

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

Über den Effekt des Knockdowns der TMBIM-Proteinfamilie in der Taufliede
Drosophila Melanogaster

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

Vorgelegt von

Sebastian Buhr
aus Seligenstadt

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Schild

1. Gutachter: [REDACTED]

2. Gutachter: [REDACTED]

Tag der Promotion: 16.04.2024

1. Inhalt

2. Abbildungsverzeichnis	i
3. Tabellenverzeichnis	iii
4. Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1. Die TMBIM-Proteinfamilie.....	2
2.2. Von der BCL-2-Familie zur Entdeckung des Bax inhibitor motifs	2
2.2.1. Die Mitglieder der TMBIM-Familie.....	3
2.2.2. Sind TMBIM Proteine Calciumkanäle?	13
2.3. MCU	14
2.4. Drosophila Melanogaster.....	16
2.4.1. Drosophila als Modellorganismus	16
2.4.2. Die TMBIM-Familie der Drosophila	17
3. Material	20
3.1. Fliegenstämme	20
3.2. Primer und Sonden.....	21
3.3. Kits	21
3.4. Geräte	21
3.5. Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	22
3.6. Programme.....	22
4. Methoden	23
4.1. Fliegenkulturen	23
4.2. Fliegennahrung	23
4.3. Das GAL4/UAS-System	24
4.4. Kreuzungen	24
4.5. Lebensfähigkeit	25
4.6. CG2076 KD-MCU / EMRE-Interaktion.....	27
4.6.1. Generierung einer elav-Gal4 / FM7a ;; CG2076 / TM3 -Linie	27
4.6.2. Kreuzung von elav-Gal4 ;; CG2076-RNAi mit MCU / EMRE	27

4.7.	Larvengeschwindigkeit	28
4.8.	Negative Geotaxis	28
4.9.	Lebensdauer	28
4.10.	Metabolischer Stress.....	29
4.11.	Laufband	29
4.12.	Überprüfung des RNAi-Knockdowns.....	30
4.12.1.	RNA - Extraktion.....	30
4.12.2.	Reverse Transkriptase.....	30
4.12.3.	qPCR	30
4.13.	Statistik.....	30
5.	Ergebnisse	32
1.	Die Gewebsexpression der TMBIM-Proteinfamilie	32
5.1.	Die vollständige Entwicklung gesunder Fliegen wird vor allem durch den muskelspezifische Knockdown von CG9722/TMBIM1 gestört	33
5.2.	TMBIM2/CG3814 reduziert bei ubiquitärem und muskelspezifischem Knockdown die Lebensfähigkeit.....	35
5.3.	Der TMBIM3/CG3798-Knockdown hat lediglich eine leichtgradige Einschränkung der Lebensfähigkeit zur Folge	39
5.4.	TMBIM4/CG30379 scheint vor allem in der Entwicklung von Gliazellen eine Rolle zu spielen.....	41
5.5.	TMBIM5/CG2076 ist ein entscheidendes Gen für die Entwicklung und Gesundheit der Drosophila.....	44
5.6.	MCU und TMBIM5/CG2076 zeigen eine komplexe Interaktion	49
5.7.	TMBIM6/CG7188 scheint vor allem während der Verpuppung eine Rolle zu spielen.....	52
6.	Diskussion.....	55
6.1.	Limitierungen.....	63
6.2.	Ausblick.....	65
7.	Zusammenfassung.....	66
8.	Danksagung.....	68
9.	Quellen.....	69

10. Tabellarischer Lebenslauf..... 76

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte 50:50-Verteilung adulter Fliegen nach Kreuzung einer UAS-RNAi-Linie mit einer Gal4-Treiber/Balancer-Linie.....	26
Abbildung 2: Vereinfachter Aufbau des "Laufbandes"	29
Abbildung 3: Sowohl der ubiquitäre, als auch der neuronenspezifische Knockdown von CG9722 stört die Entwicklung adulter Fliegen.....	33
Abbildung 4: Der mef2-gesteuerte Knockdown von CG9722 führt zu einer deutlichen Reduktion adulter Fliegen bei unauffälliger motorischer Funktion der Larven	34
Abbildung 5: Der Knockdown von CG3814 führt zu einer reduzierten Anzahl adulter Fliegen unter tubP-RNAi und mef2-RNAi, nicht aber unter repo-Gal4 und elav-Gal 36	
Abbildung 6: Der Knockdown von CG3814 unter mef2 sorgt für eine reduzierte Lebenszeit adulter Fliegen ohne motorische Einschränkungen.....	38
Abbildung 7: Der Knockdown von CG3798 mittels repo-Gal4 und elav-Gal4 hat keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit.....	39
Abbildung 8: Der muskelspezifische Knockdown von CG3798 führt zu einer leichten Einschränkung der Lebensfähigkeit, aber unauffälligen Geschwindigkeit.	40
Abbildung 9: Der gliale Knockdown von CG30379 hat eine deutliche Reduzierung adulter Fliegen zur Folge. Der stärkste Effekt findet sich unter alm-Gal4-gesteuerter RNAi-Expression.	42
Abbildung 10: Der mef2- und elav-Gal4-gesteuerte Knockdown von CG30379 senkt die Lebensdauer von Fliegen ohne Einfluss auf motorische Funktion oder Erreichen des adulten Stadiums.	43
Abbildung 11: Der Knockdown von CG2076 führt unter tubP-Gal4 und repo-Gal4 zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl adulter Fliegen, wobei der Effekt unter tubP-Gal4 am stärksten ausgeprägt ist.	44
Abbildung 12: Der muskelspezifische Knockdown von CG2076 führt zu einer unauffälligen Anzahl adulter Fliegen bei eingeschränkter Lebenserwartung und motorischer Funktion.	45
Abbildung 13: Der neuronenspezifische Knockdown von CG2076 führt zu einer reduzierten Anzahl adulter Fliegen mit verkürzter Lebensdauer und eingeschränkter motorischer Funktion.	47
Abbildung 14: Elav-Gal4-CG2076-RNAi-Fliegen sind besonders anfällig gegenüber H ₂ O ₂ und Rotenon.....	48

Abbildung 15: Der negative Effekt des neuronalen Knockdowns von CG2076 wird durch die gleichzeitige Überexpression von MCU verstärkt und durch EMRE-Überexpression abgeschwächt.....	50
Abbildung 16: Die eingeschränkte Lebensdauer durch CG2076-RNAi lässt sich durch MCU-RNAi ausgleichen. MCU-Überexpression führt zu einer veränderten Überlebenskurve.	52
Abbildung 17: Der Knockdown von CG7188 führt unter repo-Gal4 und elav-Gal4 zu einer leichtgradigen Einschränkung der Vitalität.....	53
Abbildung 18: Der muskelspezifische Knockdown von CG7188 führt zu einer ausgeprägten Reduktion adulter Fliegen, die Larvengeschwindigkeit ist jedoch nicht beeinträchtigt.....	54

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der TMBIM-Familie zwischen Mensch und Drosophila Melanogaster nach Rojas-Rivera, Hetz et al.	18
Tabelle 2: Vergleich der TMBIM-Familie zwischen Mensch und Drosophila Melanogaster nach Zhang et al.	19
Tabelle 3: Die für meine Versuche verwendeten Fliegenstämme nach BSC/VDRC-ID, Genotyp, Kurzbeschreibung, Herkunft, sowie der intern verwendeten ID.	21
Tabelle 4: Die für meine Versuche verwendeten Primer und Sonden nach Gen, ID und Sequenz, sowohl FWD, als auch REV.	21
Tabelle 5: Die für meine Versuche verwendeten Kits mit dazugehörigem Hersteller.	21
Tabelle 6: Die für meine Versuche verwendeten Geräte nach Hersteller.	22
Tabelle 7: Die für meine Versuche verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien nach Hersteller.	22
Tabelle 8: Die für meine Versuche verwendeten PC-Programme nach Hersteller. ...	22
Tabelle 9: Zutatenliste des Fliegenfutters.	23
Tabelle 10: Die für meine Versuche verwendeten Gal4-Treiber-Linien.	24
Tabelle 11: Kreuzungsschema eines Gal4/Balancer-Stammes mit einem UAS-RNAi-Stamm.	26
Tabelle 12: Kreuzungsschema eines Gal4/Balancer-Stammes mit einem UAS-RNAi/Balancer-Stamm.	26
Tabelle 13: Kreuzungsschema zur Generierung von Fliegen, welche sowohl über elav-Gal4, als auch UAS-CG2076-RNAi verfügen.	27
Tabelle 14: Die Expression der TMBIM-Proteinfamilie nach ausgewähltem Gewebe anhand des mRNA-Signals.	32

4. Abkürzungsverzeichnis

Anova	-	Analysis of Variance
ATP	-	Adenosintriphosphat
Bad	-	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death
Bax	-	Bcl-2-associated-X-protein
BI-1	-	Bax inhibitor-1
BCL-2	-	B-cell-lymphoma-2-Protein
BLAST	-	Basic Local Alignment Search Tool
tubP	-	Embryonic Lethal Abnormal Vision
EMRE	-	Essential MCU regulator
ER	-	Endoplasmatisches Retikulum
FWD	-	Forward
IMM	-	Inner mitochondrial membran
IP ₃	-	Inositoltrisphosphat
IRBIT	-	IP ₃ receptor binding protein released with Inositoltrisphosphate
KD	-	Knockdown
KO	-	Knockout
MCU	-	Mitochondrial calcium uniporter
mef2	-	Myocyte-specific enhancer factor 2
MICU1	-	Mitochondrial Calcium Uptake 1
NCLX	-	Na/Li/Ca exchanger
OMM	-	Outer mitochondrial membran
PCR	-	Polymerase chain reaction
PTP	-	Permeability transition pore
RECS1	-	responsive to centrifugal force and shear stress 1
repo	-	Reversed polarity
REV	-	Reverse
TLR4	-	Toll-like Receptor 4
TMBIM	-	Trans-membran-bax-inhibitor
tubP	-	tubulin
UAS	-	upstream activating sequence
UPR	-	Unfolded protein response
VDAC	-	Voltage-Dependent Anion Channel
WT	-	Wildtyp
ZNS	-	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die TMBIM-Proteinfamilie ist weit verbreitet und über verschiedene Reiche des Lebens hinweg konserviert. Aus diesem Grund wird für ihre Mitglieder eine wichtige Rolle angenommen (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Ihre Bezeichnung verdankt die Proteinfamilie der antagonistischen Wirkung des namensgebenden Proteins Bax-inhibitor-1 auf das proapoptotische Bax (Xu and Reed, 1998), einem Mitglied der BCL-2-Familie. Im Menschen finden sich mindestens sechs Mitglieder, lokalisiert in verschiedenen Membranen, vor allem des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgiapparates (Lisak et al., 2015). Eine Besonderheit stellt TMBIM5 dar, welches mitochondrial lokalisiert ist (Oka et al., 2008) (Seitaj et al., 2020). Eine Interaktion mit oder ein wichtiger Einfluss auf intrazelluläre Calciumspiegel und -signale werden für die meisten Mitglieder der Familie angenommen. Hierzu passend konnten für TMBIM6/BI-1 Eigenschaften eines Calcium-Kanals gezeigt werden (Bultynck et al., 2012) (Guo et al., 2019).

Wichtige Regulatoren der verschiedenen intrazellulären Calciumspiegel sind das ER, der Golgiapparat sowie die Mitochondrien. In den Mitochondrien wird eine entscheidende Rolle des Mitochondrialen Calcium Uniporter (MCU) angenommen. Dieser ermöglicht eine rasche Aufnahme von Calciumionen in die Mitochondrien, was beispielsweise bei der Signaltransduktion von Bedeutung ist, aber auch das zytosolische Calcium auf einem niedrigen basalen Level hält (Baughman et al., 2011).

Auch die *Drosophila Melanogaster* verfügt über eine eigene Ausstattung an TMBIM-Proteinen. Dies ist bemerkenswert, da die namensgebende BCL-2-Familie in Invertebraten nur schwach konserviert ist (Suraweera et al., 2022). Eine über die Interaktion mit BCL-2-Proteinen hinausgehende Funktion wird deshalb angenommen (M'Angale and Staveley, 2016a) (Rojas-Rivera et al., 2012).

In dieser Arbeit wird der Effekt des Knockdowns der einzelnen Mitglieder der TMBIM-Proteinfamilie in der *Drosophila Melanogaster* untersucht. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf TMBIM5, bzw. sein Ortholog in der Taufliege gelegt. Hierbei wird zusätzlich die Interaktion mit dem MCU und seinen assoziierten Proteinen untersucht. Dabei wird vor allem das Gal4-UAS-System genutzt. Hierbei handelt es sich um ein erprobtes und robustes System, welches den gewebespezifischen Knockdown verschiedener Proteine ermöglicht (Brand and Perrimon).

2. Literaturdiskussion

2.1. Die TMBIM-Proteinfamilie

2.2. *Von der BCL-2-Familie zur Entdeckung des Bax inhibitor motifs*

Die TMBIM-Familie ist eine bislang nicht vollständig verstandene Gruppe homologer Proteine, welche einen wichtigen Einfluss auf die Apoptose hat (Lisak et al., 2015) (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Bei allen Mitgliedern der TMBIM-Proteinfamilie handelt es sich um Membranproteine. Dies zeigt sich unter anderem durch das abwechselnde Vorkommen hydrophober und hydrophiler Abschnitte in der Primärstruktur der Proteine (Lisak et al., 2015). Das Vorkommen mehrfacher hydrophober Transmembranabschnitte ist über die Mitglieder der Familie konserviert. Noch nicht abschließend geklärt ist, ob es sich um sechs oder sieben Transmembranabschnitte handelt, wobei von mindestens sechs Abschnitten ausgegangen wird (Carrara et al., 2012). Der Name TMBIM steht als Akronym für 'Transmembran Bax Inhibitor Motif'. Grund dieser Benennung ist die erstmalige Beschreibung des namensgebenden Bax inhibitor-1, im Folgenden meist als TMBIM6 bezeichnet, als funktionellen Antagonisten zu Bax (Bcl-2-associated X protein) (Xu and Reed, 1998). Bei Bax handelt es sich um ein proapoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie (B-cell lymphoma 2). Die Mitglieder der BCL-2-Proteinfamilie stellen in höheren Wirbeltieren wichtige Regulatoren der Apoptose dar (Adams and Cory, 1998). Erste Beschreibungen erfolgten vor allem aufgrund der bereits früh entdeckten Rolle von BCL-2-Genen in bestimmten Krebserkrankungen, wodurch sich wiederum der Name 'B-Cell Lymphoma 2' erklärt (Seto and Osada, 1991). Die BCL-2-Familie besteht sowohl aus pro-, als auch antiapoptotischen Proteinen. Zu den antiapoptotischen Mitgliedern zählt etwa das namensgebende BCL-2. Darüber hinaus ist eine dritte Gruppe beschrieben, deren Mitglieder antiapoptotische BCL-2-Proteine binden können, wodurch diese eine proapoptotische Aktivität aufweisen (Adams and Cory, 1998). Bax ist einer der am besten untersuchten und prominentesten Vertreter der proapoptotischen Seite. Es kann beispielsweise Einfluss auf den Zellzyklus nehmen oder als Kanal die Durchlässigkeit zellulärer Membranen beeinflussen (Brady and Gil-Gómez). Die Wirkung proapoptotischer Mitglieder wie BCL-2 und antiapoptotischer Mitglieder wie Bax wird als direkt entgegengesetzt beschrieben. Eine vermehrte Expression proapoptotischer Mitglieder kann durch eine Überexpression antiapoptotischer Mitglieder ausgeglichen werden. Diese entgegengesetzte Wirkung ist nicht nur funktionaler Natur, es ist beispielsweise eine direkte Interaktion des proapoptotischen BCL-2-Homologes Bax mit BCL-2 in Form einer Heterodimerisierung beschrieben.

Liegt Bax als Heterodimer mit BCL-2 vor, ist es inaktiv. Bei Überschuss von Bax kommt es dagegen zu vermehrten Bax-Homodimeren, welche ihre proapoptotische Wirkung entfalten können (Oltval et al., 1993). Für BI-1 (TM6IM6) ist entsprechend des Namens eine schützende Wirkung gegenüber Bax beschrieben. Diese scheint jedoch nicht auf einer direkten Interaktion der beiden Proteine zu beruhen (Xu and Reed, 1998). Vielmehr wird angenommen, dass TM6IM6 auf Targets von Bax, wie beispielsweise der Inositol requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α (IRE1 α), Einfluss nimmt. Beim genannten IRE1 α handelt es sich um ein wichtiges Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER), welches vor allem in der Unfolded Protein Response (UPR) eine wichtige Rolle spielt (Lisbona et al., 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass TM6IM6 als Membranprotein des ER eine Calcium-permeable Pore bildet. Ein hierdurch erklärbarer stetiger Ausstrom von Calciumionen aus dem ER kann die Zelle ebenfalls vor Bax-abhängigen proapoptotischen Signalen schützen, da in der Folge weniger Calcium als apoptotisches Signal aus dem ER bereitgestellt werden kann (Bultynck et al., 2012).

In *Drosophila Melanogaster* sind zwei Mitglieder der BCL-2-Familie bekannt. Damit ist die Gruppe deutlich kleiner als in Vertebraten (Youle and Strasser, 2008). Die beiden Proteine tragen den Namen debcl und buffy. Eine im Vergleich zur BCL-2-Familie höherer Wirbeltiere weniger wichtige Rolle wird angenommen. Denn auch bei Fehlen beider Mitglieder entwickeln sich die Fliegen weitgehend normal; beide Mitglieder scheinen vor allem die mit einem DNA-Schaden assoziierte Apoptose zu hemmen. Dies geschieht über eine Hemmung proapoptotischer Faktoren wie Rpr (Sevrioukov et al., 2007). Trotz dieser funktionell scheinbar wenig relevanten BCL-2-Ausstattung verfügt *Drosophila melanogaster* über ein eigenes Set von TM6IM-Genen. Dies, sowie die starke Konservierung der Familie, auch in Organismen ohne Vorkommen eigener BCL-2-Proteinen, wie bestimmten Pflanzen, Hefen und Bakterien, spricht für eine Rolle, die über die reine Beeinflussung von BCL-2-Proteinen hinausgeht (Gamboa-Tuz et al., 2018) (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Einige der beschriebenen und vermuteten Effekte werden im Folgenden genauer beschrieben. Der Mensch verfügt über sechs Mitglieder der TM6IM-Familie, *Drosophila Melanogaster* über sieben.

2.2.1. Die Mitglieder der TM6IM-Familie

TM6IM1 (auch RECS1 oder LFG3) ist vor allem in der Plasmamembran, dem Golgiapparat, Endo- und Lysosomen vertreten. Der Knockout ist in Mäusen nicht letal (Zhao et al., 2017). Wie auch bei anderen Mitgliedern der Genfamilie wird eine

Regulation des zellulären Überlebens und Sterbens angenommen. TMBIM1 schützt Zellen vor bestimmten, aber nicht allen proapoptotischen Signalwegen (Shukla et al., 2011). Wechselwirkungen sind mit FAS (FS-7-associated surface antigen), einem für die Einleitung der Apoptose wichtigen Signalweg, beschrieben. Eine TMBIM1-Überexpression führt zu einer erniedrigten Expression des FAS-Rezeptors auf der Plasmamembran und damit zu einer gewissen zellulären Resistenz gegenüber proapoptotischen FAS. Ein gleichzeitiger Schutz gegenüber einem anderen proapoptotischen Signalweg, vermittelt durch den TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), konnte nicht nachgewiesen werden. Klinisch scheint TMBIM1 besonders bei Erkrankungen mit gestörtem Lipidstoffwechsel eine Rolle zu spielen. So verringert eine Überexpression von TMBIM1 die Entwicklung und das Fortschreiten einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) oder Fettleberhepatitis (NASH). Beide Pathologien sind vor allem in den Industrienationen häufig auftretende, schwerwiegende Krankheiten (Younossi et al.). In Mäusen sinkt die TMBIM1-Expression bei besonders fettreicher Nahrung, und an einer NAFLD oder NASH erkrankte Mäuse zeigen geringere Level an TMBIM1-Expression als nicht erkrankte. Eine Überexpression von TMBIM1 führt in Mäusen zudem zu einer verbesserten Insulinsensitivität, einer verminderten hepatischen Fettansammlung und reduzierter Entzündungsaktivität (Zhao et al., 2017). In Javaneraffen zeigte eine TMBIM1-Überexpression ähnliche Effekte mit reduzierter Nüchtern glukose- und Nüchterninsulinkonzentrationen, sowie verminderten Entzündungsmarkern im Serum. Außerdem kam es zu einer verminderten hepatischen Fettansammlung, Entzündungsaktivität und Fibrose (Wree et al., 2018). Auch bei der kardialen Hypertrophie wird TMBIM1 als wichtiger Einflussfaktor beschrieben. Im Mausmodell ist TMBIM1 in hypertrophen Herzen herabreguliert und ein kardiales Silencing von TMBIM1 führt zu einer kardialen Hypertrophie (Deng et al., 2018). Sowohl für den Einfluss von TMBIM1 auf die NAFLD, als auch auf die kardiale Hypertrophie wird eine Wirkung von TMBIM1 auf lysosomale Stoffwechselwege als Erklärung angegeben. Vor allem die lysosomale Degradation des Toll-Like-Receptors-4 (TLR4) wird als wichtiger Effektor diskutiert. So kommt es durch einen TMBIM1-Knockout oder veränderter Expression zwar nicht zu einer Veränderung der TLR4-mRNA-Level, jedoch zu nachweisbar erniedrigten TLR4-Protein-Leveln. Die Interaktion zwischen TMBIM1 und TLR4 findet somit höchstwahrscheinlich nicht auf genomischer, sondern auf Ebene des exprimierten Proteins statt (Zhao et al., 2017). TLR4 bindet unter anderem freie Fettsäuren und aktiviert verschiedene Signalkaskaden, welche einen Einfluss auf die

Entzündungsaktivität haben, was zumindest einen Teil des Effektes erklärt (Vaure and Liu, 2014).

TMBIM2 (auch LFG, LFG2 oder FAIM2) wird als strukturell sehr ähnlich zu TMBIM1 beschrieben, mit dem es einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren teilt (Hu et al., 2009). Es ist ebenfalls in ER und Golgiapparat lokalisiert, aber zeigt eine vorwiegend neuronale Expression, insbesondere postsynaptisch und dendritisch (Schweitzer et al., 2002). Ein besonders hohes Expressionslevel wurde für den Hippocampus nachgewiesen. Ein Knockout in Mäusen ist mit dem Leben vereinbar, es kommt jedoch zu einer gestörten Entwicklung des Kleinhirns. Dies zeigte sich besonders in einer gestörten Entwicklung der Purkinje-Zellen (Hurtado de Mendoza et al., 2011). Wie TMBIM1 bietet TMBIM2 einen Schutz gegen die FAS-gesteuerte Apoptose, anders als bei TMBIM1 kommt es dabei jedoch zu keiner Abnahme der Rezeptordichte. Auf den durch Tumornekrosefaktor- α -gesteuerten (TNF α , ein vor allem für Entzündungsreaktionen entscheidendes Zytokin) Zelltod hat eine TMBIM2-Überexpression dagegen keinen Einfluss (Somia et al., 1999). Passend zu der vorwiegend neuronalen Expression wurde der Einfluss von TMBIM2 auf verschiedene neurologische Krankheitsbilder wie die zerebrale Ischämie oder Morbus Parkinson untersucht (Habib et al., 2019; Komnig et al., 2016). Nach TMBIM2-Knockout zeigen Mäuse eine höhere Anfälligkeit gegenüber ischämischen Hirnschäden, nachweisbar durch ein größeres Infarktvolume nach transientser Okklusion der Arteria cerebri media. Außerdem konnte die Hochregulation der proapoptotischen Caspase 8 gezeigt werden, sodass von einem verstärkten Zelluntergang im minderdurchbluteten Gewebe ausgegangen wird (Habib et al., 2019). Der Einfluss von TMBIM2 auf Morbus Parkinson wurde durch 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) Gabe an Mäusen getestet. In diesem Modell zeigte sich eine erhöhte Anfälligkeit von TMBIM2-Knockout-Mäusen gegenüber der Noxe. Umgekehrt führt in genetisch nicht veränderten Mäusen die Gabe von MPTP zu einer Herabregulation der TMBIM2-Expression (Komnig et al., 2016). Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von TMBIM2 auf die bakterielle Meningitis. Erneut zeigte sich eine erhöhte Anfälligkeit der TMBIM2-Knockout-Mäuse für neuronale Apoptose, gemessen im Hippocampus. Allerdings zeigten TMBIM2-Knockout-Mäuse eine erhöhte hippocampale Neurogenese nach erfolgreicher Antibiotikatherapie und folglich ein besseres funktionelles Langzeit-Outcome mit besseren Werten in anschließenden Funktionstests wie einem Wasserlabyrinth. Eine ambivalente Rolle des Proteins in

verschiedenen neurologischen Erkrankungsbildern muss somit diskutiert werden (Tauber et al., 2014). Neben einer Rolle bei Krankheiten des Gehirns gibt es Hinweise, dass Varianten des TMBIM2-Gens mit Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind. Dies zeigten genetische Populationsstudien aus China (Kang et al., 2020). Interessanterweise besteht hier eine weitere Verbindung zum verwandten TMBIM1, für das ein Einfluss auf Blutglukose, Körpergewicht und Insulinsensibilität beschrieben ist (Philippaert et al., 2020).

TMBIM3 (auch LFG1, GBP, Nmdara1 oder GRINA) wird ebenfalls neuronal exprimiert (Nielsen et al., 2011a). Wie TMBIM1 und TMBIM2 befindet es sich in Membranen des ER und Golgiapparates (Rojas-Rivera et al., 2012). Rojas-Rivera et al. konnten zudem zeigen, dass der Knockdown (KD) von TMBIM3 in Kombination mit TMBIM6 zu spontaner Apoptose führt. Der reine KD von TMBIM3 ist für eine Zelle nicht letal, sodass von einer Interaktion beider Proteine ausgegangen wird. Außerdem wurde eine verstärkte Expression von TMBIM3 während der UPR beschrieben. Für gewöhnlich spielt das ER eine wichtige Rolle in der korrekten Faltung und Verteilung neu gebildeter Proteine. Bei der UPR handelt es sich um eine zelluläre Reaktion auf durch ER-Stress anfallende ungefaltete Proteine. Sie hat als Ziel die Wiederherstellung der ER-Homöostase (Hetz et al., 2020). Neben seiner Rolle während der UPR hat TMBIM3 eine regulatorische Interaktion mit dem IP₃R (Inosintriposphat-Rezeptor) (Rojas-Rivera et al., 2012). Der IP₃R ist ein in der ER-Membran gelegener Calciumkanal. Beim Menschen wurden drei Typen des IP₃-Rezeptors beschrieben (Mikoshiba, 2015). Das namensgebende IP₃ ist ein wichtiger Signalstoff des Proteinkinase-C-Weges, einem der wichtigen G-Protein-Signalwege. Es wird angenommen, dass die Funktion des IP₃R über die eines Calciumkanals hinausgeht und er durch weitere Signalwege auch den zellulären pH, sowie eine Reihe weiterer Prozesse steuert (Mikoshiba, 2015). Ein wichtiger, durch IP₃ gesteuerter Effekt ist etwa der Release von Calcium aus nicht mitochondrialen Speichern. Ein KD des IP₃R reduziert die mitochondriale Calciumaufnahme, unter anderem aufgrund einer geringeren Bereitstellung von Calciumionen aus dem ER, dem wichtigsten zellulären Calciumspeicher (Krebs et al., 2015) (Choi et al., 2017). In Zellen mit erhöhter TMBIM3-Expression fällt der durch IP₃ ausgelöste Calciumrelease aus dem ER geringer aus als in Kontrollzellen (Rojas-Rivera et al., 2012). Calcium selbst spielt wiederum eine entscheidende Rolle in vielen biologischen Vorgängen (Brini et al., 2014). Als Signalstoff steuert es zelluläre Vorgänge wie die Kontraktion von Muskelzellen, die Aktivität des Zellmetabolismus,

die Zellproliferation und - vor allem als proapoptotisches Signal - den Zelltod (Berridge et al., 2000). Voraussetzung für die Nutzung von Calcium als Signalstoff für viele verschiedene und teils gegensätzliche Signalwege ist eine genaue Kontrolle des intrazellulären Calciumspiegels. In Ruhe hält das Zytosol einen konstant niedrigen Calciumspiegel von circa 100 nM. Eine niedrige zytosolische Calciumkonzentration war höchstwahrscheinlich bereits für das frühe Leben eine wichtige Voraussetzung, da Calcium zusammen mit Phosphaten und damit wichtigen zellulären Energieträgern schlecht lösliche Salze bildet (Carafoli and Krebs, 2016). Durch eine Vielzahl an calciumbindenden Proteinen, Pumpen und Kanälen, sowie einer begrenzten Diffusionsgeschwindigkeit bleibt ein Anstieg der Calciumkonzentration in der gesunden Zelle lokal begrenzt. Dies ermöglicht neben einem Schutz vor einem cytosolischen Calciumoverload eine räumliche Diskrimination von Signalen. So kann eine Zelle an unterschiedlichen Punkten ihres Zytosols unterschiedliche Calciumkonzentrationen und damit -signale aufweisen (Berridge, 2006). Aufgrund des großen Einflusses von Calcium auf eine Vielzahl zellulärer Mechanismen ist Calcium, insbesondere im Cytosol ein wichtiger Faktor für die Entstehung verschiedener Krankheiten wie Bluthochdruck, Schlaganfall oder Morbus Alzheimer (Mooren and Kinne, 1998).

Auch aufgrund des Einfluss von TMBIM3 auf zentrale Stoffwechselwege wie zelluläre Calciumströme oder die UPR ist in vivo der Effekt einer veränderten Expression zu beobachten. In Zebrafischen führt ein Knockdown von TMBIM3 zu einer Dysregulation der Apoptose. Eine Überexpression scheint wiederum vor ER-Stressoren wie Thapsigargin zu schützen, passend zur eingangs beschriebenen Rolle in der UPR (Rojas-Rivera et al., 2012). In *Drosophila Melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der ubiquitäre Knockdown von TMBIM3 durch einen tubP-GAL4-Treiber und UAS-dTMBIM3-RNAi die Lebensfähigkeit nicht signifikant einschränkt. Allerdings sind TMBIM3-Knockdown-Fliegen ebenfalls anfälliger gegenüber ER-Stressoren, wie Tunicamycin (Rojas-Rivera et al., 2012). Darüber hinaus gibt es aus der medizinischen Forschung Hinweise für eine wichtige Rolle bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems. So zeigte sich beispielsweise eine Heraufregulation von TMBIM3 bei suizidalen Patienten mit schwerer Depression oder bei schizophrenen Personen (Sequeira et al., 2009) (Bowden et al., 2008). Zudem besteht eine Assoziation mit bestimmten Epilepsieformen (Chen et al., 2020) . Es wird angenommen, dass sich einige dieser Eigenschaften vor allem durch die Assoziation von TMBIM3 zum NMDA-

Rezeptor und damit eine Wirkung auf die synaptische Übertragung und daraus folgend erneut den zellulären Calciumspiegeln erklären lassen (Chen et al., 2020).

TMBIM4 (auch LFG4 oder GAAP) ist ebenfalls im Golgiapparat und im ER vertreten. Es wird als hochkonserviert beschrieben. So finden sich Orthologe in Eukaryoten, aber auch in Prokaryoten und sogar in manchen Orthomyxoviren, wo auch die Erstbeschreibung erfolgte. Auch wenn es sich bei den viralen TMBIM4-Varianten wahrscheinlich um einen Gentransfer von Säugetier-TMBIM4 handelt, spricht die weite Verbreitung über verschiedene Eukaryoten und sogar Prokaryoten für ein sehr altes Gen mit wichtiger zellulärer Funktion (Carrara et al., 2017). Im menschlichen Körper wird TMBIM4 in sämtlichen Geweben exprimiert, wobei sich im Gehirn geringere Expressionslevel zeigen (Lisak et al., 2015). Ein Knockout (KO) führt in Zellkulturen zu einer spontanen Apoptose. Eine Apoptoseinduktion durch TNF α , Fas, Bax und verschiedene Toxine, besonders C2-Ceramide, wird durch TMBIM4 inhibiert. Damit ist der bislang nachgewiesene antiapoptotische Einfluss breiter als bei anderen Mitgliedern der TMBIM-Familie und umfasst sowohl den intrinsischen, als auch den extrinsischen Weg (Gubser et al., 2007). Zudem steigert eine Überexpression von TMBIM4 die Zellmigration und reduziert den Calciumgehalt intrazellulärer Speicher (Saraiva et al., 2013a). Wie bei anderen TMBIM-Proteinen wird das Leeren intrazellulärer Calciumspeicher als eine Möglichkeit der antiapoptotischen Aktivität diskutiert, da hierdurch weniger Calcium als eigenständiges apoptotisches Signal zur Verfügung steht. Zudem führen erhöhte Calciumspiegel intrazellulär zu einer direkten Schädigung, welche auch einen nekrotischen Zelltod auslösen kann. Ein vor allem aus neurologischer Sicht wichtiges Beispiel für die potenziell direkt toxische Wirkung des Calciums ist die Exzitotoxizität, also der Zelltod infolge einer hohen Ligandenkonzentration, wie sie bei Neuronen unter Glutamat-Überstimulation auftritt. Hier wird unter anderem ein übermäßiger intrazellulärer Calciumanstieg als Ursache für den eintretenden Zelltod angenommen (Szydłowska and Tymianski, 2010). Neben der Toxizität intrazellulär erhöhter Calciumkonzentrationen greift Calcium als Signalstoff direkt in den Zelltod ein. Beispiele hierfür sind Calpaine. Dies sind während der Apoptose aktive, calciumabhängige Proteasen. Auch die Calciumsensibilität der Caspase 12, einem wichtigen Enzym der Apoptose, ist ein Beispiel für den Einfluss von cytosolischem Calcium auf die Apoptose (Pinton et al., 2008). Noch ein weiteres Beispiel ist Calcineurin, eine calciumabhängige Serin-Threonin-Phosphatase. Sie ist an vielen

Signalketten der Apoptose beteiligt und aktiviert beispielsweise durch eine Dephosphorylierung das proapoptotische Protein Bad (Rusnak and Mertz, 2000). Für TMBIM4 wurde eine Funktion als kationenselektiver Kanal beschrieben (Carrara et al., 2015). Sowohl die humane, als auch die virale TMBIM4-Variante zeigt eine pH-abhängige Oligomerisierung bis hin zu Tetrameren (Saraiva et al., 2013b). Der genaue Grund hierfür, sowie der Effekt sind noch unklar. Ein mutiertes virales TMBIM4, welches keine solchen Oligomere bilden kann, behält trotz dieser Einschränkung seine bekannten Funktionen aus antiapoptotischer Wirkung und Kontrolle intrazellulärer Calciumspeicher bei (Saraiva et al., 2013b). Als für das Zellüberleben auch unter proapoptotischen Stimuli günstiges Protein mit möglicherweise zusätzlichem Einfluss auf die Zellmigration spielt TMBIM4 unter anderem bei verschiedenen Krebserkrankungen eine Rolle. So findet sich eine Dysregulation unter anderem in aggressiven Malignomen wie den NSCLCs und Glioblastomen. Hier ist eine Heraufregulation prognostisch ungünstig, passend zur hemmenden Wirkung auf den Zelltod (Carrara et al., 2017).

TMBIM5 (auch GHITM, MICS1, DERP2) wird ubiquitär exprimiert, wenn auch in Thymus und Darm in geringerer Ausprägung (Lisak et al., 2015). Der alternative Name Growth hormone-inducible transmembrane protein (GHITM) erklärt sich durch eine Dysregulation des Gens unter Growth Hormon (GH)-Antagonismus (Li et al., 2001). Das GH ist vor allem für das Längenwachstum und die Proteinsynthese des Körpers von Bedeutung, sodass ein Mangel zu Kleinwuchs führt. Wird gleichzeitig die Nahrungszufuhr von Mäusen nicht an den hierdurch veränderten Energiebedarf angepasst, kommt es zudem zu einem erhöhten BMI sowie Körperfettanteil (WY et al.). In Mäusen, welche ein verändertes GH mit antagonistischer Wirkung auf den GH-Rezeptor exprimieren, konnte zudem eine herabregulierte Translation des vermuteten TMBIM5-Orthologs gezeigt werden, wobei die Herabregulation mit dem Alter der Mäuse abnahm (Li et al., 2001). TMBIM5 ist als einziges bekanntes Mitglied der TMBIM-Familie mitochondrial, genauer in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) vertreten (Oka et al., 2008). Bei der Mitochondrienmembran handelt es sich um eine sogenannte Doppelmembran, also eine Membran aus zwei Lipiddoppelschichten (Kroemer et al., 2007). Die äußere Mitochondrienmembran (OMM) ist durch einen spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) permeabel für Moleküle <5 kDa, worunter auch Ionen wie Calcium fallen. Sie bildet allerdings eine Barriere für größere Moleküle. Über verschiedene weitere Wege wird der Durchtritt von Proteinen und

Enzymen, welche für die korrekte Funktion der Mitochondrien benötigt werden, durch die äußere Mitochondrienmembran reguliert (Wiedemann and Pfanner, 2017). Die vielfach gefaltete innere Mitochondrienmembran wiederum ist auch für die meisten Ionen impermeabel. Dies ist entscheidend für den Aufbau eines Membranpotentials, welches während der Atmungskette als Energiespeicher für die ATP-Synthese genutzt wird. Außerdem ermöglicht dies eine genaue Kontrolle der Ionenkonzentration innerhalb der Mitochondrien. Dies ist für verschiedene mitochondriale Stoffwechsel- und Signalwege von entscheidender Bedeutung (Kroemer et al., 2007). Hierunter fällt vor allem das Calcium, da eine Erhöhung des mitochondrialen Calciumspiegels mitochondriale Stoffwechselwege aktiviert (Denton, 2009).

Eine intakte Mitochondrienmembran ist eine Voraussetzung für zelluläres Überleben. Während der Apoptose wird die innere Mitochondrienmembran durchlässig, wodurch Cytochrom C und Calciumionen in das Zytoplasma übertreten. Dies ist entscheidend für die Aktivierung der Caspasen, proteolytische Enzyme, welche während der Apoptose zelleigene Proteine zerschneiden und somit den Zelltod herbeiführen (Kroemer et al., 2007).

In Zellkulturen führt eine Herabregulation der TMBIM5-Expression zu mitochondrialer Fragmentierung, verminderter Faltungen der IMM und in der Folge zu einem vermehrten Freisetzen proapoptotischer Faktoren (Seitaj et al., 2020). Wie die anderen Mitglieder der TMBIM-Familie scheint also auch TMBIM5 eine wichtige Rolle für das Zellüberleben zu spielen. Eine vermehrte Expression führt zu mitochondrialer Aggregation, sowie einer geringen Hemmung der Cytochrom C-Freisetzung. Da die Cytochrom C-Freisetzung ein wichtiger Schritt der Apoptose ist, führt dies zu einem schwachen Schutz vor apoptotischen Faktoren (Oka et al., 2008). Hierbei handelt es sich um keine komplette Hemmung der Apoptose, denn die Permeabilität der OMM wird nicht entscheidend beeinflusst. Die Wirkung auf die mitochondriale Struktur und die Freisetzung von Cytochrom C werden zudem als weitgehend unabhängig voneinander beschrieben. Auch Zellen mit intakter mitochondrialer Struktur trotz heraufreguliertem TMBIM5 zeigen eine verringerte Freisetzung von Cytochrom C während der Apoptose. Meine Arbeitsgruppe konnte in früheren Arbeiten zudem zeigen, dass TMBIM5 über die mitochondriale Struktur hinaus auch Zellgröße und -Proliferation beeinflusst. So sind TMBIM5-KO-Zellen kleiner und teilen sich langsamer als Wildtypzellen. Dazu passend ist die mitochondriale ATP-Produktion in TMBIM5-KO-Zellen verringert (Seitaj et al., 2020). Der Effekt des Knockouts des TMBIM5-Orthologs Cg2076 wurde an *Drosophila Melanogaster* unter bestimmten Bedingungen

bereits untersucht. Unter Knockdown von Cg2076 in dopaminergen Neuronen kommt es zu einer verkürzten Lebenszeit und einer reduzierten Kletteraktivität der Fliegen. Bei zusätzlicher Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2-Homolog Buffy wird dieser Effekt vermindert. Die Fliegen überleben länger und zeigen eine verbesserte Kletteraktivität. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bleibt allerdings ein Defizit bestehen (M'Angale and Staveley, 2016a). Die Rolle der dopaminergen Neuronen der *Drosophila Melanogaster* ist vergleichbar mit den humanen dopaminergen Zellen der Substantia nigra (Riemensperger et al., 2013). Ein Zelluntergang in der Substantia nigra ist Teil der Pathophysiologie des Morbus Parkinson, welcher als eines seiner Kardinalsymptome eine krankhaft verminderte motorische Aktivität, die sogenannten Hypokinesie zeigt (Trist et al., 2019).

Zudem wurde ein augenspezifischer Knockdown in *Drosophila melanogaster* beschrieben. Hier kommt es unter TMBIM5-Knockdown zu einer gestörten Entwicklung der Einzelaugen, welche ebenfalls durch buffy-Überexpression verhindert wird. Wie auch die anderen Mitglieder der Genfamilie spielt TMBIM5 in verschiedenen Krankheiten eine Rolle. Hierzu zählt beispielsweise eine Infektion mit HIV, welche zu einer Herabregulation von TMBIM5 führt (Moni and Liò, 2014).

TMBIM6 (auch BI-1) wurde als erstes Protein der Familie überhaupt zunächst im Rahmen eines Screens für Bax-Antagonisten identifiziert (Xu and Reed, 1998). In Hefe kann es eine durch humanes Bax induzierte Apoptose verhindern. Diese Inhibition ist vor allem funktioneller Natur, wobei auch eine direkte Interaktion mit BCL-2 beschrieben wurde (Xu and Reed, 1998). Besonders ein Schutz vor ER-Stress gilt als wichtiger Effekt von TMBIM6 (Chae et al., 2004). Während eine Überexpression in Zellkulturen zu einer Resistenz gegen ER-Stressoren führt, kann auf der anderen Seite eine verminderte Expression eine größere Anfälligkeit gegenüber ER-Stress bewirken (Chae et al., 2004). Trotz dieses Schutzes sind die Zellen weiterhin für andere Apoptosetrigger wie den extrinsischen Weg über FAS anfällig. Ein wahrscheinlicher Mechanismus für den Schutz vor ER-Stress ist, wie auch bei anderen TMBIM-Proteinen postuliert, unter anderem eine Veränderung der ER-Calcium-Homöostase. Unter TMBIM6-Überexpression werden weniger Calciumionen nach Behandlung mit Thapsigargin, einem Inhibitor der ER-Ca²⁺-ATPase, in das Zytosol ausgeschüttet (Bultynck et al., 2012). Wie bereits beschrieben wird angenommen, dass TMBIM6 als "Leak-Channel" zu einer andauernden Entleerung zellulärer Calciumspeicher wie dem ER beiträgt, was diese Ergebnisse erklären würde (Bultynck et al., 2012). Hierzu

passend konnte gezeigt werden, dass das C-Terminus von TM6IM6 in der Lage ist, eine für Calcium permeable Pore zu bilden (Bultynck et al., 2012). Dadurch stünde weniger Calcium zur Verfügung, um als Signalstoff ausgeschüttet zu werden, was wiederum auf proapoptische Calcium-Signale eine abschwächende Wirkung hat. Die Eigenschaften dieser Pore werden im Kapitel 2.2.2 weiter beschrieben und scheinen insbesondere abhängig vom pH-Wert des Cytosol zu sein, wobei eine Ansäuerung des Cytosols den Ionenstrom verringert. Dies ist entscheidend, da ein fallender pH-Wert des Cytosol in der Regel in Situationen, welche mit Zellstress verbunden sind, auftritt. In diesem Fall ist eine Verringerung des Calciumausstroms aus dem ER sinnvoll, um eine weitere Belastung der Zelle durch erhöhte cytosolische Calciumkonzentrationen zu verhindern (Aoyama et al., 2005) (Kiviluoto et al., 2013). Ob die Funktion als Calciumkanal damit die Hauptfunktion oder ein Nebeneffekt von TM6IM6 ist, kann bislang nicht eindeutig gesagt werden (Philippaert et al., 2020). Neben dem direkten Einfluss auf die Calciumhomöostase des ER wurde für TM6IM6 ein zweiter wichtiger Einfluss auf die zelluläre ER-Stress-Reaktion beschrieben. In TM6IM6-KO-Zellen kommt es zu erhöhten Konzentrationen des X-box Binding Protein 1, kurz XBP-1. XBP-1 hat als regulatorisches Protein einen wichtigen Einfluss auf die zelluläre ER-Stress-Reaktion und verbessert die zelluläre UPR. Mediator der Wirkung von TM6IM6 auf XBP-1 scheint dabei IRE1 α zu sein, welches als Sensor für ER-Stress fungiert und in TM6IM6-KO-Zellen übermäßig aktiv ist (Lisbona et al., 2009).

Da Calcium wie zuvor beschrieben in vielen zellulären Signalwegen eine Rolle spielt, können neben der wichtigen Regulation des Zelltodes auch andere zelluläre Funktionen von einer durch TM6IM6 veränderten Calciumhomöostase betroffen sein. So ist ein TM6IM6-Knockout in Mäusen mit Übergewicht und eine Überexpression mit verbesserter Glucoseverwertung assoziiert (Lisak et al., 2016) (Philippaert et al., 2020). Grund hierfür ist vermutlich eine erhöhte Insulinausschüttung in TM6IM6-Knockout-Mäusen, was sich ebenfalls durch erhöhte zytosolische Calcium-Spiegel erklären ließe. Zudem entwickeln TM6IM6-Knockout-Mäuse vermehrt eine NAFLD. Hierin ähnelt es TM6IM1, für das ein ähnlicher Effekt beschrieben wurde (Zhao et al., 2017). Andere Krankheiten, bei denen TM6IM6 eine Rolle spielen könnte, sind verschiedene Krebserkrankungen. So ist eine vermehrte Expression für Cervix-, Endometrium-, Brust-, Lungen- und Prostatakarzinome beschrieben. Je stärker die Expression, umso schlechter ist in der Regel das Langzeitüberleben der Patienten (Kim et al., 2020). Kim et al. konnten zudem zeigen, dass umgekehrt ein TM6IM6-

Knockout in Zellkulturen aus Tumorzellen zu verminderter Migration und Tumorwachstum führt. Als Grund für diese Ergebnisse wird durch die Arbeitsgruppe unter anderem eine Aktivierung verschiedener proliferativer Signalwege durch TMBIM6 diskutiert. So kommt es bei erhöhter TMBIM6-Expression auch zu einer vermehrten Aktivität des *mechanistic target of Rapamycin complex 2* (mTORC2) und AKT (Kim et al., 2020). Der mTOR/AKT-Signalweg kontrolliert unter anderem die Zellteilung, den Zellzyklus oder Ruhephasen (Zou et al., 2020). Die Interaktion von TMBIM6 mit mTORC2 wird zum einen über eine vermehrte Calciumfreisetzung, aber auch durch eine direkte Bindung erklärt. Zudem wird angenommen, dass TMBIM6 mTORC2 direkt zum ER rekrutieren und so zu dessen Aktivierung steuern kann (Kim et al., 2020).

Insgesamt wird vermutet, dass die Mitglieder der TMBIM-Familie zellulären Stress integrieren und die zelluläre Reaktion auf Stressoren koordinieren. Die Mitglieder der TMBIM-Familie spielen dabei mindestens zum Teil eine zentrale Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, welche vor allem bei veränderten Umweltbedingungen benötigt werden. Hierzu zählen beispielsweise die mitochondriale Energiebereitstellung, die Calciumhomöostase, die UPR oder die lysosomale Funktion. Dies zeigt sich auch in der weiten Verbreitung der einzelnen Mitglieder über die meisten zellulären Kompartimente. Entsprechend werden sie von anderen Autoren auch als „Stress-Wächter“ (Rojas-Rivera and Hetz, 2015) bezeichnet.

2.2.2. Sind TMBIM Proteine Calciumkanäle?

Für das bakterielle TMBIM-Homolog BsYetJ wurden Calciumkanal-Eigenschaften nachgewiesen (Guo et al., 2019). Wie bereits beschrieben verhindert die Kanalfunktion der TMBIM-Familie wahrscheinlich einen endoplasmatischen Calciumoverload, welcher die Zelle schädigen könnte. Dies wird als mindestens ein Teil der Erklärung für die antiapoptotische Wirkung der TMBIM-Proteinfamilie angegeben (Bultynck et al., 2012). Verantwortlich für die Calciumkanalfunktion des TMBI-Motifs ist der C-Terminus, welcher eine Pore bildet (Bultynck et al., 2012). Die Pore ist spontan geöffnet, zeigt also das typische Verhalten eines Calcium-Leak-Channels, wie zumindest für TMBIM6 gezeigt werden konnte (Chang et al., 2014). Eventuell fehlte aufgrund des Versuchsaufbaus in den Untersuchungen hierzu allerdings auch ein regulatorischer Teil oder ein Cofaktor. Deshalb ist unter physiologischen Bedingungen auch eine genauer regulierte, andersartige Funktion denkbar. So zeigten

weiterführende Untersuchungen, dass die Calciumkanalaktivität durch den cytosolischen pH beeinflusst wird (Kiviluoto et al., 2013). Wie bereits beschrieben, kommt es zu einer Reduktion des Calciumleaks aus dem ER bei niedrigerem cytosolischen pH. Das Optimum liegt bei einem physiologischen pH von 6,8. Als mögliche Gründe für diese Eigenschaften wurde eine pH-Sensitivität der Pore oder auch eine Aktivität als H^+/Ca^{2+} -Antiporter angegeben. Gegen eine Tätigkeit als H^+/Ca^{2+} -Antiporter spricht laut Bultynck et al. unter anderem, dass hierfür ein stabiler H^+ -Gradient benötigt wird, welcher aufgrund der Durchlässigkeit der ER-Membran für sehr kleine Moleküle wie H^+ -Ionen nur schwer aufrechtzuerhalten wäre. Sollte es sich bei TMBIM6 um einen pH-gesteuerten Calcium-Leak-Channel handeln, so schlagen Bultynck et al. die Seitenketten mehrerer Asparaginsäuren im Bereich der Pore als Regulatoren des Öffnungsverhaltens vor. Diese Seitenketten tragen eine Carboxygruppe, welche in Abhängigkeit von der H^+ -Konzentration protoniert oder als Carboxylat vorliegt. Bei niedrigem pH kommt es zur Protonierung und damit zu einer Neutralisierung der negativ geladenen Seitenketten, was die Bildung von Wasserstoffbrücken ermöglicht. Es ändert sich die Struktur der Pore, wodurch die Calciumpermeabilität der Pore gesenkt wird. Bei pH-Werten über 8 kommt es dagegen zu einem Verschluss der Pore durch die Bindung einer deprotonierten Asparaginseitenkette mit einem an Position 78 befindlichen, positiv geladenen Histidin (Bultynck et al., 2014).

2.3. MCU

Während für die TMBIM-Proteingruppe eine Kanalfunktion angenommen wird, gibt es eine Vielzahl weiterer Ionenkanäle in unterschiedlichen zellulären Membranen. Schon lange ist beispielsweise bekannt, dass Mitochondrien in der Lage sind, Calciumionen in großen Mengen aufzunehmen (Deluca and Engstrom, 1961). Schließlich gelang auch die Identifikation des hierzu benötigten Kanals, dem Mitochondrialen Calcium Uniporters (MCU) (Baughman et al., 2011). Seine Aktivität und damit die mitochondriale Calciumaufnahme wird unter anderem durch das bereits zuvor bekannte MICU1 reguliert (Csordas et al., 2013). Die Identifizierung des MCU erfolgte später in einer Arbeit von Baughman et al., welche per phylogenetischer Analyse zeigen konnte, dass MICU1 in verschiedenen Spezies nur in Kombination mit einem weiteren Gen auftritt oder fehlt. Dieses konnte als eigentlicher MCU identifiziert werden. Eine direkte Interaktion zwischen MCU und MICU1 wurde durch Immunpräzipitation gezeigt. Dass MCU für die Calciumaufnahme der Mitochondrien

eine entscheidende Rolle zukommt, konnte durch einen Knockdown des Gens in Zellkulturen demonstriert werden. Dieser führt zu einer verminderten mitochondrialen Calciumaufnahme, hat allerdings keinen Einfluss auf die basale mitochondriale Respiration, das mitochondriale Membranpotential oder die mitochondriale Morphologie, sodass die Rolle des MCU unter Ruhebedingungen wahrscheinlich nicht zu überschätzen ist (Baughman et al., 2011). Neben MICU1 haben weitere Proteine einen Einfluss auf die Aktivität des MCU. Eine Suppression des essentiellen MCU Regulators (EMRE) deaktiviert die Calciumaufnahme über MCU, was für eine entscheidende regulatorische oder funktionelle Rolle in der mitochondrialen Calciumaufnahme spricht. Der C-Terminus von EMRE befindet sich in der mitochondrialen Matrix und enthält ein Motif, welches homolog zu anderen calciumbindenden Proteinen ist. Eine Deletion oder Ladungsänderung dieses Motifs führt zu einer Dysregulation der mitochondrialen Calciumaufnahme, sodass Calciumionen weitgehend unabhängig von der mitochondrialen Calciumkonzentration aufgenommen werden. Somit scheint EMRE vor allem eine regulatorische Rolle zu spielen und die Calciumaufnahme in Abhängigkeit von der mitochondrialen Calciumkonzentration zu steuern. Entsprechend erfolgte die Benennung als EMRE für 'essential mcu regulator' (Vais et al., 2016).

Trotz einer zentralen Funktion des MCU für die mitochondriale Calciumaufnahme ist der basale Metabolismus in Mäusen durch einen MCU-KO kaum beeinflusst, was den zuvor aus Zellkulturen beschriebenen Ergebnissen ähnelt (Pan et al., 2013). Zudem scheint es neben dem MCU eine Reihe weiterer, bisher nicht genau beschriebener Mechanismen für einen mitochondrialen Calciumuptake zu geben, deren Wichtigkeit und Regulation noch nicht ausreichend verstanden wurde (Bondarenko et al., 2014).

Auch in *Drosophila Melanogaster* ist ein MCU-, sowie EMRE-Ortholog beschrieben. Seine Funktion wurde durch Choi et al. untersucht. Wie in Wirbeltieren wird EMRE für eine korrekte MCU-Aktivität benötigt und auch in der Fliege beeinflusst ein KO des MCU-Orthologes den basalen Metabolismus kaum. Allerdings sind normalerweise unter oxidativem Stress auftretende mitochondriale Calciumanstiege und Membrandepolarisationen reduziert. Passend hierzu sind die Fliegen durch einen MCU-Knockout resistenter gegenüber oxidativem Stress, was sich als eine verlängerte Lebensdauer nach Beimischung von Wasserstoffperoxid zum normalen Futter zeigt. Die Lebensdauer bei Gabe von normalem Futter war dagegen leicht verkürzt. Zudem ist eine *mef2-Gal4*-gesteuerte Überexpression von MCU in der Muskulatur der Fliegen

bereits während der Verpuppung letal. Ein zusätzlicher IP₃R-Knockdown blockiert diese Letalität. Wie eingehend beschrieben, spielt der IP₃R vor allem in der Freisetzung von Calciumionen aus dem ER eine wichtige Rolle. Der lebenserhaltende Effekt des zusätzlichen Knockdowns spricht laut Choi et al. zusammen mit einem deutlich geringeren mitochondrialen Calciumanstieg in IP₃R-Knockdown-Fliegen nach Gabe von t-BuOOH für eine Koppelung der Calciumfreisetzung durch das ER und der Calciumaufnahme durch Mitochondrien als Reaktion auf verschiedene zelluläre Reize oder Stress (Choi et al., 2017).

2.4. Drosophila Melanogaster

Drosophila ist eine Familie kleiner Fliegen, deren bekanntester Vertreter, *Drosophila Melanogaster*, im Deutschen als Taufliege bekannt ist. Aufgrund ihrer Vorliebe für faulendes Obst werden sie häufig fälschlicherweise auch als Fruchtfliegen bezeichnet, welche nach biologischer Nomenklatur jedoch eine andere Familie der Insekten bilden. Inzwischen sind die Fliegen als Kulturfolger auf der ganzen Welt verbreitet. Als Insekt verfügt *Drosophila Melanogaster* über mehrere Entwicklungsstadien. Die Eier schlüpfen bei 25 °C nach circa einem Tag. Die wurmartige Made, beziehungsweise Larve frisst, wächst und durchläuft dabei drei Stadien, wobei zwischen jedem Stadium eine Häutung stattfindet, da der außen gelegene Chitinpanzer nicht mitwachsen kann. Nach fünf Tagen ist diese Entwicklung abgeschlossen, die Larven haben ihre finale Größe erreicht und verpuppen sich. Die Verpuppung dauert weitere 5 Tage. In dieser Zeit wird ein Großteil des larvalen Gewebes abgebaut und durch neues Gewebe aus den sogenannten Imaginalscheiben ersetzt. Dieses neue Gewebe bildet vor allem die für die adulte Fliege benötigten Strukturen wie Beine, Flügel oder Augen. Die adulte Fliege wächst nicht mehr und führt auch keine Häutungen mehr durch. Die vollständige Entwicklung der auch Imagines genannten adulten Fliegen aus einem befruchteten Ei dauert somit etwa 10 Tage. Die Tiere erreichen die Geschlechtsreife nach etwa 10 Stunden und können mehrere Wochen überleben (Hales et al., 2015).

2.4.1. *Drosophila als Modellorganismus*

Die genetische Forschung mit Hilfe von *Drosophila Melanogaster* ist inzwischen über hundert Jahre alt. Als wichtiger Modellorganismus handelt es sich bei der Fliege um einen der am besten untersuchten Organismen der Welt. Ein großer Vorteil ist die einfache Kultivierung und Vermehrung. Die Generationszeit ist kurz und während das Genom kompakt aufgebaut ist, enthält es eine Vielzahl an auch für den Menschen relevanten Genen (Hedges et al., 2006). Vor allem die Laborgruppe um Thomas Hunt

Morgan an der Columbia University forschte früh mit *Drosophila Melanogaster* und konnte einige wichtige Erkenntnisse, vor allem über die Rolle von Chromosomen in der Vererbung gewinnen (Bridges, 1916). Für seine Arbeit erhielt Morgan 1933 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Ein weiterer Nobelpreis in Verbindung mit der Forschung an *Drosophila Melanogaster* ging 1946 an Hermann Muller für seine Erkenntnis, dass Röntgenstrahlung ein Mutationsfaktor für Gene darstellt (Muller). Wie wichtig die Arbeit mit *Drosophila Melanogaster* auch für das Verständnis menschlicher Genetik und Krankheiten sein könnte, wurde spätestens zu dieser Zeit deutlich. Es wurde eine Reihe verschiedener zwischen Fliege und Säugetier konservierter Gene beschrieben, die für das Leben eine fundamentale Rolle zu spielen scheinen. Ein Beispiel hierfür ist das paired box protein (Pax) 6. Trotz des auf den ersten Blick komplett unterschiedlichen Aufbaus der Augen in Insekten und Säugetieren wird Pax 6 in beiden Gruppen für deren korrekte Entwicklung benötigt (Gehring). Das Genom der *Drosophila* diente als Testlauf für das Humane Genom Projekt Anfang der 2000er (Adams et al.). Eine Reihe von Onlineresourcen und immer neue Techniken haben das Repertoire und die Möglichkeiten des Modellorganismus *Drosophila* in den letzten Jahren erweitert, sodass neben der Genetik auch in der Entwicklungs- oder Neurobiologie sowie weiteren Forschungsfeldern die Fliege ein wichtiges Modell ist (Hales et al., 2015).

2.4.2. Die TMBIM-Familie der *Drosophila*

Der letzte gemeinsame Vorfahre von *Drosophila Melanogaster* und Mensch lebte vor ca. 780 Millionen Jahren (Hedges et al., 2006). Deshalb ist eine zum Teil deutlich veränderte genetische Ausstattung zu erwarten. Trotzdem haben 14,9% aller humanen Gene mindestens ein sicheres Ortholog in der Fliege. 46% aller Gene der *Drosophila Melanogaster* haben wiederum wenigstens ein humanes Ortholog (Shih et al., 2015). Berücksichtigt man nur die mit Krankheiten assoziierten DNA-Abschnitte, lassen sich sogar für über 65% der humanen Gene Homologe in der Fliege finden (Mirzoyan et al., 2019). Bei homologen Sequenzen kann in der Regel zunächst von einer ähnlichen oder sogar identischen Funktion ausgegangen werden (Stormo, 2009). Während BCL-2 bei Invertebraten mit zwei Vertretern und unklaren Rollen wenig konserviert ist (Rojas-Rivera et al., 2012), finden sich Mitglieder der TMBIM-Familie auch in der *Drosophila*. Rojas-Rivera und Hetz teilen der humanen TMBIM-Gruppe folgende Fliegenproteine als Homologe zu:

Homo Sapiens	Drosophila melanogaster
TMBIM1	CG30379
TMBIM2	CG9722/CG3814
TMBIM3	CG3798
TMBIM4	CG33673
TMBIM5	CG2076/(CG1287)
TMBIM6	CG7188

Tabelle 1: Vergleich der TMBIM-Familie zwischen Mensch und Drosophila Melanogaster nach Rojas-Rivera, Hetz et al.

Dabei ist zu beachten, dass vor allem die Zuteilung von TMBIM 1-3 zu den entsprechenden Fliegenproteinen keine akkurate Einteilung ist, da die humanen Proteine zum Teil eine größere Ähnlichkeit zueinander als zu denen der Fliege zeigen und umgekehrt (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Hierzu passend lässt sich innerhalb der humanen TMBIM-Ausstattung eine Gruppe aus TMBIM1-3 und eine zweite aus TMBIM4-6 nach Homologie abgrenzen.

Meine Arbeitsgruppe schlägt eine leicht abweichende Zuteilung der TMBIM-Gene von Fliege und Mensch vor. Grundlage ist der BLASTP-Algorithmus, welcher eine Suche nach möglichen Homologen einer gegebenen genetischen Sequenz erlaubt (Hu and Kurgan, 2019). Erneut werden die humanen TMBIM-Proteine nach Ähnlichkeit in zwei Untergruppen aus TMBIM1-3 und TMBIM4-6 aufgeteilt. Diesen Untergruppen können jeweils mehrere Gene der Drosophila nach Homologie zugeordnet werden. Dabei passen CG9722, CG3814 und CG3798 zu TMBIM1-3, CG30379, CG2076 und CG7188 besser zur Untergruppe aus TMBIM4-6. TMBIM4-6 lassen sich weiterhin aufgrund ihrer Aminosäurenstruktur relativ eindeutig den wahrscheinlichsten Orthologen der Fliege zuordnen. Für TMBIM1-3 fällt diese Einteilung schwerer, da die Gene innerhalb der jeweiligen Spezies ähnlicher sind als über die Artgrenze hinweg. Insbesondere TMBIM1 und 2, sowie CG9722 und CG3814 bilden ein Paar, während TMBIM3 und CG3798 frühere Abspaltungen zu sein scheinen. Die genaue Zuordnung nach Homologie, sowie entsprechend der intraspezifischen Verwandtschaftsverhältnisse ist in folgender Tabelle dargestellt. (Zhang et al., 2021):

Homo Sapiens	Drosophila melanogaster
TMBIM1	CG9722
TMBIM2	CG3814
TMBIM3	CG3798
TMBIM4	CG30379
TMBIM5	CG2076/(CG1287)
TMBIM6	CG7188

Tabelle 2: Vergleich der TMBIM-Familie zwischen Mensch und Drosophila Melanogaster nach Zhang et al.

3. Material

3.1. Fliegenstämme

ID	Genotyp	Beschreibung	Interne ID	Herkunft
<i>Treiber</i>				
BL458	elav-GAL4	Neuronaler Treiber	1	Bloomington
BL5138	tubP-GAL4	Ubiquitärer Treiber	2	Bloomington
	w;;repo-Gal4/TM6b	Gliazell-Treiber	3	IDN Mainz
	mef2-GAL4/TM3	Muskulärer Treiber	4	
	da-Gal4	Ubiquitärer Treiber		
	BL/CyO;55B12-Gal4/TM6	Cortex Glia	13	
	Bl/CyO;alrm-Gal4/(TM6)	Astrozytäre Glia	14	
	Tret1-1-Gal4/(TM6)	Perineurale Glia	15	
	83E12-Gal4(86F6)/TM6	Ensheathing glia driver	16	
	Gli-GI4/(CyO)	Subperineurale Glia	17	
<i>UAS</i>				
v46464	UAS-vasa-RNAi	Kontrolle UAS-RNAi	24	
v13673	UAS-always early-RNAi	Kontrolle UAS-RNAi	25	
v3235	UAS-CG7188-RNAi	CG7188-RNAi	30	
v37108	UAS-CG7188-RNAi	CG7188-RNAi	10	
v50221	UAS-CG2076-RNAi	CG2076-RNAi	29	
BL64564	UAS-CG2076-RNAi	CG2076-RNAi	33	
BL36679	UAS-CG30379-RNAi/TM3	CG30379-RNAi	31	
BL28988	UAS-CG30379-RNAi	CG30379-RNAi	90	Bloomington
v4671	UAS-CG3814-RNAi	CG3814-RNAi	26	
BL33354	UAS-CG3814-RNAi	CG3814-RNAi	92	Bloomington
v28365	UAS-CG3798-RNAi	CG3798-RNAi	27	
BL28361	UAS-CG3798-RNAi	CG3798-RNAi	89	Bloomington
v6679	UAS-CG9722-RNAi	CG9722-RNAi	28	
v28052	UAS-CG9722-RNAi	CG9722-RNAi	86	Bloomington
	UAS-MCU-Flag	MCU-Überexpression	42	
	UAS-MCU-NIMQ-Flag	MCU-KO-Mutante	44	
	UAS-EMRE-Flag	EMRE-Überexpression	45	
BL42580	UAS-MCU-RNAi	MCU-RNAi	62	Bloomington
BL 41909	UAS-MICU1-RNAi	MICU1-RNAi	60	Bloomington
<i>Sonstige</i>				
	w	Kontrolle		
	FM7a ;; let / TM3	Doppelte Balancer	6	
	FM7a ;; let/TM6	Doppelte Balancer	7	

Tabelle 3: Die für meine Versuche verwendeten Fliegenstämme nach BSC/VDRG-ID, Genotyp, Kurzbeschreibung, Herkunft, sowie der intern verwendeten ID.

3.2. Primer und Sonden

Die Primer stammten von Eurofin, die Sonden von Universal Probe (Roche). Folgende Primer und Proben wurden verwendet:

Gen	Proben ID	FWD Sequenz Primer	REV Sequenz Primer
CG7188	#36	gctgattatactgacgcaaaag c	ggataatctgattgagctatcttgg
CG2076	#57	aaccagcatcgccgataat	aaaaggcataggtgctctgg
CG30379	#76	ttggcccaattactgttca	cttgggtgggttggtgtaag
CG3814	#40	cggccacctgttcagtagt	gtgtatgcgccagtttcac
CG3798	#131	caccgagctgctgtgtatgt	Cgaaaccgctgtggagtaa
CG9722	#87	tgataaacgggtgctgtctg	Agtatggccaccacaaatattcc
RpL32/rp49 (CG7939)	#117	cggatcgatattgtaagctgt	Gcgcttgttcgatccgta
spliced Xbp1	#116	gatctgccgcagggtataacaac	Ggccacaactttccagagtg
non-spliced Xbp1	#89	ctgtgctgccaccaacct	Tgtgtccacctgtgtatacc

Tabelle 4: Die für meine Versuche verwendeten Primer und Sonden nach Gen, ID und Sequenz, sowohl FWD, als auch REV. #117 ist das verwendete Kontrollgen.

3.3. Kits

Kit	Firma
ZR RNA MiniPrep™	Zymo Research
High -capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™
Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP	Eurogentec™

Tabelle 5: Die für meine Versuche verwendeten Kits mit dazugehörigem Hersteller.

3.4. Geräte

Gerätebezeichnung	Firma
Mini-Zentrifuge	Labnet
Pipette (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Multipipette	Eppendorf
Ice maker	Hoshizaki
Kühlraum 4 °C	Viessmann
Feinwaage	Acculab
Grobwaage	Ohaus
NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific™
Vortex Mixer	neoLab
Mikrowelle	Sharp
Biorad iCycler	Biorad

Kamera: Moto G5 (1080p 30fps Video)	Motorola
-------------------------------------	----------

Tabelle 6: Die für meine Versuche verwendeten Geräte nach Hersteller.

3.5. Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Pipetierspitzen (10, 100, 1000 µl)	Greiner Bio-One
Pipetierspitzen gestopft (10, 100, 1000 µl)	Greiner Bio-One
Zymo-Spin IIC Columns	Zymo Research
96 Well qPCR-Platte	Biorad
Reaktionsgefäß (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf
Entsorgungsbeutel	Roth
Agarose Basic	AppliChem
Rotenon	Sigma-Aldrich
Tunicamycin	Sigma-Aldrich
Sucrose	Sigma-Aldrich

Tabelle 7: Die für meine Versuche verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien nach Hersteller.

3.6. Programme

Bezeichnung	Firma
Google Spreadsheet	Google LLC
Google Docs	Google LLC
Graph Pad Prism 7	Graph Pad Prism
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe
Excel 2013	Microsoft
Word 2013/2016	Microsoft
EndNote X9	Clarivate
VLC Media Player	VideoLAN

Tabelle 8: Die für meine Versuche verwendeten PC-Programme nach Hersteller.

4. Methoden

4.1. Fliegenkulturen

Die verwendeten Fliegen (Tab. 3) stammten entweder ursprünglich aus dem Vienna Drosophila Resource Center (v) oder dem Bloomington Stock Center (bl), sowie aus bestehenden Beständen des IDN Mainz oder wurden freundlicherweise von den genannten Personen zur Verfügung gestellt. Tabelle 3 zeigt alle für meine Experimente verwendeten Fliegenstämme. Alle Fliegen wurden in zylindrischen Plastikbehältern gehalten. Diese waren nach oben mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen. Als Futter erhielten die Fliegen, sofern nicht anders beschrieben, die unten angegebene Nahrung. Aktuell nicht benötigte Fliegen wurden bei 18° gehalten. Da es sich bei Fliegen um wechselwarme Tiere handelt, verlangsamt sich hierdurch der Stoffwechsel und damit die Generationenzeit deutlich. Alle zwei Wochen wurden die Fliegen in ein neues Glas mit frischem Nahrungsbrei transferiert. Fliegen, welche für Experimente benötigt wurden, wurden bei 25° gehalten. Aufgrund der deutlich kürzeren Generationszeit mussten diese Fliegen zweimal pro Woche in ein neues Glas mit frischem Nahrungsbrei transferiert werden. Mussten Fliegen genau sortiert oder beispielsweise gezählt werden, erfolgte dies während einer Narkose mit CO₂. Hierbei wurde versucht die Narkosezeit möglichst kurz zu halten, um mögliche Langzeitfolgen oder Einflüsse auf andere Experimente zu minimieren.

4.2. Fliegennahrung

Als Nahrung für die Fliegen wurde, wenn nicht anders angegeben, ein Gemisch aus den folgenden Zutaten verwendet:

Zutat	Menge (Beispielmenge für 20l)
Agar	130 g
Maismehl	1050 g
Sojamehl	125 g
Hefeflocken	350 g
Malzextrakt	1100 g
Zuckerrübensaft	550 g
Nipagin	30 g gelöst in 100 ml Ethanol
Propionsäure	65 ml
Wasser	Auffüllen auf 20 l

Tabelle 9: Zutatenliste des Fliegenfutters

Die Zutaten wurden mit Ausnahme des Nipagin und der Propionsäure auf 100°C erhitzt und verrührt. Danach wurden die beiden fehlenden Zutaten zugegeben, der Brei

abgefüllt und abgekühlt. Propionsäure und Nipagin helfen gegen Pilzwachstum und Infektionen in den Fliegenkulturen, der Rest der Mischung sind die eigentlichen Nahrungsbestandteile.

4.3. Das GAL4/UAS-System

Für den in-vivo-Knockdown bestimmter Gene wurde das GAL4/UAS-System verwendet. GAL4 ist ein in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckter Genregulator (Laughon and Gesteland, 1984). Für seine Aktivität benötigt er eine Upstream Activating Sequence, kurz UAS (Giniger et al., 1985). In Organismen, welche sowohl GAL4 exprimieren und eine geeignete UAS-Sequenz besitzen, wird ein an die UAS -Sequenz gekoppeltes Gen exprimiert, während GAL4 oder UAS alleine nur minimale Effekte haben (Brand and Perrimon, 1993). Das GAL4-Gen kann mit verschiedenen Promotern gekoppelt werden, wodurch eine gewebespezifische Expression möglich ist (Duffy, 2002). Diese UAS-Sequenz kann mit verschiedenen Genen gekoppelt werden, wodurch eine Überexpression oder auch ein Knockdown, in meinem Fall per RNAi möglich ist. Entscheidend für eine funktionierende Expression des UAS-gekoppelten Gens ist die korrekte Temperatur. Mit sinkender Temperatur nimmt die Effizienz der Genexpression deutlich ab (Enerly et al., 2002). Für diese Doktorarbeit wurden folgende Gal4-Linien verwendet:

Genotyp	Beschreibung
tubP-GAL4	Ubiquitärer Treiber
elav-GAL4	Neuronenspezifischer Treiber
mef2-GAL4/TM3	Muskelspezifischer Treiber
repo-Gal4	Gliazellspezifischer Treiber
BL/CyO;55B12-Gal4/TM6	Cortex Glia
Bl/CyoO;alrm-Gal4/(TM6)	Astrozytäre Glia
tret1-1-Gal4/(TM6)	Perineuriale Glia
83E12-Gal4(86F6)/TM6	Ensheathing glia driver
gli-GI4/(CyO)	Subperineuriale Glia

Tabelle 10: Die für meine Versuche verwendeten Gal4-Treiber-Linien. Fett-gedruckt ist der entsprechende Promoter.

4.4. Kreuzungen

Kreuzungen wurden in der Regel mit jungfräulichen Weibchen des GAL4-Treiberstammes und Männchen des UAS-Stammes durchgeführt. Weibchen sind für Kreuzungen deutlich schwieriger zu sammeln als Männchen, da es sich um jungfräuliche Exemplare handeln muss. Andernfalls ist nicht sicher gewährleistet, ob es sich bei den verwendeten Fliegen um den gewünschten Genotyp handelt. Um

unbefruchtete Weibchen zu sammeln, wurde ein Schwarm des benötigten GAL4-Stammes auf frisches Futter gesetzt und dort für ein bis zwei Tage belassen, bis die Fliegen Eier legten. Daraufhin wurde der Schwarm entfernt und bei Bedarf auf neues Futter transferiert. Die von dem Schwarm gelegten Eier wurden bei 25° belassen, bis sie sich zu Larven und schließlich adulten Fliegen entwickelten. Nach Verwerfen aller über Nacht geschlüpften Fliegen wurden alle 4 Stunden die neu geschlüpften Weibchen abgesammelt und die geschlüpften Männchen verworfen. Weibchen benötigen nach dem Schlüpfen eine Zeit von mehreren Stunden bis zur Paarungsreife, sodass die auf diese Weise gesammelten Weibchen noch nicht begattet wurden. Die Unterscheidung zwischen Männchen und Weibchen erfolgte unter einem Mikroskop. Die Männchen des UAS-Stammes wurden aus einem bestehenden Schwarm gesammelt. Auch hier erfolgte die Unterscheidung unter einem Mikroskop. Schließlich wurden jungfräuliche Weibchen und Männchen des gewünschten Genotyps gemeinsam in ein frisches Glas mit Futter transferiert.

4.5. Lebensfähigkeit

Um die Lebensfähigkeit von gekreuzten Stämmen zu überprüfen, wurde zunächst eine Kreuzung nach dem oben genannten Schema angefertigt. Viele Fliegenstämme verfügen über sogenannte Balancer. Hierbei handelt es sich um modifizierte Chromosomen, für die sowohl ein homologes Vorliegen als auch komplettes Fehlen letal wäre und welche keine Rekombination eingehen. Ein auf diese Weise „balanciertes“ Gen, beispielsweise ein GAL4-Treiber, liegt dadurch in allen Fliegen einer Population heterolog vor. Bei einer Verkreuzung mit einem weiteren Stamm kommt es zu einer weiteren Verteilung der Erbinformation nach den Mendelschen Gesetzen. Frisch gelegte Eier wurden bei 25° belassen. In regelmäßigen Abständen wurden die Gläser auf geschlüpfte Larven und adulte Fliegen überprüft. Nach dem Schlüpfen der adulten Fliegen wurden diese unter einem Mikroskop ausgezählt und mit der zu erwartenden Verteilung von 50:50 verglichen:

	UAS-Gen	UAS-Gen
Gal4-Gen	Gal4 + UAS-Gen = Knockdown	Gal4 + UAS-Gen = Knockdown
Balancer	Balancer + UAS-Gen = WT	Balancer + UAS-Gen = WT

Tabelle 11: Kreuzungsschema eines Gal4/Balancer-Stammes mit einem UAS-RNAi-Stamm

Mithilfe genetisch gekoppelter Marker, wie beispielsweise veränderter Borsten, konnte die Unterscheidung nach Knockdown-Fliegen und Fliegen ohne Expression von RNAi getroffen werden.

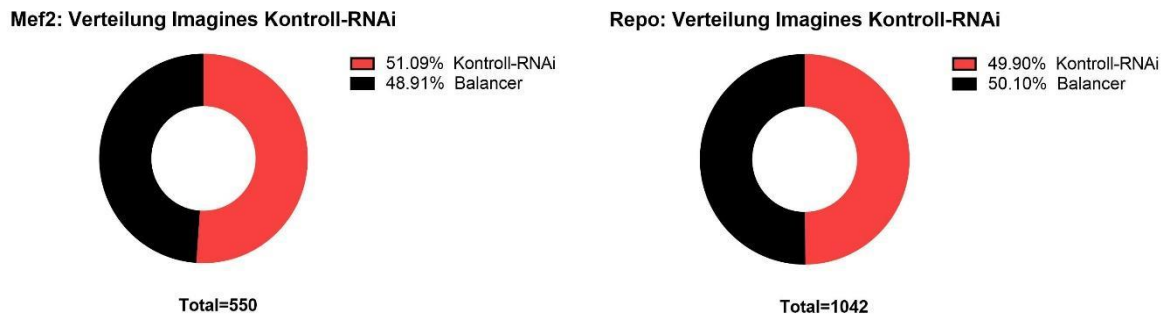


Abbildung 1: Beispielhafte 50:50-Verteilung adulter Fliegen nach Kreuzung einer UAS-RNAi-Linie mit einer Gal4-Treiber/Balancer-Linie.

Bei der verwendeten UAS-RNAi handelt es sich um eine RNAi ohne nachgewiesenen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Fliegen, entsprechend findet sich die erwartete Verteilung von annähernd 50:50.

Man kann auch zwei Stämme, von denen jeder einen Balancer trägt, verkreuzen. In diesem Fall ist bei einem Drittel der adulten Fliegen ein Tragen von Gal4 und dem UAS-Gen zu erwarten:

	UAS-Gen	Balancer
Gal4-Gen	Gal4 + UAS-Gen = Knockdown	Gal4 + Balancer = WT
Balancer	Balancer + UAS-Gen = WT	Balancer + Balancer = letal

Tabelle 12: Kreuzungsschema eines Gal4/Balancer-Stammes mit einem UAS-RNAi/Balancer-Stamm

Bei Stämmen ohne Balancer-Chromosom und damit keiner Möglichkeit, die Lebensfähigkeit nach dem oben genannten Schema zu bestimmen, wurde die Anzahl der geschlüpften Fliegen und die Anzahl der Puppen innerhalb eines definierten Zeitraums nach dem Schlüpfen der ersten Fliege ausgezählt. So konnte bestimmt

werden, welcher Prozentsatz der Fliegen die Metamorphose von der Larve zur Imago überlebte.

4.6. CG2076 KD-MCU / EMRE-Interaktion

4.6.1. *Generierung einer elav-Gal4 / FM7a ;; CG2076 / TM3 -Linie*

Für die Generierung der elav-Gal4 / FM7a ;; CG2076 / TM3 -Linie wurden die Stämme elav-Gal4, FM7a ;; let / TM3, FM7a ;; let/TM6 und UAS-CG2076-RNAi genutzt. TM3 trug den Marker Stubble, welcher sich als verkürzte Borsten auf dem Hinterleib der Fliegen präsentiert (Chung, 1967). TM6 trug den Marker Humeral, welcher vermehrte Borsten auf dem Schultersegment bedeutet und FM7a den Marker Bar, der durch eine veränderte Augenform auffällt. Die Kreuzung wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

	♀	♂	Selektierte Nachkommen	Selektierte Eigenschaften
1a	$\frac{elav-Gal4 \dots +}{elav-Gal4 \dots +}$	$\frac{FM7a \dots TM3}{y \dots let}$	$\frac{elav-Gal4 \dots TM3}{FM7a \dots +}$	Stubble (TM3) Bar (FM7a heterozygot)
1b	$\frac{FM7a \dots TM6b}{FM7a \dots let}$	$\frac{X \dots UAS-RNAi}{Y \dots UAS-RNAi}$	$\frac{FM7a \dots UAS-RNAi}{Y \dots TM6b}$	Humeral (TM6), Bar (FM7a)
2	$\frac{elav-Gal4 \dots TM3}{FM7a \dots +}$	$\frac{FM7a \dots UAS-RNAi}{Y \dots TM6b}$	$\frac{FM7a \dots TM3}{elav-Gal4 \dots UAS-RNAi}$	Stubble (TM3), Bar (FM7a heterozygot)

Tabelle 13: Kreuzungsschema zur Generierung von Fliegen, welche sowohl über elav-Gal4, als auch UAS-CG2076-RNAi verfügen. Beide Gene liegen heterozygot mit einem Balancerchromosom vor.

Zunächst wurden die Kreuzungen 1a und 1b durchgeführt. Mit den selektierten Nachkommen wurde die Kreuzung 2 durchgeführt. Unter den Nachkommen der Kreuzung 2 wurde nach Stubble und Bar selektiert. Die weiblichen Nachkommen dieser Kreuzung sind heterozygot für elav-Gal4 und UAS-CG2076 mit einem Balancer auf dem ersten und dritten Chromosom. Die Männchen dieser Kreuzung tragen entweder elav-Gal4 oder FM7a auf dem ersten Chromosom und sind UAS-CG2076 / TM3 heterozygot auf dem dritten Chromosom.

4.6.2. *Kreuzung von elav-Gal4 ;; CG2076-RNAi mit MCU / EMRE*

Jungfräuliche Weibchen mit dem Genotyp $\frac{FM7a}{elav-Gal4} \dots \frac{TM3}{UAS-RNAi}$ wurden gesammelt und mit Männchen des Genotyps UAS-MCU-RNAi, UAS-MCU⁵², UAS-MCU-Flag, UAS-EMRE-Flag und UAS-MICU1-KD gekreuzt. Als Kontrolle diente UAS-always-early. Die

Fliegen wurden wie vorangehend beschrieben durch die Verteilung der adulten Fliegen und deren Lebenszeit auf ihre Vitalität getestet.

4.7. Larvengeschwindigkeit

Um die Muskelfunktion insbesondere in *mef2*-TMBIM-Knockdown-Larven zu testen wurde ihre Geschwindigkeit bestimmt (Nichols et al., 2012). Durch Fluoreszenz eines an *mef2*-Gal4 gekoppelten Proteins gelang in vivo die Unterscheidung in *mef2*-Gal4 positive und negative Larven. Larven im dritten Larvenstadium wurden gesammelt und mit destilliertem Wasser gesäubert. Einzelne Larven wurden auf eine 2% Agaroseplatte über kariertem Papier (5 x 5 mm) platziert. Die Menge an überquerten Kästchen wurde innerhalb einer Minute protokolliert. Die Zeitmessung wurde nach dem Überqueren des ersten Kästchens gestartet, da die Larven nach der Übertragung in die fremde Umgebung Zeit benötigen bis sie eine Wanderbewegung starten. Dies wurde pro Larve dreimal wiederholt. Versuche, in denen sich die Larve nicht bewegte, wurden nicht gewertet, da Ziel der Messung die Fortbewegungsgeschwindigkeit und nicht die allgemeine Aktivität war.

4.8. Negative Geotaxis

Um die Muskelfunktion adulter Knockdown-Fliegen zu testen, wurde die Klettergeschwindigkeit gemessen. Fliegen zeigen nach Herabklopfen auf den Boden ein Kletterverhalten, auch negative Geotaxis genannt (Nichols et al., 2012). Eine abgezählte Menge an Fliegen wurde hierfür in leere Plastikzylinder übertragen. Diese waren mit einem Zentimetermaß markiert. Die Plastikzylinder wurden vor einem weißen Hintergrund platziert und mit einer Kamera gefilmt. Nach dreimaligem Klopfen wurden die Zylinder für mindestens 15 Sekunden gefilmt. Die Position der einzelnen Fliegen wurde 10 Sekunden nach dem letzten Klopfen bestimmt und so die innerhalb dieser Zeit zurückgelegte Distanz berechnet. Pro Fliegenschwarm wurde die Messung fünfmal wiederholt. Zwischen den Testungen wurde mindestens eine Minute gewartet, um eine Habituation der Fliegen an das Klopfen und damit eine scheinbar abnehmende Kletteraktivität zu verhindern.

4.9. Lebensdauer

Knockdown-Fliegen wurden nach dem oben genannten Prinzip gezüchtet. Als Kontrollen wurden nicht gekreuzte Treiber-Stämme, Always-Early- und Vasa-Knockdown-Fliegen verwendet. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, erfolgte die Messung der Lebenszeit nach einem möglichst standardisierten Protokoll. Frisch geschlüpfte Fliegen wurden unter möglichst kurzer CO₂-Narkose nach Geschlecht

sortiert und in Gläsern mit Futter platziert. Dreimal pro Woche wurden die Fliegen in frische Gläser mit neuem Futter transferiert. Dabei wurden die Gläser auf verstorbene Fliegen untersucht und diese protokolliert. Fliegen, welche anderweitig aus dem Experiment ausschieden, wurden gesondert protokolliert und in der Auswertung zensiert. Das Experiment wurde bis zum Versterben der letzten Fliege fortgeführt (Linford et al., 2013). Die Auswertung erfolgte als Kaplan-Meier-Diagramm.

4.10. Metabolischer Stress

Die Lebenszeit der Fliegen wurde unter Zugabe verschiedener Noxen bestimmt. Fliegen wurden hierfür auf mit 5%iger Sucroselösung getränkter Watte gehalten. Der Lösung wurden die Substanzen Tunicamycin oder Rotenon in einer Konzentration von 10 μ M zugesetzt. Eine weitere Gruppe wurde mit 1%iger H₂O₂-Lösung behandelt. Als Kontrolle diente reine 5%ige-Sucroselösung. Täglich wurden verstorbene oder zensierte Fliegen nach dem oben beschriebenen Prinzip protokolliert, bis alle Fliegen verstorben waren.

4.11. Laufband

Fliegen wurden, wie unter 4.9 Lebensdauer beschrieben, gekreuzt und gesammelt. Täglich wurden die Fliegen für 4 Stunden in eine spezielle Anlage gesetzt. Diese bestand aus einer Wippe (Abb. 2 B), mit einem leeren Behälter für die Fliegen (Abb. 2 A) am Ende. Mit einer Frequenz von 60 Hz wurde die Wippe am anderen Ende durch einen rotierenden Arm (Abb. 2 C) herabgedrückt und ausgelöst, sodass die Fliegen auf den Boden ihres Behälters geschüttelt wurden. Hierauf reagierten die Fliegen mit einer Kletterbewegung. Die Fliegen wurden, wie unter dem Punkt 4.9 Lebensdauer beschrieben, auf ihre Lebensdauer getestet. Am Tag 0 und 7 wurde zudem ein Kletterversuch (siehe 4.8.) mit ihnen durchgeführt.

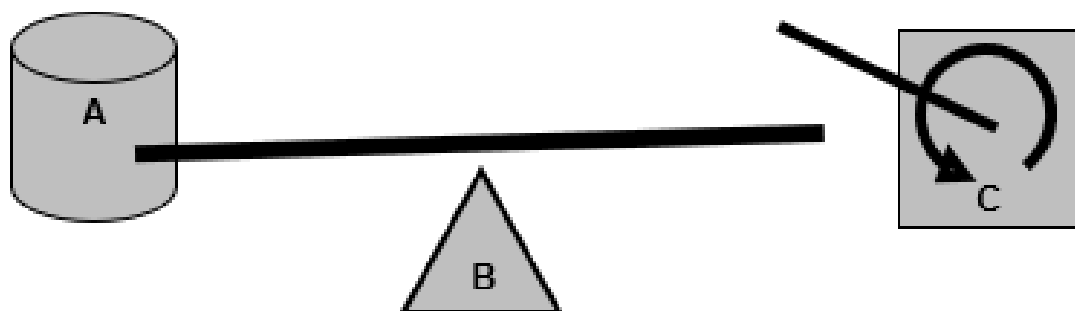


Abbildung 2: Vereinfachter Aufbau des "Laufbandes" aus den Komponenten A = Behälter für Fliegen, B = Wippe und C = rotierender Arm zum wiederholten Herabdrücken der Wippe

4.12. Überprüfung des RNAi-Knockdowns

Der RNAi-Knockdown wurde für den tubP-Gal4-Treiber in ganzen Fliegen, dem mef2 Gal4-Treiber in ganzen Fliegen und dem elav-Gal4-Treiber aufgrund der neuronalen Expression in Fliegenköpfen überprüft. Zunächst wurde RNA aus den Fliegen gewonnen, durch eine Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA überführt und diese per qPCR im Vergleich zu einem ubiquitär exprimierten Kontrollgen, hier rp49, quantifiziert.

4.12.1. *RNA - Extraktion*

Zur RNAi-Extraktion wurde das ZR RNA MiniPrep™-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es basiert auf einer Lyse der Zellmembranen, Reinigung der RNA über eine Säule und schließlich Elution in destilliertem Wasser.

4.12.2. *Reverse Transkriptase*

Für die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde das High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems™ nach Herstellerangaben verwendet. Als RNA-Konzentration für die Reaktion wurden 10 ng/μl genutzt.

4.12.3. *qPCR*

Für die Quantifizierung der gewonnenen RNA wurde der Eurogentec™ Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP, 1 μl Probe, 2 μl Primer (s. Tabelle 4) und 4,5 μl destilliertes H₂O verwendet. Der Ablauf des Experimentes erfolgte nach Anleitung des MasterMixes. Für 2μl cDNA ergab dies eine finale Konzentration von 570 nMol/μl Primer und 100 nMol/μl Probe. Als Kontrolle dienten Fliegen mit UAS-vasa- oder UAS-always-early-RNAi. Kontrollprimer waren gegen rp49 gerichtet. Hierbei handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes ribosomales Protein (O'Connell and Rosbash, 1984). Die Primer stammten von Eurofin und die Proben aus der Universal Probe Library (Roche).

4.13. Statistik

Als Statistikprogramm wurde GraphPad Prism™ verwendet. Die Lebensfähigkeit adulter Fliegen wurde bei Vorliegen von mindestens einem Balancer anhand der erwarteten Verteilung mit dem Binomialtest überprüft. Lag kein Balancer vor, wurde die Menge an geschlüpften Fliegen mit einer Kontrolle durch den ANOVA verglichen. Für Überlebenskurven wurden der Log-Rank-Test und der Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test durchgeführt, wobei das Ergebnis des Log-Rank-Testes in den Grafiken eingetragen wurde. Bei der Auswertung der Geschwindigkeit von Larven und adulten

Fliegen wurden die Daten zunächst mit der ROUT-Methode unter den empfohlenen Einstellungen nach Outliern durchsucht und anschließend durch den Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung getestet. Der Vergleich zur Kontrollgruppe erfolgte bei einer einzigen Variable über den T-Test, bei mehreren unabhängigen Variablen über den 2way ANOVA. Die Bestimmung der Transkriptionslevel erfolgte nach $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Der Ct-Wert ist die Anzahl der PCR-Zyklen, nach denen erstmals ein exponentieller Anstieg des Fluoreszenzsignales nachgewiesen wurde. ΔCt ist die Differenz zwischen dem Ct-Wert des untersuchten Genes und dem Housekeeping-Gen, $\Delta\Delta Ct$ somit die Differenz des ΔCt der RNAi-Gruppe mit dem ΔCt der Kontrollgruppe. Die genaue verwendete statistische Auswertung wird in den entsprechenden Grafiken gesondert angegeben.

In den folgenden Abbildungen ist die statistische Signifikanz mit * markiert. Ein * entspricht einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$; *** entsprechen $p \leq 0,001$. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit ns gekennzeichnet.

5. Ergebnisse

1. Die Gewebsexpression der TMBIM-Proteinfamilie

Die unterschiedliche Expression einzelner Gene nach Gewebeart ist in der *Drosophila Melanogaster* gut untersucht. Onlinetools, wie der frei zugängliche FlyAtlas, welcher vor allem auf der Arbeit der Universität Glasgow aufbaut, erlauben eine schnelle und einfache Überprüfung der Expression nach Gewebeart. Zum Zeitpunkt der Abfrage lagen 27 Gewebetypen aufgeteilt auf Gewebe der Larve, adulter Fliegen und einer S2-Zellkultur vor.

Die Gewebeexpression nach mRNA-Signal der TMBIM-Orthologen in ausgewählten Geweben ist wie folgt (Chintapalli et al., 2007):

	Gewebe	CG30379	CG9722	CG3814	CG3798	CG2076	CG7188
Imago	Komplett	2 ± 1	36 ± 0	184 ± 33	478 ± 49	353 ± 20	795 ± 36
	Hirn	3 ± 1	2 ± 0	13 ± 1	1327 ± 16	413 ± 5	814 ± 13
	Herz	4 ± 1	0 ± 0	9 ± 2	998 ± 54	714 ± 47	2282 ± 132
	Fettkörper	5 ± 4	6 ± 4	31 ± 12	970 ± 51	338 ± 30	1886 ± 70
Larve	Komplett	2 ± 2	4 ± 0	14 ± 2	708 ± 28	514 ± 40	652 ± 22
	ZNS	82 ± 12	3 ± 0	6 ± 2	812 ± 46	351 ± 17	636 ± 38

Tabelle 14: Die Expression der TMBIM-Proteinfamilie nach ausgewähltem Gewebe anhand des mRNA-Signals. Farbkodierung: Rot hinterlegt ist eine erniedrigte Expression, grün hinterlegt eine vermehrte Expression. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte des mRNA-Signals

Prinzipiell bin ich während meiner Arbeit nach folgendem Schema vorgegangen: Zunächst wurden für die einzelnen Mitglieder der Proteinfamilie eher allgemeine Untersuchungen durchgeführt. Es wurde getestet, ob beispielsweise der ubiquitäre, muskel- oder neuronenspezifische Knockdown überhaupt zu lebensfähigen Fliegen führt. Basierend auf diesen ersten Ergebnissen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Überlebten beispielsweise Fliegen bis ins Erwachsenenalter unter muskelspezifischem Knockdown wurde nun die Muskelfunktion durch weitere Tests, in diesem Fall der negativen Geotaxis untersucht. Entsprechend versuchte ich, über zunächst allgemeinere Ergebnisse, wie prinzipielle Überlebensfähigkeit oder Letalität eines Knockdowns, schließlich speziellere Erkenntnisse zu generieren, zum Beispiel die Lebensdauer oder Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Noxen. Aus praktischen und zeitlichen Gründen wurden einzelne Proteine wie TMBIM5, auf denen mein Fokus lag, genauer als andere untersucht.

5.1. Die vollständige Entwicklung gesunder Fliegen wird vor allem durch den muskelspezifische Knockdown von CG9722/TMBIM1 gestört

Um zu untersuchen, ob der gewebspezifische CG9722-Knockdown für Fliegen mit dem Erreichen des adulten Stadiums vereinbar ist, wurden UAS-CG9722-Fliegen mit verschiedenen Treiberlinien gekreuzt. Der ubiquitäre Knockdown des Gens führte zu einem signifikant reduzierten Anteil adulter Fliegen. Ein ähnliches Ergebnis fand sich ebenfalls für den neuronenspezifischen Knockdown mittels elav-Gal4. Um zu überprüfen, ob es auch nach Erreichen des adulten Stadiums weitere Effekte auf die Vitalität gibt, wurden diese Fliegen zudem auf ihre Lebenszeit untersucht. Hier fand sich kein statistisch signifikanter Effekt. Die Verteilung adulter Fliegen unter gliazellspezifischem Knockdown mittels repo-Gal4 zeigte ebenfalls keine statistische Signifikanz.

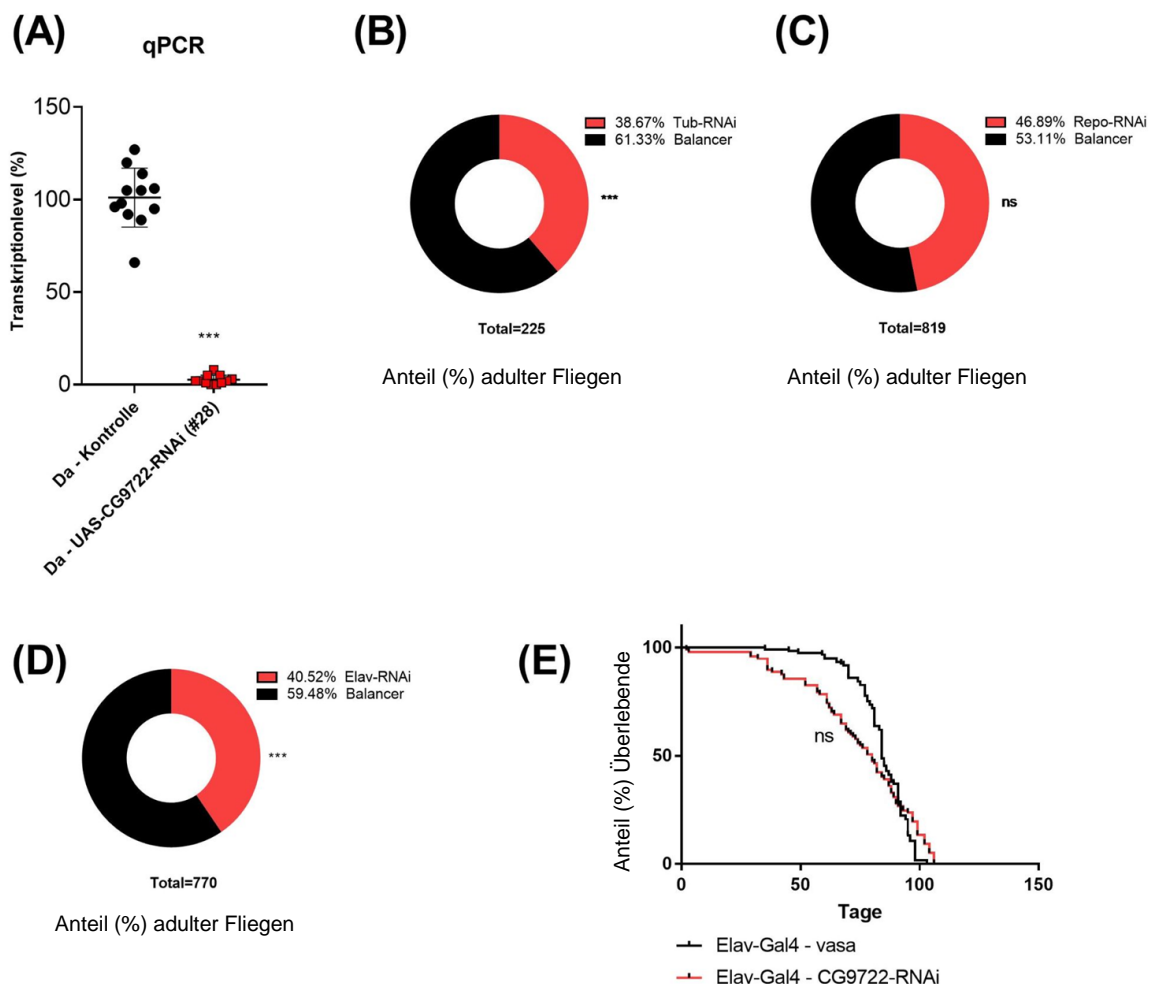


Abbildung 3: Sowohl der ubiquitäre, als auch der neuronenspezifische Knockdown von CG9722 stört die Entwicklung adulter Fliegen

Unter **(A)** werden die per qPCR bestimmten CG9722-Transkriptionslevel inklusive Mittelwert und einfacher Standardabweichung dargestellt. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung. **(B)** - **(D)** zeigen die Verteilung adulter Fliegen als Prozentsatz mit CG9722-RNAi oder Balancer; unter dem ubiquitären und neuronenspezifischen Knockdown findet sich eine Reduktion. **(E)** zeigt die Überlebenskurve von elav-Gal-CG9722-Fliegen mit nicht veränderter Lebensdauer.

*** entsprechen einer statistischen Signifikanz von $p \leq 0,001$, ns bezeichnet statistisch nicht signifikant bewertete Ergebnisse. Die Signifikanz berechnet sich für (A) nach dem t-Test, angegeben sind Mittelwert +/- eine Standardabweichung als horizontale Linie. Für (B) - (D) wurde ein Binominaltest zur Bestimmung der Signifikanz genutzt. Im Falle von (E) diente der Log-Rank-Test zur Bestimmung.

Neben den oben genannten Treibern wurde auch der muskelspezifische Knockdown mittels *mef2-Gal4* untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion adulter Fliegen. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt bereits im Larvenstadium oder während der Verpuppung eintritt, wurden die ungeschlüpften Puppen mittels Fluoreszenz ausgezählt. Dies erlaubte eine Unterscheidung von Puppen mit Knockdown und Balancer. Auffällig war ein großer Anteil ungeschlüpfter Puppen in der Knockdowngruppe. Um nun weiter zu testen, ob es neben der deutlichen Entwicklungseinschränkung bereits während des Larvenstadiums unter muskelspezifischem CG9722-Knockdown zu generellen Einschränkungen oder Hinweisen auf eine gestörte Muskelfunktion kommt, wurden die Larven auf ihre Geschwindigkeit untersucht. Hier zeigte sich jedoch kein Unterschied zur Kontrollgruppe.

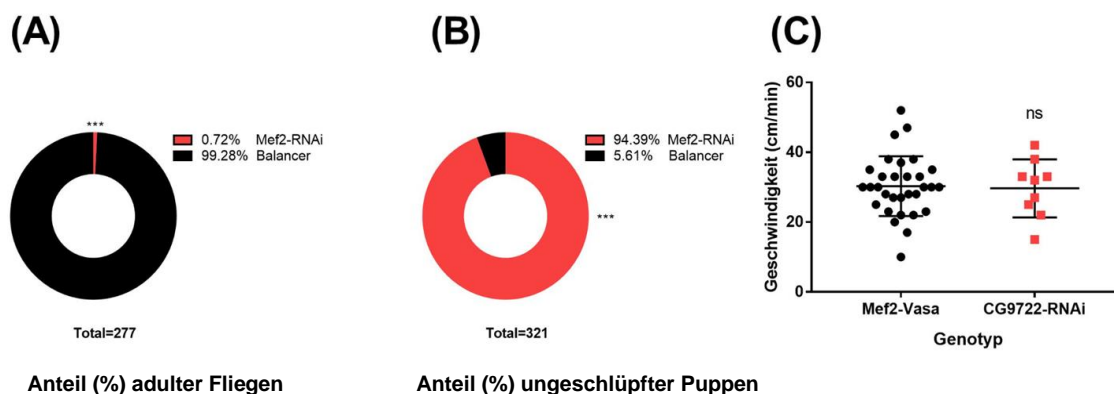


Abbildung 4: Der *mef2*-gesteuerte Knockdown von CG9722 führt zu einer deutlichen Reduktion adulter Fliegen bei unauffälliger motorischer Funktion der Larven

(A) zeigt den deutlich reduzierten Anteil adulter Fliegen in der mef2-RNAi-Gruppe. Passend hierzu finden sich eine große Anzahl ungeschlüpfter Puppen in der genannten Gruppe (B). (C) zeigt die unveränderte Geschwindigkeit der Larven unter muskulärem CG9722-Knockdown, jeder Punkt entspricht einer Larve, angegeben wird zudem Mittelwert und Standardabweichung als horizontale Linie.

*** entsprechen einer statistischen Signifikanz von $p \leq 0,001$, ns bezeichnet statistisch nicht signifikant bewertete Ergebnisse. Die statistische Signifikanz berechnet sich für (A) und (B) nach einem Binomialtest, für (C) wurde ein t-Test genutzt.

5.2. TMBIM2/CG3814 reduziert bei ubiquitärem und muskelspezifischem Knockdown die Lebensfähigkeit

Um herauszufinden, in welchem Gewebetyp CG3814 von besonderer Bedeutung ist, wurde zunächst ein Knockdown unter verschiedenen Gal4-Linien untersucht. Hier zeigte sich ein reduzierter Anteil adulter Fliegen unter ubiquitärem, muskelspezifischem und neuronenspezifischem Knockdown. Der gliale Knockdown durch repo-Gal4 zeigte dagegen eine unauffällige Verteilung der adulten Fliegen (Abb. 5).

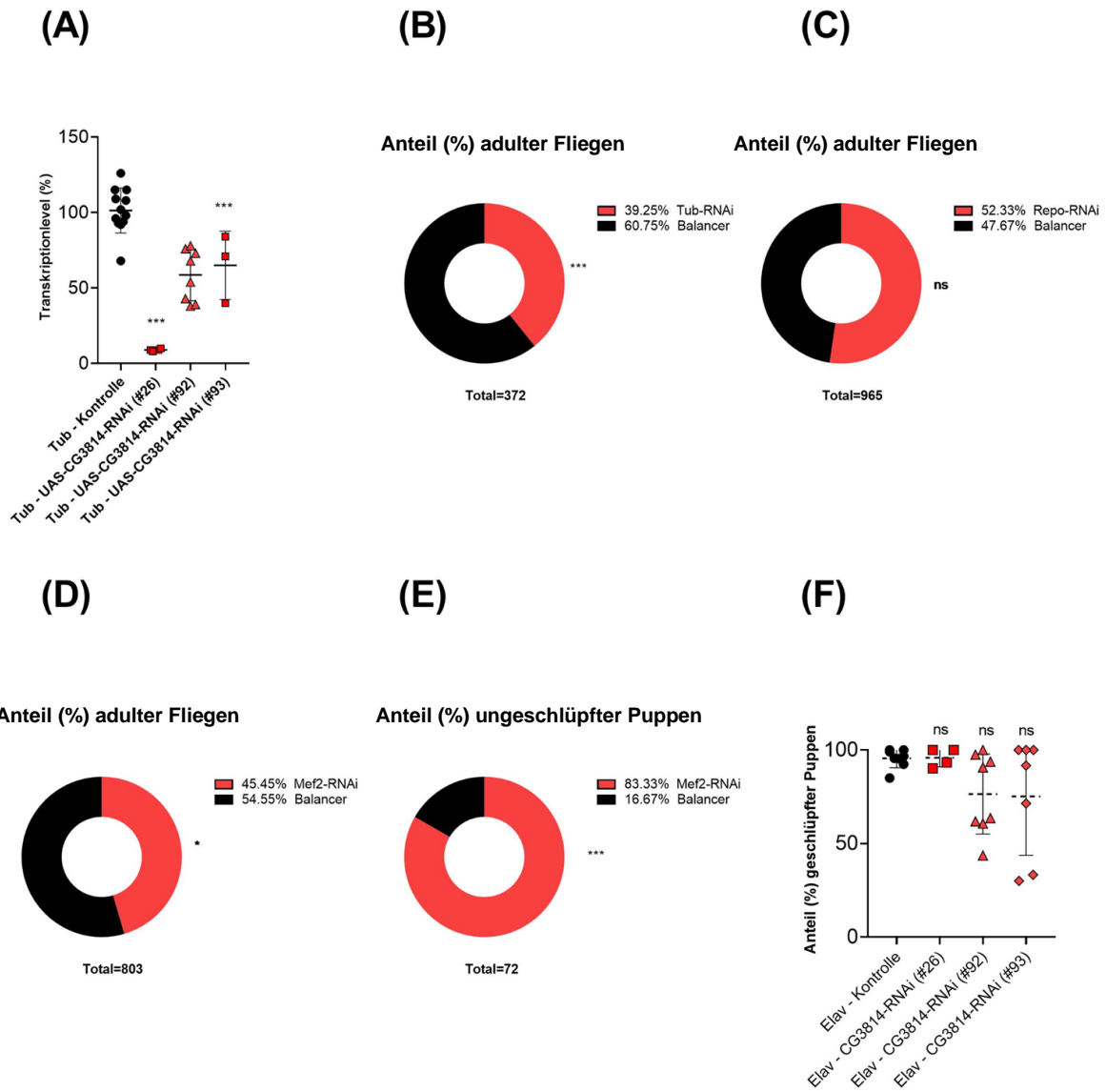


Abbildung 5: Der Knockdown von CG3814 führt zu einer reduzierten Anzahl adulter Fliegen unter tubP-RNAi und mef2-RNAi, nicht aber unter repo-Gal4 und elav-Gal4

(A) zeigt die unter CG3814-Knockdown reduzierten Transkriptionslevel des Gens. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung (B) - (D) zeigen die reduzierte (B/D), bzw. unauffällige (C) Anzahl adulter Fliegen unter dem jeweiligen Knockdown. (E) zeigt darüber hinaus den großen Anteil ungeschlüpfter Puppen mit mef2-Gal4 und CG3814-RNAi. (F) zeigt den unauffälligen Anteil geschlüpfter Fliegen pro Puppen unter elav-gesteuertem Knockdown, wobei jeder Punkt einer Kohorte aus Fliegen, welche in einem gemeinsamen Behälter geschlüpft sind, entspricht. Zudem wurde der Mittelwert und eine Standardabweichung als horizontale Linie angegeben.

Als statistische Tests wurde für (A) und (F) ein ANOVA verwendet, für (B) - (E) ein Binomialtest.

*** entsprechen einer statistischen Signifikanz von $p \leq 0,001$, * gibt ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ an, ns bezeichnet statistisch nicht signifikant bewertete Ergebnisse.

Um weiterhin zu untersuchen, ob es neben der reduzierten Anzahl adulter Fliegen zu einer weiteren Störung der Lebensfähigkeit kommt, wurde die Lebenszeit der elav-Gal4 und mef2-Gal4-Fliegen aufgezeichnet.

Hier zeigte sich eine reduzierte Lebenszeit für mef2-Gal4-CG3814-RNAi-Fliegen. Unter elav-Gal4 kam es dagegen zu keiner signifikanten Einschränkung der Lebensdauer trotz unterschiedlich verlaufenden Überlebenskurven (siehe Abb. 6 (B)). Da es sich bei mef2 um eine muskuläre Expression handelt und die mef2-Gruppe Einschränkungen in der Anzahl adulter Individuen und der Lebenszeit zeigte, wurde nun die motorische Funktion der Fliegen und Larven durch die Kriechgeschwindigkeit und negative Geotaxis untersucht. Hier zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Knockdown und Kontrollgruppe (siehe Abb. 6 (C) und (D)).

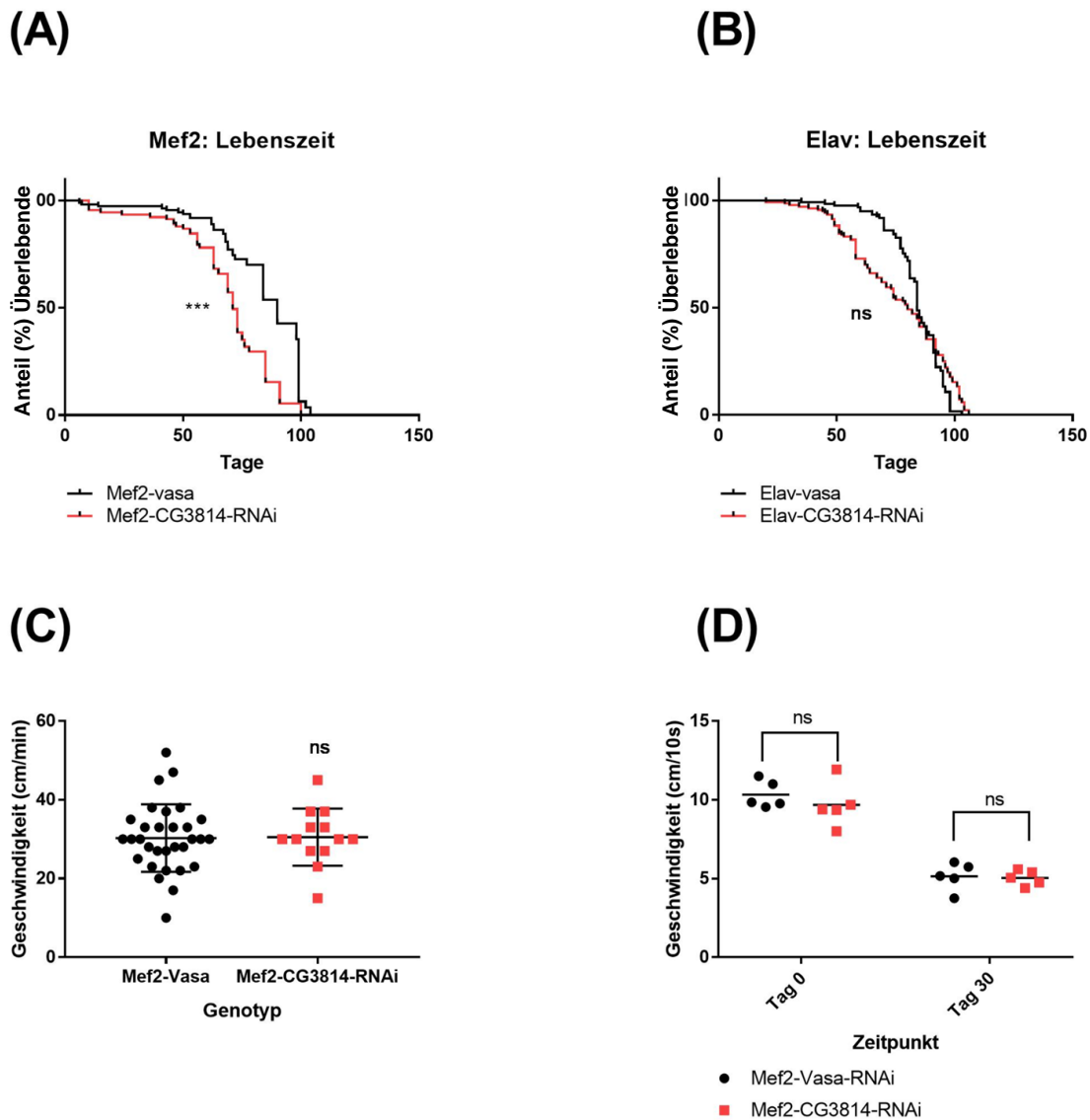


Abbildung 6: Der Knockdown von CG3814 unter *mef2* sorgt für eine reduzierte Lebenszeit adulter Fliegen ohne motorische Einschränkungen.

(A) und (B) zeigen die Überlebenskurve von Fliegen unter *mef2*- und *elav*- gesteuertem Knockdown von CG3814. (C) und (D) zeigen die Geschwindigkeit der Larven, bzw. adulter Fliegen. Jeder Punkt entspricht im Fall von (C) einer Larve, bei (D) dagegen einer Gruppe aus zehn Fliegen. Zudem wird für (C) der Mittelwert und eine Standardabweichung, für (D) der Mittelwert als horizontale Linie angegeben. Die statistische Signifikanz wurde für (A) und (B) nach dem Log-Rank-Test bestimmt, für (C) und (D) wurde das Signifikanzniveau nach dem t-Test bestimmt. Hierbei gibt ns ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis an, während *** einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ entspricht.

5.3. Der TMBIM3/CG3798-Knockdown hat lediglich eine leichtgradige Einschränkung der Lebensfähigkeit zur Folge

Erneut wurde mittels unterschiedlicher Gal4-Linien zunächst untersucht, in welchem Gewebe ein Knockdown von CG3798 zu einer reduzierten Lebensfähigkeit der Fliegen führt. Sowohl unter dem glialen, als auch neuronalen Knockdown zeigte sich eine unauffällige Verteilung, bzw. Anzahl adulter Fliegen, sowie Überlebenszeit.

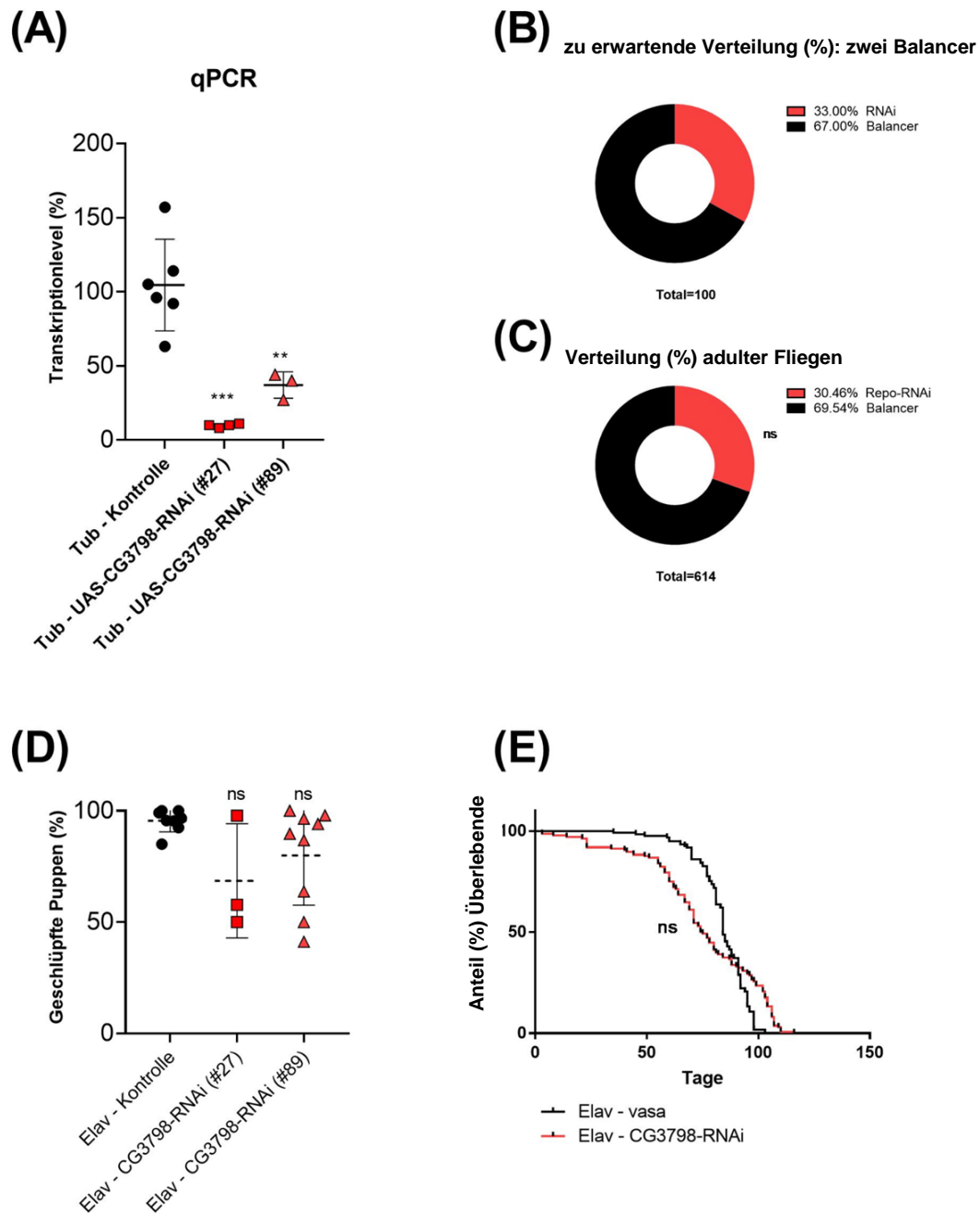


Abbildung 7: Der Knockdown von CG3798 mittels repo-Gal4 und elav-Gal4 hat keinen Effekt auf die Lebensfähigkeit.

(A) zeigt den erfolgreichen Knockdown mittels RNAi als reduziertes Transkriptionslevel der RNA. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine

Standardabweichung. **(B)** zeigt die zu erwartende 1:2-Verteilung bei Verwendung zweier Balancer, **(C)** zeigt die tatsächliche, unauffällige Verteilung unter repo-Gal4-gesteuertem Knockdown. **(D)** und **(E)** zeigen die Lebensfähigkeit unter neuronalem Knockdown als Anzahl geschlüpfter Puppen und Überlebensdauer. Für (D) entspricht jeder Punkt einer Gruppe aus Fliegen in einem eigenen Behälter. Die statistische Signifikanz wurde für (A) und (D) durch ein ANOVA, für (B) und (C) mit einem t-Test und für (E) nach dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierbei gibt ns ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis an. ** markieren $p \leq 0,002$ und *** $\leq 0,001$.

Anders verhielt es sich in der *mef2*-Gruppe. Unter muskelspezifischem Knockdown zeigte sich zwar eine unauffällige Verteilung adulter Fliegen. Allerdings konnte für eine große Anzahl ungeschlüpfter Puppen ein CG3798-Knockdown nachgewiesen werden. Auch die Lebensdauer der Knockdown-Fliegen zeigte sich leicht auffällig, interessanterweise kam es sogar zu einer minimalen Verlängerung der Überlebensdauer. Um zu überprüfen, ob es zudem zu einer gestörten muskulären Funktion kam, wurden die Fliegen, wie unter 4.7 Larvengeschwindigkeit und 4.8 negative Geotaxis beschrieben, getestet. Hier zeigte sich ein unauffälliges Bild im Vergleich zur Kontrollgruppe.

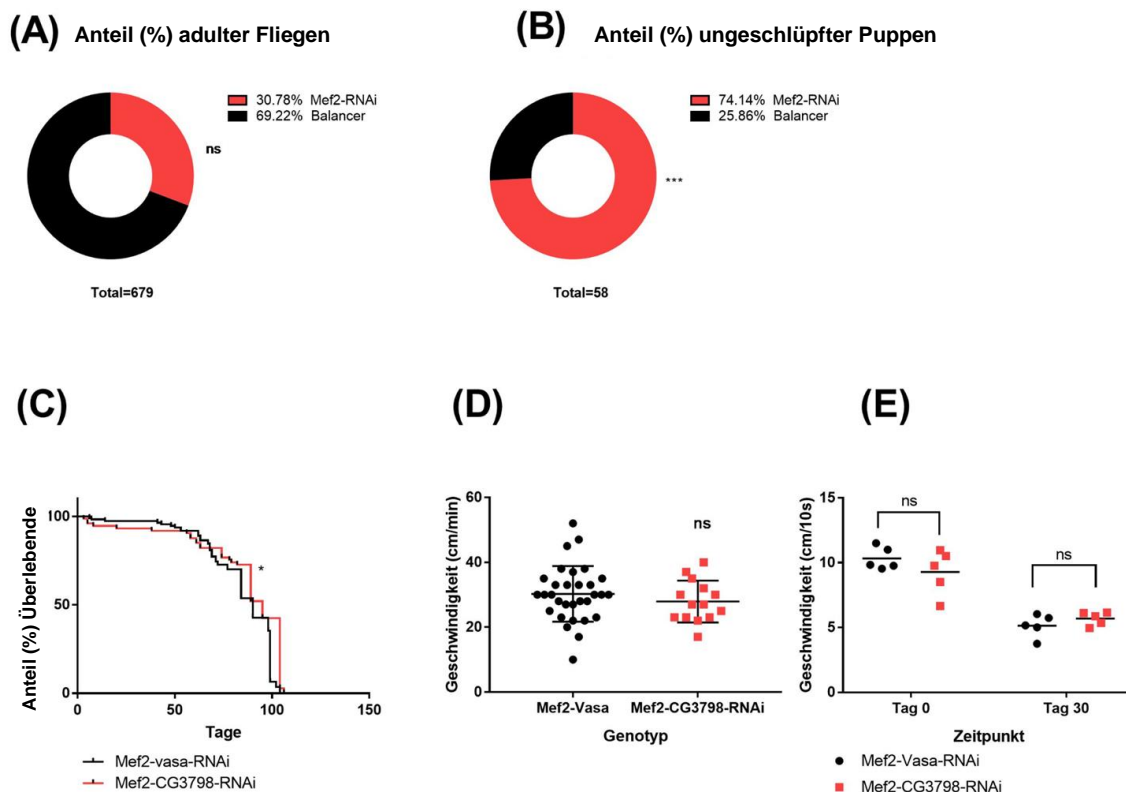


Abbildung 8: Der muskelspezifische Knockdown von CG3798 führt zu einer leichten Einschränkung der Lebensfähigkeit, aber unauffälligen Geschwindigkeit.

(A) zeigt die unauffällige Verteilung adulter Fliegen bei Vorliegen von zwei Balancern (Vergleiche

Abbildung 7 (B)). **(B)** stellt die deutlich erhöhte Anzahl ungeschlüpfter Puppen mit Knockdown dar. **(C)** zeigt die leicht auffällige Überlebenskurve der Fliegen, **(D)** und **(E)** zeigt die unauffällige Geschwindigkeit sowohl der Larven (D), als auch der adulten Fliegen (E). Jeder Punkt der Abbildung (D) entspricht einer Larve, während in Abbildung (E) jeder Punkt den Mittelwert einer Gruppe aus zehn Fliegen angibt. Die horizontalen Linien markieren den Mittelwert, bzw. für (D) zusätzlich eine Standardabweichung. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus diente für (A) und (B) ein Binomialtest, für (C) ein Log-Rank-Test und für (D) und (E) ein t-Test. *** kennzeichnen ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$, * entspricht $p \leq 0,05$ und ns markiert statistisch nicht signifikant bewertete Ergebnisse.

5.4. TMBIM4/CG30379 scheint vor allem in der Entwicklung von Gliazellen eine Rolle zu spielen

Wie bei den anderen TMBIM-Proteinen wurde der CG30379-Knockdown mittels verschiedener Gal4-Linien getestet. Für repo-Gal4 fand sich eine deutliche Reduzierung adulter Fliegen. Da repo-Gal4 vor allem in Gliazellen exprimiert wird, wurde nun weiter untersucht, ob sich ein Effekt in allen Gliazelllinien, oder nur in bestimmten nachweisen lässt. Hierzu wurden UAS-CG30379-RNAi-Linien mit spezifischeren Gliazelltreibern gekreuzt. Der deutlichste Effekt fand sich in alrm-Gal4, welches vor allem in astrozytenartigen Gliazellen exprimiert wird. Eine dagegen unauffällige Verteilung fand sich in der 55B12-Gal4-Gruppe, welcher vor allem in den Gliazellen des Cortex exprimiert wird. Die zwei restlichen Linien zeigten eine leichte Reduktion adulter Fliegen, weniger ausgeprägt als unter repo-Gal4 und alrm-Gal4.

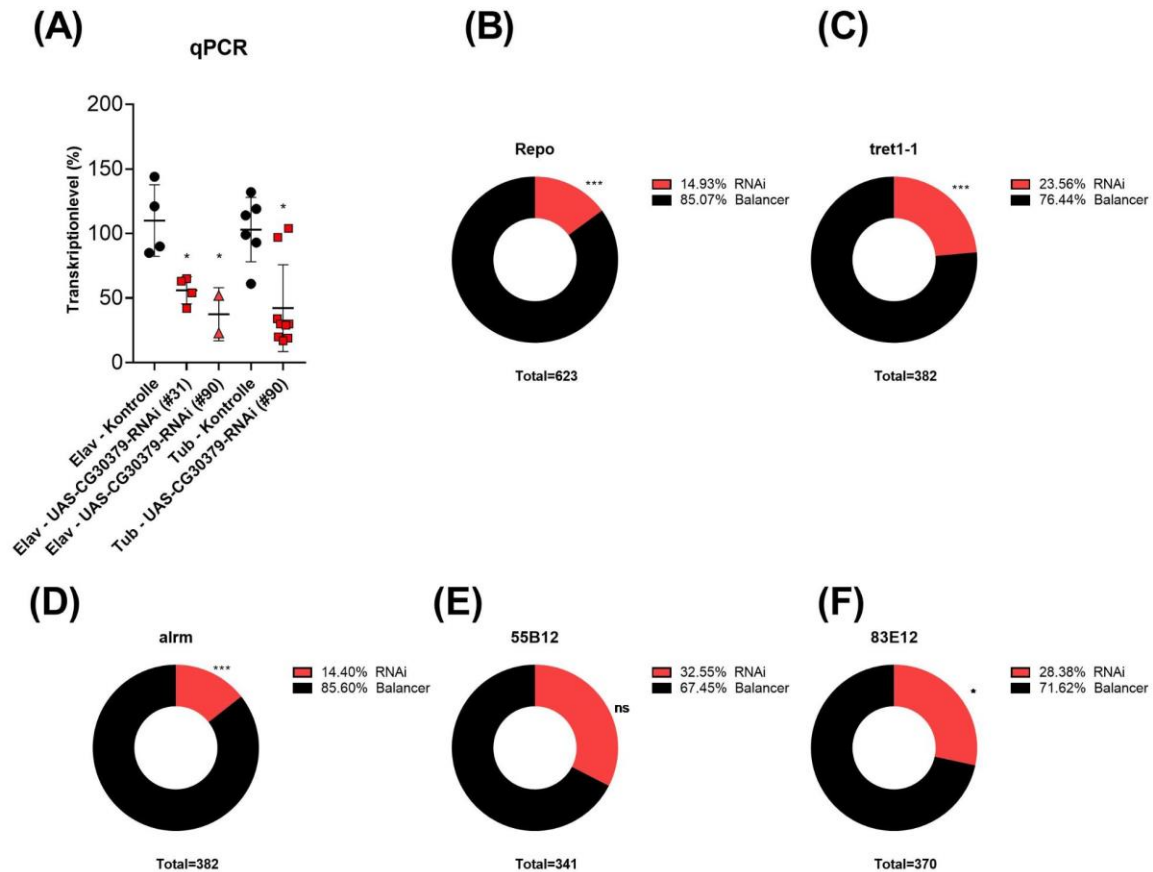


Abbildung 9: Der gliale Knockdown von CG30379 hat eine deutliche Reduzierung adulter Fliegen zur Folge. Der stärkste Effekt findet sich unter alm-Gal4-gesteuerter RNAi-Expression. (A) zeigt die reduzierte Transkription unter RNAi-Interferenz. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung **(B)** zeigt die deutlich reduzierte Anzahl adulter Fliegen unter repo-Gal4-gesteuertem Knockdown des Gens. **(C) - (F)** zeigen die darauffolgende Untersuchung mittels spezifischer Gliazelltreiber. Der deutlichste Effekt konnte für alm-Gal4 gefunden werden. Die statistische Signifikanz wurde für (A) nach einer ANOVA und für (B) - (F) mittels einem Binomialtest berechnet. *** kennzeichnen ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$, * entspricht $p \leq 0,05$ und ns markiert statistisch nicht signifikant bewertete Ergebnisse.

Um neben der glialen Expression unter repo-Gal4 weitere Gewebetypen zu testen, wurden auch für CG30379-RNAi-Stämme Kreuzungen mit mef2-Gal4 und elav-Gal4 durchgeführt. Es zeigte sich in beiden Fällen eine unauffällige Anzahl, beziehungsweise Verteilung adulter Individuen. Um zu überprüfen, ob es über das Erreichen des adulten Stadiums hinaus doch zu einer Einschränkung der Lebensfähigkeit kommt, wurden die Fliegen auf ihre Überlebenszeit untersucht. Es konnte eine Reduzierung sowohl in der elav-RNAi, als auch in ausgeprägterer Form in der mef2-Gal4-Kreuzung nachgewiesen werden. Ferner wurde die Geschwindigkeit der Larven und Imagines der mef2-Gruppe untersucht, um herauszufinden, ob der

muskuläre Knockdown die Muskelfunktion der Larven oder Fliegen beeinträchtigt. Hier fanden sich jedoch keine Auffälligkeiten.

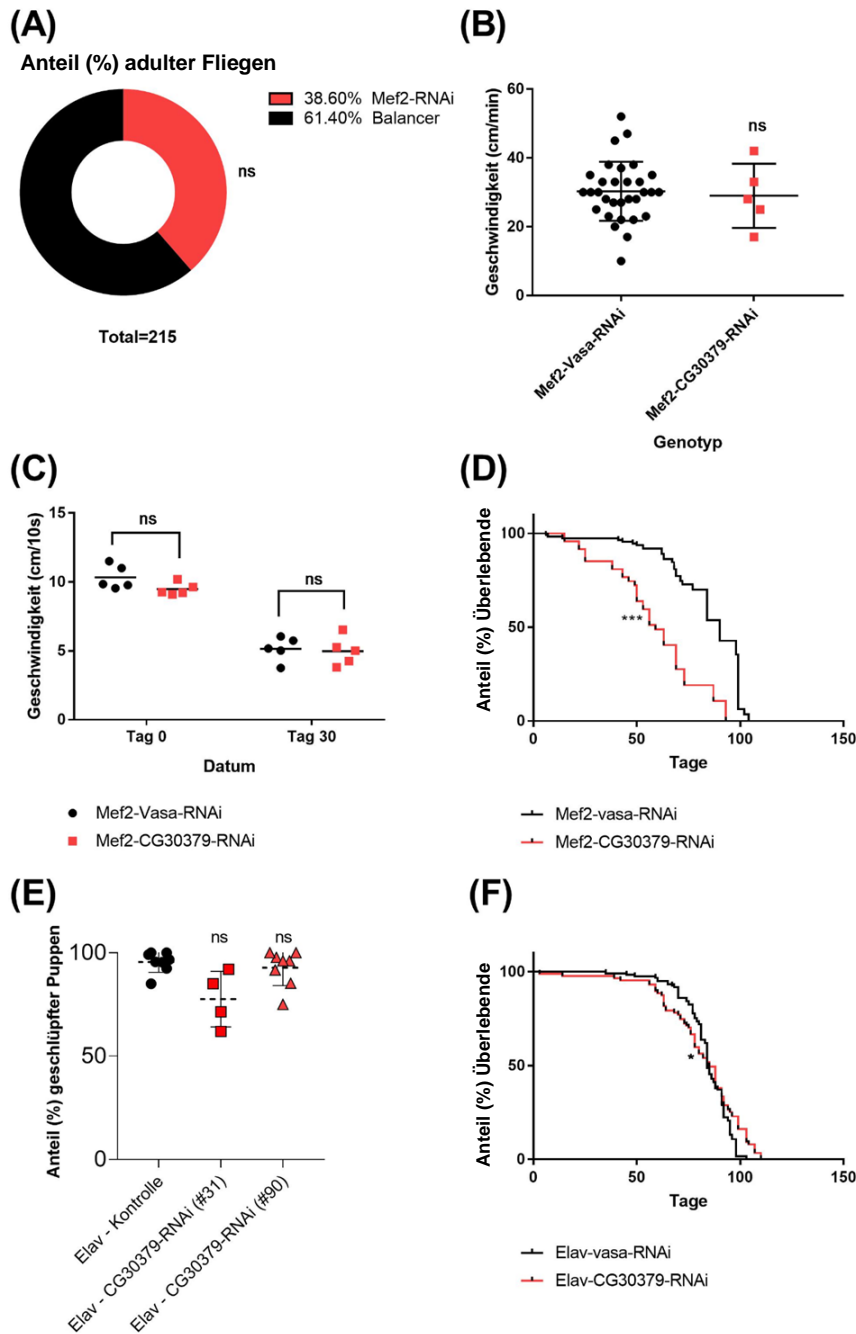


Abbildung 10: Der mef2- und elav-Gal4-gesteuerte Knockdown von CG30379 senkt die Lebensdauer von Fliegen ohne Einfluss auf motorische Funktion oder Erreichen des adulten Stadiums.

(A) zeigt die unauffällige Verteilung adulter Fliegen unter mef2-gesteuertem Knockdown. (B) und (C) zeigen die Geschwindigkeit der Larven, bzw. Fliegen. Für (B) entspricht jeder Punkt einer Larve, im Falle von (C) dagegen dem Mittelwert einer Gruppe aus zehn Fliegen. Die horizontalen Linien markieren den Mittelwert, sowie im Falle von (B) eine Standardabweichung. (D) beschreibt die reduzierte Lebensdauer der mef2-RNAi-Gruppe als Überlebenskurve. (E) zeigt die unauffällige Anzahl an adulten

Fliegen, wobei jeder Punkt einer Kohorte aus Fliegen in einem eigenen Behälter entspricht. (F) zeigt die leicht reduzierte Lebenszeit der elav-Knockdown-Gruppe als Überlebenskurve. Als statistische Tests der Signifikanz diente für (A) ein Binomialtest, für (B) und (C) ein t-Test, für (D) und (F) der Log-Rank-Test und für (E) ein ANOVA. Die statistische Signifikanz wurde mit *** bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$, * bei $p \leq 0,05$ und ns bei nicht signifikanten Ergebnissen angegeben.

5.5. TMBIM5/CG2076 ist ein entscheidendes Gen für die Entwicklung und Gesundheit der Drosophila

Zunächst wurde CG2076-RNAi mit tubP-Gal4, dem ubiquitären Treiber, verkreuzt. Es zeigte sich eine eindruckliche Reduktion der adulten Fliegen. Um nun zu untersuchen, ob dieser Effekt bei Knockdown in bestimmten Geweben ebenfalls auftritt, wurden CG2076-Fliegen mit verschiedenen weiteren Treiberlinien gekreuzt. Unter elav-Gal4 (Abb. 13 A) und repo-Gal4 kam es jeweils zu einer Reduktion adulter Fliegen, wobei der Effekt nicht so ausgeprägt schien wie unter tubP-Gal4.

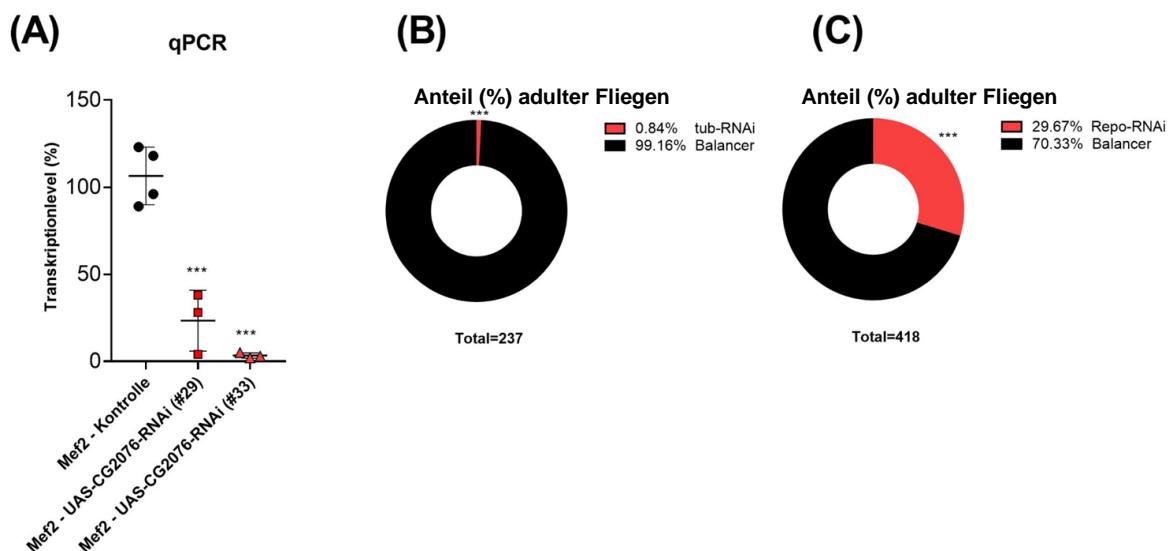


Abbildung 11: Der Knockdown von CG2076 führt unter tubP-Gal4 und repo-Gal4 zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl adulter Fliegen, wobei der Effekt unter tubP-Gal4 am stärksten ausgeprägt ist.

(A) zeigt die erfolgreiche Reduktion der Gentranskription unter RNA-Interferenz. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung.

(B) und (C) beschreiben die reduzierte Anzahl adulter Fliegen unter Knockdown von CG2076 entweder durch tubP-Gal4 (ubiquitär) oder repo-Gal4 (glial). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz diente für (A) ein ANOVA, für (B) und (C) ein Binomialtest.

Die statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ mit ***, bei $p \leq 0,05$ mit * und bei nicht signifikanten Ergebnissen mittels ns angegeben.

Neben elav-Gal4 und repo-Gal4 wurde auch *mef2*-Gal4 untersucht. Hier fand sich eine unauffällige Verteilung adulter Fliegen. Ähnlich zu den anderen *mef2*-Kreuzungen wurde aufgrund des muskelspezifischen Knockdowns die Muskelfunktion anhand der Larvengeschwindigkeit, sowie der negativen Geotaxis überprüft. Hier zeigte sich eine signifikante Reduzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auffallend war zudem, dass die Differenz zur Kontrollgruppe mit zunehmender Lebensdauer der Fliegen weiter abnahm. Um zu überprüfen, ob es neben der rasch abnehmenden motorischen Funktion auch zu einer Einschränkung der Lebensdauer kam, wurden die Fliegen wie unter 4.9 beschrieben untersucht. In der Knockdowngruppe kam es hierbei zu einer deutlichen und signifikanten Verkürzung der Lebensdauer.

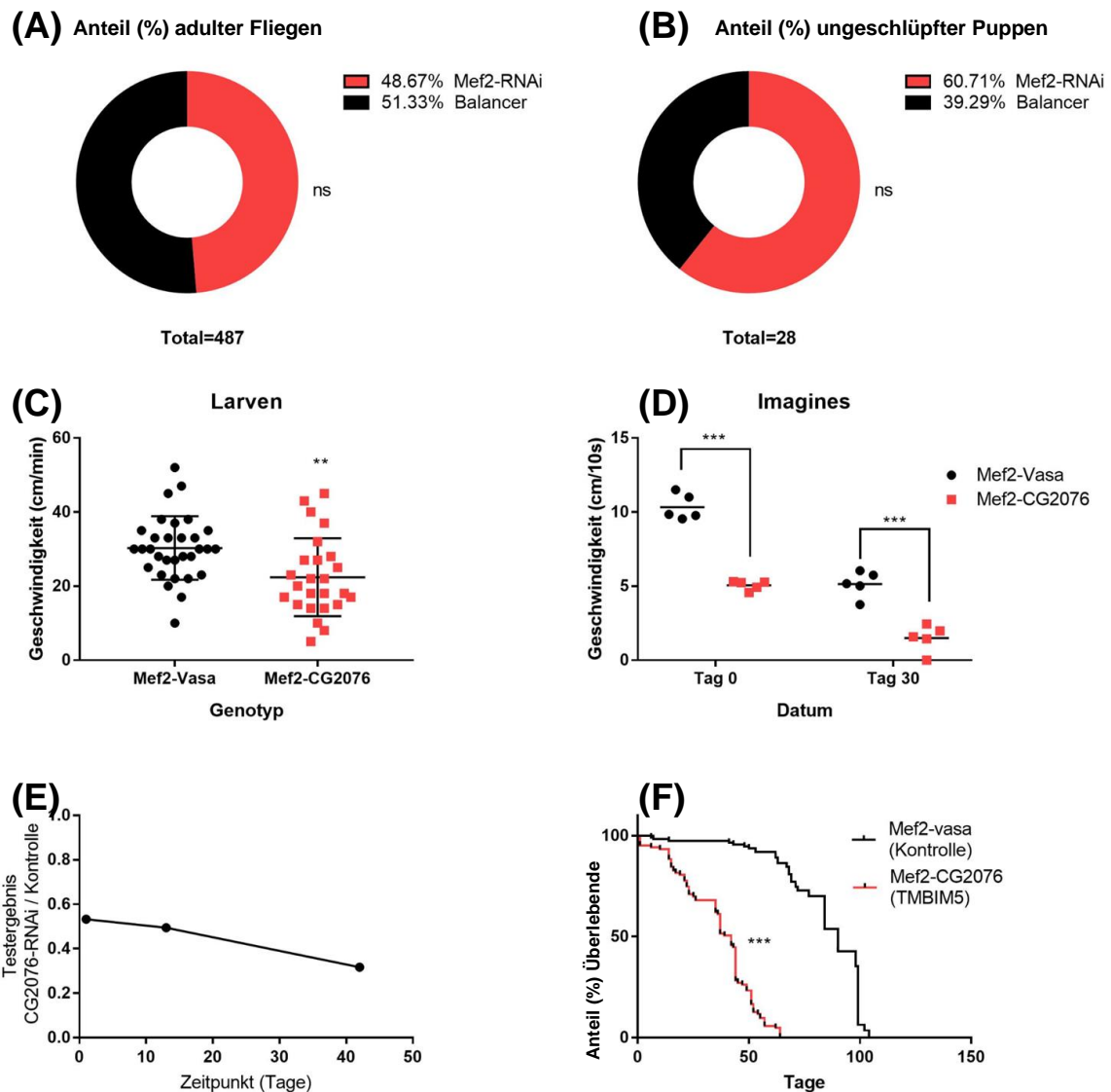


Abbildung 12: Der muskelspezifische Knockdown von CG2076 führt zu einer unauffälligen Anzahl adulter Fliegen bei eingeschränkter Lebenserwartung und motorischer Funktion.

(A) und **(B)** zeigen die unauffällige Verteilung geschlüpfter Fliegen, bzw. ungeschlüpfter Puppen. **(C)** zeigt die reduzierte Geschwindigkeit der Larven; **(D)** beschreibt die verringerte Geschwindigkeit adulter Fliegen der Knockdown-Gruppe, gemessen an Tag 0 und Tag 30. Horizontale Linien geben den Mittelwert, bzw. im Falle von (C) zusätzlich eine Standardabweichung an. Ein Punkt entspricht im Falle von (C) einer Larve, im Fall von (D) einer Gruppe aus 10 Fliegen. **(E)** zeigt die zunehmende Abnahme der motorischen Fähigkeiten von Fliegen, bzw. Larven gegen die Zeit. **(F)** gibt schließlich die Lebensdauer der *mef2-CG2076-RNAi*-Fliegen als Überlebenskurve im Vergleich zur Kontrollgruppe an.

Die statistische Signifikanz wurde für (A) und (B) mittels eines Binomialtest, für (C) und (D) mit einem t-Test und für (F) mit einem Log-Rank-Test bestimmt. Die Signifikanz wurde mit *** bei $p \leq 0,001$, ** bei $p \leq 0,002$ und mit ns bei nicht signifikant bewerteten Ergebnissen angegeben.

Wie bereits beschrieben, kam es unter *elav*-gesteuertem Knockdown von CG2076 zu einer reduzierten Anzahl adulter Fliegen. Um weiter zu überprüfen, ob es darüber hinaus zu Einschränkungen kam, wurde die Lebensdauer der Fliegen ausgewertet. Es zeigte sich eine Reduktion. Unter der Vermutung, dass es unter neuronenspezifischem Knockdown auch zu Einschränkungen der motorischen Funktion kommen könnte, wurden *elav-Gal4-CG2076-RNAi*-Fliegen mittels negativer Geostaxis überprüft (Abb. 13 C Tag 0). Es konnte eine reduzierte Klettergeschwindigkeit nachgewiesen werden. Da TMBIM-Proteine, wie in der Einleitung beschrieben, eine wichtige Rolle in zellulären Stressreaktionen zu spielen scheinen, wurden die CG2076-Knockdown-Fliegen unter verschiedenen Stressoren auf ihre Lebensdauer hin überprüft. Wurden die Fliegen täglich auf das unter 4.11 beschriebene Laufband gesetzt, führte dies zu einer weiteren Einschränkung der Lebensdauer und Klettergeschwindigkeit. Allerdings zeigte sich auch in der Kontrollgruppe eine vergleichbare Reduktion (Abbildung 13 (C) und (D)).

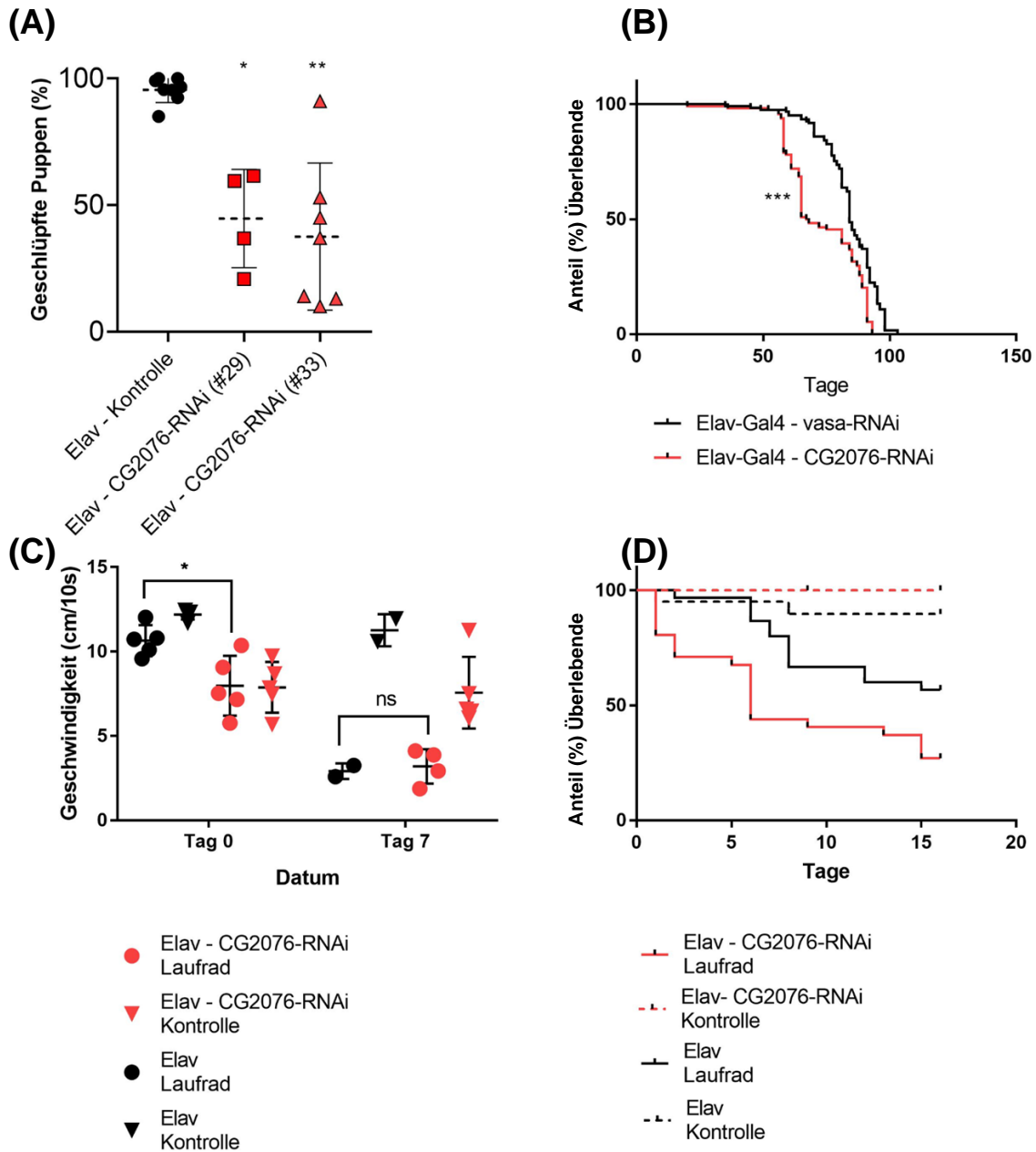


Abbildung 13: Der neuronenspezifische Knockdown von CG2076 führt zu einer reduzierten Anzahl adulter Fliegen mit verkürzter Lebensdauer und eingeschränkter motorischer Funktion.

(A) beschreibt den reduzierten Anteil geschlüpfter Larven in der CG2076-Knockdown-Gruppe. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung. **(B)** zeigt die reduzierte Lebenszeit der Knockdown-Fliegen als Überlebenskurve. **(C)** zeigt die Klettergeschwindigkeit von Knockdown- und elav-Kontrollgruppe an Tag null und nach sieben Tagen auf dem Laufband, wobei die mit ▼ markierten zusätzlichen Datenpunkte einer weiteren Kontrollgruppe entsprechen, welche nicht auf das Laufband gesetzt wurde. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert einer Gruppe aus 10 Fliegen. Angegeben sind zudem Mittelwert und Standardabweichung. **(D)** beschreibt die Überlebenskurven der oben beschriebenen Gruppen aus Knockdown- und Kontrollgruppe jeweils mit oder ohne Laufband.

Die statistische Signifikanz wurde für (A) per one-way ANOVA, für (B) und (D) nach dem Log-Rank-Test, für (D) mittels einem 2way ANOVA berechnet. Erneut beschreibt * einen p-Wert von $\leq 0,05$, ** $p > 0,002$ und *** ein $p \leq 0,001$; mit ns sind statistisch nicht signifikant bewertete Ergebnisse markiert.

Neben der Belastung durch das Laufband wurden drei chemische Noxen untersucht. Die Auswahl fiel auf Rotenon, Tunicamycin und H_2O_2 . Grund für H_2O_2 und Rotenon war, dass TMBIM5 aufgrund seiner mitochondrialen Expression möglicherweise eine Rolle im Management des für Mitochondrien entscheidenden oxidativen Stress spielt. Tunicamycin wiederum wurde als Modell für endoplasmatischen Stress und die UPR gewählt. Es zeigte sich für H_2O_2 und Rotenon eine deutliche zusätzliche Einschränkung der Lebensdauer in der Knockdowngruppe, während Tunicamycin eine vergleichbare Reduktion der Überlebenszeit sowohl in der Knockdown-, als auch der Kontrollgruppe zur Folge hatte.

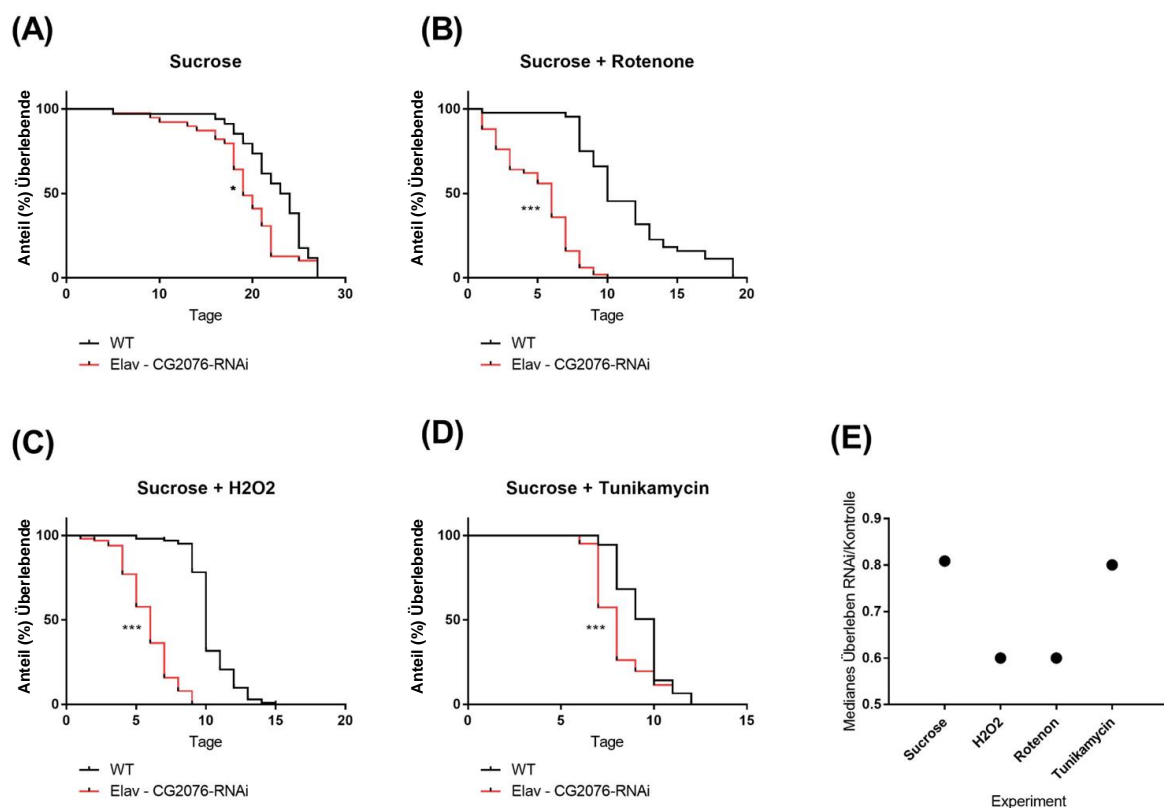


Abbildung 14: Elav-Gal4-CG2076-RNAi-Fliegen sind besonders anfällig gegenüber H_2O_2 und Rotenon.

(A)-(D) zeigen die Überlebenskurve von elav-CG2076-RNAi- und Kontrollfliegen unter verschiedenen Noxen, bzw. der Sucrose-Kontrolle. (E) gibt das mediane Überleben der Knockdownfliegen des jeweiligen Experimentes an. Die statistische Signifikanz berechnet sich nach dem Log-Rank-Test. * markiert statistisch signifikante Ergebnisse bei einem $p \leq 0,05$, *** markieren ein $p \leq 0,001$.

5.6. MCU und TMBIM5/CG2076 zeigen eine komplexe Interaktion

Für TMBIM5 haben wir aufgrund seiner Lokalisation in der Mitochondrienmembran eine wichtige Rolle für den Calciumstoffwechsel der Mitochondrien angenommen. Daher war es naheliegend, die Interaktion von TMBIM5 bzw. seinem Homolog CG2076 mit verschiedenen Proteinen des Calciumstoffwechsels zu prüfen. Hierfür wurde zunächst wie unter 4.6.1 beschrieben eine Linie generiert, welche balanciert sowohl elav-Gal4 als auch UAS-CG2076-RNAi trug. Vereinfacht handelt es sich hierbei um Fliegen, welche in jeder Generation CG2076-RNAi und elav-Gal4-Kontrolle exprimieren. Diese Linie wurde mit verschiedenen Stämmen gekreuzt, welche beispielsweise eine Überexpression verschiedener bekannter Proteine des mitochondrialen Calciumstoffwechsels als genetisches Merkmal trugen. Auffällig war vor allem eine Reduktion adulter Fliegen durch den Knockdown von CG2076 in Kombination mit einer MCU-Überexpression. Zudem zeigten diese Fliegen verkümmerte Flügel, beispielhaft in Abbildung 15 (D) dargestellt. Die Kombination von TMBIM5 und EMRE-Flag führte zu einem erhöhten Anteil von Fliegen mit CG2076-RNAi, sodass kein Unterschied zur Balancergruppe bestand.

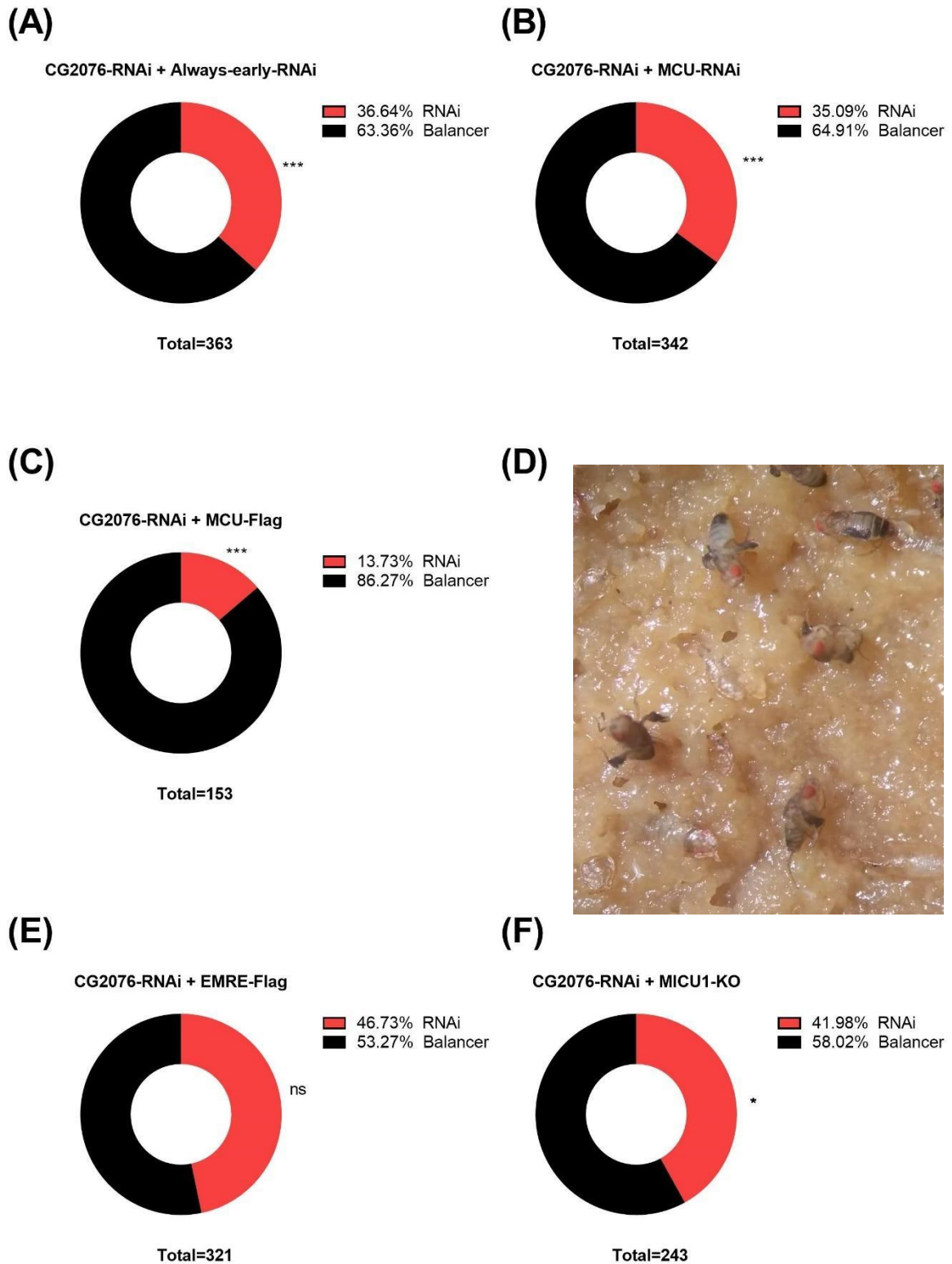


Abbildung 15: Der negative Effekt des neuronalen Knockdowns von CG2076 wird durch die gleichzeitige Überexpression von MCU verstärkt und durch EMRE-Überexpression abgeschwächt.

Zunächst wurden Fliegen mit balancierten *elav-Gal4*- und *UAS-CG2076-RNAi*-Genen gezüchtet. Diese wurden mit verschiedenen anderen Linien gekreuzt, gezeigt wird die Verteilung der adulten Fliegen. **(A)** stellt exemplarisch die Verteilung der Kontrollkreuzung mit *always-early-RNAi* dar. **(B) - (F)** zeigen die Kreuzungen von *elav-Gal4-CG2076-RNAi*-Fliegen mit den jeweiligen *UAS*-Linien. Während *MCU-RNAi* und *MICU1-KO* zu einer vergleichsweise unauffälligen Verteilung führen, kommt es unter *MCU-Überexpression* **(C)** zu einer deutlichen Reduktion adulter Fliegen. **(D)** zeigt exemplarisch die auffällig verkümmerten Flügel der geschlüpften Fliegen dieser Kreuzung. Unter *EMRE-Überexpression* wiederum zeigt sich ein vergleichsweise größerer Anteil adulter Fliegen mit dem Merkmal *CG2076-RNAi* und *EMRE-Überexpression*, wie in **(E)** dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Binomialtest bestimmt, wobei das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,001$ mit ***, bei $p \leq 0,05$ mit * und bei nicht signifikanten Ergebnissen mittels ns angegeben wurde.

Die Kombination eines *CG2076*-Knockdowns mit einer *MCU-Überexpression* führte zudem zu einer verlängerten Lebenszeit im Vergleich zum reinen *TMBIM5*-Knockdown, aber einer verkürzten Lebenszeit im Vergleich zur reinen Überexpression von *MCU*. Der Knockdown von *MCU* führte mit oder ohne Kombination von *CG2076-RNAi* zu einer vergleichbaren Lebenszeit. Gegenüber dem reinen Knockdown von *CG2076* war die Überlebenszeit dagegen signifikant verlängert. Bei Untersuchung der Expressionslevel durch eine qPCR zeigte sich eine nicht signifikant erhöhte Expression von *MCU* in *CG2076*-Knockdown-Fliegen.

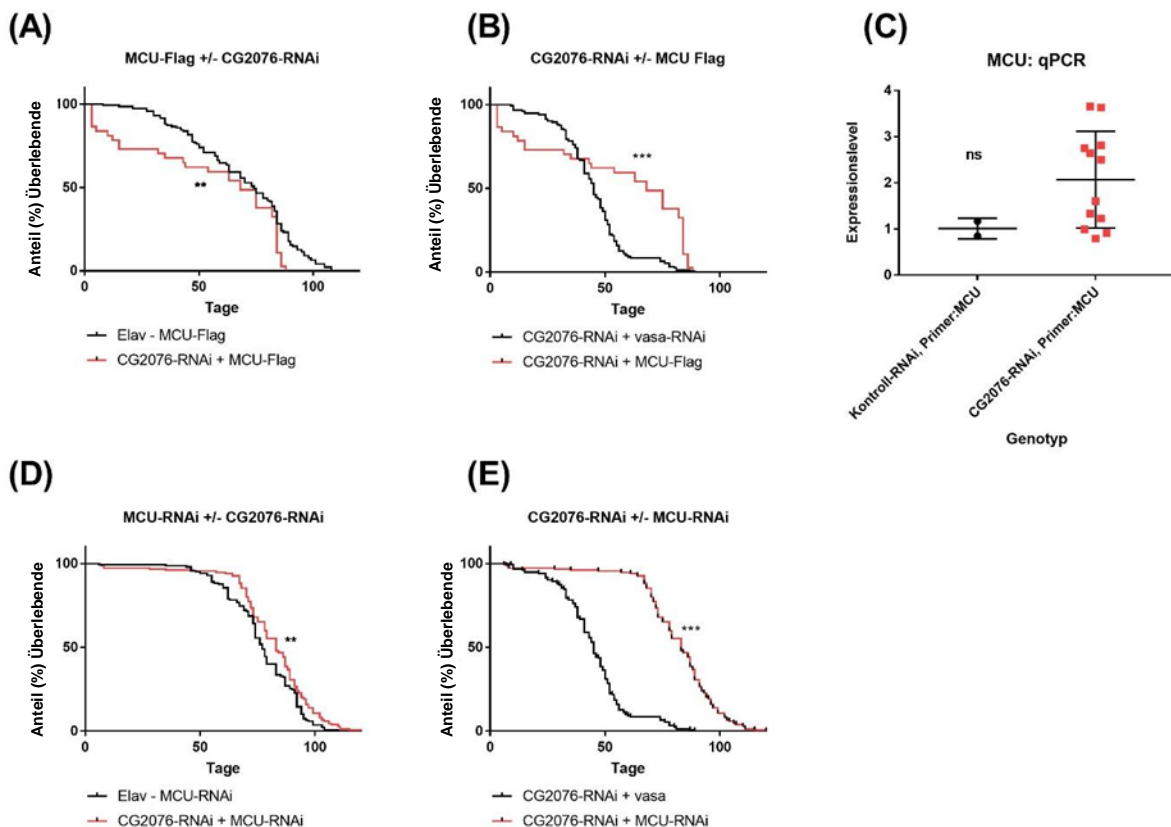


Abbildung 16: Die eingeschränkte Lebensdauer durch CG2076-RNAi lässt sich durch MCU-RNAi ausgleichen. MCU-Überexpression führt zu einer veränderten Überlebenskurve. (A) und (B) zeigt das Überleben von MCU-Fliegen mit oder ohne CG2076-RNAi oder CG2076-RNAi-Fliegen mit oder ohne MCU-Flag. (C) zeigt das Expressionslevel von MCU in Kontrollfliegen und CG2076-RNAi-Fliegen. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung (D) und (E) zeigt das Überleben von MCU-RNAi-Fliegen mit oder ohne CG2076-RNAi oder CG2076-RNAi-Fliegen mit oder ohne MCU-RNAi. Die statistische Signifikanz wurde für (A), (B), (D) und (E) nach dem Log-Rank-Test, für (C) durch einen t-Test bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ mit * und bei nicht signifikanten Ergebnissen mittels ns angegeben.**

5.7. TMBIM6/CG7188 scheint vor allem während der Verpuppung eine Rolle zu spielen

Auch für CG7188, dem wahrscheinlichen TMBIM6-Homolog, wurden verschiedene Kreuzungen von Gal4-Linien mit RNAi-Linien durchgeführt. Sowohl für repo-Gal4, als auch elav-Gal4 ließ sich eine signifikante Reduktion adulter Fliegen nachweisen; für den neuronalen Knockdown mittels elav-Gal4 zudem eine Reduktion der Lebensdauer.

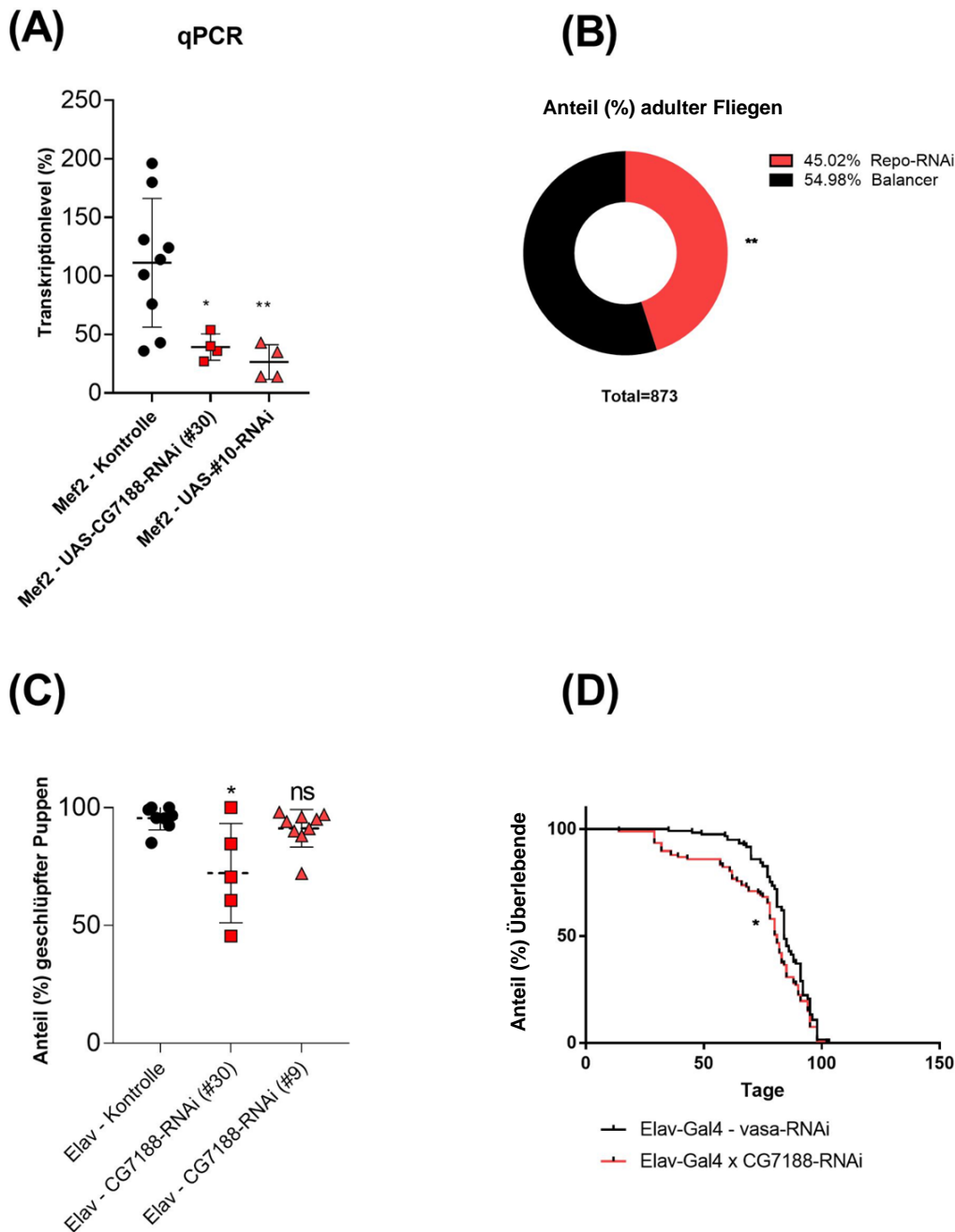


Abbildung 17: Der Knockdown von CG7188 führt unter repo-Gal4 und elav-Gal4 zu einer leichtgradigen Einschränkung der Vitalität.

(A) stellt die erfolgreiche Reduktion der Transkription unter RNA-Interferenz dar. Jeder Punkt entspricht einer Gruppe aus 10 Fliegen, die Linien markieren Mittelwert +/- eine Standardabweichung. (B) zeigt eine leichte Reduktion adulter Fliegen mit dem Merkmal repo-Gal4-CG7188-RNAi. (C) zeigt die leicht reduzierte Anzahl adulter Fliegen der Kreuzung von elav-Gal4-Stämmen mit CG7188-RNAi, wobei jeder Punkt einer Kohorte aus Fliegen in einem eigenen Behälter entspricht. Zudem wurde der Mittelwert +/- eine Standardabweichung als horizontale Linie markiert. (D) zeigt die zudem reduzierte Überlebensdauer dieser Fliegen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz diente im Falle von (A) und (C) ein ANOVA, für (B) wurde ein Binomialtest und für (D) ein Log-Rank-Test verwendet. Die

Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ mit ***, bei $p \leq 0,05$ mit * und bei nicht signifikanten Ergebnissen mittels ns angegeben

Während die Kreuzung mit *elav-Gal4* und *repo-Gal4* zwar zu einer statistisch signifikanten, aber eher leichtgradig ausgeprägten Einschränkung der Lebensfähigkeit adulter Fliegen führte, kam es unter *mef2-Gal4* zu einer ausgeprägten Reduktion. Um nun weiter zu untersuchen, ob diese Einschränkung bereits im Larvenstadium oder während der Verpuppung auftritt, wurden zunächst die ungeschlüpften Puppen ausgezählt und mittels Fluoreszenz auf das Vorliegen des Balancers, bzw. der *mef2-RNAi*-Kombination sortiert. Wie bereits bei *TMBIM1* zeigte sich eine große Anzahl ungeschlüpfter Puppen in der Knockdown-Gruppe, die genaue Ursache hierfür blieb leider unklar (siehe Abb. 18 (A) + (B)).

Außerdem wurde getestet, ob es funktionell unter *mef2*-gesteuertem Knockdown zu Einschränkungen kommt. Da die wenigen adulten Fliegen bereits in den ersten Tagen verstarben, konnten lediglich die Larven untersucht werden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Knockdown. Auffallend war jedoch eine U-förmige Verteilung der Geschwindigkeit in der RNAi-Gruppe (siehe Abb. 18 (C).)

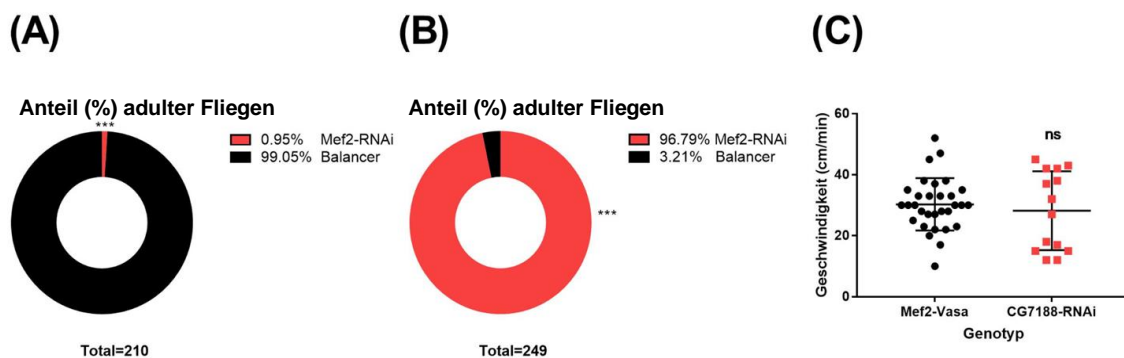


Abbildung 18: Der muskelspezifische Knockdown von CG7188 führt zu einer ausgeprägten Reduktion adulter Fliegen, die Larvengeschwindigkeit ist jedoch nicht beeinträchtigt.

(A) und (B) zeigen die deutliche Reduktion adulter Fliegen, einhergehend mit einer großen Anzahl ungeschlüpfter Puppen für die Kreuzung von *mef2-Gal4* mit *UAS-CG7188-RNAi*. (C) zeigt die Geschwindigkeit der Larven in der entsprechenden Kreuzung. Jeder Punkt entspricht einer Larve, zudem wurde Mittelwert und eine Standardabweichung durch horizontale Linien angegeben. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz diente für (A) und (B) ein Binomialtest, im Falle von (C) wurde aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Mann-Whitney-Test angewendet. Die statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ mit *** und bei nicht signifikanten Ergebnissen mittels ns angegeben.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der verschiedenen Mitglieder der TMBIM-Proteinfamilie in vivo zu untersuchen. Hierzu wurde der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* genutzt. Durch das Gal4-UAS-System gelang ein Knockdown der Genfamilie in verschiedenen Geweben. Die nun entstandenen Fliegen wurden auf verschiedene Weise untersucht. Zum einen wurde die allgemeine Lebensfähigkeit gemessen. Zum anderen wurden, wo es möglich war oder sinnvoll erschien, funktionelle Untersuchungen wie die negative Geotaxis oder die Messung der Larvengeschwindigkeit durchgeführt. Um eventuelle zusätzliche Effekte der RNAi-Interferenz zu eliminieren, wurden, falls möglich, jeweils zwei UAS-RNAi-Linien mit unterschiedlichem Angriffspunkt verwendet. Eine Ausnahme dieser Regel bildete CG9722. Hier findet sich keine zweite RNAi-Linie, da das gesamte Gen auf einem Exon vorliegt.

Bei CG9722 handelt es sich um das wahrscheinliche TMBIM1-Homolog. Besonders auffällig war die gestörte Lebensfähigkeit unter *mef2*-gesteuertem Knockdown. Dies ist interessant, da für das eng verwandte CG3814 keine solche Störung gezeigt werden konnte. Ähnlich zu den für CG7188 beobachteten Ergebnissen zeigte sich zudem trotz dieser Einschränkung keine Änderung der Larvengeschwindigkeit. Während CG7188 in Larve und adulter Fliege beinahe ubiquitär exprimiert wird, ist für CG9722 laut FlyAtlas eine deutliche Expression nur für den Fettkörper der Larve und die Hoden der adulten Fliege beschrieben (Chintapalli et al., 2007). In diese Analyse ist allerdings nicht die Expression im Muskelgewebe, mit Ausnahme des Herzens, sowie die Expression während der Verpuppung eingeflossen. Auffällige Ergebnisse waren neben der reduzierten Anzahl adulter Fliegen unter *mef2*-gesteuertem Knockdown eine große Anzahl ungeschlüpfter Puppen in der RNAi-Gruppe. Aufgrund der hier gefundenen eindrücklichen Ergebnisse spielt CG9722 möglicherweise in diesem Gewebe, bzw. Stadium eine entscheidende Rolle, die bisher noch nicht untersucht wurde. Insbesondere bleibt unklar, wann und auf welchem Weg eine Schädigung während der Verpuppung eintritt. Makroskopisch zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den Puppen der *mef2*-RNAi- und Kontrollgruppe. Denkbar wäre zum Beispiel eine deutliche muskuläre Schwäche, die das Aufbrechen und Verlassen des Kokons verhindert. Aber auch eine katastrophale Fehlfunktion, welche bereits während des Verpuppens bzw. der Metamorphose zu einem Absterben der Fliegen führt, erscheint möglich. Der neuronenspezifische Knockdown von

CG9722 führte passend zum oben genannten Expressionsmuster zu keinem auffälligen Phänotyp. Eventuell wird der Knockdown von CG9722 auch durch das sehr ähnliche CG3814 kompensiert. Ein gemeinsamer Knockdown von CG9722 und CG3814 sollte deshalb in künftigen Untersuchungen angestrebt werden.

Auch für CG3814 wurde initial untersucht, ob der ubiquitäre Knockdown durch tubP-Gal4 für Fliegen mit dem Erreichen des Imagostadiums vereinbar ist. Eine Gruppe von Fliegen erreichte dieses Stadium, wenn auch in geringerer Anzahl als in der Balancergruppe. Damit ähnelt CG3814 seinem möglichen Ortholog TMBIM2, welches in Mäusen bei Knockout zu keinem letalen Phänotyp führt (Komnig et al., 2016). Ähnliches zeigte sich für den muskelspezifischen Knockdown durch mef2-Gal4. Der Anteil adulter Fliegen mit mef2-Gal4 und UAS-RNAi war im Vergleich zu den balancertragenden Imagines signifikant reduziert. Trotz Knockdown erreichte jedoch eine große Anzahl Fliegen das adulte Stadium. Der Anteil an nicht geschlüpften Puppen in der Knockdown-Gruppe war wiederum deutlich erhöht. Demzufolge hat ein CG3814-Knockdown einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Fliegen. Die Lebenszeit der Fliegen war hierzu passend verkürzt. Sowohl die Geschwindigkeit der Larven als auch der adulten Fliegen zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Fliegen mit muskelspezifischem CG3814-Knockdown sind somit, wenn auch reduziert, lebensfähig und nicht in ihrer Geschwindigkeit als Larve oder Imago eingeschränkt. Für den Knockdown von CG3814 in Dopa-decarboxylase-exprimierenden Neuronen wurde anders als hier ein deutlicherer Phänotyp aus reduzierter Lebensdauer und zusätzlich gestörter motorischer Aktivität beschrieben (M'Angale and Staveley, 2016b). Dies ist interessant, da in meinen Experimenten der neuronale Knockdown über elav-Gal4 ebenfalls einen eher milden Effekt auf die Lebensfähigkeit adulter Fliegen zeigte, was möglicherweise auf einem ähnlichen Mechanismus beruht. Für den muskelspezifischen Knockdown liegen in der Literatur leider noch keine Daten zum Vergleich vor.

CG3798 ist das mögliche Ortholog zu TMBIM3. Allerdings ist das Gen ähnlicher und damit wahrscheinlich auch näher verwandt zu CG3814, als zu dem menschlichen Ortholog. Der muskelspezifische Knockdown durch mef2-Gal4 war für die Fliegen nicht letal, eine große Zahl erreichte das adulte Stadium. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen, in denen ein ubiquitärer Knockdown durch tubP-Gal4 alleine zu keiner signifikanten Einschränkung der Lebensfähigkeit führte (Rojas-Rivera et al., 2012). In der Kletterfähigkeit adulter Fliegen und der

Fortbewegungsgeschwindigkeit der Larven bestand in den hier beschriebenen Versuchen in der *mef2-Gal4*-Gruppe keine signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe. Der muskelspezifische Knockdown scheint somit keine deutliche Einschränkung der Motorik zur Folge zu haben. Für das murine TMBIM3 ist vor allem eine neuronale Expression beschrieben, wobei TMBIM3-KO-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen (Nielsen et al., 2011b). Dies ähnelt den Ergebnissen des hier beschriebenen *elav-Gal4*-Knockdowns. Es zeigte sich keine Einschränkung der Lebensfähigkeit. Entsprechend erreichte eine große Zahl an Fliegen das Imagostadium. Die Lebensdauer war zwar nach dem Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe, nicht aber nach dem log-rank-test. Dies erklärt sich durch die relativ höhere Gewichtung früher Tode durch den Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test. Die Überlebenskurve der CG3798-Knockdown-Gruppe fiel zunächst rascher ab als die der Kontrollgruppe, um dann nach etwa 75 Tagen flacher zu verlaufen und kreuzte schließlich die der Kontrollgruppe. Grund hierfür könnte eine aus bisher unbekanntem Gründen besonders langlebige Subpopulation innerhalb der CG3798-Knockdown-Gruppe sein, beispielsweise aufgrund von bestimmten Kompensationsmechanismen. Ebenfalls denkbar wäre eine abnehmende Wichtigkeit des Gens im Laufe des Lebenszyklus einer Fliege, bzw. sogar ein leichter Schutz vor Alterungsprozessen. Zudem ist natürlich ein Versagen des Knockdowns in einem Teil der Fliegen denkbar.

Der Knockdown von CG30379 in der *mef2-Gal4* und *elav-Gal4*-Gruppe führte zu keiner signifikanten Reduktion der Anzahl adulter Fliegen, aber zu einer verkürzten Lebenszeit in der *mef2-Gal4*-Gruppe. CG30379 wird als mögliches Homolog zu TMBIM1 angesehen (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Auch in Mäusen wird der TMBIM1-KO als nicht letal beschrieben, führt allerdings zu verschiedenen Krankheiten, welche vor allem mit einer Fettstoffwechselstörung assoziiert sind (Zhao et al., 2017). Interessanterweise zeigte CG30379 als einziges der untersuchten Gene neben CG2076 eine deutliche Reduktion der Imagines unter *repo-Gal4*-gesteuertem Knockdown. Möglicherweise hat der Knockdown von CG30379 eine Störung des für Gliazellen wichtigen Fettstoffwechsels zur Folge (Barber and Raben, 2019). Um herauszufinden, ob ein bestimmter Typ Gliazellen besonders von einem Knockdown betroffen ist, wurden UAS-CG30379-RNAi mit verschiedenen Gliazelltreibern gekreuzt. Eine besonders auffällige Reduktion zeigte sich unter *alm-Gal4*, einem astrozytenspezifischen Treiber, aber auch durch *Tret1-1-Gal4*, welches in der

perineurialen Glia exprimiert wird. Der Knockdown in der kortikalen Glia hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Fliegen. Die kortikale Glia der *Drosophila Melanogaster* hat eine den menschlichen Oligodendrozyten vergleichbare Funktion. Sie dient vor allem der Umhüllung kortikaler Nervenzellen. Allerdings wird sie als eher schlecht erforscht beschrieben und zeigt vermutlich viele auch darüber hinausgehende Eigenschaften (Freeman, 2015). Die Astrozyten der *Drosophila* ähneln von allen Gliazellen der *Drosophila* am meisten ihrem Äquivalent in Säugetieren. Sie sind während der Entwicklung des Nervensystems und für die Bildung neuer Synapsen, vor allem während der Verpuppung und Metamorphose von der Larve zum Imago, von großer Bedeutung (Freeman, 2015). Diese zentrale Rolle der Astrozyten könnte einer der Gründe für den deutlichen Effekt des alm-gesteuerten Knockdowns von CG30379 sein. Eine Untersuchung von Larven auf den Effekt von alm-Gal4-CG30379-RNAi sollte in Zukunft ergänzt werden, um festzustellen, ob auch diese bereits durch den Knockdown beeinflusst werden oder ob der Effekt erst während der Verpuppung auftritt. In Mäusen steigert das durch Rojas-Rivera, Hetz et al. vermutete Ortholog TMBIM1 die Degradation von TLR4 (Zhao et al., 2017). Da der TLR4 auch in der Neuroinflammation eine wichtige Rolle spielt, ist zudem ein ähnlicher Mechanismus mit gesteigerter Neuroinflammation infolge des Knockdowns als Grund für die verminderte Viabilität der Fliegen möglich (Ibanez et al., 2019). Zu beachten ist hierbei allerdings, dass *Drosophila melanogaster* nicht über die aus Säugetieren bekannte Toll-Like-Rezeptor-Ausstattung verfügt, jedoch über die namensgebenden Toll-Rezeptoren. Diese weisen eine ähnliche Funktion in der Immunantwort auf, spielen aber auch beispielsweise in der Entwicklung zur adulten Fliege eine wichtige Rolle (Levin and Malik, 2017).

Das Ortholog des humanen TMBIM5 ist wahrscheinlich CG2076. Es stand im Zentrum meiner Arbeit. Der ubiquitäre Knockdown führte zu einem deutlichen Phänotyp, nur einzelne Fliegen erreichten überhaupt das Imagostadium. Dies spricht für eine entscheidende Rolle des Gens bei der Entwicklung der Fliegen. Eine Recherche auf Pubmed mit den Schlagworten „TMBIM5“, „GHITM“, oder „MICS1“ jeweils in Kombination mit „Mouse“ oder „Mice“ im Oktober 2021 fand keine Studien, in denen ein in-vivo-Knockout des Proteins in Mäusen beschrieben wurde. In der Literatur ist dafür ein Knockdown von CG2076 in Ddc-Gal4-exprimierenden, dopaminergen Neuronen der *Drosophila melanogaster* beschrieben (M'Angale and Staveley, 2016a). Dieser führt zu einer verkürzten Lebensdauer und reduzierter Kletterfähigkeit.

Ähnliches zeigte sich in meinen Versuchen in der elav-Gal4-Gruppe, also unter einem Knockdown in sämtlichen Neuronen. Eine reduzierte Anzahl an Fliegen erreichte in meinen Versuchen das Imagostadium. Zudem zeigte ein großer Teil dieser Fliegen verkümmerte Flügel und verstarb innerhalb weniger Stunden. Fliegen, welche länger als einen Tag überlebten, zeigten ebenfalls eine signifikant eingeschränkte Lebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise erreichten deutlich mehr Weibchen als Männchen das adulte Stadium. Dies könnte mit einer veränderten Gendosis durch das doppelte X-Chromosom der Weibchen erklärt werden. Für elav-Gal4 ist neben der neuronalen Expression auch eine ektopische Expression unter anderem in Epithelien beschrieben, was ebenfalls einen Einfluss, insbesondere auf die auffällige Flügelform haben könnte (Casas-Tinto et al., 2017). Andere Gal4-Treiber zeigten keine derartige Geschlechtsverteilung. Der Knockdown unter Kontrolle von *mef2* führte ebenfalls zu einer deutlichen und signifikanten Einschränkung der Lebensdauer. Zusammenfassend scheint CG2076 also eine wichtige Rolle zumindest im Nerven- und Muskelgewebe der Fliegen zu spielen. Entsprechend führte der muskelspezifische Knockdown zu einer verlangsamten Kriechgeschwindigkeit der Larven und einer deutlich reduzierten Kletterfähigkeit adulter Fliegen. Interessanterweise nahmen die motorischen Fähigkeiten der CG2076-Knockdown-Fliegen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit der Zeit ab. Frisch geschlüpfte Imagines erreichten noch etwa die Hälfte der Geschwindigkeit der Kontrollgruppe, einen Monat später dagegen weniger als ein Drittel. Dies könnte für eine fortschreitende Degradation oder Schädigung infolge des CG2076-Knockdowns sprechen. Besonders oxidativer Stress kommt als Verursacher der fortschreitenden Einschränkung der Fliegen in Betracht, wie meine Versuche mit CG-2076-Knockdown-Fliegen und verschiedenen Noxen nahelegen.

Fliegen unter Knockdown von CG2076 zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe anfälliger gegenüber verschiedenen Stressoren. Dies galt besonders für Rotenon und H_2O_2 . Rotenon blockiert den mitochondrialen Komplex I und somit die Elektronentransportkette und führt in verschiedenen Modellorganismen zu parkinsonähnlichen Symptomen und histologischen Veränderungen. Auch aufgrund dieser Befunde werden für die Pathogenese des Morbus Parkinson oxidative Zellschäden und mitochondriale Fehlfunktionen diskutiert (Aryal and Lee, 2019). Wichtiger Modulator des Zelltodes infolge einer Blockade des Komplex I ist unter anderem Bax (Aryal and Lee, 2019). Für andere Mitglieder der TMBIM-Familie ist eine

antagonistische Wirkung zu Bax beschrieben (Xu and Reed, 1998). Eine ähnliche Wirkung für TMBIM5, bzw. CG2076 liegt somit nahe. Zudem ist TMBIM5 mit CHCHD2 assoziiert, einem weiteren Protein der IMM. Gemeinsam stabilisieren sie Cytochrom C und regulieren so den Zelltod. Mutationen in CHCHD2 sind als Auslöser für Parkinson beschrieben (Kee et al., 2021). In Fliegen sorgt ein Knockdown des CHCHD2-Gens für eine verkürzte Lebensdauer, erhöhte Sensibilität für oxidativen Stress durch H₂O₂ und Paraquat, sowie eine Verlangsamung der Klettergeschwindigkeit (Meng et al., 2017). Interessanterweise wurde ein sehr ähnlicher Phänotyp in meinen Versuchen auch für den Knockdown von CG2076 beobachtet. Eventuell haben CG2076 und CHCHD2 eine gemeinsame Funktion oder sind in ihren Funktionen voneinander abhängig, sodass der Knockout eines der beiden Proteine die Funktion des anderen beeinträchtigt. Da es sich bei den beschriebenen Versuchen zunächst um einen eher unspezifischen Überblick über die Rolle der TMBIM-Familie in der Drosophila handelt, ist es an dieser Stelle noch zu früh, um Schlüsse über das genaue Zusammenspiel von CG2076 und CHCHD2 zu ziehen. Der beschriebene Phänotyp könnte sich auch durch eine generell wichtige Rolle von CG2076 für eine intakte mitochondriale und damit zelluläre Funktion erklären lassen. Fehlt diese, kommt es zu vermehrtem Zelluntergang und dem beobachteten Phänotyp. Hier sollten weitere Untersuchungen erfolgen.

Neben der vermuteten Stabilisierung des Cytochrom C wird für TMBIM5 eine Rolle in der Calciumhomöostase der Zelle postuliert (Lisak et al., 2015). Denkbar wäre somit auch eine Interaktion mit dem für den mitochondrialen Calciumhaushalt entscheidenden MCU. Der Knockout von MCU ist für Fliegen nicht letal und führt sogar zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch H₂O₂, was gegenteilig zu dem von mir beobachteten Effekt des Knockdowns von CG2076 ist (Choi et al., 2017). Um weitere Interaktionen zu untersuchen, generierte ich Fliegen mit einem Knockdown von CG2076 und kreuzte diese mit verschiedenen Linien, unter anderem mit MCU-Knockdown und -Überexpression. Die gleichzeitige Expression von CG2076- und MCU-RNAi veränderte das Verhältnis adulter Fliegen mit oder ohne RNAi im Vergleich zum reinen CG2076-Knockdown nicht. Interessanterweise verbesserte sich die Überlebensdauer von Fliegen durch den Knockdown von MCU und CG2076 im Vergleich zum reinen Knockdown von CG2076. Eine Überexpression von MCU bei gleichzeitigem Knockdown von CG2076 führte dagegen zu einer verringerten Anzahl an Fliegen, welche das adulte Stadium erreichten. Außerdem zeigte ein großer Anteil

dieser Fliege den „smokey wing“ Phänotyp mit verkümmerten Flügeln. Somit konnte für die Viabilität von Fliegen und deren Lebensdauer zumindest in diesem engen Rahmen ein antagonistischer Effekt von CG2076 und MCU gezeigt werden. In Fliegen mit mef2-gesteuertem Knockdown von CG2076 zeigten sich allerdings gesteigerte Level an MCU-RNA, was auf den ersten Blick nicht zu den hier beschriebenen Ergebnissen passt. Dies spricht für ein deutlich komplexeres Zusammenspiel, das über eine reine antagonistische Wirkung der beiden Proteine hinausgeht. So ist beispielsweise eine Deregulation der Expression von MCU während eines CG2076-Knockdowns denkbar. Eine zusätzliche Überexpression von MCU würde diesen Effekt weiter verstärken und den stärker ausgeprägten Phänotyp erklären. Der zusätzliche Knockdown von MCU hätte dagegen einen protektiven Effekt auf eine solche Deregulation. Interessanterweise hatte die Überexpression von MCU auf die Lebensdauer von CG2076-Knockdown-Fliegen zunächst einen negativen Effekt mit einer Übersterblichkeit in den ersten drei Wochen. Hierauf folgte allerdings ein Plateau und schließlich ein Kreuzen mit der Überlebenskurve der reinen CG2076-Knockdown-Gruppe. Dies führte zu einer insgesamt verlängerten medianen Lebensdauer für die Gruppe mit zusätzlicher MCU-Überexpression, was ebenfalls zunächst nicht zu den vorangegangenen Ergebnissen zu passen scheint. Erneut wäre auch hier eine aus bisher unbekanntem Gründen besonders robuste und langlebige Subpopulation denkbar. Besonders eine Selektion von Fliegen mit schwach ausgeprägtem Knockdown oder effektiven Kompensationsmechanismen ist denkbar. Der Teil an Fliegen, welcher besonders schwer betroffen war und bereits als Ei oder Larve verstarb, konnte erst gar nicht in die Überlebenskurven eingehen und nach Versterben der restlichen besonders beeinträchtigten Fliegen in den ersten Wochen bestand der Rest eventuell nur noch aus leicht betroffenen Fliegen. Erneut ist ein negativer Einfluss während der Entwicklung und dem Wachstum der Tiere denkbar, welcher im Verlauf durch einen schützenden Einfluss, beispielsweise auf bestimmte Alterungsprozesse ausgeglichen wird.

Neben der Interaktion mit MCU wurde auf ähnliche Weise auch die Interaktion mit EMRE und MICU1 untersucht. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Funktion des MCU. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang EMRE. EMRE ist für die Funktion des MCU entscheidend und steuert unter anderem die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals in Abhängigkeit von der cytosolischen Calciumkonzentration (Payne et al., 2020). Eine Überexpression von EMRE in Kombination mit einem Knockdown von CG2076 führte zu einer verbesserten

Lebensfähigkeit mit einer höheren Anzahl adulter Fliegen und einer leicht verlängerten Lebensdauer im Vergleich zum reinen Knockdown von CG2076. Leider verfügte ich über keine EMRE-RNAi-Linien, um den Effekt des kombinierten Knockdown zu zeigen. Der gleichzeitige Knockdown von CG2076 und MICU1 führte zu einer verbesserten Lebensfähigkeit und verlängerten Lebensdauer im Vergleich zum reinen CG2076-Knockdown. MICU1 wird für die korrekte Funktion des MCU benötigt. In Zellkulturen wurde gezeigt, dass MICU1 die Calciumaufnahme durch MCU bei niedriger cytosolischer Konzentration inhibiert, bei erhöhter Konzentration aber aktiviert (Matesanz-Isabel et al., 2016). Vor allem die Aktivierung des MCU bei hohen cytosolischen Calciumkonzentrationen ist in diesem Zusammenhang interessant. Sowohl ein Knockdown von MCU als auch von MICU1 sollte somit bei hohen Calciumkonzentrationen den mitochondrialen Calciumanstieg abschwächen. Möglicherweise ist auch dies einer der entscheidenden Mechanismen für die bessere Lebensfähigkeit der CG2076-Knockdown-Fliegen. Es ist denkbar, dass CG2076, beziehungsweise TMBIM5 bei mitochondrialer Calciumüberladung den Zelltod verhindert oder sogar einer solchen Calciumüberladung entgegenwirken kann. Beim Knockdown fehlte diese Funktion, sodass es zum Untergang von Zellen kommen kann. Hier sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, um die Calciumhomöostase in TMBIM5-KO-Zellen oder Organismen zu untersuchen.

Schließlich wurde in Form der Laufbandversuche der Effekt von Stress durch vermehrte körperliche Aktivität auf Fliegen mit CG2076-Knockdown untersucht. Erneut zeigten sich die CG2076-Knockdown-Fliegen anfälliger gegenüber dem Stressor. Auch die Kletterfähigkeit nahm infolge des Stresses ab, wenn auch weniger stark als in der Kontrollgruppe. Grund für die im Verlauf ähnlichen Geschwindigkeiten in der Knockdown- und Kontrollgruppe ist vermutlich das bereits nach einer Woche in beiden Gruppen nur noch sehr niedrige Leistungsniveau. Die quantitativen Unterschiede waren somit nur noch sehr gering. Eventuell ist es auch aufgrund der ähnlichen Reize durch Kletterversuch und Laufband zu einer Desensibilisierung der Fliegen gekommen. In diesem Fall würden diese nicht mehr ausreichend mit einer Kletterreaktion auf das Herabklopfen reagieren, weshalb durch dieses Experiment keine Aussage über die wahre Geschwindigkeit der Fliegen getroffen werden konnte.

Der muskelspezifische Knockdown von CG7188 war für Fliegen nicht mit Erreichen des adulten Stadiums zu vereinbaren. Hier besteht ein Unterschied zum wahrscheinlichen murinen Homolog, dem Protein TMBIM6. Mäuse mit Knockout von

TMBIM6 sind lebensfähig, zeigen allerdings einen veränderten Glucosestoffwechsel (Philippaert et al., 2020). Interessanterweise scheint der entscheidende Schritt für die durch CG7188-Knockdown gestörte Lebensfähigkeit die Verpuppung zu sein. Hierin ähnelt es dem TMBIM1-Homolog CG9722. Larven mit CG7188-Knockdown waren lebensfähig und zeigten sogar eine nicht signifikant veränderte Kriechgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Passend zur vermuteten Einschränkung während der Verpuppung fand sich eine große Gruppe nicht geschlüpfter Kokons in der Knockdown-Gruppe. Wie bereits bei CG9722 lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht sicher zuordnen, auf welche Weise die Letalität ausgelöst wird, bzw. ob es sich überhaupt um einen identischen Effekt zum CG9722-Knockdown handelt. Die Ergebnisse sind insofern interessant, als dass sich in der Literatur ähnliche Untersuchungen finden lassen, in denen die *mef2*-gesteuerte Überexpression von MCU während der Verpuppung letal ist. Ein zusätzlicher Knockdown von IP₃R schwächt diese Letalität ab, ein Einfluss von endogenen Sauerstoffradikalen wird hier diskutiert (Choi et al., 2017). Ein ähnlicher Mechanismus oder ein Einfluss auf IP₃R sollte für CG7188 bzw. CG9722 in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Der neuronenspezifische Knockdown scheint ebenfalls einen geringen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Fliegen zu haben. In Mäusen ist vor allem eine Expression von TMBIM6 in Muskeln, sowie Leber, Niere und Milz und in deutlich geringeren Mengen in Groß- und Kleinhirn beschrieben (Lisak et al., 2015). Eventuell liegt auch ein ähnliches Expressionsmuster in der Fliege vor, wobei die Expression in der Muskulatur eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der adulten Fliege, aber nicht unbedingt für die Funktion der Muskulatur spielt. Dazu passend ist für CG7188 eher eine Expression im Fettkörper und Herzen, weniger dagegen im Gehirn beschrieben, wobei Muskeln nicht untersucht wurden. Der Fettkörper der *Drosophila* scheint eine ähnliche Stoffwechselrolle wie die Leber höherer Wirbeltiere zu spielen (Chintapalli et al., 2007).

6.1. Limitierungen

Die durchgeführten Experimente hatten vor allem das Ziel, ein erstes Schlaglicht auf die TMBIM-Proteinfamilie der *Drosophila Melanogaster* zu werfen und die prinzipielle Machbarkeit und Funktionsfähigkeit der Fliege als Modell für weitere Versuche aufzuzeigen. Erste Ergebnisse sollten deshalb nicht überinterpretiert werden. Eine wichtige Erkenntnis ist die zum Teil entscheidende Rolle von CG2076 für die Lebensfähigkeit und Gesundheit der Fliege. Dies konnte in verschiedenen Versuchen

gezeigt werden. Über die genaue Funktionsweise und die Interaktion mit verschiedenen Proteinen können die dargestellten Versuche allerdings zunächst nur oberflächliche Ergebnisse liefern. Zudem sollte die Übertragbarkeit von diesen Ergebnissen auf Wirbeltiere wie dem Menschen, kritisch diskutiert werden. Schließlich liegen zwischen uns und der *Drosophila Melanogaster* über 500 Mio. Jahre Evolution, was sich zum Beispiel in einem anders aufgebauten Immunsystem zeigt (Lu et al., 2020). Zwar liegen für mehrere Gene der Familie Homologe in Fliege und Wirbeltier vor, allerdings sind viele Gene der Fliege miteinander enger verwandt als mit ihrem vermuteten Homolog (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Für viele Gene zeigten meine Versuche vergleichbare Ergebnisse zu ähnlichen Versuchen an Zellkulturen oder Wirbeltieren. Allerdings kam es auch zu einzelnen Abweichungen. *Drosophila Melanogaster* verfügt als Insekt über einen Lebenszyklus mit Larvenstadien und Verpuppung. Während der Verpuppung werden große Teile des Larvengewebes zerstört, während aus den sogenannten Imaginalscheiben die für das adulte Tier benötigten Organe und Gliedmaßen wachsen (Jennings, 2011). Für CG7188 scheint beispielsweise ein Knockdown vor allem während der Verpuppung die Lebensfähigkeit der Fliegen einzuschränken. Da hier ein großer Unterschied zu Wirbeltieren wie dem Menschen liegt, ist eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse fraglich. Auch über den genauen Zeitpunkt einer Letalität während der Entwicklung zur adulten Fliege lassen sich oft nur unpräzise Einordnungen angeben.

Ein Vorteil der *Drosophila Melanogaster* ist ihre leichte Verfügbarkeit und die hohe Anzahl an Fliegen. Vor allem die hohe Anzahl an Fliegen führt aber auch leicht zu einer hohen Zahl an Datenpunkten und damit schnell zu einer statistischen Signifikanz. Deshalb könnte es in manchen Versuchen zu einer Überschätzung des tatsächlichen Effektes gekommen sein. Ein Beispiel hierfür ist eventuell die Überlebensdauer von *mef2-Gal4/CG3798-RNAi*-Fliegen. Obwohl beide Kurven nahezu parallel verlaufen, lässt sich statistisch ein Unterschied finden. Zudem handelt es sich bei den Fliegen oft um eng verwandte Individuen, da viele Populationen als Schwarm über lange Zeit zusammengehalten werden. Aufgrund dieser Inzucht könnte der Effekt einzelner Gene über- oder auch unterschätzt werden. Auch auf die Lebensdauer hat dies einen Einfluss. Bekannt ist beispielsweise der Heterosis-Effekt, also die höhere Leistungsfähigkeit und Gesundheit von Hybriden (Jensen et al., 2018). Zwar versuchte ich dies zu überprüfen, indem ich als Kontrolle eine Kreuzung mit anderen RNAi-Linien ohne nachgewiesenen Effekt verwendete, allerdings bleibt hier die Frage, ob die

verwendeten Kontroll-RNAi-Linien nicht doch einen zumindest kleinen Effekt hatten. Zudem besteht in der CG9722-Gruppe aufgrund des Vorliegens einer einzigen möglichen RNAi-Linie eine weitere Limitierung. Sollte die verwendete RNAi auch an einer anderen Stelle des Genoms zu Interferenzen führen, würde dies in meine Untersuchungen als Effekt des CG9722-Knockdowns einfließen, da keine zweite RNAi zum Vergleich vorlag.

6.2. Ausblick

Ziel meiner Arbeit war es, einen ersten Überblick über die Wichtigkeit der TMBIM-Proteinfamilie in der *Drosophila Melanogaster* zu geben. Viele meiner Versuche belegen eine wichtige Rolle verschiedener Mitglieder der Proteinfamilie. Eine genauere Differenzierung und eine weitere Eingrenzung der Funktion dieser Mitglieder muss allerdings in Zukunft erfolgen. Dies gilt vor allem für CG2076, dessen Knockdown in mehreren Versuchen einen deutlichen negativen Effekt auf Überleben und verschiedene motorische Tests zeigte. Für CG2076 und sein wahrscheinliches Ortholog TMBIM5 wurde bislang keine einheitliche Funktion und Wirkmechanismus beschrieben. Zukünftig sollte deshalb weiterhin die in-vitro-Forschung, beispielsweise anhand von Zellkulturen im Zentrum stehen. Auch die Interaktion mit MCU bedarf weiterer Untersuchungen. Insbesondere Techniken, welche intrazelluläre Calciumflüsse darstellen können, sollten hier weitere interessante Ergebnisse liefern. Ein weiterer wichtiger Schritt wäre die Generierung von TMBIM-KO-Mäusen oder eines vergleichbaren Wirbeltiermodelles, um die Rolle der Proteinfamilie in vivo in einem dem Menschen näher verwandten Organismen zu untersuchen. Hierdurch ließen sich weitere Erkenntnisse auch für die Rolle der menschlichen Proteinfamilie ableiten. Trotzdem sollte die Forschung anhand der *Drosophila* nach den hier beschriebenen ersten vielversprechenden Ergebnissen nicht aus den Augen gelassen werden. Insbesondere die Interaktion der TMBIM-Gene untereinander oder mit anderen Genen bietet interessante Forschungsfragen. Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, je nach angewandtem Protokoll, fast in Echtzeit Rückschlüsse über verschiedene biologische Prozesse zu gewinnen. Leider konnte ich dieses weite Feld während meiner Arbeit nicht weiter vertiefen. Hier liegt somit noch viel Potential für zukünftige Forschung. Das langfristige Ziel sollte sein, durch Integration verschiedener Ergebnisse aus verschiedenen Modellen und Techniken schließlich einen genauen Überblick über die Funktion und Rolle der Proteinfamilie zu erhalten.

7. Zusammenfassung

Die TMBIM-Proteinfamilie ist aus fast allen Klassen des Lebens, inklusive der Säugetiere, Insekten, Pflanzen, Hefen und sogar manchen Bakterien und Viren bekannt. Ihren Namen verdankt sie der antagonistischen Wirkung auf proapoptotische Mitglieder der BCL-2-Familie (Rojas-Rivera and Hetz, 2015). Trotzdem ist Funktion und Rolle vor allem für einzelne Mitglieder noch relativ unbekannt. Typische Lokalisation der Proteine sind die Membranen des ER und Golgiapparates. Für TMBIM5 wurde allerdings eine mitochondriale Lokalisation nachgewiesen (Lisak et al., 2015). Die *Drosophila Melanogaster* ist ein wichtiger Modellorganismus der genetischen Forschung und verfügt dank des Gal4-UAS-System über eine simple und robuste Methode des Knockdowns verschiedener Gene (Duffy, 2002). In dieser Arbeit wurde unter Nutzung des Gal4-UAS-System ein gewebsspezifischer Knockdown der TMBIM-Orthologe durchgeführt. Für CG3814 war eine leichte Einschränkung der Lebensfähigkeit durch den *mef2*- und *elav*-gesteuerten Knockdown auffällig. Ähnliches galt für CG3798. Ein Fokus dieser Arbeit lag auf CG2076, dem Homolog des humanen TMBIM5. Wie dieses befindet es sich in der IMM (M'Angale and Staveley, 2016a). Auffällig war eine Reduktion der Lebensfähigkeit in fast allen Kreuzungen, aber besonders für *tubP*-Gal4, dem ubiquitären Treiber. Der *mef2*-gesteuerte Knockdown führte neben einer verkürzten Lebenszeit zudem zu einer verringerten lokomotorischen Funktion. *Elav*-CG2076-RNAi-Fliegen waren anfälliger gegenüber verschiedenen Noxen, wobei H₂O₂ und Rotenon die stärkste Wirkung zeigten. Beide Stoffe basieren auf oxidativer Schädigung, insbesondere der Mitochondrien. Die Kombination des Knockdowns von CG2076 mit der Überexpression von MCU führte zu einer weiteren Reduktion der Lebensfähigkeit adulter Fliegen, während der zusätzliche Knockdown von MCU einen gegenteiligen Effekt hatte. Für die nahe verwandten CG7188 und CG9722 stand vor allem die Einschränkung der Lebensfähigkeit adulter Fliegen bei Knockdown durch *mef2* im Vordergrund, wobei die Lokomotorik der Larven nicht eingeschränkt war. CG30379 zeigte eine interessante Reduktion adulter Fliegen in der *repo*-Gal4-Gruppe, also dem Knockdown in Gliazellen. Eine weitere Aufschlüsselung nach Gliazelltypen erfolgte, wo sich vor allem ein Effekt in der *tret1-1*- und *alm*-Gruppe zeigte. Hierbei erfolgte der Knockdown in Astrozyten und perineurial. Insgesamt konnte eine wichtige Rolle für die TMBIM-Proteinfamilie der Fliege gezeigt werden. Vor allem CG2076 scheint für die Lebensfähigkeit von Fliegen von großer Bedeutung zu sein und schützt eventuell vor mitochondrialen Schäden. Hierbei spielt vermutlich eine Interaktion mit MCU eine

wichtige Rolle. Da für verschiedene TMBIM-Proteine eine Ca^{2+} -sensible Funktion beschrieben wurde, ist hier eine ähnliche Funktionsweise denkbar (Guo et al., 2019) (Bultynck et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass mit der Fliege ein leicht zugängliches System besteht, in dem der Knockdown der TMBIM-Proteinfamilie auch in Zukunft weiter untersucht werden kann. Die Ergebnisse ähnelten vorbeschriebenen Experimenten in Säugetieren und Zellkulturen, auch wenn es zu einzelnen Abweichungen kam.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Als erstes meinem Doktorvater [REDACTED], dem ich nicht nur für das spannende Thema und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, sondern auch für regelmäßige Anregungen, die leichte Erreichbarkeit und natürlich die Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit danken möchte.

Des Weiteren danke ich der [REDACTED] ohne deren Unterstützung, Anleitungen und Vertrauen erst viele der gezeigten Experimente möglich waren. Außerdem gilt mein Dank [REDACTED] und seinem [REDACTED], welches mich selbstverständlich aufgenommen und mit Kaffee, Ideen und nicht zuletzt einem großen Teil der Fliegenstämme unterstützt hat.

Schließlich danke ich [REDACTED] für die Unterstützung, die Motivation und natürlich die Korrekturen. Und am Ende danke ich meiner – inzwischen – Frau, [REDACTED] für das offene Ohr und den Rückhalt in allen Tiefen, die eine Promotion mal mit sich bringen kann.

9. Quellen

- Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Adams, M.D., Celniker Se Fau - Holt, R.A., Holt Ra Fau - Evans, C.A., Evans Ca Fau - Gocayne, J.D., Gocayne Jd Fau - Amanatides, P.G., Amanatides Pg Fau - Scherer, S.E., Scherer Se Fau - Li, P.W., Li Pw Fau - Hoskins, R.A., Hoskins Ra Fau - Galle, R.F., Galle Rf Fau - George, R.A., *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.
- Aoyama, K., Burns, D.M., Suh, S.W., Garnier, P., Matsumori, Y., Shiina, H., and Swanson, R.A. (2005). Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 358-370.
- Aryal, B., and Lee, Y. (2019). Disease model organism for Parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. *BMB Reports* 52, 250-258.
- Barber, C.N., and Raben, D.M. (2019). Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. *Front Cell Neurosci* 13, 212.
- 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., *et al.* (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341-345.
- Berridge, M.J. (2006). Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 11-21.
- Bondarenko, A.I., Jean-Quartier, C., Parichatikanond, W., Alam, M.R., Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., and Graier, W.F. (2014). Mitochondrial Ca(2+) uniporter (MCU)-dependent and MCU-independent Ca(2+) channels coexist in the inner mitochondrial membrane. *Pflugers Arch* 466, 1411-1420.
- Bowden, N.A., Scott, R.J., and Tooney, P.A. (2008). Altered gene expression in the superior temporal gyrus in schizophrenia. *BMC Genomics* 9, 199.
- Brady, H.J., and Gil-Gómez, G. Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bridges, C.B. (1916). Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity. *Genetics* 1, 1-52.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 71, 2787-2814.
- Bultynck, G., Kiviluoto, S., Henke, N., Ivanova, H., Schneider, L., Rybalchenko, V., Luyten, T., Nuyts, K., De Borggraeve, W., Bezprozvanny, I., *et al.* (2012). The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore. *J Biol Chem* 287, 2544-2557.
- Bultynck, G., Kiviluoto, S., and Methner, A. (2014). Bax inhibitor-1 is likely a pH-sensitive calcium leak channel, not a H⁺/Ca²⁺ exchanger. *Sci Signal* 7, pe22.
- Carafoli, E., and Krebs, J. (2016). Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* 291, 20849-20857.
- Carrara, G., Parsons, M., Saraiva, N., and Smith, G.L. (2017). Golgi anti-apoptotic protein: a tale of camels, calcium, channels and cancer. *Open Biol* 7.
- Carrara, G., Saraiva, N., Gubser, C., Johnson, B.F., and Smith, G.L. (2012). Six-transmembrane topology for Golgi anti-apoptotic protein (GAAP) and Bax inhibitor 1

- (BI-1) provides model for the transmembrane Bax inhibitor-containing motif (TMBIM) family. *J Biol Chem* 287, 15896-15905.
- Carrara, G., Saraiva, N., Parsons, M., Byrne, B., Prole, D.L., Taylor, C.W., and Smith, G.L. (2015). Golgi anti-apoptotic proteins are highly conserved ion channels that affect apoptosis and cell migration. *J Biol Chem* 290, 11785-11801.
- Casas-Tinto, S., Arnes, M., and Ferrus, A. (2017). *Drosophila* enhancer-Gal4 lines show ectopic expression during development. *R Soc Open Sci* 4, 170039.
- Chae, H.J., Kim, H.R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., *et al.* (2004). BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell* 15, 355-366.
- Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W.A., and Liu, Q. (2014). Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science* 344, 1131-1135.
- Chen, K., Yang, L.N., Lai, C., Liu, D., and Zhu, L.Q. (2020). Role of Grina/Nmdara1 in the Central Nervous System Diseases. *Curr Neuropharmacol* 18, 861-867.
- Chintapalli, V.R., Wang, J., and Dow, J.A. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet* 39, 715-720.
- Choi, S., Quan, X., Bang, S., Yoo, H., Kim, J., Park, J., Park, K.S., and Chung, J. (2017). Mitochondrial calcium uniporter in *Drosophila* transfers calcium between the endoplasmic reticulum and mitochondria in oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem* 292, 14473-14485.
- Chung, Y.J. (1967). Persistence of a mutant gene in *Drosophila* populations of different genetic backgrounds. *Genetics* 57, 957-967.
- Csordas, G., Golenar, T., Seifert, E.L., Kamer, K.J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., Perez, S.F., Bogorad, R., *et al.* (2013). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca(2)(+) uniporter. *Cell Metab* 17, 976-987.
- Deluca, H.F., and Engstrom, G.W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47, 1744-1750.
- Deng, K.Q., Zhao, G.N., Wang, Z., Fang, J., Jiang, Z., Gong, J., Yan, F.J., Zhu, X.Y., Zhang, P., She, Z.G., *et al.* (2018). Targeting Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing 1 Alleviates Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation* 137, 1486-1504.
- Denton, R.M. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1309-1316.
- Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.
- Enerly, E., Larsson, J., and Lambertsson, A. (2002). Reverse genetics in *Drosophila*: from sequence to phenotype using UAS-RNAi transgenic flies. *Genesis* 34, 152-155.
- Freeman, M.R. (2015). *Drosophila* Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Gamboa-Tuz, S.D., Pereira-Santana, A., Zhao, T., Schranz, M.E., Castano, E., and Rodriguez-Zapata, L.C. (2018). New insights into the phylogeny of the TMBIM superfamily across the tree of life: Comparative genomics and synteny networks reveal independent evolution of the BI and LFG families in plants. *Mol Phylogenet Evol* 126, 266-278.
- Gehring, W.J. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types.
- Giniger, E., Varnum, S.M., and Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.

- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F.J., and Smith, G.L. (2007). A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog* 3, e17.
- Guo, G., Xu, M., Chang, Y., Luyten, T., Seitaj, B., Liu, W., Zhu, P., Bultynck, G., Shi, L., Quick, M., *et al.* (2019). Ion and pH Sensitivity of a TMBIM Ca(2+) Channel. *Structure* 27, 1013-1021 e1013.
- Habib, P., Stamm, A.-S., Zeyen, T., Noristani, R., Slowik, A., Beyer, C., Wilhelm, T., Huber, M., Komnig, D., Schulz, J.B., *et al.* (2019). EPO regulates neuroprotective Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif-containing (TMBIM) family members GRINA and FAIM2 after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Experimental Neurology* 320, 112978.
- Hales, K.G., Korey, C.A., Larracuente, A.M., and Roberts, D.M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics* 201, 815-842.
- Hedges, S.B., Dudley, J., and Kumar, S. (2006). TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics* 22, 2971-2972.
- Hetz, C., Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 421-438.
- Hu, G., and Kurgan, L. (2019). Sequence Similarity Searching. *Curr Protoc Protein Sci* 95, e71.
- Hu, L., Smith, T.F., and Goldberger, G. (2009). LFG: a candidate apoptosis regulatory gene family. *Apoptosis* 14, 1255-1265.
- Hurtado de Mendoza, T., Perez-Garcia, C.G., Kroll, T.T., Hoong, N.H., O'Leary, D.D., and Verma, I.M. (2011). Antiapoptotic protein Lifeguard is required for survival and maintenance of Purkinje and granular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17189-17194.
- Ibanez, F., Montesinos, J., Urena-Peralta, J.R., Guerri, C., and Pascual, M. (2019). TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles. *J Neuroinflammation* 16, 136.
- Jennings, B.H. (2011). *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. *Materials Today* 14, 190-195.
- Jensen, C., Orsted, M., and Kristensen, T.N. (2018). Effects of genetic distance on heterosis in a *Drosophila melanogaster* model system. *Genetica* 146, 345-359.
- Kang, J., Guan, R.C., Zhao, Y., and Chen, Y. (2020). Obesity-related loci in TMEM18, CDKAL1 and FAIM2 are associated with obesity and type 2 diabetes in Chinese Han patients. *BMC Med Genet* 21, 65.
- Kee, T.R., Espinoza Gonzalez, P., Wehinger, J.L., Bukhari, M.Z., Ermekbaeva, A., Sista, A., Kotsiviras, P., Liu, T., Kang, D.E., and Woo, J.A. (2021). Mitochondrial CHCHD2: Disease-Associated Mutations, Physiological Functions, and Current Animal Models. *Front Aging Neurosci* 13, 660843.
- Kim, H.K., Bhattarai, K.R., Junjappa, R.P., Ahn, J.H., Pagire, S.H., Yoo, H.J., Han, J., Lee, D., Kim, K.W., Kim, H.R., *et al.* (2020). TMBIM6/BI-1 contributes to cancer progression through assembly with mTORC2 and AKT activation. *Nat Commun* 11, 4012.
- Kiviluoto, S., Luyten, T., Schneider, L., Lisak, D., Rojas-Rivera, D., Welkenhuyzen, K., Missaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., Hetz, C., *et al.* (2013). Bax Inhibitor-1-mediated Ca²⁺ leak is decreased by cytosolic acidosis. *Cell Calcium* 54, 186-192.
- Komnig, D., Schulz, J.B., Reich, A., and Falkenburger, B.H. (2016). Mice lacking Faim2 show increased cell death in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *J Neurochem* 139, 848-857.
- Krebs, J., Agellon, L.B., and Michalak, M. (2015). Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 114-121.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Laughon, A., and Gesteland, R.F. (1984). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol* 4, 260-267.
- Levin, T.C., and Malik, H.S. (2017). Rapidly Evolving Toll-3/4 Genes Encode Male-Specific Toll-Like Receptors in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 34, 2307-2323.
- Li, Y., Kelder, B., and Kopchick, J.J. (2001). Identification, isolation, and cloning of growth hormone (GH)-inducible interscapular brown adipose complementary deoxyribonucleic acid from GH antagonist mice. *Endocrinology* 142, 2937-2945.
- Linford, N.J., Bilgir, C., Ro, J., and Pletcher, S.D. (2013). Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp*.
- Lisak, D., Schacht, T., Gawlitza, A., Albrecht, P., Aktas, O., Koop, B., Gliem, M., Hofstetter, H.H., Zanger, K., Bultynck, G., *et al.* (2016). BAX inhibitor-1 is a Ca(2+) channel critically important for immune cell function and survival. *Cell Death Differ* 23, 358-368.
- Lisak, D.A., Schacht, T., Enders, V., Habicht, J., Kiviluoto, S., Schneider, J., Henke, N., Bultynck, G., and Methner, A. (2015). The transmembrane Bax inhibitor motif (TMBIM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER CA(2+)-filling state. *Biochim Biophys Acta* 1853, 2104-2114.
- Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J.H., Walter, P., *et al.* (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell* 33, 679-691.
- Lu, Y., Su, F., Li, Q., Zhang, J., Li, Y., Tang, T., Hu, Q., and Yu, X.-Q. (2020). Pattern recognition receptors in *Drosophila* immune responses. *Developmental & Comparative Immunology* 102, 103468.
- M'Angale, P.G., and Staveley, B.E. (2016a). The inhibition of Cg2076, the GHITM homologue in neurons of *Drosophila Melanogaster* can be rescued by Buffy. *Journal of RNAi & Gene Silencing* 12.
- M'Angale, P.G., and Staveley, B.E. (2016b). Knockdown of the putative Lifeguard homologue CG3814 in neurons of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res* 15.
- Matesanz-Isabel, J., Arias-del-Val, J., Alvarez-Illera, P., Fonteriz, R.I., Montero, M., and Alvarez, J. (2016). Functional roles of MICU1 and MICU2 in mitochondrial Ca(2+) uptake. *Biochim Biophys Acta* 1858, 1110-1117.
- Meng, H., Yamashita, C., Shiba-Fukushima, K., Inoshita, T., Funayama, M., Sato, S., Hatta, T., Natsume, T., Umitsu, M., Takagi, J., *et al.* (2017). Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun* 8, 15500.
- Mikoshiba, K. (2015). Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv Biol Regul* 57, 217-227.
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A.M., Grifoni, D., and Bellosta, P. (2019). *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Front Genet* 10, 51.
- Moni, M.A., and Liò, P. (2014). Network-based analysis of comorbidities risk during an infection: SARS and HIV case studies. *BMC Bioinformatics* 15, 333.
- Mooren, F.C., and Kinne, R.K.H. (1998). Cellular calcium in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1406, 127-151.
- Muller, H.J. ARTIFICIAL TRANSMUTATION OF THE GENE.
- Nichols, C.D., Becnel, J., and Pandey, U.B. (2012). Methods to assay *Drosophila* behavior. *J Vis Exp*.
- Nielsen, J.A., Chambers, M.A., Romm, E., Lee, L.Y.-H., Berndt, J.A., and Hudson, L.D. (2011a). Mouse transmembrane BAX inhibitor Motif 3 (Tmbim3) encodes a

- 38 kDa transmembrane protein expressed in the central nervous system. *Molecular and Cellular Biochemistry* 357, 73-81.
- Nielsen, J.A., Chambers, M.A., Romm, E., Lee, L.Y., Berndt, J.A., and Hudson, L.D. (2011b). Mouse transmembrane BAX inhibitor motif 3 (Tmbim3) encodes a 38 kDa transmembrane protein expressed in the central nervous system. *Mol Cell Biochem* 357, 73-81.
- O'Connell, P.O., and Rosbash, M. (1984). Sequence, structure, and codon preference of the *Drosophila* ribosomal protein 49 gene. *Nucleic Acids Res* 12, 5495-5513.
- Oka, T., Sayano, T., Tamai, S., Yokota, S., Kato, H., Fujii, G., and Mihara, K. (2008). Identification of a novel protein MICS1 that is involved in maintenance of mitochondrial morphology and apoptotic release of cytochrome c. *Mol Biol Cell* 19, 2597-2608.
- Oltval, Z.N., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M.M., Rovira, II, Allen, M., Springer, D.A., *et al.* (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* 15, 1464-1472.
- Payne, R., Li, C., and Foskett, J.K. (2020). Variable Assembly of EMRE and MCU Creates Functional Channels with Distinct Gatekeeping Profiles. *iScience* 23, 101037.
- Philippaert, K., Roden, M., Lisak, D., Bueno, D., Jelenik, T., Radyushkin, K., Schacht, T., Mesuere, M., Wullner, V., Herrmann, A.K., *et al.* (2020). Bax inhibitor-1 deficiency leads to obesity by increasing Ca(2+)-dependent insulin secretion. *J Mol Med (Berl)* 98, 849-862.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407-6418.
- Riemensperger, T., Issa, A.R., Pech, U., Coulom, H., Nguyen, M.V., Cassar, M., Jacquet, M., Fiala, A., and Birman, S. (2013). A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Cell Rep* 5, 952-960.
- Rojas-Rivera, D., Armisen, R., Colombo, A., Martinez, G., Eguiguren, A.L., Diaz, A., Kiviluoto, S., Rodriguez, D., Patron, M., Rizzuto, R., *et al.* (2012). TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell Death Differ* 19, 1013-1026.
- Rojas-Rivera, D., and Hetz, C. (2015). TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death. *Oncogene* 34, 269-280.
- Rusnak, F., and Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80, 1483-1521.
- Saraiva, N., Prole, D.L., Carrara, G., Johnson, B.F., Taylor, C.W., Parsons, M., and Smith, G.L. (2013a). hGAAP promotes cell adhesion and migration via the stimulation of store-operated Ca²⁺ entry and calpain 2. *J Cell Biol* 202, 699-713.
- Saraiva, N., Prole, D.L., Carrara, G., Maluquer de Motes, C., Johnson, B.F., Byrne, B., Taylor, C.W., and Smith, G.L. (2013b). Human and viral Golgi anti-apoptotic proteins (GAAPs) oligomerize via different mechanisms and monomeric GAAP inhibits apoptosis and modulates calcium. *J Biol Chem* 288, 13057-13067.
- Schweitzer, B., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Neural membrane protein 35/Lifeguard is localized at postsynaptic sites and in dendrites. *Molecular Brain Research* 107, 47-56.

- Seitaj, B., Maull, F., Zhang, L., Wullner, V., Wolf, C., Schippers, P., La Rovere, R., Distler, U., Tenzer, S., Parys, J.B., *et al.* (2020). Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif Containing Protein 5 (TMBIM5) Sustains Mitochondrial Structure, Shape, and Function by Impacting the Mitochondrial Protein Synthesis Machinery. *Cells* 9.
- Sequeira, A., Mamdani, F., Ernst, C., Vawter, M.P., Bunney, W.E., Lebel, V., Rehal, S., Klempan, T., Gratton, A., Benkelfat, C., *et al.* (2009). Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS One* 4, e6585.
- Seto, M., and Osada, H. (1991). [bcl-2 gene in B cell lymphoma]. *Rinsho Ketsueki* 32, 644-649.
- Sevrioukov, E.A., Burr, J., Huang, E.W., Assi, H.H., Monserrate, J.P., Purves, D.C., Wu, J.N., Song, E.J., and Brachmann, C.B. (2007). *Drosophila* Bcl-2 proteins participate in stress-induced apoptosis, but are not required for normal development. *Genesis* 45, 184-193.
- Shih, J., Hodge, R., and Andrade-Navarro, M.A. (2015). Comparison of inter- and intraspecies variation in humans and fruit flies. *Genom Data* 3, 49-54.
- Shukla, S., Fujita, K., Xiao, Q., Liao, Z., Garfield, S., and Srinivasula, S.M. (2011). A shear stress responsive gene product PP1201 protects against Fas-mediated apoptosis by reducing Fas expression on the cell surface. *Apoptosis* 16, 162-173.
- Somia, N.V., Schmitt, M.J., Vetter, D.E., Van Antwerp, D., Heinemann, S.F., and Verma, I.M. (1999). LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12667-12672.
- Stormo, G.D. (2009). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 3*, Unit 3 1 3 1 1-7.
- Suraweera, C.D., Banjara, S., Hinds, M.G., and Kvensakul, M. (2022). Metazoans and Intrinsic Apoptosis: An Evolutionary Analysis of the Bcl-2 Family. *Int J Mol Sci* 23.
- Szydłowska, K., and Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47, 122-129.
- Tauber, S.C., Harms, K., Falkenburger, B., Weis, J., Sellhaus, B., Nau, R., Schulz, J.B., and Reich, A. (2014). Modulation of hippocampal neuroplasticity by Fas/CD95 regulatory protein 2 (Faim2) in the course of bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 73, 2-13.
- Trist, B.G., Hare, D.J., and Double, K.L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell* 18, e13031.
- Vais, H., Mallilankaraman, K., Mak, D.D., Hoff, H., Payne, R., Tanis, J.E., and 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.
- Vaure, C., and Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* 5, 316.
- Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2017). Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem* 86, 685-714.
- Wree, A., Inzaugarat, M.E., and Feldstein, A.E. (2018). Transmembrane BAX Inhibitor motif-containing 1, a novel anti-inflammatory approach for nonalcoholic steatohepatitis treatment. *Hepatology* 67, 438-441.
- WY, C., DC, W., TE, W., and JJ, K. - Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of. D - 7505876, - 5061-5065.
- Xu, Q., and Reed, J.C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1, 337-346.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.

- Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., and Bugianesi, E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention.
- Zhang, L., Buhr, S., Voigt, A., and Methner, A. (2021). The Evolutionary Conserved Transmembrane BAX Inhibitor Motif (TMBIM) Containing Protein Family Members 5 and 6 Are Essential for the Development and Survival of *Drosophila melanogaster*. *Front Cell Dev Biol* 9, 666484.
- Zhao, G.N., Zhang, P., Gong, J., Zhang, X.J., Wang, P.X., Yin, M., Jiang, Z., Shen, L.J., Ji, Y.X., Tong, J., *et al.* (2017). Tmbim1 is a multivesicular body regulator that protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice and monkeys by targeting the lysosomal degradation of Tlr4. *Nat Med* 23, 742-752.
- Zou, Z., Tao, T., Li, H., and Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci* 10, 31.

10. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Sebastian Buhr
Geburtsdatum	21. Juli 1995
Geburtsort	Seligenstadt

Bildungsweg

Abitur

Juni 2014	Rudolf-Steiner-Schule Dietzenbach
-----------	-----------------------------------

Studium der Humanmedizin

WS 14/15 – SS 2021	Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Herbst 2016	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
Frühjahr 2020	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2)
Frühjahr 2021	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1)

Promotion

April 2024	Über den Effekt des Knockdowns der TMBIM-Proteinfamilie in der Drosophila Melanogaster
------------	----------------------------------------------------------------------------------------

Praktika

Famulaturen (30tägig)

März 2017	Ketteler Krankenhaus OF Kardiologie u. Pneumologie KKM Abt. Orthopädie
September 2017	Praxis für Allgemeinmedizin [REDACTED]
März 2018	KFH – Gesundheitszentrum
September 2019	Rheumatologie – Nephrologie

Praktisches Jahr

1. Tertial	
18.05.2020 – 12.07.2020	Universitätsmedizin Mainz, Anästhesie/Neurochirurgie
13.07.2020 – 06.09.2020	Spital Zofingen, Department Operative Medizin
2. Tertial	
07.09.2020 – 27.12.2020	Klinikum Köln-Merheim, Abteilung Neurologie
3. Tertial	
28.12.2020 – 18.04.2021	Klinikum St. Marienwörth, Bad Kreuznach Abteilung Innere

Berufliche Tätigkeit

Seit Oktober 2021	Arzt in Weiterbildung Neurologie Klinikum Osnabrück
-------------------	--------------------------------------------------------

