

# **Fusion, Fission und Nucleoids in Megamitochondrien**

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

vorgelegt von

**Christian Kukat**

aus Landshut

Würzburg, 2008



# **Fusion, Fission und Nucleoids in Megamitochondrien**

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

vorgelegt von

**Christian Kukat**

aus Landshut

Würzburg, 2008

**Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Seibel**

**Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar**

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Peter Seibel

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Für Alex  
und meine Eltern!**

Die vorliegende Arbeit entstand von Juni 2004 bis März 2008 am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg sowie an der Professur für Molekulare Zelltherapie des Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrums der Universität Leipzig.

*Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlußpunkt,  
sondern mit einem Fragezeichen.*

*Hermann Hesse (1877-1962)*

# Inhaltsverzeichnis

1.1	Zusammenfassung.....	1
1.2	Summary .....	3
<b>2</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>5</b>
2.1	Struktur/Morphologie der Mitochondrien.....	5
2.2	Mitochondriale Energiegewinnung – die Atmungskette.....	6
2.3	Das mitochondriale Genom.....	9
2.4	Mitochondriale Nucleoids .....	10
2.5	Mitochondriale Transkription .....	11
2.6	Replikation mitochondrialer DNA .....	13
2.7	Zellen ohne mitochondriale DNA – $\rho$ 0-Zellen .....	14
2.8	Mitochondriopathien .....	15
2.9	Dynamik der Mitochondrien .....	16
2.9.1	Fusion von Mitochondrien .....	17
2.9.2	Fission von Mitochondrien.....	20
2.9.3	Biologische Signifikanz mitochondrialer Fusion und Fission .....	23
2.10	Zielsetzung .....	26
<b>3</b>	<b><i>Material</i></b> .....	<b>27</b>
3.1	Biologisches Material.....	27
3.1.1	Zelllinien .....	27
3.1.2	Zellkulturmedien .....	28
3.1.3	Antikörper .....	29
3.1.4	Bakterien .....	29
3.2	Molekularbiologisches Material.....	30
3.2.1	Plasmidvektoren.....	30
3.2.2	Enzyme.....	41
3.2.3	Oligodesoxynukleotide.....	41
3.2.4	DNA-Größenstandards.....	42
3.3	Chemikalien .....	42
3.4	Verbrauchsmaterial .....	43
3.5	Kits .....	44
3.6	Software, Programme, Datenbanken.....	44

3.7	Laborgeräte.....	45
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>47</b>
4.1	Mikrobiologische Methoden .....	47
4.1.1	Übernachtflüssigkultur von Bakterien .....	47
4.1.2	Bakterienkulturen auf Agarplatten .....	47
4.1.3	Herstellung chemisch transformationskompetenter Bakterien .....	47
4.1.4	Transformation kompetenter Bakterien .....	48
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	49
4.2.1	Isolierung und Reinigung von DNA .....	49
4.2.1.1	Reinigung von DNA durch Natriumacetat-/Ethanol-fällung.....	49
4.2.1.2	Reinigung von DNA durch Isopropanolfällung.....	49
4.2.1.3	Reinigung von DNA durch präparative Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit .....	50
4.2.1.4	Reinigung von DNA mit dem Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System.....	50
4.2.1.5	Gewinnung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien.....	51
	E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I.....	51
	QIAprep®-Lösungen.....	51
4.2.2	Isolierung und Reinigung von RNA.....	52
4.2.2.1	Isolierung von RNA aus Kulturzellen mit peqGOLD TriFast™.....	52
4.2.3	Enzymatische Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion .....	53
4.2.3.1	Enzymatische Amplifizierung mit der Taq- bzw. Pfu-Polymerase.....	53
	Colonyscreening-PCR.....	54
4.2.3.2	Enzymatische Amplifizierung mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES).....	55
4.2.4	RT-PCR.....	55
4.2.4.1	RT-PCR mit SuperScript II-Reverse Transkriptase .....	56
4.2.4.2	RT-PCR mit SuperScript III-Reverse Transkriptase.....	56
4.2.5	Quantifizierung von DNA.....	57
4.2.5.1	Photometrische Quantifizierung von DNA .....	57
4.2.5.2	Quantifizierung von DNA durch optischen Vergleich der Bandenintensität auf einem Agarose-Gel.....	58
4.2.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	58
4.2.6.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	58

4.2.7	DNA- und RNA-Modifizierung durch Enzymbehandlung.....	60
4.2.7.1	Restriktionsendonuklease-Behandlung von DNA-Fragmenten.....	60
4.2.7.2	Phosphorylierung von DNA.....	60
4.2.7.3	Dephosphorylierung von DNA.....	61
4.2.7.4	Auffüllen bzw. Abspalten von DNA-Einzelstrang-Überhängen mit dem Klenow-Fragment.....	61
4.2.7.5	Auffüllen bzw. Abspalten von DNA-Einzelstrang-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase.....	61
4.2.7.6	Verknüpfung von DNA.....	62
4.2.7.7	DNase-Behandlung von RNA.....	62
4.2.8	Klonierung.....	63
4.2.8.1	Vektoren zur Klonierung.....	63
4.2.8.2	Klonierung mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits.....	63
4.2.9	DNA-Sequenzierung.....	64
4.3	Zellkultur.....	65
4.3.1	Kultivierung von Zellen.....	65
4.3.2	Ablösen von Zellen.....	65
4.3.3	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Zellzähl-Gerätes Vi-CELL™ Series Cell Viability Analyzers.....	66
4.3.4	Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	66
4.3.4.1	Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™.....	67
4.3.4.2	Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™Pro.....	67
4.3.4.3	Transfektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE HD®.....	68
4.3.5	Selektion durch Antibiotika.....	68
4.3.6	Vereinzelung von Klonen mit Klonierungszyklindern.....	69
4.3.7	Färbung von Mitochondrien mit MitoTracker® Green FM, MitoTracker® Red CMXRos und MitoTracker® Deep Red 633.....	69
4.3.8	Färbung der Kern-DNA mit Hoechst 33342.....	70
4.3.9	Färbung der mitochondrialen DNA mit PicoGreen.....	70
4.3.10	Herstellung des Milchsäure-Mediums.....	70
4.3.11	Behandlung von Kulturzellen mit Inhibitoren.....	70
4.4	Mikroskopische Methoden.....	71
4.4.1	Herstellung von Präparaten für die Immunfluoreszenz.....	71
4.4.1.1	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen mit Methanol und Aceton.....	71

4.4.2	Immunzytochemie .....	72
4.4.2.1	Immunlokalisation an Kulturzellen .....	72
4.4.3	Fluoreszenz–Mikroskopie .....	73
4.4.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....	73
4.4.5	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von Zellen .....	74
4.5	Statistische Methoden .....	75
<b>5</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>76</b>
5.1	Detektion mitochondrialer Fusion mithilfe von photoaktivierbarem GFP .....	76
5.2	Elektronenmikroskopische Analyse der Rückbildung von Megamitochondrien in $\rho^0$ -Zellen .....	78
5.3	Exogene Induktion von Megamitochondrien.....	81
5.4	Analyse der Bildung und Rückbildung von Megamitochondrien.....	83
5.4.1	Mikroskopische Analyse der Bildung von Megamitochondrien.....	84
5.4.1.1	Konfokalmikroskopische Analyse .....	84
5.4.1.2	Elektronenmikroskopische Analyse.....	86
5.4.2	Mikroskopische Analyse der Rückbildung von Megamitochondrien.....	88
5.4.2.1	Konfokalmikroskopische Analyse .....	88
5.4.2.2	Elektronenmikroskopische Analyse.....	89
5.5	Induktion von Megamitochondrien mit Valinomycin.....	92
5.6	Einfluss von Inhibitoren auf die Bildung von La-Medium-induzierten Megamitochondrien .....	94
5.7	Endogene Lokalisation mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine mittels Immunzytochemie.....	97
5.7.1	Endogene Lokalisierung des Fusionsproteins Mitofusin 2 (MFN2).....	98
5.7.2	Endogene Lokalisierung des Fissionsproteins hFis1 .....	99
5.7.3	Endogene Lokalisierung des Fissionsproteins Drp1/DNM1L .....	101
5.8	Überexpression und Lokalisierung mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine ... ..	103
5.8.1	Überexpression von Mitofusin 1 (MFN1).....	103
5.8.2	Überexpression von Mitofusin 2 (MFN2).....	107
5.8.3	Überexpression von Drp1/DNM1L.....	111
5.8.3.1	Drp1/DNM1L, Isoform 1 .....	111
5.8.3.2	Drp1/DNM1L, Isoform 2 .....	113
5.8.3.3	Drp1/DNM1L, Isoform 3 .....	115

5.8.3.4	Detektion von Drp1/DNM1L an mitochondrialen Spaltstellen .....	116
5.8.4	Überexpression von hFis1 .....	118
5.8.4.1	Konfokalmikroskopische Analyse .....	118
5.8.4.2	Elektronenmikroskopische Analyse .....	122
5.8.4.3	Gleichzeitige Überexpression von hFis1 und Drp1/DNM1L .....	123
5.9	Dynamik mitochondrialer Nucleoids .....	125
5.9.1	Visualisierung mitochondrialer Nucleoids mit PicoGreen .....	125
5.9.1.1	Lokalisierung und Dynamik PicoGreen-gefärbter Nucleoids .....	125
5.9.1.2	PicoGreen-gefärbte Nucleoids in Megamitochondrien .....	127
5.9.2	Visualisierung mitochondrialer Nucleoids durch TFAM .....	128
5.9.2.1	Lokalisierung und Dynamik TFAM-markierter Nucleoids .....	128
5.9.2.2	Kolokalisierung von TFAM und PicoGreen .....	130
5.9.2.3	Dynamik von TFAM in Megamitochondrien .....	131
5.9.2.4	Lokalisierung von TFAM in $\rho^0$ -Zellen .....	133
5.9.3	Visualisierung mitochondrialer Nucleoids durch SSBP1 .....	135
5.9.3.1	Lokalisierung und Dynamik SSBP1-markierter Nucleoids .....	135
5.9.3.2	Kolokalisierung von SSBP1 und PicoGreen .....	136
5.9.3.3	Dynamik von SSBP1 in Megamitochondrien .....	137
5.9.3.4	Lokalisierung von SSBP1 in $\rho^0$ -Zellen .....	139
5.9.4	Visualisierung einer mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease... .....	142
5.9.4.1	Lokalisierung der mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease EcoRI in $\rho^+$ -Zellen .....	142
5.9.4.2	Lokalisierung der mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease EcoRI in $\rho^0$ -Zellen .....	143
<b>6</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>144</b>
6.1	Detektion mitochondrialer Fusion mithilfe von photoaktivierbarem GFP .....	144
6.2	Elektronenmikroskopische Analyse der Rückbildung von Megamitochondrien in $\rho^0$ - Zellen .....	144
6.3	Exogene Induktion von Megamitochondrien .....	146
6.4	Analyse der Bildung und Rückbildung von Megamitochondrien .....	147
6.5	Induktion von Megamitochondrien mit Valinomycin .....	149
6.6	Einfluss von Inhibitoren auf die Bildung von La-Medium-induzierten Megamitochondrien .....	150

6.7	Endogene Lokalisation mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine mittels Immunzytochemie.....	151
6.8	Überexpression und Lokalisierung mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine... ..	153
6.9	Dynamik mitochondrialer Nucleoids .....	158
6.9.1	Visualisierung der Dynamik mitochondrialer Nucleoids mit PicoGreen.....	158
6.9.2	Dynamik mitochondrialer Nucleoids durch Visualisierung von TFAM.....	159
6.9.3	Dynamik mitochondrialer Nucleoids durch Visualisierung von SSBP1 .....	162
6.9.4	Visualisierung einer mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease... ..	163
6.10	Ausblick .....	163
<b>7</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>165</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>180</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>184</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>185</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>187</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>188</b>

### 1.1 Zusammenfassung

In  $\rho^0$ -Zellen, die über keine mitochondriale DNA (mtDNA) mehr verfügen, entstehen während der Kultivierung Megamitochondrien durch endogene Milchsäure-Azidifizierung des Kulturmediums. Diese Riesenorganellen bilden sich dabei durch mitochondriale Fusionsereignisse und/oder eine Hemmung der Fission. In Zellen mit mitochondrialem Genom ist es ebenso möglich Megamitochondrien durch artifizielles Ansäuern des Kulturmediums zu induzieren. Diese Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit als Werkzeug verwendet, um Einblicke in mitochondriale Fusions- und Fissionsereignisse zu erlangen. Zunächst wurde die Fusion mitochondrialer Matrixkompartimente mithilfe der photoaktivierbaren Variante des grünen fluoreszierenden Proteins (PA-GFP) untersucht. Hiermit konnte gezeigt werden, dass das Vermischen der Matrixkompartimente nach der Fusion ein sehr schneller Prozess ist. Die Analyse der Bildung und Rückbildung der Megamitochondrien erfolgte sowohl konfokal- als auch elektronenmikroskopisch, wobei sich zeigte, dass die Matrix der Riesenorganellen kaum mehr Cristae beinhaltet. Die Rückbildung der Megamitochondrien zum normalen Netzwerk ist ein sehr schneller Prozess, bei dem schon nach 15 min keine vergrößerten Organellen mehr sichtbar sind. Dies indiziert, dass der Rückbildungsprozess wahrscheinlich durch Veränderungen von verfügbaren Proteinen durchgeführt wird, ohne die Induzierung von Proteinneusynthese. Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene zeigten, dass es während der Rückbildung zur Formation von drei unterschiedlichen Mitochondrientypen kam, die sich in ihrer Morphologie stark unterscheiden. Weiterhin wurden vergleichende Studien zur Bildung der Megamitochondrien durchgeführt, bei denen der Einfluss von Atmungsketten-Inhibitoren auf die Bildung von Milchsäure-induzierten Riesenorganellen untersucht wurde. Die Resultate deuten für die Megamitochondrieninduktion auf eine Abhängigkeit auf ein intaktes Membranpotential hin. Immunzytochemisch wurde die endogene Lokalisation der mitochondrialen Fusions- und Fissionsproteine Mitofusin 2, hFis1 und Drp1/DNM1L am Modellsystem der Megamitochondrieninduktion aufgeklärt. Es zeigte sich, dass diese Proteine punktförmig an der äußeren Membran der Riesenorganellen lokalisieren. Um das Modellsystem an lebenden Zellen zu nutzen, wurden Vektoren konstruiert, die fluoreszenzmarkierte Proteine der mitochondrialen Fusions- und Fissionsmaschinerie exprimierten. Hiermit konnte einerseits die Lokalisation von Mitofusin 1, Mitofusin 2, hFis1 und Drp1/DNM1L in lebenden Zellen nach Induktion der Megamitochondrien analysiert werden und andererseits der Einfluss der

Überexpression dieser Proteine auf die Bildung der Riesenorganellen dokumentiert werden. Die Ergebnisse machten deutlich, dass nur die Überexpression von hFis1 die Bildung der Megamitochondrien verhinderte.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Visualisierung und Dynamik mitochondrialer Nucleoids in lebenden Zellen. Nucleoids sind Protein-DNA-Komplexe, in denen mitochondriale Genome organisiert sind. Mit dem Farbstoff PicoGreen gelang es mtDNA in lebenden Zellen zu färben und Dynamikstudien der punktförmigen Strukturen mikroskopisch festzuhalten. Während sich mtDNA im mitochondrialen Netzwerk nur marginal aufgrund stattfindender Fusions- und Fissionsereignisse bewegte kam es in den Milchsäure-induzierten Megamitochondrien zu einer extensiven und extrem schnellen Bewegung von mitochondrialer DNA.

In anschließenden Versuchen wurde der mitochondriale Transkriptions- und Verpackungsfaktor TFAM als fluoreszentes Fusionsprotein in Zellen transfiziert und Kollokalisationsstudien zeigten, dass das Fusionsprotein mit mtDNA kollokalisiert. In den Riesenorganellen präsentierten punktförmige TFAM-gefärbte Nucleoids ein sehr dynamisches Verhalten mit schneller Bewegung. In  $\rho^0$ -Zellen ohne mitochondriale DNA war die TFAM-Fluoreszenz hingegen gleichmäßig verteilt. Ein weiterer Nucleiodbestandteil ist das mitochondriale DNA-Einzelstrangbindeprotein SSBP1, welches in Megamitochondrien ebenso ein sehr dynamisches Verhalten aufwies.

Eine mitochondrial-zielgesteuerte und EGFP-markierte Restriktionsendonuklease wies ebenfalls das typische, punktförmige Nucleoidmuster im mitochondrialen Netzwerk auf, was auf eine Interaktion mit der mtDNA schließen lässt. In  $\rho^0$ -Zellen ohne mtDNA kam es jedoch zur gleichmäßigen Verteilung des Konstruktes in den Mitochondrien.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit sowohl Einblicke in die Biologie der Megamitochondrien gewonnen, als auch Erkenntnisse über die Dynamik mitochondrialer Protein-DNA-Komplexe, wobei der Schwerpunkt hierbei auf einer Analyse mit Hilfe optischer Methoden lag.

## 1.2 Summary

During the cultivation of  $\rho^0$  cells, which are devoid of mitochondrial DNA (mtDNA), excessive endogenous lactic acid production during the fermentation process drives the development of megamitochondria. These giant organelles are formed by mitochondrial fusion events and/or the repression of fission. Megamitochondria formation is inducible in cells containing mtDNA by an artificial acidification of the culture medium by lactic acid. This work exploits these findings in order to investigate mitochondrial fusion and fission events.

Fusion of mitochondrial matrix compartments was examined with the aid of the photoactivatable variant of the green fluorescent protein (PA-GFP), showing that the mixing of matrix components after fusion is an extremely fast process. Formation and reversion of megamitochondria was analyzed by confocal and electron microscopy, revealing that the matrix of giant organelles contains only rudiment structures of cristae organization. Reversion of the megamitochondria to a normal network displays fast kinetic characteristics. This indicates that the restoration process most likely is performed by alterations of novel protein expression. Additional assessment on an ultrastructural level displayed the occurrence of three different types of mitochondria during the reversion, which strongly differed in their morphology. To gain insights into the mechanism of megamitochondria formation and reversion comparative studies were performed with various inhibitors of the respiratory chain. The results indicated a dependence on an intact membrane potential for the induction of megamitochondria.

Localization of the endogenous mitochondrial fusion and fission proteins mitofusin 1, hFis1 and Drp1/DNM1L were analyzed in megamitochondria by immunocytochemistry, demonstrating that these proteins localize foci-like to the outer membrane of the giant organelles. Fluorescently tagged proteins of the mitochondrial fusion and fission apparatus (mitofusin 1, mitofusin 2, hFis1 and Drp1/DNM1L) were used in localization and overexpression experiments in living cells by transient transfection. The results revealed that only the overexpression of hFis1 inhibited the formation of megamitochondria.

Another main focus of this thesis was the visualization and dynamics of mitochondrial nucleoids in living cells. Nucleoids are protein-DNA complexes representing organizational units for the mitochondrial genomes. The dye PicoGreen was used to stain mtDNA in living

cells and the dynamics of nucleoid movement was analyzed by fluorescent and confocal microscopy. While mitochondrial DNA showed only marginal movements due to ongoing fusion and fission events in a mitochondrial network, an extensive and extremely fast movement in the lactic acid-induced megamitochondria could be observed.

In subsequent experiments the mitochondrial transcription and packaging factor TFAM was fluorescently tagged and transfected into cells. Colocalization studies showed that this fusion protein colocalizes with mitochondrial DNA. In the giant organelles foci-like TFAM-stained nucleoids displayed a very dynamic performance with fast movement. However, in  $\rho^0$  cells without mitochondrial DNA the TFAM-fluorescence was uniformly distributed.

An additional nucleoid constituent and marker for mitochondrial DNA is the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein SSBP1, and it could be shown that SSBP1 also exhibits very dynamic characteristics in megamitochondria.

A mitochondrial-targeted and EGFP-tagged restriction endonuclease also exhibited the typical, punctual nucleoid pattern in the mitochondrial network, suggesting an mtDNA interaction. In  $\rho^0$  cells, however, the construct was uniformly distributed in the mitochondrial matrix.

In summary, in the present thesis optical and mechanistic insights into the biology of megamitochondria were obtained. This approach was further exploited to study the dynamics of mitochondrial protein-DNA complexes with optical methods.

## 2 Einleitung

Bis zurück in die 1840er Jahre gehen die ersten Aufzeichnungen über intrazelluläre Organismen, die eventuell schon die Mitochondrien beschrieben (Ernster und Schatz, 1981). 1890 jedoch war es Altmann, der als erster über das allgegenwärtige Auftreten dieser Organellen berichtete und sie „Bioblasten“ nannte (Altmann, 1890). Die Bezeichnung „Mitochondrien“ wurde 1898 von Benda eingeführt und setzt sich aus den griechischen Ausdrücken „*mitos*“ (Faden) und „*chondros*“ (Korn) zusammen, was sich auf das Erscheinungsbild dieser Strukturen während der Spermatogenese bezieht (Benda, 1898).

Inzwischen ist gemeinhin bekannt, dass Mitochondrien essentielle Organellen eukaryontischer Zellen sind, deren Hauptaufgabe die Erzeugung von Energie in Form von ATP ist, weshalb sie oftmals „Kraftwerke der Zellen“ genannt werden. Die Zellen sind im Energiestoffwechsel auf die Mitochondrien angewiesen, denn viele grundlegende Reaktionen laufen darin ab. Zum Beispiel ist der Citratzyklus das Tor zum aeroben Stoffwechsel vieler Moleküle. Hier werden aus den Produkten der Glykolyse – einem zytoplasmatischen Stoffwechselweg – Reduktionsäquivalente gebildet. In der  $\beta$ -Oxidation werden Fettsäuren in der mitochondrialen Matrix zu Acetyl-CoA gespalten und bei der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), bei der ein transmembraner elektrochemischer Protonengradient gebildet wird, werden Reduktionsäquivalente (NADH und FADH<sub>2</sub>) aus der Glykolyse, dem Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation dazu genutzt, um ATP – die Energiequelle von Zellen – zu synthetisieren.

### 2.1 Struktur/Morphologie der Mitochondrien

Mitochondrien sind mehrere Mikrometer lang, etwa 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und von einer Doppelmembran umgeben. Diese Erkenntnis basiert auf frühen Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie (Kölliker, 1888). Erst mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und Dünnschnitttechnik wurden detaillierte Studien der mitochondrialen Ultrastruktur möglich (Palade, 1952; Sjöstrand 1953). Zum Zytoplasma hin werden diese Organellen von einer ca. 7 nm dicken äußeren Membran begrenzt, die aus Phospholipiden und Cholesterin aufgebaut ist. Durch das Vorhandensein von Porinen ist sie für kleinere Stoffe bis 6 kD ungehindert

permeabel. Eine zweite, innere Membran ist von der äußeren durch den 8 nm breiten Intermembranraum getrennt und zeichnet sich durch lamellenartige Einstülpungen – den Cristae – aus (Palade, 1952), wodurch die innere Membran über eine ausgeprägte Oberflächenvergrößerung verfügt. Anstelle des Lipids Cholesterin enthält die innere Mitochondrienmembran das in Membranen tierischer Zellen sonst nicht vorkommende Cardiolipin und ist aufgrund fehlender Poren nahezu impermeabel. Außerdem sind in die innere Membran die Proteine der oxidativen Phosphorylierung integriert.

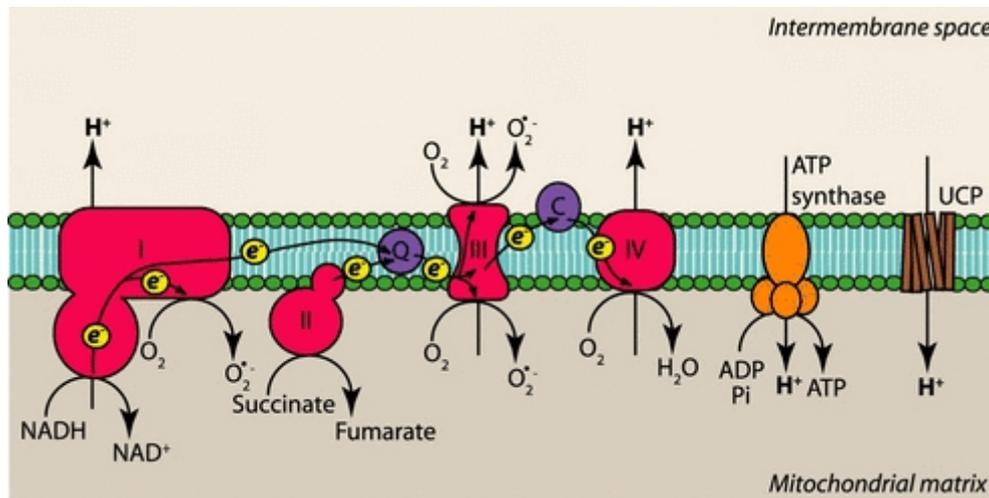
Durch die Doppelmembranen verfügen Mitochondrien über vier Kompartimente: die Matrix umgeben von der inneren Membran, die äußere Membran und der Intermembranraum zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran.

Das Vorhandensein der Doppelmembranen ist auf den Ursprung der Mitochondrien zurückzuführen, der mit der seriellen Endosymbiontentheorie erklärt werden kann (Margulis, 1975), welche von einem monophyletischen Ereignis ausgeht, bei dem ein prokaryontischer respirations-kompetenter Organismus in eine symbiontische Beziehung zu einer anderen Zelle, möglicherweise einem anaeroben Archaeobakterium, trat (Gray und Doolittle, 1982). Seit diesem Ereignis erfolgte sowohl eine Reduktion von mitochondrialen Genen, als auch ein Transfer von Genen in den eukaryontischen Kern (Weeden, 1981), so dass sich die symbiontische Beziehung bis dato zu einer gegenseitigen Abhängigkeit entwickelt hat (Gray, 1993; Gray *et al.*, 1999).

## **2.2 Mitochondriale Energiegewinnung – die Atmungskette**

Die Atmungskette – das System der oxidativen Phosphorylierung – besteht aus fünf Enzymkomplexen (Komplex I – V), welche aus etwa 90 Untereinheiten bestehen (Abb. 2-1). Die Komplexe I – IV bilden die Elektronentransportkette, in der die Elektronen der Elektronentransporter NADH und FADH<sub>2</sub> genutzt werden, um einen Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran zu generieren. Dieser wird vom fünften Enzymkomplex, der ATP-Synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase) genutzt, um ADP und anorganisches Phosphat P<sub>i</sub> in ATP zu synthetisieren.

Der größte der Enzymkomplexe der Atmungskette, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), besteht im Rinderherz aus 45 Untereinheiten, von denen sieben mitochondrial codiert sind. Zudem besitzt das Enzym mehrere prosthetische Gruppen, ein Flavonmononukleotid (FMN) und acht Eisen-Schwefel-Cluster (Carroll *et al.*, 2006).



**Abb. 2-1:** Schematische Darstellung der fünf Proteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette (Trifunovic und Larsson, 2008).

Durch die Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  im Intermembranraum werden zwei Elektronen auf den FMN-Rest übertragen, um dann über eine Reihe von Eisen-Schwefel-Clustern zu der Matrixseite der inneren Membran transportiert zu werden, um dort Ubichinon zu Ubichinol zu reduzieren. Pro NADH werden vier Protonen über die innere Membran in den Intermembranraum gepumpt.

Der einzige ausschließlich nukleär codierte Komplex der Atmungskette, die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), ist ein Enzym des Citratzyklus und katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei Elektronen auf die Elektronentransportkette übergeben werden, ohne jedoch Protonen über die Membran zu pumpen. Der Komplex II besteht aus einer katalytischen Untereinheit, der Succinat-Dehydrogenase und zwei Membran-Untereinheiten, die den Komplex in der inneren Membran verankern. Die Elektronen des Succinat werden auf FAD übertragen, welches an die Succinat-Dehydrogenase gebunden ist, wobei es zu  $\text{FADH}_2$  reduziert wird. Weiterhin werden die Elektronen über eine Reihe von Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon übertragen, wodurch dieses zu Ubichinol reduziert wird (Lancaster und Kröger, 2000).

Die Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III) katalysiert den Transfer von Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c. Der Komplex besteht aus einem Homodimer,

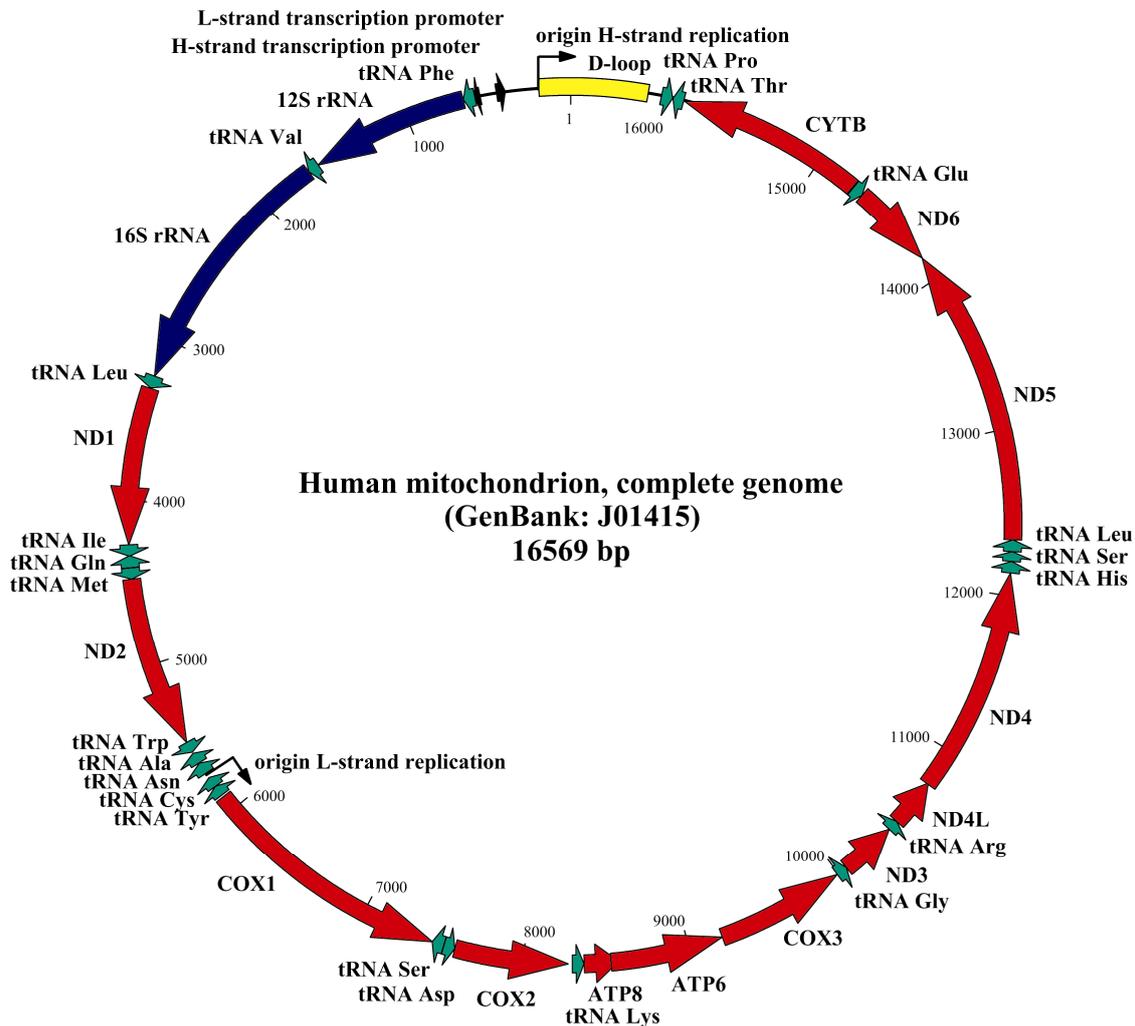
wobei jedes Monomer aus elf Untereinheiten besteht, von denen nur eine mitochondrial codiert ist. Ubichinol, ein 2-Elektronentransporter, gibt seine beiden Elektronen nacheinander an den Komplex III ab, wobei zwei Protonen gepumpt werden. Eines der Elektronen wird auf Cytochrom c übertragen, währenddessen das zweite Elektron zurück zur Matrixseite auf Cytochrom b transportiert wird. Cytochrom b kann zwei Elektronen aufnehmen, welche auf Ubichinon auf der Matrixseite abgegeben werden, woraus Ubichinol resultiert. Bei der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol durch Cytochrom b werden zwei Protonen in den Matrixraum transportiert. Der Mechanismus der Kopplung von Elektronentransfer und Protonentransport im Komplex III wird auch als Q-Zyklus bezeichnet. (Darrouzet *et al.*, 2001).

Im finalen Schritt der Elektronentransportkette übergibt Cytochrom c Elektronen an der zytoplasmatischen Seite der inneren Mitochondrienmembran auf die Cytochrom c-Oxidase, den Komplex IV. Dieser Komplex besteht aus 13 Untereinheiten, von denen drei von den Mitochondrien codiert werden und er katalysiert den Transfer von Elektronen des reduzierten Cytochrom c-Pools auf molekularen Sauerstoff, wobei dieser zu Wasser reduziert wird. In diesem Schritt werden vier Elektronen von Komplex IV auf zwei Moleküle Sauerstoff übertragen, was dadurch erreicht wird, dass die Elektronen an Häm- und Kupferzentren gespeichert werden, bevor sie erst in der Gegenwart von zwei Sauerstoff-Molekülen und vier Protonen abgegeben werden. Dies ist nötig, um die Bildung von Sauerstoffradikalen zu unterbinden. Zu der Reaktion werden vier Protonen über die innere Membran gepumpt (Schultz und Chan, 2001).

Die Aufgabe der Elektronentransportkette ist es, Protonen von der Matrixseite in den Intermembranraum zu transportieren. Der daraus resultierende elektrochemische Gradient wird von der fünften Komponente der Atmungskette – der ATP-Synthase ( $F_0F_1$ -ATPase) – genutzt um die Reaktion  $ADP + P_i \rightarrow ATP$  zu katalysieren. Der Komplex V besteht aus einem membrangebundenen Unterkomplex ( $F_0$ ) und einem Komplex ( $F_1$ ), welcher in den Matrixraum reicht. Durch das Eintreten von Protonen aus dem Intermembranraum in den  $F_0$ -Komplex kommt es zu einer Rotation der Untereinheiten im Enzym, deren Energie dazu genutzt wird die ATP-Synthese im  $F_1$ -Komplex zu bewerkstelligen (Schultz und Chan, 2001).

Neben der Energieproduktion besitzen Mitochondrien noch eine Vielzahl anderer Funktionen; hierzu zählen die Synthese von Aminosäuren, Pyrimidinen, Lipiden, Häm, Hormonen und anderer Metabolite. Zusätzlich spielen sie eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung des

zellulären Redoxpotentials, der Ionenregulation (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase), der Thermogenese sowie bei der Kontrolle der Apoptose.



**Abb. 2-2:** Karte des menschlichen mitochondrialen Genoms.

ATP6:	ATPase Untereinheit 6	ND1:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1
ATP8:	ATPase Untereinheit 8	ND2:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 2
COX1:	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 1	ND3:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 3
COX2:	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 2	ND4:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4
COX3:	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 3	ND4L:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4L
CYTB:	Cytochrom b	ND5:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5
		ND6:	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 6

## 2.3 Das mitochondriale Genom

Mitochondrien verfügen über ein eigenes, doppelsträngiges und zirkuläres Genom (mitochondriale DNA, mtDNA), welches in der Matrix der Organellen vorliegt. Die Entdeckung geht auf Elektronenmikroskopieaufnahmen zurück, die in Mitochondrien von

Hühnerembryonenzellen fadenähnliche Strukturen zeigten, welche mittels DNase verdaut werden konnten (Nass und Nass, 1963). Mit biochemischen Techniken wurde kurz darauf mitochondriale DNA in Hefe entdeckt (Schatz *et al.*, 1964).

In *Homo sapiens* umfasst das mitochondriale Genom 16569 Basenpaare (Anderson *et al.* 1981) und codiert 13 der für die oxidative Phosphorylierung notwendigen Proteinuntereinheiten (Abb. 2-2). Neben den 13 Genen, die Polypeptide codieren, finden sich auf dem Genom noch 22 Gene für tRNAs und zwei rRNA-Gene.

Mitochondriale DNA von Säugetieren weist eine außerordentliche Organisationsökonomie auf, denn den Genen fehlen Introns und ausgeprägte intergenische Bereiche sind nicht vorhanden oder auf wenige Basen beschränkt. Davon ausgenommen ist nur ein regulatorischer Bereich, der so genannte D-Loop (ca. 1,1 kb). Manche der Protein-Gene überlappen und in vielen Fällen sind Teile der Terminations-Codons nicht codiert, sondern werden erst nach der Transkription durch Polyadenylierung der mRNAs generiert (Ojala *et al.* 1981).

Der genetische Code der Mitochondrien unterscheidet sich zum Teil vom universellen nukleären Code, denn z.B. codiert das nukleäre Stopp-Codon UGA in Mitochondrien ein Tryptophan, AUA codiert Methionin anstelle von Isoleucin und die beiden Codons AGA und AGG codieren kein Arginin, sondern sind mitochondriale Terminationscodons (Wallace, 1982).

Eine Unterscheidung der beiden Stränge der mitochondrialen DNA ist durch eine Separierung mittels eines Cäsiumchlorid-Gradienten aufgrund des unterschiedlichen Puringehaltes möglich. Daraus resultieren die Namen H-Strang (*heavy strand*) und L-Strang (*light strand*), wobei der H-Strang die meiste Information codiert, mit Genen für zwei rRNAs, 14 tRNAs und 12 Polypeptiden, der L-Strang hingegen codiert acht tRNAs und nur ein Polypeptid.

## 2.4 Mitochondriale Nucleoids

Das mitochondriale Genom von Säugern ist in Protein-DNA-Komplexen organisiert, die als mitochondriale Nucleoids bezeichnet werden und innerhalb der Matrix von Mitochondrien visualisiert werden können (Nass, 1969). Die Nucleoids beinhalten abhängig vom Zelltyp zwei bis zehn mtDNA-Moleküle und sind in 450 – 800 getrennten Foci in Kulturzellen vorhanden (Nass, 1969; Iborra *et al.*, 2004; Legros *et al.*, 2004).

Die Zusammensetzung der Nucleoids ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wurde eine Reihe von Proteinen vorgeschlagen, welche Bestandteile der Nucleoids zu sein scheinen.

Dazu gehören Proteine, die an der Replikation, Transkription bzw. an der Erhaltung der mtDNA beteiligt sind, wie der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM, mtTFA), die mitochondriale DNA-Polymerase  $\gamma$  (POLG), das mitochondriale DNA-Einzelstrangbindeprotein (mtSSB) oder die mitochondriale DNA-Helikase Twinkle (Bogehagen *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2003).

Es werden jedoch ebenso Chaperone und Proteine, die am Intermediär-Metabolismus, dem Membrantransport oder dem Zytoskelett beteiligt sind mit mitochondrialen Nucleoids in Verbindung gebracht (Iborra *et al.*, 2004; Wang und Bogehagen, 2006). Ein mehrschichtiger Aufbau von Nucleoids, mit Kernproteinen und Proteinen, die nur zu bestimmten Zeiten und Funktionen mit der mtDNA assoziiert sind, wird ebenfalls diskutiert (Bogehagen *et al.*, 2007).

Als Hauptverpackungsproteine für das mitochondriale Genom fungieren in Hefe das Nicht-Histon HMG-Protein (*high mobility group*) Abf2 und in Säugern das Homolog TFAM. Beide Proteine können die mtDNA biegen und entwinden (Fisher *et al.*, 1992) und in Säugerzellen verpackt TFAM die mtDNA mit einer geschätzten Umwicklung von 10 – 20 bp pro TFAM-Protein (Takamatsu *et al.*, 2002; Ekstrand *et al.*, 2004). Aktuelle Ergebnisse mittels Atomkraft-Mikroskopie zeigen, dass TFAM kooperative DNA-Bindungskapazität besitzt und bestätigen ihn als vorherrschenden Organisator für mitochondriale Nucleoids (Kaufman *et al.*, 2007). Ursprünglich wurde TFAM als Transkriptionsfaktor entdeckt (Fisher und Clayton, 1988), jedoch ist er ein bifunktionelles Protein, welches als Transkriptionsfaktor und Verpackungsprotein fungieren kann.

## 2.5 Mitochondriale Transkription

Für die mitochondriale Transkription in Säugern sind *in vitro* nur vier Komponenten nötig. Hierzu zählt die phagenartige mitochondriale RNA-Polymerase (POLRMT), sowie TFAM und die mitochondrialen Transkriptionsfaktoren B1 (TFB1M) und/oder B2 (TFB2M) (Falkenberg *et al.*, 2002; Falkenberg *et al.*, 2007). Neben der unspezifischen DNA-Bindungskapazität von TFAM, welche mit für die Nucleidorganisation verantwortlich ist,

bindet TFAM mtDNA auch sequenzspezifisch in den Promotorregionen der mtDNA (Fisher *et al.*, 1987). Mutationsanalysen von TFAM, welcher zwei Tandem-HMG-Box-Domänen und einen 25 Aminosäuren langen C-terminalen Schwanz besitzt (Parisi und Clayton, 1991), zeigten, dass diese Schwanzregion für die Erkennung der spezifischen DNA-Bindung wichtig ist und für die Aktivierung der Transkription benötigt wird (Dairaghi *et al.*, 1995).

Im menschlichen mitochondrialen Genom gibt es im Bereich des D-Loops zwei Stellen für die Initiation der Transkription, IT<sub>H1</sub> sowie IT<sub>L</sub> (*initiation of transcription site on the heavy strand 1*, IT<sub>H1</sub> bzw. *initiation of transcription site on the light strand*, IT<sub>L</sub>), die sich innerhalb eines Bereiches von 150 bp befinden (Abb. 2-3).

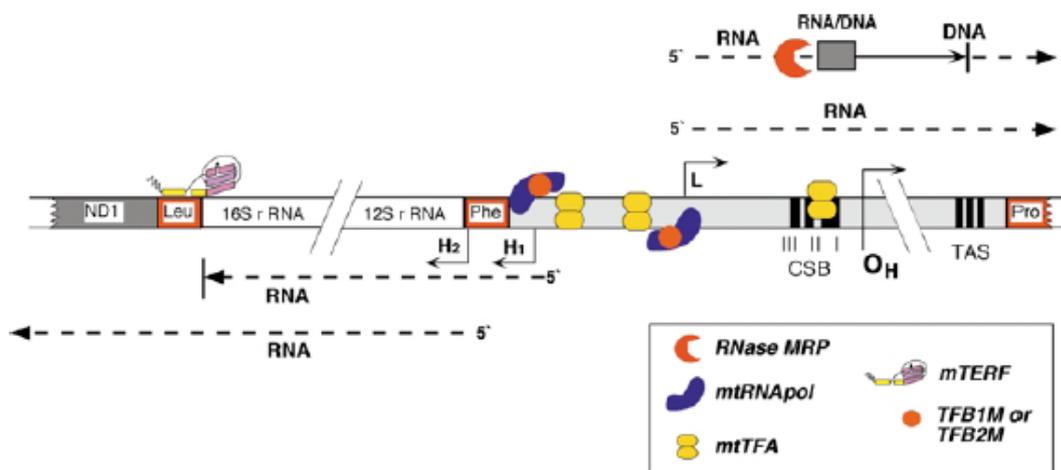
Der Start der Transkription des H-Stranges findet an der Nukleotid-Position 561 (IT<sub>H1</sub>) innerhalb des H-Strang-Promotors (HSP, *heavy strand promotor*) statt, wohingegen die Transkription des L-Stranges innerhalb des L-Strang-Promotors (LSP, *light strand promotor*) an Position 407 (IT<sub>L</sub>) beginnt.

Eine zweite Initiationsstelle für die Transkription des H-Stranges sitzt innerhalb des Gens für die tRNA<sup>Phe</sup>, direkt neben dem Gen für die 12S rRNA und wird als IT<sub>H2</sub> bezeichnet. IT<sub>H2</sub> wird jedoch weniger frequent für die Transkription des H-Stranges genutzt als IT<sub>H1</sub> (Montoya *et al.* 1982) und daraus resultieren Transkripte, die fast den gesamten H-Strang umfassen. Die Transkripte ausgehend von IT<sub>H1</sub> beginnen 16 bp stromaufwärts der tRNA<sup>Phe</sup> und enden am 3'-Ende der 16S-rRNA.

Die resultierenden polycistronischen Vorläufer-RNAs, welche die genetische Information des jeweiligen Stranges beinhalten, werden durch das Herausschneiden der tRNAs prozessiert, wodurch individuelle mRNA-, tRNA- und rRNA-Moleküle entstehen (Ojala *et al.*, 1980; Ojala *et al.*, 1981).

Für die Termination der Transkription sind mitochondriale Terminationsfaktoren verantwortlich, wobei der Abschluss von H1-Transkripten an einer Terminationsstelle am 3'-Ende der 16S-rRNA stattfindet (Christianson und Clayton, 1988) und vom Terminationsfaktor mTERF (nun als mTERF1 bezeichnet) abhängt (Kruse *et al.*, 1989; Fernandez-Silva *et al.*, 1997). Bioinformatische Analysen haben drei neue Gene identifiziert, die homologe Proteine von mTERF codieren (Linder *et al.*, 2005), wobei die Funktionen von mTERF2 und 4 noch unbekannt sind, wohingegen mTERF3 ein negativer Regulator für die mitochondriale Transkription ist (Park *et al.*, 2007).

Mitochondriale mRNAs werden während oder direkt nach der Spaltung am 3'-Ende polyadenyliert und zwar durch eine mitochondriale Poly(A)-Polymerase (Rose *et al.* 1975, Amalric *et al.* 1978), wohingegen die beiden rRNAs post-transkriptionell durch das Anfügen von kurzen Adenylresten modifiziert werden (Dubin *et al.* 1982). Weiterhin tragen mRNAs in Mitochondrien keine Polyadenylierungssignale strangaufwärts des Poly(A)-Schwanzes, so wie sie bei nukleären mRNAs gefunden werden. Die Länge der Poly(A)-Schwänze ist in den Mitochondrien ebenfalls kürzer (ca. 60 Adenylreste) als in den zytoplasmatischen mRNAs (200 bis 250 Adenylreste). Ebenso fehlt dem 5'-Ende mitochondrialer mRNAs die 7-Methylguanylat-Cap-Struktur, die man bei zytoplasmatischen mRNAs findet (Grohmann *et al.* 1978).



**Abb. 2-3:** Schematische Illustration des mitochondrialen D-Loops in Säugern, mit Darstellung der Hauptelemente und Hauptfaktoren, die in die Initiation der Replikation und Transkription involviert sind. Der nicht-codierende regulatorische Bereich im D-Loop ist in hellgrau dargestellt (Fernandez-Silva *et al.*, 2003).

## 2.6 Replikation mitochondrialer DNA

Für die Replikation der mitochondrialen DNA ist *in vitro* das minimale mitochondriale Replisom nötig, bestehend aus der mtDNA-Polymerase  $\gamma$  (POLG), der mitochondrialen Helikase Twinkle und dem mitochondrialen DNA-Einzelstrangbindeprotein (mtSSB) (Korhonen *et al.*, 2004).

Zwei verschiedene Modelle für die Replikation der mtDNA werden diskutiert: zum einen die Replikation als asynchroner Verschiebungsmechanismus, der zwei unidirektionale

unabhängige Replikationsursprünge miteinbezieht (Berk und Clayton, 1974; Bogenhagen und Clayton, 2003; Brown *et al.*, 2005). Als zweites Modell wurde das strang-asymmetrische Replikationsmodell vorgeschlagen (Holt *et al.*, 2000).

Beim klassischen Modell startet die Replikation am Replikationsursprung des H-Stranges ( $O_H$ ), verläuft entlang des parentalen L-Stranges um den neuen H-Strang zu erzeugen (*leading strand*). Nachdem die Synthese des H-Stranges etwa  $2/3$  des Genoms erreicht hat, liegt der Replikationsursprung des L-Stranges ( $O_L$ ) frei, die Synthese des *lagging strand* wird initiiert und verläuft in die Gegenrichtung, um den neuen L-Strang zu erzeugen (Shadel und Clayton, 1997). Für die Einleitung der Replikation wird ein RNA-Primer benötigt, der während der Transkription entsteht und die Region zwischen L-Strang Promotor (LSP) und CSBs (*conserved sequence blocks*) im D-Loop überspannt (Chang und Clayton, 1985).

Die Replikation kann von  $O_H$  ausgehend das gesamte Genom kopieren oder aber etwa 700 bp stromabwärts des  $O_H$  an den TAS (*termination associated sequences*) stoppen, um die 7S DNA zu bilden, welche zum naszierenden H-Strang der dreisträngigen D-Loop-Struktur identisch ist (Clayton, 1982, Abb. 2-3).

## 2.7 Zellen ohne mitochondriale DNA – $\rho^0$ -Zellen

Es ist möglich Kulturzellen so zu behandeln, dass sie über keine mitochondriale DNA mehr verfügen. Dies ist v. a. für Studien nötig, bei denen festgestellt werden soll, ob ein pathogener Gendefekt durch das mitochondriale oder das nukleäre Genom verursacht wird.

Bei den ersten mtDNA-freien ( $\rho^0$ ) Kulturzellen handelte es sich um Vogelzellen, die durch Langzeitexposition mit Ethidiumbromid entwickelt wurden (Desjardins *et al.*, 1985; Desjardins *et al.*; 1986, Morais *et al.*, 1988); eine humane Osteosarkom-Zelllinie (143B.TK<sup>-</sup>) mit  $\rho^0$ -Genotyp entstand 1989 durch King und Attardi. Die Behandlung mit Ethidiumbromid, welches bevorzugt in die mitochondriale DNA interkaliert, inhibiert somit ein korrektes Ablaufen sowohl der mitochondrialen Replikation als auch der Transkription in Säugerzellen. Die Herstellung weiterer  $\rho^0$ -Zellen gelang z.B. durch die Behandlung mit dem bis-interkalierenden Antitumormittel Ditercalinium (Inoue *et al.*, 1997) oder durch die Exposition von Zellen mit 2',3'-Didesoxycytidin (ddC, Nelson *et al.*, 1997). Mithilfe einer mitochondrial

zielgesteuerten Restriktionsendonuklease konnten ebenso erfolgreich Zelllinien ohne mtDNA erzeugt werden (Kukat *et al.*, 2008).

Allen  $\rho^0$ -Zelllinien gemeinsam sind die Abhängigkeit von zusätzlicher Supplementierung mit Pyruvat (King und Attardi, 1996) und Uridin (Morais und Giguère, 1979), sowie ein schnelles Ansäuern des Kulturmediums durch die Produktion von Laktat (Jakobs *et al.*, 1994). Die zusätzliche Gabe von Pyruvat ist nötig, um das in der Glykolyse entstehende Reduktionsäquivalent NADH wieder zu  $\text{NAD}^+$  zu oxidieren und für den erneuten Eintritt in die Glykolyse und in andere Stoffwechselwege bereitstellen zu können. Die Protonen und Elektronen werden dabei unter anaeroben Bedingungen in dem Prozess der Milchsäuregärung durch die Laktat-Dehydrogenase auf Pyruvat übertragen, wodurch Laktat entsteht. Weiterhin ist bei Zellen ohne mtDNA durch den Defekt der Atmungskette die Funktion der Dihydroorotat-Dehydrogenase gestört. Das Enzym der inneren Mitochondrienmembran katalysiert die Konversion von Dihydroorotat zu Orotat, bei der die in der katalytischen Oxidation freiwerdenden Elektronen auf die Atmungskette übertragen werden (Gregoire *et al.*, 1984). Als Teil der Pyrimidinbiosynthese kann diese Reaktion bei Zellen im  $\rho^0$ -Zustand nicht erfolgen, so dass eine Supplementierung mit Uridin nötig ist, welches in Cytidin und Thymidin konvertiert werden kann.

## 2.8 Mitochondriopathien

Innerhalb der Mitochondrien findet der Hauptteil der Energiegewinnung einer Zelle statt, weshalb mitochondriale Dysfunktionen in starkem Maße die Funktion und das Wachstum der Zelle beeinflussen. Dies trifft im Besonderen auf Gewebe zu, die einen hohen Energieverbrauch haben wie zum Beispiel Muskeln und Nervengewebe (Schon *et al.*, 1989; Shoffner *et al.*, 1989; Nakase *et al.*, 1990; Corral-Debrinski *et al.*, 1992; Cortopassi *et al.*, 1992; Wallace, 1994; Papa, 1996).

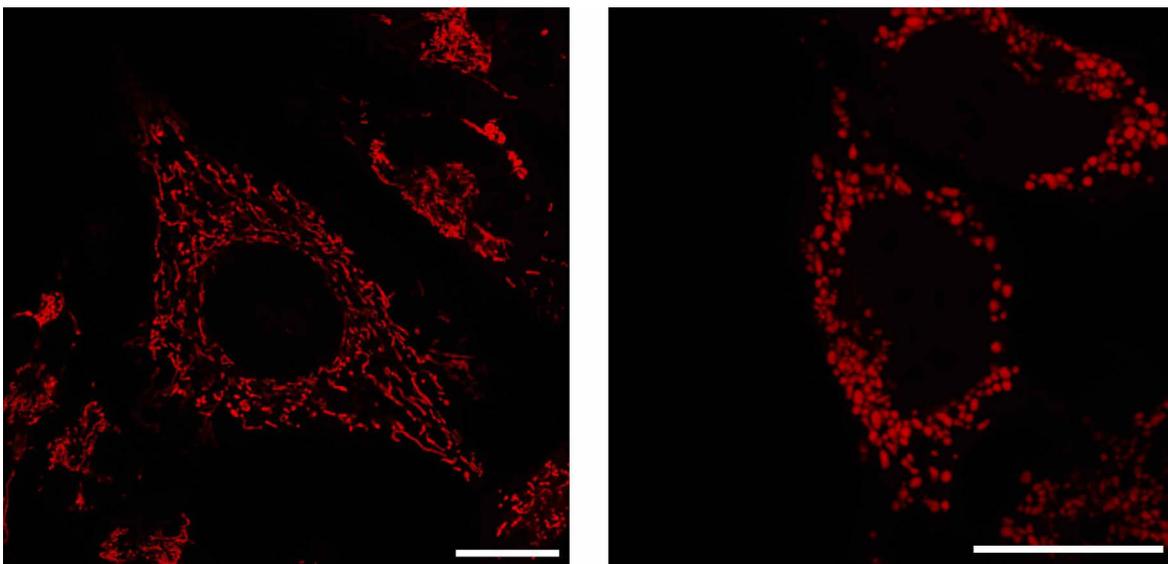
Pathogene Mutationen in mitochondrialen Genen sind meist heteroplasmatisch, das heißt, Wildtyp und mutierte mtDNA koexistieren in derselben Zelle. Zudem kommt es bei mitochondrialen Krankheiten meist zu einem Schwellenwert-Effekt, was bedeutet, dass Symptome der Krankheit erst ab einem gewissen Prozentsatz an defekten Genomen auftreten (Chomyn *et al.*, 1991; Chomyn *et al.*, 1992; Wallace, 1994). Ein weiteres Charakteristikum

mitochondrial codierter Krankheiten ist der streng maternale Erbgang, da die Vererbung von Mitochondrien maternal erfolgt (Hutchison *et al.*, 1974; Giles *et al.*, 1980).

Bekannte Mitochondriopathien sind: Leigh-Krankheit (Subakute Nekrotisierende Enzephalomyelopathie, DeVivo *et al.*, 1979), LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy, Wallace *et al.*, 1988), MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Stokelike Episodes, Pavlakis *et al.* 1984), MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber Disease, Shoffner *et al.*, 1990) und NARP (Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa, Holt *et al.*, 1990).

## 2.9 Dynamik der Mitochondrien

Mitochondrien sind hochdynamische Organellen, die ihre Gestalt und Größe verändern können und an strategische Orte in Zellen transportiert werden. Die mitochondriale Morphologie, Größe und Position innerhalb der Zelle werden durch ein ausgewogenes Gleichgewicht von Fusions- und Spaltungsereignissen aufrechterhalten (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994), so dass die Mitochondrien einerseits als Netzwerk andererseits aber auch als Einzelorganellen vorliegen können (Abb. 2-4).



**Abb. 2-4:** Fluoreszenzaufnahmen von Mitochondrien in HeLa-Zellen, die einerseits als Netzwerk, andererseits als Einzelorganellen vorliegen. Eichstriche: 20  $\mu$ m.

## 2.9.1 Fusion von Mitochondrien

Um die Fusion von Mitochondrien zu bewerkstelligen, ist eine Membranfusionsmaschinerie nötig, die aus mehreren Komponenten besteht. Der erste Akteur der mitochondrialen Fusion, welcher identifiziert wurde, ist das Genprodukt des Fzo (*fuzzy onion*)-Gens in *Drosophila melanogaster* (Hales und Fuller, 1997). Das Fzo-Protein wird für die Bildung der beiden Riesenmitochondrien benötigt, die die Struktur des Nebenkerns in der *Drosophila*-Spermatogenese bilden (Tokuyasu, 1975).

In Hefe und Säugern wurden Homologe zu Fzo identifiziert, nämlich Fzo1p bzw. die Mitofusine (Hermann *et al.*, 1998; Santel und Fuller, 2001; Rojo *et al.*, 2002). Zusammen bilden sie eine Protein-Familie von großen GTPasen, die in der äußeren Mitochondrienmembran liegen und evolutionär stark konserviert sind. Es gibt zwei Säuger-Mitofusine: Mitofusin 1 (MFN1) und Mitofusin 2 (MFN2), die zu 60 % identisch sind.

All diese Proteine haben strukturelle Gemeinsamkeiten, zu denen die N-terminale GTPase-Domäne zählt (Abb. 2-5). Eine zweiteilige Transmembrandomäne, welche die äußere Mitochondrienmembran zweimal durchspannt ist nahe dem C-Terminus lokalisiert, woraus die Orientierung sowohl des N- als auch des C-Terminus ins Zytosol resultiert (Fritz *et al.*, 001; Rojo *et al.*, 2002). Die beiden hydrophoben Heptad-Repeat-Regionen HR1 und HR2 flankieren die Transmembrandomäne (TM) und bilden helikale Coiled-Coil-Strukturen, die für das Andocken benachbarter Mitochondrien verantwortlich gemacht werden (Koshiba *et al.*, 2004).

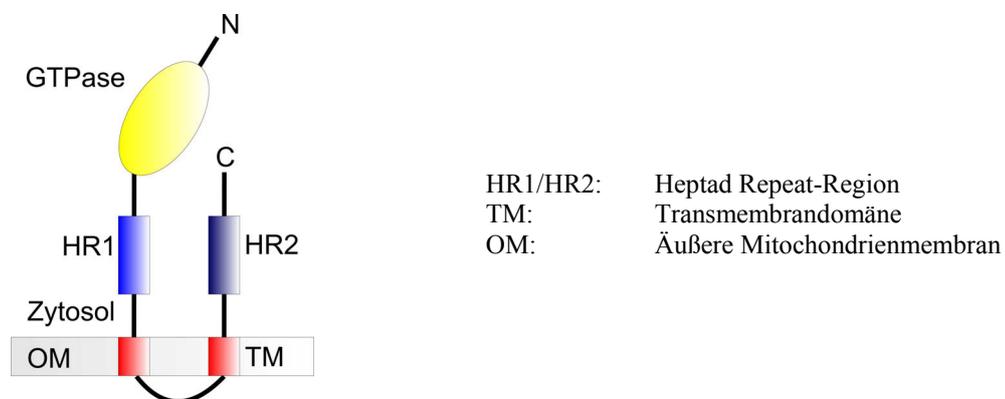


Abb. 2-5: Schematischer Aufbau von MFN1/2

Dass Mitofusine essentiell für die mitochondriale Fusion sind, konnte mit transgenen Mäusen gezeigt werden, die zielgerichtete Mutationen in diesen Genen aufwiesen (Chen *et al.*,

2003). Zellen, denen MFN1 oder MFN2 fehlt zeigten stark reduzierte mitochondriale Fusion und homozygote Knockouts in Mäusen von MFN1 oder MFN2 sind embryonal lethal (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005).

MFN1 und MFN2 spielen ähnliche Rollen bei der Fusion von Mitochondrien, es gibt jedoch Unterschiede: so zeigen Fibroblasten, denen MFN1 fehlt, stärker fragmentierte Mitochondrien und weniger Fusion als Fibroblasten, welchen MFN2 fehlt (Chen *et al.*, 2005). MFN1 und MFN2 können sich funktionell ersetzen, denn Zellen ohne MFN1 oder MFN2 können durch die Überexpression des jeweils anderen Mitofusins gerettet werden. Daneben ist es möglich, Zellen ohne MFN durch die Überexpression von MFN1 oder MFN2 zu retten.

Für ein mitochondriales Fusionsereignis werden Mitofusine an benachbarten Mitochondrien benötigt (Koshiba *et al.*, 2004). MFN1 und MFN2 bilden sowohl homo- als auch heterotypische Komplexe, die mittels Immunpräzipitation nachgewiesen wurden und alle Fusionskompetenz besitzen (Chen *et al.*, 2003; Eura *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Mitofusine Komplexe in *trans* bilden, d.h. zwischen benachbarten Mitochondrien.

Es wird angenommen, dass die Fusion der äußeren und inneren Membran koordiniert abläuft, jedoch lassen sich die Prozesse durch experimentelle Manipulation entkoppeln, was die Vermutung nahe legt, dass sie mechanistisch unterschiedlich sind. In Kulturzellen von Säugern wird die mitochondriale Fusion durch  $H^+$ - bzw.  $K^+$ -Ionophore, die das Membranpotential der Mitochondrien stören, inhibiert (Legros *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2003; Mattenberger *et al.*, 2003). Nähere Betrachtungen zeigten, dass diese Ionophore die Fusion der äußeren Membran zulassen, nicht jedoch die der inneren Membran (Malka *et al.*, 2005).

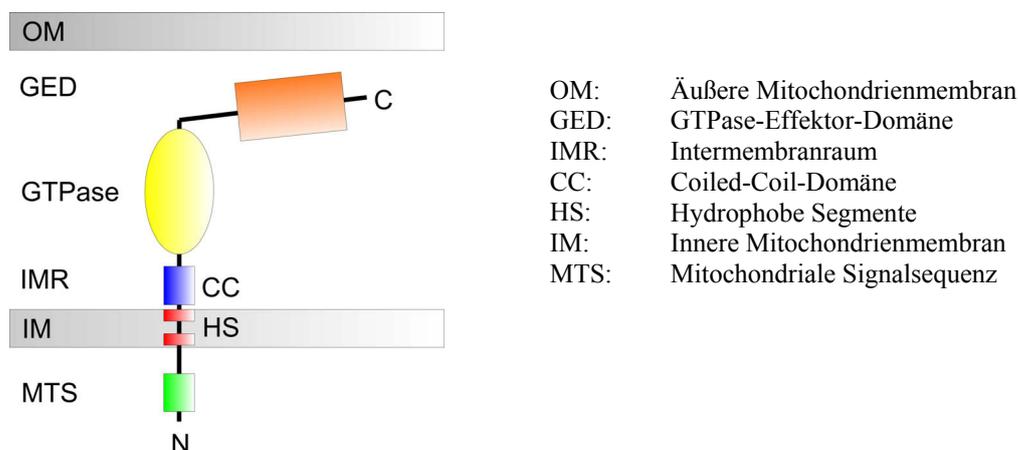
In die Regulation der Mitofusin-Aktivität sind die beiden Apoptose-Moleküle Bax und Bak involviert, denn sie regulieren die Funktion von MFN2 in Säugerzellen. Während der Apoptose liegen Bax und Bak punktförmig an Mitochondrien vor und kolokalisieren dort mit MFN2 (Youle und Karbowski, 2005). Aber auch in intakten Zellen – ohne Apoptosevorgänge – regulieren Bax und Bak die mitochondriale Fusion indem sie Interaktionen mit MFN2 eingehen (Karbowski *et al.*, 2006). Somit ergeben sich für Bax und Bak zwei Rollen: einerseits eine nicht-apoptotische bei der Förderung der Mitochondrienfusion durch MFN2, andererseits eine apoptotische Rolle, in der sie die Fission der Organellen vorantreiben, je nachdem welche Stimuli sie erhalten.

Ein weiterer wichtiger Regulator der mitochondrialen Fusion ist MitoPLD, ein mitochondriales Mitglied der Phospholipase D-Superfamilie. Durch Herabregulation von MitoPLD reduziert sich die mitochondriale Fusionsaktivität signifikant, wohingegen eine Überexpression zu einer Aggregation von Mitochondrien führt. MitoPLD wird bei der Fusion eine, dem Andockschrift durch die Mitofusine, nachgeschaltete Rolle zugesprochen (Choi *et al.*, 2006).

Weitere potentielle Interaktionspartner für die Mitofusine sind das mitofusinbindende Protein (MIB, *mitofusin-binding protein*, Eura *et al.*, 2006), das stomatinähnliche Protein 2 (Stoml2, *stomatin-like protein 2*, Hajek *et al.*, 2007) und das membranassoziierte RING-CH-V (MARCH-V, *membrane-associated RING-CH-V*, Nakamura *et al.*, 2006).

Ein anderes Protein, dem eine Rolle bei der Mitochondrienfusion zugesprochen wird ist OPA1. Sein Name resultiert aus der Entdeckung, dass Mutationen in diesem Gen autosomale dominante optische Atrophie hervorrufen können, eine Krankheit, bei der eine Degeneration des optischen Nervs charakteristisch ist (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000).

Das orthologe Protein in Hefe wird als Mgm1p bezeichnet. Biochemische Analysen ergaben für beide Proteine eine Lokalisierung im Intermembranraum sowie eine Assoziierung mit der inneren Mitochondrienmembran (Wong *et al.*, 2000; Griparic *et al.*, 2004). Beide Proteine sind Mitglieder der dynamin-verwandten Proteinfamilie. Sie bestehen aus einer N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz (MTS), zwei aufeinanderfolgenden hydrophoben Segmenten, einer Coiled-Coil-Domäne, einer GTPase-Domäne, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen GTPase-Effektor-Domäne (GED, Abb. 2-6).



**Abb. 2-6:** Schematischer Aufbau von OPA1

In Säugern findet man eine große Diversität von OPA1-Isoformen, denn bisher wurden mindestens acht mRNA-Isoformen ermittelt, die durch alternatives Spleißen entstehen

(Delettre *et al.*, 2001). Zusätzlich kommt es durch regulierte Proteolyse zu post-translationalen Prozessierungen der Isoformen. Bisher sind zwei Proteasen bekannt, die eine Rolle bei der Prozessierung von OPA1 spielen: PARL (*Presenilin associated rhomboid-like*, Cipolat *et al.*, 2006; Frezza *et al.*, 2006) und die m-AAA-Protease Paraplegin (Ishihara *et al.*, 2006). Beide Proteasen scheinen jedoch nicht die Hauptverantwortlichen für die OPA1-Prozessierung zu sein, so dass die Suche weitergeht.

Nach der Herabregulation von OPA1 kommt es zur mitochondrialen Fragmentierung und zu einem Verlust der Fusionsaktivität (Cipolat *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

Die Maschinerie, die die Fusion der inneren Membran vollzieht ist noch ungeklärt, jedoch ist es wahrscheinlich, dass OPA1, wegen seiner essentiellen Funktion in der Fusion (Cipolat *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005) und der Assoziierung mit der inneren Membran (Satoh *et al.*, 2003; Griparic *et al.*, 2004) dort eine Rolle spielt.

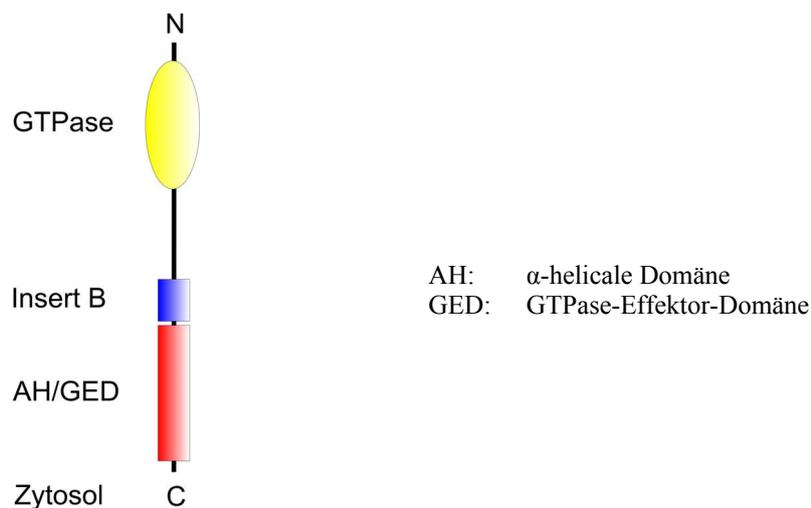
In Studien mit Hefe sind Proteine der mitochondrialen Fusionsmaschinerie entdeckt worden, für die bisher keine Gegenstücke in Säugern bekannt sind. Hierzu zählt beispielsweise Ugo1, ein Protein der äußeren Membran in Hefe, das mit Fzo1 und Mgm1 assoziiert und für die Fusion essentiell ist (Sesaki und Jensen, 2001; Sesaki *et al.* 2003; Wong *et al.*, 2003). Für Ugo1 wird eine Rolle bei der Koordination der Fusion von äußerer und innerer Mitochondrienmembran diskutiert.

### 2.9.2 Fission von Mitochondrien

Erste Bestandteile der mitochondrialen Fissionsmaschinerie wurden in genetischen Untersuchungen in der Hefe identifiziert (Bleazard *et al.*, 1999; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu und Nunnari, 2000) sowie in Studien zum dynamin-verwandten Protein in *Caenorhabditis elegans* (Labrousse *et al.*, 1999). Ausweitungen dieser Studien auf Säugerzellen konnten das dynamin-verwandte Protein 1 (Drp1, *dynamin-related protein 1*) und das Fissionsprotein Fis1 als Komponenten der Fissionsmaschinerie in Säugermitochondrien ermitteln (Smirnova *et al.*, 1998; Pitts *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 2001; James *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003).

Als Schlüsselkomponente der mitochondrialen Fission fungiert das dynamin-verwandte Protein 1 – Drp1, welches auch als DNM1L, DLP1 oder DYMPLE bezeichnet wird. Das homologe Protein in der Hefe heißt Dnm1. Bei der Verteilung innerhalb der Zelle findet sich die größte Menge im Zytoplasma, jedoch lokalisiert es ebenso punktförmig an den Mitochondrien. Von diesen mitochondrialen Drp1-Spots markieren manche zukünftige Spaltstellen, was mikroskopisch verfolgt werden konnte (Smirnova *et al.*, 2001). Wenn Drp1 herabreguliert wird – einerseits durch eine dominant-negative Mutante, andererseits durch RNAi – führt dies zur Inhibierung von Fission, woraus elongierte Mitochondrien resultieren (Smirnova *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004).

In *Homo sapiens* sind drei Isoformen von Drp1 bekannt, welche ein Molekulargewicht von 78 bis 82 kD besitzen. Drp1 beinhaltet mehrere Domänen, die charakteristisch für die GTPasen der Dynamin-Familie sind, hierzu zählen die GTPase-Domäne, die Zentraldomäne sowie eine GTPase-Effektor-Domäne (GED, Abb. 2-7).



**Abb. 2-7:** Schematischer Aufbau von DNM1L/Drp1

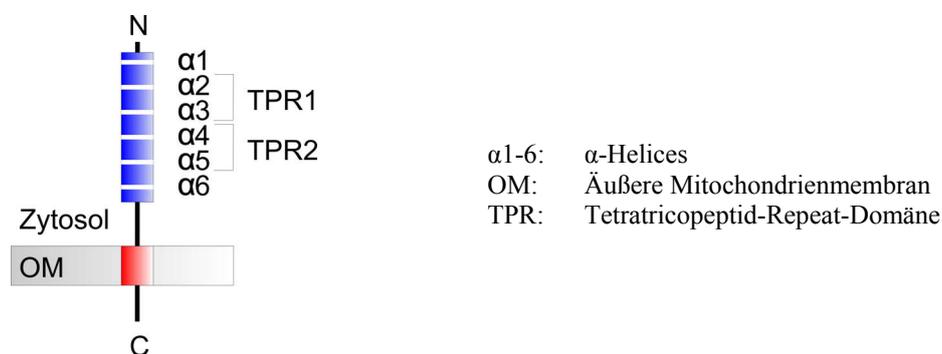
Für die mitochondriale Fissionsmaschinerie in Säugern ist Fis1 essentiell. Ein Knockdown von Fis 1 verursacht eine Elongation mitochondrialer Strukturen, ähnlich der Inhibierung von Drp1, jedoch beeinflusst eine Verringerung der Proteinmenge von Fis1 nicht die Rekrutierung von Drp1 (Lee *et al.*, 2004). Mitochondriale Fragmentierung, die abhängig von Drp1 ist, erhält man nach Überexpression von Fis1 (James *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003).

Fis1 ist ein kleines Protein – die humane Form hFis1 verfügt über ein Molekulargewicht von 17 kD – welches gleichmäßig in der äußeren Membran von Mitochondrien durch eine C-terminale Transmembrandomäne verankert ist (Abb. 2-8). Der größte Teil des Proteins ragt ins Zytoplasma und besitzt sechs antiparallele Helices (Suzuki *et al.*, 2003; Dohm *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2005), wobei die vier zentralen Helices aus zwei Tetratricopeptid-Repeat-

Domänen (TPRs) bestehen, einem Helix-Turn-Helix-Motiv. Eine Oberfläche der Helices ist konkav und wird somit als Bindungsstelle für einen kleinen Peptidliganden vermutet.

Fis1 rekrutiert mittels eines bisher unbekanntes Mechanismus Drp1 punktförmig an die Mitochondrienmembran. Im Anschluss kommt es zur Einschnürung der Mitochondrien durch Drp1 und zur Spaltung (Smirnova *et al.*, 2001).

Die Funktionen von Fis1 und Drp1 in der Teilung von Organellen sind nicht auf die Mitochondrien limitiert, denn beide Proteine lokalisieren ebenso an Peroxisomen und ein jeweiliger Knockdown führt zur Elongation der Peroxisomen (Koch *et al.*, 2005).



**Abb. 2-8:** Schematischer Aufbau von Fis1

Auch auf der Fissionsseite wurden Proteine in der Hefe identifiziert, deren Gegenstücke in Säugern bisher fehlen, z.B. Mdv1, welches essentiell für die Fission ist (Tieu und Nunnari, 2000; Shaw und Nunnari, 2002). Durch Mdv1 und ein verwandtes Protein, Caf4, rekrutiert Fis1 in der äußeren Membran Dnm1 zu punktförmigen Bereichen an die Mitochondrien (Griffin *et al.*, 2005). Mdv1 und Caf4 interagieren als molekulare Adapter bei der Assemblierung des Fissionskomplexes (Tieu *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2005). Solche Adapterproteine sind im Säugersystem noch nicht bekannt.

Zusätzlich wurden andere Proteine vorgeschlagen, die an der Regulation der Dynamik von Mitochondrien in Säugern teilhaben. Hierzu zählt Endophilin B1, dem eine Rolle bei der mitochondrialen Fission zugesprochen wird, denn eine Verminderung der Endophilin B1-Menge durch RNAi führt zu Abnormalitäten in der Mitochondrienmorphologie, die einen Defekt in der Fission vermuten lassen (Karbowski *et al.*, 2004). Zellen, denen Endophilin B1 fehlt zeigen eine Mischung aus Röhren und Kugeln, oftmals mit unüblichen Verbindungen in den Mitochondrienformen. Am auffälligsten ist, dass manche Zellen lange, dünne Mitochondrien besitzen, die sich mit Markern für die äußere Membran färben lassen, jedoch nicht mit Marken für die Matrix. Diese Beobachtungen weisen auf eine Dissoziation der

äußeren Membran von der inneren Membran innerhalb der Mitochondrien hin, womit Endophilin B1 eine Rolle bei der Kontrolle der Dynamik der äußeren Membran spielen könnte.

Ein weiterer Faktor der mitochondrialen Spaltung könnte das mitochondriale Membranprotein MTP18 sein. MTP18 enthält drei putative Transmembrandomänen und bei einer Überexpression kommt es zur Fragmentierung der Mitochondrien und eine Herabregulierung führt zur Elongation (Tondera *et al.*, 2005).

### **2.9.3 Biologische Signifikanz mitochondrialer Fusion und Fission**

Die mitochondriale Morphologie hängt von dem Gleichgewicht zwischen Fusion und Fission ab. Unausgewogene Spaltung führt zur Fragmentierung, währenddessen unausgewogene Fusion zur Elongation der Organellen führt. In der Entwicklung kann die Kontrolle dieser Vorgänge die Form der Mitochondrien ändern, um bestimmte Funktionen zu gewährleisten. Ein berühmtes Beispiel ist die Bildung des Nebenkerns in der Spermatogenese von *Drosophila* durch entwicklungsbiologische Hochregulation von Fzo (Hales und Fuller, 1997).

Für die bioenergetische Funktion von Mitochondrien spielt Fusion und Fission eine tragende Rolle (Skulachev *et al.*, 2001). Die Mitochondrienpopulation innerhalb einer Zelle ist sehr heterogen, was das Membranpotential betrifft. Als Ergebnis wachsen Zellen ohne mitochondriale Fusion viel langsamer als die Wildtyp-Pendants, wohingegen andere genetische Manipulationen, die die Fragmentierung der Organellen nach sich ziehen, keinen solchen funktionellen Einfluss haben. Dies lässt den Schluss zu, dass die Fusion an sich, abgesehen von der Mitochondrienform, auch für die Funktion der Mitochondrien wichtig ist (Chan, 2006).

Mitochondrien fusionieren wohl auch, um zu kooperieren bzw. defekte Einzelmitochondrien zu komplementieren. Durch hohe Raten an Fusion und Fission sind autonome Organellen unmöglich, da jederzeit durch das Hinzufügen von Material (Fusion) bzw. der Entfernung von Material (Fission) die Identität der Mitochondrien geändert wird. In Zellen, in denen Fusion verhindert ist, werden die Mitochondrien zu autonomen Organellen, was in Defekte der

Funktion resultiert. Dies könnte zur Ursache haben, dass die Verringerung von Substraten, mitochondrialer DNA oder Metaboliten nicht durch Fusion mit gesunden Mitochondrien komplementiert werden kann (Chan, 2006).

Der Schutz vor Auswirkungen von Mutationen in der mtDNA ist ebenfalls durch Fusion gewährleistet, denn es kommt zu einer funktionellen Komplementierung der Genprodukte, wie an Zellhybriden gezeigt werden konnte. Hierzu wurden parentale Zellen mit verschiedenen pathogenen mtDNA-Mutationen fusioniert und wurden somit wieder respirationskompetent (Nakada *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2001), was auch als Verteidigungsmechanismus gegen zelluläre Alterungsprozesse dienen könnte.

Die Vererbung und Transmission von mitochondrialen Genomen wird ebenfalls durch Fusion von Mitochondrien bewerkstelligt. Belege für die Komplementierung und Rekombination von mtDNA wurden in der Hefe gefunden (Dujon *et al.*, 1974), wohingegen das Thema in Säugern kontrovers debattiert wird. Es gibt widersprüchliche Erkenntnisse darüber, denn einerseits wurde die Komplementierung zwischen verschiedenen mtDNA-Mutanten als ein seltenes Ereignis beschrieben (Enriquez *et al.*, 2000), andererseits gibt es einen Bericht, nachdem die Komplementierung nach 10 – 14 Tagen effizient verlief (Ono *et al.*, 2001). Dass die Mitochondrien lösliche Matrixproteine durch Fusion austauschen können, gilt als gesichert (Legros *et al.*, 2002). Es gibt auch Publikationen über  $\rho^0$ -Zellen, die Mitochondrien von  $\rho^+$ -Zellen aufnehmen wenn sie in Co-Kultur mit respirationskompetenten Zellen ausplattiert werden. Die mtDNA-freien  $\rho^0$ -Zellen erhalten somit wieder mitochondriale Genome und Respirationskompetenz (Spees *et al.*, 2006).

In der Entwicklungsbiologie ist die mitochondriale Fusion von essentieller Bedeutung, denn Mäuse ohne MFN1 oder MFN2 sterben während der Embryonalentwicklung *in utero* (Chen *et al.*, 2003). Für die Proteine der mitochondrialen Fissionsmaschinerie fehlen bisher Mausmodelle, jedoch führt ein Knockdown von Drp1 in *Caenorhabditis elegans* zu einer sehr frühen embryonalen Lethalität (Labrousse *et al.*, 1999). Zusätzlich ist die mitochondriale Fission ein wichtiger Faktor bei der Apoptose, denn in mehreren Apoptose-Modellen fragmentieren die Mitochondrien am Beginn der Zelltodprozesse (Frank *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2002; Breckenridge *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

Mitochondriale Fusion hingegen scheint Mitochondrien vor dem programmierten Zelltod schützen zu können; so ist beispielsweise die Fusion nach dem Eintreten der Apoptose

gehemmt (Karbowski *et al.*, 2004) und die Überexpression von Mitofusinen ermöglicht eine Reduzierung des Apoptosegrades (Sugioka *et al.*, 2004). Die Verminderung von OPA1 oder Mitofusinen resultiert in langsamerem Zellwachstum (Chen *et al.*, 2005) und erhöht die Anfälligkeit für apoptotische Stimuli (Olichon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Sugioka *et al.*, 2004).

Störungen der mitochondrialen Dynamik werden in Verbindung mit Krankheiten gebracht, so verursachen Mutationen im MFN2-Gen die erbliche Neuropathie Charcot-Marie-Tooth Typ 2A (CMT2A), welche durch Muskelschwäche und sensorischen Verlust in distalen Extremitäten charakterisiert ist (Züchner *et al.*, 2004). Die meisten Mutationen, die CMT2A hervorrufen befinden sich in oder in der Nähe von der GTPase-Region von MFN2 (Züchner *et al.*, 2004; Kijima *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2005). Inzwischen existiert ein Mausmodell für CMT2A, bei dem die Expression eines pathogenen Allels mit einer Punktmutation verwendet wurde. Die transgenen Mäuse entwickeln klinische Anzeichen von Charcot-Marie-Tooth Typ 2A und in den Motorneuronen der Tiere kommt es zur Zusammenlagerung von Mitochondrien (Detmer *et al.*, 2008).

Mutationen in OPA1 sind an der Erkrankung autosomale optische Atrophie beteiligt, die häufigste Form von erblichen optischen Atrophien, bei denen Patienten aufgrund eines Verlustes retinaler Ganglionzellen bilaterale Verkümmierungen des optischen Nervis aufweisen (Delettre *et al.*, 2002). Bisher wurden mehrere genetische Loci mit der autosomalen optischen Atrophie verknüpft, jedoch ist OPA1 das Gen, welches am häufigsten betroffen ist (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000). Neueste Studien berichten von einem *Drosophila*-Modell mit einer Mutation in dOPA1, dem *Drosophila melanogaster*-Ortholog zu OPA1, bei dem es zur mitochondrialen Fragmentierung und erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies kam (ROS, *reactive oxygen species*, Yarosh *et al.*, 2008).

Für die Bedeutung mitochondrialer Fission existiert ein klinischer Beweis, denn eine dominant-negative Mutation in Drp1 führte bei einer Neugeborenen zu lethalen Defekten in der Spaltung von Mitochondrien und Peroxisomen (Waterham *et al.*, 2007). Eine Expression der mutanten Drp1-Form in Kontrollzellen führte zu anormalen elongierten Mitochondrien und Peroxisomen. Eine Überexpression des Wildtyp-Drp1 hingegen in Fibroblasten der Patientin änderte den Phänotyp der Mitochondrien und Peroxisomen in den des Wildtyps (Waterham *et al.*, 2007).

## 2.10 Zielsetzung

Die wichtigen bioenergetischen Vorgänge, die in den Organellen ablaufen, sind nicht statisch. Mitochondrien bewegen sich in der Zelle und unterlaufen Fusions- und Fissionsprozesse. Begleitet wird dieser hohe Grad an Plastizität von Veränderungen in Größe, Anzahl und Masse der Mitochondrien, was in komplexen Abläufen vor sich geht, die wiederum von einer Vielzahl physiologischer Stimuli und Differenzierungsstadien abhängen, was etwa 1000 Gene miteinbezieht und 20 % der produzierten Zellproteinmenge. Solch eine Komplexität bedarf der Existenz eines Netzwerks, verschiedener koordinierter regulatorischer Signalwege (Nisoli *et al.*, 2004).

Um die Fusion und Fission von Mitochondrien zu studieren, existiert für Säuger bisher kein *in vitro*-System. Es wurden Untersuchungen zur mitochondrialen Fusion mit PEG-vermittelter Zellfusion durchgeführt (Borer *et al.*, 1989; Legros *et al.*, 2002; Legros *et al.*, 2004; Malka *et al.*, 2005) oder aber mit Viren, beispielsweise die HVJ-abhängige Zellfusion (*hemagglutinating virus of Japan*, HVJ, Eura *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2003).

Der Nachteil dieser Studien ist jedoch, dass einerseits exogene Faktoren wie PEG oder Viren vonnöten sind, um die Mitochondrien zu fusionieren und, dass es jeweils im Vorfeld zur Fusion von ganzen Zellen kommt.

In einer neueren Arbeit konnte gezeigt werden, dass mtDNA-freie  $\rho^0$ -Zellen endogen Megamitochondrien bilden, die durch Fusionsereignisse entstehen (Kukat *et al.*, submitted). Diese Riesenorganellen lassen sich wieder in ein ursprüngliches mitochondriales Netzwerk überführen. Zudem konnte die Induktion von Megamitochondrien ebenso in Zelllinien nachgewiesen werden, die über ein mitochondriales Genom verfügen (Kukat *et al.*, submitted).

Diese Erkenntnisse und über ein System zu verfügen, mit dem man Fusion und Fission in lebenden Zellen mit physiologischen Substanzen erzeugen kann, die so auch endogen entstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um vertiefende Einblicke in die Entstehung dieser Megamitochondrien zu bekommen. Vor allem wurde die Technik eingesetzt, um die Lokalisation und den Einfluss verschiedener Proteine der mitochondrialen Fusions- und Fissionsmaschinerien auf die Riesenorganellen zu untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt waren Experimente zu mitochondrialen Nucleoids und deren Verhalten innerhalb der Megamitochondrien.

## 3 Material

### 3.1 Biologisches Material

#### 3.1.1 Zelllinien

- 143B.DsRed1-Mito

Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
 Ursprung: Osteosarkom  
 adhärent  
 143B.TK<sup>-</sup> stabil transfiziert mit pDsRed1-Mito
- 143B.EGFP-Mito

Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
 Ursprung: Osteosarkom  
 adhärent  
 143B.TK<sup>-</sup> stabil transfiziert mit pEGFP-Mito
- 143B.TK<sup>-</sup>

Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
 Ursprung: Osteosarkom  
 adhärent
- 143B.TK<sup>-</sup>K7

Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
 Ursprung: Osteosarkom  
 adhärent  
 durch transiente Transfektion von 143B.TK<sup>-</sup> mit einer mitochondrial zielgesteuerten Restriktionsendonuklease hergestellte Zelllinie ohne mtDNA
- 143B.TK<sup>-</sup>K7gm

Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
 Ursprung: Osteosarkom  
 adhärent  
 durch transiente Transfektion von mit einer mitochondrial zielgesteuerten Restriktionsendonuklease hergestellte Zelllinie ohne mtDNA, stabil transfiziert mit pEGFP-Mito (ausgehend von 143B.TK<sup>-</sup>K7)
- 143B.TK<sup>-</sup>p<sup>0</sup>

Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
 Ursprung: Osteosarkom  
 adhärent  
 durch Inkubation von 143B.TK<sup>-</sup> mit Ethidiumbromid hergestellte Zelllinie ohne mtDNA
- 3T3

Organismus: *Mus musculus*  
 Ursprung: embryonale Fibroblasten  
 adhärent

- HeLa Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
Ursprung: Zervix-Karzinom  
adhärent
- HEp-2 Organismus: *Homo sapiens*, weiblich  
adhärent
- HFF Organismus: *Homo sapiens*, männlich  
Ursprung: Vorhaut-Fibroblasten  
adhärent
- HT1080C Organismus: *Homo sapiens*  
Ursprung: Fibrosarkom  
adhärent

### 3.1.2 Zellkulturmedien

Die in der Zellkultur eingesetzten Medien stammen von GIBCO/BRL (Eggenstein) bzw. von Sigma (Deisenhofen). Das Fötale Kälberserum (FCS) wurde von PAA (Cölbe) bezogen.

**Tab. 3-1:** Zusammensetzung der Kultivierungsmedien:

Zelllinie	Kultivierungsmedium
143B.TK <sup>-</sup> 143B.DsRed1-Mito 143B.EGFP-Mito	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose, mit GlutaMAXX, mit Pyruvat 5 % FCS 100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU)
143B.TK <sup>ρ0</sup> 143B.TK <sup>-</sup> K7 143B.TK <sup>-</sup> K7gm	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose, mit GlutaMAXX, mit Pyruvat 5 % FCS 100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU) 100 µg/ml Pyruvat 50 µg/ml Uridin
HeLa HEp-2 HT1080C	Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit Earle's Salzen, mit L-Glutamine, mit Natriumbicarbonat 100 µM <i>non-essential amino acids</i> 10 % FCS
HFF 3T3	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose, mit GlutaMAXX, mit Pyruvat 10 % FCS

### 3.1.3 Antikörper

Tab. 3-2: Auflistung der verwendeten Antikörper:

Antigen	Bezeichnung	Hersteller	Herkunft	Konzentration	Verdünnung
MFN2	affi-pu Mfn2NG	Manuel Rojo	Kaninchen polyklonal	-	1:200
DNM1L/Drp1	DNM1L monoclonal antibody (M01), clone 3B5	abnova	Maus monoklonal	1 mg/ml	1:50
hFis1	FIS1 monoclonal antibody (M01), clone 1G9	abnova	Maus monoklonal	1 mg/ml	1:100
Ziege anti-Maus-Cy3	Goat anti-Mouse IgG (H+L) - Cy3	Zymed	Ziege	1 mg/ml	1:100
Ziege anti-Kaninchen-FITC	Goat anti-rabbit IgG (H+L) - FITC	Zymed	Ziege	1,5 mg/ml	1:100

### 3.1.4 Bakterien

- *Escherichia coli* TOP10F' Genotyp: F' {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

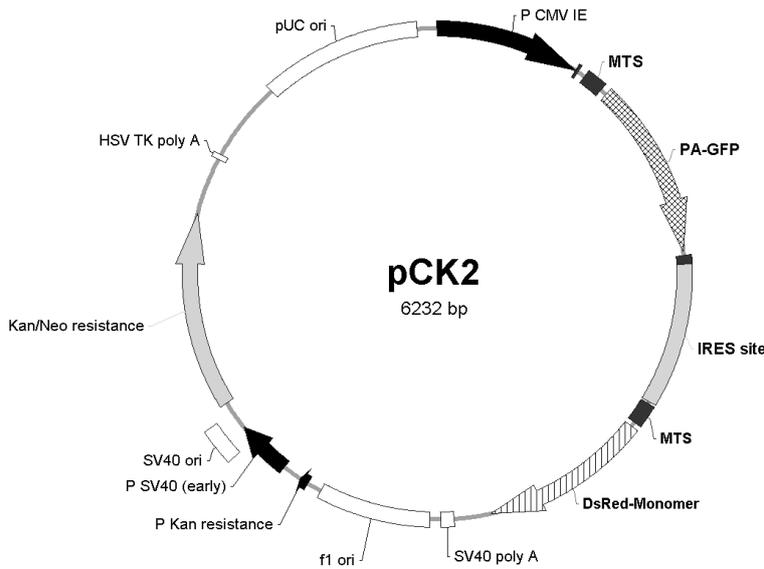
Dieser Stamm wurde zur Transformation des Vektors pCR<sup>®</sup> II-Topo<sup>®</sup> verwendet. Die chemisch transformations-kompetenten Zellen sind Bestandteil des TOPO-Kits der Firma Invitrogen.

- *Escherichia coli* XL1-Blue Genotyp: endA1 supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac<sup>-</sup> [F'proAB+lacI<sup>q</sup> ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]
- *Escherichia coli* DH5α Genotyp: F' / endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub><sup>+</sup>) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (Φ80dlacΔ(lacZ)M15)

Zur Vermehrung von Plasmiden und für Transformationen ligierter Vektorkonstrukte wurden routinemäßig die *Escherichia coli*-Stämme XL1-Blue und DH5α verwendet.

## 3.2 Molekularbiologisches Material

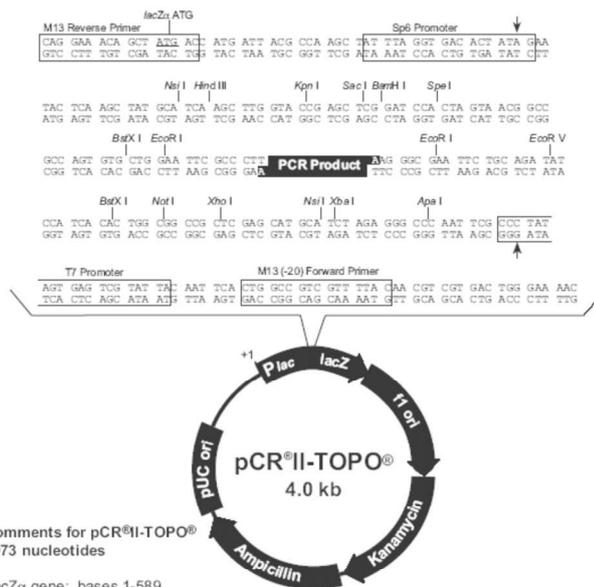
### 3.2.1 Plasmidvektoren



#### pCK2:

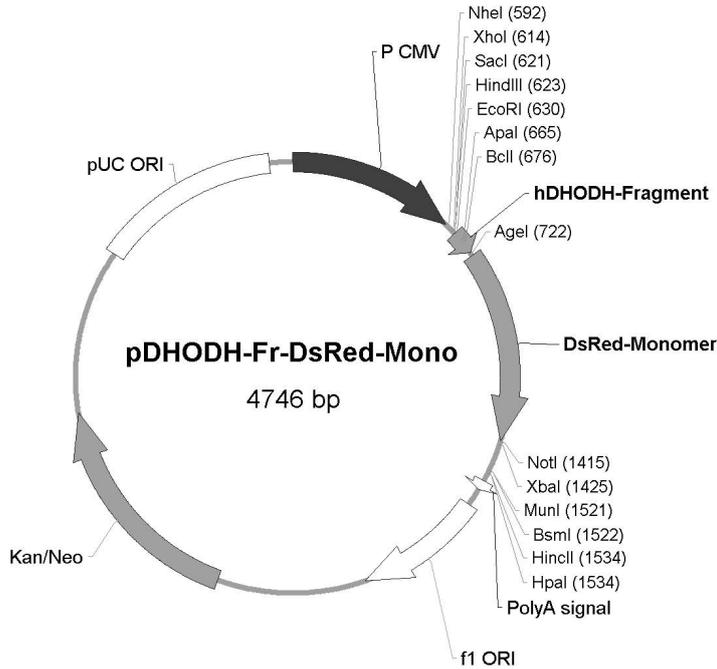
Plasmid zur gleichzeitigen Expression von photoaktivierbarem GFP (PA-GFP) und DsRed-Monomer, welche beide in die mitochondriale Matrix zielgesteuert werden, ermöglicht durch interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES).

Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.



#### pCR<sup>II</sup>-TOPO<sup>®</sup>:

Dieser Vektor ist Teil eines Kits der Firma Invitrogen. Er wurde für die Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang verwendet. Der Vektor besitzt ein Lac-Operon, welches eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht.



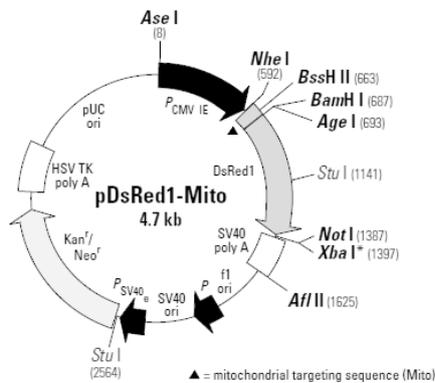
**pDHODH-Fr-DsRedM:**

Vektor zur Färbung der inneren Mitochondrienmembran mit DsRed-Monomer fusioniert an ein Fragment der humanen Dihydrooratatdehydrogenase (DHODH).

Hergestellt von Alexandra Kukat.

pDsRed1-Mito Vector Information

PT3451-5  
Catalog #6928-1



**pDsRed1-Mito:**

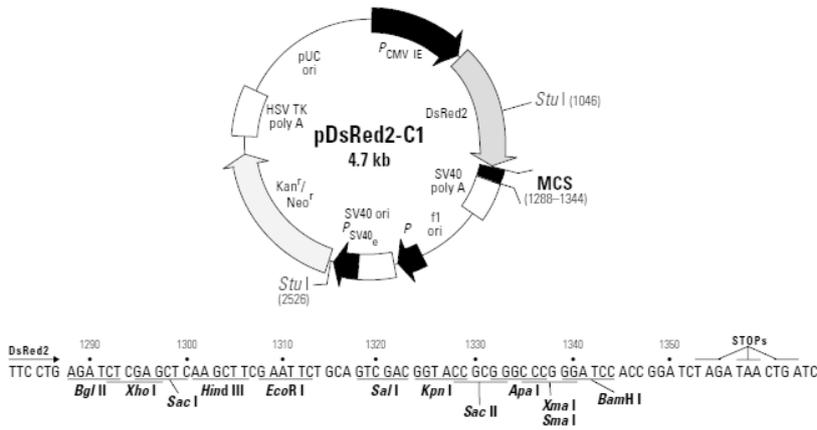
Durch diesen Vektor wird DsRed2 exprimiert, welches am C-Terminus mit einer mitochondrialen Signalsequenz versehen ist und somit in die Matrix der Mitochondrien transportiert wird (Firma Clontech).

pDsRed2-C1 Vector Information

PT3603-5  
Cat. No. 632407

**pDsRed2-C1:**

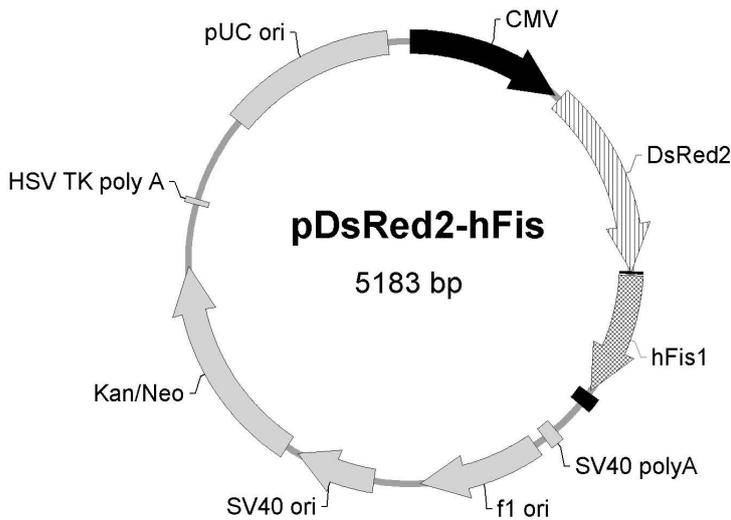
Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins, bei dem DsRed2 am N-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Firma Clontech).



**pDsRed2-hFis1:**

Plasmid zur Expression eines Fusionsproteins, bestehend aus DsRed2 und hFis1.

Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.

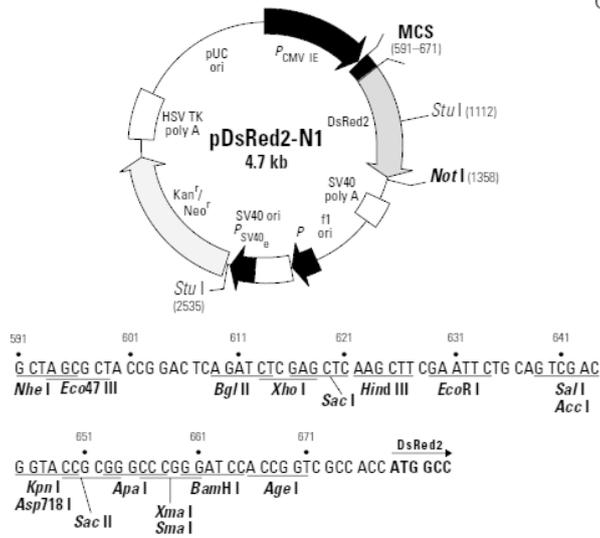


**pDsRed2-N1 Vector Information**

PT3604-5  
Catalog #6973-1

**pDsRed2-N1:**

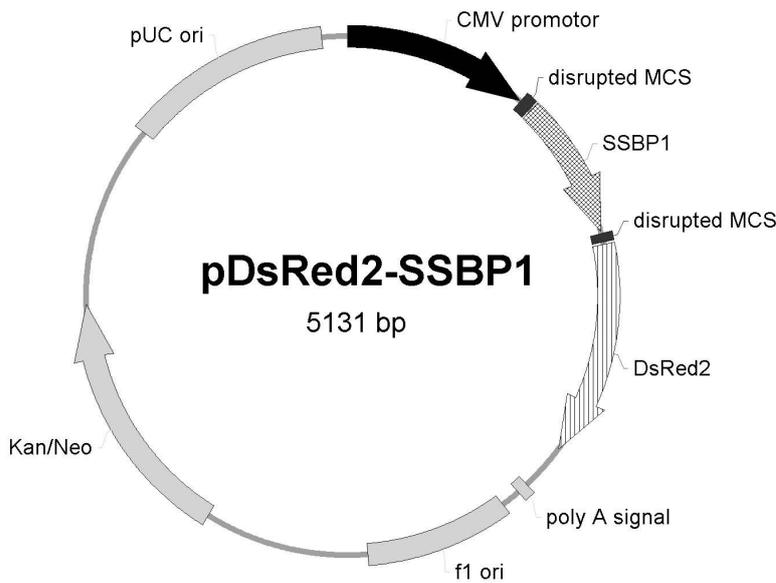
Dieser Vektor ermöglicht die Expression des Fusionsproteins, bei dem DsRed2 am C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Firma Clontech).

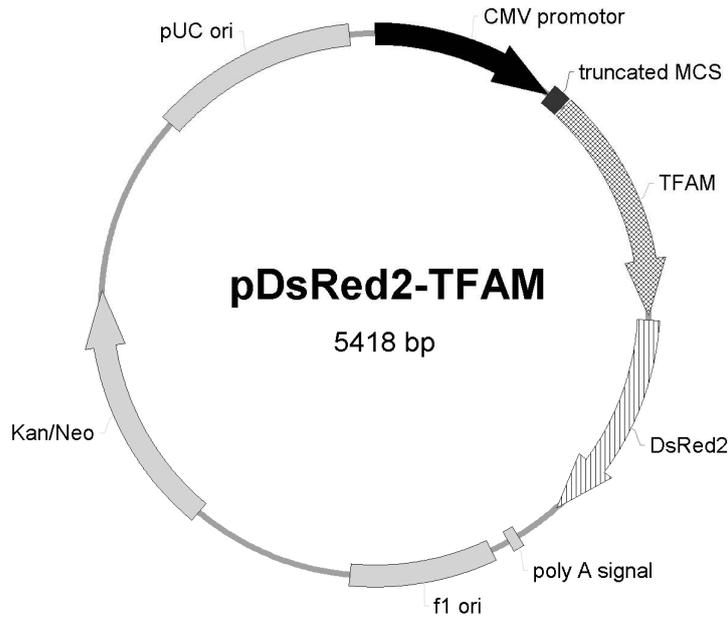


**pDsRed2-SSBP1:**

Vektor zur Expression des Fusionsproteines bestehend aus SSBP1 und DsRed2.

Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.

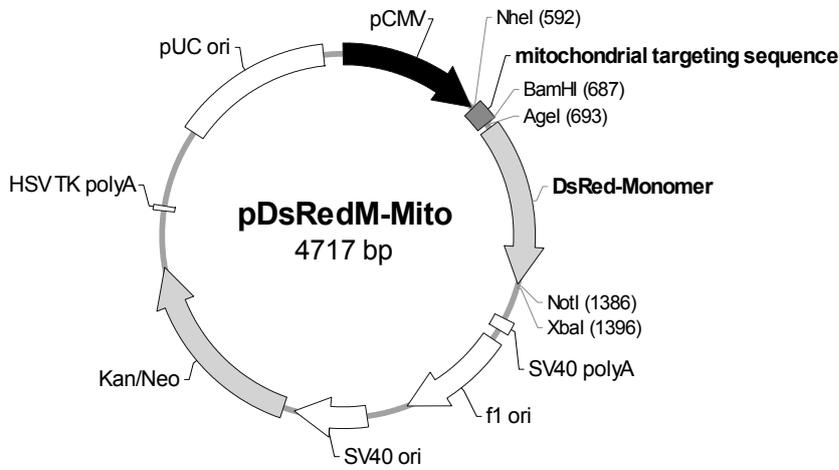




**pDsRed2-TFAM:**

Plasmid zur Expression des Fusionsproteines bestehend aus TFAM und DsRed2.

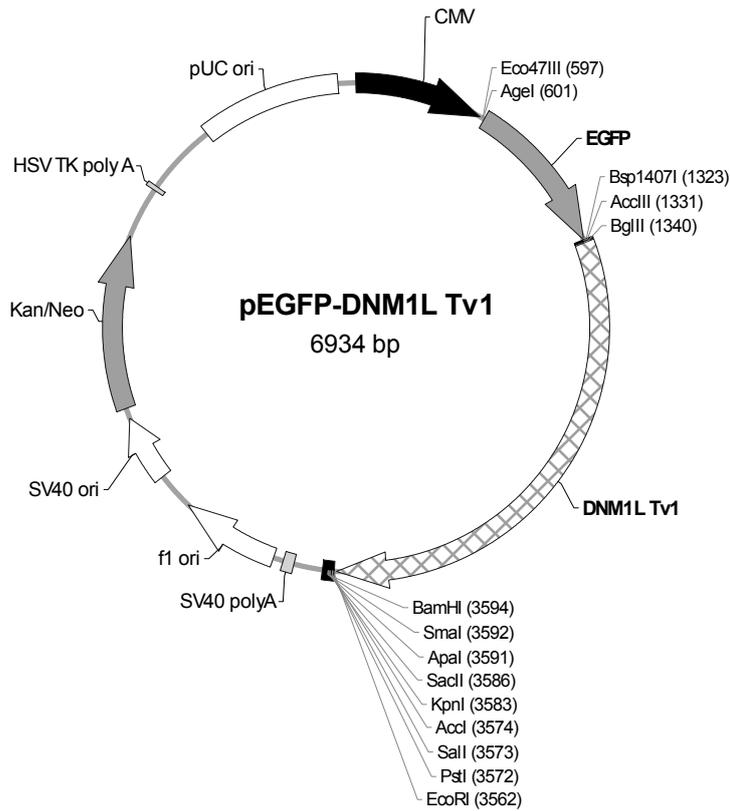
Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.



**pDsRedM-Mito:**

Vektor zur Expression von DsRed-Monomer, welches in die mitochondriale Matrix zielgesteuert wird.

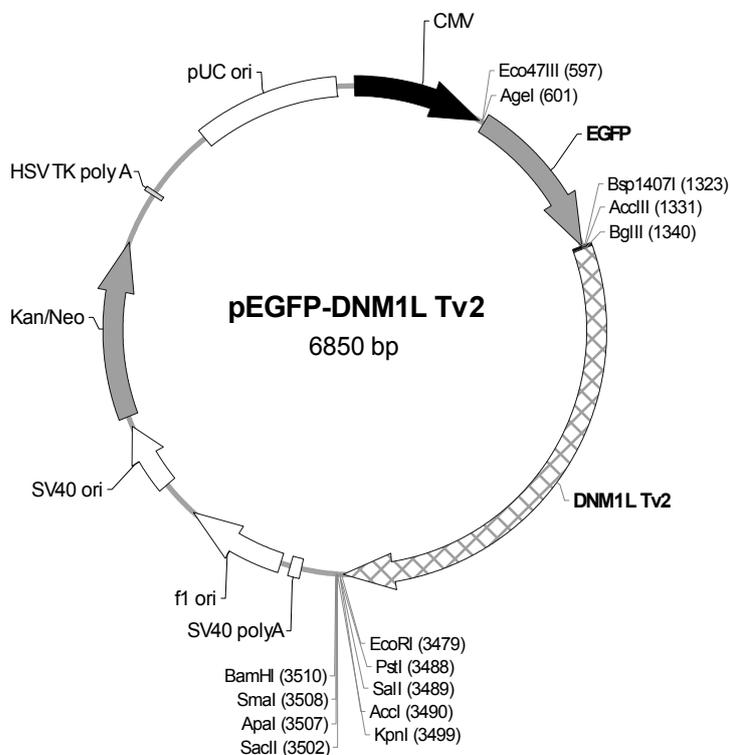
Hergestellt von Mandy Bloch.



**pEGFP-DNM1L, Tv1:**

Vektor zur Expression des Fusionsproteines, bestehend aus EGFP und DNM1L, Isoform 1.

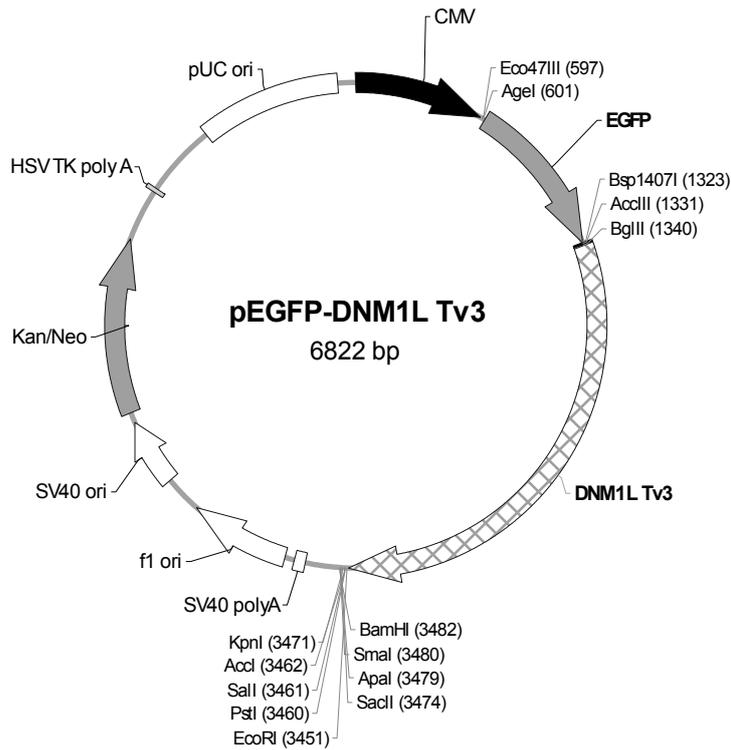
Hergestellt von Alexandra Kukat.



**pEGFP-DNM1L, Tv2:**

Vektor zur Expression des Fusionsproteines, bestehend aus EGFP und DNM1L, Isoform 2.

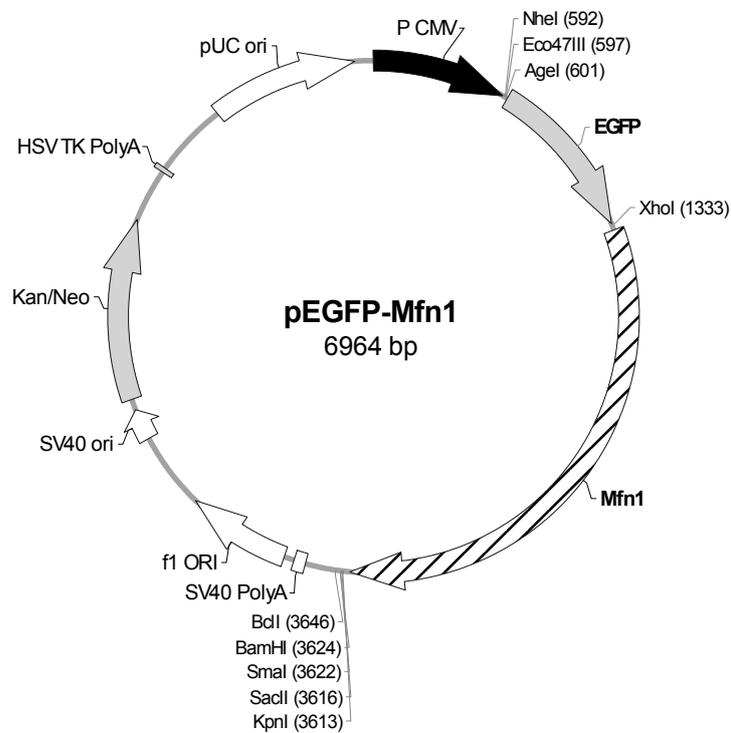
Hergestellt von Alexandra Kukat.



**pEGFP-DNM1L, Tv3:**

Vektor zur Expression des Fusionsproteines, bestehend aus EGFP und DNM1L, Isoform 3.

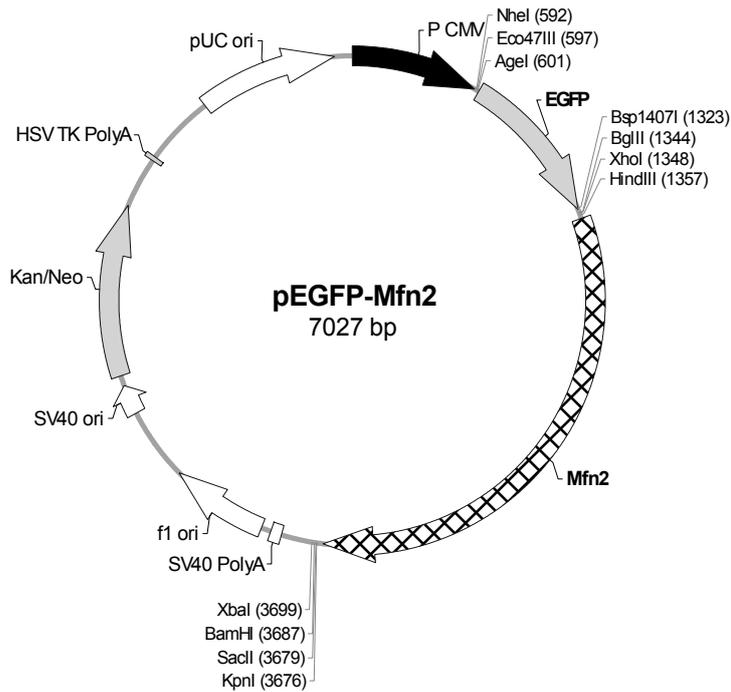
Hergestellt von Alexandra Kukat.



**pEGFP-Mfn1:**

Plasmid zur Expression des Fusionsproteines bestehend aus EGFP und Mitofusin 1 (Mfn1).

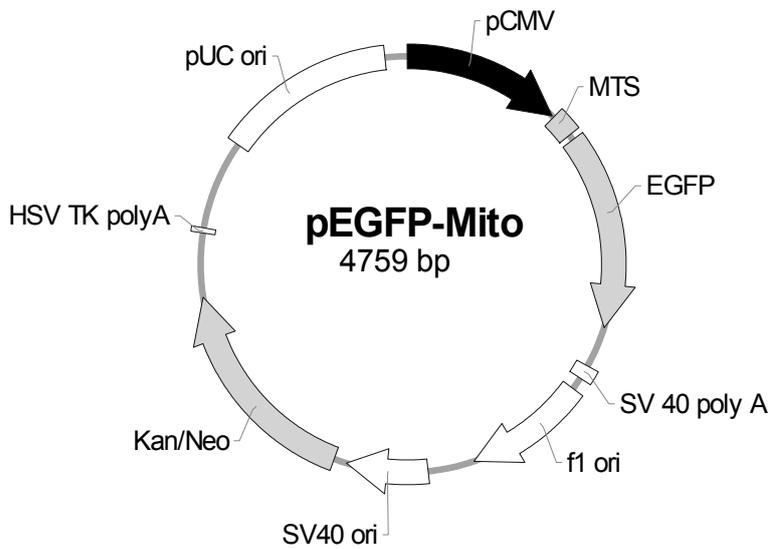
Hergestellt von Tina Krieger.



**pEGFP-Mfn2:**

Plasmid zur Expression des Fusionsproteines bestehend aus EGFP und Mitofusin 2 (Mfn2).

Hergestellt von Juliane Knebel.

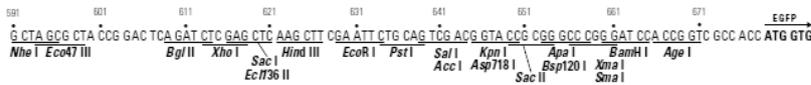
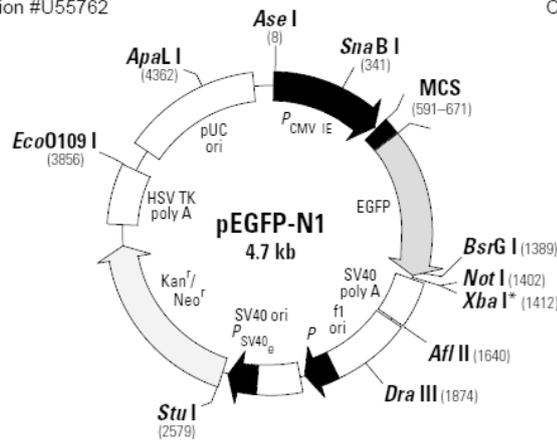


**pEGFP-Mito:**

Durch diesen Vektor wird EGFP exprimiert, welches am N-Terminus mit der mitochondrialen Signalsequenz der humanen Cytochrom c Oxidase Untereinheit 8A (MTS) versehen ist und somit in die Matrix von Mitochondrien transportiert wird.

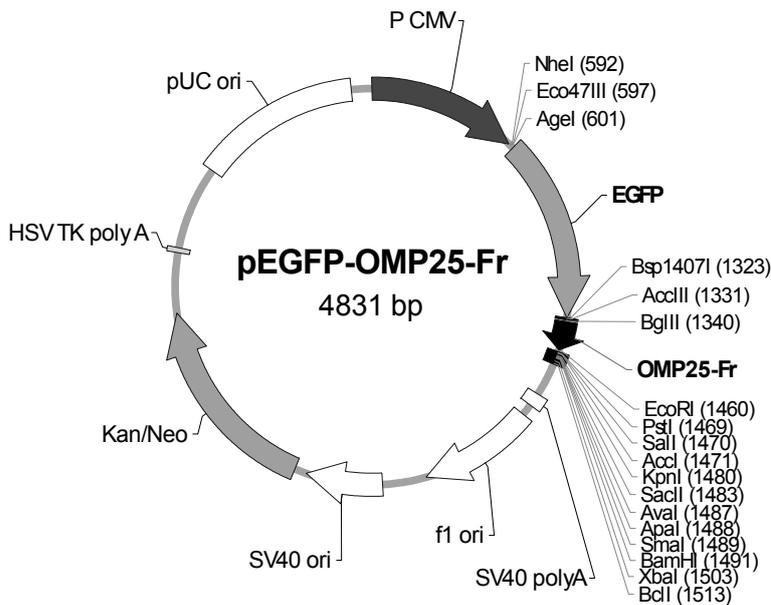
**pEGFP-N1 Vector Information**  
 GenBank Accession #U55762

PT3027-5  
 Catalog #6085-1 **pEGFP-N1:**



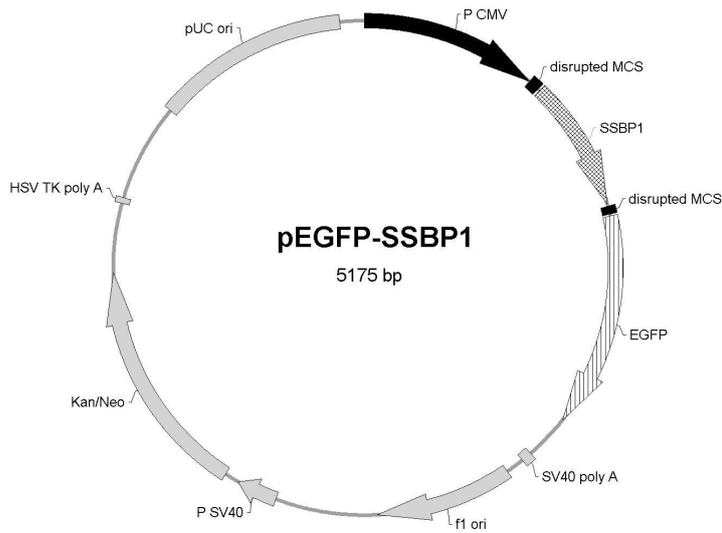
Dieser Vektor ermöglicht die Expression des Fusionsproteins, bei dem EGFP am C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Firma Clontech).

**pEGFP-OMP25-Fr:**



Vektor zur Expression von EGFP, welches in die mitochondriale äußere Membran zielgesteuert wird.

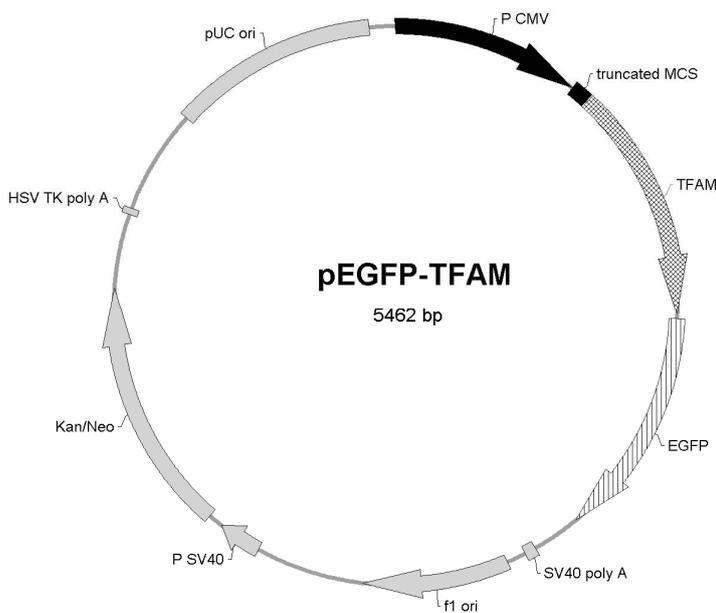
Hergestellt von Alexandra Kukat.



**pEGFP-SSBP1:**

Vektor zur Expression des Fusionsproteines bestehend aus SSBP1 und EGFP.

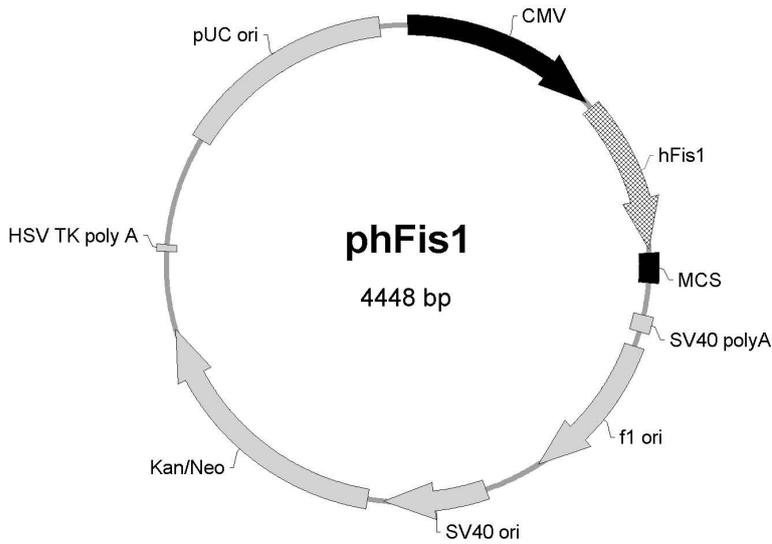
Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.



**pEGFP-TFAM:**

Plasmid zur Expression des Fusionsproteines bestehend aus TFAM und EGFP.

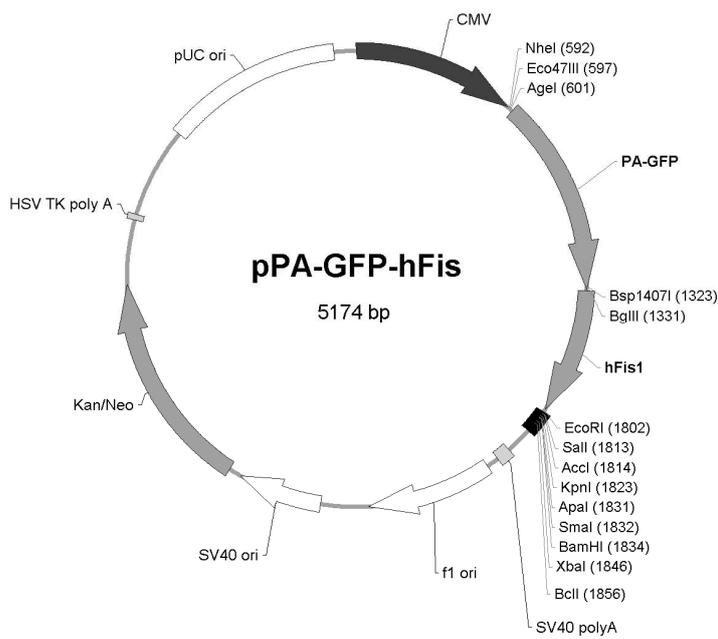
Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.



**phFis1:**

Vektor zur Expression von hFis1 ohne Fluoreszenzmarkierung.

Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit.



**pPA-GFP-hFis1:**

Plasmid zur Expression eines Fusionsproteines, bestehend aus photoaktivierbarem GFP (PA-GFP) und hFis1.

Hergestellt von Alexandra Kukat.

### 3.2.2 Enzyme

Enzym	Hersteller/Lieferant
DNase I (RNase-frei)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung
Phusion <i>High-Fidelity DNA Polymerase</i>	FINNZYMES, Heidelberg
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M., MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock™ <i>Ribonuclease Inhibitor</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase H	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SuperScript™ II-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ III-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco, Karlsruhe

### 3.2.3 Oligodesoxynukleotide

Name	tail-Sequenz	core-Sequenz	T <sub>a</sub>
hFis-001-FOR (3)	AATTCCGGA	ATGGAGGCCGTGCTGAACGAG	55 °C
hFis1-459-REV (2)	AATTCTAGA	TCAGGATTGGACTTGGACACAGC	55 °C
M13 FOR (-20)	-	GTAAAACGACGGCCAG	48 °C
M13 REV	-	CAGGAAACAGCTATGAC	48 °C
P CMV IE-566-FOR	-	GCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA	53 °C
pEGFP-C1-1489-REV	-	TTCAGGTCAGGGGGAGGTG	53 °C
SSBP1-079-FOR	-	ATGTTTCGAAGACCTGTATTACAGGTA	56 °C

## MATERIAL

---

SSBP1-079-FOR (2)	GTCCGAATTC	ATGTTTCGAAGACCTGTATTACAGGTACT	54 °C
SSBP1-522-REV	AGATTGTCGACA	CTCCTTCTCTTTCGTCTGGTCACTCAG	54 °C
SSBP1-525-REV		- CTACTCCTTCTCTTTCGTCTGGTCACTCAG	56 °C
TFAM-0133-FOR		- ATGGCGTTTCTCCGAAGCATGTG	55 °C
TFAM-0133-FOR (2)	AATCCCGCGG	ATGGCGTTTCTCCGAAGCATGTG	55 °C
TFAM-0870-REV (3)	TTACCGGTAA	ACACTCCTCAGACCATATTTTCG	55 °C
TFAM-0873-REV		- TTAACACTCCTCAGACCATATTTTCGTTG	55 °C

Die core-Sequenz gibt die komplementäre Sequenz an und die tail-Sequenz ist eine artifizielle Sequenz, die oftmals Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen beinhaltet.

$T_a$  = Verwendete Annealing-Temperatur in der Polymerase-Kettenreaktion

### 3.2.4 DNA-Größenstandards

DNA-Größenstandard	Hersteller/Lieferant
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker, 3	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
pUC Mix, 8	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.3 Chemikalien

Bis auf die unten aufgeführten Produkte wurden alle verwendeten Chemikalien von AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in Analysequalität bezogen.

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Bovines Serum Albumin (BSA)	Invitrogen, Erlangen
Cleaning Agent	Beckman Coulter, Krefeld
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP-Set)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Fugene HD Transfection reagent	Roche, Mannheim
G418 (Geneticin)	Invitrogen, Karlsruhe
Hoechst 33342	Applichem, Darmstadt

## MATERIAL

---

Metafectene Pro <sup>®</sup> Transfection Reagent	Biontex, Martinsried
Metafectene <sup>®</sup> Transfection Reagent	Biontex, Martinsried
MitoTracker <sup>®</sup> Deep Red 633	
MitoTracker <sup>®</sup> Green	Invitrogen, Karlsruhe
MitoTracker <sup>®</sup> Red CMXRos	
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD TriFast 100 ml	Peqlab, Erlangen
QIAprep <sup>®</sup> Lysepuffer P2	Qiagen, Hilden
QIAprep <sup>®</sup> Neutralisationspuffer N3	Qiagen, Hilden
QIAprep <sup>®</sup> Resuspensionspuffer P1	Qiagen, Hilden
Seakem LE Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, ME USA

### 3.4 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller/Lieferant
Edelstahlklonierungszyylinder	eigene Herstellung
Einmalküvetten 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Filterspitzen	Greiner, Frickenhausen
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Gefäße	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellklingen	Swan Morton, Sheffield, Großbritannien
Spritzenfilter, PES-Membran; 0,2 µm	Dr Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Sterile Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Sterilindikator-Klebeband für Dampfsterilisation	A. Hartenstein, Würzburg
UVette	Eppendorf, Hamburg

## MATERIAL

---

Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman Chromatography Paper (3MM)	Whatman Inc.Ltd., Maidstone, Großbritannien
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen mit Glasboden	MatTek Corporation, Ashland, USA

## 3.5 Kits

Kit	Hersteller/Lieferant
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega Corporation, Mannheim

## 3.6 Software, Programme, Datenbanken

Software	Hersteller/Lieferant/Website
Adobe Acrobat Reader 7.0	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Acrobat Standard 6.0	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Photoshop CS Version 8.0.1	Adobe Systems GmbH, München
AlphaEase FC	Biozym, Hessisch Oldendorf
BioEdit Sequence Alignment Editor	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
Chromas Version 1.45	<a href="http://technelysium.com.au/chromas.html">http://technelysium.com.au/chromas.html</a>
CorelDRAW 12	Corel, Unterschleißheim
Fermentas <i>doubledigest</i>	<a href="http://www.fermentas.com/doubledigest/">http://www.fermentas.com/doubledigest/</a>
Fluoreszenz-Spektren	<a href="http://www.mcb.arizona.edu/IPC/fret/indexb.html">http://www.mcb.arizona.edu/IPC/fret/indexb.html</a>
Huygens Deconvolution Software	Scientific Volume Imaging b.v., Niederlande
Leica LAS AF	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica Application Suite	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft Office 2003	Microsoft, Unterschleißheim

## MATERIAL

---

Primer Express 2.0 Express Biosystems.	Applied Biosystems, Forster City, USA
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Reference Manager 11	Thomson Research Soft
Sequenz-Alignment	<a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>
The Sequence Manipulation Suite	<a href="http://bioinformatics.org/sms/">http://bioinformatics.org/sms/</a>
Visual Cloning 2000	Redasoft, Toronto, Kanada
Webcutter 2.0	<a href="http://rna.lundberg.gu.se/cutter2">http://rna.lundberg.gu.se/cutter2</a>
WU-Blast	<a href="http://blast.wustl.edu/">http://blast.wustl.edu/</a>

### 3.7 Laborgeräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
Autoklav V-150 Systec	Laborsystemtechnik, Wettengel
Brutschrank Function Line	Heraeus, Langenselbold
Brutschrank HeraCell 240	Heraeus, Langenselbold
Destille Water still A4000D	Aquatron, Kungsham, Schweden
Eismaschine AF 100 Scotsman	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer i-Mupid	Cosmo Bio Co Ltd., Eurogentec, Köln
Gefrierschrank -20°C Premium_no_frost	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank -80°C Forma-86C ULT Freezer	Thermo electron corporation, Marietta, OH, USA
Inverses Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Kamera DFC 350 FX	Leica Microsystems, Wetzlar
Konfokales Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschrank Premium_no_frost	Liebherr, Biberach an der Riss
Laborschüttler Ika KS 260 Basic	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle MW 500 PROFI	AEG, Aachen
PCR-Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter pH 740 WTW	Inolab, Weilheim
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Research (2,5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe EasyPet	Eppendorf, Hamburg
Scanner Expression 1680	Epson, Düsseldorf

## MATERIAL

---

Schüttler Forma orbital shaker	Thermo electron corporation, Marietta, OH, USA
Speed Vac SPD Speed Vac	Thermo Servant, Holbrook, NJ, USA
Spülmaschine Professional G 7883 CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank HeraSafe HSP 12	Heraeus, Langenselbold
Stickstofflagertank Cryo Plus 2	Cryo Anlagenbau GmbH, Wilnsdorf
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank FD 240	Binder, Tuttlingen
UV-Transluminator mit Videokamerasystem	Biozym, Hessisch Oldendorf
Alphaimager™ Biozym/Alpha Innotech	
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage Sartorius CP 3202 S	Sartorius, Göttingen
Waage-Feinwaage Sartorius CP 64	Sartorius, Göttingen
Wasserbad 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator	LKB, Bromma, Schweden
Wasserbad Memmert WB 22	Memmert GmbH, Schwabach
Zellzählgerät Vi-Cell™XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mini Spin Plus	Eppendorf, Hamburg



### Material:

- |   |  |
|---|--|
| • 1x TSS (Transformation and Storage Solution) (pH 6,5) | LB-Medium<br>10 % (w/v) PEG 4000<br>5 % (v/v) DMSO<br>20 – 50 mM Mg <sup>2+</sup> (MgCl <sub>2</sub> ) |
|---|--|

Die 1x TSS-Lösung wird auf einen pH von 6,5 eingestellt und nach dem Sterilfiltrieren bei -20 °C aufbewahrt.

### Durchführung:

Zunächst wurden 5 bis 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft und bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 1 ml der Übernacht-Flüssigkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte (OD) nach Bradford ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) von 0,3 – 0,4 erreicht war. Danach wurde die Suspension auf vier 50 ml Röhren aufgeteilt und bei 1000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde verworfen, die Pellets in je 250  $\mu\text{l}$  eiskaltem 1x TSS resuspendiert und in 50  $\mu\text{l}$ -Aliquots in gekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

## 4.1.4 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien aus dem umgebenden Medium. Hierzu wurde die Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA nach dem „Ein-Schritt“-Verfahren (Chung *et al.* 1989) durchgeführt.

### Material:

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| • SOC-Medium (1 Liter)          | 20,0 g Trypton<br>5,0 g Hefeextrakt<br>0,5 g NaCl<br>2,5 ml 1 M KCl |
| • 1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung |   |
| • 1 M Glukose-Lösung            |   |

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde das SOC-Medium durch Zugabe von 10 ml einer sterilen 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 20 ml einer sterilen 1 M Glukose-Lösung komplettiert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

### Durchführung:

Die chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz hinzugefügt und vermischt. Der Transformationsansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach 30 bis 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend wieder für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurden 900  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben, die Bakteriensuspension in ein 15 ml-Gefäß überführt und der Transformationsansatz bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Jeweils eine

$1/10$ - und eine  $9/10$ -Verdünnung der Bakterien wurde auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C aufbewahrt. Die entstandenen Klone wurden über eine *Colonyscreening-PCR* und/oder einer DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen analysiert.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolierung und Reinigung von DNA

#### 4.2.1.1 *Reinigung von DNA durch Natriumacetat-/Ethanol-fällung*

##### Material:

- 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2
- 100 % Ethanol (-20 °C)
- 70 % Ethanol

##### Durchführung:

Um DNA einer wässrigen Lösung zu präzipitieren, wurde diese mit  $1/10$  Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt und mit 3 Volumen eiskaltem, absoluten Ethanol für 30 – 60 min bei -70 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert (12000 g, 30 min), der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet gewaschen. Dazu wurden 500 µl 70 %-iger Ethanol auf das Pellet pipettiert und bei 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die DNA für 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, um verbliebene Ethanol-Reste zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in 20 – 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

#### 4.2.1.2 *Reinigung von DNA durch Isopropanol-fällung*

##### Material:

- 100 % Isopropanol
- 70 % Ethanol

##### Durchführung:

Für die Fällung von DNA in wässrigen Lösungen mit Isopropanol wurde zu dem Ansatz ein 0,7-faches Volumen 100 % Isopropanol gegeben, gemischt und im Anschluss für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Waschen des DNA-Sediments mit 70 % Ethanol und anschließender Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde die DNA in ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

### **4.2.1.3 *Reinigung von DNA durch präparative Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit***

Die Methode der Gelextraktion dient dazu, ein spezifisches DNA-Fragment definierter Größe aus einem Agarosegel isolieren und somit alle weiteren im Gel enthaltenen DNA-Fragmente eliminieren zu können.

#### Durchführung:

Durchgeführt wurde die Gelextraktion nach den Angaben des Herstellerprotokolls für das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen).

Nach einer präparativen Gelelektrophorese wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) mit Hilfe eines Skalpells herausgetrennt. Die Masse des Gelstückes wurde ermittelt, je Gewichtsanteil mit drei Anteilen Puffer QG versetzt und bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  etwa zehn Minuten inkubiert bis sich das Gelstück vollständig gelöst hatte. Daraufhin wurde die Lösung mit einem Anteil Isopropanol je Gewichtsanteil Gel gemischt, die Probe auf eine QIAquick Spin-Säule gegeben und für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule mit  $750 \text{ }\mu\text{l}$  Puffer PE gewaschen (eine Minute, maximale Geschwindigkeit). Nach dem Waschen wurde die Säule für eine Minute trocken zentrifugiert und in ein sauberes  $1,5 \text{ ml}$ -Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die DNA mit  $50 \text{ }\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O durch eine Zentrifugation eluiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Agarosegels bestimmt.

### **4.2.1.4 *Reinigung von DNA mit dem Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System***

Diese Methode der Reinigung von DNA-Fragmenten dient dazu, ein PCR-Produkt aus dem PCR-Ansatz zu isolieren und somit Primer, dNTPs, Puffer und die Polymerase eliminieren zu können.

#### Durchführung:

Durchgeführt wurde die PCR-Reinigung nach den Angaben des Herstellerprotokolls für das Wizard®SV Gel an PCR Clean-Up System (Promega, Stand Januar 2006).

Der PCR-Ansatz wurde mit einem äquivalenten Volumenanteil Membranbindungslösung vermischt, auf eine SV Minicolumn Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (1 Minute,  $16000 \text{ g}$ ). Das Eluat wurde verworfen und die Säule mit  $700 \text{ }\mu\text{l}$  Waschlösung gewaschen und zentrifugiert (1 Minute,  $16000 \text{ g}$ ).

Dieser Schritt wurde mit  $500 \text{ }\mu\text{l}$  der Waschlösung wiederholt (5 Minuten,  $16000 \text{ g}$ ), die Säule anschließend trocken zentrifugiert (1 min,  $16000 \text{ g}$ ) und in ein sauberes  $1,5 \text{ ml}$ -Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Elution erfolgte mit  $30 - 50 \text{ }\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O durch Zentrifugieren (1 Minute,  $16000 \text{ g}$ ), anschließend wurde die Konzentration mithilfe eines Agarosegels bestimmt.

### 4.2.1.5 Gewinnung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

#### *E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA mit Hilfe des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel in einer Säule unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z. B. ddH<sub>2</sub>O) eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt in der Regel einen sehr hohen Reinheitsgrad und kann somit für empfindlichere Reaktionen wie die Transfektion von Zellen verwendet werden.

#### Durchführung:

Fünf Milliliter einer Übernachtflüssigkultur wurden bei 5000 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 250 µl Lösung I/RNase A resuspendiert und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 µl Lösung II und vier- bis sechsmaligen Invertieren, wurde das Lysat mit 350 µl Lösung III versetzt und gemischt, bis sich ein weißes Präzipitat bildete. Daran schloss sich ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 10000 g an. Der Überstand wurde in die HiBind<sup>®</sup>-Miniprep-Zentrifugensäule gefüllt, für eine Minute bei 10000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurden 750 µl des mit absolutem Ethanol komplettierten DNA-Waschpuffers auf die Säule pipettiert und für eine Minute bei 10000 g zentrifugiert. Zum Trocknen wurde die Säule eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und im Anschluss wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O durch einminütiges Zentrifugieren bei 10000 g in einem neuen 1,5 ml-Gefäß eluiert.

#### *QIAprep<sup>®</sup>-Lösungen*

Der Zellaufschluss von Bakterien mit den QIAprep<sup>®</sup>-Lösungen (Qiagen) verläuft analog zu dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I, die Plasmid-DNA wird anschließend jedoch nicht in einer Säule durch Adsorption an eine Gelmatrix isoliert, sondern mit Isopropanol gefällt.

#### Material:

- QIAprep<sup>®</sup>-Lösungen P1, P2 und N3
- 100 % Isopropanol
- 70 % Ethanol

#### Durchführung:

Drei Milliliter einer Übernachtflüssigkultur wurden bei 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 350 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach dem Überführen der Lösung in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß, wurde 350 µl Puffer P2 zugegeben, das Gefäß mehrmals vorsichtig invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde zur Neutralisierung 350 µl Puffer N3 zugegeben, das Gefäß erneut mehrmals invertiert und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Daran schloss sich ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 g an, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der resultierende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumeneinheiten

Isopropanol versetzt und bei 10000 g für 30 Minuten bei 15 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 10000 g für 10 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet, in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### 4.2.2 Isolierung und Reinigung von RNA

#### 4.2.2.1 Isolierung von RNA aus Kulturzellen mit peqGOLD TriFast™

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Kulturzellen wurde peqGOLD TriFast™ verwendet, ein gebrauchsfertiges Reagenz, das die gleichzeitige Isolation von RNA, DNA und Proteinen ermöglicht. Die Wirkung von TriFast beruht auf seiner Eigenschaft als monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisocyanat effektiv Proteine zu denaturieren und RNasen zu inhibieren.

##### Material:

- peqGOLD TriFast™
- Chloroform
- 75 % Ethanol
- DEPC-H<sub>2</sub>O

Zur Herstellung von DEPC-H<sub>2</sub>O, wurde doppeldestilliertes H<sub>2</sub>O mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht unter Abzug inkubiert und anschließend autoklaviert.

##### Durchführung:

Die Isolation von RNA aus Kulturzellen für den Einsatz in die Reverse Transkriptionsreaktion erfolgte während der logarithmischen Wachstumsphase. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst. Nach Zugabe von Medium wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten bei 4 °C pelletiert und der Medien-Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml peqGOLD TriFast™ pro 5 – 10 x 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Daran schloss sich eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur an, um eine Dissoziation der Nukleotid-Komplexe zu gewährleisten.

Für die Überprüfung einer effizienten Herabregulierung der spezifischen mRNAs in den RNA Interferenz-Versuchen wurden die Zellen einer 10 cm-Schale 48 Stunden nach der Transfektion einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Danach wurden die Zellen in 1,2 ml peqGOLD TriFast™ aufgenommen, fünf Minuten bei Raumtemperatur in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß inkubiert und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml TriFast wurde das Gefäß 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und nach einer drei- bis zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch erfolgte eine Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere Phenol/Chloroform-Phase und eine Interphase, in denen sich die DNA und die Proteine befanden und eine obere wässrige Phase, in der die RNA angereichert war. Nach der Überführung dieser wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß erfolgte die Fällung der RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml eingesetzter peqGOLD TriFast™-Lösung und einer Inkubation der Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Die Pelletierung der RNA erfolgt durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g.

Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 75 %- igem Ethanol und anschließendem Lufttrocknen, wurde die RNA in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die Menge der RNA photometrisch quantifiziert. Anschließend wurde die RNA aliquotiert bei -70 °C gelagert.

### 4.2.3 Enzymatische Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion

#### 4.2.3.1 Enzymatische Amplifizierung mit der *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient in erster Linie zur *in vitro*-Amplifizierung von definierten DNA-Abschnitten. Voraussetzung ist, dass von dieser DNA Teile der Sequenz bekannt sind, an der sich Oligodesoxynukleotide (Primer) für die durchzuführende Polymerasereaktion anlagern können. Amplifiziert wird die DNA-Region zwischen zwei Primern, die unter geeigneten Bedingungen bis zu mehreren kb groß sein kann. Voraussetzung für die Polymerase-Kettenreaktion ist eine thermostabile DNA-Polymerase. Der Standard-Ansatz einer Polymerase-Kettenreaktion wurde entweder mit rekombinanter *Taq*-Polymerase oder mit klonierter *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Die *Taq*-DNA-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, wohingegen die *Pfu*-DNA-Polymerase aus dem Archaeum *Pyrococcus furiosus* isoliert wurde. Beide besitzen ein Temperaturoptimum von 72 °C und behalten ihre Aktivität, auch wenn sie für einige Minuten auf über 95°C erhitzt werden. Die *Taq*-Polymerase weist eine höhere Einbaugeschwindigkeit gegenüber der *Pfu* auf, jedoch besitzt die *Pfu*-Polymerase eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, die es ihr ermöglicht, Nukleotide auf Korrektheit des Einbaus zu überprüfen und gegebenenfalls auszutauschen.

Die Polymerase-Kettenreaktion läuft in einem gepufferten Reaktionsgemisch ab, das neben zwei Oligodesoxynukleotiden (Primern), freien Desoxynukleotiden (dNTPs) und der zu amplifizierenden DNA das Polymerase-Enzym enthält. Ein sich zyklisch wiederholendes Temperaturintervallsystem steuert die Kettenreaktion. Zu Beginn der *in vitro*-Amplifizierung wird die DNA bei 94 °C für 3 min denaturiert. Dabei entsteht einzelsträngige DNA, an die sich jetzt die in der Lösung befindlichen Primer bei einer für das Primerpaar spezifischen Hybridisierungstemperatur anlagern können. Diese Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge. Die anschließende Elongation erfolgt bei einer für die Aktivität der Polymerase günstigen Temperatur von 72 °C. Die gewählte Elongationszeit hängt dabei von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes ab. Beim darauf folgenden Zyklus dient nun auch die eben neu synthetisierte DNA als Matrize. So kommt es theoretisch nach jedem Reaktionsdurchlauf zu einer Verdopplung der DNA und somit zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes. Es werden in der Regel 35 Zyklen durchlaufen, um ein spezifisches Fragment in genügend großer Ausbeute zu erhalten.

### Standard-Reaktionsansatz (100 µl):

- 10,0 µl 10x PCR-Puffer mit Magnesium
  - 2,0 µl dNTP-Lösung (10 mM)
  - 1,0 µl DNA-Lösung (25 pg - 100 ng)
  - 3,0 µl *Forward*-Primer (10.0 pmol/µl)
  - 3,0 µl *Reverse*-Primer (10.0 pmol/µl)
  - 0,5 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)      bzw. 1 µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U/µl)
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

### Reaktionsbedingungen für 35 Zyklen:

Denaturierung:	T <sub>D</sub>	93 °C	1 min
Hybridisierung:	T <sub>H</sub>	s.u.	1 min
Elongation:	T <sub>E</sub>	72 °C	1 - 2 min

Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der niedrigsten theoretischen Hybridisierungstemperatur beider Primer und wurde meist nach dem *Nearest-Neighbour*-Algorithmus berechnet, bei dem sowohl thermodynamische Werte als auch experimentelle Daten in die Berechnung miteinbezogen werden.

### Verwendete Reaktionspuffer:

- für *Taq*-DNA-Polymerase (10x)  
100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100
- für *Pfu*-DNA-Polymerase (10x)  
200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1% Triton X-100,  
1 mg/ml BSA, 20 mM MgSO<sub>4</sub>

### *Colony*screening-PCR

Mit Hilfe der *Colony*screening-PCR ist es möglich, eine große Anzahl an Bakterienkolonien in kurzer Zeit auf das richtige Klonierungsprodukt überprüfen zu können. Dazu wird die DNA einer Bakterienkolonie direkt ohne vorherige Isolierung mit Hilfe der PCR amplifiziert, da die zu testenden Bakterien während der initialen Denaturierung durch die Hitze zerstört werden und die in ihnen enthaltene DNA als Matrize für eine Polymerase-Kettenreaktion zur Verfügung steht.

Hierzu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein geringer Teil der Kolonie in ein Reaktionsgefäß, das alle Komponenten der PCR außer der DNA-Matrize enthielt, übertragen. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde analog zu 4.2.3.1 mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt, der Schritt der initialen Denaturierung wurde jedoch auf fünf Minuten ausgedehnt.

Um die positiven Kolonien nach der PCR noch verwenden zu können, wurde eine Replika-Platte angelegt. Von dieser konnten dann, sofern die *Colony*screening-PCR als Ergebnis positive Klone bestätigte, Übernacht-Flüssigkulturen angesetzt werden, um die gewünschte DNA mittels Plasmidpräparation aus den Bakterien zu isolieren.

#### 4.2.3.2 *Enzymatische Amplifizierung mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES)*

Die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase besitzt die Eigenschaften einer DNA-Polymerase mit Korrektur-Lese-Aktivität vereint mit einer Prozessivitäts-Verstärkungs-Domäne. Dadurch ist es möglich lange und schwierige DNA-Matrizen in kurzer Zeit zu amplifizieren. Nach Herstellerangaben besitzt die *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase zudem noch eine geringere Fehlerrate als die *Taq*- und *Pfu*-Polymerase.

##### Reaktionsansatz:

- 10 µl 5x *Phusion* HF Puffer
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 2,5 µl *Forward*-Primer (10 pmol)
- 2,5 µl *Reverse*-Primer (10 pmol)
- 50 – 500 pg DNA
- 0,5 µl *Phusion* DNA Polymerase (2 U/µl)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

Für die PCR nach einer reversen Transkription wurden 1 – 10 µl des RT-Ansatzes als Matrize verwendet.

##### Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung:	T <sub>Di</sub>	98 °C	30 s
Zyklische Denaturierung:	T <sub>Dz</sub>	98 °C	5 – 10 s
Hybridisierung:	T <sub>H</sub>	45 – 72 °C	10 – 30 s
Elongation:	T <sub>E</sub>	72 °C	15 – 30 s / 1 kb
35 Zyklen			
Finale Extension:	T <sub>F</sub>	72 °C	5 -10 min

#### 4.2.4 RT-PCR

Ursprünglich wurde der Mechanismus der Reversen Transkription bei Retroviren entdeckt. Diese verwenden eine RNA-abhängigen DNA-Polymerase um ihr Genom, das durch Virus-RNA repräsentiert wird, in DNA umzuschreiben und diese so als Matrize für die zelluläre Transkriptionsmaschinerie benutzen zu können.

Molekularbiologisch kann die Reverse Transkription dazu benutzt werden, mRNA zunächst in einzelsträngige cDNA umzuschreiben, welche anschließend durch eine PCR vervielfältigt wird und danach als DNA-Doppelstrang vorliegt. Diese Gesamtreaktion bestehend aus Reverser Transkription und PCR wird als RT-PCR bezeichnet. Bei dem für die Reverse Transkription benötigten *Reverse*-Primer kann zwischen einem sequenzspezifischen Primer für die jeweilige mRNA gewählt werden oder einem Oligo(dT)-Primer, der in dem ersten Schritt die gesamte mRNA in cDNA umschreibt. Anschließend wird die gebildete cDNA in unterschiedlichen Konzentrationen als DNA-Matrize in eine Polymerasekettenreaktion eingesetzt.

### 4.2.4.1 RT-PCR mit SuperScript II-Reverse Transkriptase

Die *SuperScript* II-Reverse Transkriptase (Invitrogen) ist eine technisch veränderte Version der M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) Reversen Transkriptase, wobei die RNase H-Aktivität reduziert und die Hitzestabilität erhöht wurde.

#### Durchführung:

Für die RT-Reaktion wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Gefäß zusammengegeben:

- 1 - 5 µg Gesamt-RNA (mit RNase-freier DNase-behandelt)
  - 1 µl *Reverse-Primer* (Gen-spezifisch, 2 pmol/µl)
  - 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- und mit ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt.

Diese Mischung wurde bei 65 °C für 5 min inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugegeben:

- 4 µl 5x *First Strand Buffer*
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl ddH<sub>2</sub>O

Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 42 °C erfolgte die Zugabe von 1 µl *SuperScript* II-Reverse Transkriptase (200 U/µl) und eine weitere Inkubation bei 42 °C für 50 Minuten. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 15 Minuten. Aus den RT-Ansätzen wurden jeweils 1 µl, 2 µl, 8 µl und 10 µl als DNA-Matrize in einer PCR verwendet.

### 4.2.4.2 RT-PCR mit SuperScript III-Reverse Transkriptase

Die *SuperScript* III-Reverse Transkriptase (Invitrogen) ist eine technisch veränderte Version der M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) Reversen Transkriptase, die die gleichen Eigenschaften wie die *SuperScript* II-Reverse Transkriptase besitzt, aber eine RT-Reaktion bei noch höherer Temperatur erlaubt.

#### Durchführung:

Für die RT-Reaktion wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Gefäß zusammengegeben:

- 1 - 5 µg Gesamt-RNA (mit RNase-freier DNase-behandelt)
  - 1 µl *Reverse-Primer* (Gen-spezifisch, 2 pmol/µl)
  - 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 13 µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde bei 65 °C für 5 min inkubiert und danach für eine Minute auf Eis gekühlt.

Im Anschluss wurden folgende Reagenzien zugegeben:

- 4 µl 5x *First Strand Buffer*
- 1 µl 0,1 M DTT

- 1 µl RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)
- 1 µl *SuperScript* III-Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Nach einer einstündigen Inkubation der Reaktionsmischung bei 55 °C erfolgte die Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 70 °C für 15 Minuten.

Um Hybrid-Strukturen zwischen der cDNA und der mRNA aufzulösen wurde der gesamte Ansatz anschließend mit 1 µl RNase H (5 U/µl) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 Minuten erfolgte die PCR-Reaktion, bei der 1 µl, 2 µl, 8 µl und 10 µl der RT-Reaktion als Matrize eingesetzt wurden.

## 4.2.5 Quantifizierung von DNA

### 4.2.5.1 Photometrische Quantifizierung von DNA

Die photometrische Quantifizierung der DNA-Lösung erfolgt durch die Bestimmung der Absorption bei den Wellenlängen  $\lambda = 260$  nm und 280 nm in einer Quarzküvette bzw. in einer UV-gängigen Kunststoffküvette im Spektralphotometer. Als Referenzlösung dient das jeweilige Lösungsmittel bei  $\lambda = 260$  nm haben Nukleinsäuren und bei  $\lambda = 280$  nm aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum.

Die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration der absorbierenden Substanz wird in verdünnten Lösungen durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$A = -\lg(I/I_0) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Dabei ist  $A$  die im Photometer gemessene Absorption (spektrales dekadisches Absorptionsmaß, nach IUPAC),  $I_0$  die Intensität des eintretenden,  $I$  die des nach Durchstrahlen der Probelösung austretenden Lichtstromes,  $c$  die molare Konzentration der absorbierenden Substanz (mol/l) und  $d$  die Schichtdicke der Lösung (gemessen in cm).  $\varepsilon$  wird als molarer dekadischer Absorptionskoeffizient (nach IUPAC, früher: Extinktionskoeffizient) bezeichnet und hat die Dimension  $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Der molare dekadische Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  entspricht der Absorption einer molaren Lösung in 1 cm dicker Schicht bei einer definierten Wellenlänge und Temperatur; der molare natürliche Absorptionskoeffizient ist  $\kappa = 2,303 \varepsilon$ .

Die Konzentration der gemessenen Probe wird nach folgender Gleichung bestimmt:

$$c = A_{260} \cdot F/d$$

Die Konzentration der DNA ergibt sich dabei aus der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) multipliziert mit dem für die Art der Probe spezifischen Proportionalitätsfaktor  $F$  dividiert durch die durchstrahlte Schichtdicke der Lösung  $d$ . Die Werte für verschiedene Nukleinsäuren sind in der Tabelle 4-1 aufgelistet.

Das Maß für das Verhältnis von DNA zu Proteinen  $p$  erhält man aus dem Quotienten der Absorption der Lösung bei  $\lambda = 260$  nm zu der Absorption bei  $\lambda = 280$  nm. Die Werte für reine DNA liegen bei  $p = 1,8 - 2,0$ .

**Tab. 4-1:** Mittelwerte für Proportionalitätsfaktoren, Molekulargewichte und molare Extinktionskoeffizienten für Nukleinsäurebasen

	<b>Proportionalitätsfaktor</b> $F \left[ \frac{\mu\text{g} \cdot \text{cm}}{\text{ml}} \right]$	<b>Molekulargewicht/ Base</b> $[\text{g} / \text{mol}]$	<b>molarer Absorptions- koeffizient pro Base</b> $\varepsilon \left[ \frac{\text{ml}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
<b>dsDNA</b>	50	330	8,250
<b>RNA</b>	40	340	6,600
<b>ssDNA</b>	37	330	8,919

Durchführung:

Als Nullwert wurde zu Beginn der Messung die optische Dichte von 70 µl Lösungsmittel in einer Küvette im Spektral-Photometer bestimmt. Danach wurde die Konzentration der einzelnen Proben, die in einem Verhältnis von 2 µl Probenlösung zu 68 µl Lösungsmittel gemischt wurden, gemessen, wobei die Art der Probe (z.B. dsDNA) sowie das Verdünnungsverhältnis am Photometer eingestellt wurde. Das Spektral-Photometer errechnete selbstständig die DNA-Konzentration  $c$  sowie das Maß für das Verhältnis DNA zu Proteinen  $p$  und mögliche Verunreinigungen.

**4.2.5.2 Quantifizierung von DNA durch optischen Vergleich der Bandenintensität auf einem Agarose-Gel**

Diese Methode wurde zur Quantifizierung von DNA-Mengen im Nanogramm-Bereich verwendet. Hierzu wurde die DNA-Probe zusammen mit der Konzentrationsreihe einer quantifizierten Marker-DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das durch Ethidiumbromid angefärbte Gel unter ultraviolettem Licht betrachtet. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Probe mit den Markerfragmenten konnte die DNA-Menge – bezogen auf das eingesetzte Volumen – bestimmt werden.

**4.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA**

**4.2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Elektrophorese mittels Agarose-Gelen wird für die Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten benutzt. Agarose ist ein langkettiges, unverzweigtes lineares Polymer der Agarobiose, ein aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose bestehendes Disaccharid.

Nukleinsäuren besitzen aufgrund der Phosphatgruppen in ihrem Rückgrat, eine negative Nettoladung, durch die sie in einem Agarose-Gel nach dem Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zur Anode wandert.

Die Auftrennung während der Elektrophorese wird durch die im Auftragspuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol FF verfolgt. Nach Beendigung der Elektrophorese können die DNA-Fragmente durch Anfärben mit Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht werden. Dieser fluoreszierende Farbstoff lagert sich in die große Furche der DNA ein und kann somit als DNA-EtBr-Komplex mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

## METHODEN

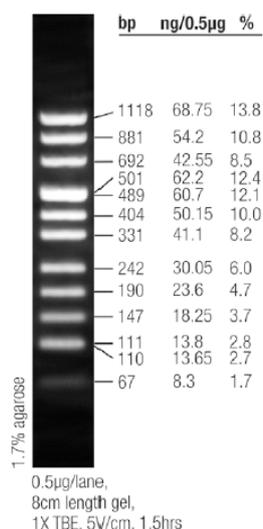
### Material:

- 1x Mupid-Laufpuffer (1x TAE-Puffer) 4,8 g Tris  
0,74 g EDTA·2 Na  
1,14 ml Essigsäure (100 %)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt
- 6x DNA-Probenpuffer (10 ml) 6 ml Glycerin  
3 ml 0,2 M EDTA·2 Na  
1 ml ddH<sub>2</sub>O
- 6x Ultra fast-Auftragspuffer 0,2 % (w/v) Orange G in 6x DNA-Probenpuffer
- Ethidiumbromid-Lösung 1 % Ethidiumbromid in ddH<sub>2</sub>O

### Durchführung:

Zur Herstellung von 1 %-igen Agarosegelen wurden 2,4 g Agarose mit 240 ml 1x Mupid-Laufpuffer gemischt und in einer Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 10<sup>-4</sup> Volumenanteilen Ethidiumbromid-Lösung versetzt, durchmischt und in das Mupid-2 Gelschlittensystem mit Probenkamm gegossen. Vor Gebrauch wurde das Gel in der Mupid-2 Gelelektrophoresekammer platziert. Die DNA-Probe wurde mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (6x Ultra fast) auf einem Streifen Parafilm vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard diente für kleinere Fragmente unter 1 kb der DNA-Längenmarker pUC Mix, 8 und für größere, bis etwa 6 kb der Lambda DNA/*Eco*RI + Hind III Marker, 3 (Abb. 4-1).

#### pUC Mix Marker, 8



#### Lambda DNA/*Eco*RI + Hind III Marker, 3

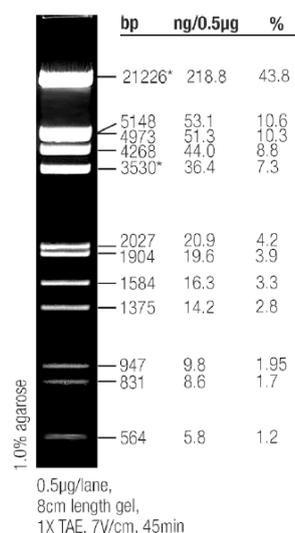


Abb. 4-1: DNA-Fragmentlängenmarker für Agarosegele (Quelle: [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com))

In der Gelkammer wurde eine Spannung von 130 V für 15 bis 30 Minuten angelegt, anschließend wurde das Gel unter UV-Licht ( $\lambda = 320$  nm) analysiert. Wurden eine oder mehrere der Banden für eine Gelextraktion benötigt, wurde das Gel dem UV-Licht nur sehr kurze Zeit ausgesetzt, da sich sonst Thymidindimere und Strangbrüche bilden, die die Qualität der DNA stark reduzieren.

### 4.2.7 DNA- und RNA-Modifizierung durch Enzymbehandlung

#### 4.2.7.1 Restriktionsendonuklease-Behandlung von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen werden aus unterschiedlichen Bakterienstämmen gewonnen und erkennen und schneiden vorwiegend palindromische Tetra-, Penta- und Hexanukleotid DNA-Sequenzen. Die Spaltung der beiden DNA-Stränge erfolgt hydrolytisch innerhalb oder in der Nähe der Erkennungssequenz. An der Spaltstelle trägt das 3'-Ende meist eine Hydroxylgruppe, das 5'-Ende eine Phosphatgruppe, wobei je nach Enzym glatte Enden (*blunt ends*) oder überstehende einzelsträngige Enden (*sticky ends*) entstehen können.

Eine Spaltung von DNA wird durchgeführt, um bestimmte DNA-Fragmente zwischen unterschiedlichen Vektoren umzuklonieren, bakterielle Kolonien auf ein bestimmtes vektorielles Insert und gegebenenfalls auf dessen Orientierung zu überprüfen oder Klonierungsvektoren für eine anschließende Ligationsreaktion zu linearisieren.

#### Durchführung:

Für die Spaltung von DNA wurde eine entsprechende Menge an DNA mit dem jeweiligen Enzym,  $\frac{1}{10}$  Volumen 10x Reaktionspuffer und je nach Herstellerangaben zusätzlich  $\frac{1}{100}$  Volumen BSA (10 mg/ml) inkubiert. Die Menge der Restriktionsendonuklease ergab sich dabei aus der Definition der Enzymaktivität: eine Unit (U) eines Enzyms spaltet 1  $\mu$ g Referenz-DNA bei optimaler Temperatur innerhalb einer Stunde vollständig. Die Menge des benötigten Enzyms wurde nach Häufigkeit der Schnittstellen in der zu spaltenden DNA bestimmt. Ein Reaktionsansatz hatte in der Regel ein Endvolumen von 50  $\mu$ l. Die Reaktion lief zwischen 30 Minuten und drei Stunden bei optimaler Temperatur für das jeweilige Enzym. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### 4.2.7.2 Phosphorylierung von DNA

Die T4-Polynukleotid-Kinase katalysiert die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf das freie 5'-Ende einer Desoxyribonukleinsäure.

#### Durchführung:

Zur DNA-Phosphorylierung wurde folgender Ansatz gewählt:

- 1  $\mu$ l *Primer* (100 pmol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l ATP (50 mM)
- $\frac{1}{10}$  Volumen 10x Ligase-Puffer
- 1  $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ $\mu$ l)  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 10  $\mu$ l Gesamtvolumen aufgefüllt

Der Ansatz wurde zunächst 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde die T4-Polynukleotid-Kinase bei 80 °C für 20 Minuten einem Hitzeinaktivierungsschritt ausgesetzt.

### 4.2.7.3 *Dephosphorylierung von DNA*

Um die Religation eines fragmentierten Vektors zu verhindern, wurde die 5'-Phosphatgruppe vor der Ligation mit der Insert-DNA durch die alkalische Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) hydrolysiert.

#### Durchführung:

Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte im Anschluss an die Restriktionsendonuklease-Behandlung nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms. Dazu wurden 150 ng der fragmentierten Vektor-DNA zusammen mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 10x-Dephosphorylierungspuffer und 1  $\mu$ l SAP (1 U/ $\mu$ l) auf 10  $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, gut gemischt und bei 37 °C im Wasserbad 30 Minuten inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Ansatz anschließend auf 70 °C für 15 Minuten erhitzt.

### 4.2.7.4 *Auffüllen bzw. Abspalten von DNA-Einzelstrang-Überhängen mit dem Klenow-Fragment*

Das Klenow-Fragment ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase I aus dem Prokaryonten *E. coli*. Für das Auffüllen bzw. Abspalten von DNA-Einzelstrang-Überhängen wird ein kloniertes Polymerase-Enzym (Klenow-Enzym) verwendet, welches eine 5'→3'-Polymerase-Aktivität bzw. 3'→5'-Exonukleaseaktivität aufweist, jedoch 5'→3'-Exonuklease-frei ist. Hierdurch können einzelsträngige DNA-Überhänge, die nach einer Behandlung mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, wieder zu glatten Enden (*blunt ends*) aufgefüllt bzw. abgebaut werden.

#### Durchführung:

Das Klenow-Fragment wies laut Herstellerangaben eine 100 %-ige Aktivität in allen Restriktionsendonukleasepuffern auf. Somit wurde 1  $\mu$ l des Klenow-Fragmentes (10 U/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l dNTPs direkt nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonuklease zu dem jeweiligen Restriktionsspaltungsansatz zugegeben.

Nach einer Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten folgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70 °C für weitere 20 Minuten.

### 4.2.7.5 *Auffüllen bzw. Abspalten von DNA-Einzelstrang-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase*

Die T4-DNA-Polymerase aus dem *E. coli* Bakteriophagen T4 weist ebenso wie das Klenow-Fragment eine 5'→3'-Polymerase-Aktivität und eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf. Eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Somit können auch mit diesem Enzym einzelsträngige DNA-Überhänge, die nach einer Behandlung mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, wieder zu glatten Enden (*blunt ends*) aufgefüllt werden.

### Durchführung:

Da die T4-DNA-Polymerase laut Herstellerangaben eine Aktivität in allen Restriktionsspaltungspuffern aufwies, wurde nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme 1 µl des Enzyms (10 U/µl) zusammen mit 1 µl dNTPs (je 10 mM) direkt zu dem Restriktionsspaltungsansatz hinzu gegeben.

Der Ansatz wurde bei 11 °C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der T4-DNA-Polymerase durch 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C.

### **4.2.7.6 Verknüpfung von DNA**

Der Vorgang der Ligation dient dazu, zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden, beziehungsweise ein gewünschtes Insert in einen Klonierungsvektor zu inserieren. Das hierzu verwendete Enzym – die T4-DNA-Ligase – katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen doppelsträngiger DNA mit freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen.

### Durchführung:

Für das Zusammenfügen von komplementären, kohäsiven DNA-Enden wurden 150 ng linearisierter und dephosphorylierter Vektor und die dreifache molare Menge an Insert-DNA zusammen mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) bei 16 °C über Nacht inkubiert. Der Standardligationsansatz hatte dabei ein Gesamtvolumen von 20 – 40 µl.

Bei *blunt-end*-Ligationen wurde zu dem entsprechenden Ansatz noch  $\frac{1}{10}$  Volumen PEG-4000 zugegeben, eine hochkonzentrierte T4-DNA-Ligase (5 U/µl) verwendet und die Ligation bei 4 °C für 48 h durchgeführt.

Vor der anschließenden Transformation der Ligation in chemisch-kompetente Bakterien wurde, die Ligrationsreaktion durch einen zehnminütigen Hitzeschritt bei 65 °C inaktiviert.

### **4.2.7.7 DNase-Behandlung von RNA**

Um sicherzugehen, dass RNA-Isolierungen nicht mit genomischer DNA verunreinigt waren, erfolgte eine DNase I (RNase-frei)-Behandlung der isolierten RNA.

### Durchführung:

Es wurden bis zu 10 µg RNA mit 1 µl DNase I (10 U/µl) und  $\frac{1}{10}$  Volumen 10x DNase-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert.

### 4.2.8 Klonierung

Unter Klonierung versteht man das Einbringen eines DNA-Fragmentes in ein Genom eines sich selbst replizierenden genetischen Elements. Dazu wurde ein DNA-Fragment mit einer unabhängig replizierenden DNA-Sequenz (Vektor) *in vitro* verknüpft. Diese Hybrid-DNA wurde in geeignete *Escherichia coli*-Wirtszellen übertragen und dort selektiv vermehrt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Kolonien mit Hilfe der *Colonyscreening*-PCR bzw. einer Restriktionendonukleasespaltung.

#### 4.2.8.1 Vektoren zur Klonierung

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden Vektoren verwendet, die ein Resistenzgen entweder für Ampicillin oder für Kanamycin bzw. Neomycin enthielten, so dass eine Selektion sowohl in Bakterien (mittels Kanamycin) als auch in Kulturzellen (mittels Neomycin bzw. Geneticin) möglich war. Außerdem verfügte jeder Vektor über eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS), welche die Ligation der Fremd-DNA in den Vektor vereinfachte, da dort Schnittstellen vieler gebräuchlicher Restriktionendonukleasen vereinigt sind. Weiterhin enthielten die Vektoren prokaryontische und eukaryontische Replikationsursprünge.

Die verwendeten Vektoren dieser Arbeit sind im Material-Teil aufgelistet.

#### 4.2.8.2 Klonierung mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits

Der Vektor pCR®2.1-TOPO® des *TOPO TA Cloning® Kits* (Invitrogen) liegt im linearisierten Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus einem Thymidin. Außerdem ist das Topoisomerase I-Enzym kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I werden somit auch geringe Mengen eines PCR-Produktes mit 3'-A-Überhang schnell in den Vektor integriert, wobei das Enzym abdissoziiert.

##### Durchführung:

PCR-Fragmente, die mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden, konnten aufgrund eines Adenosin-Überhangs direkt in die TOPO-Ligations-Reaktion eingesetzt werden. Nach einer Amplifikation mit einer Polymerase mit Korrektur-Lese-Aktivität (*Pfu*, *Phusion*), musste das PCR-Produkt zunächst 10 Minuten bei 72 °C mit 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) inkubiert werden, um einen Adenosin-Überhang zu generieren. Die *Phusion*-Polymerase wurde zuvor durch eine Gelextraktion eliminiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt direkt in die TOPO-Reaktion eingesetzt.

##### **Standard-Reaktionsansatz (3 µl):**

- 2,0 µl PCR-Produkt
- 0,5 µl *Salt Solution* (Invitrogen)
- 0,5 µl pCR®2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen)

Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* TOP10F<sup>+</sup> gegeben, vorsichtig vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C, danach wurde das Reaktionsgefäß 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium folgte eine Schüttelinkubation bei 37 °C für eine Stunde.

Die Methode des *TOPO TA Cloning*<sup>®</sup> Kits (Invitrogen) erlaubte eine Vorauswahl möglicher positiver Klone über Blau/Weiß-Selektion, wobei die positiven Klone mit integriertem PCR-Produkt weiß blieben, während die Klone ohne Insert blau wurden. Ohne ein vorhandenes Insert konnte das *lacZ*-Gen vollständig exprimiert werden und die hierdurch entstehende β-Galaktosidase hydrolysierte das Laktose-Derivat X-Gal zu 5-Brom-4-chlorindoxyl. Dieses wurde durch Luftsauerstoff zu dem blauen Dimer 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert.

Für die Blau/Weiß-Selektion wurden auf den LB-Agarplatten eine Stunde vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF) und 40 µl IPTG (100 mM) ausgestrichen. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Kanamycin- bzw. Ampicillin zwei Verdünnungen (50 µl und 250 µl) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 4.2.9 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger und Coulson (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass die Elongation von DNA durch die Polymerase dann abbricht, wenn ein 2',3'-Dideoxyribonukleotidtriphosphat (ddNTPs, so genannte Terminatoren) eingebaut wird, an die eine DNA-Polymerase wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe der Ribose des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen generiert, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Die verwendeten ddNTPs waren fluoreszenzmarkiert, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff versehen war.

Alle Sequenzierreaktionen im Rahmen dieser Arbeit wurden von den Mitarbeitern des zentralen Funktionsbereiches DNA-Sequenzierung am IZKF Leipzig durchgeführt.

## 4.3 Zellkultur

### 4.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen wurde unter Einhaltung aller Sicherheitsmaßnahmen bei keimarmen Bedingungen durchgeführt. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung überprüft. Grundsätzlich galten die in Tabelle 4-2 angegebenen Richtwerte für die verwendeten Kulturgefäße.

Die Anzahl der Zellen bei Konfluenz ist abhängig von den jeweiligen Zelltypen, die angegebenen Werte beziehen sich auf HeLa-Zellen.

Tab. 4-2: Richtwerte für die Kultivierung von Zellen

Gefäß	Fläche (mm <sup>2</sup> )	Zellzahl beim Aussähen	Zellzahl bei Konfluenz	Wachstumsmedium (ml)	PBS (ml)	Trypsin (ml)
<b>Flaschen</b>						
TC 25	2500	0,7 x 10 <sup>6</sup>	2,8 x 10 <sup>6</sup>	5	2	1
TC 75	8000	2 x 10 <sup>6</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	15	6	2
<b>Multi-wells</b>						
96-well	25,5		2,5 x 10 <sup>4</sup>	0,1	0,1	0,05
24-well	200	0,5 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>	1	1	0,2
6-well	962	0,3 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,5	2	0,5
<b>Schalen</b>						
35 mm	962	0,3 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,5	2	0,5
60 mm	2827	0,7 x 10 <sup>6</sup>	3,2 x 10 <sup>6</sup>	5	5	1
100 mm	7854	2,0 x 10 <sup>6</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	10	10	2
150 mm	17671	5,0 x 10 <sup>6</sup>	20,0 x 10 <sup>6</sup>	20	15	4

### 4.3.2 Ablösen von Zellen

Um adhärenente Zellen von den Kulturschalen abzulösen, wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Trypsin spaltet spezifisch Peptidbindungen, die Carboxylgruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin enthalten. EDTA ist ein Chelator für zweiwertige Kationen wie Magnesium und Calcium und destabilisiert somit viele Moleküle der extrazellulären Matrix sowie Adhäsionsproteine.

#### Material:

- 1x PBS
- Trypsin/EDTA-Lösung

#### Durchführung:

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde die Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese 5 bis 10 Minuten bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Da sich die Zelllinien hinsichtlich der optimalen Zeitdauer für das Ablösen unterschieden, ist es wichtig diesen Vorgang zu



### 4.3.4.1 *Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™*

Metafectene™ ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, das in Kombination mit einem neutralen Ko-Lipid in liposomaler Form vorliegt. Der Eintritt von DNA und RNA in die Zellen findet statt, indem die DNA bzw. RNA zunächst in kompakte Strukturen komplexiert und anschließend endozytotisch in die Zellen aufgenommen wird. Innerhalb der Zelle wird die Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Endosomen durch Puffereigenschaften der Komplexbildner bewerkstelligt, so dass es zu einem Anstieg des osmotischen Druckes innerhalb des Endosoms kommt und die Membran aufbricht. Dieser Prozess wird durch die Eigenschaften der kationischen Lipide unterstützt, welche durch die Ansäuerung der Endosomen destabilisieren (*Repulsive Membrane Acidolysis*). Die Aufnahme der DNA bzw. RNA in den Zellkern kann nur während des Zusammenbruchs der Kernhülle in der Mitose stattfinden kann, deshalb sollte die Transfektion mit stark proliferierenden Zellen durchgeführt werden.

Um mögliche Adsorption der Reagenzien an die Gefäßwände zu verhindern, wurden für die Transfektion ausschließlich Gefäße verwendet, die aus Polypropylen oder Polystyrol gefertigt waren.

#### Durchführung:

Durchgeführt wurde die Transfektion mit Metafectene™ nach dem Herstellerprotokoll (Stand Juni 2004). 24 Stunden vor der Transfektion wurden  $4 \times 10^5 - 6 \times 10^5$  Zellen in 30 mm-Kulturschalen so ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine optische Konfluenz von 90 – 100 % besaßen. Für die Transfektion einer 35 mm-Kulturschale wurden 2 µg DNA mit serum- und antibiotikafreiem Kultivierungsmedium auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Ebenso wurden 10 µl der Metafectene™-Lösung mit 90 µl serum- und antibiotikafreiem Medium vermischt. Nach dem Vereinigen beider Lösungen erfolgte die Komplexbildung während einer Inkubation für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Transfektionslösung mit den DNA-Lipid-Komplexen zu 2 ml frischem Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben und im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert.

### 4.3.4.2 *Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Metafectene™ Pro*

Metafectene™ Pro basiert wie Metafectene™ auf der Basis der „*Repulsive Membrane Acidolysis*“; darüber hinausgehend besitzt es laut Herstellerangaben ein „*Toxicity Optimization module. (TOP-Technology)*“, wodurch die DNA-Lipid-Komplexe destabilisiert werden und so der Prozess der repulsiven Membran-Azidolyse und damit die Freisetzung der DNA in der Ziel-Zelle noch effektiver wird.

#### Durchführung:

Durchgeführt wurde die Transfektion mit Metafectene™ Pro nach dem Herstellerprotokoll (Stand Januar 2007). 24 Stunden vor der Transfektion wurden  $4 \times 10^5 - 6 \times 10^5$  Zellen in 35 mm-Kulturschalen so ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine optische Konfluenz von 70 – 80 % besaßen. Für die Transfektion einer 35 mm-Kulturschale wurden 2 µg DNA mit serum- und antibiotikafreiem Kultivierungsmedium auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Ebenso wurden 6 µl der Metafectene™ Pro-Lösung mit 94 µl serum- und antibiotikafreiem Medium vermischt. Nach dem Vereinigen beider Lösungen erfolgte die

Komplexbildung während einer Inkubation für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Transfektionslösung mit den DNA-Lipid-Komplexen zu 2 ml frischem Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben und im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert.

### **4.3.4.3 Transfektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE HD<sup>®</sup>**

FuGENE HD<sup>®</sup> ist ein lipidbasiertes Multikomponenten-Transfektionsreagenz, welches laut Herstellerangaben für ein breites Spektrum an eukaryontischen Zelllinien geeignet ist.

#### Durchführung:

Durchgeführt wurde die Transfektion mit FuGENE HD<sup>®</sup> nach dem Herstellerprotokoll (Stand November 2006). 24 Stunden vor der Transfektion wurden  $5,5 \times 10^5$  Zellen in 35 mm-Kulturschalen ausgesät. 2 µg DNA wurde mit serum- und antibiotikafreiem Kultivierungsmedium auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und gemischt. Nach dem Zufügen von 4 µl Fugene Transfektionsreagenz, erfolgte die Komplexbildung während einer Inkubation für 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu 2 ml frischem Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben und im Brutschrank bei 37 °C für 24 h inkubiert.

### **4.3.5 Selektion durch Antibiotika**

Für die Selektion transfizierter Zellen wurde das Antibiotikum G418 (Geneticin) verwendet, für welches auf den jeweiligen Vektor-Konstrukten das entsprechende Resistenzgen vorhanden war.

Zunächst wurde ermittelt, ab welcher Geneticin-Konzentration alle untransfizierten Zellen einer Kulturschale abstarben bzw. das Wachstum einstellten. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien in den entsprechenden Kulturmedien ausgesät und mit Geneticin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Das antibiotikumhaltige Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen über insgesamt acht Tage hinweg beobachtet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne Geneticin in dem Standardmedium inkubiert wurden.

Die benötigte Geneticinmenge für die Selektion nach einer Transfektion wurde durch die Konzentration ermittelt, bei der nach vier bis fünf Tagen alle Zellen in der Kulturschale abgestorben waren. Diese muss bei jeder neuen G418-Charge neu bestimmt werden.

Mit der Selektion wurde zwischen 24 h und 48 h nach der Transfektion begonnen.

#### Durchführung:

Für die Herstellung einer stabilen Zelllinie wurde die Zellen zur Selektion positiver Kolonien 24 bis 48 h nach der Transfektion zunächst in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:150 in eine 100 mm-Kulturschale mit dem entsprechenden Medium umgesetzt. Die Geneticinbehandlung erfolgte über mehrere Wochen hinweg, bis sich überlebende Zellkolonien bildeten. Diese wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert und weiterkultiviert.

### 4.3.6 Vereinzeln von Klonen mit Klonierungszyklindern

Mit Hilfe von Klonierungszyklindern können Zellklone adhären wachsender Zelllinien selektiv isoliert und zur Subkultivierung abgelöst werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch ein entsprechend dünnes Aussäen der Zellen, so dass ausschließlich Zellen eines Klons in die neue Kulturschale übertragen werden.

#### Durchführung:

Durch Markierungen auf der Unterseite der Kulturschale während des Mikroskopierens wurden die zu isolierenden Kolonien oder Bereiche der Zellen gekennzeichnet. Anschließend wurden die Klonierungszyklinder mit Hilfe einer sterilen Pinzette in Schliff Fett getaucht, so dass die Unterseite des Klonierungsringes überall mit einer dünnen Schicht bedeckt war. Danach wurde der Ring über den markierten Bereich gestülpt und so der Bereich innerhalb des Zylinders von dem umgebenden Medium abgedichtet. Das Medium innerhalb des Ringes wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit einer dem Volumen des Klonierungsringes angepassten Menge PBS durch vorsichtiges Pipettieren gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA ersetzt und der Ablösevorgang unter dem Umkehrmikroskop kontrolliert. Nachdem sich die Zellen von dem Boden der Kulturschale gelöst hatten, wurden sie durch mehrmaliges Waschen des Bereiches innerhalb des Klonierungszyklinders vollständig in eine neue Zellkulturschale mit vorgelegtem Medium überführt und weiterkultiviert.

Dieser Isolierungsmethode ging meist eine Anreicherung der gewünschten Zellen voraus, indem alle Zellen in der Kulturschale, die außerhalb der markierten Bereiche lagen mechanisch entfernt wurden, um den markierten Zellen mehr Raum für weitere Zellteilungen zu geben.

### 4.3.7 Färbung von Mitochondrien mit MitoTracker<sup>®</sup> Green FM, MitoTracker<sup>®</sup> Red CMXRos und MitoTracker<sup>®</sup> Deep Red 633

Mit Hilfe der MitoTracker<sup>®</sup>-Farbstoffe können selektiv Mitochondrien in lebenden Zellen gefärbt werden. Die rot fluoreszierenden MitoTracker<sup>®</sup>-Farbstoffe sind Derivate von Tetramethylrosamin oder X-Rosamin und enthalten eine thiolreaktive Chlormethyl-Einheit, die wahrscheinlich für ihre Assoziation mit den Mitochondrien verantwortlich ist. Hierdurch sind sie auch nach einer formaldehydbasierten Fixierung der Zellen noch aktiv.

#### Durchführung:

Die MitoTracker<sup>®</sup>-Farbstoffe wurden jeweils auf eine Konzentration von 1 mM mit DMSO eingestellt. Zum Medium lebender Zellen wurden die MitoTracker<sup>®</sup> in einer Konzentration von 100 nM gegeben und 15 – 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel eine und weitere Inkubation von 15 bis 120 Minuten im Brutschrank bei 37 °C. Danach konnte die Fluoreszenz mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen beobachtet werden.

Die Färbung der Mitochondrien von Zellen auf Deckgläsern zur anschließenden Weiterverarbeitung für die Immunzytochemie erfolgte in der doppelten MitoTracker<sup>®</sup>-

Konzentration (200 nM) für 20 – 30 Minuten, danach wurden die Deckgläser kurz in PBS gewaschen und anschließend fixiert.

### 4.3.8 Färbung der Kern-DNA mit Hoechst 33342

Hoechst 33342 ist ein bei Hoechst entwickelter Farbstoff, der zur Färbung von DNA geeignet ist. Der Farbstoff bindet bevorzugt an AT-reiche Sequenzen ohne zu interkalieren. Mit dieser Färbung lässt sich die DNA im Zellkern in blauer Fluoreszenz visualisieren.

#### Durchführung:

Der Farbstoff Hoechst 33342 wurde in einer Konzentration von 10 mM in ddH<sub>2</sub>O gelöst, für lebende Zellen in einer Endkonzentration von 5 µM verwendet und für fixierte Zellen in der Endkonzentration 1 µM. Nach einer Inkubation von mindestens 15 min war die Fluoreszenz sichtbar.

### 4.3.9 Färbung der mitochondrialen DNA mit PicoGreen

PicoGreen ist ein fluoreszierender DNA-spezifischer Farbstoff, welcher ursprünglich für die Quantifizierung doppelsträngiger DNA in Lösung verwendet wurde. Mit PicoGreen ist es auch möglich mitochondriale DNA in lebenden Kulturzellen zu visualisieren (Ashley *et al.*, 2005).

#### Durchführung:

Der DMSO-gelöste PicoGreen-Farbstoff aus dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent-Kit (Molecular Probes) wurde in einer Endkonzentration von 3 µl/ml direkt in das Kulturmedium der zu färbenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von ca. 1 h bei 37 °C im Brutschrank konnte die grüne Fluoreszenz mikroskopisch betrachtet werden.

### 4.3.10 Herstellung des Milchsäure-Mediums

Für die Herstellung des Milchsäure-Mediums (La-Medium) wurde das Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie mit Milchsäure auf einen pH von 6 bis 6,5 eingestellt. Das resultierende Medium wurde getestet, indem die Induktion von Megamitochondrien, aber auch die vollständige Rückbildung beobachtet wurde.

### 4.3.11 Behandlung von Kulturzellen mit Inhibitoren

Verschiedene Inhibitoren wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, z.B. CCCP (Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon), ein Protonophor (H<sup>+</sup>-Ionophor) und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien. Zudem konnte multiple Effekte auf zelluläres Kalzium nachgewiesen werden.

Valinomycin ist ein  $K^+$ -selektives Zyklodepsipeptid, welches als Ionophor agiert und die oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Dabei wird in Zellen mit vorhandener Atmungskette zwar der Protonengradient über der Mitochondrienmembran aufrechterhalten, nicht jedoch der elektrische Gradient (Meeusen *et al.*, 2004).

Nigericin ist eine Polyether-Ionophor, das das Membranpotential der Mitochondrien zerstört und die ATPase-Aktivität stimuliert. Die Ionenselektivität nimmt von  $K^+ > Rb^+ \geq Cs^+ \gg Na^+$  ab. Durch den selektiven elektroneutral  $K^+/H^+$ -Austausch wird speziell der Protonen-Gradient zerstört, nicht jedoch ein elektrischer Gradient (Meeusen *et al.*, 2004).

Oligomycin ist ein Antibiotikum, welches an die ATP-Synthase bindet und somit den Protonen-Kanal blockiert. Mit diesem Mechanismus inhibiert es die oxidative Phosphorylierung und hat experimentell keine direkten Effekt auf den Elektronentransport oder den chemiosmotischen Gradienten.

### Material:

- |                           |                   |
|---------------------------|-------------------|
| • CCCP-Stammlösung        | 10 mM in DMSO     |
| • Valinomycin-Stammlösung | 10 mM in DMSO     |
| • Nigericin-Stammlösung   | 1 mM in Ethanol   |
| • Oligomycin-Stammlösung  | 2,5 mM in Ethanol |

### Durchführung:

Für die Untersuchung, welchen Einfluss verschiedene Komponenten des mitochondrialen Membranpotentials haben, wurden die oben genannten Stammlösungen jeweils 1:1000 im Kulturmedium verdünnt.

## 4.4 Mikroskopische Methoden

### 4.4.1 Herstellung von Präparaten für die Immunfluoreszenz

#### 4.4.1.1 *Fixierung und Permeabilisierung von Zellen mit Methanol und Aceton*

### Material:

- Methanol p.a. (-20 °C)
- Aceton p.a. (-20 °C)
- Methanol p.a./Aceton p.a. (je 50 %)
- 0,2 % Triton X-100
- 1x PBS

### Durchführung:

Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden nach dem Absaugen des Kultivierungsmediums zunächst kurz in PBS gewaschen und entweder fünf Minuten nur in Methanol (-20 °C) inkubiert oder anschließend noch fünf Minuten mit Aceton (-20 °C) fixiert. Eine andere Fixierung erfolgte durch die Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur in einem 50 %-igen Methanol-Acetongemisch. Danach wurden die Zellen entweder direkt in die immunzytochemische Behandlung eingesetzt oder es erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,2 % Triton X-100 für fünf Minuten mit anschließenden weiteren

Waschschritten in PBS. Bis zur schnellstmöglichen Weiterverwendung in der Immunzytochemie wurden die Zellen auf den Deckgläsern in PBS aufbewahrt.

### 4.4.2 Immunzytochemie

Das Prinzip einer immunhistochemischen Färbung ist die Markierung von Proteinantigenen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper), der durch die Immunisierung eines Tieres und die Aufreinigung des Serums gewonnen wurde (polyklonaler Antikörper). Ein hochspezifischer gegen das Antigen gerichteter monoklonaler Antikörper kann durch die Verschmelzung von Lymphozyten des immunisierten Tieres mit kultivierten Tumorzellen aus dem Kulturüberstand gewonnen werden.

Durch Inkubation von Zellen mit dem Primärantikörper binden die Immunglobuline spezifisch an ihr Antigen. Zur Detektion der Primärantikörper gibt es verschiedene Möglichkeiten, die alle dem gleichen Prinzip folgen: ein Sekundärantikörper, der gegen die Fc-Region der jeweiligen Tiergruppe gerichtet ist, bindet an den ersten Antikörper.

Dieser Sekundärantikörper kann mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sein, die durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anregung mit monochromatischem Licht einer entsprechenden Wellenlänge sichtbar gemacht werden können.

#### 4.4.2.1 Immunlokalisation an Kulturzellen

##### Material:

- 1x PBS
- 100 mM Glycin
- 3 – 5 % BSA in PBS
- Primärantikörper, verdünnt (siehe Anhang)
- Sekundärantikörper, verdünnt in PBS mit 10 % Ziegen Serum (siehe Anhang)
- Mowiol

##### Durchführung:

Vor der Immunlokalisation wurden die auf Deckgläsern gewachsenen Zellen wie unter 4.4.1.1 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zum Absättigen unspezifischer Bindungen mit 3 – 5 % BSA in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Optional wurden die Zellen zuvor 10 – 15 Minuten mit einer 100 mM Glycin-Lösung behandelt, um eine Hintergrundfärbung zu minimieren. Die Inkubation mit der Primär-Antikörper-Lösung (25 µl) erfolgte in einer feuchten Kammer entweder bei Raumtemperatur für 30 – 60 Minuten oder bei 4 °C für 16 h. Anschließend wurden die Deckgläser drei Mal fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit 50 µl der Sekundär-Antikörper-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS für 5 – 10 Minuten wurden die Deckgläser mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet und abgedunkelt bei 4 °C aufbewahrt.

### 4.4.3 Fluoreszenz–Mikroskopie

Eine effektive Methode zur Lokalisierung und Beobachtung von Proteinen sowohl in lebenden, wie auch in fixierten Zellen ist die Fluoreszenzmikroskopie, bei der eine Lokalisation von spezifischen Strukturen innerhalb der Zelle über Moleküle mit Eigenfluoreszenz oder Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern möglich ist. Die Fluoreszenz von Stoffen beruht auf deren Fähigkeiten das Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Anregungslicht) und daraufhin sichtbares Licht einer bestimmten – längeren – Wellenlänge (Fluoreszenzlicht) emittieren zu können.

Bei den Fluoreszenzmikroskopen, wird das Licht zunächst durch einen Filter gestrahlt, der nur die Erregerwellenlänge passieren lässt. Dieses wird von einem dichroitischen Spiegel durch das Objektiv geleitet und trifft dann auf das Präparat. Das rückgestrahlte Fluoreszenzlicht durchdringt den Spiegel und den Filter und wird vom Betrachter wahrgenommen bzw. über eine angeschlossene Kamera auf einem Monitor dargestellt.

In Tabelle 4-3 sind die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome aufgeführt.

**Tab. 4-3:** Absorptions- bzw. Emissionsmaxima von Fluoreszenzfarbstoffen

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Hoechst 33342	340 nm	450 nm
EGFP	488 nm	507 nm
DsRed und Derivate	558 nm	583 nm
Cy3	550 nm	570 nm
FITC	494 nm	518 nm
MitoTracker Green FM	490 nm	516 nm
MitoTracker Red CMXRos	579 nm	599 nm
MitoTracker Deep Red 633	644 nm	665 nm

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen gearbeitet: dem inversen Fluoreszenzmikroskop DMI 6000 B (Leica Microsystems) und dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP5 (Leica Microsystems).

### 4.4.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop werden nur die fluoreszierenden Moleküle beobachtet, die sich in einer bestimmten Ebene befinden, so dass Strahlung einer anderen Brennebene nicht gemessen wird. Dies wird durch eine besonders kleine Lochblende (*pinhole*) im Strahlengang erreicht.

Die Fluoreszenzanregung der Probe erfolgt durch Laser verschiedener Wellenlängen. Mit Hilfe eines beweglichen Spiegels werden die Punkte einer bestimmten Brennebene rasterartig gescannt und die Fluoreszenzsignale, die von den einzelnen Punkten ausgehen, nach dem Durchtritt durch die Lochblende von Photomultipliern registriert. Das zusammengesetzte Bild wird anschließend über ein angeschlossenes Computersystem wiedergegeben.

Die Bearbeitung der Bilder wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Leica Application Suite Advance Fluorescence 1.7.0, Adobe Photoshop CS (Version 8.0.1) und Corel Draw 12 durchgeführt.

### 4.4.5 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von Zellen

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie wird ein Durchlicht - Elektronenbild eines Präparatschnittes mit einer Vergrößerung von 100x bis 500.000x und einem Auflösungsvermögen von etwa 0,2 nm erzeugt. Als Elektronenquelle dient eine Wolframdrahtschleife, die die Kathode darstellt. Durch das Anlegen einer Spannung von ca. 1.000 Volt wird der Draht stark aufgeheizt und dadurch Elektronen aus den Wolframatomen geschleudert. Diese werden zu der Anode hin beschleunigt und nach dem Durchtritt durch die Anodenöffnung durch die Kondensorenlinse auf die Probe gelenkt. Diese befindet sich auf einem Kupfernetz, das im Hochvakuum in der Objektebene des Elektronenmikroskops eingebracht wird. Das Endbild der Probe wird auf einen Leuchtschirm projiziert und mit Hilfe verschiedener Kameras aufgezeichnet. Die Probenvorbereitung beginnt zunächst mit der Primär-Fixierung durch Aldehyde (z.B. Formaldehyd, Glutaraldehyd) und einer Fixierung mit Metalloxiden, meist Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ), das zusätzlich als Kontrastmittel wirkt. Eine dritte Fixierung mit Uranylacetat trägt ebenso zum Gesamtkontrast der Probe bei. Zum Entwässern der Proben wird das Wasser in dem System stufenweise durch ein Lösungsmittel (meist Ethanol oder Aceton) ersetzt. Anschließend erfolgt die Einbettung der Zellen in ein Kunststoffharz (Epon 812) und es werden Dünnschnitte mit Hilfe eines Ultramikrotoms angefertigt. Nachdem die Schnitte von einem beschichteten Kupfernetz aufgenommen wurden, werden sie erneut mit Uranylacetat als Kontrastierungsmittel behandelt.

#### Material:

- PBS-Fixierlösung  
2 % Formaldehyd  
2,5 % Glutaraldehyd  
in PBS
- Cacodylat-Fixierlösung  
2 % Formaldehyd  
2,5 % Glutaraldehyd  
in 100 mM Cacodylat-Puffer (pH 7,2)
- 2 % Osmiumtetroxid in Cacodylat-Puffer
- Epon 812
- Ethanolreihe: 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 2 x 100 %
- Propylenoxid

#### Durchführung:

Für die Analyse mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläsern in einer Kulturschale kultiviert und zum jeweiligen Analysezeitpunkt fixiert. Als Fixieragenzien dienten dabei Formaldehyd (2 %) und Glutaraldehyd (2,5 %) entweder in PBS oder in 100 mM Cacodylat-Puffer.

Die Deckgläser mit den Zellen wurden zunächst kurz in PBS gewaschen und dann in einer feuchten Kammer entweder mit der PBS-Fixierlösung oder der Cacodylat-Fixierlösung zunächst für 2 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 1,5 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS bzw. Cacodylat-Puffer gewaschen und bis zu der weiteren Verwendung in PBS oder Cacodylat-Puffer aufbewahrt.

Alle weiteren Schritte der Probenpräparation und die Analyse am Elektronenmikroskop wurden von der Zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie (Prof. Dr. G. Krohne), Fakultät für Biologie, Universität Würzburg durchgeführt.

Dabei wurden die Zellen auf Deckgläsern zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe und anschließend mit Propylenoxid dehydriert. Danach erfolgte eine Inkubation in einem Propylenoxid/Epongemisch (1:1) für ein bis zwei Stunden. Die Einbettung in Epon 812 erfolgte über Nacht. Ultradünnschnitte wurden in der EM-Abteilung nach Standardprotokoll angefertigt und kontrastiert. Die Analyse der EM-Präparate erfolgte an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss (EM10). Die Negativaufnahmen wurden mit einer Auflösung von 1200 dpi eingescannt und mit Hilfe von Adobe Photoshop CS (Version 8.0.1) bearbeitet.

## 4.5 Statistische Methoden

Die Statistik ist die Zusammenfassung bestimmter Methoden, um Massenerscheinungen zu quantifizieren und interpretieren. Nach mehrfach Bestimmung von Meßwerten, wurde der arithmetische Mittelwert mit folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Verwendet wurde hierzu in der Software Microsoft Excel folgender Ausdruck:

=MITTELWERT(Zahl1;Zahl2;...).

Die Standardabweichung gibt die Streuung der Einzelwerte der vorhandenen Daten an und wird bestimmt durch den Ausdruck:

$$\tilde{s} = \sqrt{\tilde{s}^2}$$

$\tilde{s}^2$  ist dabei die empirische Varianz und wird durch folgende Formel dargestellt:

$$\tilde{s}^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

In der Software Microsoft Excel wurden diese beiden Formeln durch die Eingabe =STABW(Zahl1;Zahl2;...) zusammengefasst.

## 5 Ergebnisse

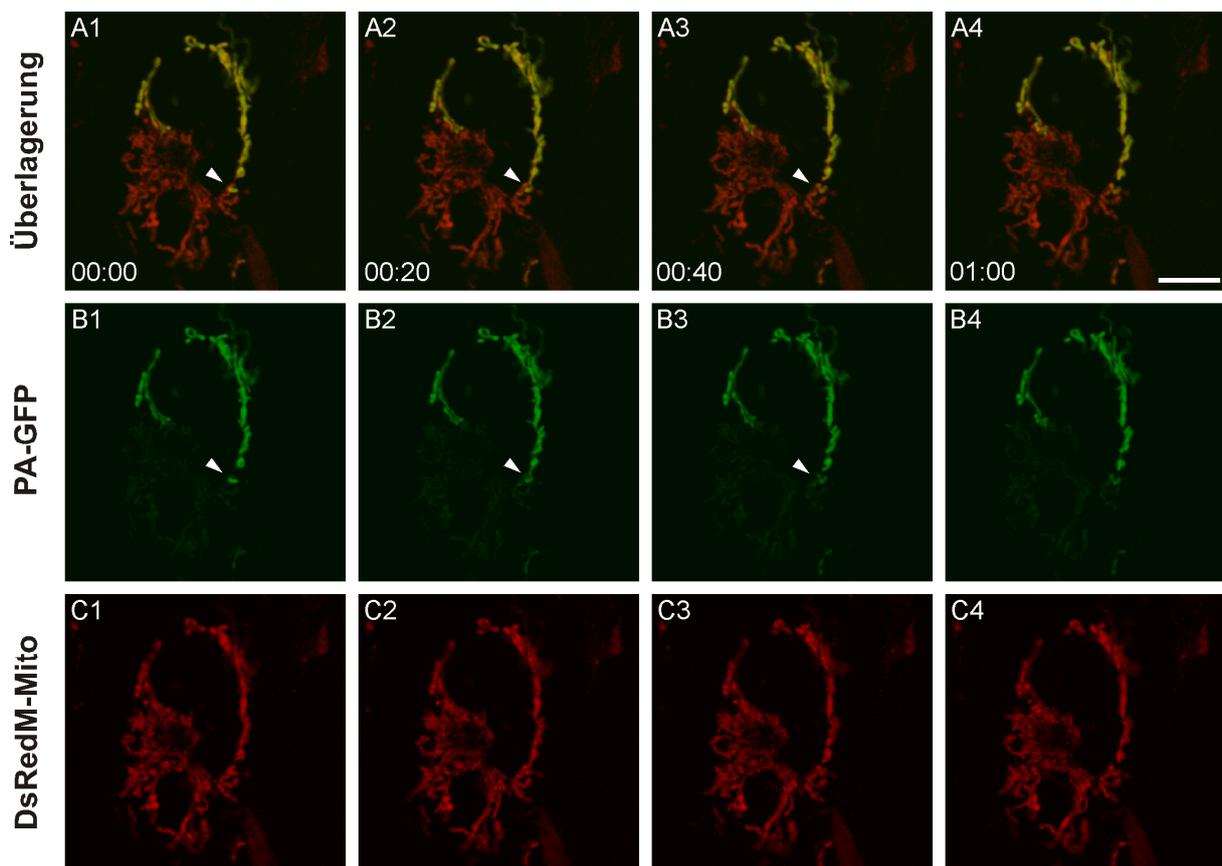
Zu Untersuchungen von Fusion und Fission von Mitochondrien existieren bislang nur wenige Daten in der Literatur, die Experimente an lebenden Zellen beschreiben. In Fusionsassays, bei denen ganze Zellen unter artifiziellen Bedingungen mit PEG (Polyethylenglykol) oder HVJ (*Hemagglutinating Virus of Japan*, Sendai Virus) fusioniert werden, führt dies im weiteren Verlauf auch zu der Fusion von zumeist unterschiedlich gefärbten Mitochondrien. Die Auswertung erfolgt anschließend nach einer Fixierung der Zellen, womit eine Lebendbetrachtung nicht mehr möglich ist (Legros *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2003; Eura *et al.*, 2003; Legros *et al.*, 2004; Malka *et al.*, 2005).

### 5.1 Detektion mitochondrialer Fusion mithilfe von photoaktivierbarem GFP

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt der Untersuchungen zur mitochondrialen Fusion und Fission auf Erkenntnissen, die an lebenden Zellen gewonnen werden konnten. Hierfür wurde im Besonderen das photoaktiverbare grünfluoreszierende Protein (PA-GFP, *photoactivatable green fluorescent protein*) eingesetzt. Diese modifizierte Variante von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) ist im Grundzustand vor der Aktivierung kaum fluoreszent. Erst nach einer Photoaktivierung durch Licht einer Wellenlänge von ca. 405 nm kommt es zu einer Decarboxylierung, wonach grünes Fluoreszenzlicht etwa 100-mal stärker als vor der Aktivierung emittiert wird. Nach der Photokonversion verhält sich PA-GFP in der Zelle wie ein normales EGFP-Molekül (Patterson und Lippincott-Schwartz, 2002).

Für die Experimente mit PA-GFP wurde der eukaryontische Expressionsvektor pCK2 verwendet, der neben der PA-GFP-Sequenz gekoppelt an eine mitochondriale Signalsequenz (MTS, *mitochondrial targeting signal*) noch eine Sequenz für DsRedM (ein rotfluoreszierendes Protein) mit mitochondrialer Signalsequenz für die Gegenfärbung der Mitochondrien enthielt. Um die Expression beider Proteine innerhalb der gleichen Zelle sicherzustellen, verfügte das Plasmid pCK2 über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES, *internal ribosome entry site*).

Mithilfe des Expressionsvektors pCK2 wurde in HeLa-Zellen die Fusion von Mitochondrien dokumentiert, bei der eine sofortige Verteilung des PA-GFP innerhalb der Matrix der neu zusammengesetzten Organellen erfolgte. Bei der Zeitserie in Abb. 5-1 sind die Mitochondrien einerseits mit DsRedM-Mito gefärbt, andererseits erfolgte die Färbung mit photoaktiviertem grünfluoreszierendem Protein. Die Aufnahmen A1 und A2 zeigen mitochondriale Fusionsereignisse, was mit einem weißen Pfeilkopf markiert ist. Die grüne Fluoreszenz des PA-GFP verteilte sich sofort homogen in dem fusionierten Mitochondrium, so dass es zu einer Intensitätsverringering des grünen Farbstoffs kam. Mit diesem Experiment konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Mitochondrien in HeLa-Zellen fusionieren und, dass es zu einem schnellen Austausch von löslichen Matrixproteinen innerhalb der neuen, größeren Organelle kommt. Die Verteilung des PA-GFP innerhalb des neuen Mitochondriums geht mit einem Intensitätsverlust einher, da es zu einer Verdünnung kommt.



**Abb. 5-1:** HeLa transfiziert mit pCK2. Ausschnitt aus Zeitreihe, Beginn ca. 18 min nach Photoaktivierung. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

## 5.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Rückbildung von Megamitochondrien in $\rho^0$ -Zellen

In  $\rho^0$ -Zellen, deren Mitochondrien über keine mitochondriale DNA mehr verfügen, bilden sich im Zytoplasma mit fortlaufender Kultivierungszeit und zunehmenden Azidifizierung des Mediums Megamitochondrien. Diese entstehen sowohl durch zahlreiche Fusionsereignisse als auch einem Schwellen durch vermehrten Wassereinfluss in die Mitochondrienmatrix. Alle Mitochondrien liegen dann als große kugelförmige Strukturen in der Zelle vor und nehmen somit die geringste Oberfläche zu dem vorhandenen Volumen ein. Die Entstehung der Megamitochondrien ist dabei abhängig von einer hohen Protonenkonzentration zusätzlich zu einer ausreichend großen Menge an Laktat im Medium (Milchsäure) (Kukat *et al.*, *submitted*; Kukat, Dissertation 2007).

Wie durch frühere Untersuchungen gezeigt werden konnte, handelt es sich bei der Entstehung der Megamitochondrien zunächst nicht um apoptotische Vorgänge, da durch den Austausch des aziden Mediums durch frisches eine äußerst schnell verlaufende Rückbildung der Megamitochondrien in ein für  $\rho^0$ -Zellen typisches Mitochondrienetzwerk erfolgt. Dabei kommt es zunächst zu Verformungen der Megamitochondrien mit fortschreitender Tubulierung in lange Mitochondrienschläuche und zahlreichen Fissionsprozessen in einzeln vorliegende Mitochondrieneinheiten. Metabolische Untersuchungen zeigten, dass für die Rückbildung der Megamitochondrien zu einem Netzwerk ausschließlich die im Medium vorhandene Protonenkonzentration ausreichend gering sein muss, wobei ein Schwellenwert existiert, unterhalb dessen die Megamitochondrien bestehen bleiben (Kukat *et al.*, *submitted*).

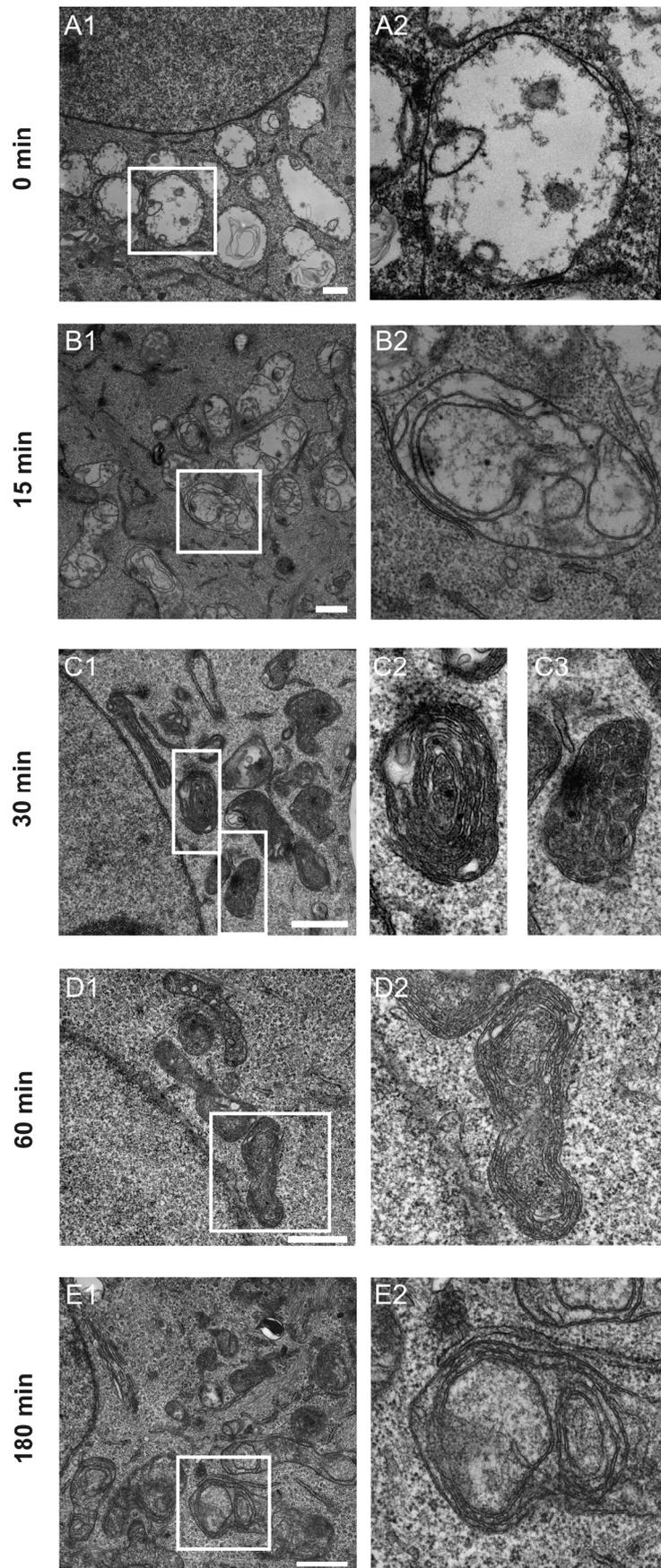
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rückbildung der Megamitochondrien auf elektronenmikroskopischer Ebene untersucht, um Einblicke darüber zu erhalten, welche Mechanismen für diesen Prozess von Bedeutung sind.

Für diesen Zweck wurde das azide Medium der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7 nach der Bildung von Megamitochondrien gegen frisches Kultivierungsmedium ausgetauscht und die strukturellen Veränderungen der Mitochondrien-Morphologie nach 0, 15, 30, 60 und 180 min analysiert. Die ursprüngliche Morphologie der runden Megamitochondrien (Abb. 5-2, A1-A2) mit elektronenarmer Matrix und fehlenden Cristae veränderte sich binnen 15 min. Es bildeten sich ovale mitochondriale Formen, mit wiederauftretenden Cristae in der Matrix, die als

multiple große Doppelmembranringe sichtbar sind (Abb. 5-2, B1-B2). 30 min und 60 min (Abb. 5-2, C1-D2) nach dem Mediumwechsel sind erstaunliche Unterschiede in den Mitochondrien ersichtlich, denn nun scheint die Matrix sehr elektronendicht zu sein und manche Mitochondrien enthalten zahlreiche konzentrische Ringe, die einander umgeben (Abb. 5-2, C2, D2). Wahrscheinlich sind die Cristae hier aus zwei Membranen zusammengesetzt, was jedoch nicht klar erkennbar ist. Der Raum zwischen beiden Membranen besitzt ein größeres Volumen als 15 min nach dem Mediaustausch. Andere Mitochondrien beinhalten amorphe Cristae, ebenso mit einer hohen Elektronendichte (Abb. 5-2, C3). Nach 180 min ist eine für  $\rho^0$ -Zellen typische Mitochondrienmorphologie beobachtbar (Abb. 5-2, E1-E2). Mitochondrien auf Abbildungen zu diesem Zeitpunkt besitzen ein Matrixkompartiment, mit einer Elektronendichte, die zwischen derjenigen von Megamitochondrien und der extrem dichten Matrix bei den 30 min-Aufnahmen liegt. Die charakteristischen zwiebelringartigen Doppelmembrancristae sind sichtbar und die Organellen erscheinen typisch geschwollen.

Die Veränderungen, die zwischen den Zeitpunkten 15, 30/60 und 180 min nach dem Austausch des sauren Mediums deuten an, dass die Rückbildung der Megamitochondrien über den Normalzustand der  $\rho^0$ -Mitochondrien hinausgeht, denn nach 15 min erscheint die Mitochondrienmorphologie sehr ähnlich derjenigen in der Abbildung bei 180 min. Wobei erst 180 min nach den ersten Veränderungen das System im Gleichgewicht scheint, und die typische  $\rho^0$ -Mitochondrienmorphologie stabil wiederhergestellt ist.

Zusammenfassend zeigen die Aufnahmen, dass die Rückbildung der Megamitochondrien ein schneller Prozess ist, welcher durch den Austausch des aziden Kulturmediums induziert wird und nicht nur von mitochondrialen Fissionsereignissen begleitet wird, sondern ebenfalls mehrere erhebliche Veränderungen in der Cristaestruktur und Matrixzusammensetzung nach sich zieht, wahrscheinlich begleitet von einem massiven Wasserefflux aus den Mitochondrien.



**Abb. 5-2:** Transmissionselektronenmikroskopaufnahmen der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7 nach Induktion der Rückbildung der Megamitochondrien 68 h nach Aussäen. Die Zeitpunkte geben jeweils den Zeitraum nach dem Mediumwechsel an. Messbalken: 1  $\mu$ m.

### 5.3 Exogene Induktion von Megamitochondrien

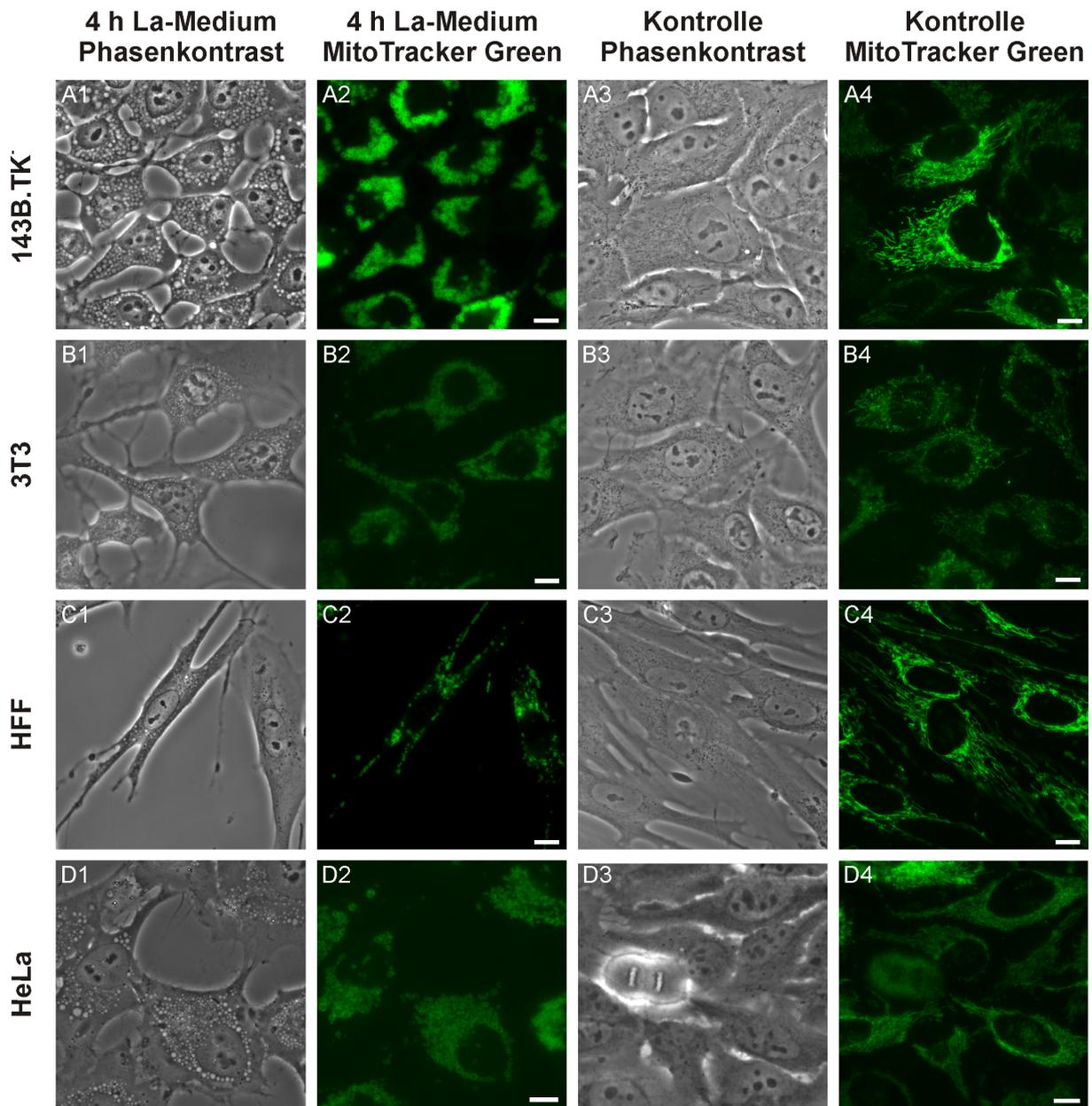
Endogen in  $\rho^0$ -Zellen auftretende Megamitochondrien lassen sich in anderen Zelllinien, welche noch über mtDNA verfügen, exogen induzieren. Dies konnte durch die Übertragung des azidifizierten Mediums von 143B.TK<sup>-</sup> K7-Zellen auf andere Zelllinien, wie 143B.TK<sup>-</sup> und HeLa gezeigt werden. Zudem war eine Induktion der Riesenmitochondrien durch das Ansäuern des Kulturmediums mit Milchsäure möglich (Kukat *et al.*, *submitted*).

Diese Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um in Zellen, welche noch über ein mitochondriales Genom verfügen, exogen die Bildung von Megamitochondrien hervorzurufen. Hierfür wurde mit Milchsäure azidifiziertes Kulturmedium (im Weiteren als La-Medium bezeichnet) der jeweiligen Zelllinien verwendet. Somit entstand ein Modellsystem für mitochondriale Fusionsereignisse in lebenden Zellen.

Das Ansäuern des Mediums mit Milchsäure wurde für die Zelllinien 143B.TK<sup>-</sup>, 3T3, HFF und HeLa durchgeführt. In Abb. 5-3 wird ersichtlich, dass sich nach jeweils vier Stunden Inkubation mit dem azidifizierten Medium große Mitochondrien gebildet haben, die sowohl als runde, helle Strukturen im Phasenkontrast sichtbar waren, als auch mit MitoTracker Green FM angefärbt werden konnten (Spalte 1 und 2, Abb. 5-3). Diese Mitochondrien unterscheiden sich deutlich von den netzwerkartigen Strukturen in den unbehandelten Kontrollzellen, bei denen nur das Medium ausgetauscht wurde, um einen mechanischen Einfluss auszuschließen (Spalte 4, Abb. 5-3).

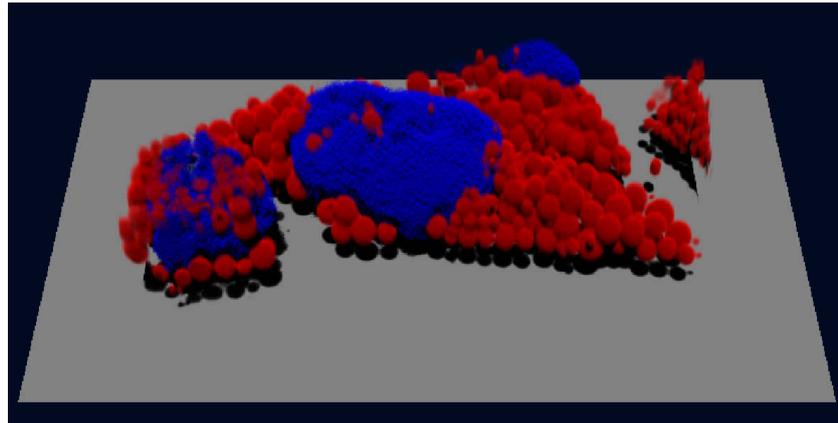
Weiterhin konnten in den Zelllinien HEp-2 und HT1080C Megamitochondrien induziert werden; auf Abbildungen dieser Zelllinien wird verzichtet.

Bei allen untersuchten Zelllinien war die Bildung der Megamitochondrien revidierbar. Durch den Austausch des La-Mediums durch das Standardkultivierungsmedium der jeweiligen Zelllinie kam es wieder zur Ausbildung eines mitochondrialen Netzwerks. Dies ist ein Indikator dafür, dass es sich bei der Megamitochondrienbildung durch Milchsäure nicht um den Beginn apoptotischer Vorgänge handelt.



**Abb. 5-3:** Lebendbetrachtung der Megamitochondrien-Induktion am Fluoreszenzmikroskop. Eichstriche: 10  $\mu$ m.

Dass es sich bei den ringförmigen Strukturen der Mikroskopieaufnahmen in Abb. 5-3 tatsächlich um kugelförmige Megamitochondrien handelt, konnte mithilfe einer 3D-Visualisierung verdeutlicht werden, welche mit einem z-Stapel am konfokalen Laserscanningmikroskop und einem Volumenrender-Algorithmus erstellt wurde (Abb. 5-4). Der Zellkern, der stabil mit DsRed1-Mito transfizierten Zelllinie 143B.DsRed1-Mito wurde mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht.



**Abb. 5-4:** 3D-Visualisierung von Zellen durch Volumenrendern (Simulated Fluorescence Process (SFP) algorithm) aus einem z-Stapel einer 143B.DsRed1-Mito-Zelle 5 h nach Applizierung von La-Medium.

## 5.4 Analyse der Bildung und Rückbildung von Megamitochondrien

Mitochondrien sind dynamische Organellen, welche einer ständigen Fusions- und Fissionsaktivität unterliegen. Aufgrund der limitierten Auflösung der Lichtmikroskopie im Vergleich zur Elektronenmikroskopie, können diese Vorgänge nur sehr schlecht an lebenden Zellen verfolgt werden.

Die Induzierbarkeit und Bildung von Megamitochondrien durch azidifiziertes Kulturmedium setzt zwangsläufig eine mitochondriale Fusionsaktivität voraus und macht dies zum idealen Modellsystem zur Erforschung der Fusion von Mitochondrien in Zellen mit mitochondrialer DNA. Die Revidierbarkeit dieser Fusionsereignisse durch Austausch des sauren Mediums durch frisches stellt zudem ein sehr gutes Modellsystem zur Untersuchung mitochondrialer Fission in lebenden Kulturzellen dar.

Für diese Untersuchungen wurde ausgehend von HeLa-Zellen eine stabile Zelllinie erstellt, welche dauerhaft EGFP exprimiert, das mit Hilfe einer Signalsequenz in die äußere Mitochondrienmembran lokalisiert wird. Nach einer Transfektion mit dem Vektor pEGFP-OMP25Fr wurden die transfizierten Zellen mehrere Wochen mit Geneticin selektioniert und Einzelklone isoliert. Aus solch einem Klon resultierte die Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr.

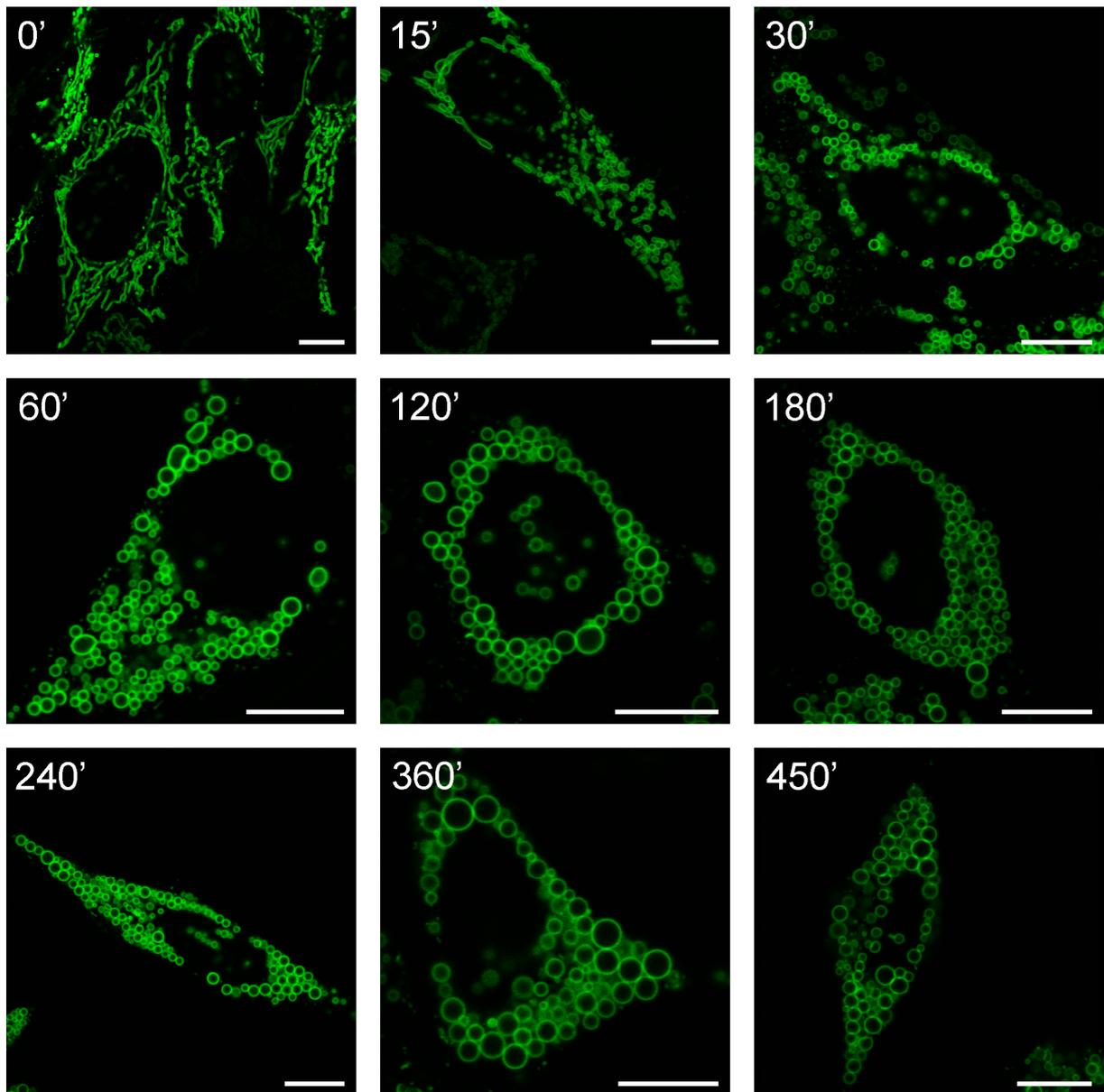
Die Zelllinie HeLa.DsRedM-Mito entstand mit der gleichen Methode mithilfe des Vektors pDsRedM-Mito, welcher die mitochondriale Matrix mit dem rotfluoreszierenden Protein DsRedM färbt.

## **5.4.1 Mikroskopische Analyse der Bildung von Megamitochondrien**

### ***5.4.1.1 Konfokalmikroskopische Analyse***

Die Bildung der Megamitochondrien in Zellen mit mitochondrialer DNA wurde nach Austausch des Kulturmediums gegen La-Medium am Konfokalmikroskop mit der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr dokumentiert. Dazu wurden zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360 und 450 min nach Zugabe von azidem La-Medium Aufnahmen von lebenden Zellen gemacht (Abb. 5-5). Die Färbung der Megamitochondrien erscheint dabei als Ring, da es sich um optische Schnitte handelt und EGFP-OMP25Fr nur die äußere Mitochondrienmembran färbt.

Zum Zeitpunkt 0 Minuten (0') kurz vor dem Austausch des Standard-Kultivierungsmediums gegen La-Medium zeigte sich bei der Zelllinie HeLa-EGFP-OMP ein typisches mitochondriales Netzwerk (Abb. 5-5, 0'). Kurz nach dem Mediumwechsel löste sich dieses Netzwerk auf und es kam zu kleineren runden Mitochondrien möglicherweise nach anfänglichen Fissionsereignissen. Nach etwa 60 Minuten waren erste große, runde Mitochondrien zu erkennen, wobei die Anzahl der Organellen über diese Zeit noch weiter abnahm, was auf Fusionsereignisse schließen lässt. Am Ende der Versuchsreihe, 450 Minuten nach dem Mediaustausch waren nur noch wenige sehr große Megamitochondrien innerhalb des Zytoplasmas zu sehen (Abb. 5-5).

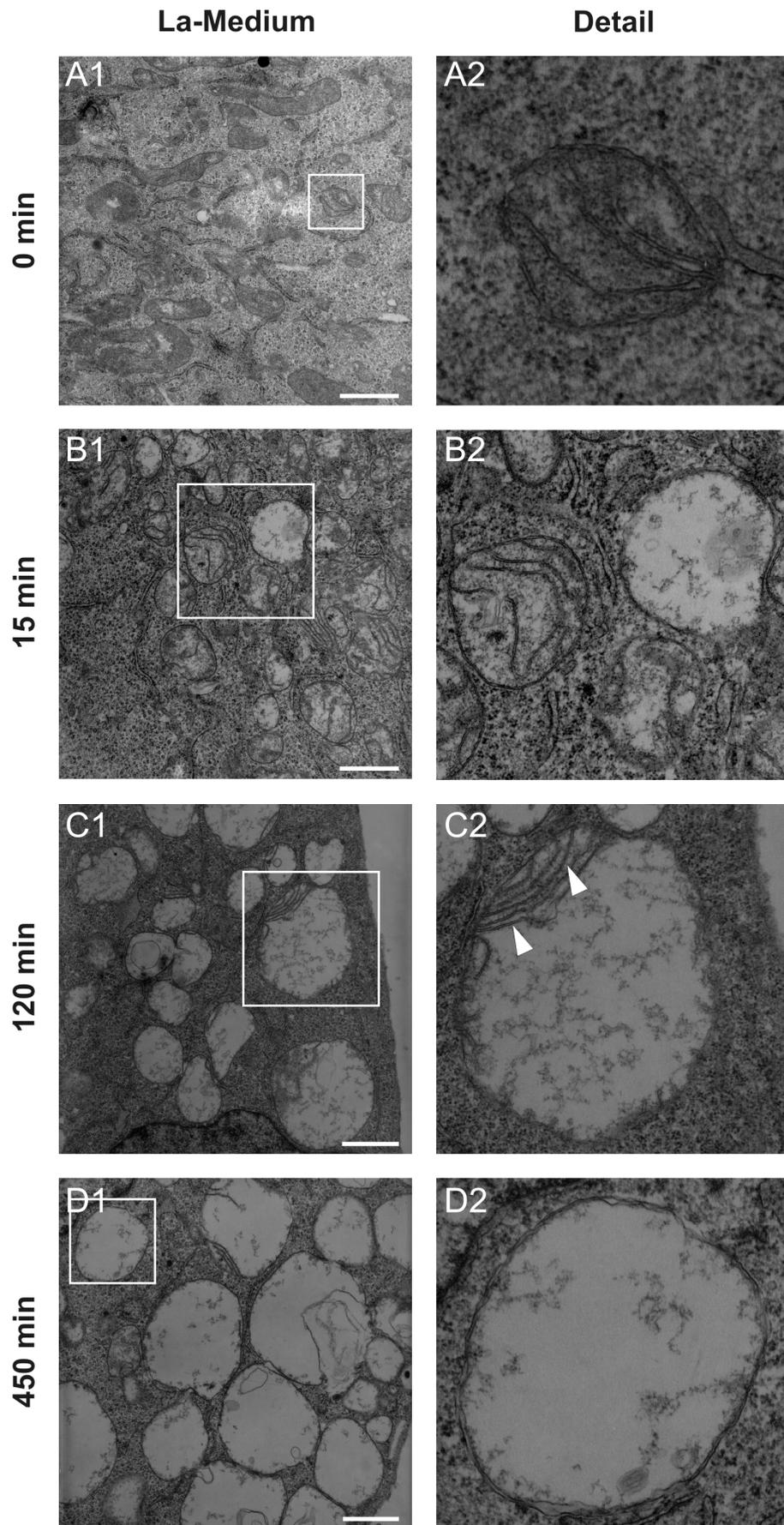


**Abb. 5-5:** Konfokalmikroskopische Lebendbetrachtung einer Zeitreihe nach Induktion von Megamitochondrien in der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr. Die Zeitpunkte geben den Zeitraum nach Applizierung von La-Medium an. Eichtriche: 10  $\mu$ m.

### **5.4.1.2 Elektronenmikroskopische Analyse**

Um Einblicke in die Ultrastruktur der Mitochondrien bei der Induktion von Megamitochondrien zu erhalten, wurde die Bildung der Riesenorganellen in HeLa-Zellen nach Austausch des Kulturmediums gegen azides La-Medium mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops untersucht. Hierzu wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Wechseln des Mediums fixiert und analysiert.

In Abb. 5-6 sind die Ergebnisse dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 min, also vor der Zugabe des La-Mediums erkennt man die Mitochondrien als längliche Organellen, welche über Cristae verfügen. Schon 15 min nach dem Austausch des Kulturmediums gegen La-Medium liegen die Mitochondrien eher einzeln und rundlich vor und es ergibt sich ein heterogenes Bild: zum einen existieren Mitochondrien mit normaler Cristae-Struktur, zum anderen liegen runde Mitochondrien vor, die über keine Cristae mehr verfügen und sehr elektronenarm sind. Insgesamt wirken die Mitochondrien angeschwollen. Dies ist der vorherrschende Phänotyp der Organellen 120 min nach Applizierung von La-Medium. Hier sieht man nur noch runde, stark vergrößerte Mitochondrien, in denen kaum noch innere Strukturen erkennbar sind. Manche Organellen weisen noch innere Membranen auf, die nur im Randbereich auftreten, was in der Abb. 5-6, C2 mit Pfeilköpfen markiert ist. 450 min nach Mediumaustausch sind die Mitochondrien noch größer im Durchmesser und haben im inneren nahezu keine Strukturen mehr, die sich visualisieren lassen – es ist nur noch die Doppelmembran um die Riesenorganelle zu erkennen.

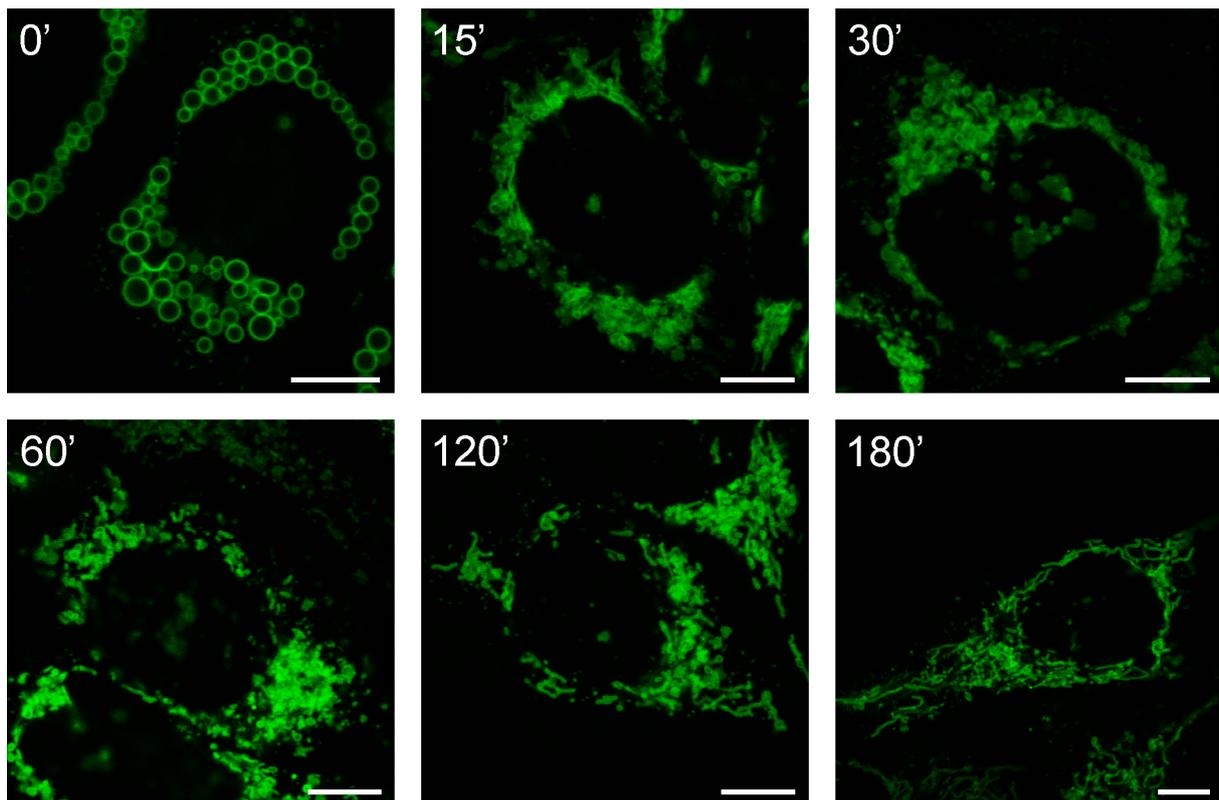


**Abb. 5-6:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Megamitochondrienbildung in HeLa-Zellen. Die Zeitpunkte geben den Zeitraum nach Applizierung von La-Medium an. Messbalken: 1  $\mu$ m.

## 5.4.2 Mikroskopische Analyse der Rückbildung von Megamitochondrien

### 5.4.2.1 Konfokalmikroskopische Analyse

Neben der Induktion der Megamitochondrien wurde auch die Rückbildung der Megamitochondrien in ein Netzwerk untersucht, um auszuschließen, dass es sich um apoptotische Ereignisse handelte und um eventuelle Unterschiede im Verhalten der Rückbildung zu den  $\rho^0$ -Zellen zu erkennen. Hierzu wurde das La-Medium nach 5-stündiger Inkubationszeit nach Ausbildung der Megamitochondrien in HeLa-Zellen wieder gegen normales Kultivierungsmedium ausgetauscht und die Rückbildung zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 120, 180 Minuten nach dem Mediumwechsel konfokalmikroskopisch dokumentiert (Abb. 5-7).



**Abb. 5-7:** Konfokalmikroskopische Lebendbetrachtung einer Zeitreihe zur Rückbildung der Megamitochondrien in der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr. Die Zeitpunkte geben den Zeitraum nach Mediumwechsel an. Eichtriche: 7,5  $\mu\text{m}$ .

180 min nach dem Austausch des aziden La-Mediums gegen frisches Kulturmedium war eine vollständige Rückbildung des mitochondrialen Netzwerks erkennbar (Abb. 5-7, 180'). Bis 60

min nach dem Mediumwechsel waren noch runde Mitochondrien zu sehen, deren Durchmesser deutlich geringer war als derjenige von Megamitochondrien.

Der Vorgang der Rückbildung der Megamitochondrien ist somit ein sehr schneller Prozess, denn bereits nach 15 Minuten sind in den Fluoreszenzaufnahmen kaum noch große Mitochondrien zu erkennen und im Vergleich zu 0 min kam es zu großen morphologischen Veränderungen der Organellen.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass es sich bei der Megamitochondrienbildung nach Induktion mit La-Medium nicht um apoptotische Prozesse handelte, denn die Mitochondrienmorphologie konnten von den Riesenorganellen wieder in ein mitochondriales Netzwerk zurückgeführt werden.

### ***5.4.2.2 Elektronenmikroskopische Analyse***

Bessere Einblicke in diese Strukturveränderungen bei der Rückbildung der Megamitochondrien wurden von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erwartet. Hierzu wurden HeLa-Zellen für 5 h mit La-Medium inkubiert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Die Bilder, welche mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops erhalten wurden, sind in Abb. 5-8 dargestellt.

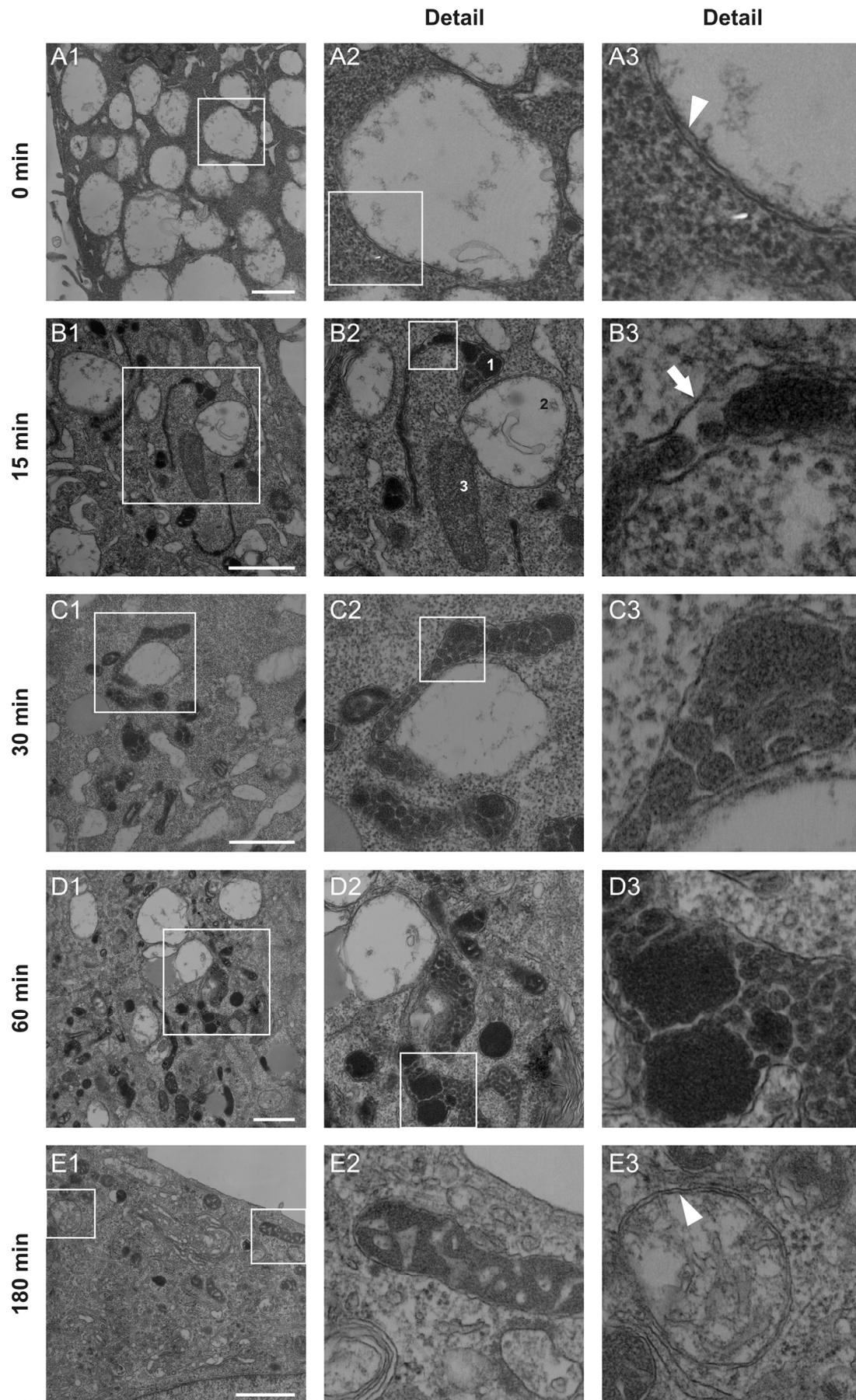
Nach 5-stündiger Inkubation erkennt man die großen runden Organellen, welche über eine Doppelmembran aus äußerer und innerer Mitochondrienmembran verfügen, was mit einem Pfeilkopf markiert ist (Abb. 5-8, A3). Bereits 15 min nach Austausch des La-Mediums durch normales Kultivierungsmedium kommt es zu einem sehr heterogenen Bild, was die Morphologie der Mitochondrien betrifft. Man erkennt drei verschiedene Formen der Mitochondrien: zum einen langgestreckte, sehr kontrastreiche Mitochondrien (in Abb. 5-8, B2 mit „1“ gekennzeichnet), deren innere Mitochondrienmembran vesikuliert ist und eventuell Komponenten der Matrix mit einschließt. Diese Mitochondrienform ist nur noch von der äußeren Mitochondrienmembran umgeben, an der die innere nicht mehr eng anliegt (B3, Pfeil).

Zum anderen treten weiterhin große, runde Mitochondrien auf, die den Riesenorganellen zum Startpunkt 0 min ähneln (in Abb. 5-8, B2 mit „2“ markiert). Zum dritten gibt es Mitochondrien, die von der Elektronendichte den normalen Organellen ähneln, wobei noch keine deutlichen Cristae zu erkennen sind (in Abb. 5-8, B2 mit „3“ versehen).

Zum Zeitpunkt 30 min nach Mediumwechsel treten immer noch runde, wenig elektronendichte Mitochondrien auf, jedoch ebenso sehr viele vesikulierte, elektronendichte Organellen, die dem „Typ 1“ der Abbildung B2 ähneln, aber weniger langgestreckt wirken. Nach 60 min ist das Gesamtbild ähnlich der Situation wie 30 min nach der Mediumauswechslung, wobei sehr elektronendichte Strukturen in den vesikulierten Organellen vorkommen.

180 Minuten nach dem Wechsel von La-Medium zu normalen Kultivierungsmedium sind die Mitochondrien von ihrer Größe vergleichbar mit unbehandelten Kontrollzellen. Es treten jedoch immer noch vesikulierte Mitochondrien auf, die über elektronendichte Kompartimente verfügen (E2). Andererseits gibt es Organellen, welche wieder Cristae und eine Doppelmembran enthalten, bei der die innere und äußere Mitochondrienmembran eng aneinander liegen (E3, Pfeilkopf).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Rückbildung der Megamitochondrien sehr heterogen und langsam von statten geht, denn es kommt zu verschiedenen mitochondrialen Strukturen, die nach 180 min noch nicht alle in normal aussehende Organellen überführt sind.

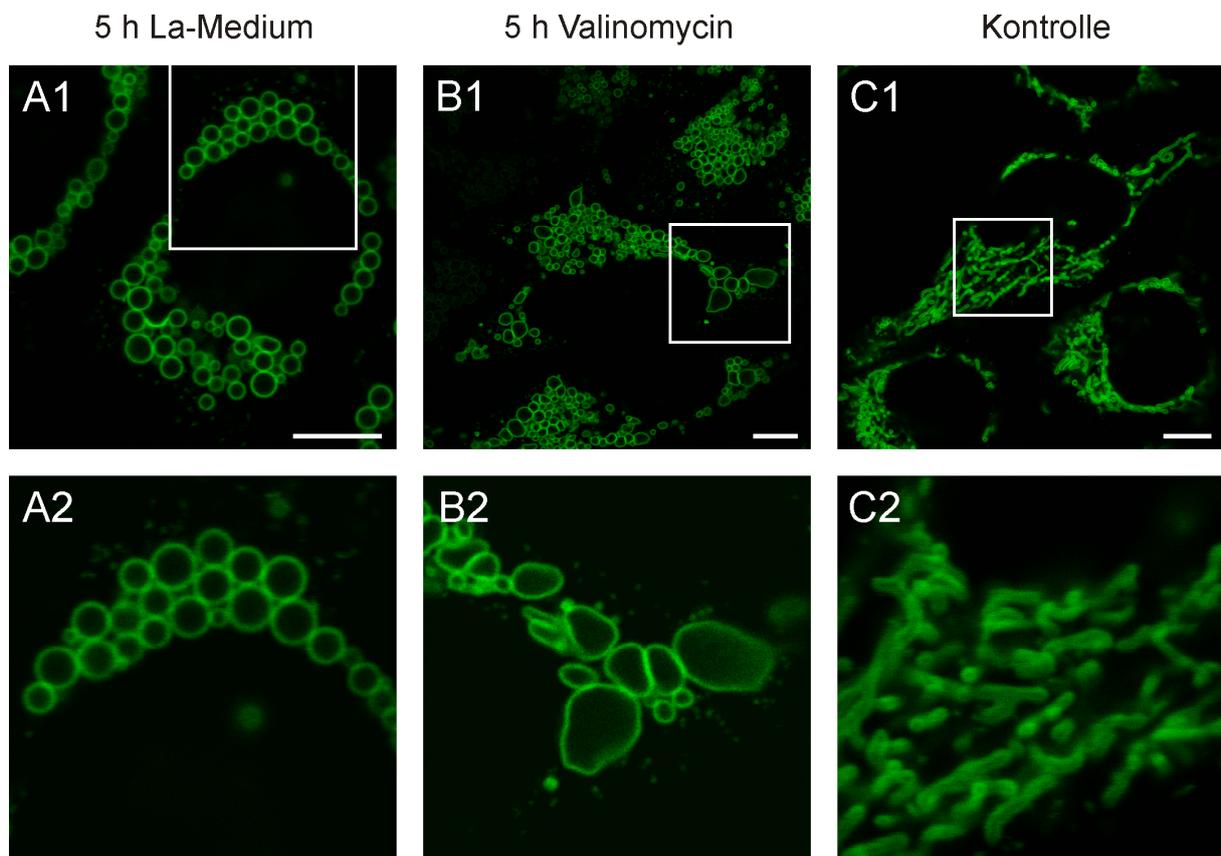


**Abb. 5-8:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen zur Rückbildung der Megamitochondrien. Die Zeitpunkte geben den Zeitraum nach Mediumwechsel an. Messbalken: 1  $\mu$ m.

## 5.5 Induktion von Megamitochondrien mit Valinomycin

Megamitochondrien können nicht nur durch Milchsäure, sondern auch durch die Zugabe von Chemikalien wie z.B. durch Valinomycin in Kulturzellen induziert werden. Valinomycin ist ein ionophores Zyklopeptid, welches von *Streptomyces fulvissimus* produziert wird und zur Klasse der neutralen Transporter der Ionophor-Antibiotika zählt. Durch Valinomycin werden einwertige Ionen ( $Rb^+ > K^+ \gg NH_4^+ > Na^+ > Li^+$ ) durch Membranen transportiert, zweiwertige Ionen werden hingegen nur sehr schwach komplexiert.

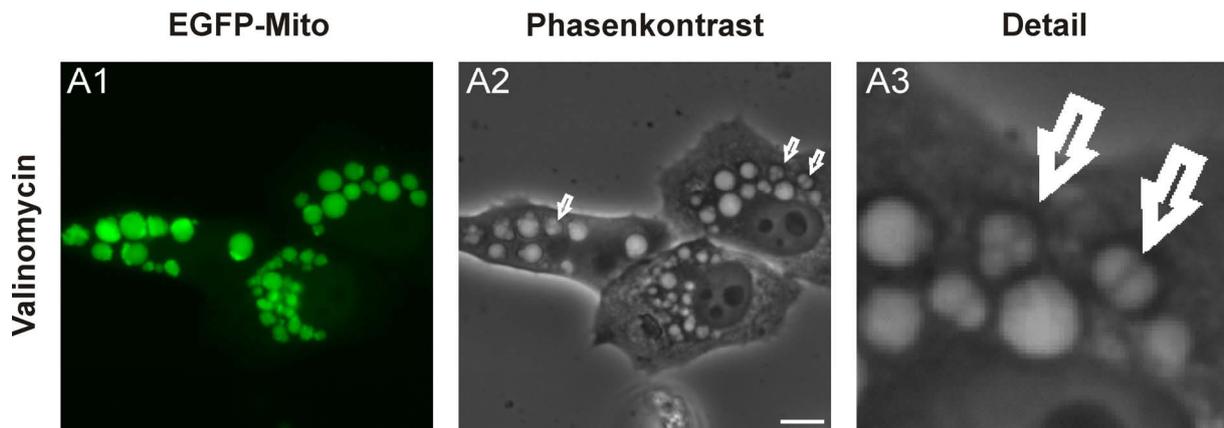
In Abb. 5-9 sind Mitochondrien der stabilen Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr nach 5-stündiger Inkubation mit einerseits La-Medium (Spalte A), andererseits mit Valinomycin (Spalte B) dargestellt. Spalte C zeigt unbehandelte Kontrollzellen.



**Abb. 5-9:** Konfokalaufnahmen der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr nach Behandlung mit La-Medium bzw. Valinomycin sowie unbehandelte Kontrolle. Eichtriche: 7,5  $\mu$ m.

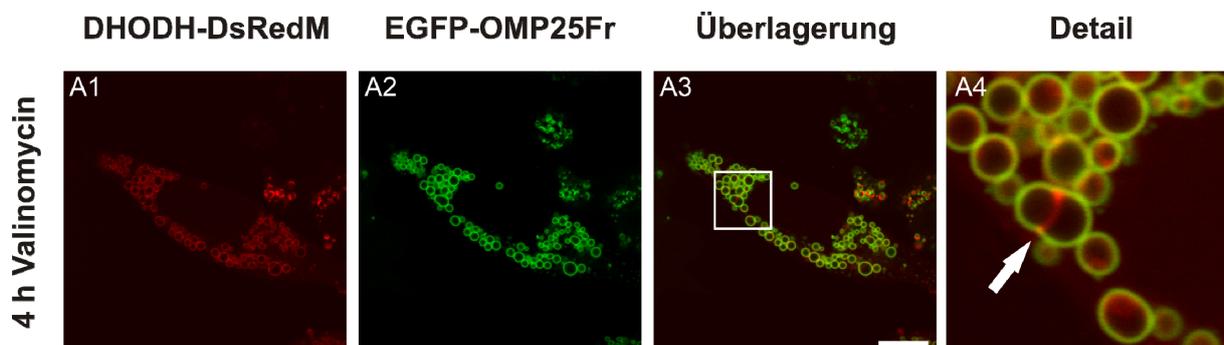
Die Struktur der Valinomycin-induzierten Riesenorganellen weicht sowohl deutlich ab von derjenigen, welche durch La-Medium induziert wurde und ebenso von den endogenen Megamitochondrien der  $\rho^0$ -Zelllinie (Kukat, Dissertation 2007). Die Valinomycin-generierten

Megamitochondrien sind dabei nicht so kugelförmig wie die durch La-Medium erzeugten. Weiterhin kommt es nach der Fusion der äußeren Mitochondrienmembranen zu einer unvollständigen Fusion der inneren Membranen (Malka *et al.*, 2005). Dieses Phänomen konnte mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahmen sichtbar gemacht werden und ist in Abb. 5-10 dargestellt. Nach Applizierung von Valinomycin kam es zur Induktion von Megamitochondrien, die durch Septen in mehrere Matrixkompartimente geteilt waren, was in der Phasenkontrastaufnahme durch Pfeile markiert ist (Abb. 5-10, A2-A3).



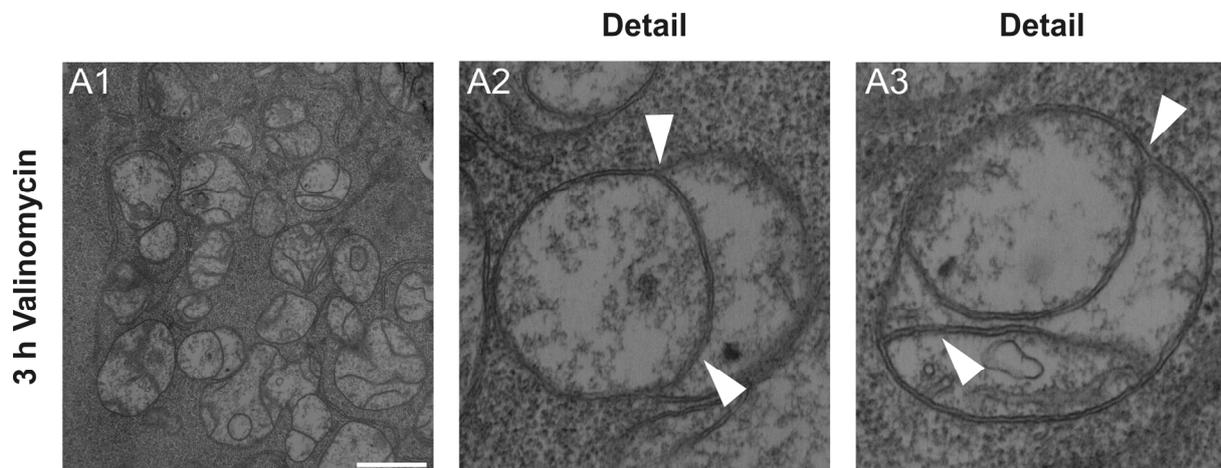
**Abb. 5-10:** Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme der Zelllinie 143B.EGFP-Mito nach Valinomycin-Behandlung. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

Dass es sich bei den Septen um innere Mitochondrienmembran handelt konnte mit der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr gezeigt werden, welche zusätzlich für die Färbung der inneren Mitochondrienmembran mit pDHODH-DsRedM transfiziert wurde. Nach der Behandlung mit Valinomycin wurde die unvollständige Fusion innerer Membran in Megamitochondrien nachgewiesen, was in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. Dort ist ein Megamitochondrium von einer äußeren Membran umgeben, jedoch sind die inneren Kompartimente durch ein rot gefärbtes Septum aus innerer Mitochondrienmembran getrennt (Abb. 5-11).



**Abb. 5-11:** Konfokalaufnahmen von HeLa.EGFP-OMP25Fr transfiziert mit pDHODH-DsRedM zur Färbung der inneren Mitochondrienmembran nach 4 h Valinomycin-Behandlung. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Mitochondrien mit Septierung nach Induktion von Megamitochondrien mit Valinomycin konnten ebenfalls in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. In Abb. 5-12 sind Riesenorganellen gezeigt, die in mehrere Kompartimente aufgeteilt sind, durch innere Mitochondrienmembranen, welche durch Pfeilköpfe markiert sind (Abb. 5-12, A2-A3).



**Abb. 5-12:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen 3 h nach Valinomycin-Zugabe. Eichstrich: 1  $\mu$ m.

## 5.6 Einfluss von Inhibitoren auf die Bildung von La-Medium-induzierten Megamitochondrien

Es ist bekannt, dass in Säugerzellen für die intakte Fusion der inneren Mitochondrienmembran ein Membranpotential über der inneren Membran notwendig ist (Ishihara *et al.*, 2002; Legros *et al.*, 2002; Malka *et al.*, 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein zytoplasmatischer ATP-Vorrat durch eine funktionierende Glykolyse für die Fusion von innerer jedoch nicht äußerer Mitochondrienmembran essentiell ist (Malka *et al.*, 2005). Oxidative Phosphorylierung und somit ein mitochondrialer ATP-Gehalt sind für die Fusion von innerer und äußerer Membran nicht nötig (Malka *et al.*, 2005).

Um Aufschluss darüber zu erhalten, welchen Einfluss das Membranpotential, die Ionenverteilung und die Funktion der oxidativen Phosphorylierung auf die Entstehung und Rückbildung der Megamitochondrien hat, wurden die Zelllinien 143B.EGFP-Mito (Abb. 5-13) und HeLa.EGFP-OMP25Fr (Daten nicht gezeigt) für zwei bis vier Stunden mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit adäquatem La-Medium versetzt, welches ebenfalls die gleiche Chemikalienkonzentration

besaß wie bei der Präinkubation. Nach etwa drei Stunden erfolgte die Analyse der Mitochondrienmorphologie mit dem Konfokalmikroskop. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die jeweils nur mit den Inhibitoren, jedoch nicht mit La-Medium versetzt wurden, somit ergibt sich eine Gegenüberstellung von Zellen, die mit La-Medium und Inhibitoren behandelt wurden zu solchen, denen nur Chemikalien zugefügt wurden (Abb. 5-13).

In Abb. 5-13 sind jeweils in der linken Spalte die Zellen nach Applizierung der Drogen dargestellt und in der rechten Spalte nach Zugabe von Drogen und La-Medium. Bei der Kontrolle erkennt man das typische mitochondriale Netzwerk (A1) und nach La-Medium-Gabe die Bildung der kugelrunden Megamitochondrien (A2).

Nach dem Zusatz von CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon), einem Protonophor welcher das Membranpotential der Mitochondrien zerstört, wird eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks deutlich. Es kam zu Strukturen, die im Zentrum eine verringerte Fluoreszenz aufwiesen, sowie zu ringförmigen Formen, welche ein fluoreszentes Zentrum hatten (Abb. 5-13, B1 und Detail). Nach der Zugabe von La-Medium mit CCCP kam es nicht zur Bildung von Megamitochondrien, sondern ebenfalls zur Fragmentierung des Netzwerks, wobei einerseits die gleichen Strukturen wie bei der Induktion mit CCCP alleine auftraten (B3), andererseits kam es zu kleinen runden Mitochondrien (B2). In allen Fällen der Behandlung mit CCCP wurden keine Megamitochondrien ausgebildet.

Nachdem die Zellen mit Nigericin inkubiert wurden, kam es ebenfalls zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks und es lagen kleine, runde Einzelorganellen vor (Abb. 5-13, C1). Nigericin, ein Polyether-Ionophor, welches das Membranpotential stört und die ATPase-Aktivität stimuliert hat folgende Ionenselektivität:  $K^+ > Cs^+ \geq Rb^+ \gg Na^+$ .

Nach dem Wechsel zu La-Medium bildeten sich hier ebenso keine Megamitochondrien und das fragmentierte Muster der Mitochondrien blieb erhalten (C2), somit verhindert Nigericin die Induktion von Megamitochondrien.

Oligomycin – ein Macrolid-Antibiotikum aus *Streptomyces diastatochromogenes*, das die mitochondriale ATPase hemmt, indem es den Protonenkanal inhibiert – maximiert das Membranpotential der Mitochondrien. Nach der Applizierung wurde das mitochondriale Netzwerk teilweise fragmentiert, so dass neben runden Organellen noch langgestreckte vorlagen (Abb. 5-13, D1).

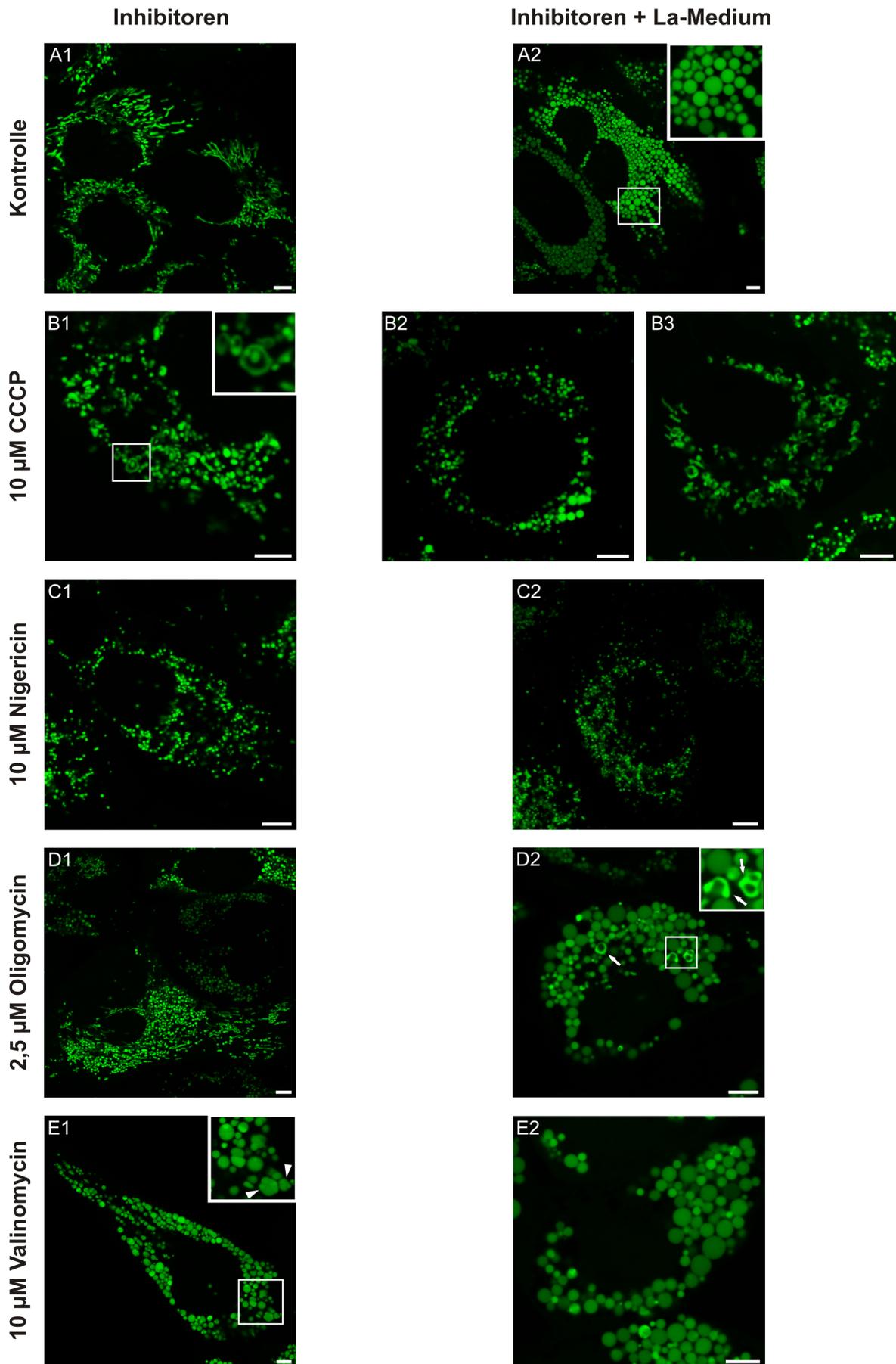


Abb. 5-13: Konfokalmikroskopische Analyse der Zelllinie 143B.EGFP-Mito nach Inkubation mit Inhibitoren und La-Medium. Eichstriche: 5  $\mu$ m.

Der Wechsel zum La-Medium bewirkte nach Oligomycin-Behandlung die Bildung von Megamitochondrien, die ähnliche Ausmaße besaßen wie diejenigen des Kontrollversuchs (D2). Selten traten zusätzlich auffällige Mitochondrienstrukturen auf, die in Abb. 5-13, D2 mit Pfeilen gekennzeichnet sind und aussehen, als hätten die Mitochondrien im Zentrum weniger Fluoreszenz.

Valinomycin induziert Megamitochondrien, wobei die innere Membran unvollständig fusioniert. Dies ist in der Detailaufnahme in Abb. 5-13, E1 mit Pfeilköpfen gekennzeichnet, worin ersichtlich ist, dass ein Riesenmitochondrium aus mehreren Matrixkompartimenten besteht. Nach Applizierung von La-Medium zu den präinkubierten Zellen bildeten sich Megamitochondrien, wobei bei diesen die innere Membran vollständig fusioniert schien, da die auffälligen Matrix-Strukturen von den Valinomycin-behandelten Zellen nicht mehr auftraten (E2).

Zusammenfassend verhinderten die Inhibitoren CCCP und Nigericin die Bildung von Megamitochondrien nach der Behandlung mit La-Medium, wohingegen nach Präinkubation mit Oligomycin und Valinomycin mit La-Medium Riesenorganellen erzeugt werden konnten.

## **5.7 Endogene Lokalisation mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine mittels Immunzytochemie**

Die Bildung der Megamitochondrien durch das La-Medium geht neben einer Zunahme des Durchmessers einher mit einer Verminderung der Gesamtzahl an Mitochondrien einer Zelle, so dass das dynamische Gleichgewicht von Fusion und Fission auf die Fusionsseite hin verschoben ist.

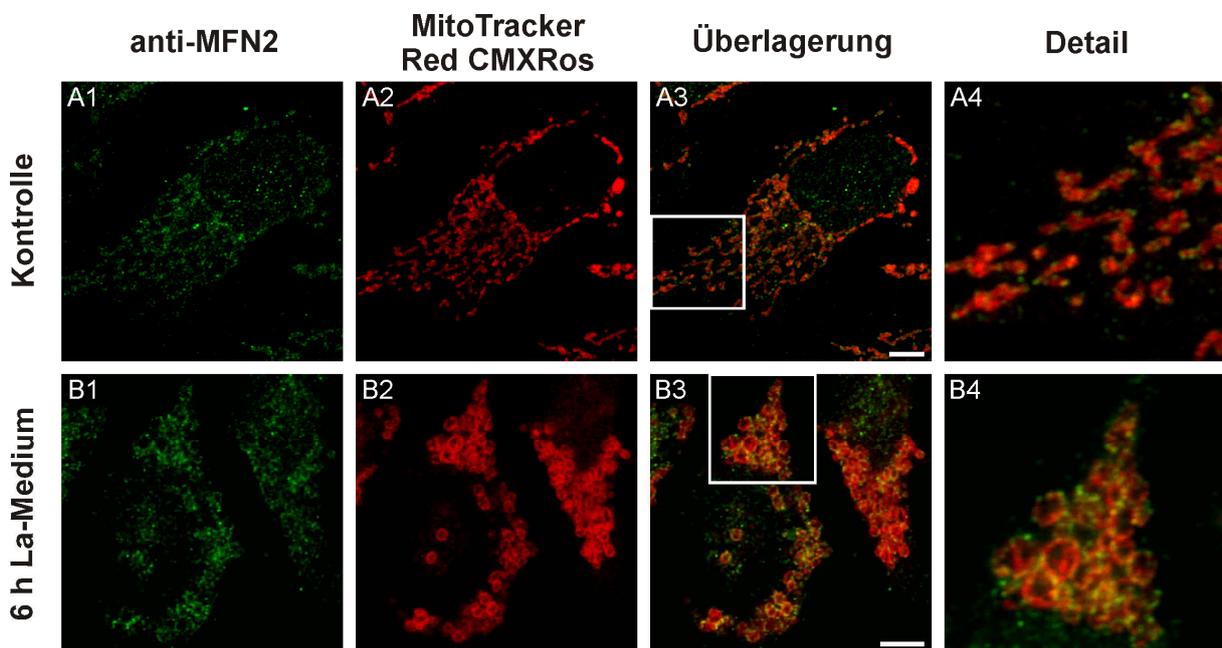
Um die Bildung der Megamitochondrien weiter aufzuklären wurde der Fokus auf die endogene Verteilung mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine gelegt. Hierzu wurden immunzytochemische Analysen mit Antikörpern gerichtet gegen einerseits das Fusionsprotein Mitofusin 2 (MFN2), andererseits gegen die Fissionsproteine hFis1 und Drp1/DNM1L verwendet. Damit wurde jeweils sowohl die endogene Verteilung der Proteine in unbehandelten Zellen detektiert, als auch die Verteilung nach Induktion von Megamitochondrien durch La-Medium bzw. nach Behandlung mit Inhibitoren.

### 5.7.1 Endogene Lokalisierung des Fusionsproteins Mitofusin 2 (MFN2)

Die endogene Verteilung von Mitofusin 2 (MFN2) in den Kontrollzellen war punktförmig an den Mitochondrien – verdeutlicht durch die grüne Fluoreszenz des Sekundärantikörpers. Vor allem an den Enden elongierter Mitochondrien oder zwischen benachbarten Organellen wurde Mitofusin 2 detektiert, was besonders in der Detailaufnahme deutlich wird. Die Mitochondrien wurden in den vorliegenden Aufnahmen mit MitoTracker Red CMXRos gefärbt (Abb. 5-14, A1-A4).

Nach der Induktion von Megamitochondrien durch La-Medium ergab sich eine Verteilung von MFN2 ebenfalls punktuell an der Außenseite rund um die mit MitoTracker Red CMXRos gefärbten Riesenorganellen (Abb. 5-14, B1-B4). Die Analyse erfolgte jeweils konfokalmikroskopisch an fixierten Präparaten.

Endogen liegt MFN2 punktförmig an den Mitochondrien vor, sowohl bei unbehandelten Kontrollzellen als auch nach Megamitochondrien-Induktion durch La-Medium.



**Abb. 5-14:** Konfokalmikroskopische Analyse der endogenen Verteilung von MFN2 in fixierten HeLa-Zellen nach Induktion von Megamitochondrien und in Kontrollzellen. Eichstriche: 5  $\mu$ m.

### 5.7.2 Endogene Lokalisierung des Fissionsproteins hFis1

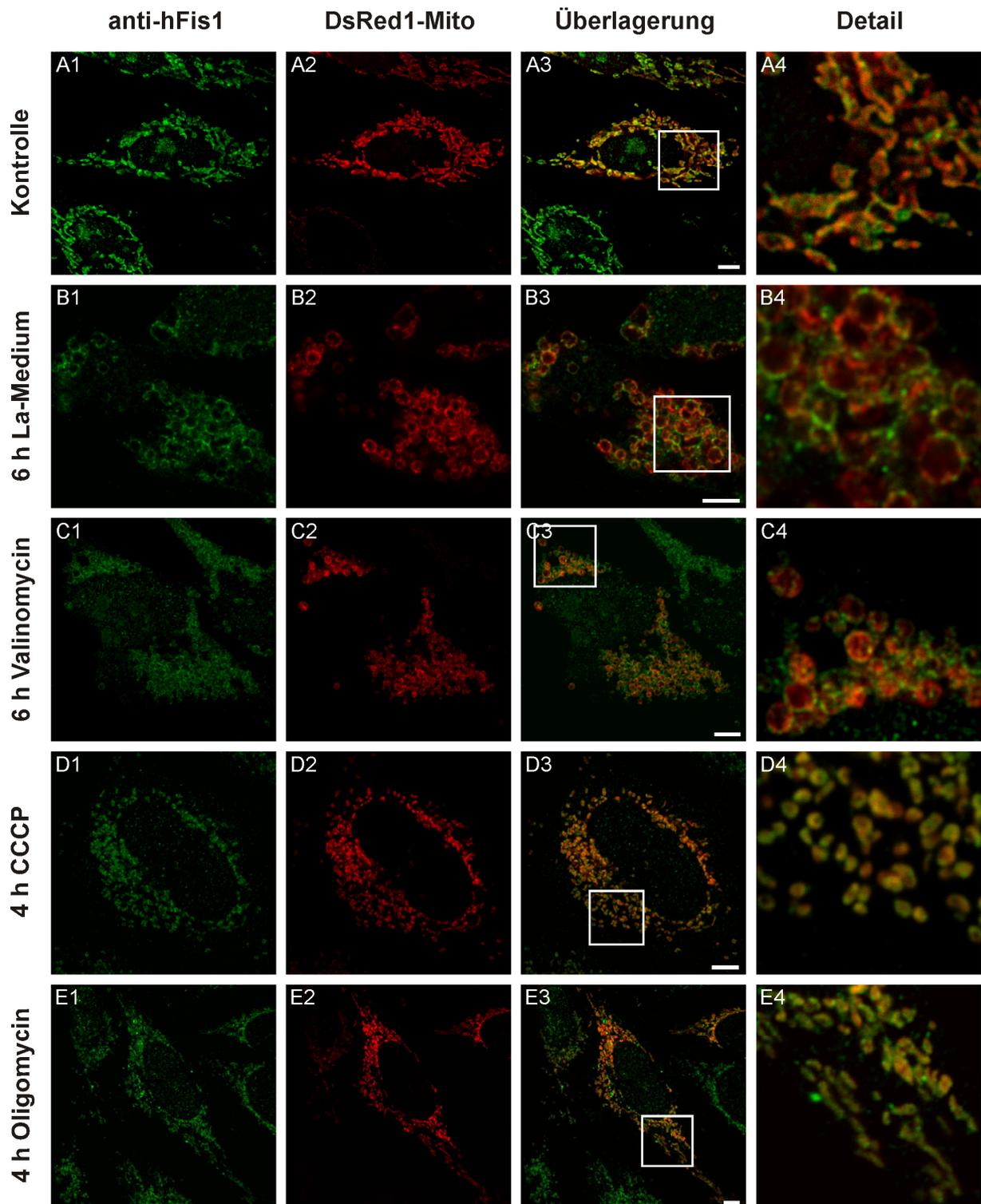
Für die immunzytochemische, endogene Lokalisation der Fissionsproteine hFis1 und Drp1/DNM1L wurden neben den Kontrollen und induzierten Megamitochondrien noch die Verteilung nach Behandlung mit den Inhibitoren Valinomycin, CCCP und Oligomycin detektiert. Die Gegenfärbung der Mitochondrien erfolgte mit DsRed1-Mito.

In den Kontrollzellen kolokalisiert hFis1 mit den Mitochondrien (Abb. 5-15, A1-A4), wobei einige Bereiche der Mitochondrien eine stärkere Kolokalisation mit hFis1 aufweisen.

Nach dem Versetzen mit La-Medium verteilte sich hFis1 ringförmig um die Außenseite der Megamitochondrien (Abb. 5-15, B1-B4), jedoch ist oftmals eine verstärkte punktförmige Lokalisierung erkennbar. Diese Verteilung ergab sich ebenfalls nach der Induktion von Riesenorganellen durch Valinomycin (Abb. 5-15, C1-C4).

Eine Fragmentierung der Mitochondrien durch CCCP führte im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten zu einer sehr gleichmäßigen Färbung der einzeln vorliegenden Organellen mit hFis1 (Abb. 5-15, D1-D4), ein Bild, das sich ebenso nach der Behandlung mit Oligomycin zeigte (Abb. 5-15, E1-E4).

Somit liegt hFis1 unabhängig von den durchgeführten Behandlungen der Zellen außen an den Mitochondrien vor.



**Abb. 5-15:** Konfokalmikroskopische Analyse der endogenen Verteilung von hFis1 in fixierten HeLa-Zellen, die mit pDsRed1-Mito transfiziert wurden. Messbalken: 5  $\mu$ m.

### **5.7.3 Endogene Lokalisierung des Fissionsproteins Drp1/DNM1L**

Für die endogene Detektion des Fissionsproteins Drp1/DNM1L durch Immunzytochemie wurde die Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr verwendet, deren äußere Mitochondrienmembran durch EGFP gefärbt ist.

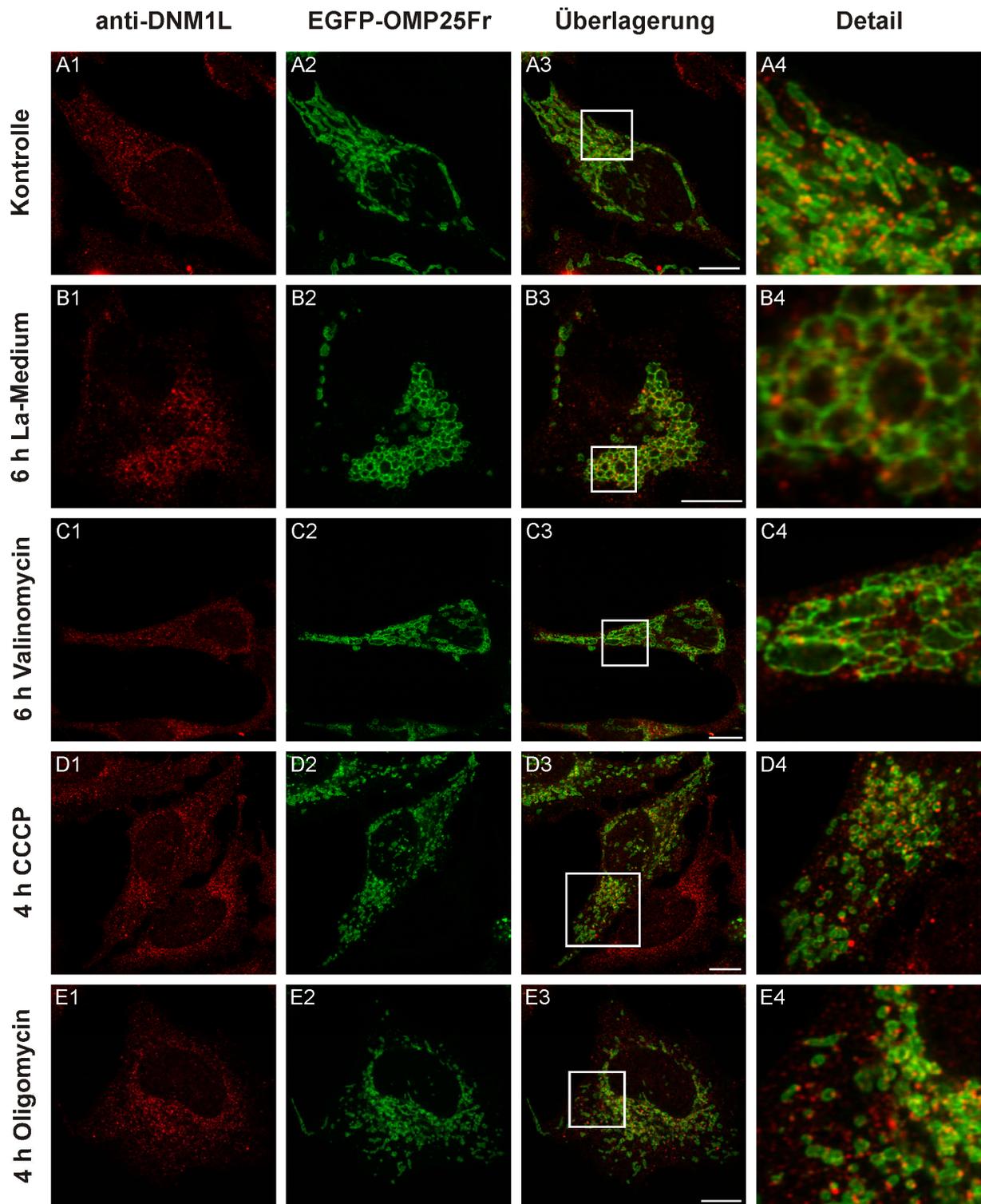
In den Kontrollzellen war eine punktförmige Verteilung von Drp1/DNM1L an den elongierten Mitochondrien zu erkennen, wobei auch zwischen benachbarten Organellen und an den Enden von Mitochondrientubuli Drp1/DNM1L zu finden war. Im Zytoplasma schien Drp1/DNM1L diffus verteilt zu sein (Abb. 5-16, A1-A4).

Die Lokalisation von Drp1/DNM1L an den durch La-Medium induzierten Megamitochondrien war punktuell an der Außenseite der kreisrunden Riesenorganellen (Abb. 5-16, B1-B4). Hier ist ebenfalls eine zusätzliche Lokalisation im Zytoplasma erkennbar.

Nach der Zugabe von Valinomycin kam es zu Megamitochondrien, welche wie schon vorher beschrieben eine ungleichmäßigere Form aufweisen als die durch La-Medium induzierten. Dabei verhielt sich die Drp1-Verteilung so wie nach La-Mediumwechsel, jedoch schien mehr Drp1/DNM1L im Zytoplasma verteilt zu sein (Abb. 5-16, C1-C4).

Die Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks mit CCCP bzw. Oligomycin ergab Einzelorganellen, an denen Drp1/DNM1L ebenfalls punktuell detektiert werden konnte (Abb. 5-16, D1-D4, E1-E4).

Zusammenfassend ist die endogene Verteilung von Drp1/DNM1L punktförmig an den Mitochondrien und im Zytoplasma unabhängig von den hier durchgeführten Behandlungen der Zellen.



**Abb. 5-16:** Konfokalmikroskopische Analyse der endogenen Verteilung von Drp1/DNM1L in fixierten Zellen der Linie HeLa.EGFP-OMP25Fr. Eichstriche: 10  $\mu$ m.

## 5.8 Überexpression und Lokalisierung mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine

Die Induktion von Megamitochondrien ist mit La-Medium binnen Minuten bzw. weniger Stunden mit Substanzen möglich, die ebenso endogen von den Zellen produziert werden (wie z.B. in  $\rho^0$ -Zellen), also ohne Gifte bzw. Drogen. Ebenso kann die Rückbildung der Riesenorganellen innerhalb von Minuten bzw. wenigen Stunden induziert werden.

Diese Erkenntnisse ermöglichen den Einsatz La-Medium-induzierter Riesenorganellen als Modellsystem für Megamitochondrienbildung in lebenden Zellen inklusive des Studiums von mitochondrialer Fusion und Fission. Es eröffnet mikroskopische Beobachtungsmöglichkeiten zur Lokalisierung mitochondrialer Proteine in lebenden Zellen, denn für immunzytochemischen Analysen mussten die Zellen fixiert werden.

Für diese Studien an lebenden Zellen wurden Vektoren verwendet, welche die Proteine, die an der mitochondrialen Fusion und Fission beteiligt sind, als Fusionsproteine mit Fluoreszenzfarbstoffen exprimieren. Mit diesen Plasmiden waren zudem Untersuchungen zum Einfluss der Überexpression von Fusions-/Fissionsproteinen auf die Megamitochondrienbildung möglich.

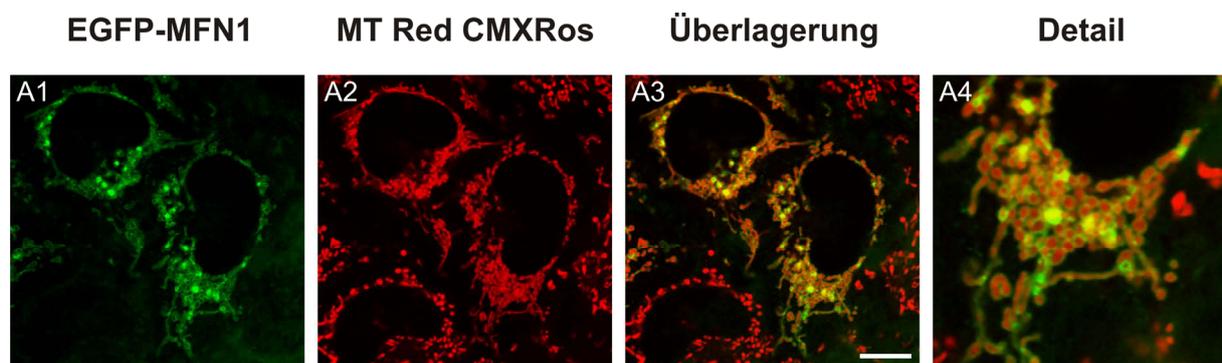
Durch die Überexpression von Proteinen der Fissionsmaschinerie konnte nun untersucht werden, ob bei der Bildung von Megamitochondrien eine verstärkte Fusionsaktivität der Organellen eine Rolle spielt oder ob eine Hemmung der Fission eintritt.

### 5.8.1 Überexpression von Mitofusin 1 (MFN1)

Durch die Überexpression der Fusionsproteine MFN1 und MFN2 sollte untersucht werden, ob die Induktion der Megamitochondrien eventuell zu noch größeren Organellen führt. Hierfür wurden Vektoren verwendet, die ein fluoreszentes Fusionsprotein bestehend aus dem jeweiligen Mitofusin und EGFP in eukaryontischen Zellen exprimieren.

Bei der Expression von MFN1 in Kontrollzellen, bei denen die Mitochondrien mit MitoTracker Red CMXRos gefärbt waren, zeigte sich in den lebenden Zellen eine gleichmäßige Lokalisierung des Fusionsproteins EGFP-MFN1 an den Mitochondrien mit stärkeren punktförmigen Bereichen v.a. zwischen benachbarten Organellen (Abb. 5-18, A1-

A6). Zur besseren Verdeutlichung wurden einige Konfokalaufnahmen einer Dekonvolutionsberechnung unterzogen, wobei wieder Mitofusin 1-Ansammlungen zwischen den Organellen erkennbar waren und ebenso die leichte Umhüllung der Mitochondrientubuli (Abb. 5-18, B1-B6). Es kam auch zu traubenförmigen Zusammenlagerungen der Organellen, wobei die Mitochondrien in der Größe leicht zunahmen und rund erschienen (Abb. 5-17).

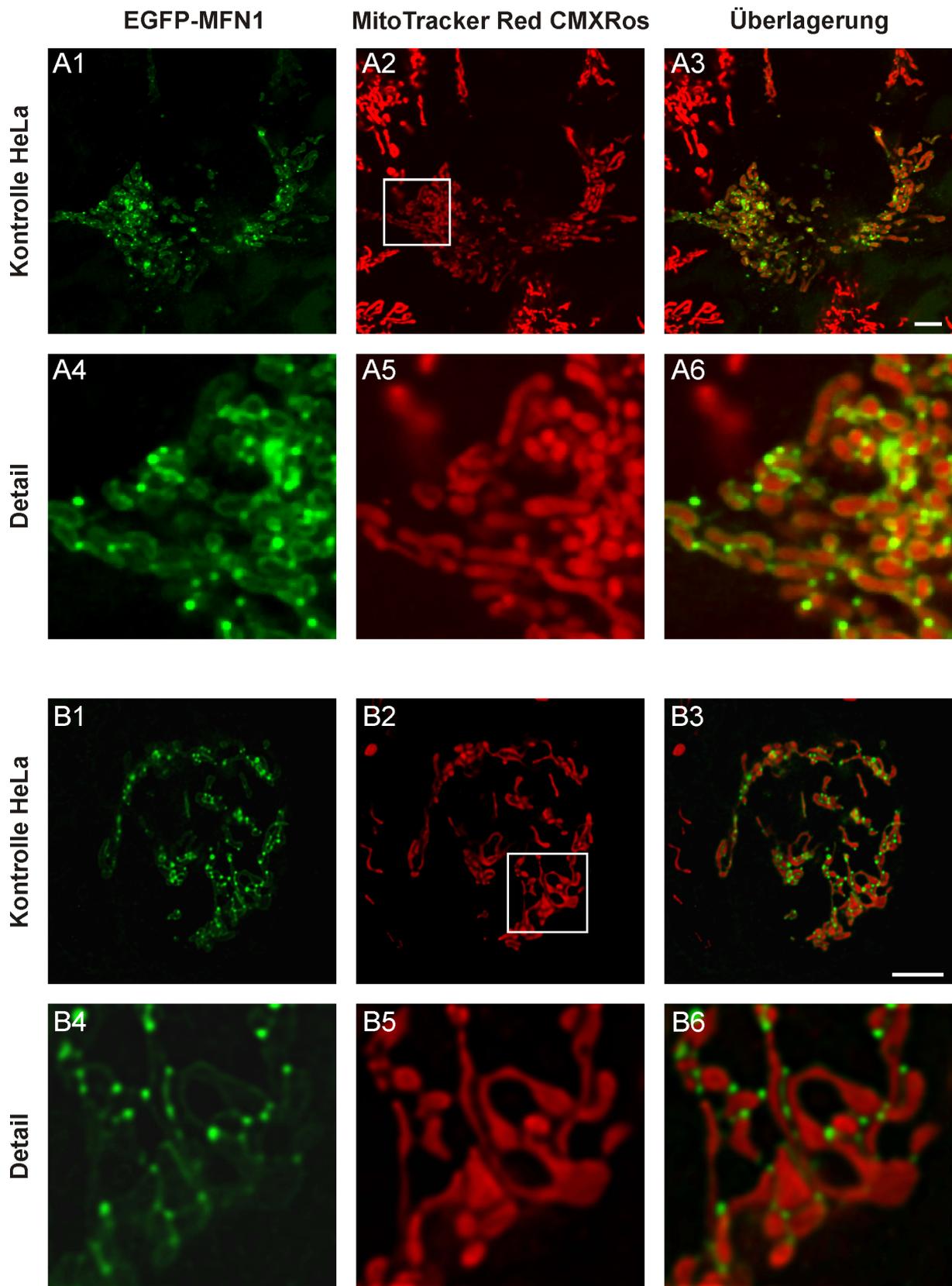


**Abb. 5-17:** Konfokalaufnahmen von HeLa-Zellen, transfiziert mit pEGFP-MFN1. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

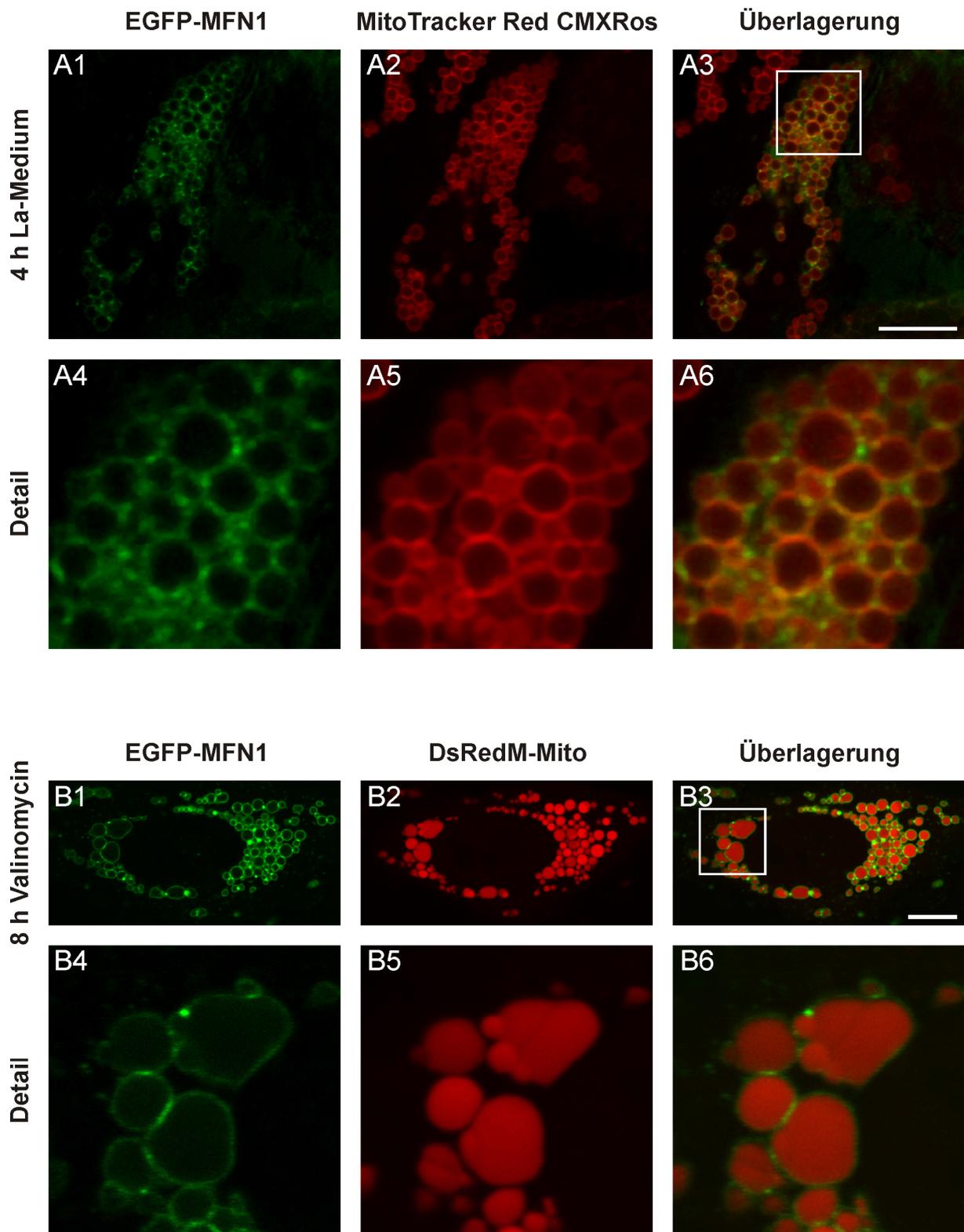
Nachdem in den Zellen mit La-Medium Megamitochondrien induziert wurden, ergab sich eine Verteilung von MFN1 komplett rund um die Megamitochondrien, wobei es Aggregate mit stärkerer Fluoreszenz gab (Abb. 5-19, A1-A6). Die Bildung der durch MitoTracker Red CMXRos-gefärbten Megamitochondrien wurde durch die Überexpression von MFN1 nicht beeinflusst.

Manchmal waren bei der Verteilung von EGFP-MFN1 um die La-Medium-induzierten Megamitochondrien nur noch punktförmige Aggregate sichtbar und nur noch sehr schwach die Ansammlung um die gesamten Riesenorganellen. Dies ist in Abb. 5-20 dargestellt, bei der pEGFP-MFN1 in HeLa.DsRedM-Mito transfiziert wurde, deren mitochondriale Matrix mit DsRedM gefärbt ist.

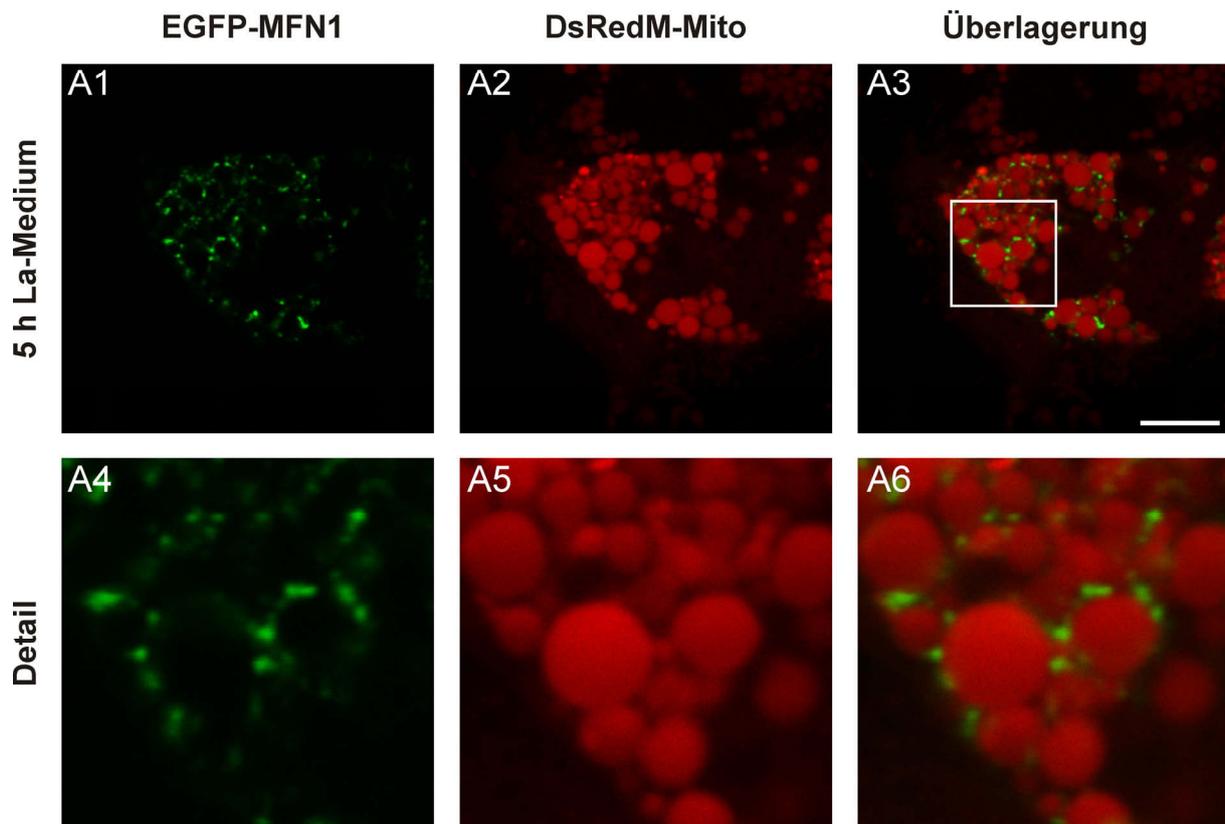
Die Behandlung mit Valinomycin ergab ebenfalls während der Überexpression von Mitofusin 1 Megamitochondrien (Abb. 5-19, B1-B6). Hierbei kam es ebenso wie zuvor beschrieben zur unvollständigen Fusion innerer Membran, was durch abgetrennte Matrixkompartimente deutlich wurde (B5). Diese sind lückenlos von MFN1 umgeben (B6), was frühere Untersuchungen bestätigt, dass MFN1 in der äußeren Membran lokalisiert ist. Die Gegenfärbung der Mitochondrien erfolgte durch Verwendung der Zelllinie HeLa.DsRedM-Mito, welche DsRedM-Mito stabil exprimiert. Die Benutzung von MitoTracker zusammen mit Valinomycin war nicht möglich, da es nach Zugabe des Inhibitors zu einer extremen Verminderung der Mitochondrienfärbung kam.



**Abb. 5-18:** Konfokalmikroskopische Analyse der Distribution von EGFP-MFN1 in lebenden HeLa-Zellen, wobei die Aufnahmen B1-B6 einer Dekonvolutionsberechnung unterzogen wurden. Eichbalken: 5  $\mu$ m.



**Abb. 5-19:** Konfokalmikroskopische Analyse der Distribution von MFN1 mittels Transfektion von pEGFP-MFN1 in lebenden HeLa-Zellen nach Applizierung von La-Medium (A1-A6) bzw. in Zellen der Linie HeLa.DsRedM-Mito nach Valinomycinbehandlung (B1-B6). Messbalken: 10  $\mu$ m.



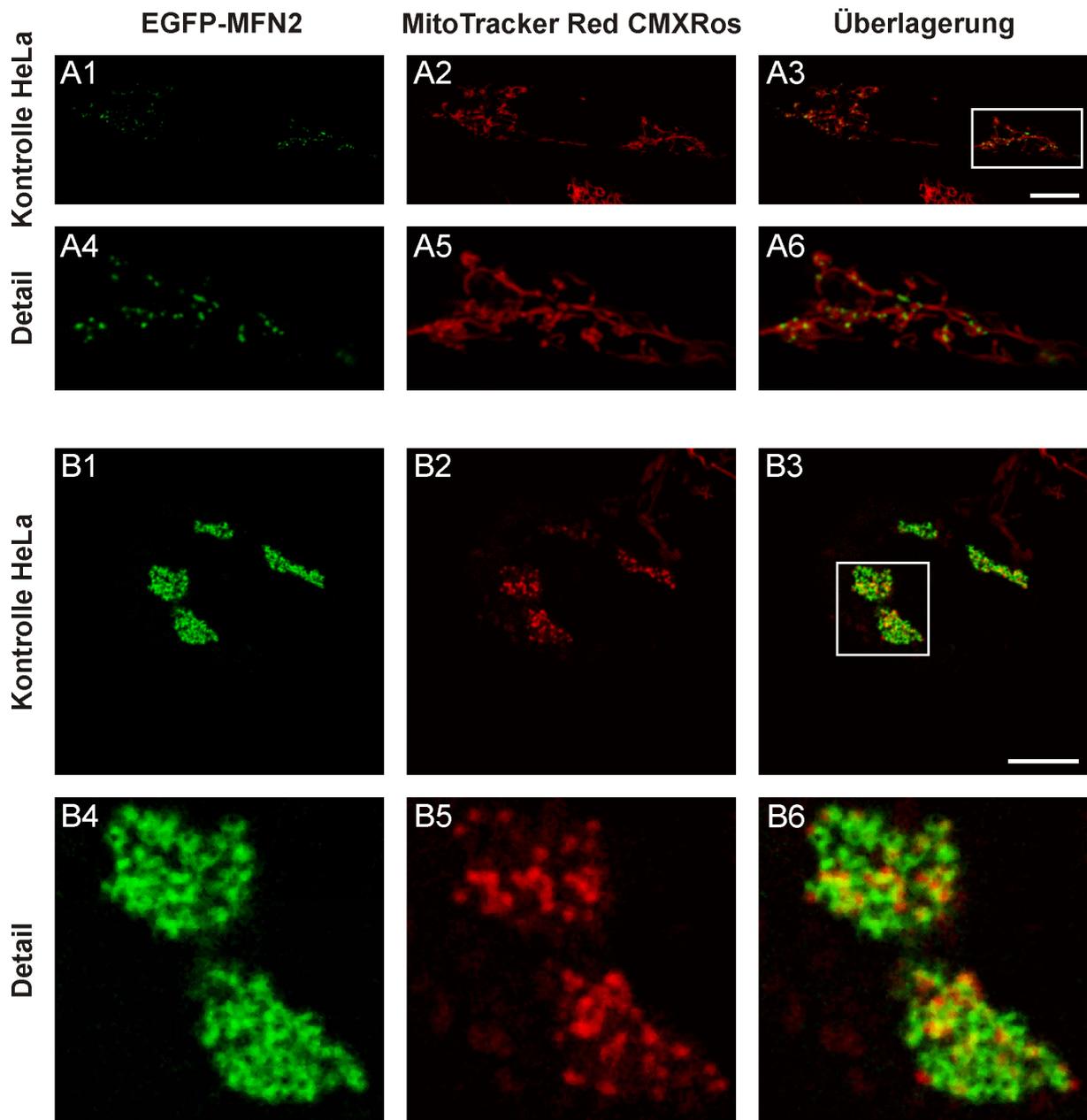
**Abb. 5-20:** Konfokalmikroskopische Analyse der Distribution von MFN1 in lebenden HeLa.DsRedM-Mito-Zellen nach 5 h Induktion mit La-Medium mittels Transfektion von pEGFP-MFN1. Messbalken: 7,5  $\mu\text{m}$ .

### 5.8.2 Überexpression von Mitofusin 2 (MFN2)

Die Lokalisierung von Mitofusin 2 (MFN2) in den lebenden Zellen der Kontrolle zeigte eine zu MFN1 unterschiedliche Verteilung, denn es kam zu einer punktuellen Färbung an den mitochondrialen Tubuli, ebenso zwischen benachbarten Organellen, jedoch ohne die schlauchförmige Umrandung (Abb. 5-21, A1-A6).

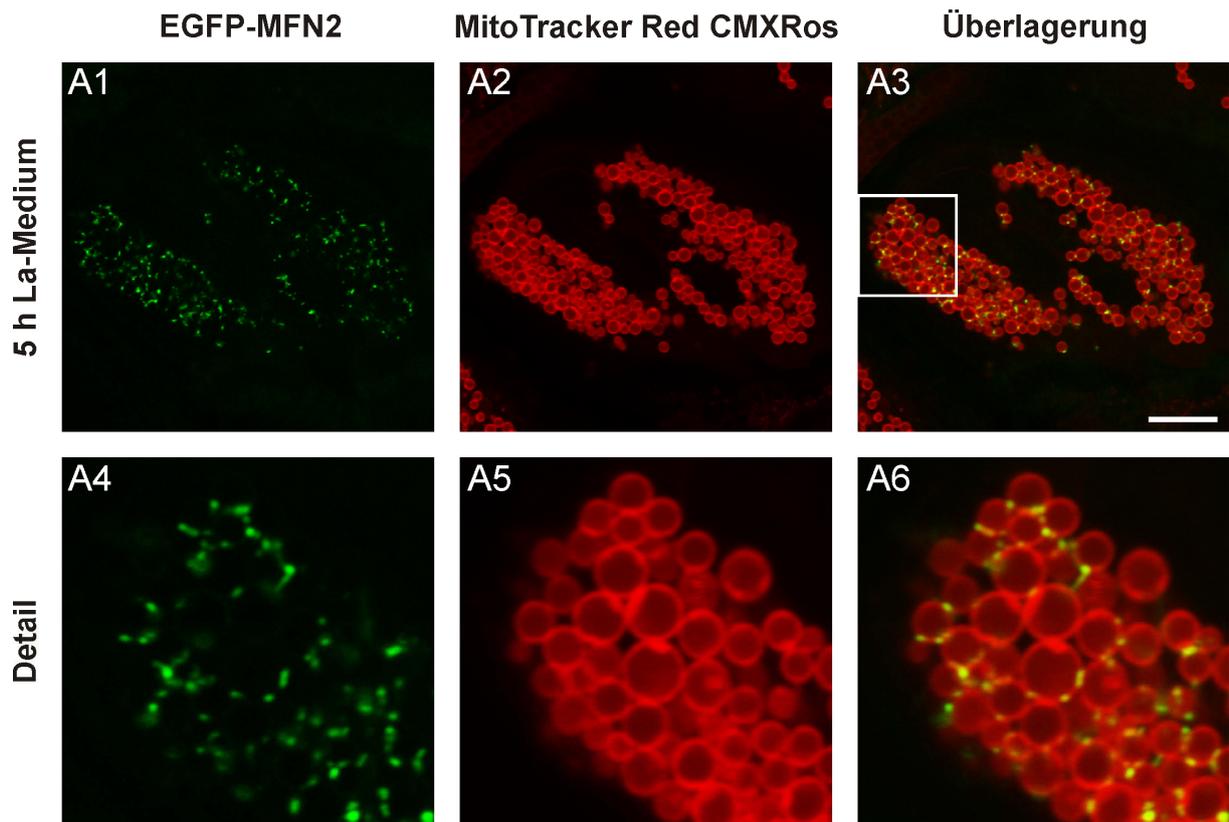
Manchmal zeigte sich bei den Kontrollzellen eine Umstrukturierung der Mitochondrien durch die Überexpression von MFN2, was in Abb. 5-21, B1-B6 dargestellt ist: Die Organellen aggregierten und innerhalb dieser Aggregate lokalisierte MFN2.

Nach den Experimenten in unbehandelten Kontrollzellen wurde das Augenmerk auf das Verhalten der induzierten Megamitochondrien nach Überexpression von EGFP-MFN2 in HeLa-Zellen gerichtet.

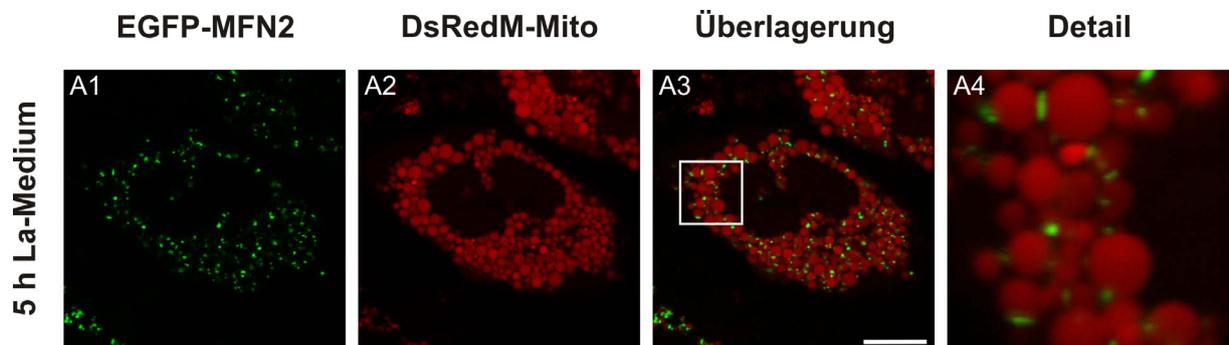


**Abb. 5-21:** Konfokalmikroskopische Analyse der Verteilung von MFN2 in lebenden HeLa- Zellen mittels Transfektion von pEGFP-MFN2. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Die Induktion von Megamitochondrien mit La-Medium führte zu einer punktuellen Verteilung von MFN2 an den Außenseiten der Riesenorganellen und zwischen benachbarten Mitochondrien (Abb. 5-22). Die Überexpression von MFN2 behinderte nicht die Bildung von Megamitochondrien, obwohl es bei den Kontrollzellen manchmal zur Aggregatbildung der Organellen kam. Bei der Färbung mit MitoTracker Red CMXRos kam es zur Kolo-kalisierung von EGFP-MFN2 und dem Mitochondrienfarbstoff. Diese Kolo-kalisierung war nicht zu beobachten, wenn die Matrix nach Megamitochondrieninduktion gefärbt war, wie in Abb. 5-23 mit der Zelllinie HeLa.DsRedM-Mito gezeigt ist. Hier tritt die Fluoreszenz von EGFP-MFN2 ebenso punktförmig zwischen benachbarten Riesenorganellen auf.

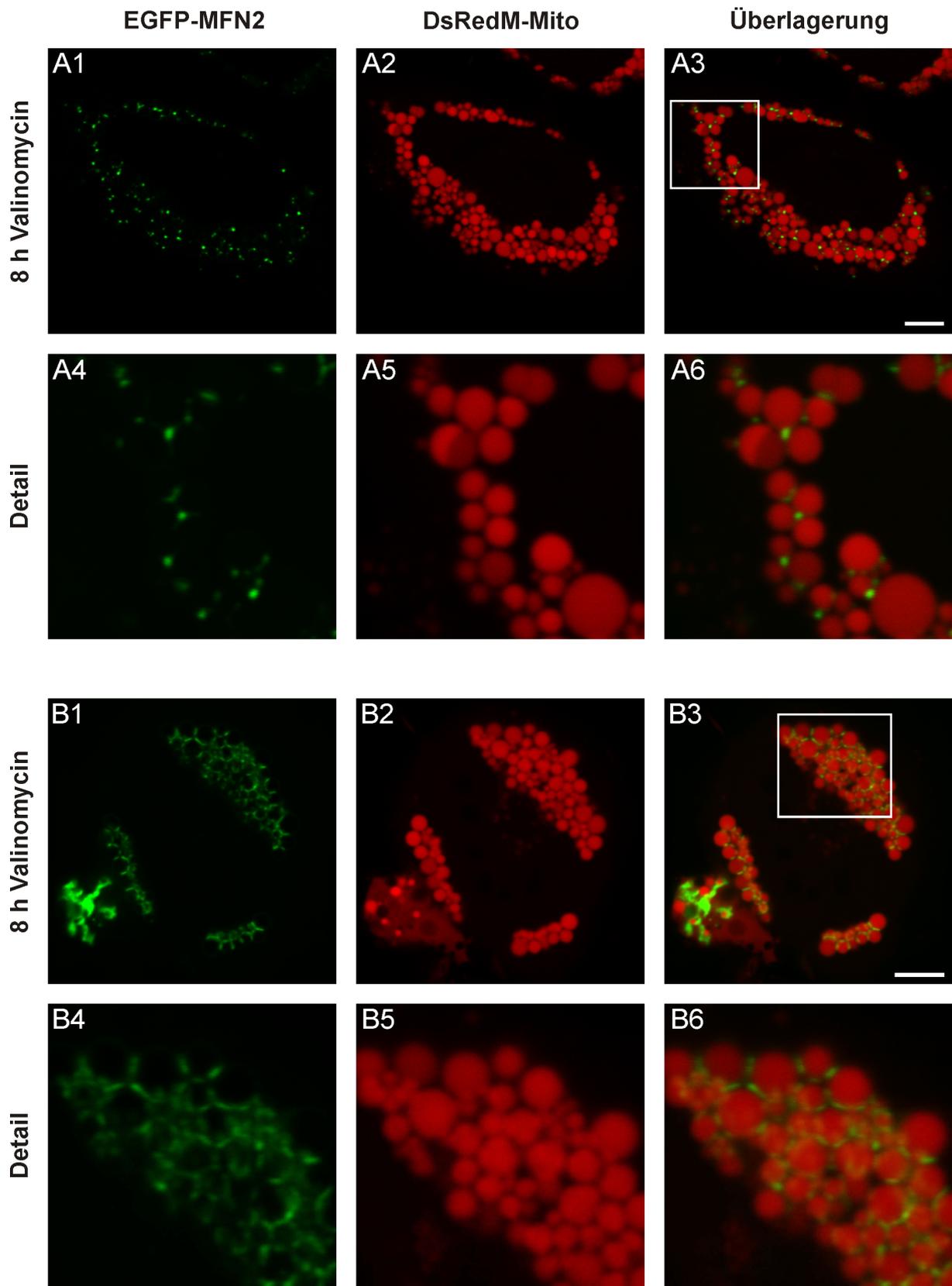


**Abb. 5-22:** Konfokalmikroskopische Analyse der Verteilung von MFN2 mittels Transfektion von pEGFP-MFN2 in lebenden HeLa-Zellen nach Inkubation mit La-Medium. Messbalken: 10  $\mu$ m.



**Abb. 5-23:** Konfokalaufnahmen der Verteilung von MFN2 mittels Transfektion von pEGFP-MFN2 in lebenden HeLa.DsRedM-Mito-Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit La-Medium. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Bei der Bildung von Megamitochondrien durch das Ionophor-Antibiotikum Valinomycin gab es eine heterogene Verteilung von MFN2 in den lebenden Zellen. Zum einen kam es zur punktförmigen Lokalisierung an und zwischen benachbarten Riesenorganellen (Abb. 5-24, A1-A6). Zum anderen ist eine stäbchenförmige Verteilung von Mitofusin 2 zwischen den runden Megamitochondrien (Abb. 5-24, B1-B6) erkennbar. Die Bildung der Megamitochondrien wurde nicht durch die Überexpression von MFN2 beeinflusst.



**Abb. 5-24:** Konfokalmikroskopische Analyse der Verteilung von MFN2 mittels Transfektion von pEGFP-MFN2 in lebenden HeLa.DsRedM-Mito-Zellen nach Valinomycinbehandlung. Messbalken: 5  $\mu$ m.

### 5.8.3 Überexpression von Drp1/DNM1L

Für die Untersuchungen zu dem mitochondrialen Fissionsprotein Drp1/DNM1L wurden Vektoren verwendet, die das Protein fusioniert an EGFP in eukaryontischen Zellen exprimieren. Von Drp1/DNM1L sind drei Isoformen bekannt, wobei alle drei kloniert und in Experimenten eingesetzt wurden. Die aus Spleißvarianten entstehenden Drp1/DNM1L-Isoformen werden im Folgenden mit I1, I2 bzw. I3 abgekürzt. Für die Versuche wurde die stabile Zelllinie HeLa.DsRedM-Mito verwendet, bei der die Mitochondrienmatrix mit DsRedM gefärbt ist.

#### 5.8.3.1 *Drp1/DNM1L, Isoform 1*

Bei den unbehandelten Kontrollzellen zeigte sich nach der Transfektion mit pEGFP-DNM1L, I1 in Abb. 5-25, A1-A4 eine punktförmige Lokalisierung an den Mitochondrien und an den Enden von Mitochondrientubuli. Außerdem war DNM1L, I1 im Zytoplasma – teilweise punktuell – verteilt.

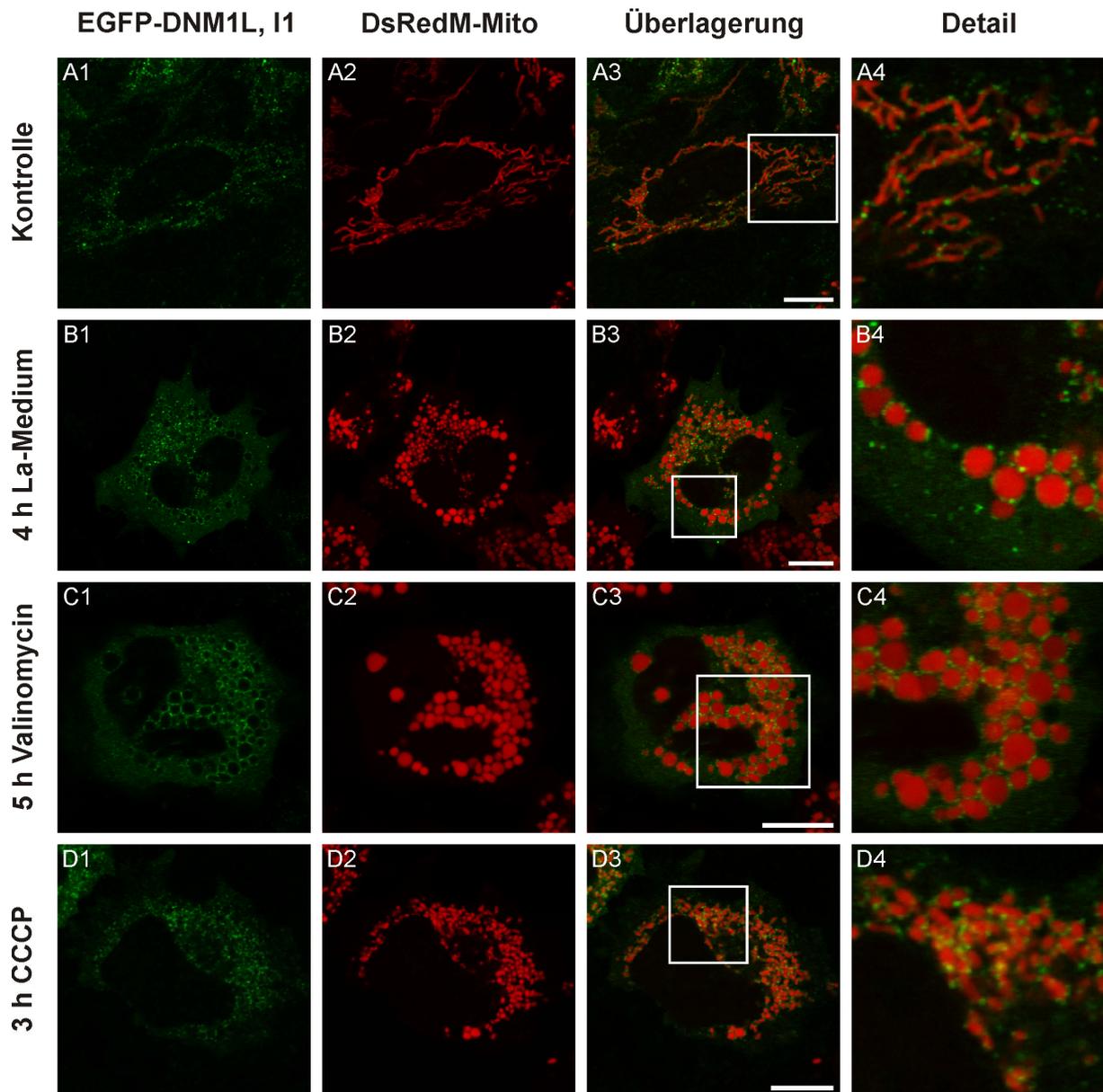
Nach der Megamitochondrieninduktion mit La-Medium kam es zur punktförmigen Verteilung von DNM1L, I1 in großen Aggregaten an der Außenseite und zusätzlich zwischen benachbarten Riesenorganellen (Abb. 5-25, B1-B4). Ein Einfluss auf die Induktion von Megamitochondrien war trotz Überexpression des Fissionsproteins DNM1L, I1 nicht feststellbar. Die Distribution von DNM1L, I1 im Zytoplasma, partiell in kleinen Aggregaten, konnte hier wie bei allen anderen Behandlungen ebenso beobachtet werden.

Die Verteilung von DNM1L, I1 nach Bildung von Riesenorganellen durch Valinomycin ähnelte sehr stark derjenigen, wie sie bei der Behandlung mit La-Medium auftrat (Abb. 5-25, C1-C4). Die punktuell auftretenden Ansammlungen schienen nicht so stark in ihrer Intensität zu sein, was durch den unterschiedlichen Grad der Überexpression begründet werden kann. Es zeigte sich kein Einfluss der Überexpression auf die Induktion von Megamitochondrien.

Durch CCCP wurde die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks zu Einzelmitochondrien hervorgerufen. Hierbei wurde eine Lokalisierung von DNM1L, I1 punktförmig an den Einzelorganellen deutlich. Vor allem an den Enden und zwischen

benachbarten Mitochondrien war die punktuelle Fluoreszenz des DNM1L, I1-EGFP-Fusionsprotein sichtbar (Abb. 5-25, D1-D4).

Zusammenfassend befindet sich Drp1/DNM1L, I1 nach allen durchgeführten Behandlungen der Zellen punktuell an den Mitochondrien und verteilt im Zytoplasma.

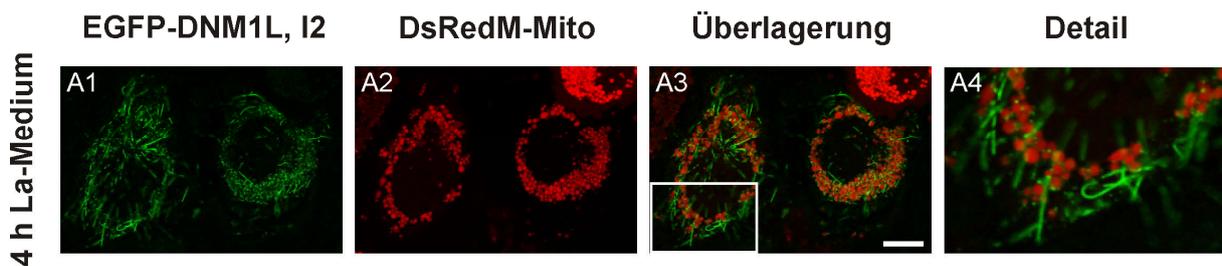


**Abb. 5-25:** Konfokalaufnahmen der Expression von pEGFP-DNM1L, Tv1 in HeLa.DsRedM-Mito-Zellen. Eichstriche: 10  $\mu$ m.

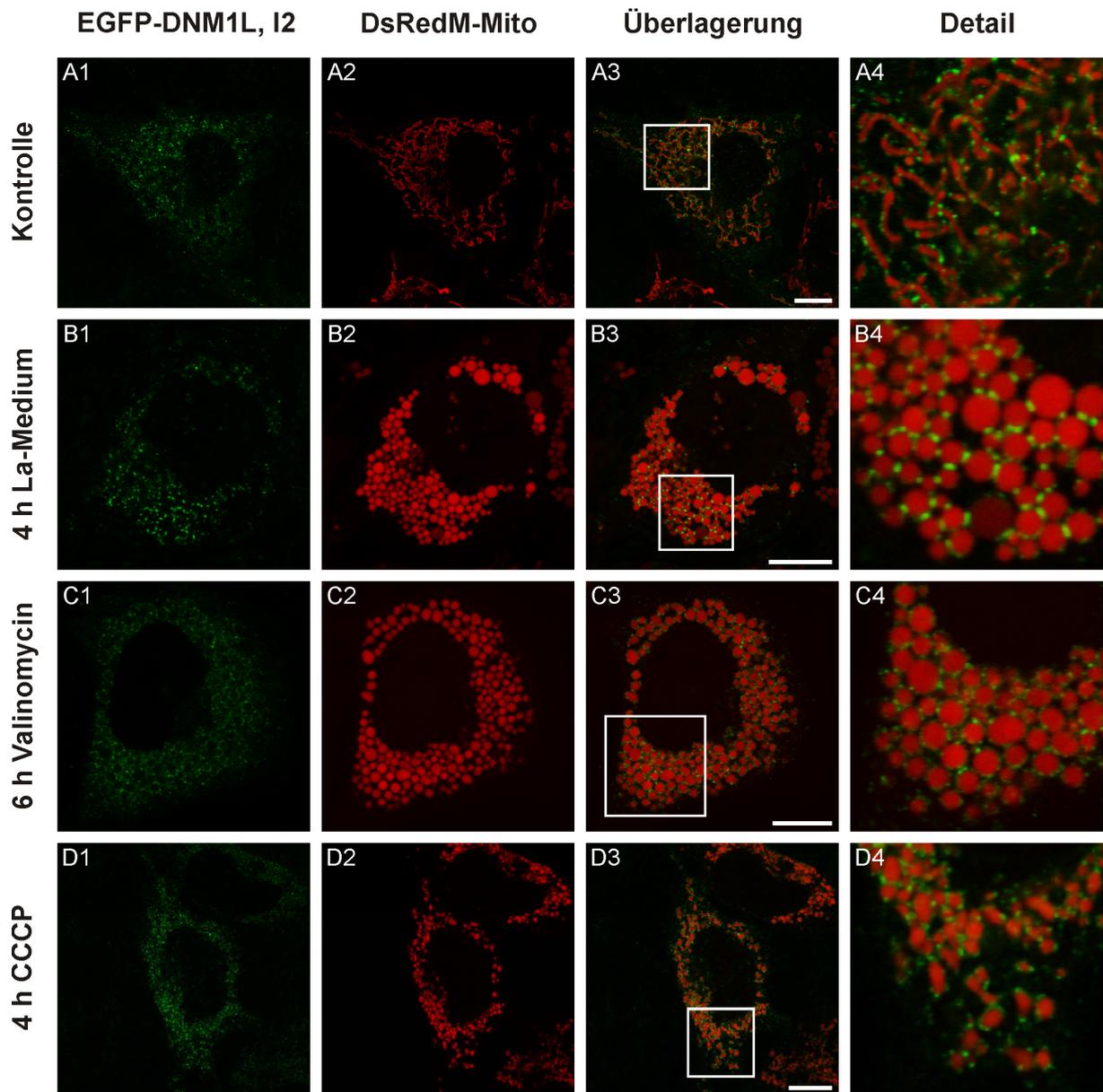
### 5.8.3.2 *Drp1/DNM1L, Isoform 2*

Die Ergebnisse für die Isoform DNM1L, I2 ähnelten stark denjenigen, wie sie für die Isoform 1 beschrieben wurden. Auffällig war, dass die Verteilung im Zytoplasma weniger intensiv erschien. Bei den Versuchen konnte ebenso kein Einfluss der Überexpression von DNM1L, I2 auf die Bildung der Megamitochondrien festgestellt werden. In Abb. 5-27, A1-D4 sind die Konfokalaufnahmen zu DNM1L, I2 dargestellt.

Bei der Isoform 2 von DNM1L traten – im Gegensatz zu den Isoformen 1 und 3 – manchmal neben den punktförmigen Fluoreszenzsignalen, faserartige Strukturen in der Zelle auf, welche nicht an oder mit den Mitochondrien kolokalisierten. Diese Fasern waren zudem nicht abhängig von der Behandlung der Zellen, denn sie waren beispielsweise auch nach der Induktion mit La-Medium weiterhin beobachtbar (Abb. 5-26).



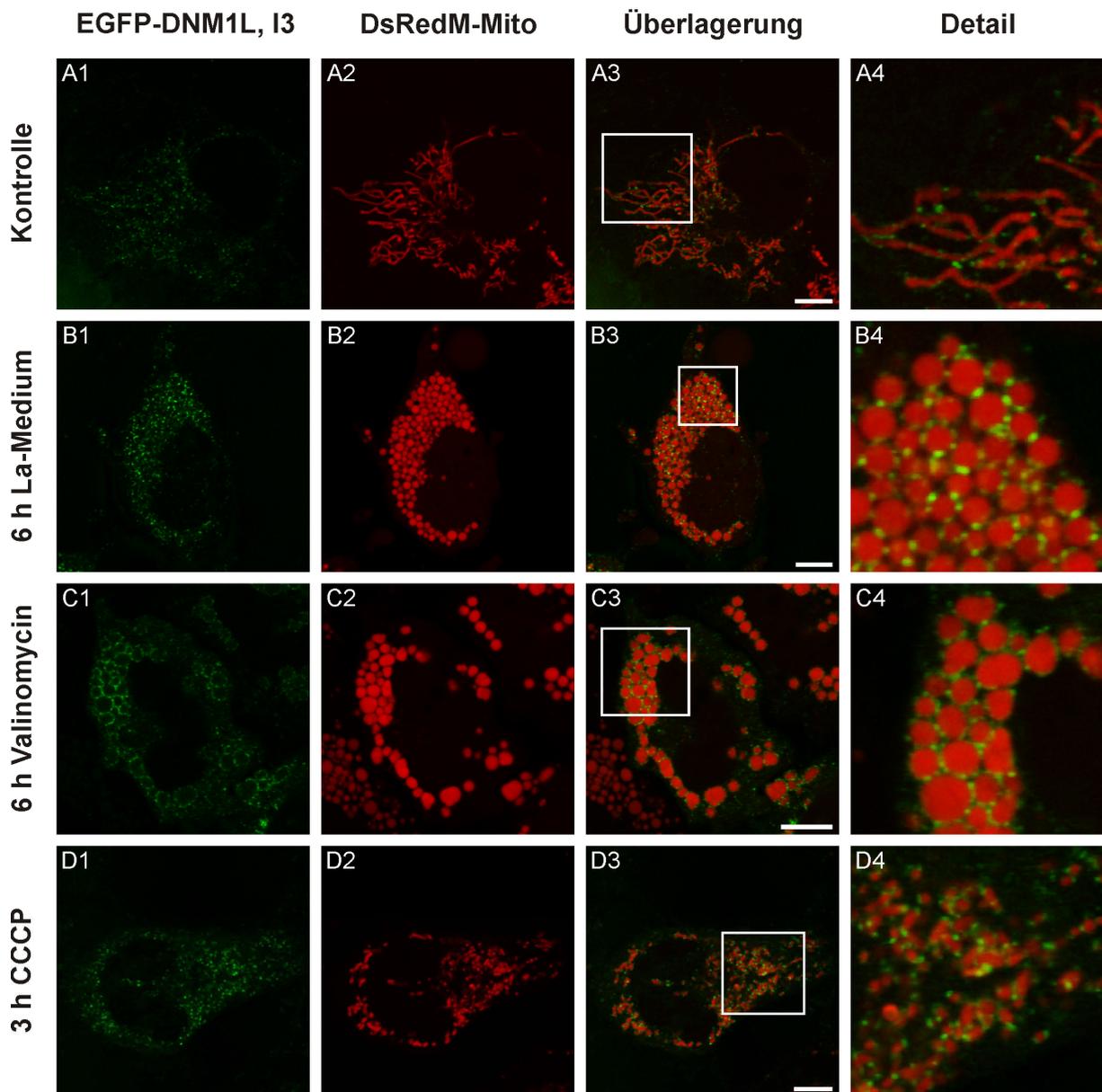
**Abb. 5-26:** Konfokalaufnahmen der Expression von pEGFP-DNM1L, Tv2 in HeLa.DsRedM-Mito-Zellen. Eichstriche: 10  $\mu$ m.



**Abb. 5-27:** Konfokalaufnahmen der Expression von pEGFP-DNM1L, Tv2 in HeLa.DsRedM-Mito-Zellen. Eichstriche: 10  $\mu$ m.

### 5.8.3.3 *Drp1/DNM1L, Isoform 3*

Die Verteilung der 3. Isoform DNM1L, I3 weist ebenso eine starke Ähnlichkeit zu der bereits beschriebenen Isoformen 1 auf. Eine faserartige Anordnung wie bei DNM1L, I2 konnte nicht beobachtet werden. Zudem gab es keine Hinweise auf eine Wirkung der Überexpression auf die Induktion von Megamitochondrien. Die Konfokalaufnahmen zu DNM1L, I3 sind in Abb. 5-28, A1-D4 zu sehen.

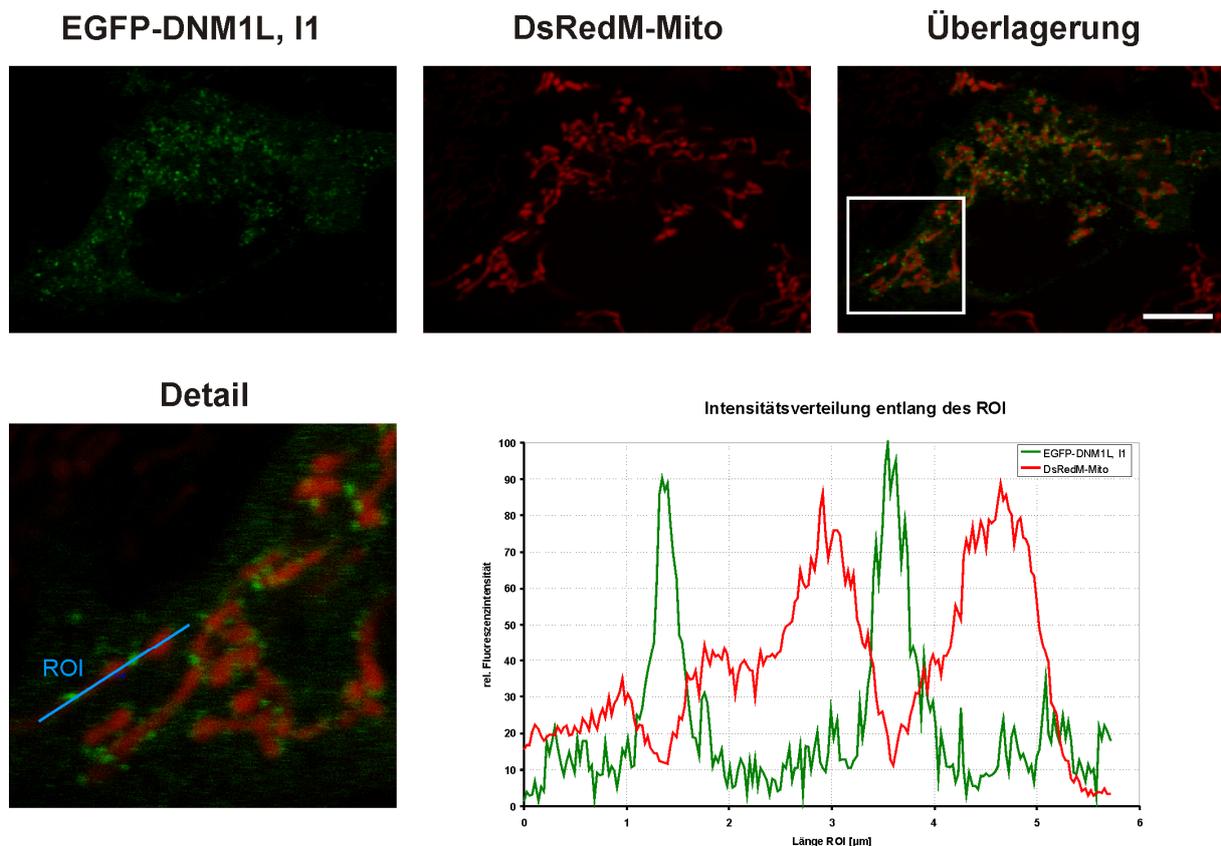


**Abb. 5-28:** Konfokalaufnahmen der Expression von pEGFP-DNM1L, Tv3 in HeLa.DsRedM-Mito-Zellen. Eichstriche: 7,5 µm.

Zusammenfassend beeinflusst die Überexpression des Fissionsproteins Drp1/DNM1L mit allen drei bekannten Isoformen nicht das Verhalten der Mitochondrien, unabhängig von der Induktion von Megamitochondrien durch La-Medium oder Valinomycin.

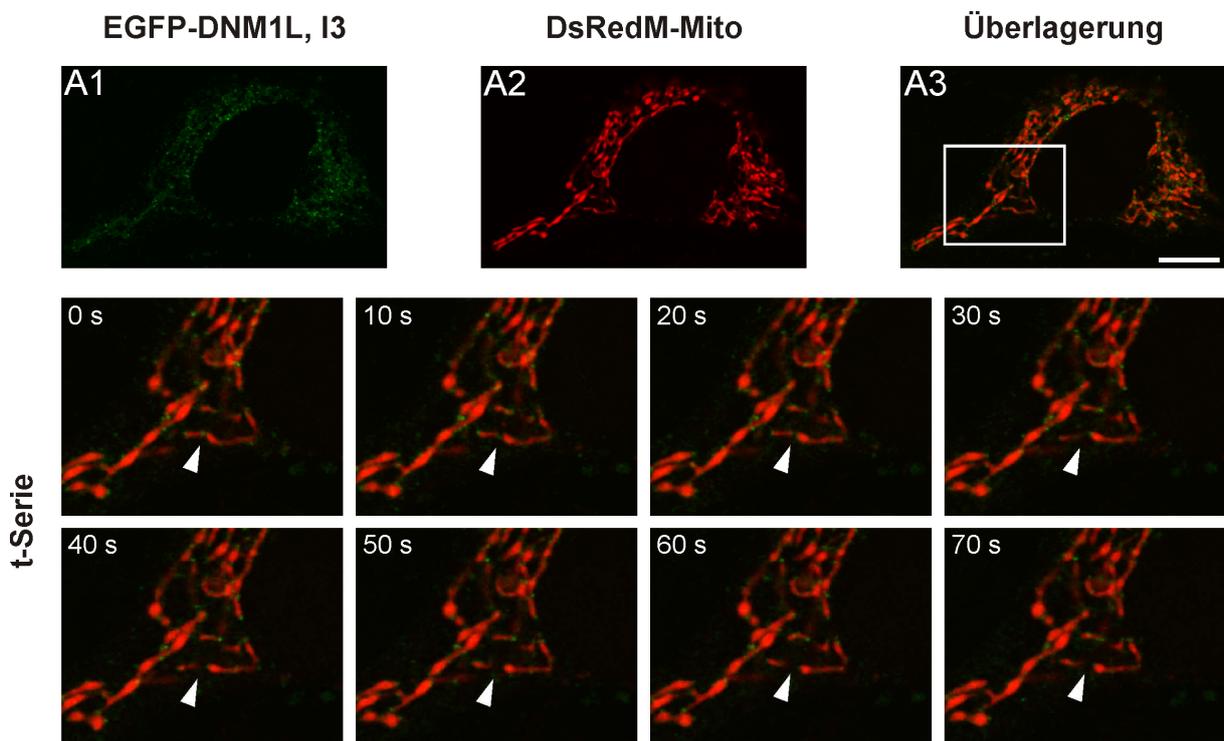
#### 5.8.3.4 Detektion von Drp1/DNM1L an mitochondrialen Spaltstellen

Drp1/DNM1L wird für die Abschnürung von Mitochondrien bei der Fission verantwortlich gemacht. Um hierzu Erkenntnisse zu erlangen, wurde für eine charakteristische Lokalisierung an Mitochondrientubuli die Intensitätsverteilung der Fluoreszenz sowohl für DsRedM-Mito als auch EGFP-DNM1L, I1 entlang eines linienförmigen ROI (*region of interest*) ermittelt. In der resultierenden Kurve in Abb. 5-29 ist erkennbar, dass an den beiden Stellen an denen die grüne Fluoreszenz von EGFP-DNM1L, I1 maximal ist, die rote Fluoreszenz von DsRedM-Mito stark abgenommen hat. Dies zeigt, dass an diesen punktförmigen EGFP-DNM1L, I1-Bereichen eine mitochondriale Spaltung vorliegt.



**Abb. 5-29:** Konfokalmikroskopische Analyse der Verteilung und Intensitäten von Drp1/DNM1L, I1 in HeLa.DsRedM-Mito-Zellen durch Transfektion mit pEGFP-DNM1L, Tv1. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Maximalwert normalisiert. Eichbalken: 7,5  $\mu\text{m}$ .

Die Divisionsvorgänge an den Stellen, an denen sich EGFP-DNM1L an den Mitochondrien befindet, konnten in einer Zeitserie konfokalmikroskopisch festgehalten werden und ist im Folgenden exemplarisch für EGFP-DNM1L, I3 dargestellt (Abb. 5-30). Der weiße Pfeilkopf kennzeichnet die Position, an der es zwischen 0 s und 10 s zur Fission kam. Das langgestreckte Mitochondrium wurde an dieser Stelle gespalten und bewegte sich dann auseinander. Bei dem elongierten Organell links vom dem Pfeilkopf deutete sich ebenfalls eine Einschnürung an, die auf eine baldige Spaltung schließen lässt.



**Abb. 5-30:** Konfokalmikroskopische Analyse der Drp1/DNM1L-abhängigen Spaltung von Mitochondrien in HeLa.DsRedM-Mito-Zellen durch Transfektion mit pEGFP-DNM1L, Tv3. Eichbalken: 10  $\mu$ m.

## 5.8.4 Überexpression von hFis1

### 5.8.4.1 Konfokalmikroskopische Analyse

Für das Fissionsprotein hFis1 wurde ein Expressionsvektor konstruiert, der ein Fusionsprotein bestehend aus hFis1 und DsRed2 codierte.

Für die Vektorkonstruktion wurden der hFis1-cDNA ausgehend von pPA-GFP-hFis1 mittels PCR und den Primern hFis1-001-FOR (3) und hFis1-459-REV (2) Überhänge für die Restriktionsschnittstellen XbaI und Kpn2I angefügt. Nach Restriktionsspaltung wurde die cDNA für hFis1 in das Plasmid pDsRed2-C1 kloniert, woraus der Vektor pDsRed2-hFis1 resultierte.

Schon bei der Expression in den Kontrollzellen ohne weitere Behandlung zeigte sich ein Einfluss der Überexpression von hFis1 auf die Morphologie der Mitochondrien, denn sie lagen als kleine runde Einzelorganellen vor. Als Gegenfärbung diente die grüne äußere Mitochondrienmembran der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr. Es zeigte sich dabei, dass hFis1-DsRed2 eine gleichmäßige Färbung mit der kreisrunden äußeren Membran aufweist (Abb. 5-31, A1-A4). Eine zusätzliche Färbung des Zellkerns erfolgte in den Aufnahmen durch Hoechst 33342.

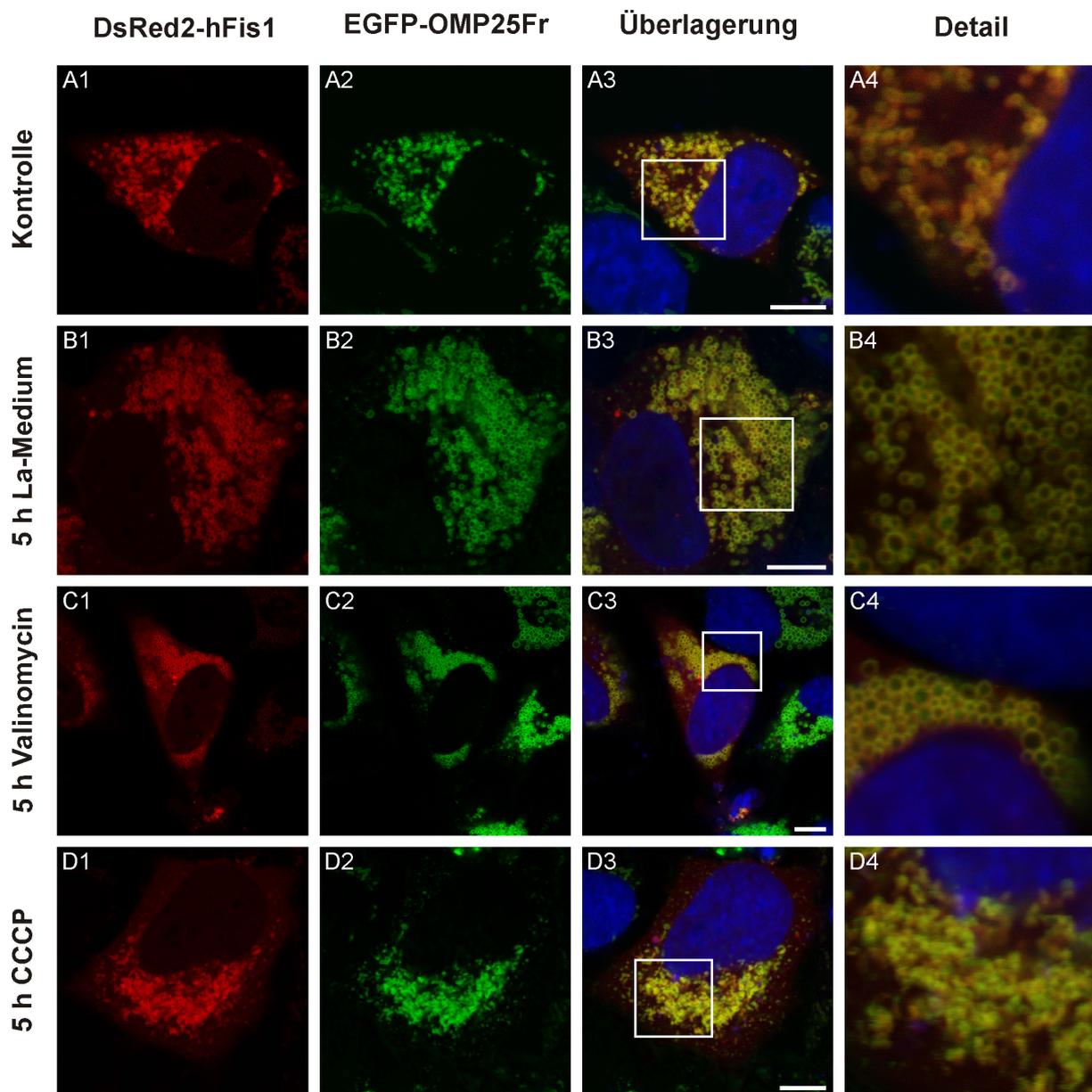
Nach Applizierung von La-Medium bildeten sich größere runde Mitochondrien, die bei weitem nicht die Ausmaße wie in Kontrollzellen nach La-Medium-Induktion erreichten. Es war eine Kolokalisation von hFis1 mit der äußeren Membran beobachtbar, jedoch zeigte sich deutlich der Einfluss der Überexpression von hFis1, da die Bildung der Megamitochondrien stark gehemmt wurde (Abb. 5-31, B1-B4).

Die Applizierung von Valinomycin ergab im Vergleich zum La-Medium eine ähnliche Morphologie der Mitochondrien. Die Ausbildung von Megamitochondrien wurde verhindert, wobei die Durchmesser der Organellen größer waren als bei der unbehandelten Kontrolle (Abb. 5-31, C1-C4).

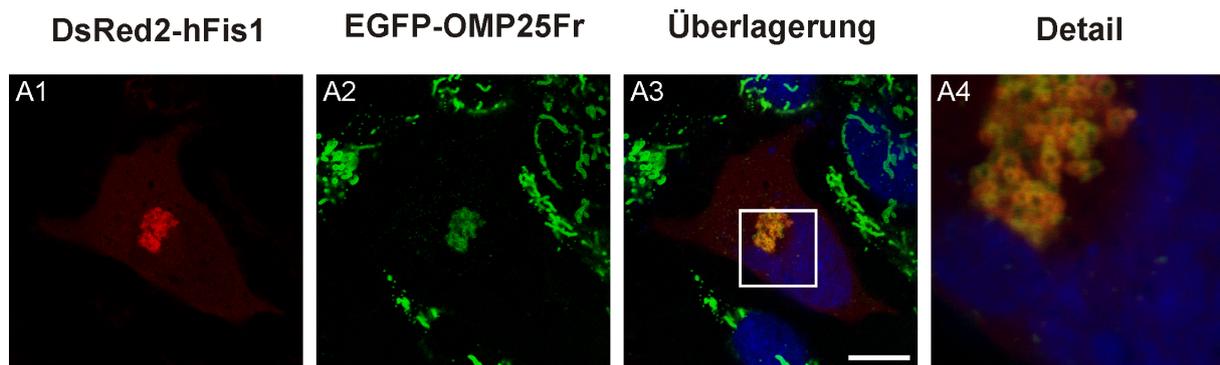
CCCP führte zu einer starken Fragmentierung zu sehr kleinen Einzelmitochondrien. Es konnten keine runden Organellen, wie bei der unbehandelten Kontrolle, beobachtet werden.

Die Kolokalisierung von hFis1-DsRed2 und EGFP-OMP25Fr blieb bestehen (Abb. 5-31, D1-D4).

Zusammenfassend wird durch die vorliegenden Ergebnisse deutlich, dass die Überexpression von hFis1 die Bildung von Megamitochondrien verhindert, obwohl die Zellen mit La-Medium oder Valinomycin behandelt wurden. Der Effekt der Fragmentierung der Organellen nach CCCP-Zugabe scheint durch hFis1-Überexpression verstärkt zu sein.



**Abb. 5-31:** Konfokalmikroskopische Analyse der Expression von pDsRed2-hFis1 in der Zelllinie HeLa. EGFP-OMP25Fr gefärbt mit Hoechst 33342. Messbalken: 7,5  $\mu$ m.



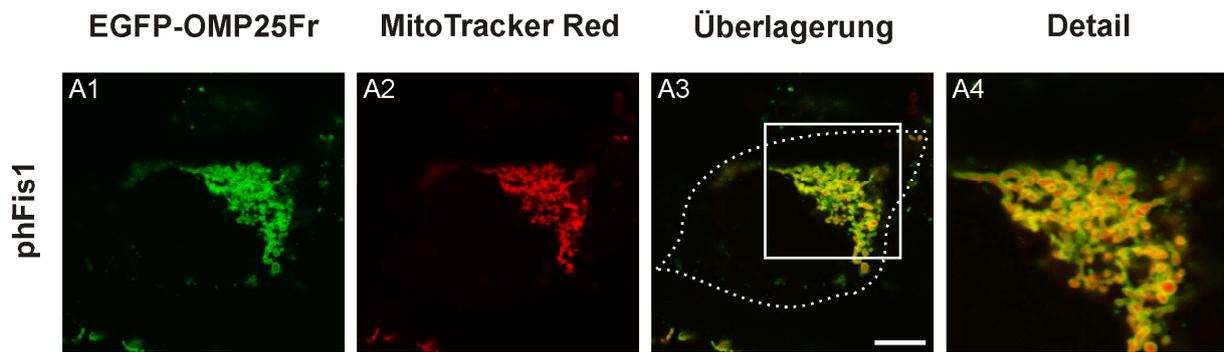
**Abb. 5-32:** Auffällige Morphologie bei konfokalmikroskopischer Analyse der Expression von pDsRed2-hFis1 in der Zelllinie HeLa. EGFP-OMP25Fr gefärbt mit Hoechst 33342. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Die Überexpression von hFis1 führte bei manchen Zellen zu einer auffälligen Mitochondrienmorphologie, denn es kam zur perinukleären Ansammlung aller in der Zelle vorhandenen Mitochondrien (Abb. 5-32). Die Mitochondrien lagen als kleine, runde Einzelorganellen vor und der Zellkern zeigte eine Deformation. Diese Strukturen lagen meist 48 h nach Transfektion von pDsRed2-hFis1 vor und waren wahrscheinlich abhängig vom Expressionsgrad von hFis1.

Um zu testen, ob diese auffällige Morphologie der fragmentierten und aggregierten Mitochondrien nur von der Überexpression von hFis1 abhängt und nicht von dem Fusionsprotein – bestehend aus hFis1 und DsRed2 – wurde der Expressionsvektor phFis1 erstellt, welcher nur hFis1 ohne Fluoreszenzmarkierung codierte.

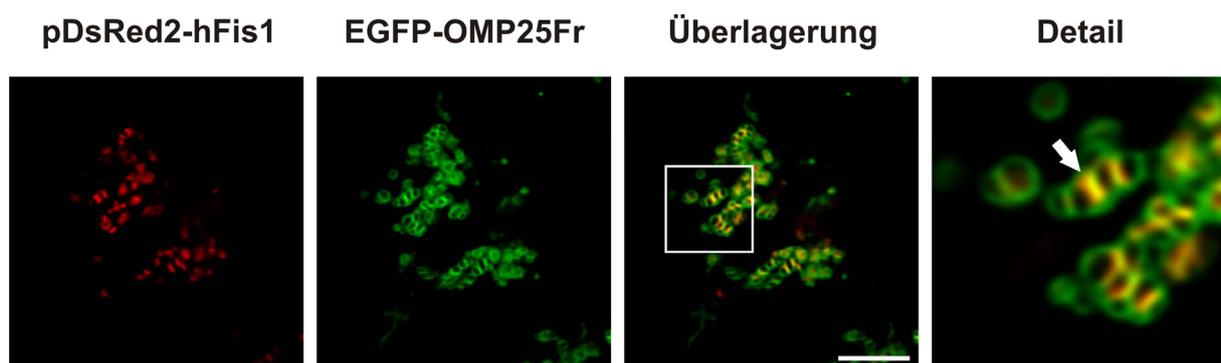
Der Vektor phFis1 wurde ausgehend von pPA-GFP-hFis1 erstellt, indem mittels der Restriktionsendonucleasen BglIII und BshTI die cDNA für PA-GFP eliminiert wurde. Nach Gelextraktion wurden die Überhänge mit T4 DNA-Polymerase aufgefüllt und das Plasmid anschließend ligiert, woraus der Vektor phFis1 resultierte.

Bei der Überexpression von hFis1 alleine kam es ebenfalls zur Fragmentierung der Mitochondrien und zur Aggregatbildung. Das Ergebnis bestätigt, dass die Aggregation von der Überexpression von hFis1 abhängt und ist in Abb. 5-33 dargestellt. Hierzu wurden die Organellen mit EGFP-OMP25Fr und MitoTracker Red CMXRos sichtbar gemacht.



**Abb. 5-33:** Konfokalmikroskopische Analyse der Expression von phFis1 in der Zelllinie HeLa. EGFP-OMP25Fr gefärbt mit MitoTracker Red CMXRos. Die punktierte Linie gibt in etwa die Zellgrenze wider. Messbalken: 7,5  $\mu\text{m}$ .

Etwa 48 h nach Transfektion mit pDsRed2-hFis1 waren in einigen Zellen andere auffällige Strukturen zu beobachten. Die Mitochondrienmorphologie wies gebänderte Strukturen auf, deutlich gemacht durch die Färbung der äußeren Mitochondrienmembran mit EGFP-OMP25Fr (Abb. 5-34). Die rote Fluoreszenz von DsRed2-hFis1 kolokalisierte in diesen Strukturen mit den Stegen im Inneren der Mitochondrien, nicht jedoch mit der umgebenden äußeren Membran, was mit einem Pfeil gekennzeichnet ist (Abb. 5-34). Dies war untypisch, da DsRed2-hFis1 in den vorangegangenen Experimenten immer rund um die Mitochondrien mit der äußeren Mitochondrienmembran kolokalisierte.



**Abb. 5-34:** Auffällige Morphologie bei konfokalmikroskopischer Analyse der Expression von pDsRed2-hFis1 in der Zelllinie HeLa. EGFP-OMP25Fr. Die Abbildung wurde einer Dekonvolutionsberechnung unterzogen. Eichstrich: 5  $\mu\text{m}$ .

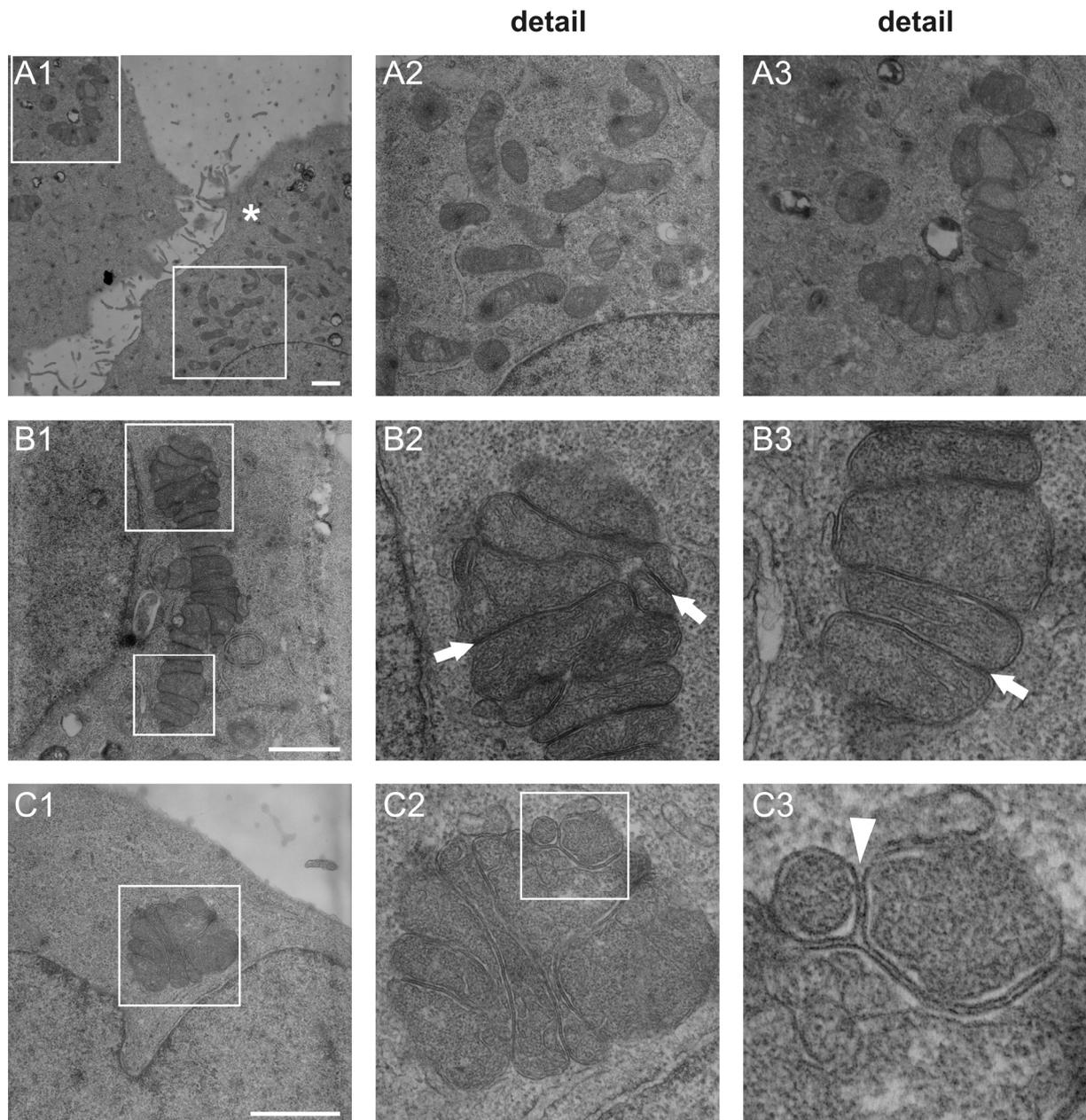
#### **5.8.4.2 Elektronenmikroskopische Analyse**

Diese auffällige, gebänderte Mitochondrienmorphologie nach Überexpression von hFis1 sollte nun ultrastrukturell mittels Elektronenmikroskopie aufgeklärt werden. Für diese Versuche wurden HeLa-Zellen mit pPA-GFP-hFis1 auf Deckgläsern mit Rastern transfiziert und nach 48 h fluoreszenzmikroskopisch identifiziert. Nach Fixierung und weiterer Behandlung konnten Schnitte der Zellen ultrastrukturell untersucht werden, die Ergebnisse sind in Abb. 5-35 dargestellt. In A1 ist eine untransfizierte Kontrollzelle – markiert durch einen Stern (\*) – in direkter Nachbarschaft zu einer transfizierten Zelle zu sehen (links). Man erkennt sofort die außergewöhnliche Morphologie der Mitochondrien nach Überexpression von hFis1 (A3) im Vergleich zu den unbehandelten Organellen (A2).

In den weiteren Aufnahmen (B1-C3) sind transfizierte Zellen gezeigt, deren Mitochondrien die auffällige Bändermorphologie zeigen, wie man sie ebenfalls in den Fluoreszenzaufnahmen beobachten konnte (Abb. 5-34). Die Mitochondrien liegen sehr dicht gepackt vor und mit Pfeilen sind in Abb. 5-35, B2 und B3 die Stege markiert, bei denen die Membranen so dicht zusammen liegen, dass es zu einer Dunkelfärbung kommt.

Eine Aufklärung dieser Strukturen verdeutlicht Abb. 5-35, C1-C3. In der Detailaufnahme C3 ist zu erkennen, dass es sich bei den Stegen zwischen den Mitochondrien um zwei äußere Mitochondrienmembranen handelt, die extrem nah zusammen lagen, was durch einen Pfeilkopf markiert wurde (Abb. 5-35, C3).

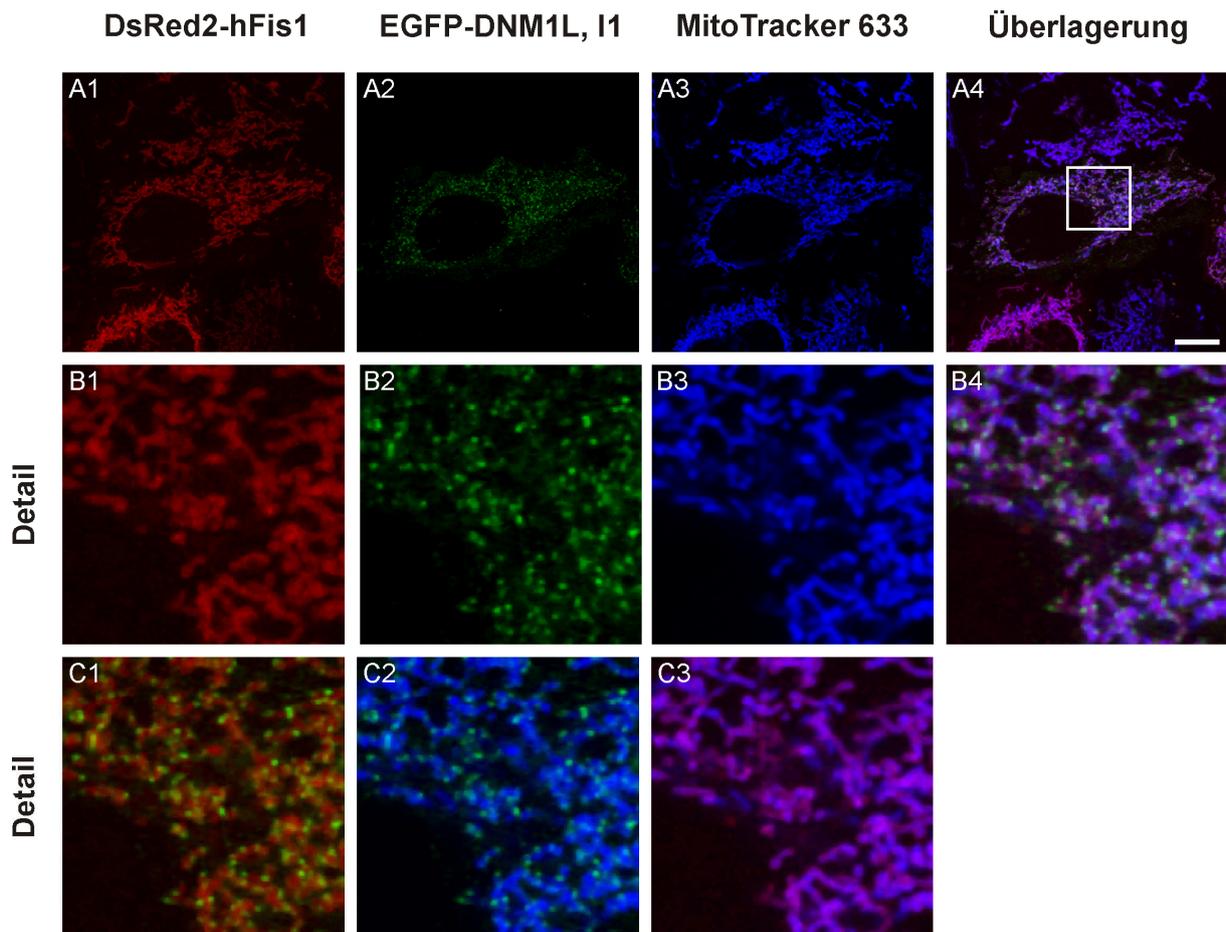
Eine längere Überexpression von hFis1 führte zu dieser gebänderten Mitochondrienmorphologie, in der die Mitochondrien alle noch als Einzelorganellen mit eigener äußerer Membran zusammenhängen.



**Abb. 5-35:** Transmissionselektronenmikroskopaufnahmen von HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion mit pPA-GFP-hFis1. Stern (\*): Kontrollzelle. Eichstriche: 1  $\mu$ m.

#### 5.8.4.3 Gleichzeitige Überexpression von *hFis1* und *Drp1/DNM1L*

Drp1/DNM1L und hFis1 werden als Interaktionspartner für die mitochondriale Fission diskutiert, wobei wahrscheinlich eine Rekrutierung des zytoplasmatischen Drp1/DNM1L durch das in der äußeren Mitochondrienmembran liegende hFis erfolgt. Um hierin nähere Einblicke zu erlangen, wurde eine Koftransfektion mit hFis1 (pDsRed2-hFis1) und Drp1/DNM1L (pEGFP-DNM1L, I1) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Mitochondrien mit MitoTracker 633 gefärbt, der in der Abbildung in Falschfarbendarstellung blau zu sehen ist (Abb. 5-36).



**Abb. 5-36:** Konfokalaufnahmen von HeLa-Zellen, transfiziert mit pDsRed2-hFis1 und pEGFP-DNM1L, I1, sowie Färbung mit MitoTracker 633, welche in Falschfarben blau dargestellt ist. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Die Morphologie der Mitochondrien zeigt das normale Netzwerk der Organellen und die rote Fluoreszenz von pDsRed2-hFis1 kolokalisiert mit der Organellenfärbung durch MitoTracker 633 (Abb. 5-36, C3). Drp1/DNM1L befindet sich punktuell an den Mitochondrien, v.a. an den Enden und an putativen Spaltstellen (Abb. 5-36).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass bei einer zeitgleichen Überexpression von hFis1 und Drp1/DNM1L die Lokalisierung dieser beiden Proteine das gleiche Muster zeigt, wie bei einzelner Überexpression. Die netzwerkartige Mitochondrienmorphologie wurde durch die gleichzeitige Überexpression zweier mitochondrialer Fissionsproteine nicht wesentlich beeinflusst.

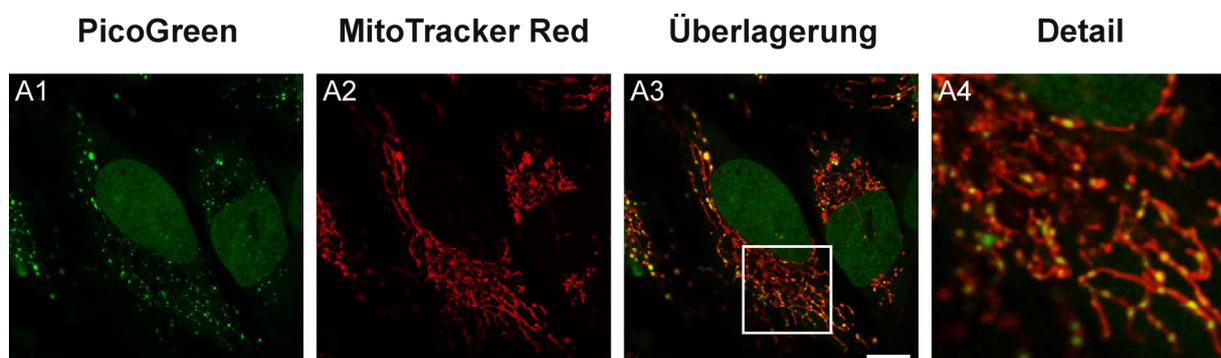
## 5.9 Dynamik mitochondrialer Nucleoids

### 5.9.1 Visualisierung mitochondrialer Nucleoids mit PicoGreen

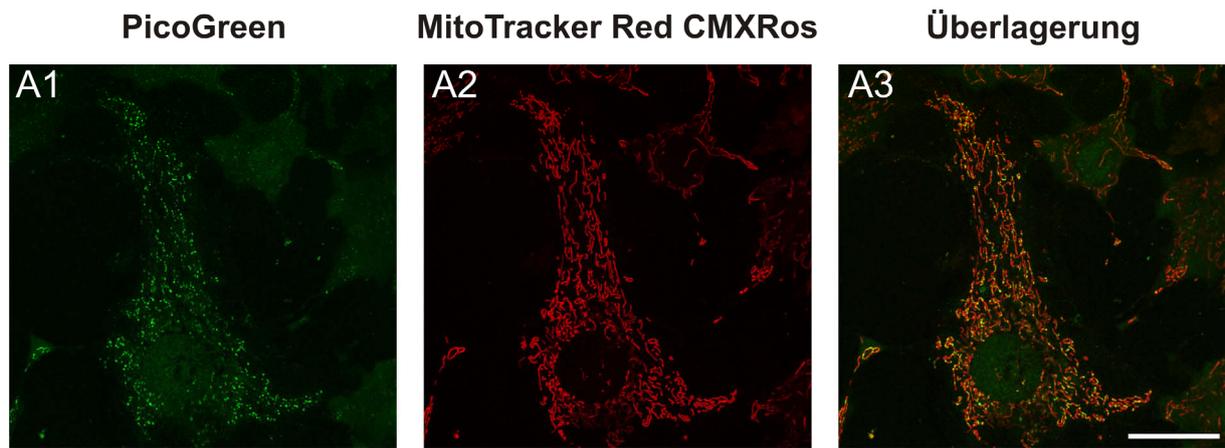
#### 5.9.1.1 Lokalisierung und Dynamik PicoGreen-gefärbter Nucleoids

Die Protein-DNA-Komplexe, in denen mitochondriale Genome organisiert sind, werden als mitochondriale Nucleoids bezeichnet. Für die Visualisierung dieser Komplexe in lebenden Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Farbstoff PicoGreen verwendet, der ursprünglich als Quantifizierungssystem für DNA auf den Markt kam, jedoch ebenfalls mitochondriale DNA in lebenden Zellen färben kann (Bereiter-Hahn und Vöth, 1996; Tyynismaa *et al.*, 2004; Ashley *et al.*, 2005).

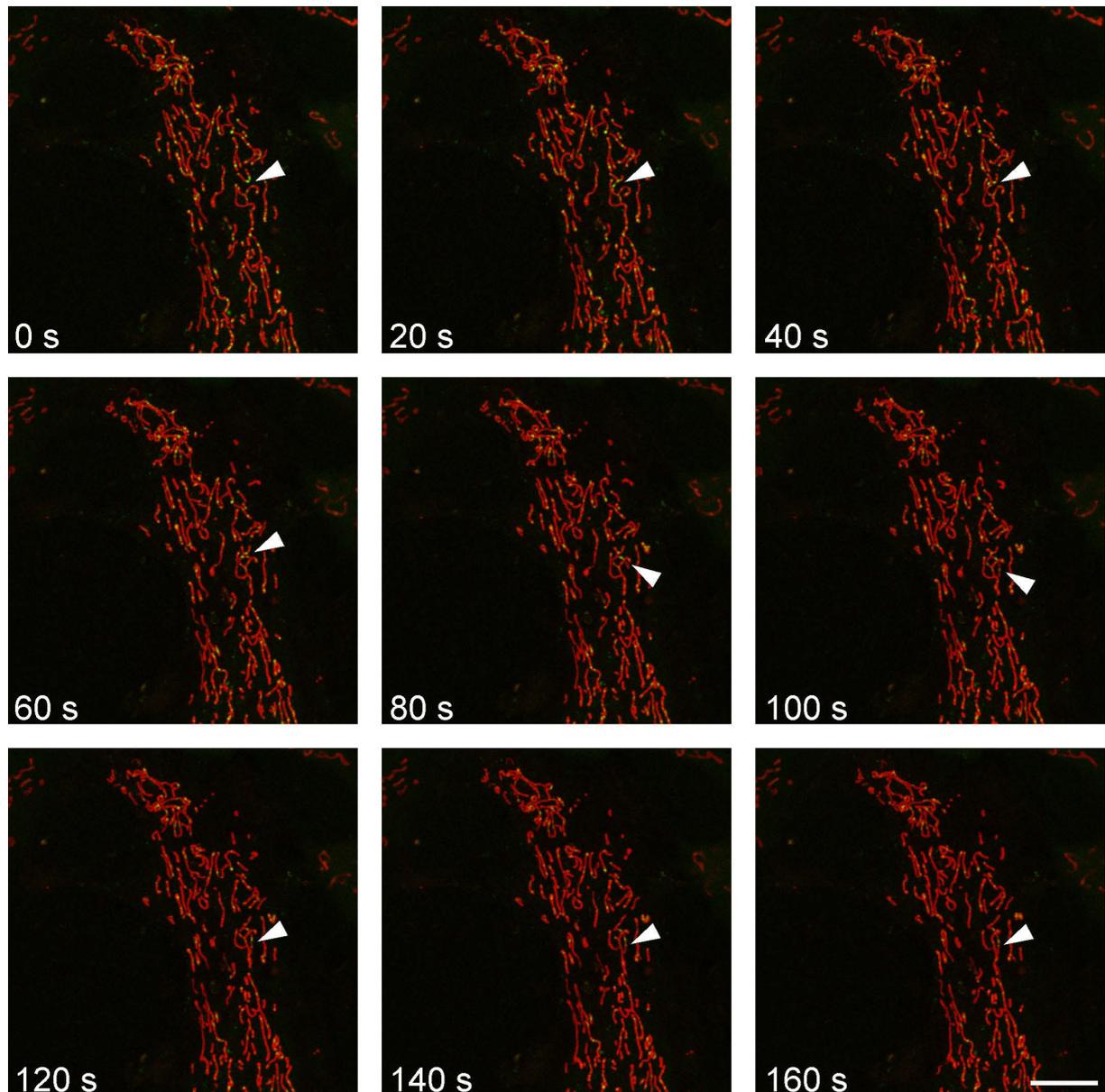
Als erstes wurde die korrekte Färbung von mtDNA *in vivo* überprüft, wozu HeLa-Zellen mit PicoGreen und MitoTracker Red CMXRos behandelt wurden. In Abb. 5-37 zeigt sich die Färbung der mtDNA in punktförmigen Strukturen im gesamten mitochondrialen Netzwerk, welches durch MitoTracker sichtbar gemacht wurde. Somit verlief die Färbung korrekt und wurde auf murine 3T3-Zellen ausgeweitet, wobei im Maus-System die Nucleoids ebenso mit PicoGreen gefärbt wurden (Abb. 5-38). Mit der gezeigten Zelle wurde in einer Zeitreihe die Dynamik der Mitochondrien und Nucleoids dargestellt, wie in Abb. 5-39 zu sehen ist. In der Lebendbetrachtung kam es zu mitochondrialer Fusion und zur Wanderung von Nucleoids von einem Mitochondrium zum anderen, was in der Abbildung durch einen Pfeilkopf markiert ist (Abb. 5-39). Im Laufe der Zeitreihe erkennt man ein Ausbleichen von PicoGreen, was ein Nachteil dieses Farbstoffs bei der Lebendbetrachtung von Zellen über längere Zeiträume ist.



**Abb. 5-37:** Konfokalmikroskopische Analyse von HeLa-Zellen, die mit PicoGreen und MitoTracker Red CMXRos gefärbt wurden. Eichstrich: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 5-38:** Konfokalmikroskopische Analyse von 3T3-Zellen, nach Färbung mit PicoGreen und MitoTracker Red CMXRos. Eichstrich: 25  $\mu\text{m}$ .



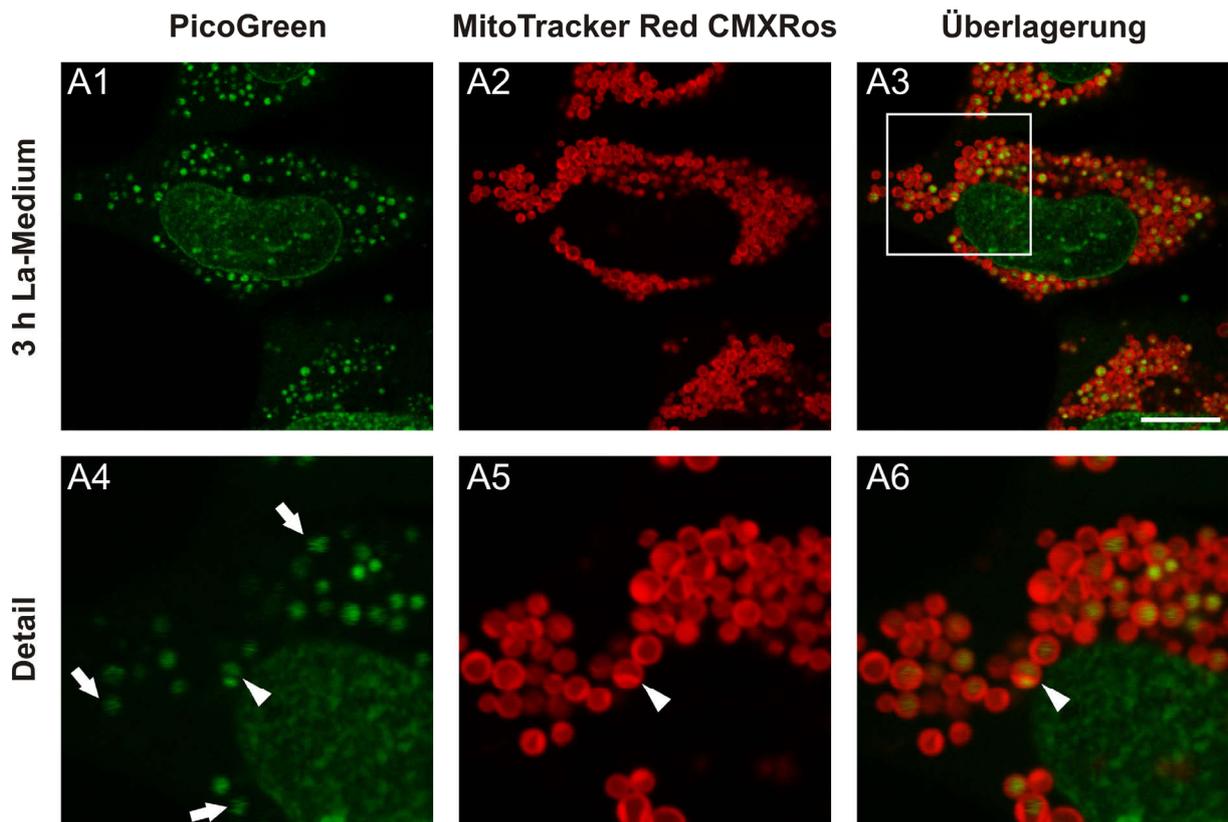
**Abb. 5-39:** Konfokalmikroskopische Zeitreihe einer Lebendbetrachtung von 3T3-Zellen mit PicoGreen und MitoTracker Red CMXRos gefärbt. Eichstrich: 10  $\mu\text{m}$ .

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nicht nur das mitochondriale Netzwerk eine sehr dynamische Struktur ist, sondern auch die mitochondrialen Nucleoids. Sie bewegen sich innerhalb der Mitochondrien und können zwischen den Mitochondrien ausgetauscht werden.

### 5.9.1.2 *PicoGreen-gefärbte Nucleoids in Megamitochondrien*

Da sich mit PicoGreen mtDNA *in vivo* beobachten lässt, stellte sich die Frage nach dem Verhalten der mtDNA in Megamitochondrien. Hierzu gibt es bisher keine Untersuchungen, da die endogene Bildung der Milchsäure-induzierten Megamitochondrien an  $\rho^0$ -Zellen beschrieben wurde, welche über kein mitochondriales Genom mehr verfügen. Um Einblicke in das Verhalten der mitochondrialen Nucleoids in Megamitochondrien zu erhalten, wurden in HeLa-Zellen Megamitochondrien mit La-Medium induziert und die mtDNA mit PicoGreen gefärbt, wobei die Mitochondrien mit MitoTracker Red CMXRos sichtbar gemacht wurden. In Abb. 5-40 ist das Resultat in A1-A3 in der Übersicht und in A4-A6 im Detail zu sehen. Man erkennt eine Verteilung der grünen PicoGreen-Färbung innerhalb der gesamten Megamitochondrien, wobei es sich nicht um eine homogene Distribution der grünen Färbung handelt. Viel mehr bewegten sich die Strukturen, die mittels PicoGreen visualisiert werden konnten, schnell innerhalb der Megamitochondrien, was am konfokalen Laserscanningmikroskop zu einem Schlierenmuster bei der Bildaufnahme führte, welches exemplarisch mit Pfeilen markiert ist (Abb. 5-40). In der Detailaufnahme A5 ist mit einem Pfeilkopf ein Septum innerhalb eines Megamitochondriums gekennzeichnet, wodurch die grüne PicoGreen-Fluoreszenz innerhalb der Riesenorganelle getrennt wird (Abb. 5-40).

Zusammenfassend ergibt sich mit PicoGreen eine Möglichkeit zur Färbung von mitochondrialen Nucleoids in lebenden Zellen. Die Nucleoids verhalten sich im normalen Netzwerk sehr dynamisch und wandern innerhalb der Mitochondrientubuli bzw. von einem zum anderen nach Fusionsereignissen. Zudem bewegen sich die PicoGreen-gefärbten Nucleoids schnell innerhalb von Megamitochondrien nach der Induktion mit La-Medium, was bei der Bildaufnahme zu Schlierenmustern führt.



**Abb. 5-40:** Konfokalaufnahmen von HeLa-Zellen, gefärbt mit PicoGreen und MitoTracker Red CMXRos nach 3-stündiger Inkubation mit La-Medium. Messbalken: 10  $\mu$ m.

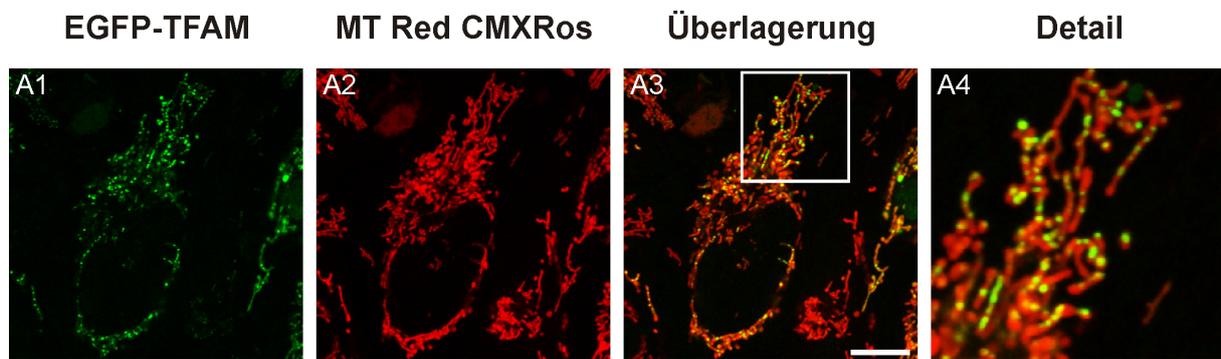
## 5.9.2 Visualisierung mitochondrialer Nucleoids durch TFAM

### 5.9.2.1 Lokalisierung und Dynamik TFAM-markierter Nucleoids

Um weitere Einblicke in mitochondriale Nucleoids in lebenden Zellen zu erhalten, wurden Bestandteile der Nucleoids für Untersuchungen herangezogen. Als erstes wurde der Transkriptions- und Verpackungsfaktor TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) gewählt und es wurden eukaryontische Expressionsvektoren konstruiert, die TFAM als Fusionsprotein einerseits mit EGFP, andererseits mit DsRed2 exprimieren.

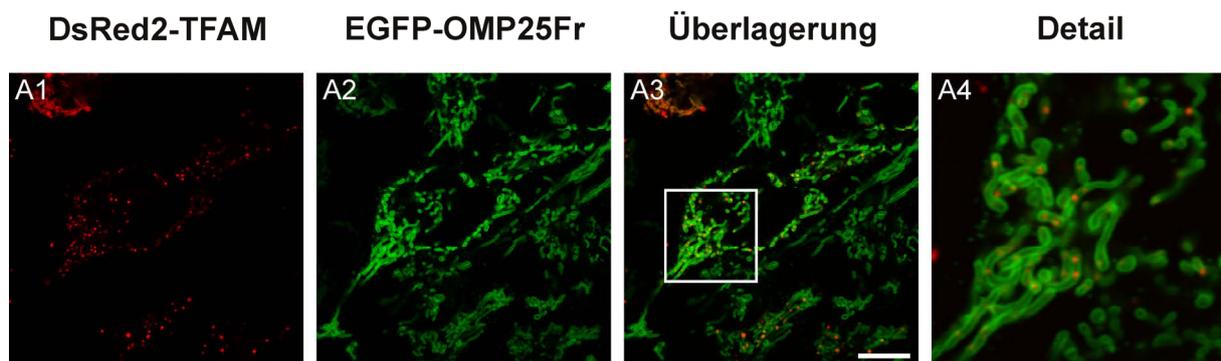
Für die Vektorkonstruktion wurde RNA aus HeLa-Zellen isoliert und einer RT-PCR mit den Primern TFAM-0133-FOR und TFAM-0873-REV unterzogen. Der cDNA wurden Überhänge für die Restriktionsschnittstellen Cfr42I und BshTI mit den Oligos TFAM-0133-FOR (2) sowie TFAM-0870-REV (3) hinzugefügt. Nach Restriktionsverdau wurde die TFAM-cDNA in die Vektoren pEGFP-N1 bzw. pDsRed2-N1 kloniert, woraus die Plasmide pEGFP-TFAM bzw. pDsRed2-TFAM resultierten.

Nach der Transfektion von pEGFP-TFAM in HeLa-Zellen ergab sich das gleiche Muster wie nach einer PicoGreen-Färbung: punktförmige Strukturen verteilten sich innerhalb des gesamten mitochondrialen Netzwerks (Abb. 5-41). Diese Distribution des Fusionsproteins bestehend aus TFAM und EGFP deutet auf die Färbung der mitochondrialen Nucleoids hin, wobei die Gegenfärbung der Organellen mit MitoTracker Red CMXRos erfolgte.



**Abb. 5-41:** Konfokalmikroskopische Analyse von HeLa-Zellen, nach Transfektion mit pEGFP-TFAM und Färbung mit MitoTracker Red CMXRos. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

Der Expressionsvektor pDsRed2-TFAM, mit dem ein Fusionsprotein bestehend aus TFAM und dem rotfluoreszierenden Protein DsRed2 exprimiert wird, wurde ebenso in HeLa-Zellen angewendet. Hierzu wurde die Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr verwendet, bei der die äußere Mitochondrienmembran mit EGFP gefärbt ist. In Abb. 5-42 ist erkennbar, dass dieses TFAM-Fusionsprotein ebenso eine punktuelle Morphologie innerhalb der Mitochondrien aufweist.

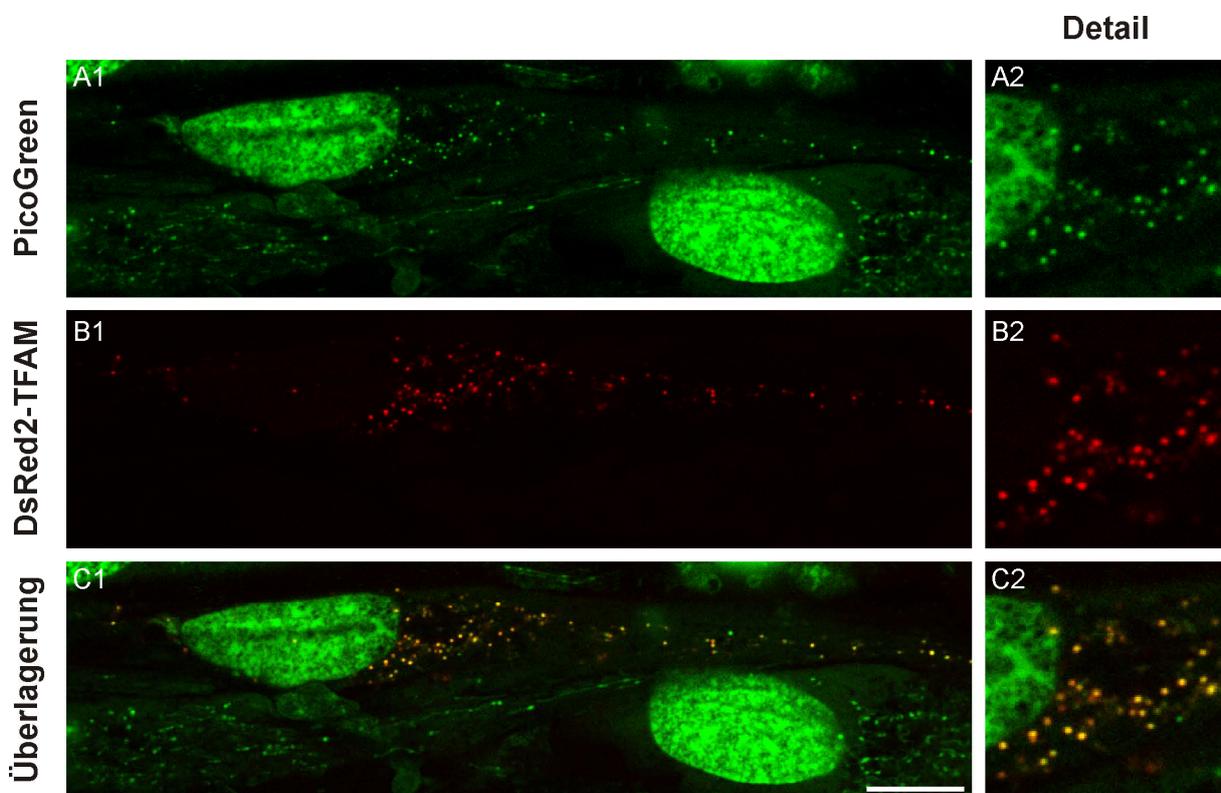


**Abb. 5-42:** Konfokalaufnahmen von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-TFAM. Messbalken: 10  $\mu$ m.

### 5.9.2.2 *Kolokalisierung von TFAM und PicoGreen*

TFAM wurde zwar als Bestandteil von mitochondrialen Nucleoids beschrieben, aber ob die punktförmigen Strukturen in Abb. 5-41 und in Abb. 5-42 wirklich den Komplexen entsprechen, die mtDNA enthalten, sollte ebenfalls optisch aufgeklärt werden. Es stellte sich zudem die Frage, ob die Überexpression von TFAM, gekoppelt an Fluoreszenzproteine, Einflüsse auf die Nucleoidstrukturen hat. Zur Aufklärung wurde eine Doppelfärbung mit DsRed2-TFAM und PicoGreen in lebenden Zellen durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden humane HFF-Zellen transfiziert und gefärbt, was in Abb. 5-43 dargestellt ist. Damit konnte nachgewiesen werden, dass jeder TFAM-Spot mit einem PicoGreen-Spot kolokalisierte, was bedeutet, dass das Fusionsprotein DsRed2-TFAM alle mit PicoGreen visualisierbaren Nucleoids färbte (Abb. 5-43, C2). Zudem war keine negative Veränderung durch die Überexpression aufgefallen.

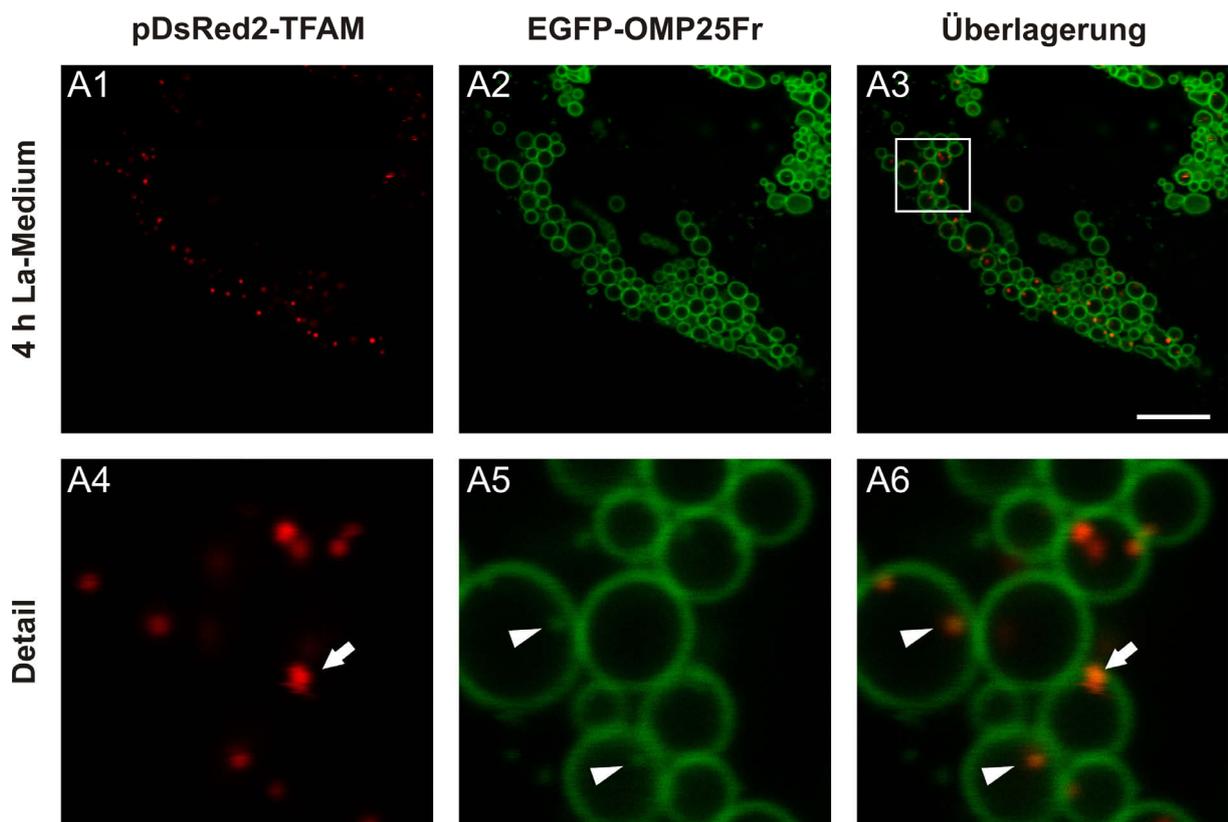
Diese Erkenntnisse ermöglichen zum ersten beschriebenen Mal die Färbung von mitochondrialen Nucleoid-Strukturen in lebenden Zellen mit den stabilen Farbstoffen EGFP oder DsRed2 gekoppelt an TFAM.



**Abb. 5-43:** Konfokalmikroskopische Analyse von HFF-Zellen, nach Transfektion mit pDsRed2-TFAM und Färbung mit PicoGreen. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

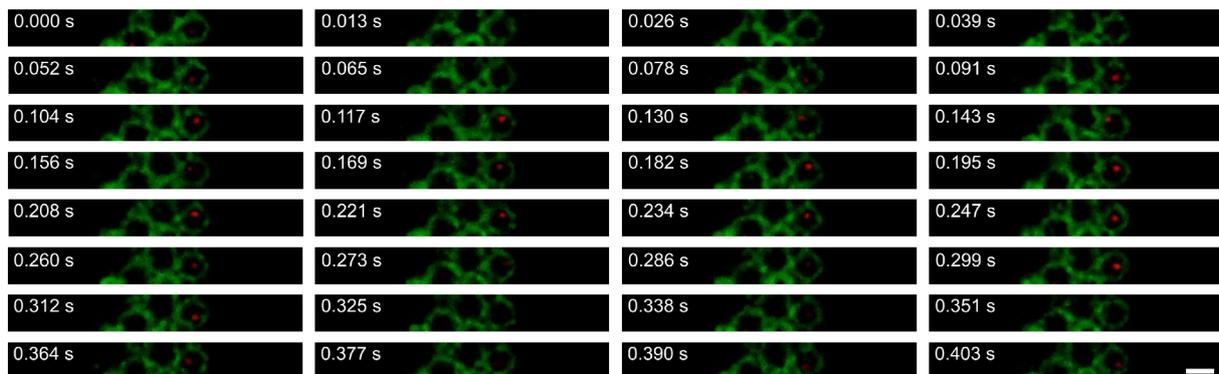
### 5.9.2.3 *Dynamik von TFAM in Megamitochondrien*

Von den Experimenten mit PicoGreen in Megamitochondrien ist bekannt, dass sich mtDNA in den Riesenorganellen bewegt. Um mehr Informationen zu diesen Phänomenen zu erhalten, wurden in Zellen, welche mit TFAM-Fusionsproteinen transfiziert waren, Megamitochondrien mit La-Medium induziert. Für die Untersuchungen wurde die Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr und der Vektor pDsRed2-TFAM herangezogen und die Ergebnisse sind in Abb. 5-44 zu sehen. Innerhalb der Megamitochondrien erkennt man eine Verteilung der roten DsRed2-TFAM-Fluoreszenz in Spots. In der Detailaufnahme wird deutlich, dass es bei der Bildaufnahme zur Bewegung der DsRed2-TFAM-gefärbten Nucleoids kam, was durch die Schlieren ersichtlich wird, welche durch einen Pfeil gekennzeichnet sind (Abb. 5-44; A4 und A6). Zudem scheint es bei den DsRed2-TFAM-Foci zu einer Kolokalisierung von grüner Fluoreszenz der äußeren Mitochondrienmembran zu kommen, was mit Pfeilköpfen markiert ist (Abb. 5-44, A5 und A6).



**Abb. 5-44:** Konfokalaufnahmen von HeLa.EGFP-OMP25Fr transfiziert mit pDsRed2-TFAM nach 4-stündiger Inkubation mit La-Medium. Messbalken: 7,5  $\mu$ m.

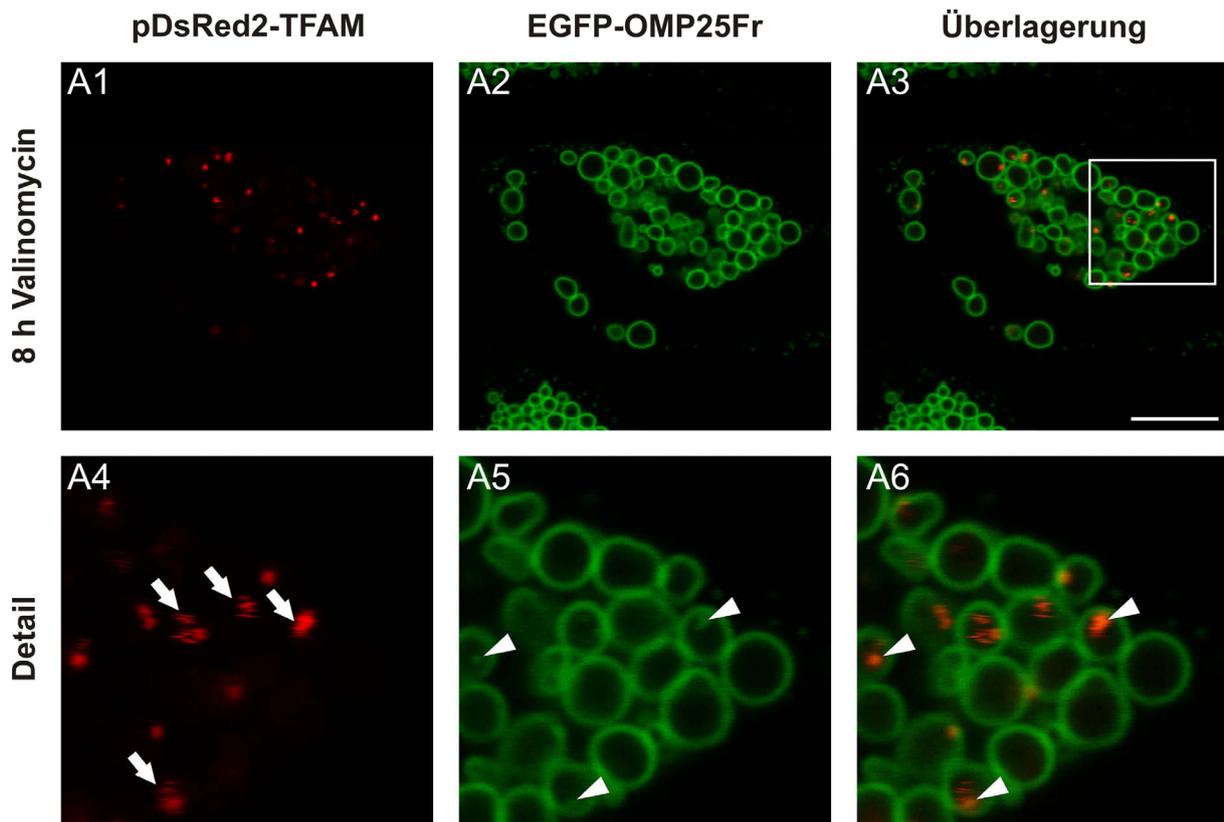
Dass sich die DsRed2-TFAM-markierten Nucleoids schnell bewegen, ist mit einer Zeitreihe in Abb. 5-45 dargestellt. Der Zeitunterschied zwischen zwei Aufnahmen beträgt 13 ms, was durch den Einsatz des Resonanzscanners am konfokalen Laserscanning-Mikroskop möglich war. In den Aufnahmen erkennt man deutlich die Bewegung des rotgefärbten Nucleoids innerhalb des Megamitochondriums, welcher sich so schnell bewegt, dass er zwischen zwei Aufnahmen zu springen scheint. Die Geschwindigkeit der Bewegung des gezeigten Nucleoids liegt bei etwa 35  $\mu\text{m/s}$ , da er zwischen zwei Bildern, also in 13 ms, eine Strecke von 0,5  $\mu\text{m}$  zurücklegte.



**Abb. 5-45:** Konfokalmikroskopische Zeitreihe einer Lebendbetrachtung von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-TFAM nach 7-stündiger Inkubation mit La-Medium. Bildaufnahme mit Resonanzscanner im Abstand von 13 ms. Messbalken: 2  $\mu\text{m}$ .

Nachdem TFAM-markierte Nucleoids in Milchsäure-induzierten Megamitochondrien als punktförmige, beweglich Strukturen vorlagen, stellte sich die Frage wie das Verhalten dieser Nucleoids in Riesenorganellen aussehen wird, die mit Valinomycin induziert wurden.

In Abb. 5-46 sind HeLa.EGFP-OMP25Fr-Zellen mit Megamitochondrien nach Valinomycin-Induktion zu sehen, welche DsRed2-TFAM exprimierten. Die Darstellung ähnelt sehr der Induktion durch La-Medium, denn auch hier lagen die DsRed2-TFAM-markierten Nucleoids punktuell in den Megamitochondrien vor und bewegten sich schnell, was zu einem Schlierenmuster führte und durch Pfeile gekennzeichnet ist (Abb. 5-46, A4). Auffällig ist, dass grün gefärbte Strukturen der äußeren Membranfärbung mit den DsRed2-TFAM-gefärbten Nucleoids kolokalisierten (Pfeilköpfe in Abb. 5-46, A5 und A6). Die Morphologie der Megamitochondrien entspricht der typischen Form nach Valinomycin-Zugabe. Für die Bewegung der TFAM-markierten Nucleoids in Valinomycin-behandelten Zellen wurden ebenfalls Zeitreihen aufgenommen. Da sie den Zeitreihen in den mit La-Medium induzierten Riesenorganellen sehr ähnlich waren, wurde auf eine bildliche Darstellung verzichtet.

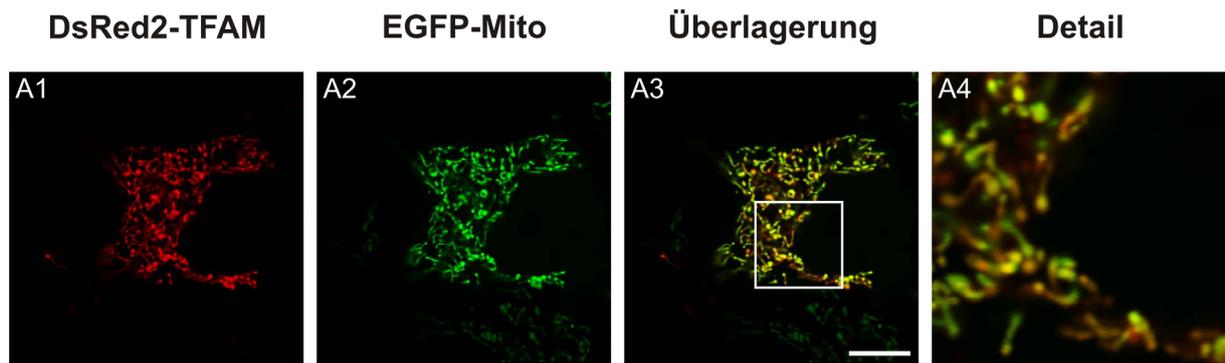


**Abb. 5-46:** Konfokalaufnahmen von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-TFAM nach 8-stündiger Inkubation mit Valinomycin. Messbalken: 7,5  $\mu\text{m}$ .

#### 5.9.2.4 Lokalisierung von TFAM in $\rho^0$ -Zellen

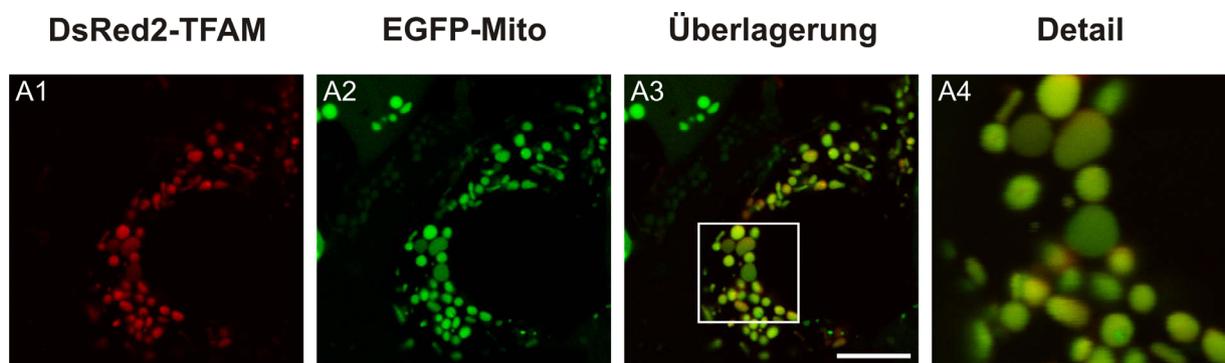
Weitere Untersuchungen wurden zu der Lokalisierung von Nucleoid-Bestandteilen in  $\rho^0$ -Zellen durchgeführt, die über keine mitochondriale DNA mehr verfügen. Es sollte aufgeklärt werden, wie sich die Proteine wie TFAM oder SSBP1 in Mitochondrien verhalten, die keine mtDNA besitzen. Zuerst wurde pDsRed2-TFAM in die  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7gm transfiziert, welche über stabil mit EGFP-Mito gefärbte Mitochondrien verfügt.

In Abb. 5-47 erkennt man deutlich, dass die rote Fluoreszenz von DsRed2-TFAM im gesamten mitochondrialen Netzwerk verteilt ist, denn es kommt zur Kolokalisierung mit der EGFP-Mito-Färbung. Es sind keine punktförmigen TFAM-Strukturen erkennbar, wie sie in Zellen mit mtDNA auftreten (Abb. 5-42). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass für die punktuelle TFAM-Färbung in Zellen mit mtDNA diese eine wichtige Rolle spielt.



**Abb. 5-47:** Konfokalaufnahmen der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7gm, transfiziert mit pDsRed2-TFAM. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Zusätzlich wurde die Distribution von TFAM in endogenen Megamitochondrien von  $\rho^0$ -Zellen analysiert. Hierzu wurden Zellen der Linie 143B.TK<sup>-</sup> K7gm mit pDsRed2-TFAM transfiziert und 66 h nach dem Aussäen, nachdem sich Riesenorganellen ausgebildet hatten, konfokalmikroskopisch untersucht. Es kam zu einer gleichmäßigen Verteilung von DsRed2-TFAM in den Megamitochondrien und es waren keine DsRed2-TFAM-gefärbten Foci erkennbar (Abb. 5-48).



**Abb. 5-48:** Konfokalaufnahmen der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7gm, transfiziert mit pDsRed2-TFAM 66 h nach Aussäen mit Megamitochondrien. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Für fluoreszente TFAM-Fusionsproteine lässt sich zusammenfassen, dass diese punktförmig im mitochondrialen Netzwerk vorliegen und mit PicoGreen kolokalisieren. In Megamitochondrien bleibt diese punktuelle Distribution bestehen, außer in  $\rho^0$ -Zellen ohne mtDNA, denn dort kommt es zur homogenen Verteilung der TFAM-Fluoreszenz in den gesamten Mitochondrien.

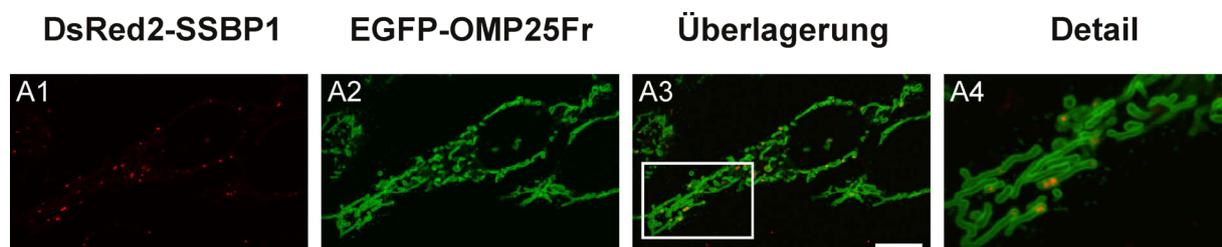
## 5.9.3 Visualisierung mitochondrialer Nucleoids durch SSBP1

### 5.9.3.1 Lokalisierung und Dynamik SSBP1-markierter Nucleoids

Nachdem mit TFAM ein weiterer Nucleoid-Bestandteil neben der mtDNA untersucht worden war, wurde das Augenmerk nun auf das mitochondriale DNA-Einzelstrangbindeprotein SSBP1 gerichtet. Hierzu wurden eukaryontische Expressionsvektoren konstruiert, die SSBP1 als Fusionsprotein einerseits mit EGFP, andererseits mit DsRed2 exprimieren.

Für die Vektorkonstruktion wurde RNA aus HeLa-Zellen isoliert und einer RT-PCR mit den Primern SSBP1-079-FOR und SSBP1-525-REV unterzogen. Der cDNA wurden Überhänge für die Restriktionsschnittstellen SallI und EcoRI mit den Oligos SSBP1-079-FOR (2) sowie SSBP1-522-REV hinzugefügt. Nach Restriktionsverdau wurde die SSBP1-cDNA in die Vektoren pEGFP-N1 bzw. pDsRed2-N1 kloniert, woraus die Plasmide pEGFP-SSBP1 bzw. pDsRed2-SSBP1 resultierten.

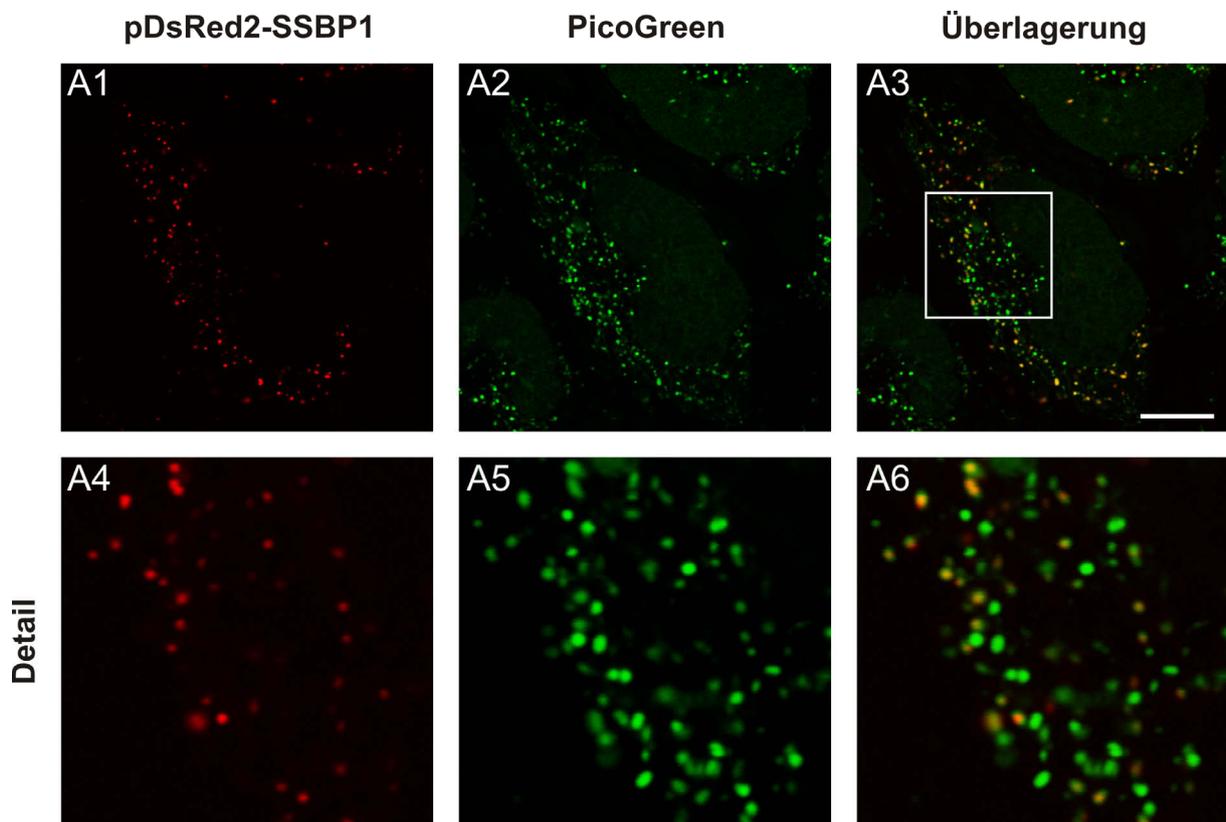
Als erstes wurde pDsRed2-SSBP1 in die Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr transfiziert, wobei sich die rote Fluoreszenz des Fusionsproteins in punktförmigen Strukturen innerhalb des Mitochondriennetzwerkes verteilte, wie in Abb. 5-49 dargestellt ist. Dieses Bild ähnelt sehr stark der Verteilung von PicoGreen-gefärbter mtDNA oder den Nucleoids, welche mit TFAM-Fusionsproteinen visualisiert werden konnten. Somit ist davon auszugehen, dass SSBP1-Fusionsproteine ebenfalls mitochondriale Nucleoids sichtbar machen.



**Abb. 5-49:** Konfokalmikroskopische Analyse von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-SSBP1. Messbalken: 10  $\mu$ m.

### 5.9.3.2 *Kolokalisierung von SSBP1 und PicoGreen*

Um eine Färbung der Nucleoids durch DsRed2-SSBP1 sicherzustellen, wurde das Plasmid pDsRed2-SSBP1 in HeLa Zellen exprimiert und die Zellen anschließend mit PicoGreen gefärbt. Hier ergab sich folgendes Bild: es kam sowohl zu punktförmigen Strukturen, die durch PicoGreen visualisiert wurden, als auch zu punktuellen Anordnungen, welche mittels DsRed2-SSBP1 gefärbt worden waren (Abb. 5-50). Die jeweiligen Spots kolokalisierten nicht komplett miteinander, denn es lagen mehr PicoGreen-gefärbte Nucleoids vor, als solche die mit DsRed2-SSBP1 markiert waren (Abb. 5-50, A4-A6). Somit scheinen nicht alle Nucleoids, die mtDNA enthalten, zeitgleich SSBP1 zu enthalten.

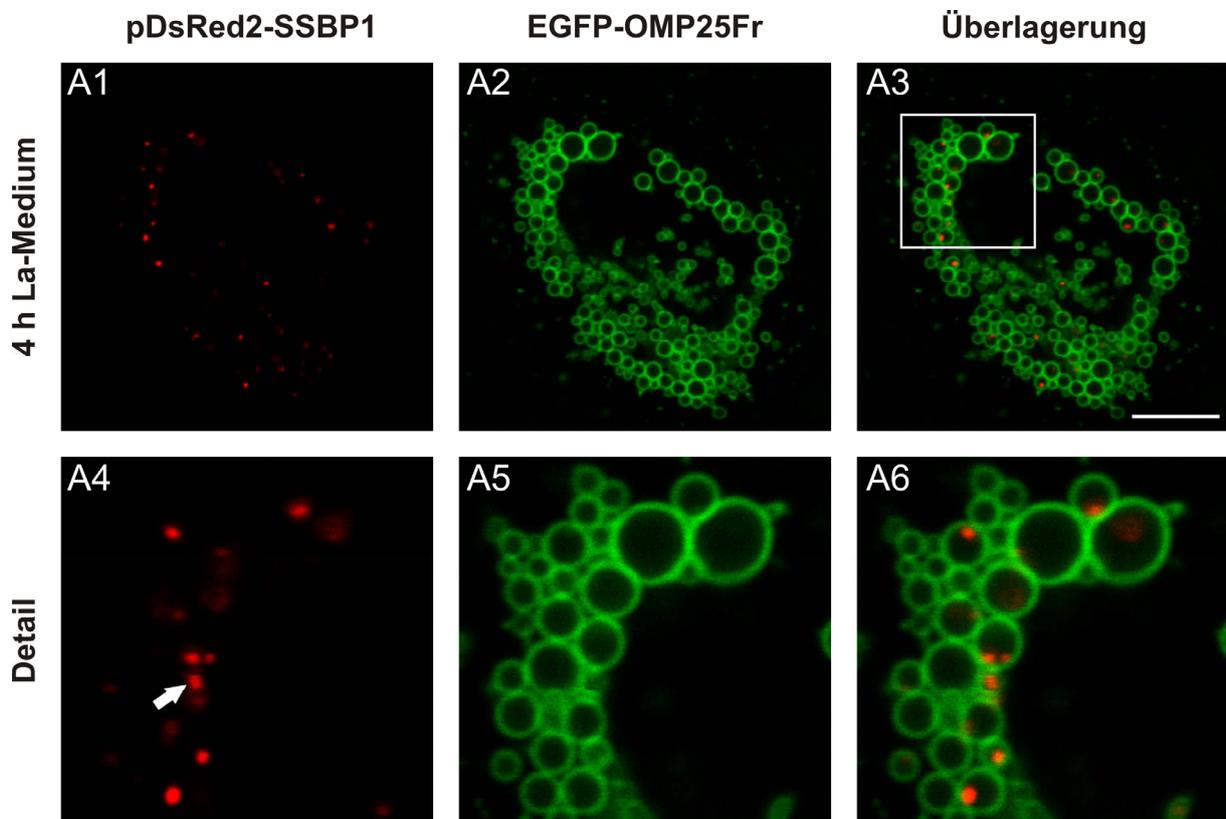


**Abb. 5-50:** Konfokalmikroskopische Analyse von HeLa transfiziert mit pDsRed2-SSBP1 und gefärbt mit PicoGreen. Eichstrich: 10  $\mu\text{m}$ .

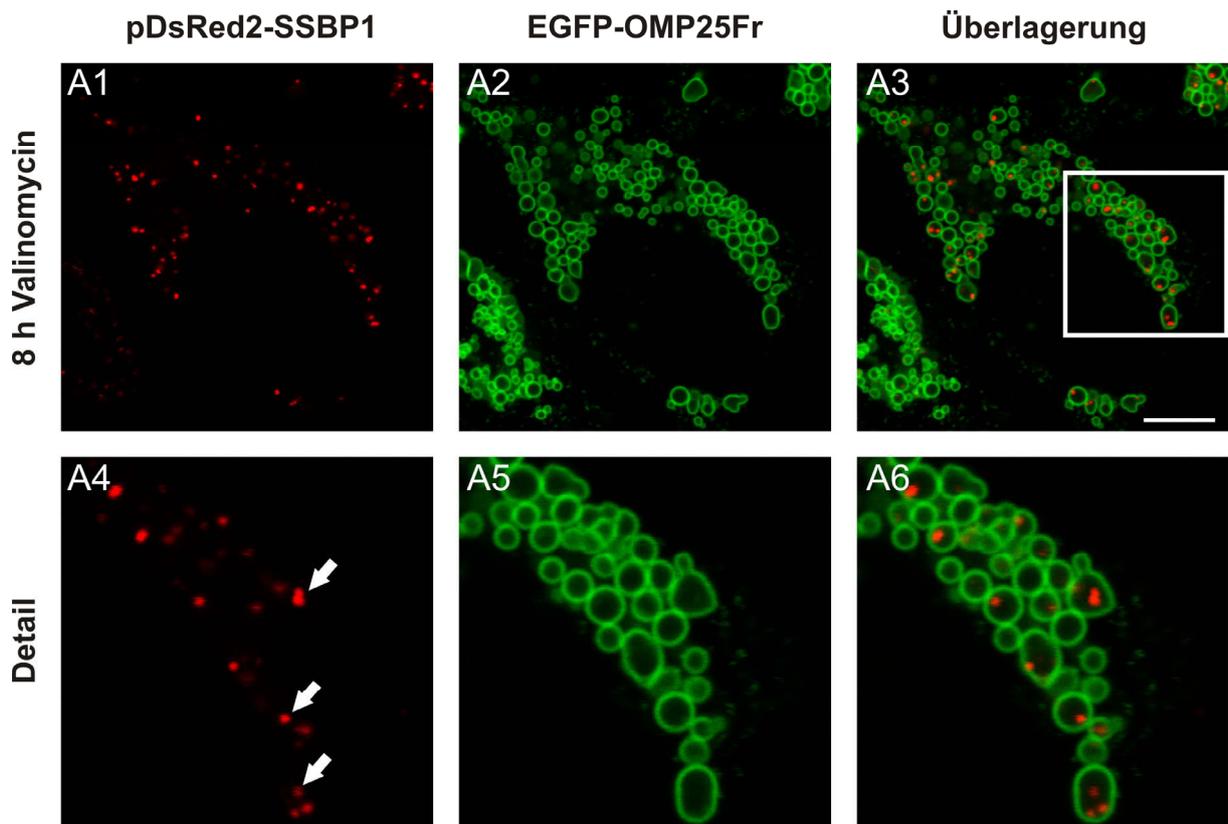
### 5.9.3.3 *Dynamik von SSBP1 in Megamitochondrien*

Um Erkenntnisse zu der Verteilung von SSBP1 in Megamitochondrien zu erlangen, wurde mit der Zelllinie HeLa-EGFP-OMP25Fr – transfiziert mit pDsRed2-SSBP1 – die Induktion der Megamitochondrien mit La-Medium durchgeführt. Es zeigte sich eine punktförmige Verteilung, der DsRed2-SSBP1-gefärbten Nucleoids, die sich in den Riesenorganellen bewegten, was in ein Schlierenmuster resultiert und durch einen Pfeil in der Abb. 5-51, A4 gekennzeichnet ist. Grüne EGFP-OMP25Fr-Strukturen, die mit DsRed2-SSBP1 kolokalisierten waren nicht auffällig.

Nach Valinomycin-vermittelter Megamitochondrienbildung ergab sich ein ähnliches Bild, denn es entstanden Riesenorganellen, in denen DsRed2-SSBP1 punktuell vorlag (Abb. 5-52). Ebenso bewegten sich die SSBP1-gefärbten Nucleoids, was bei den Aufnahmen zu einem Schlierenmuster führte und durch Pfeile in Abb. 5-52, A4 markiert ist. Grüne EGFP-OMP25Fr-Strukturen, die mit DsRed2-SSBP1 kolokalisierten, waren hier ebenso nicht ersichtlich.



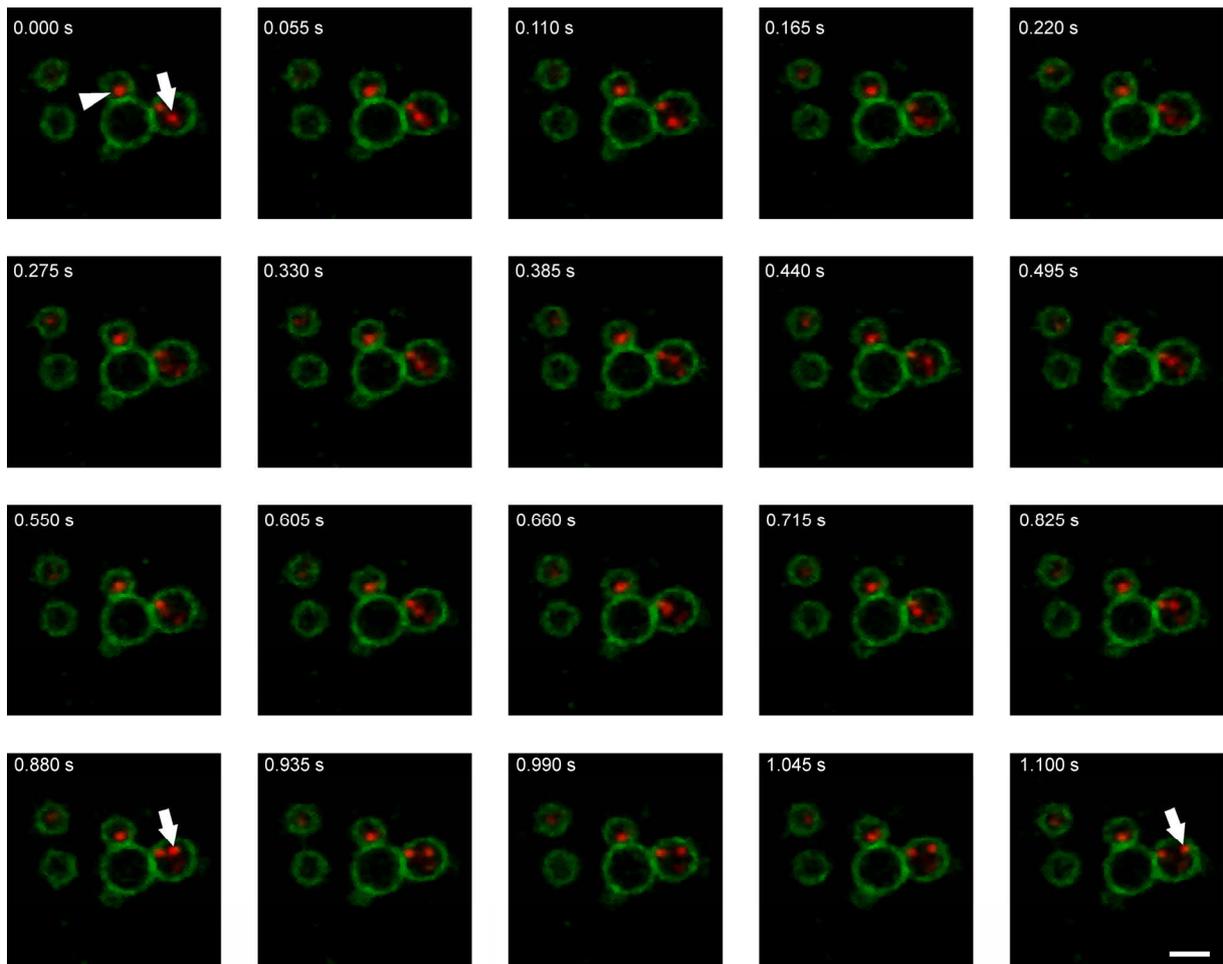
**Abb. 5-51:** Konfokalaufnahmen von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-SSBP1 nach 4-stündiger Inkubation mit La-Medium. Messbalken: 7,5 µm.



**Abb. 5-52:** Konfokalmikroskopische Analyse von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-SSBP1 nach 8 h Inkubation mit Valinomycin. Messbalken: 7,5  $\mu$ m.

Dass sich die DsRed2-SSBP1-gefärbten Nucleoids in den Megamitochondrien bewegten, ist exemplarisch in Abb. 5-53 dargestellt. Für dieses Experiment wurde in der Zelllinie HeLa.EGFP-OMP25Fr der Vektor pDsRed2-SSBP1 exprimiert, mit Valinomycin Megamitochondrien induziert und anschließend eine Zeitreihe am konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen. Aufgrund der schnellen Bewegung kam der Resonanzscanner zum Einsatz (Abb. 5-53). In der Aufnahme erkennt man statische Nucleoids (markiert durch einen Pfeilkopf) und bewegliche Nucleoids (gekennzeichnet mit einem Pfeil). SSBP1-gefärbte Strukturen können sich innerhalb von Megamitochondrien sehr schnell bewegen, denn zwischen den gezeigten Aufnahmen liegen nur 55 ms.

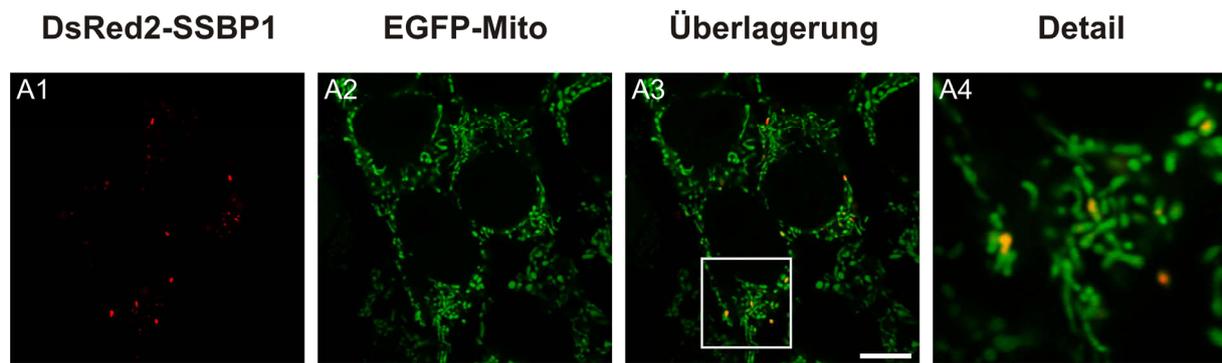
Die gleichen Erkenntnisse ergaben sich bei Riesenorganellen, die mit La-Medium induziert wurden, wobei dort die Bewegung der DsRed2-SSBP1-Strukturen im Vergleich zu Valinomycin-behandelten Zellen eher weniger ausgeprägt war.



**Abb. 5-53:** Konfokalmikroskopische Zeitreihe einer Lebendbetrachtung von HeLa.EGFP-OMP25Fr, transfiziert mit pDsRed2-SSBP1 nach 8-stündiger Inkubation mit Valinomycin. Bildaufnahme mit Resonanzscanner im Abstand von 55 ms. Messbalken: 2  $\mu\text{m}$ .

#### 5.9.3.4 Lokalisierung von SSBP1 in $\rho^0$ -Zellen

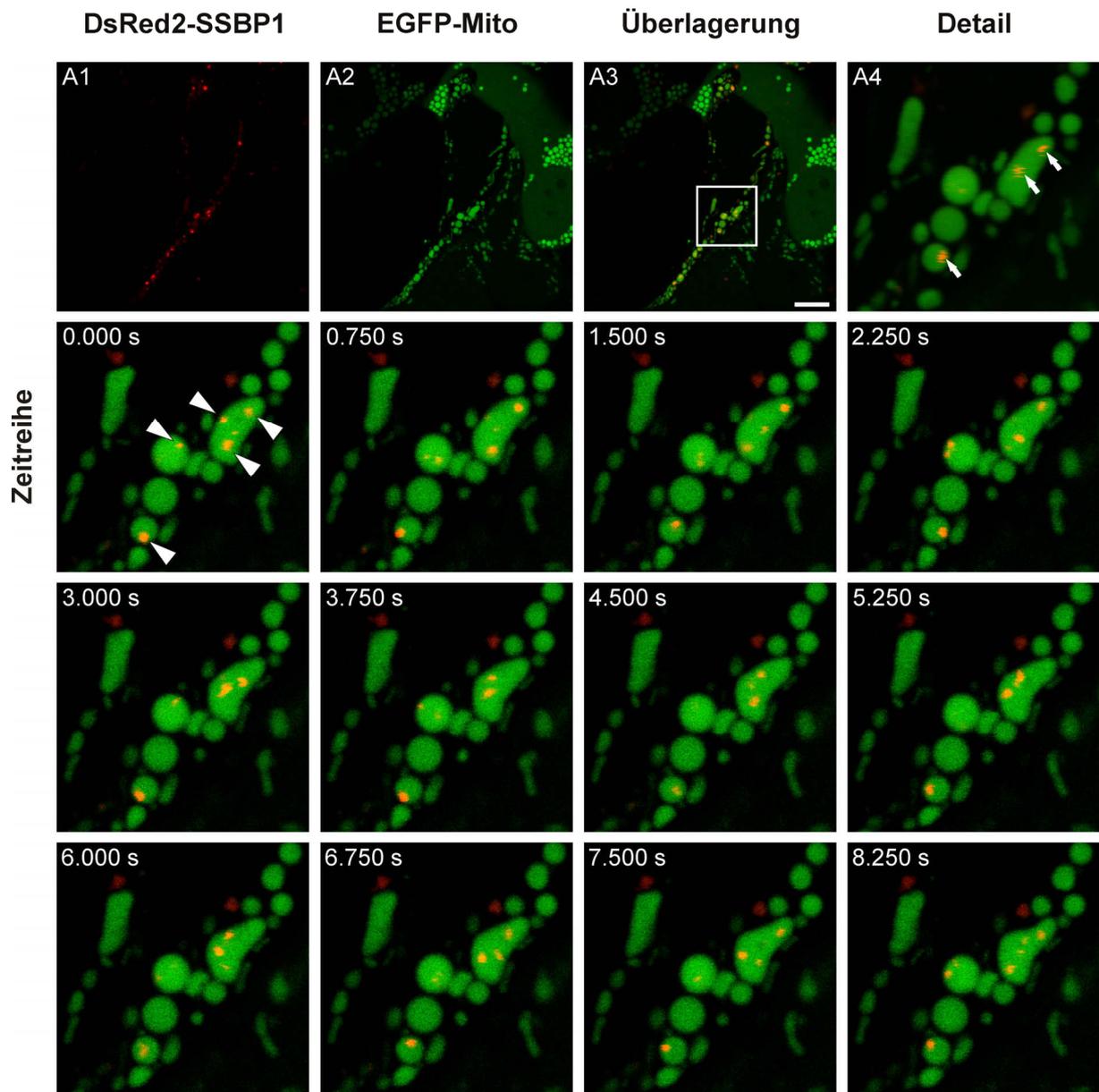
Nachdem sich für TFAM und SSBP1 bei der Kolokalisierung mit PicoGreen Unterschiede ergaben, sollte nun für SSBP1 die Distribution innerhalb der Mitochondrien von  $\rho^0$ -Zellen aufgeklärt werden. Hierzu wurde die Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup>K7gm mit pDsRed2-SSBP1 transfiziert und mikroskopisch analysiert. In Abb. 5-54 ist die Färbung dargestellt und man erkennt, dass DsRed2-SSBP1 in  $\rho^0$ -Zellen ohne mtDNA punktförmig innerhalb des mitochondrialen Netzwerks vorliegt. Im Vergleich zu den anderen Aufnahmen in Zellen mit mtDNA scheint die Anzahl der SSBP1-markierten Strukturen geringer zu sein.



**Abb. 5-54:** Konfokalaufnahmen der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7gm, transfiziert mit pDsRed2-SSBP1. Messbalken: 10  $\mu$ m.

Nach diesen Erkenntnissen in  $\rho^0$ -Zellen stellte sich natürlich die Frage, wie die Verteilung von SSBP1 in diesen Zellen nach der endogenen Bildung von Megamitochondrien sein würde. Hierzu wurden 143B.TK<sup>-</sup> K7gm mit pDsRed2-SSBP1 transfiziert und 66 h nach dem Aussäen analysiert. In Abb. 5-55 ist zu erkennen, dass die DsRed2-SSBP1-gefärbten Strukturen punktuell verteilt waren und, dass sich diese in den Megamitochondrien bewegten, was bei der Aufnahme zu einem Schlierenmuster führte (Abb. 5-55, A4, mit Pfeilen gekennzeichnet). Die Bewegung der SSBP1-markierten Formen (Pfeilköpfe) wurde mit einer Zeitreihe festgehalten und ist in Abb. 5-55 zu sehen. In den Aufnahmen erkennt man deutlich die Bewegung der rotgefärbten SSBP1-Strukturen innerhalb der Megamitochondrien, welche sich so schnell bewegen, dass sie zwischen zwei Aufnahmen zu springen scheinen und ein Schlierenmuster erzeugten.

Zusammenfassend ergibt sich für DsRed2-SSBP1-gefärbten Formen ebenfalls eine punktförmige Verteilung im mitochondrialen Netzwerk, unabhängig davon, ob in den Zellen Megamitochondrien induziert wurden oder davon, ob die Zellen über mtDNA verfügen.



**Abb. 5-55:** Konfokalaufnahmen der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7gm, transfiziert mit mit pDsRed2-SSBP1, 66 h nach Aussäen. Eichstrich: 10  $\mu\text{m}$ .

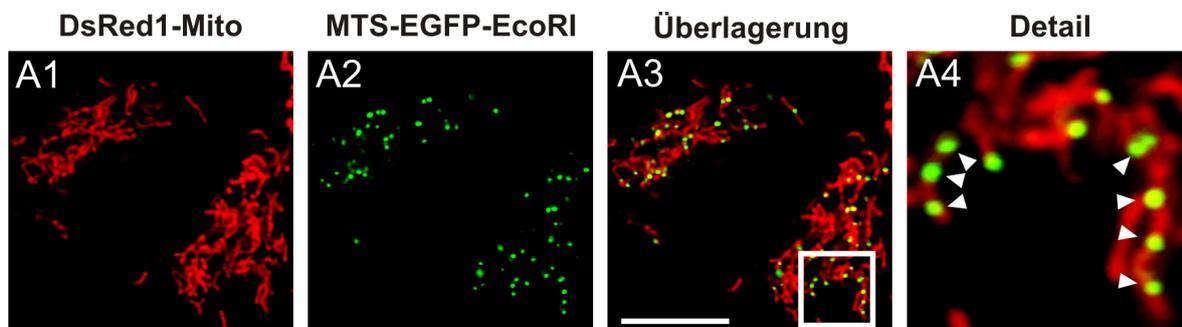
## 5.9.4 Visualisierung einer mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease

Für die Herstellung von  $\rho^0$ -Zelllinien wurde der Vektor pMEE-con verwendet (Kneissl, Diplomarbeit 2004). Dieses Vektorkonstrukt exprimiert nach Transfektion in eukaryontische Zellen konstitutiv als funktionelle Einheit die Restriktionsendonuklease *EcoRI*, für welche die humane mtDNA 3 – 5 Schnittstellen aufweist. Dieses Enzym ist Teil eines Fusionsproteins, das N-terminal aus einem 29 Aminosäuren langen mitochondrialen Signalpeptid (MTS) besteht, das sich von der humanen Cytochrom c-Oxidase-Untereinheit 8 (COX VIII) ableitet. Daran schließt sich zur Visualisierung die Sequenz des 240 Aminosäuren langen grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) an, das am C-Terminus mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* verbunden ist.

### 5.9.4.1 Lokalisierung der mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease *EcoRI* in $\rho^+$ -Zellen

Für Untersuchungen, ob das Konstrukt aus der mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease *EcoRI* und EGFP in den Mitochondrien lokalisiert, wurde das Plasmid pMEE-con in die Zelllinie 143B.DsRed1-Mito (143B.TK<sup>-</sup>, welche stabil DsRed1-Mito exprimieren) transfiziert und anschließend konfokalmikroskopisch untersucht.

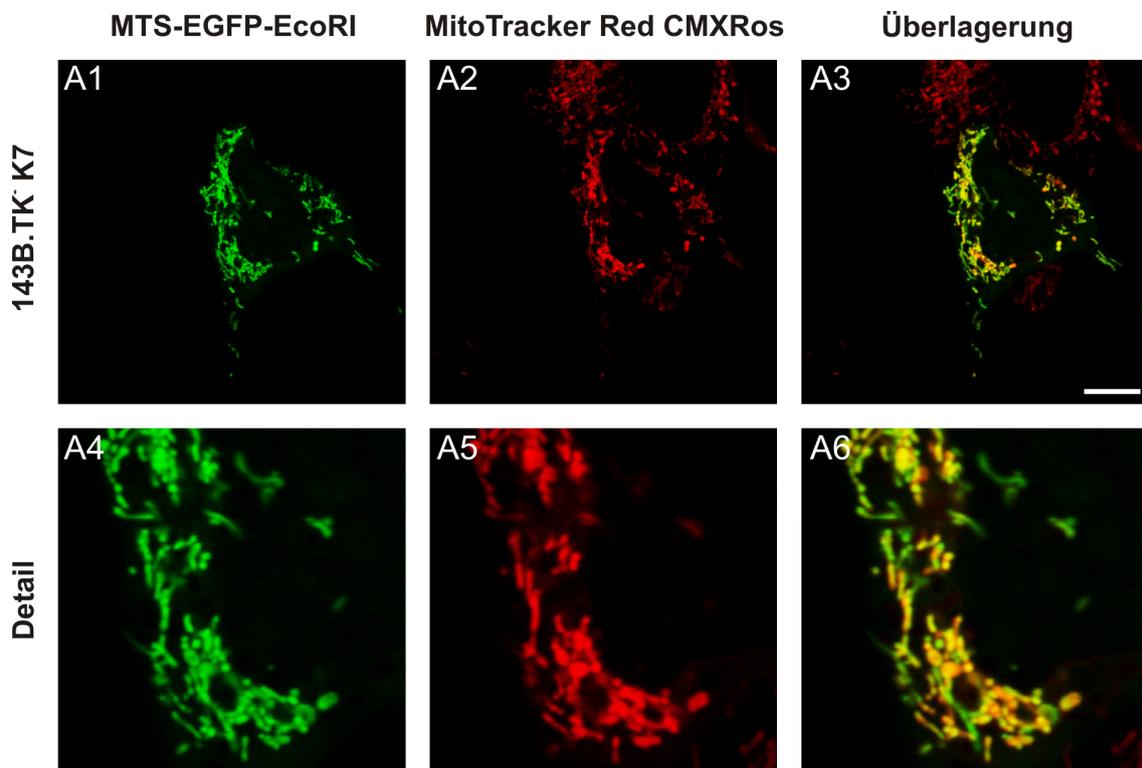
In Abb. 5-56 erkennt man deutlich eine punktförmige Verteilung der Fluoreszenz des DNA-bindenden Fusionsproteins MTS-EGFP-*EcoRI* im mitochondrialen Netzwerk der 143B.TK<sup>-</sup>- $\rho^+$ -Zellen, was durch Pfeilköpfe markiert ist (Abb. 5-56, A4).



**Abb. 5-56:** Konfokalaufnahmen der Zelllinie 143B.DsRed1-Mito, transfiziert mit pMEE-con. Messbalken: 10  $\mu$ m.

### 5.9.4.2 Lokalisierung der mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease *EcoRI* in $\rho^0$ -Zellen

Nach den Untersuchungen in  $\rho^+$ -Zellen, welche über DNA verfügen, wurde die Lokalisierung des DNA-bindenden Fusionsproteins MTS-EGFP-*EcoRI* in  $\rho^0$ -Zellen visualisiert. Hierzu wurde die  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7 verwendet und das Plasmid pMEE-con transient transfiziert. Die Abb. 5-57 zeigt die Verteilung des EGFP-markierten Restriktionsenzym im gesamten mitochondrialen Netzwerk kolokalisierend mit einer MitoTracker Red CMXRos-Färbung. Bei der Transfektion in  $\rho^0$ -Zellen war im Gegensatz zu  $\rho^+$ -Zellen, keine punktuelle Verteilung des Konstruktes bestehend aus MTS-EGFP-*EcoRI* beobachtbar.



**Abb. 5-57:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der  $\rho^0$ -Zelllinie 143B.TK<sup>-</sup> K7, transfiziert mit mit pMEE-con und gefärbt mit MitoTracker Red CMXRos. Eichstrich: 10  $\mu$ m.

Zusammenfassend ergibt sich für das Fusionsprotein bestehend aus mitochondrialem Signalpeptid (MTS), grün fluoreszierendem Protein (EGFP) und Restriktionsendonuklease *EcoRI* in Zellen, welche über DNA verfügen ( $\rho^+$ -Zellen) eine punktförmige Verteilung und in mtDNA-freien Zellen ( $\rho^0$ -Zellen) eine Distribution über das gesamte mitochondriale Netzwerk.

## 6 Diskussion

### 6.1 Detektion mitochondrialer Fusion mithilfe von photoaktivierbarem GFP

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es einerseits Erkenntnisse über Fusions- und Fissionsvorgänge von Mitochondrien zu erlangen, andererseits Einblicke in das Verhalten der mitochondrialen Nucleoids. Beide Untersuchungen sollten jeweils in lebenden Zellen stattfinden.

Hierzu sollte zunächst überprüft werden, wie sich das mitochondriale Matrixkompartiment nach Fusionsereignissen zweier Mitochondrien verhält. Für diesen Ansatz wurde das photoaktivierbare grünfluoreszierende Protein (PA-GFP) verwendet, welches erst nach Aktivierung mit Licht der Wellenlänge von etwa 400 nm Fluoreszenz emittiert. In den beschriebenen Versuchen wurde ein IRES-Vektor mit einer internen Ribosomeneintrittsstelle eingesetzt, der einerseits PA-GFP mit MTS (mitochondrialer Signalsequenz), andererseits DsRedM mit MTS codierte. Dies stellte sicher, dass alle Zellen, die über ein rotes Fluoreszenzsignal verfügten, auch grün photoaktivierbar waren, ohne auf Co-Transfektionen angewiesen zu sein, die oftmals eine schlechte Effizienz besitzen.

Nach der Photoaktivierung einer ROI (*region of interest*) kam es sehr schnell nach einem Fusionsereignis zur Verteilung des PA-GFP innerhalb des fusionierten Mitochondriums. Dies führt zu einem Intensitätsverlust der GFP-Fluoreszenz, da es in der gesamten Matrix des neuen Organells verdünnt wird. Somit konnte nachgewiesen werden, dass es nach der Fusion von Mitochondrien in HeLa-Zellen zu einem schnellen Austausch der Matrixkomponenten kommt. Dies weist darauf hin, dass bei diesem Vorgang sowohl die äußere, als auch die innere Mitochondrienmembran der verschmelzenden Organellen fusionieren.

### 6.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Rückbildung von Megamitochondrien in $\rho^0$ -Zellen

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Analyse von Megamitochondrien. Diese können in  $\rho^0$ -Zellen endogen entstehen, infolge einer Ansäuerung des Kulturmediums dieser Zellen mit der Kultivierungszeit aufgrund hoher Glykolyse-Aktivität. Die Azidifizierung mit Milchsäure führt zur Bildung von endogenen Megamitochondrien, die jedoch nicht

apoptotisch sind, sondern sich wieder zu einem mitochondrialen Netzwerk zurückbilden lassen (Kukat *et al.*, *submitted*; Kukat, Dissertation 2007).

Diese Rückbildung wurde anhand einer Zeitreihe ultrastrukturell untersucht. Hierzu wurde das saure Medium von Zellen, welche über Megamitochondrien verfügten gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht und zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen für die elektronenmikroskopische Analyse fixiert.

Hierbei zeigte sich zum Zeitpunkt 0 min das Bild von mehreren großen runden Mitochondrien umgeben von einer Doppelmembran, deren Matrix sehr elektronenarm erschien und manchmal über eine Ringstruktur aus vermutlich innerer Membran verfügte. Diese innere Ringstruktur konnte in  $\rho^0$ -Zellen mit Farbstoffen für die innere Mitochondrienmembran gefärbt werden, nicht jedoch mit Färbungen für die äußere Membran (Kukat, Dissertation 2007).

Die Rückbildung der Riesenorganellen in ein Netzwerk durch Tubulierung und Fissionsereignisse geht mit einer schnellen Dehydrierung der Mitochondrien einher. Bereits 15 min nach Austausch des Mediums erkennt man kleinere Organellen, die wie typische Mitochondrien in  $\rho^0$ -Zellen erscheinen und zwiebelringartige Strukturen im Inneren aufweisen. Hieran anschließend erfolgt die Rückbildung vermutlich über das Ziel hinaus schießend und führt zu einem weiteren Wasserefflux nachdem die Mitochondrien in der 30 min-Aufnahme sehr elektronendicht wirken und über eng gepackte Cristae verfügen. Ähnliche Morphologien konnten in Experimenten beobachtet werden, bei denen isolierte Rattenmitochondrien in hypotonische Lösungen gegeben wurden (Teranishi *et al.*, 1999). In den  $\rho^0$ -Zellen wurde die Wasserhomöostase durch ein erneutes Schwellen jedoch wiederhergestellt, was zu einer stabilen  $\rho^0$ -Mitochondrienmorphologie führte, mit elektronenleerer Matrix und deformierten Cristae.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die Rückbildung der Megamitochondrien ein sehr schneller Prozess ist, was den Rückschluss zulässt, dass die für die Rückbildungsprozesse benötigten Proteine bereits exprimiert waren, jedoch inaktiviert sind. Dies könnte durch den niedrigen pH des Kulturmediums erklärt werden und mögliche Kandidaten hierfür wären die mitochondrialen Fissionsproteine hFis1 und Drp1/DNM1L.

### 6.3 Exogene Induktion von Megamitochondrien

Mitochondrien, welche deutlich größer sind als normale Mitochondrien werden Riesen-, Mega- oder Gigamitochondrien genannt. Für ihre Bildung sind Fusionsereignisse bzw. verminderte Spalttereignisse nötig und es handelt sich nicht nur um ein Schwellen der Organellen.

Megamitochondrien können experimentell erzeugt werden, indem Zellen oder Organismen mit Chemikalien behandelt werden. Hierzu zählen Hydrazin oder  $H_2O_2$  (Karbowski *et al.*, 1997, Karbowski *et al.*, 1999), Cuprizin (Suzuki, 1969; Tandler und Hoppel, 1973), Chloramphenicol (Teranishi *et al.*, 1999; Karbowski *et al.*, 1999, Matsushashi *et al.*, 1996), und Ethidiumbromid (McGill, 1980).

Jedoch treten Megamitochondrien ebenso physiologisch auf, beispielsweise in Spermien von *Drosophila melanogaster* (Hales und Fuller, 1997), in poikilothermen Organismen während des Winterschlafs (Grodums, 1977), in Maus-Lymphozyten (Rancourt *et al.*, 1975) oder in Leberzellen (Wills, 1965; Tauchi und Sato, 1968; Wilson und Franks, 1975).

In humanen Erkrankungen kommt es zudem oft zur Bildung von Megamitochondrien, z. B. in der Leber, Niere, Knochenmark, Cerebellum, Herz oder Skelettmuskel (Review: Wakabayashi, 2002).

In den  $\rho^0$ -Zelllinien 143B.TK<sup>-</sup>  $\rho^0$  (generiert durch die Behandlung mit Ethidiumbromid) und 143B.TK<sup>-</sup> K7 (hergestellt durch die Behandlung mit einer mitochondrial zielgesteuerten Restriktionsendonuklease, Kukat *et al.*, 2008) bilden sich Megamitochondrien im Laufe der Kultivierungszeit durch Azidifizierung des Mediums mit Milchsäure (Kukat *et al.*, *submitted*). In den  $\rho^+$ -Zelllinien 143B.TK<sup>-</sup> und HeLa, welche über mtDNA verfügen, war es ebenso möglich Megamitochondrien durch exogenes Ansäuern des Kultivierungsmediums mit Milchsäure zu induzieren (Kukat *et al.*, *submitted*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Generierung von Riesenorganellen in den  $\rho^+$ -Zelllinien 143B.TK<sup>-</sup>, 3T3, HFF HEp-2, HT1080C und HeLa erfolgreich durchgeführt. Die Megamitochondrieninduktion war in allen untersuchten Zelllinien revidierbar, was den Schluss zulässt, dass die Megamitochondrienbildung durch Milchsäure keine apoptotischen Vorgänge induziert.

## 6.4 Analyse der Bildung und Rückbildung von Megamitochondrien

Nachfolgend wurden die Megamitochondrien in HeLa-Zellen näher untersucht, wobei zuerst die Größenzunahme der Riesenorganellen in HeLa-Zellen in einer Zeitreihe konfokalmikroskopisch dokumentiert wurde. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Bildung der Megamitochondrien ein schneller Prozess ist, denn bereits nach 30 min waren größere runde Organellen sichtbar, die sich im Laufe der Kultivierungszeit weiter im Durchmesser vergrößerten und in der Anzahl verringerten, was auf Fusionsereignisse zurückzuführen ist. Auch hier bildeten sich große, runde, prallgefüllte Mitochondrien, wie sie schon in  $\rho^0$ -Zellen beobachtet wurden (Kukat *et al.*, *submitted*).

Bei der elektronenmikroskopischen Analyse zeigten sich die Megamitochondrien als elektronenleere Organellen, die nur noch über eine äußere Doppelmembran verfügten, wobei keine Cristae mehr im Inneren sichtbar waren. Im Laufe der Kultivierungszeit scheinen die Cristaestrukturen an den Rand der Organellen zu wandern, was in früheren Studien mit Fluoreszenzmarkierungen in lebenden Zellen schon beobachtet wurde (Kukat *et al.*, *submitted*).

Megamitochondrien mit elektronenarmer Matrix wurden ebenso in Fibroblasten von Patienten mit Barth-Syndrom beschrieben (Acehan *et al.*, 2007). Das Barth-Syndrom ist eine mitochondriale Krankheit, welche durch Mutationen im Tafazzin-Gen verursacht wird (Bione *et al.*, 1996). Diese Riesenorganellen verfügten jedoch noch über mehrere Cristaestrukturen und waren oftmals in Invaginationen des Zellkerns zu beobachten, im Gegensatz zu den Milchsäure-induzierten Megamitochondrien.

Im Vergleich zu den  $\rho^0$ -Zellen waren bei den Megamitochondrien in den  $\rho^+$ -Zellen mit mitochondrialer DNA keine zwiebelringartigen Strukturen ersichtlich. Außerdem gab es hier auch keine Ringstrukturen, die aus einer Doppelmembran bestehen, wie sie in den Riesenorganellen von  $\rho^0$ -Zellen häufiger zu beobachten waren.

Die Rückbildung der Megamitochondrien zu einem mitochondrialen Netzwerk kann durch Austauschen des sauren Mediums durch frisches Kultivierungsmedium erreicht werden. Diese Vorgänge wurden zunächst für  $\rho^0$ -Zellen beschrieben (Kukat *et al.*, *submitted*) und in  $\rho^+$ -Zellen im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Konfokalmikroskopisch konnte eine sehr schnelle Umstrukturierung der Mitochondrien in den Zellen beobachtet werden, denn bereits 15 min nach dem Mediumwechsel waren keinerlei vergrößerten, runden Organellen mehr zu sehen. Es kam zu weiteren Morphologieveränderungen bis nach etwa 3 h das ursprüngliche Mitochondriennetzwerk wieder hergestellt war. Die Art der Umstrukturierungen, welche auf dem Weg von den Megamitochondrien zum Netzwerk auftraten, wurde durch die elektronenmikroskopische Analyse der Rückbildung deutlich. Schon nach 15 min war die Mitochondrienmorphologie komplett unterschiedlich zu den anfänglichen elektronenarmen Megamitochondrien, wobei drei verschiedene Mitochondrienstrukturen identifiziert werden konnten: einerseits langgestreckte, sehr kontrastreiche Organellen, deren innere Mitochondrienmembran vesikuliert ist. Diese Mitochondrienform ist nur noch von der äußeren Mitochondrienmembran umgeben, an der die innere nicht mehr eng anliegt. Solch vesikulierte Mitochondrien wurden von Frey und Kollegen ebenso in HeLa-Zellen beobachtet, wobei diese jedoch mit Etopsid behandelt wurden, um Apoptose zu induzieren (Sun *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den hier beobachteten Organellen, sind die von Sun *et al.* beschriebenen Mitochondrien jedoch sehr elektronenarm. Andererseits traten Mitochondrien auf, die in der Elektronendichte den normalen Organellen ähneln, wobei noch keine deutlichen Cristae zu erkennen sind. Zum dritten waren elektronenarme Megamitochondrien erkennbar, deren Durchmesser jedoch im Vergleich zum Zeitpunkt 0 min abgenommen hat.

Im Vergleich zu der Rückbildung in  $\rho^0$ -Megamitochondrien scheinen die Riesenorganellen, welche noch mitochondriale DNA besitzen nicht erst über das Ziel hinauszuschießen. Ebenso fehlen die dicht gepackten Mitochondrienstrukturen, wie sie bei den  $\rho^0$ -Zellen nach 30 bis 60 min beobachtbar waren.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden Megamitochondrien durch die Zugabe von Milchsäure zum Kulturmedium induziert, wodurch die exogene Laktatkonzentration deutlich erhöht wurde. Die Carbonsäuren Laktat und Pyruvat werden über Lipidmembranen hinweg durch eine Proteinfamilie von Monocarboxylattransportern (MCT, *monocarboxylate transport proteins*) ausgetauscht (Garcia *et al.*, 1994). MCT1 wird in verschiedenen Geweben exprimiert (Halestrap und Price, 1999) und ist in den Plasma- und Mitochondrienmembranen von Muskeln und anderen Zellen lokalisiert (Brooks *et al.*, 1999; Pierre *et al.*, 2000; McClelland *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2006). Neben der Rolle eines oxidierbaren Substrats und einer Glukoneogenese-Vorstufe wird Laktat möglicherweise auch eine Rolle als Signalmolekül oder Pseudohormon „Laktormon“ (Brooks, 2002) zur Aktivierung von Genen

als Antwort auf physische Aktivität zugesprochen. So wurden L6-Zellen aus Rattenmuskeln mit erhöhten Laktatkonzentrationen versetzt, was zur Folge hatte, dass die ROS-Produktion anstieg und sowohl die mitochondriale Masse als auch die Menge des Laktatoxidationskomplexes innerhalb einer Stunde hochreguliert wurde (Hashimoto *et al.*, 2007, Hashimoto und Brooks, 2008). Die Bildung von Megamitochondrien wurde in diesen Studien jedoch nicht beschrieben. Zudem bleibt die Frage offen, ob bei den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Riesenorganellen eine erhöhte Genexpression die Ursache sein kann, da die Größenzunahme sehr schnell vonstatten geht und schon 30 min nach La-Mediumzugabe deutlich vergrößerte Mitochondrien zu beobachten waren.

Eine erhöhte Laktatproduktion und Laktatazidosen wurde auch in vielen humanen Erkrankungen beobachtet, die mit Mitochondrien assoziiert sind, so z.B. in MELAS (*mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes*; Pavlakis *et al.*, 1984), GRACILE (*growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, iron overload, lactacidosis, and early death*; Fellman *et al.*, 1998, Visapää *et al.*, 2002) oder bei Defizienzen in den Untereinheiten COXI, COXIII oder COXIV.

## 6.5 Induktion von Megamitochondrien mit Valinomycin

Um weiter Aufschluss über den Mechanismus der Entstehung von Megamitochondrien zu erlangen wurden die durch Milchsäure induzierten Riesenorganellen mit solchen verglichen, die mit Valinomycin generiert werden konnten. Das ionophore Zyklodepsipeptid, welches von *Streptomyces fulvissimus* produziert wird, zählt zur Klasse der neutralen Transporter von Ionophor-Antibiotika. Durch Valinomycin werden einwertige Ionen ( $Rb^+ > K^+ \gg NH_4^+ > Na^+ > Li^+$ ) durch Membranen transportiert, zweiwertige Ionen hingegen nur sehr schwach komplexiert. Die schwellende Wirkung dieser Chemikalie auf Mitochondrien wurde schon früh experimentell nachgewiesen (Pressman, 1965; Azzi und Azzone, 1965).

In den vorliegenden Ergebnissen führt die Inkubation von HeLa-Zellen mit Valinomycin ebenso zur Generierung von Megamitochondrien, die sich morphologisch jedoch deutlich von den Milchsäure-induzierten unterscheiden. Im Gegensatz zu den runden und prall gefüllt wirkenden Riesenorganellen nach La-Medium-Gabe standen die Valinomycin-induzierten unter weniger Spannung und waren nicht komplett kugelförmig.

Dass es bei der Bildung von Megamitochondrien durch Valinomycin zur unvollständigen Fusion der inneren Membran kommt, wurde von Malka *et al.* 2005 in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt (Malka *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Phänomen zusätzlich zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Phasenkontrast und durch die Fluoreszenzfärbung der inneren Mitochondrienmembran bestätigt werden.

### **6.6 Einfluss von Inhibitoren auf die Bildung von La-Medium-induzierten Megamitochondrien**

Dieser Versuchsteil war darauf ausgelegt nähere Einblicke darin zu bekommen, welchen Einfluss das Membranpotential, die Ionenverteilung und die Funktion der oxidativen Phosphorylierung auf die Entstehung und Rückbildung der Megamitochondrien haben.

Hierzu wurden 143B.EGFP-Mito-Zellen während der Bildung der Megamitochondrien durch La-Medium zusätzlich mit verschiedenen Inhibitoren der Elektronentransportkette versetzt: CCCP, Nigericin, Oligomycin sowie Valinomycin.

Nach der Inkubation mit CCCP oder Nigericin kam es sowohl in den Kontrollzellen, als auch nach Zugabe von Milchsäure-Medium zur Fragmentierung der Mitochondrien bzw. zu keiner Induktion von Megamitochondrien.

Zum Verständnis der mitochondrialen Fusion wurde 2005 von Malka *et al.* ein wichtiger Beitrag geleistet, indem gezeigt wurde, dass CCCP nur die Fusion der inneren Membran in 143B-Zellen hemmt. Nach der Fusion der äußeren Mitochondrienmembran führen Fissionsprozesse an denen das Fissionsprotein Drp1/DNM1L beteiligt ist zu einzeln vorliegenden Mitochondrien (Ishihara *et al.*, 2003). In Hefestudien konnte *in vitro* demonstriert werden, dass Nigericin die Fusion der äußeren Membran der Mitochondrien inhibiert und als Konsequenz ebenfalls die Fusion der inneren Organellenmembran verhindert (Meeusen *et al.*, 2004). Der selektiv elektroneutrale  $K^+/H^+$ -Austauscher Nigericin führt zum Verlust des Protonengradienten, nicht jedoch des elektrischen Gradienten (Meeusen *et al.*, 2004). Demnach indizieren die vorgestellten Ergebnisse nach der Inkubation der 143B.EGFP-Mito-Zellen mit diesen Inhibitoren eine Hemmung sowohl der Fusion als auch des Schwellens der Megamitochondrien, was zur Verhinderung der Riesenorganellenbildung führt.

Oligomycin führte nur zum Teil zu einer mitochondrialen Fragmentierung, es ließen sich jedoch mit La-Medium Riesenorganellen generieren. Dieses Antibiotikum maximiert das mitochondriale Membranpotential durch die Inhibierung der ATPase in den Organellen, indem es den Protonenkanal hemmt. Auf die Bildung der Megamitochondrien scheint dies jedoch keinen Einfluss zu haben. Obwohl es bei der Präinkubation zur partiellen Fragmentierung kommt, scheint die Zugabe von La-Medium das Gleichgewicht in Richtung Fusion zu verschieben.

Bei der Inkubation von Mitochondrien nach La-Medium-Gabe mit Valinomycin kam es zur Ausbildung von Megamitochondrien, deren innere Membranen vollständig fusioniert waren, im Gegensatz zur alleinigen Valinomycin-Applizierung.

Valinomycin katalysiert den elektrischen Transport von  $K^+$  über die mitochondrialen Membranen und führt zur unvollständigen Fusion innerer Membranen (Malka *et al.*, 2005). Die Fusion der äußeren Membran wird nicht verhindert, was mit den hier präsentierten Ergebnissen kongruent ist. Dieser Inhibitor konnte auch die exogene Bildung von Megamitochondrien in  $\rho^0$ -Zellen nicht hemmen (Kukat *et al.*, *submitted*) und erhält den Protonengradienten in respirierenden Zellen, nicht jedoch den elektrischen Gradienten aufrecht (Meeusen *et al.*, 2004).

## 6.7 Endogene Lokalisation mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine mittels Immunzytochemie

Die endogene Verteilung mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine sollte weitere Aufklärung zum Mechanismus der Megamitochondrieninduktion liefern. Hierzu wurden immunzytochemische Analysen mit Antikörpern durchgeführt, die einerseits gegen das Fusionsprotein Mitofusin 2 (MFN2), andererseits gegen die Fissionsproteine hFis1 und Drp1/DNM1L gerichtet waren.

Bei Mitofusin 2 wurde eine punktuelle Verteilung an den Mitochondrien sowohl bei den Kontrollzellen als auch nach der Generierung von Megamitochondrien durch La-Medium beobachtet. Dies ist übereinstimmend mit Literaturberichten, in denen beschrieben wurde, dass Mitofusin 2 an der äußeren Membran der Mitochondrien eine Verteilung in Subdomänen zeigt, welche durch den Nukleotidbindungsstatus von MFN2 reguliert wird (Neuspiel *et al.*, 2005). MFN2 vermittelt dabei intermitochondriales Andocken durch Interaktionen der *coiled-*

*coil*-Domänen (Rojo *et al.*, 2002). Jedoch existieren auch Berichte, die die Annahme favorisieren, dass Mitofusin 2 eher als signalgebende GTPase agiert (Neuspiel *et al.*, 2005), da der Beitrag zur Effektivität der trans-mitochondrialen Bindung geringer ist als MFN1 (Yaffe, 1999; Ishihara *et al.*, 2004) und es eine höhere Affinität für GTP, jedoch eine geringere GTP-Hydrolyserate als Mitofusin 1 besitzt (Ishihara *et al.*, 2004).

Für die endogene Lokalisierung von hFis1 wurden die Zellen neben der unbehandelten Kontrolle und nach Induktion mit La-Medium auch mit dem fissionsinduzierenden Reagenz CCCP bzw. dem fusionsfavorisierenden Transporter Valinomycin versetzt. Zudem erfolgte eine Behandlung mit Oligomycin.

Bei der Kontrolle und nach der Zugabe von La-Medium bzw. Valinomycin war eine zum Teil punktförmige Verteilung von hFis1 an den Mitochondrien erkennbar. Um die Megamitochondrien, die sich nach La-Medium- bzw. Valinomycin-Zugabe bildeten, lag hFis1 um die Organellen der mit DsRed1-Mito gefärbten Zellen vor, wobei sich in der Membran auch Aggregate mit stärkerer Fluoreszenzintensität bildeten.

Nach der Behandlung mit CCCP war hFis1 homogen um die fragmentierten Mitochondrien verteilt und ebenso nach der Zugabe von Oligomycin, die jedoch nur zu einer teilweisen Fragmentierung führte.

Die hier dargestellten Kontrollzellen bzw. die CCCP- oder oligomycinbehandelten Zellen zeigten für die endogene Distribution von hFis1 eine Kolo-kalisierung mit den Mitochondrien wie in früheren Studien an HeLa-Zellen beschrieben wurde (James *et al.*, 2003). Nach der Induktion von Megamitochondrien erkennt man, dass hFis1 – wahrscheinlich über seine Transmembrandomäne – an der Außenseite der Mitochondrien lokalisiert ist. Eine weitere Rolle neben der Spaltung von Mitochondrien spielt hFis1 in der Peroxisomenspaltung, wobei jedoch die größere Fraktion des Proteins an den Mitochondrien lokalisiert ist (Koch *et al.*, 2005).

Für die Detektion der endogenen Distribution von Drp1/DNM1L wurden die Zellen den gleichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt wie bei den Untersuchungen zu hFis1.

Hierbei wurde deutlich, dass Drp1/DNM1L in allen Zellen sowohl in punktuellen Aggregaten an den Mitochondrien als auch im Zytoplasma verteilt war.

Studien in Hefe- und Säugerzellen deuten darauf hin, dass Drp1/DNM1L bzw. Dnm1p (das Homolog in Hefe) eine Rolle bei der mitochondrialen Fission spielen (Otsuga *et al.*, 1998; Pitts *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999; Smirnova *et al.*, 2001, Smirnova *et al.*, 1998).

Die punktförmigen Fluoreszenzsignale von Drp1/DNM1L an den beobachteten Organellen, sind wahrscheinlich Konstriktionsstellen, an denen Fissionsereignisse stattfinden können.

Dies ist kongruent mit den Befunden anderer Forschergruppen (Frank *et al.*, 2001; Labrousse *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 2001), wobei die Spaltung wahrscheinlich über transiente Interaktionen mit hFis1 bewerkstelligt wird (Yoon *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005).

Die punktuellen Aggregate kolokalisieren oftmals mit der EGFP-OMP25Fr-Färbung, welche die äußere Membran repräsentiert. Bei den Kontrollzellen und bei fissionsfavorisierenden Bedingungen (CCCP und Oligomycin) liegen mehr Drp1/DNM1L-Aggregate an den Mitochondrien vor, als bei Konditionen, die das Gleichgewicht in Richtung Fusion verschieben (La-Medium, Valinomycin). Bei allen untersuchten Zellen war eine Verteilung von Drp1/DNM1L im Zytoplasma zu beobachten. Dies deutet auf einen großen Vorrat von Drp1/DNM1L-Proteinen hin, welche durch posttranslationale Veränderungen an die Organellen rekrutiert werden können (Santel und Frank, 2008). Es ist bekannt, dass die Mehrheit des endogenen dynaminverwandten Fissionsproteins DNM1L/Drp1 eine zytoplasmatische Verteilung aufweist, wobei jedoch kleine Subpopulationen mit Mitochondrien oder anderen Zellorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum, den Peroxysomen oder den Mikrotubuli assoziiert sind (Shin *et al.*, 1997; Imoto *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 1998; Pitts *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2003; Li und Gould, 2003).

## 6.8 Überexpression und Lokalisierung mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine

Im Gegensatz zur Immunzytochemie eröffnet das Modellsystem der Megamitochondrienbildung ein Studium mitochondrialer Fusions- und Fissionsproteine in lebenden Zellen. Hierzu wurden diese Proteine als Fusionsproteine mit Fluoreszenzfarbstoffen exprimiert, was zusätzlich Untersuchungen zum Einfluss der Überexpression von Fusions-/Fissionsproteinen auf die Megamitochondrienbildung möglich machte.

### *Mitofusine*

Zunächst wurden die Fusionsproteine Mitofusin 1 (MFN1) und Mitofusin 2 (MFN2) für Analysen herangezogen. Dabei zeigte EGFP-MFN1 in Kontrollzellen eine gleichmäßige Verteilung um die Mitochondrien, die eine Lokalisierung in der äußeren Membran bestätigt. Zusätzlich kam es zur Aggregation, v.a. zwischen benachbarten Organellen – was auf eine bevorstehende Fusionsreaktion hindeuten könnte. Durch Dekonvolutionsalgorithmen konnte diese Lokalisierung verdeutlicht werden. Weiterhin wurden traubenförmige Strukturen mit leicht vergrößerten Mitochondrien beobachtet, die von Fuller und Mitarbeitern nach der Überexpression von MFN1 beschrieben wurden (Santel *et al.*, 2003). Bei den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit trat diese Zusammenlagerung erst 48 h nach der Transfektion auf oder bei besonders starker Expression von EGFP-MFN1, was mit den Resultaten von Rojo und Kollegen übereinstimmt, die 2002 beschrieben, dass es zu einer Aggregation der Mitochondrien kommt, wenn es zu hohen Expressionsleveln von Mitofusin 1 mit Myc-Markierung kommt (Legros *et al.*, 2002).

Nachdem die Zellen mit La-Medium oder Valinomycin behandelt wurden, traten trotz der Überexpression von EGFP-MFN1 Megamitochondrien auf und Mitofusin 1 war außen um die Riesenorganellen lokalisiert. Zwischen benachbarten Organellen trat auch hier eine punktförmige Aggregation auf, und manchmal war nur diese punktuelle Zusammenlagerung von EGFP-MFN1 zu sehen und kaum noch Strukturen um die Mitochondrien. Nach Valinomycin-Gabe blieb auch die unvollständige Fusion innerer Membran bei der Überexpression von MFN1 erhalten, was durch mehrere Matrixkompartimente deutlich wurde, die von einer – mit EGFP-MFN1 grüngefärbten – äußeren Membran umgeben waren.

Die Überexpression von Mitofusin 2 zeigte im Gegensatz zu der von Mitofusin 1 eine punktförmige Lokalisierung am mitochondrialen Netzwerk in den Kontrollzellen. Dies ist kongruent mit den vorliegenden Ergebnissen, die mittels Immunzytochemie erlangt wurden und konnte schon in früheren Studien gezeigt werden (Karbowski *et al.*, 2002; Neuspiel *et al.*, 2005). Zudem konnte die massive Aggregation der Mitochondrien nach EGFP-MFN2-Expression beobachtet werden. Diese Zusammenlagerungen wurden mehrfach beschrieben, wobei die perinukleären Ansammlungen der Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Untersuchungen einen vergrößerten Durchmesser mit angeschwollenen Cristae aufwiesen (Santel und Fuller, 2001; Rojo *et al.*, 2002; Eura *et al.*, 2003). Die Doppelmembranen von benachbarten Organellen waren in direktem Kontakt ohne jedoch zu fusionieren (Rojo *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass Domänen nahe dem C-Terminus von MFN2 für die Aggregation

essentiell sind (Santel und Fuller, 2001). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde berichtet, dass die zusammengelagerten Mitochondrien über ein vermindertes Membranpotential verfügen, jedoch noch mtDNA besitzen, was durch PicoGreen-Färbung bestätigt wurde (Huang *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit blieb die punktuelle Distribution von MFN2 an den Mitochondrien erhalten, nachdem mit La-Medium oder Valinomycin Megamitochondrien induziert wurde. EGFP-MFN2 war vor allem an Kontaktstellen zwischen benachbarten Riesenorganellen zu beobachten, wobei es mit MitoTracker Red CMXRos zu einer Kolokalisierung kam, nicht jedoch bei der Gegenfärbung mit dem Matrixprotein DsRedM-Mito. Dies ist ein weiterer Indikator für die Lokalisierung von MFN2 in der äußeren Mitochondrienmembran auch nach Megamitochondrienbildung. In wenigen Fällen war eine stäbchenförmige Verteilung zwischen den Riesenorganellen zu sehen, was wohl auf eine erhöhte Expression von EGFP-MFN2 zurückzuführen ist. Wie bei EGFP-MFN1 beeinflusste die Überexpression von EGFP-MFN2 nicht die Bildung von Megamitochondrien.

Studien zur Lokalisierung und Überexpression von Mitofusinen an Megamitochondrien sind bisher nicht beschrieben worden, somit wird hier zum ersten Mal deutlich, dass keine der beiden MFN-Varianten als Fusionsprotein mit EGFP die Entstehung von Riesenorganellen induziert durch La-Medium oder Valinomycin verhindert. Zudem konnte durch die Erhöhung der mikroskopischen Auflösung optisch bestätigt werden, dass die Mitofusine in der äußeren Mitochondrienmembran liegen.

### ***Drp1/DNM1L***

Um Details über Fissionsproteine bei der Megamitochondrienentstehung zu erhalten, wurden für die drei bekannten Isoformen von Drp1/DNM1L Vektoren kloniert, welche die Proteine jeweils an EGFP fusioniert exprimieren.

Bei den Kontrollzellen ergab sich nach Transfektion aller drei Drp1/DNM1L-Isoformen als Fusionsprotein mit EGFP eine fokale Lokalisierung an den Mitochondrien und an den Spitzen von Mitochondrientubuli. Außerdem waren die Drp1/DNM1L-Isoformen teilweise punktuell im Zytoplasma verteilt, was die immunzytochemischen Ergebnisse bestätigte. Ähnliche Verteilungen wurden in Hefe und *C. elegans* berichtet (Otsuga *et al.*, 1998; Bleazard *et al.*, 1999; Labrousse *et al.*, 1999; Sesaki und Jensen, 1999) sowie in Säugerzellen (Pitts *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 2001).

Die drei verwendeten Isoformen von Drp1/DNM1L verhielten sich unter allen Versuchsbedingungen sehr ähnlich, mit punktförmiger Lokalisierung an den Mitochondrien

und im Zytoplasma. Der einzige auffällige Unterschied war, dass bei der Überexpression der 2. Isoform von Drp1/DNM1L manchmal faserartige Strukturen, bestehend aus dem Fusionsprotein EGFP-DNM1L, 12 auftraten, die bei den anderen Isoformen nicht zu beobachten waren. Eventuell war das Auftreten dieser Fasern gekoppelt an eine hohe Expression des Proteins. Diese Beobachtung könnte mit der Assoziierung von Drp1/DNM1L mit den Fasern der Mikrotubuli zusammenhängen (Yoon *et al.*, 1998).

Megamitochondrien bildeten sich trotz der Überexpression aller Drp1/DNM1L-Isoformen unter beiden getesteten experimentellen Bedingungen nach Zugabe von La-Medium oder Valinomycin. Die Lokalisierung von Drp1/DNM1L war in allen untersuchten Fällen aggregiert punkt- oder strichförmig an den Riesenorganellen, oftmals zwischen benachbarten Mitochondrien, jedoch auch dispers im Zytoplasma verteilt. Nach Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks durch CCCP lokalisierte Drp1/DNM1L meist an den Enden der einzeln vorliegenden Organellen.

Grundsätzlich hatte die Überexpression des mitochondrialen Fissionsproteins Drp1/DNM1L keinen messbaren Einfluss auf das mitochondriale Netzwerk der Kontrollzellen oder auf die Induktion von Megamitochondrien. Die Funktionalität des Fusionsproteins bestehend aus Fluoreszenzprotein und Drp1/DNM1L blieb jedoch erhalten, was einerseits in Studien von van der Bliek und Kollegen (Smirnova *et al.*, 2001), andererseits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Bei der Aufnahme der Verteilung des Fluoreszenzsignals von EGFP-Drp1/DNM1L im Vergleich zur Fluoreszenz der Mitochondrien (DsRedM-Mito) wurde deutlich, dass an den Stellen, an denen EGFP-DNM1L an den Mitochondrien vorlag, keine mitochondriale Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass EGFP-DNM1L an mitochondrialen Fissionsstellen lokalisiert. Verdeutlicht wurde dies durch die Aufnahmen einer Zeitserie, in der die Spaltung eines langen Mitochondriums an der Stelle erfolgte, an der ein EGFP-DNM1L-Spot sichtbar war. Dies bestätigt ähnliche Zeitreihen aus früheren Studien, wobei dort humanes Drp1/DNM1L in C2C12-Zellen aus *Mus musculus* bzw. in COS-7-Zellen aus der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) exprimiert wurde (Smirnova *et al.*, 2001).

### ***hFis1***

Das Fissionsprotein hFis1, dem eine Rolle als Rekrutierungsfaktor für Drp1/DNM1L zugesprochen wird (Yoon *et al.*, 2003) zeigte bei Überexpression in allen hier durchgeführten Experimenten einen starken Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien. In den

Kontrollzellen führte die erhöhte Expression zu fragmentierten, kleinen, runden Organellen. Die Behandlung mit dem Protonophor CCCP verstärkte die Fragmentierung. Die Induktion von Megamitochondrien sowohl durch La-Medium als auch Valinomycin wurde durch die Überexpression von hFis1 verhindert. Es bildeten sich kleine runde Mitochondrien, die vom Durchmesser nur wenig über denjenigen in den Kontrollzellen lagen. Dies ist vermutlich bedingt durch eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung mitochondrialer Fission.

Bei längerer Überexpression von DsRed2-hFis1 kam es zu auffälligen Mitochondrienstrukturen: einerseits führte die erhöhte Menge des Fissionsproteins selten zu einer perinukleären Ansammlung der Organellen. Dieser Effekt konnte auch bei der Überexpression von hFis1 ohne Fluoreszenzprotein beobachtet werden und ist somit nicht auf das Fusionsprotein bestehend aus DsRed2 und hFis1 zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen auf die Funktionalität von DsRed2-hFis1 schließen, was in ähnlichen Experimenten bestätigt wurde (Stojanovski *et al.*, 2004).

Andererseits fand man nach 48-stündiger Überexpression häufig eine gebänderte Mitochondrienmorphologie, wobei sich hFis1 nur an den Stegen dieser Strukturen befand, nicht aber an der äußeren Membran, wo es sich normalerweise befindet. Diese gebänderte Morphologie wurde ursprünglich von James *et al.*, 2003 beschrieben, wobei dort keine Gegenfärbung der Mitochondrien durchgeführt wurde.

Zur ultrastrukturellen Aufklärung dieser auffälligen Mitochondrienmorphologie wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen. Hierbei wird deutlich, dass die Organellen dichtest möglich gepackt in stapelförmigen Gebilden vorliegen. Die äußeren Membranen liegen so dicht beieinander, dass es zu einer Dunkelfärbung kommt. Detailaufnahmen zeigten jedoch, dass es sich bei den Stegen zwischen den Mitochondrien um zwei äußere Mitochondrienmembranen handelt, was bedeutet, dass die Organellen noch einzeln mit eigener äußerer Membran zusammenhängen.

Somit kommt es bei längerer hFis1-Überexpression einerseits zu einem Andocken der Mitochondrien, jedoch zu keiner Fusion und auch nicht zu einem nachfolgendem Lösen der Aggregate. Andererseits könnte die erhöhte hFis1-Menge zur Fission der Organellen führen, die dann jedoch zusammengelagert bleiben.

Normalerweise ist hFis1 überall in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (James *et al.*, 2003; Stojanovski *et al.*, 2004) und rekrutiert dort Drp1/DNM1L an Spaltstellen (Yoon *et al.*, 2003). Bei den hier gezeigten gebänderten Mitochondrien befindet sich hFis1 nur an den

Stegen, nicht jedoch in der äußeren Membran außerhalb der Stege. Eine Interaktion von hFis1-Molekülen auf benachbarten Organellen wäre denkbar, denn einerseits wurden Interaktionen der Tetratricopeptid-Falten von hFis1 vermutet (Jofuku *et al.*, 2005), andererseits bildet hFis1 in der Kristallstruktur Dimere aus (Dohm *et al.*, 2004).

Somit könnte hFis1 noch eine weitere Rolle neben der Rekrutierung von Drp1/DNM1L besitzen. Hier sind zur Aufklärung Folgestudien nötig.

## 6.9 Dynamik mitochondrialer Nucleoids

### 6.9.1 Visualisierung der Dynamik mitochondrialer Nucleoids mit PicoGreen

Mit dem DNA-Farbstoff PicoGreen ist es möglich, mitochondriale Nucleoids – die Protein-DNA-Komplexe in denen mtDNA organisiert ist – in lebenden Zellen sichtbar zu machen (Bereiter-Hahn und Vöth, 1996; Tynismaa *et al.*, 2004; Ashley *et al.*, 2005). Weiterhin ist es möglich Nucleoids in lebenden Zellen indirekt zu visualisieren, indem man Proteinbestandteile mit fluoreszenten Farbstoffen koppelt, wie das z.B. mit Twinkle gezeigt werden konnte (Spelbrink *et al.*, 2001, Garrido *et al.*, 2003). Es existieren mehrere Methoden, mit denen mtDNA in Zellen visualisiert werden kann, wie z.B. Antikörper gegen DNA oder gegen inkorporiertes BrdU sowie immunologische Nachweise für Proteinbestandteile der mitochondrialen Nucleoids. Der Nachteil all dieser Methoden ist die Limitierung auf fixierte Zellen, was Lebendbetrachtungen unmöglich macht. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf Erkenntnissen, die an mitochondrialen Nucleoids lebender Zellen gewonnen werden konnten.

Dies war mit PicoGreen möglich und es konnte das dynamische Verhalten von Nucleoids in Zeitreihen festgehalten werden, z.B. die Übertragung von Nucleoids nach mitochondrialen Fusionsereignissen von einem Organell zum anderen. Ähnliche Studien wurden von Garrido *et al.*, 2003 mit Twinkle-GFP-gefärbten Nucleoids zum Verhalten bei Spaltungen durchgeführt, wobei jedoch nicht die mtDNA gefärbt wurde, sondern ein Protein, welches ein Nucleoid-Bestandteil ist. Ob das Konstrukt Twinkle-GFP immer mit der mtDNA assoziiert ist, konnte so nicht gezeigt werden. Der Vorteil lag bei den hier durchgeführten Experimenten in der direkten mtDNA-Färbung mit PicoGreen.

Um Einblicke in das Verhalten der mitochondrialen Nucleoids in Megamitochondrien zu erhalten, wurden in HeLa-Zellen Megamitochondrien mit La-Medium induziert und die mtDNA mit PicoGreen sichtbar gemacht.

Es kam zur Distribution der grünen PicoGreen-Färbung innerhalb der gesamten Megamitochondrien, wobei es sich nicht um eine homogene Distribution der grünen Färbung handelt. Viel mehr bewegten sich die Strukturen, die mittels PicoGreen visualisiert werden konnten, schnell innerhalb der Megamitochondrien, was am konfokalen Laserscanningmikroskop zu einem Schlierenmuster bei der Bildaufnahme führte. Hieraus lässt sich schließen, dass mitochondriale DNA in den milchsäureinduzierten Megamitochondrien dynamisch ist und sich schnell innerhalb der Riesenorganellen bewegt.

Früher wurde beschrieben, dass sich mtDNA-Nucleoids wie das normale Organellennetzwerk bewegen (Garrido *et al.*, 2003). Daraus wurde eine Unterstützung der These abgelesen, dass mitochondriale Nucleoids membran-assoziiert sind, über eine Verknüpfung mittels der D-Loop-Region (Albring *et al.*, 1977).

Im Rahmen dieser Arbeit erschienen die mtDNA-Nucleoids unter den Bedingungen der Megamitochondrienformation jedoch nicht membran-assoziiert, da sie sich frei in den Riesenorganellen bewegten.

In anderen Organismen sind konkrete Hinweise auf membrangebundene mtDNA bekannt, so z.B. in *Trypanosoma brucei*, wo mtDNA-Moleküle in einer einzigen Struktur organisiert, dem sog. Kinetoplasten. Hier wird die mtDNA in einer spezifischen Phase des Zellzyklus repliziert und jede Kopie ist an einem flagellaren Basalkörper befestigt (Robinson und Gull, 1991). Auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es Hinweise auf eine Verankerung der mitochondrialen DNA in der Membran (Meeusen und Nunnari, 2003), wobei hier im Vergleich zu in *Trypanosoma brucei* mehrere Nucleoids organisiert werden müssen (Nunnari *et al.*, 1997), so ist beispielsweise Mmm1p, ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran in Hefe, mit Nucleoids verbunden (Hobbs *et al.*, 2001).

### **6.9.2 Dynamik mitochondrialer Nucleoids durch Visualisierung von TFAM**

PicoGreen eignet sich nur bedingt für längere mikroskopische Zeitreihen, um die Dynamik mitochondrialer Nucleoids aufzuklären, da der Farbstoff schnell ausbleicht. Analog zu dem Ansatz von Garrido *et al.*, 2003 wurde TFAM mittels eines EGFP-bzw. DsRed2-Moleküls

gefärbt und als Fusionsprotein exprimiert. TFAM ist der mitochondriale Transkriptions- und DNA-Verpackungsfaktor (*mitochondrial transcription factor A*).

Nach Transfektion eukaryontischer Zellen war die Distribution der TFAM-Fusionsproteine so, wie man es von Nucleoidbestandteilen erwartete: punktförmig im mitochondrialen Netzwerk. Diese Verteilung entspricht der endogenen, wie mit Immunzytochemie gezeigt wurde (Garrido *et al.*, 2003). In einer kürzlichen Publikation wurde berichtet, dass das Fusionsprotein bestehend aus TFAM und EGFP eine uniforme Verteilung in den Mitochondrien aufweist und keine punktuelle, unabhängig vom Expressionsgrad (Goffart *et al.*, 2007). Dies konnte von uns nicht bestätigt werden, denn TFAM trat als Fusionsprotein punktförmig auf. Nur bei hoher Expression kam es auch zur leichten Färbung des Mitochondriennetzwerks, wobei jedoch immer deutliche Nucleoidfärbungen erkennbar waren. Diese Diskrepanz könnte durch die Verwendung verschiedener Vektoren und Promotoren erklärt werden. Für das Fusionsprotein TFAM-DsRed2 wird in der Publikation von Goffart *et al.*, 2007 punktförmiges Auftreten attestiert, welches auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde.

Zur Verifizierung, dass die punktförmige TFAM-Fluoreszenzfärbung auch den mitochondrialen Nucleoids entspricht, wurden DsRed2-TFAM-transfizierte Zellen parallel mit PicoGreen gefärbt, um mtDNA sichtbar zu machen. Im Ergebnis zeigte sich eine Kolokalisierung aller PicoGreen-markierten Foci mit den TFAM-DsRed2-gefärbten Punkten, womit nachgewiesen werden konnte, dass das Fusionsprotein DsRed2-TFAM alle mit PicoGreen visualisierbaren Nucleoids färbte. Dieses Resultat wurde kürzlich von Goffart *et al.*, 2007 bestätigt. Die Überexpression von TFAM führte zu keiner sichtbaren negativen Veränderung in den beobachteten Zellen. Die Kolokalisierung von endogenem TFAM und mtSSB mit Twinkle in intramitochondrialen Foci, die ebenso mtDNA enthielten, wurde in einer früheren Studie gezeigt (Garrido *et al.*, 2003).

Mit dem neuen Werkzeug zur Visualisierung mitochondrialer Nucleoids, den Fusionsproteinen bestehend aus TFAM und EGFP bzw. DsRed2, wurde die Dynamik von Nucleoids in Megamitochondrien analysiert. Für die Untersuchungen wurden Megamitochondrien einerseits mit La-Medium, andererseits mit Valinomycin induziert.

Auch in den Megamitochondrien lag die Fluoreszenz von DsRed2-TFAM punktförmig vor und die gefärbten Nucleoids bewegten sich in den Riesenorganellen, was bei der Bildaufnahme am konfokalen Laserscanningmikroskop durch die Schlieren ersichtlich wird.

Unabhängig von der Methode der Induktion von Megamitochondrien kam es zur schnellen Bewegung von Nucleoids, die in einer Zeitreihe eine Geschwindigkeit von 35  $\mu\text{m/s}$  erreichte. Auffällig war, dass es bei den DsRed2-TFAM-Foci manchmal zu einer Kolo-kalisierung mit grüner Fluoreszenz der äußeren Mitochondrienmembran zu kommen scheint. Diese Strukturen konnten ohne die Transfektion mit DsRed2-TFAM nicht beobachtet werden und ein „Durchschlagen“ der Fluoreszenz von rot nach grün wurde dadurch ausgeschlossen, dass standardmäßig sequentiell gescannt wurde, also zeilenweise hintereinander die grüne und rote Fluoreszenz angeregt und detektiert wurde. Dieses gleichzeitige räumliche Auftreten von Nucleoids und äußerer Membran könnte ein Hinweis auf eine Membranverankerung der mitochondrialen Nucleoids sein, wie diese schon öfter diskutiert wurde (Albring *et al.*, 1977, Iborra *et al.*, 2004). Grundsätzlich bewegten sich die mit TFAM-gefärbten Nucleoids aber frei in den Megamitochondrien, so dass eine Befestigung an der Membran unter diesen experimentellen Bedingungen wohl nicht vorlag. Die Strukturen der äußeren Membran, die mit DsRed2-TFAM kolo-kalisiertes könnten durch die Fusionsproteine bestehend aus TFAM und DsRed2 verursacht werden.

Zur Aufklärung der Lokalisation von fluoreszenzmarkierten TFAM-Molekülen in Zellen ohne mtDNA, sogenannten  $\rho^0$ -Zellen, wurde ebenfalls eine Transfektion vorgenommen. Hier zeigte sich, dass die Fluoreszenz von DsRed2-TFAM homogen im mitochondrialen Netzwerk verteilt war, im Gegensatz zu der Nucleoidfärbung in Zellen mit mtDNA. Dieses Muster war so zu erwarten, da  $\rho^0$ -Zellen über keine mtDNA und somit auch keine Nucleoids mehr verfügen. In  $\rho^0$ -Zellen liegen sehr wenige TFAM-Moleküle im Vergleich zu den Wildtypzellen vor, obwohl Transkripte in ähnlicher Anzahl vorhanden sind (Larsson *et al.*, 1994). Dies zeigt, dass in Mitochondrien von  $\rho^0$ -Zellen der DNA-Verpackungs- und Transkriptionsfaktor degradiert wird. Die Reduzierung von mtDNA führt zu einer verminderten TFAM-Menge (Seidel-Rogol und Shadel, 2002; Maniura-Weber *et al.*, 2004). Nach der Entstehung endogener Megamitochondrien in den  $\rho^0$ -Zellen blieb die Verteilung der DsRed2-TFAM-Fluoreszenz homogen in der Matrix der Riesenorganellen und kolo-kalisierte mit der Matrixfärbung durch EGFP-Mito. Somit liegt überexprimierter TFAM weder im normalen mitochondrialen Netzwerk, noch in Megamitochondrien von  $\rho^0$ -Zellen punktförmig vor. Dass das Fehlen von mtDNA die Nucleoid-Integrität stört konnte in früheren Studien gezeigt werden (Garrido *et al.*, 2003).

### 6.9.3 Dynamik mitochondrialer Nucleoids durch Visualisierung von SSBP1

Mit dem mitochondrialen DNA-Einzelstrangbindeprotein SSBP1 (mtSSB) wurde ein weiteres Instrument genutzt, um mtDNA-Nucleoids sichtbar zu machen, indem SSBP1 mit fluoreszenten Proteinen fusioniert wurde. Nach der Transfektion ergab sich das typische punktförmige Muster für Nucleoids im mitochondrialen Netzwerk, was SSBP1 zu einem weiteren Marker für Nucleoids macht, wobei die Anzahl der markierten mtDNA-Aggregate geringer zu sein scheint, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass nur gerade replizierende Nucleoids gefärbt werden, da das Einzelstrangbindeprotein nur bei der Replikation benötigt wird, um die dabei vorliegenden DNA-Einzelstränge zu stabilisieren.

Bei der Untersuchung, ob SSBP1 ebenso wie TFAM mit mtDNA-Nucleoids kolokalisiert, die mit PicoGreen gefärbt waren, wurden Zellen mit pDsRed2-SSBP1 transfiziert. Hierbei konnten sowohl punktförmige Strukturen beobachtet werden, die durch PicoGreen visualisiert wurden, als auch punktuelle Anordnungen, welche mittels DsRed2-SSBP1 gefärbt worden waren. Die jeweiligen Foci kolokalisierten nicht komplett miteinander, denn es lagen mehr PicoGreen-gefärbte Nucleoids vor, als solche die mit DsRed2-SSBP1 markiert waren. Diese Beobachtung könnte ebenso darauf hindeuten, dass nur gerade replizierende Nucleoids durch DsRed2-SSBP1 gefärbt werden. Durch das Konkurrieren mit endogenen SSBP1-Molekülen könnte es zu einem weiteren Verdünnungseffekt kommen.

Nachdem für Dynamikstudien entweder mit La-Medium oder Valinomycin Riesenorganellen induziert worden waren, konnte die Verteilung von DsRed2-SSBP1 in diesen untersucht werden. In beiden experimentellen Bedingungen lag DsRed2-SSBP1 punktförmig in den Megamitochondrien vor und es kam zur Bewegung der Strukturen. Die Bewegung der Foci war jedoch im Vergleich zu den Nucleoids, die mit TFAM markiert waren, weniger ausgeprägt. Dies könnte ebenso auf Replikationstätigkeit, der SSBP1-gefärbten Nucleoids hindeuten. Grüne EGFP-OMP25Fr-Strukturen, die mit DsRed2-SSBP1 kolokalisierten, so wie sie bei der TFAM-Überexpression auftraten, waren hier nicht zu erkennen.

Auch für das mitochondriale DNA-Einzelstrangbindeprotein SSBP1 stellte sich die Frage nach der Lokalisierung der überexprimierten Form, die als Fusionsprotein mit DsRed2 vorlag, in Zellen ohne mitochondriale DNA. In  $\rho^0$ -Zellen war DsRed2-SSBP1 punktförmig innerhalb

des mitochondrialen Netzwerks erkennbar. Dies war erstaunlich, da man in  $\rho^0$ -Zellen keine Nucleoid-Strukturen mehr vermutet, da die mtDNA als Hauptbestandteil der Nucleoids nicht mehr vorhanden ist. Für die endogene Verteilung von SSBP1 in der  $\rho^0$ -Zelllinie A549 humanen Ursprungs konnte gezeigt werden, dass das mitochondriale DNA-Einzelstrangbindeprotein nicht punktuell vorliegt, sondern homogen im Mitochondrienetzwerk verteilt (Garrido *et al.*, 2003). Somit könnte die punktförmige Verteilung ein Artefakt der Überexpression sein.

### 6.9.4 Visualisierung einer mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease

Die Visualisierung des Konstrukts einer mitochondrial-zielgesteuerten Restriktionsendonuklease, bestehend aus mitochondrialer Signalsequenz (MTS), *EcoRI* und EGFP, konnte ebenso für den Nachweis der Organisation von mtDNA in diskreten Strukturen verwendet werden. Nach der Transfektion lag die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins punktuell in den Mitochondrien vor, was als starker Hinweis auf mitochondriale Nucleoids zu deuten ist, bei denen gerade die mtDNA durch das Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten wurde. In  $\rho^0$ -Zellen, die keine mitochondriale DNA mehr besitzen, war die Fluoreszenz des Fusionsproteins hingegen homogen im mitochondrialen Netzwerk verteilt. Dies ist ein Zeichen dafür, dass in  $\rho^0$ -Zellen keine mitochondrialen Nucleoids mehr vorhanden sind. Dieses Konstrukt könnte ebenso als Methode zur optischen Unterscheidung von  $\rho^0$ -Zellen zu  $\rho^+$ -Zellen Verwendung finden.

### 6.10 Ausblick

Die Fusion und Fission von Mitochondrien im Zusammenhang mit der Verteilung mitochondrialer DNA, spielt eine wesentliche Rolle sowohl auf zellulärer Ebene wie auch in einem Verbund der Zellen zu Organen und Geweben und hat somit Auswirkungen auf den gesamten Organismus. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die selektive Fusion und Fission von Mitochondrien eine Qualitätskontrolle darstellt, bei der Mitochondrien, deren Membranpotential für eine erneute Fusion nicht ausreichend polarisiert ist, in Autophagosomen abgebaut werden (Twig *et al.*, 2008). Die Erkenntnis dieses Mechanismus hat weitreichende Folgen für einen Prozess, der schon früh in der Embryonalentwicklung

stattfindet: der sogenannte Flaschenhalseffekt. Die Anzahl mitochondrialer Genome wird in den ersten Entwicklungsschritten stark verringert und die Repopulation erfolgt somit durch nur wenige Ausgangsorganellen (Cree *et al.*, 2008). Man geht davon aus, dass dieser Prozess eine Qualitätskontrolle für Mitochondrien darstellt, bei der sichergestellt werden soll, dass der Organismus eine bestmögliche Auswahl an mitochondrialem Genmaterial erhält. Die Erkenntnis einer mitochondrialen Qualitätskontrolle durch selektive Fusion und Fission und einem sich daran anschließenden Abbau in Autophagosomen, könnte somit einen Hinweis darauf liefern, welcher Mechanismus für diesen Flaschenhalseffekt verantwortlich sein könnte.

Dies ist insbesondere von essentieller Bedeutung, um die Vererbung mitochondrialer Krankheiten zu verstehen. Die Weitergabe mitochondrialer Gendefekte ist durch die Möglichkeit verschiedener Heteroplasmiegrade äußerst schwer vorhersagbar und kann zu der Entstehung von nur schwachen oder auch schwerwiegenden Phänotypen führen.

In diesem Zusammenhang wird die Relevanz des Forschungsgebietes zur mitochondrialen Fusion und Fission sowie zu Nucleoids besonders deutlich und bietet ein weites Feld für zukünftige Entdeckungen.

## 7. Referenzen

- Acehan, D., Xu, Y., Stokes, D. L. und Schlame, M.** (2007). Comparison of lymphoblast mitochondria from normal subjects and patients with Barth syndrome using electron microscopic tomography. *Lab Invest.* 87, 40-48.
- Albring, M., Griffith, J. und Attardi, G.** (1977). Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1348-1352.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G. et al.** (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211-215.
- Altmann, R.** (1890). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen.* Veit.
- Amalric, F., Merkel, C., Gelfand, R. und Attardi, G.** (1978). Fractionation of mitochondrial RNA from HeLa cells by high-resolution electrophoresis under strongly denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* 118, 1-25.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F. et al.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290, 457-465.
- Ashley, N., Harris, D. und Poulton, J.** (2005). Detection of mitochondrial DNA depletion in living human cells using PicoGreen staining. *Exp. Cell Res.* 303, 432-446.
- AZZI, A. und AZZONE, G. F.** (1965). POTASSIUM-TRANSPORT-LINKED SWELLING INDUCED BY VALINOMYCIN IN LIVER MITOCHONDRIA. *Biochem. J.* 96:1C-2C., 1C-2C.
- Benda, C.** (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und hoererer Evertrebraten. II. Theil: Die Histogenese der Spermien. *Arch Anat. Physiol.*, 393-398.
- Bereiter-Hahn, J. und Voth, M.** (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198-219.
- Bereiter-Hahn, J. und Vöth, M.** (1996). Distribution and dynamics of mitochondrial nucleoids in animal cells in culture. *Exp. Biol. online* 1, 1-17.
- Berk, A. J. und Clayton, D. A.** (1974). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *J. Mol. Biol.* 86, 801-824.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A. K., Bolhuis, P. A. und Toniolo, D.** (1996). A novel X-linked gene, G4.5. is responsible for Barth syndrome. *Nat. Genet.* 12, 385-389.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. und Shaw, J. M.** (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* 1, 298-304.
- Bogenhagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L. und Kobayashi, R.** (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol. Cell Proteomics.* 2, 1205-1216.

- Bogenhagen, D. F. und Clayton, D. A.** (2003). The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28, 357-360.
- Bogenhagen, D. F., Rousseau, D. und Burke, S.** (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* 283, 3665-3675.
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M. und Nigg, E. A.** (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 56, 379-390.
- Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. und Shore, G. C.** (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol.* 160, 1115-1127.
- Brooks, G. A., Brown, M. A., Butz, C. E., Sicurello, J. P. und Dubouchaud, H.** (1999). Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J. Appl. Physiol.* 87, 1713-1718.
- Brooks, G. A.** (2002). Lactate shuttles in nature. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 258-264.
- Brown, T. A., Cecconi, C., Tkachuk, A. N., Bustamante, C. und Clayton, D. A.** (2005). Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev.* 19, 2466-2476.
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J. und Walker, J. E.** (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 32724-32727.
- Chan, D. C.** (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 125, 1241-1252.
- Chan, D. C.** (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:79-99., 79-99.
- Chang, D. D. und Clayton, D. A.** (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 351-355.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. und Chan, D. C.** (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189-200.
- Chen, H., Chomyn, A. und Chan, D. C.** (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280, 26185-26192.
- Choi, S. Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J. und Frohman, M. A.** (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1255-1262.
- Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S. T., Scarlato, G. und Attardi, G.** (1991). In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol. Cell Biol.* 11, 2236-2244.
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S. T., Nonaka, I., Angelini, C. und Attardi, G.** (1992). MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4221-4225.
- Christianson, T. W. und Clayton, D. A.** (1988). A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation in vitro. *Mol. Cell Biol.* 8, 4502-4509.

- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2172-2175.
- Cipolat, S., Martins de, B. O., Dal, Z. B. und Scorrano, L.** (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15927-15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L. et al.** (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell.* 126, 163-175.
- Clayton, D. A.** (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell.* 28, 693-705.
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. und Bootman, M. D.** (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* 21, 1616-1627.
- Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M. T., Shoffner, J. M., Beal, M. F. und Wallace, D. C.** (1992). Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat. Genet.* 2, 324-329.
- Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W. und Arnheim, N.** (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7370-7374.
- Cree, L. M., Samuels, D. C., de Sousa Lopes, S. C., Rajasimha, H. K., Wonnapijit, P., Mann, J. R., Dahl, H. H. und Chinnery, P. F.** (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat. Genet.* 40, 249-254.
- Dairaghi, D. J., Shadel, G. S. und Clayton, D. A.** (1995). Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271, 127-134.
- Darrouzet, E., Moser, C. C., Dutton, P. L. und Daldal, F.** (2001). Large scale domain movement in cytochrome bc(1): a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 445-451.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E. et al.** (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207-210.
- Delettre, C., Griffoin, J. M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. und Hamel, C. P.** (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum. Genet.* 109, 584-591.
- Delettre, C., Lenaers, G., Pelloquin, L., Belenguer, P. und Hamel, C. P.** (2002). OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 75, 97-107.
- Desjardins, P., Frost, E. und Morais, R.** (1985). Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 5, 1163-1169.
- Desjardins, P., de Muys, J. M. und Morais, R.** (1986). An established avian fibroblast cell line without mitochondrial DNA. *Somat. Cell Mol. Genet.* 12, 133-139.

- Detmer, S. A., Vande, V. C., Cleveland, D. W. und Chan, D. C.** (2008). Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum. Mol. Genet.* 17, 367-375.
- DeVivo, D. C., Haymond, M. W., Obert, K. A., Nelson, J. S. und Pagliara, A. S.** (1979). Defective activation of the pyruvate dehydrogenase complex in subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh disease). *Ann. Neurol.* 6, 483-494.
- Dohm, J. A., Lee, S. J., Hardwick, J. M., Hill, R. B. und Gittis, A. G.** (2004). Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins.* 54, 153-156.
- Dubin, D. T., Montoya, J., Timko, K. D. und Attardi, G.** (1982). Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* 157, 1-19.
- Dujon, B., Slonimski, P. P. und Weill, L.** (1974). Mitochondrial genetics IX: A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 78, 415-437.
- Ekstrand, M. I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C. B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C. M. und Larsson, N. G.** (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 13, 935-944.
- Enriquez, J. A., Cabezas-Herrera, J., Bayona-Bafaluy, M. P. und Attardi, G.** (2000). Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells. *J. Biol. Chem.* 275, 11207-11215.
- Ernster, L. und Schatz, G.** (1981). Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* 91, 227s-255s.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. und Mihara, K.** (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J. Biochem.* 134, 333-344.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. und Mihara, K.** (2006). Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J. Cell Sci.* 119, 4913-4925.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M.** (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* 31, 289-294.
- Falkenberg, M., Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M.** (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76:679-99., 679-699.
- Fellman, V., Rapola, J., Pihko, H., Varilo, T. und Raivio, K. O.** (1998). Iron-overload disease in infants involving fetal growth retardation, lactic acidosis, liver haemosiderosis, and aminoaciduria. *Lancet.* 351, 490-493.
- Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V. und Attardi, G.** (1997). The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J.* 16, 1066-1079.
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A. und Montoya, J.** (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* 88, 41-56.

- Fisher, R. P., Topper, J. N. und Clayton, D. A.** (1987). Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell*. 50, 247-258.
- Fisher, R. P. und Clayton, D. A.** (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell Biol.* 8, 3496-3509.
- Fisher, R. P., Lisowsky, T., Parisi, M. A. und Clayton, D. A.** (1992). DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J. Biol. Chem.* 267, 3358-3367.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L. und Youle, R. J.** (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*. 1, 515-525.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de, B. O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., De, S. B. et al.** (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 126, 177-189.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W. und Westermann, B.** (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152, 683-692.
- Garcia, C. K., Goldstein, J. L., Pathak, R. K., Anderson, R. G. und Brown, M. S.** (1994). Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell*. 76, 865-873.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Blik, A. M. und Spelbrink, J. N.** (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol. Biol. Cell*. 14, 1583-1596.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. und Wallace, D. C.** (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6715-6719.
- Goffart, S., Martinsson, P., Malka, F., Rojo, M. und Spelbrink, J. N.** (2007). The mitochondria of cultured mammalian cells: II. Expression and visualization of exogenous proteins in fixed and live cells. *Methods Mol. Biol.* 372:17-32., 17-32.
- Gray, M. W. und Doolittle, W. F.** (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev.* 46, 1-42.
- Gray, M. W.** (1993). Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 884-890.
- Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F.** (1999). Mitochondrial evolution. *Science*. 283, 1476-1481.
- Gregoire, M., Morais, R., Quilliam, M. A. und Gravel, D.** (1984). On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells. *Eur. J. Biochem.* 142, 49-55.
- Griffin, E. E., Graumann, J. und Chan, D. C.** (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.* 170, 237-248.
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. und van der Blik, A. M.** (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792-18798.

- Grodums, E. I.** (1977). Ultrastructural changes in the mitochondria of brown adipose cells during the hibernation cycle of *Citellus lateralis*. *Cell Tissue Res.* 185, 231-237.
- Grohmann, K., Amairic, F., Crews, S. und Attardi, G.** (1978). Failure to detect "cap" structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 5, 637-651.
- Hajek, P., Chomyn, A. und Attardi, G.** (2007). Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J. Biol. Chem.* 282, 5670-5681.
- Hales, K. G. und Fuller, M. T.** (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell.* 90, 121-129.
- Halestrap, A. P. und Price, N. T.** (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 343 Pt 2:281-99., 281-299.
- Hashimoto, T., Hussien, R. und Brooks, G. A.** (2006). Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 290, E1237-E1244.
- Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K. und Brooks, G. A.** (2007). Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J.* 21, 2602-2612.
- Hashimoto, T., Hussien, R., Cho, H. S., Kaufer, D. und Brooks, G. A.** (2008). Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS. ONE.* 3, e2915.
- Hashimoto, T. und Brooks, G. A.** (2008). Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 486-494.
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. und Shaw, J. M.** (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143, 359-373.
- Hobbs, A. E., Srinivasan, M., McCaffery, J. M. und Jensen, R. E.** (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J. Cell Biol.* 152, 401-410.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K. und Morgan-Hughes, J. A.** (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 428-433.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E. und Jacobs, H. T.** (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell.* 100, 515-524.
- Huang, P., Yu, T. und Yoon, Y.** (2007). Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 289-302.
- Hutchison, C. A., III, Newbold, J. E., Potter, S. S. und Edgell, M. H.** (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.* 251, 536-538.
- Iborra, F. J., Kimura, H. und Cook, P. R.** (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC. Biol.* 2:9., 9.

- Imoto, M., Tachibana, I. und Urrutia, R.** (1998). Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *J. Cell Sci.* 111, 1341-1349.
- Inoue, K., Takai, D., Hosaka, H., Ito, S., Shitara, H., Isobe, K., LePecq, J. B., Segal-Bendirdjian, E. und Hayashi, J.** (1997). Isolation and characterization of mitochondrial DNA-less lines from various mammalian cell lines by application of an anticancer drug, ditercalinium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 257-260.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. und Mihara, K.** (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 891-898.
- Ishihara, N., Eura, Y. und Mihara, K.** (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 117, 6535-6546.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. und Mihara, K.** (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966-2977.
- Jakobs, B. S., van den, B. C., Dacremont, G. und Wanders, R. J.** (1994). Beta-oxidation of fatty acids in cultured human skin fibroblasts devoid of the capacity for oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1211, 37-43.
- James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y. und Martinou, J. C.** (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J. Biol. Chem.* 278, 36373-36379.
- Jofuku, A., Ishihara, N. und Mihara, K.** (2005). Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 650-659.
- Karbowski, M., Kurono, C., Nishizawa, Y., Horie, Y., Soji, T. und Wakabayashi, T.** (1997). Induction of megamitochondria by some chemicals inducing oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1349, 242-250.
- Karbowski, M., Kurono, C., Wozniak, M., Ostrowski, M., Teranishi, M., Nishizawa, Y., Usukura, J., Soji, T. und Wakabayashi, T.** (1999). Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 396-409.
- Karbowski, M., Kurono, C., Wozniak, M., Ostrowski, M., Teranishi, M., Soji, T. und Wakabayashi, T.** (1999). Cycloheximide and 4-OH-TEMPO suppress chloramphenicol-induced apoptosis in RL-34 cells via the suppression of the formation of megamitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1449, 25-40.
- Karbowski, M., Lee, Y. J., Gaume, B., Jeong, S. Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C. L. und Youle, R. J.** (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 159, 931-938.
- Karbowski, M., Jeong, S. Y. und Youle, R. J.** (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 166, 1027-1039.
- Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D. C., Smith, C. L. und Youle, R. J.** (2004). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 164, 493-499.

- Karbowski, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S. Y. und Youle, R. J.** (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*. 443, 658-662.
- Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P. und Shoubridge, E. A.** (2007). The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol. Biol. Cell*. 18, 3225-3236.
- Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y. et al.** (2005). Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum. Genet.* 116, 23-27.
- King, M. P. und Attardi, G.** (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. 246, 500-503.
- King, M. P. und Attardi, G.** (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 264:304-13., 304-313.
- Kneissl, A.** (2004). Zerstörung der mtDNA *in vivo*: Etablierung einer neuen Methode unter Verwendung einer Restriktionsendonuklease. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Koch, A., Thiemann, M., Grabenbauer, M., Yoon, Y., McNiven, M. A. und Schrader, M.** (2003). Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J. Biol. Chem.* 278, 8597-8605.
- Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N. A., McNiven, M. A. und Schrader, M.** (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*. 16, 5077-5086.
- Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M. und Falkenberg, M.** (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome *in vitro*. *EMBO J.* 23, 2423-2429.
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. und Chan, D. C.** (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. 305, 858-862.
- Kölliker, A.** (1888). Zur Kenntnis der quergestreiften Muskelfasern. *Z. wissenschaft. Zool.* 47, 689-710.
- Kruse, B., Narasimhan, N. und Attardi, G.** (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*. 58, 391-397.
- Kukat, A.** (2007). Mitochondriale Fusions- und Fissionsvorgänge am Modellsystem von Mega-Mitochondrien einer  $\rho^0$ -Zelllinie. Dissertation, Universität Würzburg.
- Kukat, A., Kukat, C., Brocher, J., Schafer, I., Krohne, G., Trounce, I. A., Villani, G. und Seibel, P.** (2008). Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res.* 36, e44.
- Kukat, A., Kukat, C., Krohne, G. und Seibel, P.** (2008). Mitochondrial fusion and fission in cells with megamitochondria caused by lactic acid fermentation. *submitted*.
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. und van der Bliek, A. M.** (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell*. 4, 815-826.
- Lancaster, C. R. und Kroger, A.** (2000). Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459, 422-431.

- Larsson, N. G., Oldfors, A., Holme, E. und Clayton, D. A.** (1994). Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1374-1381.
- Lawson, V. H., Graham, B. V. und Flanigan, K. M.** (2005). Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology.* 65, 197-204.
- Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L. und Youle, R. J.** (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 15, 5001-5011.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. und Rojo, M.** (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell.* 13, 4343-4354.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A. und Rojo, M.** (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* 117, 2653-2662.
- Li, X. und Gould, S. J.** (2003). The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J. Biol. Chem.* 278, 17012-17020.
- Linder, T., Park, C. B., sin-Cayuela, J., Pellegrini, M., Larsson, N. G., Falkenberg, M., Samuelsson, T. und Gustafsson, C. M.** (2005). A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. *Curr. Genet.* 48, 265-269.
- Magnusson, J., Orth, M., Lestienne, P. und Taanman, J. W.** (2003). Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp. Cell Res.* 289, 133-142.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A. und Rojo, M.** (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6, 853-859.
- Maniura-Weber, K., Goffart, S., Garstka, H. L., Montoya, J. und Wiesner, R. J.** (2004). Transient overexpression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) is sufficient to stimulate mitochondrial DNA transcription, but not sufficient to increase mtDNA copy number in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 32, 6015-6027.
- Margulis, L.** (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 21-38.
- Matsushashi, T., Liu, X., Nishizawa, Y., Usukura, J., Wozniak, M. und Wakabayashi, T.** (1996). Mechanism of the formation of megamitochondria in the mouse liver induced by chloramphenicol. *Toxicol. Lett.* 86, 47-54.
- Mattenberger, Y., James, D. I. und Martinou, J. C.** (2003). Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 538, 53-59.
- McClelland, G. B., Khanna, S., Gonzalez, G. F., Butz, C. E. und Brooks, G. A.** (2003). Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 130-135.
- McGill, M.** (1980). Inhibition of mitochondrial-specific protein synthesis in human lymphocytes and platelets is dependent upon the stage of cellular differentiation. *Cytogenet. Cell Genet.* 26, 117-126.
- Meeusen, S. und Nunnari, J.** (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J. Cell Biol.* 163, 503-510.

- Meeusen, S., McCaffery, J. M. und Nunnari, J.** (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*. 305, 1747-1752.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M. und Attardi, G.** (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7195-7199.
- Morais, R. und Giguere, L.** (1979). On the adaptation of cultured chick embryo cells to growth in the presence of chloramphenicol. *J. Cell Physiol.* 101, 77-88.
- Morais, R., Desjardins, P., Turmel, C. und Zinkewich-Peotti, K.** (1988). Development and characterization of continuous avian cell lines depleted of mitochondrial DNA. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24, 649-658.
- Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. und Shaw, J. M.** (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151, 367-380.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I. und Hayashi, J. I.** (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934-940.
- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S. und Hirose, S.** (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* 7, 1019-1022.
- Nakase, H., Moraes, C. T., Rizzuto, R., Lombes, A., DiMauro, S. und Schon, E. A.** (1990). Transcription and translation of deleted mitochondrial genomes in Kearns-Sayre syndrome: implications for pathogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 418-427.
- NASS, M. M.** (1969). Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *J. Mol. Biol.* 42, 521-528.
- NASS, S. und NASS, M. M.** (1963). INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. II. ENZYMATIC AND OTHER HYDROLYTIC TREATMENTS. *J. Cell Biol.* 19:613-29., 613-629.
- Nelson, I., Hanna, M. G., Wood, N. W. und Harding, A. E.** (1997). Depletion of mitochondrial DNA by ddC in untransformed human cell lines. *Somat. Cell Mol. Genet.* 23, 287-290.
- Neuspiel, M., Zunino, R., Gangaraju, S., Rippstein, P. und McBride, H.** (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J. Biol. Chem.* 280, 25060-25070.
- Nisoli, E., Clementi, E., Moncada, S. und Carruba, M. O.** (2004). Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1-15.
- Nunnari, J., Marshall, W. F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J. W. und Walter, P.** (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell.* 8, 1233-1242.
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R. und Attardi, G.** (1980). The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell.* 22, 393-403.
- Ojala, D., Montoya, J. und Attardi, G.** (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature.* 290, 470-474.

- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. und Lenaers, G.** (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743-7746.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. und Hayashi, J. I.** (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 272-275.
- Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W. und Shaw, J. M.** (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143, 333-349.
- PALADE, G. E.** (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114, 427-451.
- Papa, S.** (1996). Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1276, 87-105.
- Parisi, M. A. und Clayton, D. A.** (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science.* 252, 965-969.
- Park, C. B., sin-Cayuela, J., Camara, Y., Shi, Y., Pellegrini, M., Gaspari, M., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et al.** (2007). MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell.* 130, 273-285.
- Patterson, G. H. und Lippincott-Schwartz, J.** (2002). A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science.* 297, 1873-1877.
- Pavlakis, S. G., Phillips, P. C., DiMauro, S., De, V. und Rowland, L. P.** (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.* 16, 481-488.
- Pierre, K., Pellerin, L., Debernardi, R., Riederer, B. M. und Magistretti, P. J.** (2000). Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience.* 100, 617-627.
- Pitts, K. R., Yoon, Y., Krueger, E. W. und McNiven, M. A.** (1999). The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 10, 4403-4417.
- Pressman, B. C.** (1965). Induced active transport of ions in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 53, 1076-1083.
- Rancourt, M. W., McKee, A. P. und Pollack, W.** (1975). Mitochondrial profile of a mammalian lymphocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 51, 418-424.
- Robinson, D. R. und Gull, K.** (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature.* 352, 731-733.
- Rajo, M., Legros, F., Chateau, D. und Lombes, A.** (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115, 1663-1674.
- Rose, K. M., Morris, H. P. und Jacob, S. T.** (1975). Mitochondrial poly(A) polymerase from a poorly differentiated hepatoma: purification and characteristics. *Biochemistry.* 14, 1025-1032.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Santel, A. und Fuller, M. T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R. J. und Fuller, M. T.** (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 116, 2763-2774.
- Santel, A. und Frank, S.** (2008). Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB. Life.* 60, 448-455.
- Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y. und Endo, H.** (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 482-493.
- Schatz, G., Haslbrunner, E. und Tuppy, H.** (1964). Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 15, 127-132.
- Schon, E. A., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Nakase, H., Zeviani, M. und DiMauro, S.** (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science.* 244, 346-349.
- Schultz, B. E. und Chan, S. I.** (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:23-65., 23-65.
- Seidel-Rogol, B. L. und Shadel, G. S.** (2002). Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 30, 1929-1934.
- Sesaki, H. und Jensen, R. E.** (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* 147, 699-706.
- Sesaki, H. und Jensen, R. E.** (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 152, 1123-1134.
- Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. und Jensen, R. E.** (2003). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 276-283.
- Shadel, G. S. und Clayton, D. A.** (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66:409-35., 409-435.
- Shaw, J. M. und Nunnari, J.** (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 12, 178-184.
- Shin, H. W., Shinotsuka, C., Torii, S., Murakami, K. und Nakayama, K.** (1997). Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *J. Biochem.* 122, 525-530.
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Voljavec, A. S., Soueidan, S. A., Costigan, D. A. und Wallace, D. C.** (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7952-7956.

- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M., Seibel, P., Ballinger, S. W. und Wallace, D. C.** (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*. 61, 931-937.
- SJOSTRAND, F. S.** (1953). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*. 171, 30-32.
- Skulachev, V. P.** (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26, 23-29.
- Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. und van der Blik, A. M.** (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* 143, 351-358.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. und van der Blik, A. M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*. 12, 2245-2256.
- Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J. und Prockop, D. J.** (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1283-1288.
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L. et al.** (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 223-231.
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O. S., Okamoto, K. und Ryan, M. T.** (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* 117, 1201-1210.
- Sugioka, R., Shimizu, S. und Tsujimoto, Y.** (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 52726-52734.
- Sun, M. G., Williams, J., Munoz-Pinedo, C., Perkins, G. A., Brown, J. M., Ellisman, M. H., Green, D. R. und Frey, T. G.** (2007). Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1057-1065.
- Suzuki, K.** (1969). Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science*. 163, 81-82.
- Suzuki, M., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Youle, R. J. und Tjandra, N.** (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J. Mol. Biol.* 334, 445-458.
- Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N. und Youle, R. J.** (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 280, 21444-21452.
- Takamatsu, C., Umeda, S., Ohsato, T., Ohno, T., Abe, Y., Fukuoh, A., Shinagawa, H., Hamasaki, N. und Kang, D.** (2002). Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep.* 3, 451-456.
- Tandler, B. und Hoppel, C. L.** (1973). Division of giant mitochondria during recovery from cuprizone intoxication. *J. Cell Biol.* 56, 266-272.
- Tauchi, H. und Sato, T.** (1968). Age changes in size and number of mitochondria of human hepatic cells. *J. Gerontol.* 23, 454-461.

- Teranishi, M., Karbowski, M., Kurono, C., Soji, T. und Wakabayashi, T.** (1999). Two types of the enlargement of mitochondria related to apoptosis: simple swelling and the formation of megamitochondria. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 48, 637-651.
- Tieu, Q. und Nunnari, J.** (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 151, 353-366.
- Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K. und Nunnari, J.** (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 158, 445-452.
- Tokuyasu, K. T.** (1975). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of "onion" nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.* 53, 93-112.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. und Santel, A.** (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 118, 3049-3059.
- Trifunovic, A. und Larsson, N. G.** (2008). Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J. Intern. Med.* 263, 167-178.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G. et al.** (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433-446.
- Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J. und Suomalainen, A.** (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3219-3227.
- Visapaa, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J. L., Kumar, V., Payne, G. S., Makarow, M., Van, C. R., Taylor, R. W. et al.** (2002). GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 863-876.
- Wakabayashi, T.** (2002). Megamitochondria formation - physiology and pathology. *J. Cell Mol. Med.* 6, 497-538.
- Wallace, D. C.** (1982). Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46, 208-240.
- Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J. und Nikoskelainen, E. K.** (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 242, 1427-1430.
- Wallace, D. C.** (1994). Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 241-250.
- Wallace, D. C.** (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8739-8746.
- Wang, Y. und Bogenhagen, D. F.** (2006). Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 281, 25791-25802.
- Waterham, H. R., Koster, J., van Roermund, C. W., Mooyer, P. A., Wanders, R. J. und Leonard, J. V.** (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736-1741.

- Weeden, N. F.** (1981). Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J. Mol. Evol.* 17, 133-139.
- WILLS, E. J.** (1965). CRYSTALLINE STRUCTURES IN THE MITOCHONDRIA OF NORMAL HUMAN LIVER PARENCHYMAL CELLS. *J. Cell Biol.* 24:511-4., 511-514.
- Wilson, P. D. und Franks, L. M.** (1975). The effect of age on mitochondrial ultrastructure. *Gerontologia.* 21, 81-94.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. und Nunnari, J.** (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151, 341-352.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Scott, S. V., Okreglak, V., Holewinski, T. J., Cassidy-Stone, A. und Nunnari, J.** (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 160, 303-311.
- Yaffe, M. P.** (1999). Dynamic mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 1, E149-E150.
- Yarosh, W., Monserrate, J., Tong, J. J., Tse, S., Le, P. K., Nguyen, K., Brachmann, C. B., Wallace, D. C. und Huang, T.** (2008). The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in Drosophila model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS. Genet.* 4, e6.
- Yoon, Y., Pitts, K. R., Dahan, S. und McNiven, M. A.** (1998). A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 140, 779-793.
- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. und McNiven, M. A.** (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.* 23, 5409-5420.
- Youle, R. J. und Karbowski, M.** (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 657-663.
- Yu, T., Fox, R. J., Burwell, L. S. und Yoon, Y.** (2005). Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1. *J. Cell Sci.* 118, 4141-4151.
- Zhang, Y. und Chan, D. C.** (2007). New insights into mitochondrial fusion. *FEBS Lett.* 581, 2168-2173.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J. et al.** (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449-451.

## Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm ( $10^{-6}$ g)
$\mu\text{l}$	Mikroliter ( $10^{-6}$ l)
$\mu\text{m}$	Mikrometer ( $10^{-6}$ m)
$\mu\text{mol}$	Mikromol ( $10^{-6}$ mol)
A	Adenylrest
Abb.	Abbildung
Acetyl CoA	Acetyl Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
CCCP	<i>carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cm	Zentimeter ( $10^{-2}$ m)
CMT2A	<u>C</u> harcot- <u>M</u> arie- <u>T</u> ooth Krankheit, Typ <u>2A</u>
CMV	<u>C</u> ytomegalovirus
CSBs	<i>conserved sequence blocks</i>
CTP	<u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
ddC	2',3'-Didesoxycytidin
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	<u>D</u> idesoxy <u>n</u> ukleotid <u>t</u> riphosphat
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
DHODH	<u>D</u> ihydroo <u>r</u> otat <u>d</u> ehydrogenase
D-Loop	<i>displacement loop</i>
DMF	N,N- <u>D</u> imethyl <u>f</u> ormamid
DMSO	<u>D</u> imethylsul <u>f</u> oxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxy <u>n</u> ukleotid <u>t</u> riphosphat
ds	<i>double strand</i> , Doppelstrang
DTT	1,4- <u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtBr	<u>E</u> thidiumbromid
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	reduziertes Flavinadenindinukleotid

<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
<b>FMN</b>	Flavinmononukleotid
<b>g</b>	Gravitationskonstante (9,81 m/s <sup>2</sup> )
<b>g</b>	Gramm
<b>G418</b>	Geneticin
<b>GED</b>	<u>G</u> T <u>P</u> ase- <u>E</u> ffektor- <u>D</u> omäne
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>GTP</b>	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HEPES</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
<b>HMG</b>	<i>high mobility group</i>
<b>HR</b>	<i>heptad repeat</i>
<b>HSP</b>	<i>heavy strand promoter</i> , H-Strang Promotors
<b>HVJ</b>	<i>hemagglutinating virus of Japan</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
<b>IRES</b>	<u>i</u> nterne <u>R</u> ibosomene <u>i</u> ntritts <u>s</u> telle
<b>IT<sub>H1</sub></b>	<i>initiation of transcription site on the heavy strand 1</i>
<b>IT<sub>H2</sub></b>	<i>initiation of transcription site on the heavy strand 2</i>
<b>IT<sub>L</sub></b>	<i>initiation of transcription site on the light strand</i>
<b>IUAPAC</b>	<i>The International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>Kan</b>	Kanamycin
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kD</b>	Kilo-Dalton
<b>l</b>	<u>L</u> iter
<b>lacZ</b>	β-Galaktosidase
<b>LHON</b>	<i>Leber Hereditary Optic Neuropathy</i>
<b>LSP</b>	<i>light strand promoter</i> , L-Strang Promotor
<b>m</b>	Meter
<b>M</b>	molar (mol/l)
<b>MCS</b>	<i>multiple cloning site</i>
<b>MELAS</b>	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Stroke-like Episodes</i>
<b>MERRF</b>	<i>Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber Disease</i>
<b>MFN</b>	Mitofusion
<b>mg</b>	Milligramm (10 <sup>-3</sup> g)
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter (10 <sup>-3</sup> l)
<b>mM</b>	millimolar (10 <sup>-3</sup> mol/l)
<b>mm</b>	Milimeter (10 <sup>-3</sup> m)
<b>mol</b>	Mol
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>mtDNA</b>	<i>mitochondrial DNA</i> , mitochondriale DNA
<b>mTERF</b>	<i>mitochondrial termination factor</i>
<b>MTS</b>	<i>matrix targeting signal</i> , mitochondriale Matrixsignalsequenz
<b>mtSSB</b>	<i>mitochondrial single strand binding protein</i>
<b>mtTFA</b>	<i>mitochondrial transcription factor A</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor A

<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nikotinamidadenin dinukleotid
<b>NADH</b>	reduziertes Nikotinamidadenin dinukleotid
<b>NARP</b>	<i>Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa</i>
<b>neo</b>	Neomycin
<b>ng</b>	Nanogramm (10 <sup>-9</sup> g)
<b>nm</b>	Nanometer (10 <sup>-9</sup> m)
<b>nmol</b>	Nanomol (10 <sup>-9</sup> mol)
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>O<sub>H</sub></b>	<i>origin of heavy-strand replication</i>
<b>O<sub>L</sub></b>	<i>origin of light-strand replication</i>
<b>ori</b>	<i>origin of replication</i>
<b>OXPPOS</b>	oxidative Phosphorylierung
<b>PA-GFP</b>	photoaktivierbares grünes fluoreszentes Protein
<b>PARL</b>	<i>Presenilin-associated rhomboid-like</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>pg</b>	Picogramm (10 <sup>-12</sup> g)
<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>P<sub>i</sub></b>	anorganisches Phosphat
<b>pmol</b>	Picomol (10 <sup>-12</sup> mol)
<b>POLG</b>	DNA-Polymerase $\gamma$
<b>POLRMT</b>	mitochondriale RNA-Polymerase
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<b>rRNA</b>	ribosomale RNA
<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>RT-PCR</b>	reverse Transkriptase-PCR
<b>s</b>	Sekunde
<b>SAP</b>	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
<b>sec</b>	Sekunde
<b>ss</b>	<i>single strand</i> , Einzelstrang
<b>T<sub>A</sub></b>	<i>annealing temperature</i> , Annealingtemperatur
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TFAM</b>	<i>mitochondrial transcription factor A</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
<b>TFB1M</b>	<i>mitochondrial transcription factor B1</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor B1
<b>TFB2M</b>	<i>mitochondrial transcription factor B2</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor B2
<b>T<sub>H</sub></b>	<i>hybridising temperature</i> , Hybridisierungstemperatur
<b>TM</b>	Transmembran
<b>T<sub>M</sub></b>	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
<b>TOM</b>	<i>Transporter outer membrane</i>
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>tRNA</b>	<i>transfer RNA</i>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>TSS</b>	<i>Transformation and Storage Solution</i>
<b>TTP</b>	Thymidintriphosphat
<b>U</b>	<i>unit</i> , Einheit
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	<i>volume / volume</i>
<b>w/v</b>	<i>weight / volume</i>
<b>X-Gal</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside
<b><math>\rho^+</math>-Zellen</b>	Zellen mit Mitochondrien mit mitochondrialer DNA
<b><math>\rho^0</math>-Zellen</b>	Rho 0, Zellen mit Mitochondrien ohne mitochondriale DNA

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Würzburg, den

.....  
Christian Kukat

## Publikationsliste

### Publikationen:

Kukat, A.\*, **Kukat, C.\***, Brocher, J., Schäfer, I., Krohne, G., Trounce, I.A., Villani, G., Seibel, P. (2008).

Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res.* Apr;36(7):e44.

(\* joint first authors)

Seibel, P., Di Nunno, C., **Kukat, C.**, Schäfer, I., Del Bo, R., Bordoni, A., Comi, G.P., Schön, A., Capuano, F., Latorre, D., Villani, G. (2008).

Co-segregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids. *Nucleic Acids Res.* (accepted: 03.09.2008).

Kukat, A., **Kukat, C.**, Krohne, G., Seibel, P.;

Mitochondrial fusion and fission in cells with endogenous megamitochondria caused by lactic acid fermentation. *submitted.*

**Kukat, C.**, Kukat, A., Krohne, G., Seibel, P.;

Megamitochondria as a model system: Localisation and influence of mitochondrial fusion and fission proteins. *in Vorbereitung.*

**Kukat, C.**, Kukat, A., Seibel, P.;

Dynamics of mitochondrial nucleoids in megamitochondria. *in Vorbereitung.*

Kukat A., **Kukat C.** und Seibel P.;

Fission and Fusion of Mitochondria: Real Time Imaging of Inner and Outer Membrane Dynamics in Megamitochondria of Rho zero cells. *in Vorbereitung.*

**Kukat, C.**, Kneissl, A., Schäfer, I. und Seibel, P. (2007).

Confocal multiphoton microscopy. *Cytometry Part A* 71A(7), 523.

## Kongressbeiträge in Form eines Posters/Abstracts:

### *Bari International Symposium on "Mitochondrial Physiology and Pathology", 2008*

Villani G., Di Nunno C., Latorre D., Capuano F., Del Bo R., Comi G. P., **Kukat C.**, Schäfer I., Schön A., Seibel P.,  
Co-Segregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids

### *1<sup>st</sup> Saxon Biotechnology Day, Dresden, 2007*

**Kukat C.**, Schäfer I., Kukat A., Seibel P.,  
Distribution of mitofusin 2 (Mfn2) after the formation of megamitochondria

Schäfer I., **Kukat C.**, Kukat A., Seibel P.,  
Mitochondrial import of peptide conjugated DNA

### *12<sup>th</sup> Leipziger Workshop: Cytomics and Translational Medicine, 2007*

**Kukat C.**, Kneissl A., Schäfer I., Seibel P.,  
Confocal Multiphoton Microscopy

### *5<sup>th</sup> Biotechnology Symposium of the University of Leipzig, 2006*

**Kukat C.**, Kneissl A., Schäfer I., Seibel P.,  
Dynamics of the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) in human cells

Kneissl A., **Kukat C.**, Schäfer I., Seibel P.,  
Comparison of a 143B rho<sup>0</sup> cell line devoid of mtDNA with its parental wild-type

Stöbel T., **Kukat C.**, Kneissl A., Schäfer I., Seibel P.,  
Analyzing the mitochondrial fusion activity

Schäfer I., Kneissl A., **Kukat C.**, Seibel P.,  
Import of peptide conjugated nucleic acids into mitochondria

### *4<sup>th</sup> Biotechnology Symposium of the University of Leipzig, 2005*

**Kukat C.**, Pospischil K., Kneissl A., Schäfer I., Seibel P.,  
Application of photoactivatable GFP to investigate dynamics of human mitochondria

Kneissl A., **Kukat C.**, Schäfer I., Seibel P.,  
Destruction of endogenous mtDNA – Establishing a novel method utilising a restriction endonuclease

Schäfer I., Kneissl A., **Kukat C.**, Seibel P.,  
Variability of the mitochondrial genome in cancer

Schäfer I., Kneissl A., **Kukat C.**, Seibel M.,  
Peptide mediated DNA import into mitochondria

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: K U K A T  
Vorname: C H R I S T I A N  
Geburtsdatum: 30. September 1975  
Geburtsort: Landshut  
Familienstand: verheiratet

### Bildungsweg

---

1982 – 1986      Grundschule, Ast  
1986 – 1996      Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut (Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)  
1996 – 1997      Wehrdienst bei 3./Gebirgspionierbataillon 8, Brannenburg  
1997 – 2000      Studium der Biotechnologie, Fachhochschule Weihenstephan, Freising  
2000 – 2004      Studium der Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg (Abschluss: Diplom-Biologe Univ.)  
2004 – 2008      Promotion an der Professur für Molekulare Zelltherapie, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum (BBZ), Universität Leipzig, Leipzig bei Prof. Dr. Peter Seibel  
seit 2008      Post-Doctoral Position am Karolinska Institutet, Department of Laboratory Medicine, Division of Metabolic Diseases, Stockholm, Schweden bei Prof. Dr. Dr. Nils-Göran Larsson

# Danksagung

Nachdem die Promotion vollbracht ist, fällt einem auf, dass man dieses Werk ohne die Hilfe anderer nicht erfolgreich zu Ende bringen könnte. Auf dieser Seite habe ich nun noch einmal die Gelegenheit, allen Unterstützern „Danke!“ zu sagen.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Seibel bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit zur Promotion und dafür, dass er immer auf meine Ideen vertraut hat und sie mich selbständig hat durchführen lassen.

Meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich herzlich für die unkomplizierte Übernahme dieser Aufgabe.

Herrn Prof. Dr. Krohne bin auch zu großem Dank verpflichtet, da er immer ein Ohr für experimentelle Fragen hatte und weil wir ihm die wunderschönen EM-Aufnahmen verdanken. Dank gilt auch Frau PD Dr. Astrid Schön, die es geschafft hat, meine Abstracts immer so ausgeklügelt zu korrigieren, dass die Wortzahl gleich blieb.

Für das gute Arbeitsklima, die sauberen Labore und die experimentelle sowie moralische Unterstützung in vielen Lebenslagen danke ich von ganzem Herzen Birgit „Börschid“ Löffler, Diana Behrens, Christina „Paula“ Paul, Mario „Majo“ Krehan, Ingo Schäfer, Alexandra Kukat, Mandy Bloch, Angela Mühlberg, Jessica Ferling, Friederike „Riki“ Baum sowie allen Praktikanten/Diplomanden etc. die ich hier nicht namentlich aufliste.

Ingo erwähne ich noch einmal, da er für Computerprobleme der Ansprechpartner Nr. 1 ist.

Ein großer Dank geht an alle diejenigen, die mir Materialien wie Antikörper, Vektoren etc. zur Verfügung gestellt haben.

Frau Heilos danke für die unermüdliche kompetente Beratung in allen Fragen zu amtlichen Promotionsangelegenheiten.

Nicht vergessen möchte ich meine Familie, Schwiegerfamilie und engen Freunde, die es mir erst ermöglicht haben, so weit in meinem Leben zu kommen und immer unterstützend für mich da sind!

Der allergrößte Dank geht an meine Ehefrau Alex, die mir immer zur Seite stand, mich immer unterstützte – auch bei Experimenten – und ohne die alles nichts wäre!