauch (Abbildung 19).

Scheinbar gibt es demnach einen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Form und Atmung. Je fragmentierter die Mitochondrien sind, desto höher ist der mitochondriale Sauerstoffverbrauch. Einen Zusammenhang zwischen Form und Atmungskette wurde in die andere Richtung auch beobachtet. Durch effizientere ATP-Produktion soll mitochondriale Hyperfusion (Shutt et al., 2012) die Zellen stabil und resistent gegen oxidativen Stress und anschließender Mitophagie und Apoptose machen (Gomes et al., 2011, Rambold et al., 2011, Tondera et al., 2009). Wie in meinen Experimenten beobachtet zeigten sich nur Zellen, die WT-MFN2 exprimieren, resistent gegen Änderungen des oxidativen Milieus, während alle anderen Zelllinien reagierten. Mutiertes MFN2 reagierte mit erhöhter Fragmentierung und erhöhtem Sauerstoffverbrauch. Rein physikalisch betrachtet ist das Volumen im Verhältnis zur Oberfläche in einer Kugel am größten. In fragmentierten Mitochondrien also ist das Volumen verhältnismäßig größer als in tubulären Mitochondrien. Entsprechend könnte in fragmentierten Mitochondrien durch mehr Volumen und Platz für mehr Komplexe der Atmungskette mehr Sauerstoffumsatz stattfinden. Tatsächlich ist eine vermehrte Expression der Atmungskettenkomplexe II, IV und V in MFN2-defizienten und somit fragmentierten Mitochondrien beschrieben (Kawalec et al., 2015). Geht man nun davon aus, v. a. in Anbetracht der Ergebnisse meiner Experimente, dass mutiertes MFN2 zur Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress führt, so scheint denkbar zu sein, dass die als Folge hochgradigen oxidativen Stresses stattfindende Lipidperoxidation (Antunes et al., 1996) letztlich dazu zu führt, dass Zellen mehr Energie zur Stabilisierung ihres Membranpotenzials aufwenden müssten bzw. zur Bereitstellung der gleichen Energiemenge einen erhöhten Sauerstoffumsatz generieren müssen. Für

diese gesteigerte Respiration scheint die vermehrte mitochondriale Fragmentierung, wie bereits erwähnt, durch mehr Volumen von Vorteil zu sein. Diese Überlegungen könnten ein Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen mitochondrialer Fragmentierung und vermehrter Zellatmung darstellen. Interessanterweise passt zu diesen Überlegungen das in EV-Zellen von mir gemessene reduzierte Membranpotenzial (Abbildung 20).

7. Zusammenfassung

MFN2 ist eine GTPase, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Es ist ein vielseitiges Protein, welches Einfluss auf viele fundamentale Signalwege in der Zelle hat. So hat es u. a. Einfluss auf die mitochondriale Bioenergetik, Zellproliferation, Apoptose, Interaktion von Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum, sowie den Kalziumhaushalt und ist essenziell für die mitochondriale Fusion. In dieser Arbeit untersuchte ich den Einfluss von MFN2 auf diese Zellfunktionen. Ich untersuchte Wildtyp-MFN2 exprimierende Zellen sowie Zellen ohne und mit mutiertem MFN2.

Meine Hauptergebnisse im Rahmen der Untersuchung der EV-Zellen war der im Vergleich zu Wildtyp-MFN2 deutlich erhöhte mitochondriale Sauerstoffverbrauch bei reduziertem Membranpotenzial und aufrechterhaltenem ATP-Gehalt. Der ROS-Gehalt war unverändert, während der GSH-Gehalt deutlich reduziert war. Die aktuell in der Literatur vorherrschende Meinung bzgl. der MAM-Formation und die Rolle von MFN2 besagt, dass MFN2 einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von MAM habe, um eine toxische Kalziumüberladung in den Mitochondrien mit folgendem Zelluntergang zu vermeiden (Filadi et al., 2015). Unter Hinzunahme der gemessenen erhöhten Kalziumkonzentration in MFN2-defizienten Mitochondrien könnte man als eine mögliche Kausalkette folgende Überlegung ableiten: Der Gehalt an MAM und somit der Kontakt zwischen ER und Mitochondrien ist in MFN2-defizienten Zellen erhöht. Es kommt daher zu einem gesteigerten Fluss von Kalziumionen vom ER in die Mitochondrien, was die erhöhte mitochondriale Kalziumkonzentration in EV-Zellen erklärt. Um eine toxische Kalziumüberladung zu verhindern öffnen sich die unspezifischen mPTP und es kommt zu einem Protonenfluss in die Matrix über diese Poren und nicht mehr nur durch Komplex V. Das Membranpotenzial bricht folglich zusammen, was ich ebenfalls nachweisen konnte. Kompensatorisch kommt es zur Aufrechterhaltung der Energiebereitstellung in Form ausreichender ATP-Synthese zu einer erhöhten Aktivität und erhöhtem Sauerstoffumsatz der Atmungskette. Die dadurch vermehrt anfallenden ROS werden durch die Aktivität des antioxidativen Apparats der Zelle mit u. a. dem antioxidativen Molekül GSH in physiologischem Rahmen gehalten, während der GSH-Gehalt durch die Neutralisierung der ROS deutlich abfällt. Tatsächlich ist eine vermehrte Expression der Atmungskettenkomplexe II, IV und V in MFN2-defizienten MEF-Zellen beschrieben (Kawalec et al., 2015). Ebenso ist gezeigt worden, dass bei niedrigem GSH-Level diese Zelle vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt war (Griffith and Meister, 1979).

Diese Literatur verstärkt meine Vermutung einer Heraufregulierung der Atmungskette als Hinweis auf eine Reaktion auf das zusammengebrochene mitochondriale Membranpotenzial, welche letztlich im beobachteten vermehrten Sauerstoffverbrauch deutlich wird, sowie meine Deutung des niedrigen GSH-Gehalts als Kompensation der anfallenden ROS.

Die Mutation C684A liegt in der HR2-Domäne des Proteins. Die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchung dieser Zelllinie waren die erhöhte Zellatmung als Reaktion auf Wasserstoffperoxid, sowie die verminderte Atmung nach GSH-Einwirkung. Außerdem reagierten Zelllinien mit vermehrter Fragmentierung auf Wasserstoffperoxid. Zusammenfassend scheint möglich zu sein, dass das Cystein 684 in MFN2 Redox-induzierte Veränderungen der mitochondrialen Form und Atmung vermittelt, möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen seiner Thiolgruppe wie der S-Glutathionylierung.

Die R94Q-Mutation in der GTPase-Region von MFN2 verursacht die früh und schnell progrediente Unterform 2A der hereditären Polyneuropathie Morbus Charcot-Marie-Tooth. Erhöhte ROS-, Kalzium-, zusätzlich von der ATP-Produktion entkoppelte Zellatmung und reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit v. a. bei mildem oxidativem Stress könnten, zusätzlich durch den physiologisch im Alter zunehmenden ROS-Gehalt aggraviert, zu einer frühzeitigen axonalen Degeneration mit Ausbruch der hereditären Polyneuropathie führen. Auch zeigte sich die Mitophagie in R94Q-Zellen beeinträchtigt. Zusammenfassend könnten all die beschriebenen Beobachtungen eine Rolle in der Pathogenese der CMT2A bei Menschen spielen.

Die in der GTPase-Region lokalisierte Mutation K109A offenbarte eine eingeschränkte maximale Kalziumaufnahme sowie reduzierte Kapazität der Atmungskette, welche sich möglicherweise gegenseitig verstärken. Da nur in dieser einen Zelllinie diese verringerte Kalziumaufnahme zu verzeichnen war, scheint genau diese Aminosäure eine Rolle in der Vermittlung des SOCE zu spielen, möglicherweise über Interaktion mit den SOCs der Plasma- bzw. MCUs der Mitochondrienmembran.

Die Literatur beschäftigt sich intensiv mit MFN2. Jedoch war ich der erste, der MFN2 auch unter Bedingungen milden oxidativen Stresses untersuchte. Es ist auffällig, wie alle Zelllinien außer der Wildtyp auf Änderungen im Redox-Milieu reagierten. Dieser zeigte sich stets resistent. Meine Ergebnisse deuten eindeutig auf eine Rolle von MFN2 im Redox-Haushalt hin und bieten interessante und vielversprechende Ansatzpunkte zur weiteren Erforschung der genauen Mechanismen, v. a. im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Pathogenese der CMT2A.

8. Literaturverzeichnis

Ackerman, S. H. & Tzagoloff, A. 2005. Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 80, 95-133.

Alvarez, B. V. & Villa-Abrille, M. C. 2013. Mitochondrial NHE1: a newly identified target to prevent heart disease. *Front Physiol*, 4, 152.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 7915-22.

Anderson, M. E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, 111-112, 1-14.

Antunes, F., Salvador, A., Marinho, H. S., Alves, R. & Pinto, R. E. 1996. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med*, 21, 917-43.

Apostolova, N. & Victor, V. M. 2015. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal*, 22, 686-729.

Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., Manco, M., Calvani, M., Castagneto, M., Palacin, M., Mingrone, G., Zierath, J. R., Vidal, H. & Zorzano, A. 2005. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes*, 54, 2685-93.

Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J. R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, 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. *J Biol Chem*, 278, 17190-7.

Banchs, I., Casasnovas, C., Alberti, A., De Jorge, L., Povedano, M., Montero, J., Martinez-Matos, J. A. & Volpini, V. 2009. Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biomed Biotechnol*, 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., Koteliansky, V. & Mootha, V. K. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341-5.

Beckman, K. B. & Ames, B. N. 1999. Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat Res*, 424, 51-8.

- Belyaeva, E. A. 2018. Respiratory complex II in mitochondrial dysfunction-mediated cytotoxicity: Insight from cadmium. *J Trace Elem Med Biol*, 50, 80-92.
- Ben-Yoseph, O., Boxer, P. A. & Ross, B. D. 1996. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J Neurochem*, 66, 2329-37.
- Bermejo, C., Haerizadeh, F., Takanaga, H., Chermak, D. & Frommer, W. B. 2010. Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. *Biochem J*, 432, 399-406.
- Bernard-Marissal, N., van Hameren, G., Juneja, M., Pellegrino, C., Louhivuori, L., Bartesaghi, L., Rochat, C., El Mansour, O., Medard, J. J., Croisier, M., Maclachlan, C., Poirot, O., Uhlen, P., Timmerman, V., Tricaud, N., Schneider, B. L. & Chrast, R. 2019. Altered interplay between endoplasmic reticulum and mitochondria in Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 2328-2337.
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M. & Lippe, G. 2015. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev*, 95, 1111-55.
- Bernardi, P. & von Stockum, S. 2012. The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question. *Cell Calcium*, 52, 22-7.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 62, 293-300.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348, 125-32.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. & McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349, 117-27.
- Boutant, M., Kulkarni, S. S., Joffraud, M., Ratajczak, J., Valera-Alberni, M., Combe, R., Zorzano, A. & Cantó, C. 2017. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function. *Embo j*, 36, 1543-1558.
- Bravo-Sagua, R., Parra, V., Lopez-Crisosto, C., Diaz, P., Quest, A. F. & Lavandero, S. 2017. Calcium Transport and Signaling in Mitochondria. *Compr Physiol*, 7, 623-634.
- Bravo, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J. P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A. E., Verdejo, H. E., Ferreira, J., Iglewski, M., Chiong, M., Simmen, T., Zorzano, A., Hill, J. A., Rothermel, B. A., Szabadkai, G. & Lavandero, S. 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci*, 124, 2143-52.

Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. & Sheu, S. S. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C817-33.

Burte, F., Carelli, V., Chinnery, P. F. & Yu-Wai-Man, P. 2015. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 11, 11-24.

Calvayrac, R. & Butow, R. A. 1971. [The effect of antimycin A on respiration and mitochondrial structure of *Euglena gracilis* Z]. *Arch Mikrobiol*, 80, 62-9.

Calvo, J., Funalot, B., Ouvrier, R. A., Lazaro, L., Toutain, A., De Mas, P., Bouche, P., Gilbert-Dussardier, B., Arne-Bes, M. C., Carriere, 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. *Arch Neurol*, 66, 1511-6.

Cao, Y. L., Meng, S., Chen, Y., Feng, J. X., Gu, D. D., Yu, B., Li, Y. J., Yang, J. Y., Liao, S., Chan, D. C. & Gao, S. 2017. MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature*, 542, 372-376.

Cartoni, R., Arnaud, E., Medard, J. J., Poirot, O., Courvoisier, D. S., Chrast, R. & Martinou, J. C. 2010. Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain*, 133, 1460-9.

Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Desquiret, V., Verny, C., Nicolas, G., Dubas, F., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., Bonneau, D. & Procaccio, V. 2011. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp Neurol*, 227, 31-41.

Celardo, I., Costa, A. C., Lehmann, S., Jones, C., Wood, N., Mencacci, N. E., Mallucci, G. R., Loh, S. H. & Martins, L. M. 2016. Mitofusin-mediated ER stress triggers neurodegeneration in pink1/parkin models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*, 7, e2271.

Celsi, F., Pizzo, P., Brini, M., Leo, S., Fotino, C., Pinton, P. & Rizzuto, R. 2009. Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 335-44.

Chandhok, G., Lazarou, M. & Neumann, B. 2018. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 93, 933-949.

Charcot, J. M. & Marie, P. 1886. Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev. méd*, 6.

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. *J Cell Biol*, 160, 189-200.

- Chen, H., McCaffery, J. M. & Chan, D. C. 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 130, 548-62.
- Chen, K. H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., Li, P., Qiu, X., Wen, S., Xiao, R. P. & Tang, J. 2004. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol*, 6, 872-83.
- Chen, Y. & Dorn, G. W., 2nd 2013. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, 340, 471-5.
- Chen, Y., Liu, Y. & Dorn, G. W., 2nd 2011. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circ Res*, 109, 1327-31.
- Cheng, X., Zhou, D., Wei, J. & Lin, J. 2013. Cell-cycle arrest at G2/M and proliferation inhibition by adenovirus-expressed mitofusin-2 gene in human colorectal cancer cell lines. *Neoplasma*, 60, 620-6.
- Chistiakov, D. A., Shkurat, T. P., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. 2018. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med*, 50, 121-127.
- 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: it facilitates PARK2 translocation to mitochondria. *Autophagy*, 10, 1105-19.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15927-32.
- Clapham, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-58.
- Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A. & Guo, M. 2006. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, 441, 1162-6.
- Cogliati, S., Enriquez, J. A. & Scorrano, L. 2016. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci*, 41, 261-273.
- Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M. & Orci, L. 2012. Mitofusin-2 independent juxtaposition of endoplasmic reticulum and mitochondria: an ultrastructural study. *PLoS One*, 7, e46293.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J. & Ciccarone, V. C. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33, 95-103.
- Davies, K. J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 61, 1-31.

de Brito, O. M. & Scorrano, L. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456, 605-10.

de Brito, O. M. & Scorrano, L. 2009. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion*, 9, 222-6.

De Stefani, D., Patron, M. & Rizzuto, R. 2015. Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochim Biophys Acta*, 1853, 2006-11.

Del Corso, A., Cappiello, M. & Mura, U. 1994. Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem*, 26, 745-50.

Demaurex, N. & Distelhorst, C. 2003. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science*, 300, 65-7.

Ding, Y., Gao, H., Zhao, L., Wang, X. & Zheng, M. 2015. Mitofusin 2-deficiency suppresses cell proliferation through disturbance of autophagy. *PLoS One*, 10, e0121328.

El-Hattab, A. W., Adesina, A. M., Jones, J. & Scaglia, F. 2015. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab*, 116, 4-12.

Elfawy, H. A. & Das, B. 2019. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sci*, 218, 165-184.

Elick, T. A., Bauser, C. A. & Fraser, M. J. 1996. Excision of the piggyBac transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica*, 98, 33-41.

Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. & Mihara, K. 2003. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem*, 134, 333-44.

Feely, S. M., Laura, M., Siskind, C. E., Sottile, S., Davis, M., Gibbons, V. S., Reilly, M. M. & Shy, M. E. 2011. MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology*, 76, 1690-6.

Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I. A., Lerner, R. A. & Wigler, M. 1988. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol*, 8, 2159-65.

Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T. & Pizzo, P. 2015. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E2174-81.

Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T. & Pizzo, P. 2016. Presenilin 2 Modulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Coupling by Tuning the Antagonistic Effect of Mitofusin 2. *Cell Rep*, 15, 2226-2238.

Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P. 2018. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis*, 9, 330.

Filadi, R., Theurey, P. & Pizzo, P. 2017. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium*, 62, 1-15.

Forbes, J. M. & Thorburn, D. R. 2018. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 14, 291-312.

Franco, A., Kitsis, R. N., Fleischer, J. A., Gavathiotis, E., Kornfeld, O. S., Gong, G., Biris, N., Benz, A., Qvit, N., Donnelly, S. K., Chen, Y., Mennerick, S., Hodgson, L., Mochly-Rosen, D. & Dorn, G. W., II 2016. Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature*, 540, 74-79.

Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*, 264, 7761-4.

Frohlich, M., Dejanovic, B., Kashkar, H., Schwarz, G. & Nussberger, S. 2014. S-palmitoylation represents a novel mechanism regulating the mitochondrial targeting of BAX and initiation of apoptosis. *Cell Death Dis*, 5, e1057.

Gegg, M. E., Cooper, J. M., Chau, K. Y., Rojo, M., Schapira, A. H. & Taanman, J. W. 2010. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*, 19, 4861-70.

GeneCards human gene database 2019a. *MFN1 Gene [Internet] Zitiert am 17.10.2019. URL <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MFN1>.*

GeneCards human gene database 2019b. *MFN2 Gene [Internet] Zitiert am 17.10.2019. URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MFN2>.*

Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszynski, J., Wieckowski, M. R. & Pinton, P. 2015. Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid Redox Signal*, 22, 995-1019.

Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*, 13, 589-98.

Gong, G., Song, M., Csordas, G., Kelly, D. P., Matkovich, S. J. & Dorn, G. W., 2nd 2015. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science*, 350, aad2459.

Gorlach, A., Klappa, P. & Kietzmann, T. 2006. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1391-418.

Gosslau, A. & Rensing, L. 2002. [Oxidative stress, age-dependent [correction of age-related] cell damage and antioxidative mechanisms]. *Z Gerontol Geriatr*, 35, 139-50.

Griffith, O. W. 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*, 27, 922-35.

Griffith, O. W. & Meister, A. 1979. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5606-10.

Groitel, B. & Jakob, U. 2014. Thiol-based redox switches. *Biochim Biophys Acta*, 1844, 1335-43.

Guillet, V., Gueguen, N., Cartoni, R., Chevrollier, A., Desquirit, 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 j*, 25, 1618-27.

Guillet, V., Gueguen, N., Verny, C., Ferre, M., Homedan, C., Loiseau, D., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P. & Chevrollier, A. 2010. Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics*, 11, 127-33.

Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. & Lippincott-Schwartz, J. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141, 656-67.

Hales, K. G. & Fuller, M. T. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 90, 121-9.

Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 70, 257-65.

Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A. & Yoshimori, T. 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495, 389-93.

Harman, D. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, 20, 145-7.

Hogan, P. G. & Rao, A. 2015. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 40-9.

Hong, S. & Pedersen, P. L. 2008. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 590-641, Table of Contents.

Hurst, S., Hoek, J. & Sheu, S. S. 2017. Mitochondrial Ca(2+) and regulation of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr*, 49, 27-47.

Ikon, N. & Ryan, R. O. 2017. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1859, 1156-1163.

Ishihara, N., Eura, Y. & Mihara, K. 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*, 117, 6535-46.

Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. & Brand, M. D. 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*, 47, 53-67.

Jat, P. S., Cepko, C. L., Mulligan, R. C. & Sharp, P. A. 1986. Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Mol Cell Biol*, 6, 1204-17.

Javadov, S. & Kuznetsov, A. V. 2013. Mitochondria: the cell powerhouse and nexus of stress. *Front Physiol*, 4, 207.

Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A. & Rizzuto, R. 1999. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13807-12.

Kabzinska, D., Kochanski, A., Drac, H., Rowinska-Marcinska, K., Ryniewicz, B., Pedrola, L., Palau, F. & Hausmanowa-Petrusewicz, I. 2006. A novel Met116Thr mutation in the GDAP1 gene in a Polish family with the axonal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4 disease. *J Neurol Sci*, 241, 7-11.

Katakura, Y., Alam, S. & Shirahata, S. 1998. Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol*, 57, 69-91.

Katayama, H., Kogure, T., Mizushima, N., Yoshimori, T. & Miyawaki, A. 2011. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem Biol*, 18, 1042-52.

Kawalec, M., Boratynska-Jasinska, A., Beresewicz, M., Dymkowska, D., Zablocki, K. & Zablocka, B. 2015. Mitofusin 2 Deficiency Affects Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in MEF Cells. *PLoS One*, 10, e0134162.

Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y. & Hayasaka, K. 2005. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet*, 116, 23-7.

Kim, Y. J., Park, J. K., Kang, W. S., Kim, S. K., Han, C., Na, H. R., Park, H. J., Kim, J. W., Kim, Y. Y., Park, M. H. & Paik, J. W. 2017. Association between Mitofusin 2 Gene Polymorphisms and Late-Onset Alzheimer's Disease in the Korean Population. *Psychiatry Investig*, 14, 81-85.

Klinke, R., Pape, H. C. & Silbernagl, S. 2005. *Physiologie*, Thieme.

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*, 305, 858-62.

Kowaltowski, A. J. & Vercesi, A. E. 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 26, 463-71.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D. & Hamilton, S. L. 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003996.

Larosa, V. & Remacle, C. 2018. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*, 38.

Leal, N. S., Schreiner, B., Pinho, C. M., Filadi, R., Wiehager, B., Karlstrom, H., Pizzo, P. & Ankarcona, M. 2016. Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid beta-peptide production. *J Cell Mol Med*, 20, 1686-95.

Leboucher, G. P., Tsai, Y. C., Yang, M., Shaw, K. C., Zhou, M., Veenstra, T. D., Glickman, M. H. & Weissman, A. M. 2012. Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Mol Cell*, 47, 547-57.

Leichert, L. I. & Dick, T. P. 2015. Incidence and physiological relevance of protein thiol switches. *Biol Chem*, 396, 389-99.

Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. & Robinson, J. P. 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, 278, 8516-25.

Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. & Sheng, M. 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119, 873-87.

Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T. & Tanaka, M. 1989. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*, 1, 642-5.

Löffler, G. 2008. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, Springer.

Loiseau, D., Chevrollier, A., Verny, C., Guillet, V., Gueguen, N., Pou de Crescenzo, M. A., Ferre, M., Malinge, M. C., Guichet, A., Nicolas, G., Amati-Bonneau, P., Malthiery,

Y., Bonneau, D. & Reynier, P. 2007. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol*, 61, 315-23.

Mailloux, R. J. & Treberg, J. R. 2016. Protein S-glutathionylation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria. *Redox Biol*, 8, 110-8.

Mallilankaraman, K., Cárdenas, C., Doonan, P. J., Chandramoorthy, H. C., Irrinki, K. M., Golenár, T., Csordás, G., Madireddi, P., Yang, J., Müller, M., Miller, R., Kolesar, J. E., Molgó, J., Kaufman, B., Hajnóczky, G., Foskett, J. K. & Madesh, M. 2012. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol*, 14, 1336-43.

Manczak, M., Calkins, M. J. & Reddy, P. H. 2011. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 20, 2495-509.

Marchi, S., Patergnani, S. & Pinton, P. 2014. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 461-9.

Marnett, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-70.

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. *J Cell Biol*, 217, 507-515.

Meydani, M., Lipman, R. D., Han, S. N., Wu, D., Beharka, A., Martin, K. R., Bronson, R., Cao, G., Smith, D. & Meydani, S. N. 1998. The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 352-60.

Meyer, M., Schreck, R. & Baeuerle, P. A. 1993. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo j*, 12, 2005-15.

Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A. & Zarkovic, N. 2015. Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth-regulating factor. *Free Radic Res*, 49, 850-60.

Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J. & Baloh, R. H. 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci*, 30, 4232-40.

Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K. & Yamamura, K. 1989. Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*, 79, 269-77.

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. *J Cell Biol*, 208, 429-42.

Munoz, J. P., Ivanova, S., Sanchez-Wandelmer, J., Martinez-Cristobal, P., Noguera, E., Sancho, A., Diaz-Ramos, A., Hernandez-Alvarez, M. I., Sebastian, D., Mauvezin, C., Palacin, M. & Zorzano, A. 2013. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J*, 32, 2348-61.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. & Youle, R. J. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183, 795-803.

Nass, M. M. & Nass, S. 1963. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. I. FIXATION AND ELECTRON STAINING REACTIONS. *J Cell Biol*, 19, 593-611.

Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. & McBride, H. 2005. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem*, 280, 25060-70.

Ngoh, G. A., Papanicolaou, K. N. & Walsh, K. 2012. Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 287, 20321-32.

Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. & Suter, U. 2005. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*, 170, 1067-78.

Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W. & Walter, P. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*, 8, 1233-42.

O'Malley, M. A. 2015. Endosymbiosis and its implications for evolutionary theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 10270-7.

Olanow, C. W. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 16, 439-44.

Orr, W. C. & Sohal, R. S. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263, 1128-30.

Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. 2015. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 72-81.

Palty, R. & Sekler, I. 2012. The mitochondrial Na(+)/Ca(2+) exchanger. *Cell Calcium*, 52, 9-15.

Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A. & Petruzzella, V. 2012. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol*, 942, 3-37.

Park, S. H. & Blackstone, C. 2010. Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep*, 11, 515-21.

Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., De Stefani, D. & Rizzuto, R. 2014. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol Cell*, 53, 726-37.

Patron, M., Raffaello, A., Granatiero, V., Tosatto, A., Merli, G., De Stefani, D., Wright, L., Pallafacchina, G., Terrin, A., Mammucari, C. & Rizzuto, R. 2013. The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *J Biol Chem*, 288, 10750-8.

Paupe, V., Prudent, J., Dassa, E. P., Rendon, O. Z. & Shoubridge, E. A. 2015. CCDC90A (MCUR1) is a cytochrome c oxidase assembly factor and not a regulator of the mitochondrial calcium uniporter. *Cell Metab*, 21, 109-16.

Penno, A., Hackenbroich, G. & Thiele, C. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 589-94.

Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A. 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*, 35, 430-42.

Perry, C. G., Kane, D. A., Lanza, I. R. & Neuffer, P. D. 2013. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes*, 62, 1041-53.

Pesta, D. & Gnaiger, E. 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol*, 810, 25-58.

Pettit, F. H., Roche, T. E. & Reed, L. J. 1972. Function of calcium ions in pyruvate dehydrogenase phosphatase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 49, 563-571.

Phillips, J. P., Campbell, S. D., Michaud, D., Charbonneau, M. & Hilliker, A. J. 1989. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2761-5.

Piantadosi, C. A. 2012. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 712-21.

Pitceathly, R. D., Murphy, S. M., Cottenie, E., Chalasani, A., Sweeney, M. G., Woodward, C., Mudanohwo, E. E., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Holton, J. L.,

Houlden, H., Blake, J., Champion, M., Flinter, F., Robb, S. A., Page, R., Rose, M., Palace, J., Crowe, C., Longman, C., Lunn, M. P., Rahman, S., Reilly, M. M. & Hanna, M. G. 2012. Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*, 79, 1145-54.

Plovanich, M., Bogorad, R. L., Sancak, Y., Kamer, K. J., Strittmatter, L., Li, A. A., Girgis, H. S., Kuchimanchi, S., De Groot, J., Speciner, L., Taneja, N., O Shea, J., Koteliansky, V. & Mootha, V. K. 2013. MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS One*, 8, e55785.

Prakriya, M. & Lewis, R. S. 2015. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, 95, 1383-436.

Priglinger, C., Klopstock, T., Rudolph, G. & Priglinger, S. G. 2019. [Leber's Hereditary Optic Neuropathy]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 236, 1271-1282.

Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G. & Rizzuto, R. 2016. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem Sci*, 41, 1035-1049.

Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. & Lippincott-Schwartz, J. 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 10190-5.

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. 2012. *Duale Reihe Biochemie*, Thieme.

Rehman, J., Zhang, H. J., Toth, P. T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A. N., Wietholt, C. & Archer, S. L. 2012. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *Faseb j*, 26, 2175-86.

Ristow, M. 2014. Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med*, 20, 709-11.

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. *Hum Mol Genet*, 25, 4266-4281.

Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. & Pozzan, T. 1993. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262, 744-7.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. & Pozzan, T. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, 280, 1763-6.

- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M. & Pozzan, T. 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358, 325-7.
- Rocha, A. G., Franco, A., Krezel, A. M., Rumsey, J. M., Alberti, J. M., Knight, W. C., Biris, N., Zacharioudakis, E., Janetka, J. W., Baloh, R. H., Kitsis, R. N., Mochly-Rosen, D., Townsend, R. R., Gavathiotis, E. & Dorn, G. W., 2nd 2018. MFN2 agonists reverse mitochondrial defects in preclinical models of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Science*, 360, 336-341.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. & Lombes, A. 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 115, 1663-74.
- Rottenberg, H. & Scarpa, A. 1974. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry*, 13, 4811-7.
- Santel, A. & Fuller, M. T. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 114, 867-74.
- Sanz, A., Pamplona, R. & Barja, G. 2006. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal*, 8, 582-99.
- Saotome, M., Katoh, H., Satoh, H., Hayashi, H. & Hajnoczky, G. 2014. "Mitochondrial remodeling" in coronary heart disease. *Research Reports in Clinical Cardiology*, 2014, 111.
- Schrödel, A. 2009. Trypsinierung von Zellkulturzellen. *Biologie in unserer Zeit*, 39, 234.
- Sebastian, D., Hernandez-Alvarez, M. I., Segales, J., Sorianello, E., Munoz, J. P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J. C., Gopalacharyulu, P., Oresic, M., Pich, S., Burcelin, R., Palacin, M. & Zorzano, A. 2012. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5523-8.
- Sebastian, D., Sorianello, E., Segales, J., Irazoki, A., Ruiz-Bonilla, V., Sala, D., Planet, E., Berenguer-Llargo, A., Munoz, J. P., Sanchez-Feutrie, M., Plana, N., Hernandez-Alvarez, M. I., Serrano, A. L., Palacin, M. & Zorzano, A. 2016. Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J*, 35, 1677-93.
- Senft, D. & Ronai, Z. A. 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40, 141-8.
- Shadel, G. S. & Horvath, T. L. 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 163, 560-9.

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, 2806-2813.

Shao, J., Fu, Z., Ji, Y., Guan, X., Guo, S., Ding, Z., Yang, X., Cong, Y. & Shen, Y. 2016. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a Ca(2+)/H(+) antiporter. *Sci Rep*, 6, 34174.

Shirihai, O. S., Song, M. & Dorn, G. W., 2nd 2015. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circ Res*, 116, 1835-49.

Shoshan-Barmatz, V. & Gincel, D. 2003. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys*, 39, 279-92.

Shutt, T., Geoffrion, M., Milne, R. & McBride, H. M. 2012. The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, 13, 909-15.

Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215, 213-9.

Sies, H. 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, 11, 613-619.

Skre, H. 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*, 6, 98-118.

Son, M. J., Kwon, Y., Son, M. Y., Seol, B., Choi, H. S., Ryu, S. W., Choi, C. & Cho, Y. S. 2015. Mitofusins deficiency elicits mitochondrial metabolic reprogramming to pluripotency. *Cell Death Differ*, 22, 1957-69.

Stadtman, E. R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*, 62, 797-821.

Suen, D. F., Norris, K. L. & Youle, R. J. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*, 22, 1577-90.

Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H. M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R. & Yanagi, S. 2013. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell*, 51, 20-34.

Sun, X., Li, X., Jia, H., Loo, J. J., Bucktrout, R., Xu, Q., Wang, Y., Shu, X., Dong, J., Zuo, R., Yang, L., Liu, G. & Li, X. 2019. Effect of heat-shock protein B7 on oxidative stress in adipocytes from preruminant calves. *J Dairy Sci*, 102, 5673-5685.

Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y. & Iino, M. 2014. Imaging intraorganelle Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun*, 5, 4153.

Thafer, O., Wolf, C., Dey, P. N., Pouya, A., Wullner, V., Tenzer, S. & Methner, A. 2018. The thiol switch C684 in Mitofusin-2 mediates redox-induced alterations of mitochondrial shape and respiration. *Neurochem Int*, 117, 167-173.

Thompson, S. R. 2012. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol*, 20, 558-66.

Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. 2018. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*, 62, 341-360.

To, M. S., Aromataris, E. C., Castro, J., Roberts, M. L., Barritt, G. J. & Rychkov, G. Y. 2010. Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca(2+) current in liver cells. *Arch Biochem Biophys*, 495, 152-8.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., Ehses, S., Krause, F., Chan, D. C., Alexander, C., Bauer, C., Youle, R., Langer, T. & Martinou, J. C. 2009. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J*, 28, 1589-600.

Tooth, H. H. 1886. *The peroneal type of progressive muscular atrophy: a thesis for the degree of M.D. in the University of Cambridge*. M.D., University of Cambridge.

Trump, B. F. & Berezesky, I. K. 1996. The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death [corrected]. *New Horiz*, 4, 139-50.

Tsai, M. F., Jiang, D., Zhao, L., Clapham, D. & Miller, C. 2014. Functional reconstitution of the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter Letm1. *J Gen Physiol*, 143, 67-73.

Vais, H., Mallilankaraman, K., Mak, D. D., Hoff, H., Payne, R., Tanis, J. E. & Foskett, J. K. 2016. EMRE Is a Matrix Ca(2+) Sensor that Governs Gatekeeping of the Mitochondrial Ca(2+) Uniporter. *Cell Rep*, 14, 403-410.

Vais, H., Tanis, J. E., Muller, M., Payne, R., Mallilankaraman, K. & Foskett, J. K. 2015. MCUR1, CCDC90A, Is a Regulator of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Cell Metab*, 22, 533-5.

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 Neuropathol Commun*, 7, 86.

van Vliet, A. R. & Agostinis, P. 2018. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. *Curr Top Microbiol Immunol*, 414, 73-102.

Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. 2006. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 175, 237-47.

Wang, M. & Casey, P. J. 2016. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 110-22.

Wang, W., Lu, J., Zhu, F., Wei, J., Jia, C., Zhang, Y., Zhou, L., Xie, H. & Zheng, S. 2012. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Med Oncol*, 29, 70-6.

Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Li, X., Perry, G., Smith, M. A. & Zhu, X. 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29, 9090-103.

Wei, Y. H., Lu, C. Y., Lee, H. C., Pang, C. Y. & Ma, Y. S. 1998. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 155-70.

Westermann, B. 2010a. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 872-84.

Westermann, B. 2010b. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 872-884.

Wolf, C., Zimmermann, R., Thaher, O., Bueno, D., Wullner, V., Schafer, 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.

Xu, K., Chen, G., Li, X., Wu, X., Chang, Z., Xu, J., Zhu, Y., Yin, P., Liang, X. & Dong, L. 2017. MFN2 suppresses cancer progression through inhibition of mTORC2/Akt signaling. *Sci Rep*, 7, 41718.

Yao, Q., Jiang, X., Huang, Z. W., Lan, Q. H., Wang, L. F., Chen, R., Li, X. Z., Kou, L., Xu, H. L. & Zhao, Y. Z. 2019. Bilirubin improves the quality and function of hypothermic preserved islets by its antioxidative and anti-inflammatory effect. *Transplantation*.

Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337, 1062-5.

Yu, B. P., Kang, C. M., Han, J. S. & Kim, D. S. 1998. Can antioxidant supplementation slow the aging process? *Biofactors*, 7, 93-101.

Yuan, Q., Pearce, L. L. & Peterson, J. 2017. Relative Propensities of Cytochrome c Oxidase and Cobalt Corrins for Reaction with Cyanide and Oxygen: Implications for Amelioration of Cyanide Toxicity. *Chem Res Toxicol*, 30, 2197-2208.

Yusa, K., Zhou, L., Li, M. A., Bradley, A. & Craig, N. L. 2011. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 1531-6.

Zampese, E., Fasolato, C., Kipanyula, M. J., Bortolozzi, M., Pozzan, T. & Pizzo, P. 2011. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2777-82.

Zhou, Y., Carmona, S., Muhammad, A., Bell, S., Landeros, J., Vazquez, M., Ho, R., Franco, A., Lu, B., Dorn, G. W., 2nd, Wang, S., Lutz, C. M. & Baloh, R. H. 2019. Restoring mitofusin balance prevents axonal degeneration in a Charcot-Marie-Tooth type 2A model. *J Clin Invest*, 130, 1756-1771.

Zuchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P. D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M. A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A. V., Timmerman, V., Schroder, J. M. & Vance, J. M. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, 36, 449-51.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen meinen besonderen Dank entgegenbringen, ohne deren Hilfe und Motivation die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals möglich gewesen wäre:

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Axel Methner für das Vertrauen und die Chance danken, in seiner Forschungsgruppe meine Doktorarbeit abzuleisten und erste experimentelle und wissenschaftliche Erfahrungen zu sammeln. Ausdrücklich möchte ich mich für die stetige Erreichbarkeit, Hilfe, Anregung, Motivation und insgesamt einfach ausgezeichnete Betreuung trotz stressigem Alltag in Forschung und Klinik bedanken. Sehr dankbar bin ich außerdem für die zwei Publikationen als Erstautor.

Prof. Dr. Michael Schäfer danke ich für die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter. Vielen Dank für die Beurteilung meiner Promotionsschrift.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten AG Methner, die mich von einem absoluten Anfänger im Labor zu einem mehr oder weniger routinierten Labormitarbeiter und Wissenschaftler geformt haben. Einen besonderen Dank möchte ich hierbei meinen Laborkollegen und engeren Betreuern Partha und Christina aussprechen. Vor allem Christina hat mich mit unglaublicher Geduld betreut und immer wieder alle möglichen Fragen, gerne auch mehrmals, beantwortet und mir den Einstieg in die Wissenschaft sehr vereinfacht.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt allen Mitgliedern meiner Familie, meinen drei wundervollen Schwestern und meinen wundervollen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben, die mich stets unterstützt haben und dank denen ich all meine Wünsche und Hoffnungen bis heute verwirklichen konnte. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf

Osamah Mahmud Ali Yosif Hamdan Thaher

[*07.04.1994 in Darmstadt]



BILDUNGSWEG

10/2013 - 12/2019

Studium der Humanmedizin

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

11/2019	3. Staatsexamen	Note 1
10/2018	2. Staatsexamen	Note 1
09/2015	1. Staatsexamen	Note 1,5

06/2013

Abitur, Albrecht-Dürer-Schule Weiterstadt, Note 1,0

STIPENDIEN

04/2016 - 12/2019

Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

BERUFSERFAHRUNG

seit 08/2020

Arzt in Weiterbildung
Neurologische Klinik, Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden

04/2020 - 07/2020

Arzt in Weiterbildung
Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg

11/2018 - 10/2019

Praktisches Jahr
Chirurgie, Universitätsklinikum Nablus, Palästina
Neurologie, Katholisches Klinikum Koblenz Montabaur
Innere Medizin, Katholisches Klinikum Koblenz Montabaur

02/2018 - 03/2018

Famulatur: Allgemeinmedizin, Weiterstadt

09/2017 - 10/2017

Famulatur: Neurologie, Mainz

03/2016 - 04/2016

Famulatur: Unfallchirurgie und Orthopädie, Groß-Gerau

02/2016 - 03/2016

Famulatur: Innere Medizin, Düsseldorf

SPRACHKENNTNISSE

Deutsch
Arabisch
Englisch
Latein

Muttersprache
Muttersprache
fließend in Wort und Schrift
Großes Latinum

WISSENSCHAFTLICHE LAUFBAHN

08/2016-08/2017

Experimentelle Promotion:

Adaption der mitochondrialen Form und Funktion an oxidativen Stress durch Mitofusin-2

Institut für Molekulare Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
betreut von Prof. Dr. Axel Methner

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

Wolf C. *, Zimmermann W. *, **Thaher O.***, Bueno D., Wüllner V., Schäfer MKE., Albrecht P., Methner A. 2019 Oct „The Charcot-Marie Tooth Disease Mutation R94Q in MFN2 Decreases ATP Production but Increases Mitochondrial Respiration under Conditions of Mild Oxidative Stress.“ Cells, 8. Epub 2019 Oct.

* These authors contributed equally to this work.

Freier Vortrag: „Veränderungen der mitochondrialen Form und Funktion bei Änderungen des zellulären Redoxmilieus – Relevanz für die Pathogenese der Charcot-Marie-Tooth-2A-Erkrankung“
90. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2017 (Leipzig)

Thaher O., Wolf C., Dey P.N., Pouya A., Wüllner V., Tenzer S., Methner A. 2018 Jul „The thiol switch C684 in Mitofusin-2 mediates redox-induced alterations of mitochondrial shape and respiration.“ Neurochem Int 117: 167-173. Epub 2017 May.