

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Einfluss der mitochondrialen Membranarchitektur auf die mitochondriale Calcium-Homöostase

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2023

Vorgelegt von Tobias Bernhard Deisemann

Geb. am: 13.12.1995 in Freiburg im Breisgau

Erstgutachter: Prof. Dr. Martin van der Laan

Betreuer: Dr. Alexander von der Malsburg

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Zusammenfassung	10
Abstract	12
1. Einleitung.....	13
1.1 Mitochondrien besitzen eine hochspezialisierte Innenmembran.....	14
1.1.1 Der MICOS-Komplex und Crista Junctions – ein Überblick.....	15
1.1.2 Die MICOS-Kernuntereinheit MIC60	16
1.1.3 Der MIC10-Subkomplex als Rückgrat der Crista Junctions.....	17
1.1.4 Die pathophysiologische Bedeutung des MICOS-Komplexes...	19
1.2 MICOS-Interaktionspartner im Fokus.....	20
1.2.1 DNAJC11 – Ein MICOS Interaktionspartner unbekannter Funktion.....	20
1.2.1.1 Punktmutation im murinen DNAJC11 verursacht eine neuromuskuläre Symptomkonstellation	21
1.2.1.2 DNAJC11 als Schnittstelle zwischen Mitochondrien und Zytosol.....	21
1.2.2 Tafazzin und Cardiolipin als weitere Grundsteine intakter Cristae Struktur.....	22
1.2.2.1 Die unterschiedliche Lipidzusammensetzung in den mitochondrialen Membranen.....	22
1.2.2.2 Tafazzin und die Cardiolipin-Homöostase	24
1.2.2.3 Cardiolipin im Kontext mitochondrialer Funktion.....	25
1.2.2.4 Defekte im Tafazzin-Gen als Ursache des hereditären Barth-Syndroms	25
1.2.3 CCDC127 – ein neuer MICOS-Interaktionspartner	27
1.3 Mitochondrien und die zelluläre Calcium-Homöostase	28
1.3.1 Charakteristika der zellulären Verarbeitung von Calciumsignalen	28
1.3.2 Der Mitochondriale Calcium Uniporter MCU.....	30
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	33
2. Material und Methodik	34
2.1 Material.....	34
2.1.1 Geräte.....	34
2.1.2 Chemikalien	35
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.4 Antikörper	37

2.1.5	Zelllinien.....	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Zellkultur	38
2.2.1.1	Kultivierung humaner Zelllinien	38
2.2.1.2	Passagieren humaner Zellen	38
2.2.1.3	Einfrieren von humanen Zellen	39
2.2.1.4	Auftauen von humanen Zellen	39
2.2.1.5	Transiente Transfektion	39
2.2.2	Isolation von Mitochondrien	40
2.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	40
2.2.4	Proteinase K Verdau (<i>protease accessibility assay</i>).....	40
2.2.5	Das Calciumtransport-Assay mit isolierten Mitochondrien	41
2.2.5.1	Auswertung, Normierung & Statistik	43
2.2.6	SDS-PAGE	44
2.2.7	Western Blot	44
2.2.8	Blue Native Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	45
2.2.9	Das TMRE-Assay Kit zur Erfassung des Membranpotentials ...	46
2.2.10	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.10.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	47
2.2.10.2	Plasmid Isolation mittels QIAGEN® Plasmid Midi Kit	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Etablierung eines Calciumtransport-Assays mit isolierten Mitochondrien.....	48
3.1.1	Isolierte Mitochondrien zeigen Fluoreszenzsignalantwort infolge eines Calciumstimulus	53
3.1.2	Der IMG-Puffer schafft eine isotonische Umgebung	54
3.1.3	Triton X-100 zeigt maximales Calciumsignal, gibt Hinweise auf mitochondriale Integrität und Transporter-vermittelten Calciumtransport.....	56
3.1.4	Calciumtitration zeigt Beziehung zwischen zugegebener Calciummenge und Fluoreszenzantwort	59
3.1.5	Ru360 blockiert mitochondriale Calciumaufnahme und unterstreicht so Bedeutung von MCU für das Fluoreszenzsignal.....	61
3.1.6	Das Fluoreszenzsignal entspricht der MCU vermittelten Calciumaufnahme.....	64
3.2	Mitochondrien aus den MIC10- und MIC60-Knockout Zelllinien zeigen defizitäre mitochondriale Calciumaufnahme.....	65

3.2.1	Die Calciumtransport Assays von MIC10- und MIC60-Knockout Mitochondrien zeigten eine verminderte Calciumaufnahmekapazität	65
3.2.2	Moderat verminderte MCU-Menge in Kernuntereinheiten-Knockouts	67
3.2.3	Der MCU-Komplex in Mitochondrien aus den Δ MIC10 und Δ MIC60 Zelllinien	68
3.2.4	Mitochondrien der Δ MIC10 und Δ MIC60 Knockout Zelllinien besitzen ein intaktes Membranpotential	68
3.3	Mitochondrien aus Tafazzin- und DNAJC11-Knockout-Zelllinien zeigten Defekte im mitochondrialen Calciumtransport	70
3.3.1	Verminderte Calciumaufnahme in Mitochondrien aus Tafazzin- und DNAJC11 Knockout Zelllinien	71
3.3.2	Die Proteinlevel von Δ DNAJC11-5, Δ TAZ-29 und Δ MCU-30 im Western Blot	73
3.3.3	BN-PAGE zeigt <i>Downshift</i> des MCU-Komplexes in Δ TAZ Mitochondrien	74
3.3.4	TMRE-Assay zu Detektion potenzieller Membranpotentialdefekte	74
3.4	HEK293T-Zellen mit CCDC127-Knockout besitzen eine suffiziente Calciumaufnahme	76
3.4.1	Unveränderte Proteinlevel in Δ CCDC127 G2-4 im Vergleich zu HEK293T Mitochondrien	78
3.4.2	Die CCDC127 Knockout-Zellen zeigten keine Defekte des Membranpotentials	78
4	Diskussion	79
4.1	Das Calciumtransport Assay – eine neue Methode zur Visualisierung mitochondrialer Calciumaufnahme von isolierten Mitochondrien	79
4.1.1	Mitochondrien – das Organell im Fokus	79
4.1.2	Mito-LAR-GECO 1.2 als Calciumsensor	80
4.1.3	MCU-vermittelter Calciumtransport als Grundlage des Fluoreszenzsignals	82
4.1.4	Einfluss der verwendeten Calciumkonzentration auf das Fluoreszenzsignals	86
4.1.5	Die Inhibition der Calciumaufnahme durch Ru360 und die MCU Knockout Zelllinie	86
4.1.6	Limitationen des in-organello Calcium Assays	87
4.2	MIC10- und MIC60 Knockout Mitochondrien zeigen reduzierte Antwort auf Calciumstimulus	88
4.2.1	Die Verbindung zwischen MICOS und mitochondrialer Calciumhomöostase	89

4.3	Hinweise auf defizitäre Calciumaufnahme in Mitochondrien der DNAJC11 Knockout Zelllinie	91
4.4	Der Tafazzin-Knockout bedingt eine reduzierte mitochondriale Calciumaufnahme	93
4.5.1	Störung im <i>Assembly</i> des MCU-Komplexes als potenzielle Ursache defizitärer Calciumaufnahme in Δ TAZ-Mitochondrien	93
4.5	Limitationen der Calcium-Phänotypen	95
4.6	Das Calciumtransport Assay zeigte eine reduzierten Calciumtransport in verschiedenen Mitochondrienpopulationen – Ein Überblick	97
5.	Anhang	100
5.1	Protokoll des TECAN <i>plate readers</i> für das in organello Calcium Assays.....	100
5.2	Protokoll des TECAN <i>plate readers</i> für die TMRE-Membranpotentialmessungen	103
	Literaturverzeichnis	105
	Danksagung	115
	Lebenslauf.....	116

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
BIP	HSP70 aus dem Endoplasmatischen Retikulum
BN-PAGE	<i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
CCDC127	<i>Coiled-coil-domain-containing protein 127</i>
DAG	Diacylglycerol
DNAJC11	<i>DnaJ homolog subfamily C member 11</i>
DUF	<i>domain of unknown function</i>
E.coli	Escherichia coli
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMRE	Essential Mitochondrial Ca ²⁺ Regulator
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F/F ₀	Fluoreszenzsignal normiert auf Grundfluoreszenzsignal
FCCP	Carbonyl cyanide- <i>p</i> -trifluoromethoxyphenylhydrazone
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
HEK-Zellen	<i>Human embryonic kidney</i> Zellen
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IBM	<i>Inner boundary membrane</i>

IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
MAMs	<i>Mitochondria associated membranes</i>
MCLC	Monolysocardiolipin
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
MCUb	<i>Mitochondrial calcium uniporter regulatory subunit MCUb</i>
MCUC	MCU Komplex
MCUR1	<i>MCU regulator 1</i>
MERCS	<i>Mitochondria ER contact sites</i>
MIB-Komplex	<i>Mitochondrial intermembrane space bridging</i> Komplex
MICOS	<i>Mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>
MICU1	<i>Mitochondrial calcium uptake Protein 1</i>
MICU2	<i>Mitochondrial calcium uptake Protein 2</i>
MICX	MIC-Protein des MICOS-Komplexes mit ungefährender Molekülmasse
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
N-terminal	Amino-terminal
n.s.	Nicht signifikant
NCLX	<i>Mitochondrial sodium/calcium exchanger protein</i>
OPA1	<i>Optic Atrophy 1</i>
PDP1	<i>Pyruvate dehydrogenase phosphatase 1</i>
PGP	Phosphatidylglycerolphosphat
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>

PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFU [a.u.]	<i>Relative fluorescent units [arbitrary unit]</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAM-Komplex	<i>Sorting and assembly machinery Komplex</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmatic-/endoplasmatic reticulum calcium ATPase</i>
TAZ	Tafazzin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMRE	Tetramethylrhodamin-methylester
TOM-Komplex	<i>Translocase of the outer membrane Komplex</i>
V	Volt
v/v	<i>Volume per Volume</i>
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i>
zpRFP	<i>Zyklisch-permutierten Red fluorescent protein</i>

Zusammenfassung

Mitochondrien sind Zellorganellen, die über eine komplexe Membranarchitektur verfügen. Sie bestehen aus einer äußeren sowie einer inneren Membran, wobei die innere Membran über zahlreiche Einstülpungen, den sogenannten Cristae, verfügt. Maßgeblich an der Erhaltung dieser Membraneinstülpungen ist der MICOS-Komplex mit seinen Kernuntereinheiten MIC10 und MIC 60 beteiligt. Dass eine gestörte Architektur der mitochondrialen Innenmembran Auswirkung auf die oxidative Phosphorylierung sowie auf den Proteinimport haben kann, konnte bereits gezeigt werden. Unklar ist allerdings, ob sich die gestörte Membranarchitektur auch auf Signalwege auswirkt. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der second messenger Calcium. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Rolle der hochgradig organisierten Innenmembran von Mitochondrien bei der mitochondrialen Calciumhomöostase zukommt. Bereits etablierte Methoden zur Detektion des mitochondrialen Calciumflusses beziehen sich vor allem auf den zellulären Kontext und verwenden hierbei oft chemische Farbstoffe zur Generierung eines calciumabhängigen Fluoreszenzsignals. Derzeit etablierte Methoden mit isolierten Mitochondrien basieren hingegen meist auf der Zugabe eines fluoreszenz-basierten Sensors in die Puffer-Lösung und detektieren so die Calciumaufnahme von Mitochondrien indirekt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Detektion des Calciumtransports in isolierten Mitochondrien mit einem genetisch codierten, in der mitochondrialen Matrix lokalisierten, Calciumsensor etabliert. Dies ermöglicht, im Gegensatz zu verbreiteten Methoden mit isolierten Mitochondrien, die direkte Detektion des Anstiegs der Calciumkonzentration in der mitochondrialen Matrix. Die Calciumaufnahme wird durch den Mitochondrialen Calcium Uniporter, kurz MCU, vermittelt. Durch das Calciumtransport Assay können Defekte innerhalb des mitochondrialen Calciumtransports direkt an isolierten Mitochondrien beurteilt werden und somit Defekte an Ort und Stelle detektiert werden. Anhand verschiedener Knockout-Zelllinien, welche eine gestörte Membranarchitektur aufweisen, wurde deren Calciumaufnahme mittels diesem Calciumtransport Assay untersucht. Es zeigten sich hierbei Defekte in der Calciumaufnahme in den Knockout-Zelllinien der MICOS-Kernuntereinheiten MIC10 und MIC60. Sie sind maßgeblich an der Formierung von *Crista Junctions* beteiligt und erhalten so die Architektur der inneren Membran. Auch in Mitochondrien aus der DNAJC11 und Tafazzin Knockout-Zelllinie, für die Defekte der Membranarchitektur beschrieben wurden, konnte eine verminderte Calciumaufnahme gezeigt werden. In der Tafazzin Knockout-Zelllinie zeigte sich zudem ein verändertes Migrationsverhalten des MCU-Komplexes, was möglicherweise ebenfalls zu dem beobachteten Phänotyp beiträgt. Eine im Vergleich

zu HEK293T Zellen normale Calciumaufnahme konnte in der Knockout Zelllinie des MICOS-Interaktionspartners CCDC127 beobachtet werden. Diese weist eine unauffällige Membranarchitektur auf. Anzunehmen ist, dass eine intakte Membranarchitektur eine entscheidende Rolle für die mitochondriale Calciumaufnahme besitzt. Eine gestörte Funktion der untersuchten Proteine ist bei neurodegenerativen als auch kardiologischen Erkrankungen beschrieben worden. Hier könnte eine defizitäre Calciumaufnahme pathophysiologische Relevanz besitzen. Ziel dieser Arbeit ist es somit, die Auswirkung einer gestörten mitochondrialen Membranarchitektur auf die mitochondriale Calciumhomöostase zu studieren.

Abstract

Mitochondria are organelles with a complex membrane architecture. They consist of an outer and an inner membrane. The inner membrane has multiple invaginations, the so-called cristae. MICOS is a protein complex, which is crucial for the maintenance of cristae and therefore for the mitochondrial architecture. The core components of MICOS are Mic 10 and MIC 60. It is well known, that a disturbed mitochondrial architecture affects the oxidative phosphorylation and protein import. However, the effect of a disturbed architecture on cellular signaling are currently unknown. A very prominent member of cellular signaling is the second messenger calcium. This thesis addresses the relevance of a highly organized inner mitochondrial membrane for the mitochondrial calcium homeostasis. Established methods for mitochondrial calcium measurements are focusing on the whole cell and are usually based on chemical sensors that detect a calcium-dependent fluorescent signal. Currently established methods for measurements in isolated mitochondria are mainly using extramitochondrial chemical sensors and thereby only indirectly detect the mitochondrial calcium uptake. In this work, I established a novel method for the detection of calcium in isolated mitochondria with a genetically encoded calcium sensor, localized in the mitochondrial matrix. This provides an insight into calcium signals directly derived from the mitochondria. The corresponding calcium transport is mediated by the mitochondrial calcium uniporter MCU. Based on knockout cell lines, which show a disturbed inner mitochondrial membrane architecture, the calcium uptake was analyzed by the calcium transport assay. The knockouts of the MICOS complex core subunits, MIC10 and MIC60, displayed a defective calcium transport. These are relevant for the formation of crista junctions and the maintenance of the inner membrane architecture. Mitochondria of DNAJC11- and Tafazzin cell line, which also display a disturbed inner mitochondrial membrane architecture, also showed a defective calcium uptake. In mitochondria from Tafazzin knockout cell line, the MCU complex additionally is conspicuous, which may also contribute to the reduced calcium uptake. Compared to mitochondria from HEK293T cells, mitochondria from the knockout cell line of the MICOS interactor CCDC127 displayed a regular calcium uptake. These have an inconspicuous membrane architecture. Accordingly, the inner mitochondrial membrane architecture seems to be essential for the mitochondrial calcium homeostasis. A disturbed function of the analyzed proteins is described in neurodegenerative and cardiac diseases. In these cases, a defective mitochondrial calcium uptake could potentially have pathological relevance. Thus, the main goal of this thesis was to focus on the relevance of mitochondrial membrane architecture in relation to the mitochondrial calcium homeostasis.

1. Einleitung

Mitochondrien sind essenzielle Zellorganellen, welche große Bekanntheit durch ihre Fähigkeit zur zellulären Energiebereitstellung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) erhalten haben. Jedoch stellt die oxidative Phosphorylierung nur einen Teil des mitochondrialen Aufgabenspektrums dar. Mitochondrien sind essentielle Bestandteile zellulärer Prozesse wie der Apoptose, des Metabolismus, Lipid-Transport sowie der Calcium-Homöostase (zusammengefasst in Anderson et al, 2019). Ferner sind mitochondriale Defekte in verschiedene Krankheitsprozesse involviert (zusammengefasst in Naia et al, 2017; Colina-Tenorio et al, 2020). Mitochondrien besitzen dementsprechend einen hochspezialisierten Aufbau, der sich vor allem in einem hohen Grad an Kompartimentierung äußert. Sie sind von zwei Membranen umgeben, einer äußeren und einer inneren Membran. Die äußere Membran ist glatt und umschließt das Zellorganell. Die innere Membran zeigt hingegen viele charakteristische Invaginationen, die sogenannten Cristae. Somit können verschiedene wässrige Kompartimente voneinander abgegrenzt werden. Zwischen der inneren und äußeren Membran befindet sich der sogenannte Intermembranraum und von der inneren Membran umschlossen ist die mitochondriale Matrix. Die innere Membran kann weiter unterteilt werden in die innere Randmembran (*inner boundary membrane*, IBM), welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur äußeren Membran befindet, sowie die Cristae-Membranen, welche die Invaginationen der mitochondrialen Innenmembran darstellen (zusammengefasst in Colina-Tenorio et al, 2020). Die Membranen können zudem über ihre Proteinausstattung charakterisiert werden. In der unterschiedlichen Proteinzusammensetzung zeigen sich die verschiedenen Aufgaben der Membransysteme. Die äußere Membran beinhaltet Proteine für die Kommunikationen mit anderen Zellorganellen sowie Maschinerien für den Import nukleär kodierter, mitochondrialer Proteine (zusammengefasst in

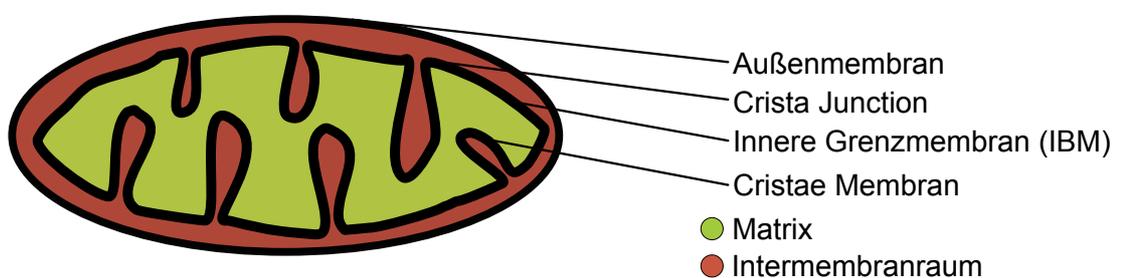


Abbildung 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Membranarchitektur

Mitochondrien sind von zwei Membranen umgeben. Die glatte Außenmembran grenzt das Mitochondrium gegen das Zytosol und die benachbarten Organellen ab. Zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran befindet sich der Intermembranraum. Die innere Mitochondrienmembran gliedert sich einerseits in die Innere Randmembran (IBM), welche parallel zur Außenmembran verläuft, und den Cristae, welchen Einstülpungen der Innenmembran entsprechen. Der Übergang zwischen IBM und Cristae Membran wird Crista Junction genannt. Das von der Innenmembran umschlossene Kompartiment entspricht der mitochondrialen Matrix.

Wiedemann & Pfanner, 2017). Die innere Membran zeigt hingegen eine heterogene Proteinzusammensetzung mit regionalen Unterschieden. Die innere Randmembran beherbergt zum Beispiel die Maschinerien für den Import von Proteinen der inneren mitochondrialen Kompartimente. Dagegen ist in der Crista Membran die Maschinerie der oxidativen Phosphorylierung lokalisiert. Sie beinhaltet die Atmungskettenkomplexe sowie die F_1F_0 -ATP-Synthase (Vogel et al, 2006; Zick et al, 2009).

1.1 Mitochondrien besitzen eine hochspezialisierte Innenmembran

Die beiden Bereiche der inneren Membran, die IBM sowie die Crista Membran, werden durch die sogenannte *Crista Junctions* verbunden. Diese Orte starker Membrankrümmung agieren als dynamische Diffusionsbarrieren und tragen somit maßgeblich zur Erhaltung der asymmetrischen Proteinverteilung innerhalb der Innenmembran bei (Mannella, 2006a, 2006b; Vogel et al, 2006). Durch die Invaginationen der Innenmembran vergrößert sich deren Oberfläche und schafft somit reichlich Platz für die Proteinmaschinerien der oxidativen Phosphorylierung. Die räumliche Konzentrierung hat auch funktionelle Vorteile. Sie schafft Mikrokompimente, welche durch die chemiosmotische Kopplung auf die Generation von ATP spezialisiert sind (Mitchell, 1961; Mannella, 2006b; Strauss et al, 2008; Zick et al, 2009). Erste Einblicke in die Proteinzusammensetzung kamen durch die Beobachtung, dass der Cytochrom c Freisetzung bei der Einleitung der Apoptose ein *Remodelling*-Prozess und eine Öffnung der *Crista Junctions* vorausgeht (Scorrano et al, 2002). Weitere Studien zeigen eine Beteiligung von *Optic atrophy 1* (OPA1), einer Dynamin-ähnliche GTPase, an diesem Prozess (Olichon et al, 2003; Arnoult et al, 2005; Cipolat et al, 2006; Frezza et al, 2006). Jedoch wird bis heute die exakte Rolle von OPA1 bei der Ausbildung, Erhaltung und Stabilität von *Cristae Junctions* kontrovers diskutiert (Barrera et al, 2016; Glytsou et al, 2016; Harner et al, 2016; Stephan et al, 2020; Cretin et al, 2021). Ein großer Durchbruch zum besseren Verständnis der Bildung und Erhaltung von *Cristae Junctions* gelang letztlich durch die Identifikation des MICOS-Komplexes (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) (Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012; Jans et al, 2013).

1.1.1 Der MICOS-Komplex und Crista Junctions – ein Überblick

An *Crista Junctions* wurde ein großer hetero-oligomerer Protein Komplex identifiziert (Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012; Jans et al, 2013), welcher nun allgemeingültig als *mitochondrial contact site and cristae organizing system* (MICOS) bezeichnet wird (Pfanner et al, 2014). Die Bedeutung von MICOS für die Erhaltung der *Crista Junctions* zeigt sich an Auffälligkeiten betroffener Zellen beim Fehlen bestimmter MICOS-Untereinheiten. Das Fehlen einzelner MICOS-Untereinheiten geht mit der Auflösung der *Crista Junctions* einher. Es resultiert ein Verlust der Verbindung der Cristae Membranen von der inneren Randmembran, woraufhin die abgeschnürten Cristae als lamellenförmigen Membranpakete innerhalb der Matrix vorliegen (Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012). Des Weiteren stellt MICOS Verbindungen zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran her. Grundlage dieser Verbindung ist dessen Interaktion mit einigen Proteinen der Außenmembran, vor allem dem SAM- (*Sorting and assembly machinery*) Komplex und dem TOM- (*Translocase of the outer membrane*) Komplex (Xie et al, 2007; Zerbes et al, 2012a; Tang et al, 2020). Diese Schnittstellen tragen einerseits zum effizienten *Import* von nukleär kodierten Vorstufen-Proteinen (*Precursors*) bei (von der Malsburg et al, 2011; Bohnert et al, 2012), könnten aber andererseits zusätzlich als Verankerung für Cristae Junctions fungieren (Körner et al, 2012; Ott et al, 2012; Zerbes et al, 2012a). Störungen des MICOS-Komplexes resultieren in einer verminderten oxidativen Kapazität, worin sich die physiologische Relevanz einer intakten Cristae-Struktur widerspiegelt (Darshi et al, 2011; Zerbes et al, 2012b; Weber et al, 2013; Guarani et al, 2015). Zudem ist der MICOS-Komplex hochkonserviert (Zerbes et al, 2012b; Muñoz-Gómez et al, 2015; Huynen et al, 2016). Der MICOS Komplex setzt sich aus verschiedenen MIC-X Proteinen zusammen, wobei X die ungefähre molekulare Masse in Hefezellen widerspiegelt (Pfanner et al, 2014). Die erste identifizierte Komponente des MICOS-Komplexes war MIC60 (John et al, 2005). Heute weiß man, das MIC60 und MIC10 die Kernuntereinheiten des MICOS-Komplexes darstellen (Darshi et al, 2011; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012). Diese organisieren zwei Subkomplexe. Der MIC60-Subkomplex wird durch MIC60, MIC19 sowie MIC25 in Säugern gebildet. Der MIC10-Subkomplex durch MIC10, MIC13 (entspricht MIC12 in Hefen), MIC26 und MIC27. (An et al, 2012; Weber et al, 2013; Bohnert et al, 2015; Friedman et al, 2015; Guarani et al, 2015; Koob et al, 2015; Anand et al, 2016; Zerbes et al, 2016).

1.1.2 Die MICOS-Kernuntereinheit MIC60

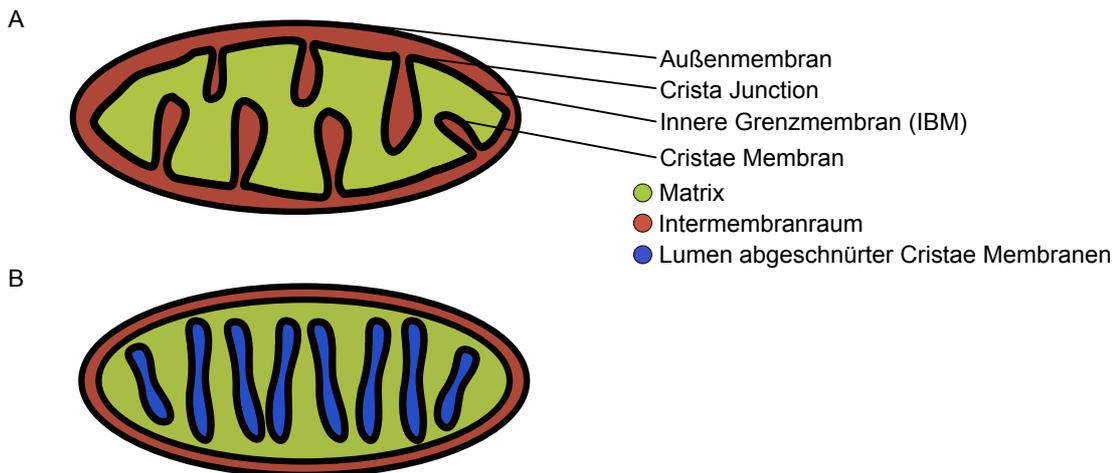


Abbildung 2: Schematische Darstellung der gestörten Innenmembranarchitektur im Rahmen eines Verlusts an *Crista Junctions*.

- (A) Dargestellt ist ein Mitochondrium mit intakter Membranarchitektur und Kompartimentierung.
 (B) Infolge von Defekten in Komponenten der Membranarchitektur, wie beispielsweise den MICOS Kernuntereinheiten MIC10 oder MIC60, kommt es zum Verlust der *Crista Junctions* und infolgedessen zur Loslösung der Cristae Membranen von der restlichen Innenmembran. Die Cristae Membranen liegen daraufhin als lamelläre Membranstapel in der mitochondrialen Matrix vor.

Die erste identifizierte Komponente des MICOS-Komplexes war MIC60. Damals nannte man dieses Protein noch Mitofilin oder IMMT in Säugern, beziehungsweise Fcj1 in Hefen. MIC60 befindet sich vor allem an den *Crista Junctions* und ist für die typische Cristae Struktur und die Erhaltung der *Crista Junctions* vonnöten. Mitochondrien aus MIC60 Knockout-Zelllinien zeigen abnorme Cristae-Strukturen, welche mit einer drastischen Abnahme an *Crista Junctions* einhergehen, und Membranstapel im Inneren der Mitochondrien zur Folge haben (John et al, 2005; Rabl et al, 2009). Untersuchungen zu den evolutionären Ursprüngen von MIC60 erbrachten Einblicke in die Herkunft von Mitochondrien. Im Einklang mit der Theorie zur endosymbiotischen Abstammung von Mitochondrien, konnte ein MIC60 Homolog in α -Proteobakterien identifiziert werden, dessen modularer Aufbau dem eukaryotischen MIC60 recht ähnlich ist. Einige α -Proteobakterien besitzen des Weiteren intrazytoplasmatische Membranen, in denen alphaMIC60 angereichert ist und welche die Vorläufer von Cristae sein könnten (Muñoz-Gómez et al, 2015, 2017). MIC60 wird in der mitochondrialen Innenmembran über eine N-terminale (amino-terminale) Transmembrandomäne verankert, während der große hydrophile Anteil in den Intermembranraum ragt. Dieser besteht aus einer zentralen *Coiled-Coil*-Domäne sowie einer hochkonservierten C-terminalen (carboxy-terminalen) Mitofilin-Domäne (Odgren et al, 1996; Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011). Der MIC60-Subkomplex ist einerseits an der Erhaltung der Cristae-Struktur beteiligt, trägt allerdings andererseits maßgeblich zur Ausbildung von Schnittstellen zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran bei.

Zahlreiche unabhängige Studien charakterisierten die Interaktion des MIC60-Subkomplexes mit dem *Translocase of the outer membrane* Komplex (TOM) sowie dem *Sorting and assembly machinery* Komplex (SAM) für die Insertion von β -barrel Proteinen in die Außenmembran (Xie et al, 2007; Darshi et al, 2011; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012; Bohnert et al, 2012; Zerbes et al, 2012a; Körner et al, 2012; Ott et al, 2012; Ding et al, 2015). Sowohl die zentrale *Coiled-Coil*-Domäne als auch die C-terminale Domäne von MIC60 scheinen einen wichtigen Beitrag zu diesen Interaktionen zu leisten (Körner et al, 2012; Zerbes et al, 2012a). Für die Formation der Schnittstellen zu den Proteinmaschinerien der äußeren Membran ist MIC60 essentiell. Allerdings beruht die Erhaltung und Bildung der *Crista Junctions* sowohl auf dem MIC60- als auch auf dem MIC10-Subkomplex (zusammengefasst in Wollweber et al, 2017).

1.1.3 Der MIC10-Subkomplex als Rückgrat der Crista Junctions

Den zweiten zentralen Bestandteil des MICOS-Komplexes stellt der MIC10-Subkomplex dar, der sich aus MIC10 sowie MIC26, MIC27 und MIC13/MIC12 zusammensetzt (Bohnert et al, 2015; Guarani et al, 2015). MIC10 ist ein essentieller Bestandteil für die Erhaltung von *Crista Junctions*, denn der Verlust von MIC10 bedingt ein annähernd komplettes Verschwinden von *Crista Junctions* in Hefezellen (von der Malsburg et al, 2011; Bohnert et al, 2015). Andererseits besitzt MIC10 eine ebenso wichtige Rolle in der Formation von *Crista Junctions*. Die Überexpression von MIC10 in Hefe führte zu deformierten Cristae und elongierten *Crista Junction*-Strukturen (Bohnert et al, 2015). Des Weiteren induziert aufgereinigtes MIC10 aus Hefen in einem synthetischen Membranmodell aus großen lamellenförmigen Vesikeln hochgradige Membrankrümmungen (Barbot et al, 2015). MIC10 ist ein integrales Membranprotein und besteht aus zwei kleinen Transmembransegmenten. Diese sind verbunden über eine kurze Schlaufe aus positiv geladenen Aminosäuren, welche in die mitochondriale Matrix ragen und wichtig sind für die zielgerichtete Lokalisation von MIC10 in der inneren mitochondrialen Membran (Bohnert et al, 2015). Sowohl das C- als auch das N-terminale Ende befinden sich im Intermembranraum (Barbot et al, 2015; Bohnert et al, 2015). Innerhalb der beiden Transmembrandomänen enthält MIC10 zwei konservierte Glycin-reiche Motive, welche für die Bildung stabiler Homo-Oligomere aus MIC10 an den *Crista Junctions* verantwortlich sind (Barbot et al, 2015; Bohnert et al, 2015). Die beiden Transmembransegmente von MIC10 nehmen eine keilförmige Orientierung zueinander ein. Somit bedarf MIC10 einer größeren Fläche auf der dem Intermembranraum zugewandten Seite der mitochondrialen Innenmembran als auf der Matrix-Seite. Durch diese V-förmige Konformation trägt MIC10 zur Ausbildung von Membrankrümmung an *Crista*

Junctions bei. Allerdings ist die Bedeutung von MIC10 nicht nur auf *Crista Junctions* beschränkt. Für die Krümmung an den Spitzen der Cristae Membranen ist zudem die F_1F_0 -ATP Synthase verantwortlich. Es wurde eine Fraktion von MIC10 identifiziert, welche mit der F_1F_0 -ATP Synthase interagiert und dadurch die Bildung größerer Oligomere der F_1F_0 -ATP Synthase fördert und diese stabilisiert (Rampelt et al, 2017a).

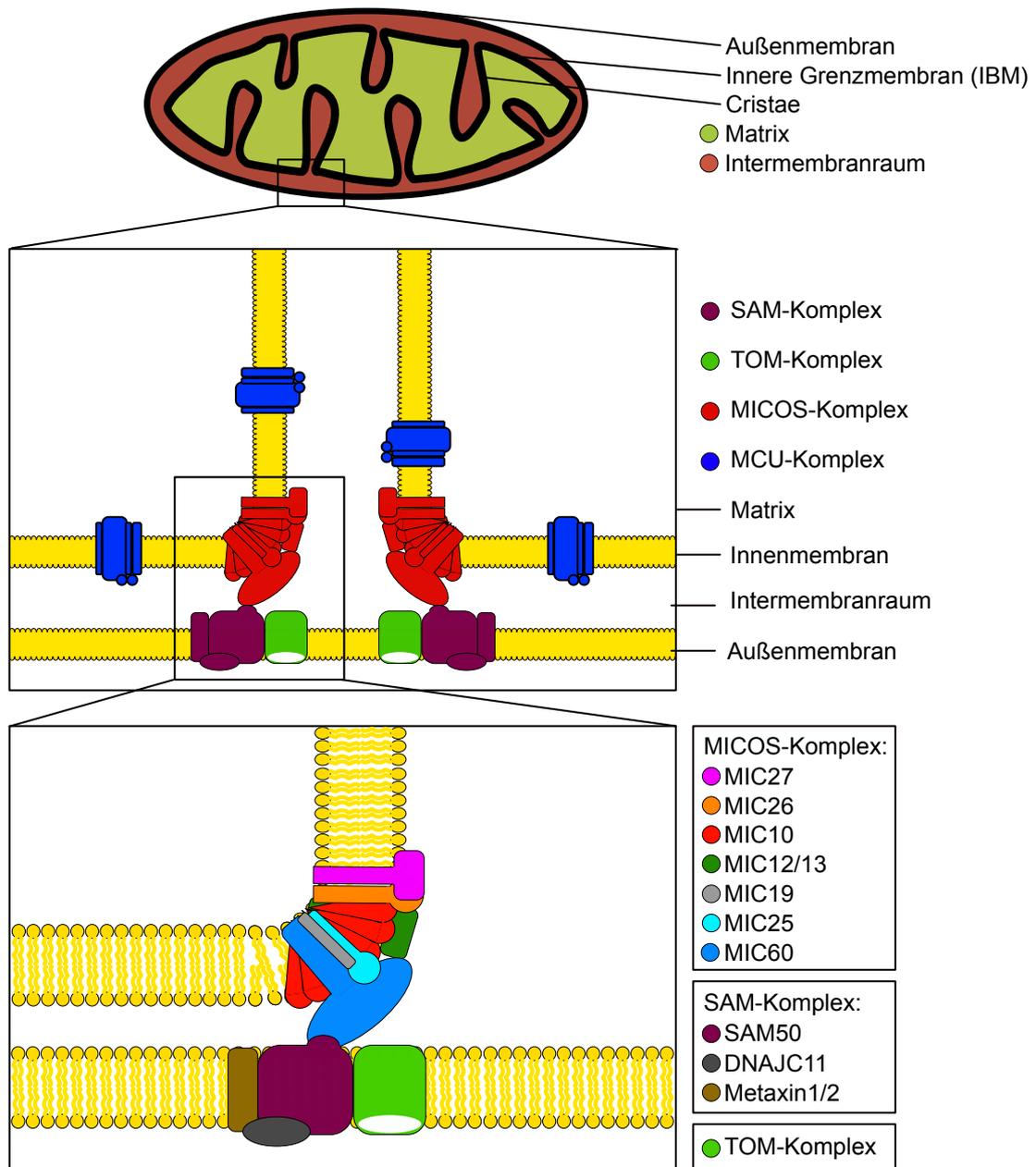


Abbildung 3: Schematische Darstellung sowohl des MICOS- als auch des MIB-Komplexes

Dargestellt sind zwei Vergrößerungsausschnitte aus dem oben gezeigten Mitochondrium. Die erste Vergrößerungsstufe stellt eine mögliche Anordnung der verschiedenen Komplexe zueinander dar. Zudem sind in der zweiten Vergrößerung die verschiedenen Untereinheiten des jeweiligen Komplexes dargestellt. Der MIB-Komplex (*membrane interspace bridging complex*) besteht aus MIC60, SAM50, Metaxin 1 und 2 sowie DNAJC11 (siehe hierfür 1.2.1.2).

1.1.4 Die pathophysiologische Bedeutung des MICOS-Komplexes

Die pathophysiologische Relevanz des MICOS-Komplexes ist vielseitig. Bekannt ist eine Verbindung zwischen MIC60 und der mitochondrialen Serin/Threonin Proteinkinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) (Tsai et al, 2018). Mutationen im PINK1-Gen wurden schon zuvor mit einer früh manifestierenden, autosomal rezessiv vererbten Form der Parkinson-Erkrankung assoziiert. Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um eine neurologische Erkrankung, welche ihren Ursprung im Untergang dopaminerger Neurone innerhalb der Substantia nigra hat (Valente, 2004). PINK1 scheint für die Erhaltung und den Umbau von *Crista Junctions* innerhalb von Mitochondrien wichtig zu sein. In Mitochondrien des Neuropils aus PINK1-null Drosophila-Larven zeigt sich eine gestörte Cristae-Struktur mit einem zwiebelartigen Muster mit Membranstapeln in der mitochondrialen Matrix. Zudem ist PINK1 für den Umbau von Mitochondrien, wenn diese vom Soma der Neuronen in die Dendriten und Synapsen transportiert werden, von Relevanz. Auf dem Weg dorthin werden vermehrt *Crista Junctions* aufgebaut (Tsai et al, 2018). Schon 2009 wurde über eine Interaktion zwischen PINK1 und MIC60 berichtet (Weihofen et al, 2009). Neuere Untersuchungen identifizieren MIC60 als Ziel für die Phosphorylierung durch PINK1. Diese Phosphorylierung an 2 Stellen innerhalb von MIC60 ist für die Erhaltung der Crista-Struktur bedeutsam (Tsai et al, 2018). Auch in menschlichen Zellen wurde die PINK1-vermittelte MIC60-Phosphorylierungsreaktion beschrieben. Die PINK1-vermittelte Phosphorylierung stärkt die Oligomerisierung von MIC60 und hat so einen stabilisierenden Effekt auf *Crista Junctions* (Tsai et al, 2018). Der PINK1-*Pathway* stellt derzeit eine Theorie zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen mit gestörter Cristae-Struktur dar (Colina-Tenorio et al, 2020). Bei Parkinson-Patienten wurden zudem vereinzelt Mutationen in der mitochondrialen Zielsequenz von MIC60 gefunden, wodurch die physiologische mitochondriale Lokalisation gestört sein könnte (Tsai et al, 2018). Somit offenbart sich die Möglichkeit, dass eine gestörte Cristae-Struktur mitbeteiligt sein könnte an der Pathogenese der Parkinson Erkrankung (Colina-Tenorio et al, 2020).

Neben neurodegenerativen Erkrankungen zeigen einige MICOS-Untereinheiten auch Bedeutung im Kontext einer weitverbreiteten Stoffwechselerkrankung, dem Typ-2-Diabetes. In Muskelbiopsien von Diabetes Typ-2 Patienten zeigen sich verminderte Proteinlevel von MIC19 (Hwang et al, 2010) als auch eine vermehrte Expression von MIC26 im Herzmuskelgewebe. Der Mechanismus für Letzteres könnte eine Lipid-Akkumulation in den Kardiomyozyten, vor allem bei übergewichtigen Patienten, darstellen (Lamant et al, 2006). Des Weiteren ist MIC26, alias Apolipoprotein O, auch bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) im Plasma erhöht. Bislang wird

diesem die Rolle eines unspezifischen Faktors für die Inflammation im Rahmen des ACS zugeschrieben (Yu et al, 2012).

Eine weitere pathophysiologische Bedeutung wird MIC13 (alias MIC12, QIL1) zugeschrieben. Mutationen in MIC13 scheinen für eine früh einsetzende mitochondriale Enzephalopathie und Lebererkrankung verantwortlich zu sein (Guarani et al, 2016; Zeharia et al, 2016). Die jungen Patienten weisen Zeichen einer neurodegenerativen Störung auf, wie eine verzögerte Entwicklung, zerebelläre Atrophie, sowie gestörte akustisch und visuell evozierte Potentiale. Zudem zeigen sie einen erhöhten Laktatspiegel, eine vermehrte Ausscheidung von 3-Methylglutarsäure mit dem Urin sowie eine gestörte Leberfunktion (Guarani et al, 2016; Zeharia et al, 2016). Die Symptome traten bei den beschriebenen Patienten schon kurz nach der Geburt auf (Guarani et al, 2016). Als ursächliche Mutation konnte eine Mutation im MIC13-Gen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend scheint eine gestörte Membranarchitektur der Mitochondrien auch pathophysiologische Relevanz zu besitzen.

1.2 MICOS-Interaktionspartner im Fokus

1.2.1 DNAJC11 – Ein MICOS Interaktionspartner unbekannter Funktion

Ausgehend von Mitofilin, dem heutigen MIC60, wurden weitere Proteine aus Mitochondrien als Interaktionspartner identifiziert. Hierbei handelte es sich unter anderem um Metaxin 1 und 2 und das zuvor schon beschriebene SAM50. Allerdings wurde auch ein bis dato unbekanntes Protein immunopräzipitiert (Xie et al, 2007). Anschließende Analysen zeigten, dass es sich hierbei um ein Protein der HSP40-Familie (*heat shock protein*) handelte, welches als DNAJC11 (*DnaJ homolog subfamily C member 11*) bezeichnet wird. Somit wurde das erste Mal die Verbindung zwischen DNAJC11 und MIC60 hergestellt. HSP40-Proteine interagieren in der Regel als Cochaperone mit HSP70-Proteinen und stimulieren deren ATPase-Aktivität. Diese stellen eine essenzielle Maschinerie innerhalb der Zelle und verschiedener Zellorganellen dar. Hitzeschockproteine spielen eine wichtige Rolle bei der regulierten Protein-Faltung, bei deren Degradierung und sind auch an deren Translokation über Membranen beteiligt. Hierdurch tragen sie zur Vermeidung von potentiell schädlichen Aggregationsereignissen durch Proteine innerhalb der Zelle maßgeblich bei (zusammengefasst in Kampinga & Craig, 2010; Hasegawa et al, 2018). DNAJC11 ist in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Ioakeimidis et al, 2014). Auf Basis dieser Daten lassen sich nur sehr vage Vermutungen über die genaue Funktion von DNAJC11, vor allem dessen Bedeutung

für die mitochondriale Funktion, anstellen. Auch die physiologische Relevanz der Interaktion von DNAJC11 und MIC60 bleibt offen.

1.2.1.1 Punktmutation im murinen DNAJC11 verursacht eine neuromuskuläre Symptomkonstellation

Erste Hinweise bezüglich der Bedeutung von DNAJC11 für die mitochondriale Homöostase und der Zellfunktion konnten im Mausmodell beobachtet werden. Infolge einer hypomorphen Spleißmutation von DNAJC11 weisen die Mäuse eine gestörte neuromuskuläre Funktion auf, welche sich vor allem in einem spastischen Muskeltonus äußert. Auffallend ist besonders die abnorme Stellung der Hinterbeine und die muskuläre Schwäche. Zusätzlich lassen sich noch Blutbildveränderungen feststellen. Untersuchungen der Motoneurone aus dem Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks dieser Mäuse enthüllen eine vermehrte Vakuolenbildung, sowohl im Soma als auch in den Dendriten. Diese Vakuolen wurden zwei verschiedenen Ursprüngen zugeordnet. Einerseits handelt es sich um ER-Anhäufungen und andererseits um Mitochondrien mit abnormaler Cristae-Struktur, welche einer gestörten Membranarchitektur entsprechen. *Rescue*-Experimente mit humanem DNAJC11 in homozygot mutierten Mäusen zeigen eine Reversibilität der Symptomatik der Mäuse unter Expression des intakten Proteins (Ioakeimidis et al, 2014). Da DNAJC11 der HSP40-Familie zugeordnet wird, ist die Interaktion zwischen DNAJC11 und zytosolischen HSP70 als sehr wahrscheinlich anzusehen. Eine Interaktion von HSPA1A (zytosolisches HSP70 Protein) mit DNAJC11 konnte gezeigt werden und stärkt dessen vermutete Rolle als Cochaperon (Violitzi et al, 2019). Durch bioinformatische Untersuchungen wurde eine J-Domäne am N-Terminus sowie eine DUF-Domäne (DUF = *domain of unknown function*) nahe dem C-Terminus gefunden (Ioakeimidis et al, 2014). Die J-Domäne in Cochaperonen ist essentiell für die Interaktion dieser mit HSP70-Proteinen, besonders für die Stimulation der ATPase-Aktivität der HSP70-Proteinmaschinerie (Kampinga & Craig, 2010). Zudem hat die J-Domäne besondere Bedeutung für die Lokalisation von DNAJC11 in der Peripherie der mitochondrialen Außenmembran (Ioakeimidis et al, 2014; Violitzi et al, 2019). Die zweite strukturelle Domäne innerhalb von DNAJC11 ist die sogenannte DUF-Domäne. Dieser wird die Protein-Protein-Interaktion von DNAJC11, wie beispielsweise zu HSPA1A, zugeschrieben (Ioakeimidis et al, 2014; Violitzi et al, 2019).

1.2.1.2 DNAJC11 als Schnittstelle zwischen Mitochondrien und Zytosol

Als weitere Interaktionspartner von DNAJC11 im Großhirngewebe transgener Mäuse konnten unter anderem Komponenten des MICOS-Komplexes als auch SAM50 identifiziert werden. Bei den MICOS-Untereinheiten handelt es sich um MIC60, MIC19

und MIC25. Des Weiteren zeigten sich Verknüpfungen zu Porinen der VDAC-Familie und der F_1F_0 -ATP-Synthase. DNAJC11 könnte als ubiquitäres mitochondriales Protein eine wichtige Schnittstelle an der Oberfläche der Mitochondrien repräsentieren. Allerdings ist auch denkbar, dass sich die Rolle von DNAJC11 in verschiedenen Geweben durch unterschiedliche Interaktionspartner unterscheidet (Violitzi et al, 2019). Über die Interaktion von DNAJC11 mit MIC60, MIC19 sowie dem SAM-Komplex aus der äußeren Mitochondrienmembran, ist DNAJC11 Teil des *Mitochondrial intermembrane space bridging complexes* (MIB-Komplex). Dieser besteht aus MIC60, MIC19, MIC25 SAM50, Metaxin 1 und 2 und DNAJC11 (Ott et al, 2012; Ding et al, 2015). In Zusammenschau der erhobenen Erkenntnisse ist derzeit eine mögliche Rolle von DNAJC11 im mitochondrialen Protein-Import zu vermuten (Violitzi et al, 2019).

1.2.2 Tafazzin und Cardiolipin als weitere Grundsteine intakter Cristae

Struktur

1.2.2.1 Die unterschiedliche Lipidzusammensetzung in den mitochondrialen Membranen

Nachdem im obigen Abschnitt der Fokus auf den wichtigen Proteinen sowie Proteinkomplexen, welche eine intakte Innenmembranstruktur gewährleisten, lag, soll nun eine weitere wichtige Komponente der Membranarchitektur betrachtet werden. Neben der Proteinkomposition spielt aber auch die Lipidzusammensetzung der Membran selbst eine entscheidende Rolle. Hier zeigen sich schon Unterschiede zwischen den beiden mitochondrialen Membranen. Dies betrifft vor allem Cardiolipin, welches nicht einmal 1% in der äußeren Membran, aber 18% in der inneren Membran von Mitochondrien aus Säugerzellen ausmacht. Von der Tendenz reziprok verhält es sich mit Phosphatidylcholin, welches deutlich vermehrt in der äußeren Membran vorkommt (zusammengefasst in Horvath & Daum, 2013). Cardiolipin besteht aus einer polaren Kopfgruppe und vier Acylgruppen. Die Grundstruktur besteht aus zwei 3-Phosphatidylgruppen, welche über ein Glycerol miteinander verbunden sind (zusammengefasst in Schlame, 2008). Cardiolipin kommt teilweise in den Zytoplasmamembranen von Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, vor (Renner & Weibel, 2011). Ein weiteres wichtiges Phospholipid der inneren Mitochondrienmembran ist Phosphatidylethanolamin. Dieses macht etwa 34% der Phospholipide innerhalb der inneren Membran aus (zusammengefasst in Horvath & Daum, 2013). Im Gegensatz zu anderen Phospholipiden, welche ebenfalls in den Membranen vorkommen, werden sowohl Cardiolipin als auch Phosphatidylethanolamin in bzw. an den mitochondrialen Membranen hergestellt

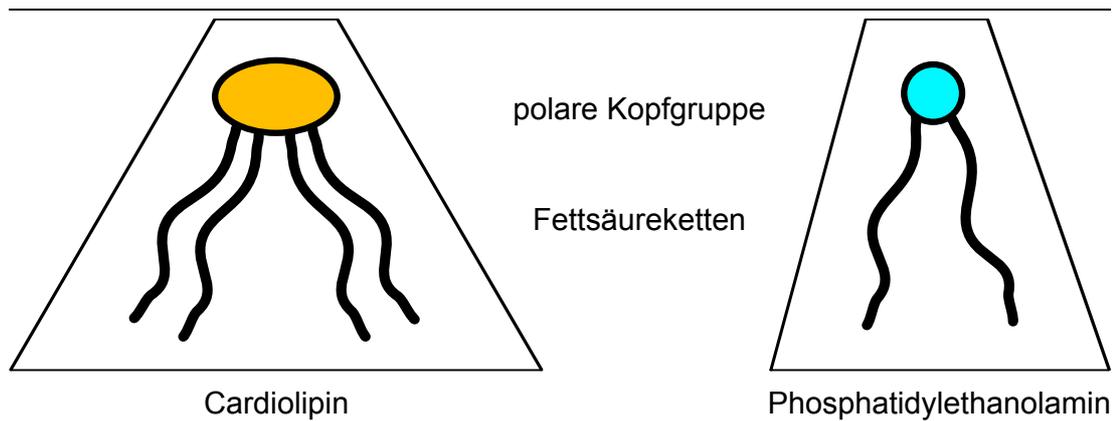


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Konus- bzw. Kegelförmigen Struktur von Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin

Sowohl Cardiolipin als auch Phosphatidylethanolamin bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und einem hydrophoben Schwanz aus Fettsäureketten. Durch die Konformation der Fettsäureketten ist der Schwanz ausladender als die Kopfgruppe und bedingt somit die konus- bzw. kegelförmige Struktur dieser Membranlipide.

(zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017). Cardiolipin wird direkt in der inneren Mitochondrienmembran synthetisiert. Hierfür werden Bausteine wie Phosphatidylglycerol aus dem Endoplasmatischen Retikulum bezogen. Phosphatidylethanolamin kann hingegen sowohl in der inneren als auch in der äußeren mitochondrialen Membran über eine Decarboxylierungsreaktion aus Phosphatidylserin, welches aus dem ER stammt, gebildet werden (zusammengefasst in Tatsuta & Langer, 2017). Aufgrund ihrer molekularen Struktur weisen beide eine konus- bzw. kegelförmige Form auf. Somit neigen diese nicht zur Ausbildung von Lipiddoppelmembranen und werden deshalb als *non-bilayer* Phospholipide bezeichnet (zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017). Aufgrund ihrer molekularen Struktur bedingen Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin in Lipiddoppelmembranen die Ausbildung einer Membrankrümmung. Diese ist Folge der kleinen hydrophilen Kopfgruppe, welche auf der Außenseite der Membran lokalisiert ist, in Relation zum eher breit ausladenden, lipophilen Schwanz, welcher in die innere, hydrophobe Phase der Membran gerichtet ist. Daraus ergibt sich eine zu diesen Phospholipiden gerichtete negative Membrankrümmung (Renner & Weibel, 2011; Teague et al, 2013). Vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäure-Reste in den hydrophoben Anteilen begünstigen die Ausbildung von Membrankrümmungen (Teague et al, 2013). Sowohl Phosphatidylethanolamin als auch Cardiolipin machen zusammen etwa die Hälfte aller Phospholipide in der inneren mitochondrialen Membran aus (zusammengefasst in Horvath & Daum, 2013). Die speziellen Eigenschaften dieser beiden Phospholipide spiegeln sich auch in der Verteilung innerhalb der inneren Mitochondrienmembran wieder, wodurch eine Stabilisierung der Morphologie und Struktur erzielt wird. Es wird angenommen, dass sich Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin vor allem auf der Seite der Doppelmembran befinden,

die eine negative Krümmung aufweist. Hingegen befinden sich auf der Seite mit positiver Biegung vor allem Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol sowie Phosphatidylserin. Am Beispiel der Cristae-Spitzen würde dies bedeuten, dass die letzteren drei Phospholipide der Matrix zugewandt sind, während Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin zum Lumen der Cristae weisen. Da sich die Membrankrümmung an den *Cristae Junctions* genau reziprok verhält, sind auch die Orientierungen der Phospholipide wahrscheinlich spiegelbildlich angeordnet im Vergleich zu den Cristae Spitzen (zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017).

1.2.2.2 Tafazzin und die Cardiolipin-Homöostase

Cardiolipin leistet einen entscheidenden Beitrag zu den physikalischen Eigenschaften der inneren Mitochondrienmembran (Renner & Weibel, 2011; Teague et al, 2013). Die Folgen des Verlustes der Cardiolipin-Synthese Funktion sind vielfältig und reichen von gestörter Cristae-Morphologie bis zu einer vermehrten Leckage von Protonen, die in einem reduzierten Membranpotential resultiert (zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017). Die Cardiolipin-Synthase ist relativ unspezifisch für die lipophilen oft gesättigten und asymmetrischen Seitenketten ihrer Substrate. Jedoch wird Zusammensetzung des reifen Cardiolipins mit spezifischen Seitenketten große Bedeutung zugeschrieben, wodurch ein funktionierendes *Remodelling* von Cardiolipin nach dessen eigentlicher Synthese relevant wird (Houtkooper et al, 2006), denn in Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskel zeigt sich eine deutliche Homogenität. Etwa 80-90% ist Tetralinoleoylcardiolipin und beinhalten damit vor allem ungesättigte Fettsäuren (Xu et al, 2003; Ikon & Ryan, 2017). Von großer Bedeutung scheint hierfür die mitochondriale Transacylase Tafazzin zu sein. Tafazzin ist als integrales Membranprotein in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert. Der C-Terminus, welcher die Acyltransferase-Aktivität beinhaltet, ragt in den Intermembranraum hinein (Brandner et al, 2005). Der Remodelling-Zyklus von Cardiolipin beginnt mit der Abspaltung einer Acyl-Seitenkette durch eine Phospholipase A, wodurch Monolysocardiolipin entsteht. Daraufhin überträgt Tafazzin eine Seitenkette, beispielsweise ein Linolsäure-Rest von Phosphatidylcholin auf das Monolysocardiolipin. Es entsteht hierbei Cardiolipin mit neuer Acyl-Seitenkette (Xu et al, 2006). Insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung, welche Tafazzin bei der Zusammensetzung von Cardiolipin zugeschrieben wird, ist es umso überraschender, dass die Transacylase-Aktivität von Tafazzin an sich relativ unspezifisch für Linolsäure-Reste ist. Durch *In vitro Transacylase Assays* konnte gezeigt werden, dass sich die Transacylierungsraten zwischen verschiedenen Acylgruppen nur marginal unterscheiden. Außerdem ist die Tafazzin-Aktivität auch von der jeweiligen Kopfgruppe des Phospholipids abhängig (Malhotra et al, 2009).

Somit nimmt man heute an, dass eher die Substratverfügbarkeit wie auch die Substratpräsentation für das Cardiolipin-Muster verantwortlich sind als die intrinsische katalytische Aktivität (zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017). Zusammenfassend sollte hervorgehoben werden, dass Tafazzin eine Schlüsselrolle im Remodelling von Cardiolipin besitzt. Durch die Transacylase-Aktivität trägt es zum spezifischen Cardiolipinmuster bei.

1.2.2.3 Cardiolipin im Kontext mitochondrialer Funktion

Schon längere Zeit geht man davon aus, dass intaktes Cardiolipin, und somit indirekt auch Tafazzin, einen stabilisierenden Effekt auf Atmungsketten-Superkomplexe ausübt. Vor allem scheint dies eine entscheidende Rolle zu spielen für Superkomplexe III₂IV₂ aus den Komplexen III und IV (Brandner et al, 2005). Außerdem scheint es auch Interaktion zwischen Cardiolipin und dem ADP/ATP-Carrier zu geben. Diese Beziehung hat Einfluss auf die Aktivität des Carriers (zusammengefasst in Palsdottir & Hunte, 2004). Zudem interagieren der MICOS-Komplex und Membrankrümmung-induzierende Phospholipide spezifisch an *Crista Junctions*. Untersuchungen zeigten eine spezifische Interaktion zwischen der MICOS-Komplex Untereinheit MIC27 und Cardiolipin (Weber et al, 2013; Rampelt et al, 2017b). Cardiolipin ist auch für den Proteinimport relevant. Die Translokasen der äußeren Membran sind auf intaktes Cardiolipin angewiesen (Gebert et al, 2009). Ist die Synthese des reifen Cardiolipins gestört, resultiert dies in einer gestörten Proteintranslokation über die äußere Membran (Gebert et al, 2009). Zudem ist auch die Integrität der Translokasen der innere Membran an das Vorhandensein von intaktem Cardiolipin gebunden (Kutik et al, 2008). Der zuvor beschriebene Einfluss von Cardiolipin auf die Membranarchitektur wird an Mitochondrien aus Tafazzin Knockdown Mäusen deutlich. Diese weisen eine abnorme Membranarchitektur mit einer reduzierten Zahl an *Crista Junctions* sowie abgeschnürten Cristae Membranen. Auch die Größe der Mitochondrien ist kleiner im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Auch zeigen die Mäuse kardiale Auffälligkeiten, die dem Barth Syndrom des Menschen sehr ähnlich sind (Acehan et al, 2011; Phoon et al, 2012).

1.2.2.4 Defekte im Tafazzin-Gen als Ursache des hereditären Barth-Syndroms

Das Barth Syndrom ist eine nach dem Erstbeschreiber Peter Barth benannte angeborene Stoffwechselstörung, welche sich durch eine Kardiomyopathie, Skelettmuskelmyopathie, Neutropenie, Wachstumsretardierung und Ausscheidung von 3-Methylglutarsäure über den Urin auszeichnet (Barth et al, 1996; zusammengefasst in Dudek & Maack, 2017). Die Kardiomyopathie wird als dilatierte Form beschrieben und kann zusätzlich mit endokardialer Fibroelastose und Linksventrikulärer *Non-Compaction* (LVNC) einhergehen (Steward et al, 2010). In

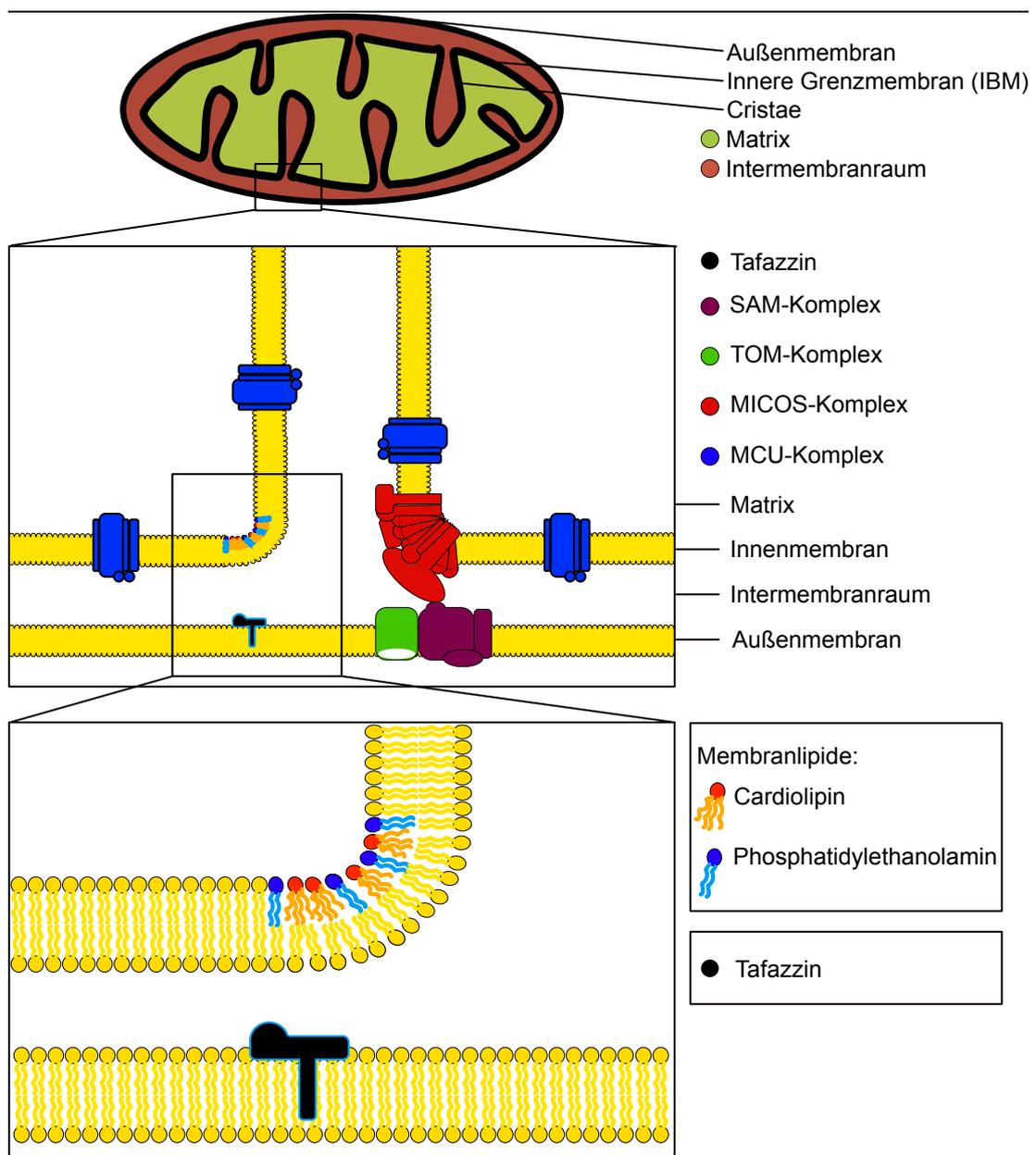


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lipidlokalisierung mit Fokus auf die besondere Rolle von Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin sowie die submitochondriale Lokalisation von Tafazzin

Die Abbildung zeigt in der ersten Vergrößerungsstufe eine mögliche räumliche Anordnung der verschiedenen Komplexe zueinander sowie ihr submitochondriale Lage. Zudem ist in der zweiten Vergrößerungsstufe die spezielle Phospholipidzusammensetzung der inneren Mitochondrienmembran dargestellt. Die als gelbe Phospholipide abgebildete Doppelmembran ist nicht weiter spezifiziert und steht damit allgemein für Phosphatidylserin, -cholin und -inositol. Hervorgehoben sind die speziellen Eigenschaften von Phosphatidylethanolamin und Cardiolipin sowie ihre mögliche Lokalisation. Das Schlüsselenzym des Cardiolipin Remodellings Tafazzin sowie dessen submitochondriale Lokalisation ist ebenfalls dargestellt.

der Regel wird das Barth-Syndrom in der Kindheit diagnostiziert und ist mit einem Betroffenen auf 300 000 bis 400 000 Individuen sehr selten (zusammengefasst in Dudek & Maack, 2017). 1996/97 wurde das verantwortliche Gen identifiziert. Dieses befindet sich auf Xq28 und codiert für das Enzym Tafazzin (D'Adamo et al, 1997). Pathophysiologisch wird somit eine konsekutive Störung des Cardiolipin Remodellings angenommen (zusammengefasst in Dudek & Maack, 2017). Der erste

Tafazzin *Knockdown* gelang im Zebrafisch und zeigte die Bedeutung von Cardiolipin für die kardiale Entwicklung (Khuchua et al, 2006), was später im Mausmodell bestätigt werden konnte (Acehan et al, 2011; Phoon et al, 2012). Zudem zeigt sich im Mausmodell eine Akkumulation von Monolysocardiolipin, welche anhand eines erhöhten MLCL/CL-Verhältnisses (Monolysocardiolipin/Cardiolipin) beschrieben wird. Diese sind im Einklang mit zuvor erhobenen Daten, welche bei Patienten mit Barth-Syndrom erhoben wurden (Acehan et al, 2011). Mitochondrien und Myofilamente innerhalb des Cardiomyozyten sind eigentlich in Reihen nebeneinander angeordnet und folgen der Längsachse der Zelle (Song & Dorn, 2015). In den Tafazzin *Knockdown* Mäusen zeigte sich diese Struktur gestört. Zum einen ist die parallele Anordnung der Mitochondrien zu den Myofibrillen aufgehoben und zum anderen zeigen sich die Mitochondrien verlängert und aggregierten. Außerdem zeigt sich eine gestörte Membranarchitektur mit abgeschnürten Cristae Membranen, die zwiebelschalenartig in der mitochondrialen Matrix vorliegen (Acehan et al, 2011). Zudem gelang es, aus dermalen Fibroblasten von verschiedenen Barth-Syndrom Patienten, induzierte pluripotente Stammzellen zu generieren. In diesen konnte, neben dem zugrundeliegenden Cardiolipin-*Remodelling*-Defekt, auch Defekte in der Atmungskettenaktivität sowie eine vermehrte Generation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden. Als Ursache konnte eine deutliche Störung der Organisation von Atmungskettenkomplexen identifiziert werden (Dudek et al, 2013). Interessanterweise sind vermehrte reaktive Sauerstoffspezies und ein veränderter Cardiolipin-Pool auch bei anderen kardialen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Herzinsuffizienz, anzutreffen und somit nicht spezifisch für das Barth Syndrom (Saini-Chohan et al, 2009; Nickel et al, 2015). Zusammenfassend kann das seltene hereditäre Barth-Syndrom als pathophysiologisches Korrelat der Relevanz eines regelrechten Cardiolipin-*Remodellings* interpretiert werden.

1.2.3 CCDC127 – ein neuer MICOS-Interaktionspartner

Kürzlich konnte ein neuer Interaktionspartner des MICOS-Komplexes identifiziert werden. Der mitochondriale Fokus auf CCDC127 beruht auf Ergebnissen von Frau Dr. Fan Liu vom Leibniz Institut Berlin. CCDC127 konnte in der Cross-Link Massenspektrometrie mit MIC19, einer Untereinheit des MIC60-Subkomplexes des MICOS-Komplexes, identifiziert werden (van der Laan, unpublizierte Daten). Erste Arbeiten zu CCDC127 postulierten eine Lokalisation von CCDC127 im Zellkern und sahen dessen Bedeutung in der Regulation von HSP70 (Saito et al, 2016). Die neuen Ergebnisse legen eine mitochondriale Lokalisation von CCDC127 nahe. Derzeitige Untersuchungen im Labor von Prof. Dr. Martin van der Laan versuchen, die

Bedeutung der Verbindung zwischen MICOS und CCDC127 zu entschlüsseln. CCDC127 ist in der äußeren Membran als integrales Protein lokalisiert. Zudem zeigen sich verminderte Protein-Level von CCDC127 sowohl in Δ MIC10- als auch Δ MIC60-Zellen. Die derzeitige Arbeitshypothese sieht die Bedeutung von CCDC127 in der Unterstützung der mitochondrialen Proteinbiogenese. Über die Verbindung zwischen CCDC127 und MIC19 könnte diese eng mit dem MICOS Komplex bzw. dessen Lokalisation verbunden sein. (Amjad Aladawi & Martin van der Laan, unpublished data).

1.3 Mitochondrien und die zelluläre Calcium-Homöostase

1.3.1 Charakteristika der zellulären Verarbeitung von Calciumsignalen

Calcium-Signale spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Signalwegen und werden über Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration vermittelt. Diese entstehen stark lokalisiert innerhalb der Zelle, beispielsweise in der synaptischen Region von Neuronen, durch einen regionalen Anstieg der Calciumkonzentration (Pivovarova et al, 1999). Die Zelle ist hierfür auf Calciumquellen angewiesen. Es existiert zum einen der extrazelluläre Raum, welcher mit einer Calciumkonzentration von circa 1 mM ein sehr großes Calciumreservoir darstellt. Auf der anderen Seite gibt es intrazelluläre Calciumspeicher, die über eine Calciumkonzentration von über 100 μ M verfügen (Rizzuto & Pozzan, 2006). Der wichtigste intrazelluläre Calciumspeicher stellt das Endoplasmatische Retikulum dar. Eine wichtige Rolle für die zelluläre Homöostase spielt hierbei die SERCA (*sarco-/endoplasmatic reticulum calcium ATPase*), welche den Transport von Calcium aus dem Zytosol zurück ins Endoplasmatische Retikulum (ER) bewerkstelligt (zusammengefasst in Chemaly et al, 2018). Weitere Arbeiten postulieren auch eine Rolle anderer Zellkompartimente, wie beispielsweise des Golgi-Apparates, als intrazellulärer Calciumspeicher (Pinton et al, 1998). Calcium ist ein wichtiger intrazellulärer *second messenger*. Damit Signale innerhalb der Zelle Calcium-abhängig weitergegeben werden können, bedarf es Sensoren, welche Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration feststellen können. Diese Proteine können entweder direkt die Veränderungen der Calciumkonzentration über eine Calcium-bindende Domäne detektieren oder sie werden in ihrer Aktivität von Calcium-abhängigen Enzymen, beispielsweise durch Phosphorylierung oder auch Dephosphorylierung, reguliert (zusammengefasst in Rizzuto et al, 2012). Die Verbindung zwischen der Calciumhomöostase der Zelle und Mitochondrien besteht darin, dass Mitochondrien plötzlich anfallende, große Mengen an zytosolischem Calcium aufnehmen können (Deluca & Engstrom, 1961; Vasington

& Murphy, 1962). Somit war die Entdeckung der mitochondrialen Calciumaufnahme sogar vor dem Aufkommen der chemiosmotischen Theorie von Mitchell, welche letztlich die thermodynamische Grundlage für den Calciumeinstrom schuf (Pallafacchina et al, 2018). Diese besagt, dass durch die Elektronentransportvorgänge in der Atmungskette ein Protonengradient über der mitochondrialen Innenmembran generiert wird. Die der Matrix zugewandten Seite der Innenmembran ist negativer geladen, während die zum Crista-Lumen gerichtete Seite positiver geladen ist. Dieser Gradient stellt nun die treibende Kraft für die Generierung von Adenosintriphosphat (ATP) mittels der F_1F_0 -ATP Synthase dar. Somit ist die Bereitstellung von ATP an die Redoxreaktionen der Atmungskette gekoppelt (Mitchell, 1961). Das Membranpotential auf Grundlage des Protonengradienten stellt letztlich den Antrieb für den Calciumtransport dar (Gunter & Pfeiffer, 1990). Mitochondrien können zelluläre Prozesse maßgeblich durch ihre Calciumpufferkapazität beeinflussen. Durch eine definierte Lokalisation von Mitochondrien innerhalb der Zelle tragen sie zu einer graduellen Vorkommen von Calcium in definierten zytosolischen Regionen bei (MacAskill et al, 2009; Chang et al, 2011). Dies hat besondere Relevanz in Neuronen. Diese sind auf das Vorhandensein funktioneller Mitochondrien vor allem an den Synapsen angewiesen, an welchen Mitochondrien zytosolische Calciumsignale dynamisch modulieren, womit sie grundlegende Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung ausüben und als Calciumpuffer fungieren (Billups & Forsythe, 2002; Medler & Gleason, 2002; David & Barrett, 2003). Außerdem formen Mitochondrien mit der Plasmamembran oder mit dem Endoplasmatischen bzw. Sarkoplasmatischen Retikulum Calcium-Mikrodomänen, an denen Mitochondrien das Calcium mit Hilfe der dortigen Calciumkanäle wieder schnell aufnehmen können. So entstehen lokal begrenzte aber dennoch vergleichbar hohe zytosolische Calciumkonzentrationen (zusammengefasst in Rizzuto et al, 2012). Die Kontaktstellen zwischen dem ER und Mitochondrien werden durch Proteinverbindungen sichergestellt (de Brito & Scorrano, 2008). Die Verbindung von ER und Mitochondrien wird als *Mitochondria ER contact sites* (MERCs) bezeichnet (Bernhard & Rouiller, 1956; Wilson & Metzakopian, 2020). Diese Kontaktstellen spielen eine essentielle Rolle bei der zelluläre Calcium-Homöostase (Missiroli et al, 2017). Mitochondriales Calcium bestimmt maßgeblich das zelluläre Überleben. Mitochondriale Calcium-Überladung kann die Öffnung der *Permeability Transition Pore* (PTP) bedingen. Bei der PTP handelt es sich um einen großen Kanal, der eine hohe Leitfähigkeit für Wasser und lösliche Moleküle besitzt. Zahlreiche Studien schreiben dem mitochondrialem Calcium eine grundlegende Funktion in der Öffnung der PTP zu, welche zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt und einen möglichen Weg zur Einleitung

der Apoptose darstellt (Szalai et al, 1999; Jacobson & Duchon, 2002; Davidson et al, 2012). Neben seiner Funktion im programmierten Zelltod hat Calcium auch eine maßgebliche Rolle am zellulären Überleben, denn mitochondriales Calcium beeinflusst auch die oxidative Phosphorylierung. Die Pyruvat-Dehydrogenase wird durch die Calcium-abhängige Phosphatase PDP1 (*pyruvate dehydrogenase phosphatase 1*) reguliert (Karpova et al, 2003). Dagegen werden die α -Ketoglutarat- sowie die Isocitrat-Dehydrogenase direkt durch Calciumbindung aktiviert (McCormack & Denton, 1979; McCormack et al, 1990; Hansford, 1994). Die Aktivierung Calcium-abhängiger Dehydrogenase resultiert in einem vermehrten Aufkommen von Redoxäquivalenten, die zu einem vermehrten Fluss von Elektronen über die Atmungskette führen. Dies bedingt eine gesteigerte ATP-Produktion, welche die ATP-Versorgung stimulierter Zellen sicherstellt (Jouaville et al, 1999). Mitochondrien und ihre Fähigkeit zur Calciumaufnahme sind folglich entscheidend an der Aufrechterhaltung zellulärer Signalwege als auch der zellulären Funktion beteiligt. Andererseits bedingt die mitochondriale Calciumaufnahme auch Veränderungen in den Mitochondrien selbst, wie die Steigerung der Energiegewinnung, und trägt so ebenfalls zur zellulären Homöostase bei.

1.3.2 Der Mitochondriale Calcium Uniporter MCU

Molekulares Korrelat der mitochondriale Calciumaufnahme stellt der sogenannte *mitochondrial calcium uniporter* MCU dar. Dieser liegt in einem größeren Proteinkomplex, dem sogenannten MCU-Komplex, vor (Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011; Marchi & Pinton, 2014; Pendin et al, 2014; Pallafacchina et al, 2018). Die Calciumabgabe wird hingegen von dessen Gegenspieler, dem Natrium Calcium Austauscher NCLX (*mitochondrial sodium/calcium exchanger protein*) vermittelt (Palty et al, 2010; Boyman et al, 2013). MCU hat eine Molekülmasse von 40 kDa mit einer darin enthaltenen aminoterminalen mitochondrialen Zielsequenz. Lokalisiert ist MCU in der mitochondrialen Innenmembran. Die molekulare Struktur besteht aus zwei transmembranären α -Helices, welche die innere Membran durchspannen, und durch einen kleinen *loop*, der in den Intermembranraum reicht, verbunden sind. C- und N-Terminus sind in der Matrix lokalisiert (Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011). Schon vor dessen Identifikation war bekannt, dass *Ruthenium Red*, als auch dessen Abkömmling *Ru360*, die mitochondriale Calciumaufnahme blockieren. Die Selektivität von MCU wird durch die Aminosäuresequenz des sogenannten DIME-Motivs erzeugt (Oxenoid et al, 2016). Die Bedeutung von MCU für die mitochondriale Calciumaufnahme kann an Hefe, welche über kein MCU-Ortholog verfügt, verdeutlicht werden. Durch das alleinige

Einbringen des MCU-Orthologs können Hefezellen zur Calciumaufnahme befähigt werden (Kovács-Bogdán et al, 2014).

MCU liegt in einem größeren circa 450 kDa großen Proteinkomplex vor (Baughman et al, 2011). Die porenformende Untereinheit des MCU-Komplexes besteht aus vier MCU-Monomeren (Raffaello et al, 2013). Erst kürzlich ist diese Annahme durch Cryo-Elektronenmikroskopie-Analysen unabhängiger Gruppen bestätigt worden (Baradaran et al, 2018; Yoo et al, 2018). Des Weiteren enthält der MCU-Komplex regulatorische Untereinheiten (zusammengefasst in Pendin et al, 2014; Pallafacchina et al, 2018). Eine regulatorisches Protein ist das *mitochondrial calcium uptake protein 1*, kurz MICU1. MICU1 besitzt zwei EF-hand Motive und ist somit zur Calciumbindung befähigt (Perocchi et al, 2010). Mit EF-hand Motiv bezeichnet man eine bestimmte Sekundärstruktur von Proteinen, welche eine Helix-Loop-Helix Abfolge aufweist. Vor allem in der Loop-Region sind negativ geladene Aminosäurereste lokalisiert, sodass ein Calcium-Ion gebunden werden kann (Gifford et al, 2007). MICU1 liegt zusammen mit MICU2 (*mitochondrial calcium uptake protein 2*) über Disulfidbrücken als Heterodimer in der mitochondrialen Innenmembran vor (Patron et al, 2014). Ebenso wie MICU1 besitzt MICU2 zwei EF-Hand Motive. So können sie auf veränderte Calciumkonzentrationen im Intermembranraum und damit indirekt auf die Calciumkonzentration im Zytosol reagieren (Csordás et al, 2013; Kamer et al, 2017). Dies ergibt sich aus der für Calcium-Ionen permeablen äußeren mitochondrialen Membran. Diese beinhaltet VDAC-Kanäle (*voltage-dependent anion channel*), welche für Moleküle kleiner 5 kDa durchlässig sind und somit keine Barriere für Calcium-Ionen darstellen (Rizzuto et al, 2012; Pan et al, 2014; Gottschalk et al, 2019). MICU1 fungiert hierbei als kooperativer Aktivator von MCU (Mallilankaraman et al, 2012b; Csordás et al, 2013; de la Fuente et al, 2014). Im Kontrast hierzu steht die Funktion von MICU2, welches einen inhibitorischen Effekt auf MCU ausübt. Dieser manifestiert sich vor allem bei niedrigen zytosolischen Calciumspiegeln und verhindert so eine Calciumüberladung unter Ruhebedingungen (Patron et al, 2014). Die Verbindung zwischen MCU und dem MICU1-MICU2 Heterodimer wird über den *essential mitochondrial Ca²⁺ regulator*, kurz EMRE, vermittelt (Sancak et al, 2013; Tsai et al, 2016). Als Gerüstbildner für den MCU-Komplex fungiert der *MCU regulator 1*, kurz MCUR1 (Mallilankaraman et al, 2012a; Tomar et al, 2016). Einen negativen Effekt auf die MCU-Leitfähigkeit übt MCUB aus. MCUB teilt etwa 50% seiner Sequenz mit MCU, besitzt aber andere Aminosäuren im Selektivitätsfilter und reduziert so die Calciumleitfähigkeit (Raffaello et al, 2013).

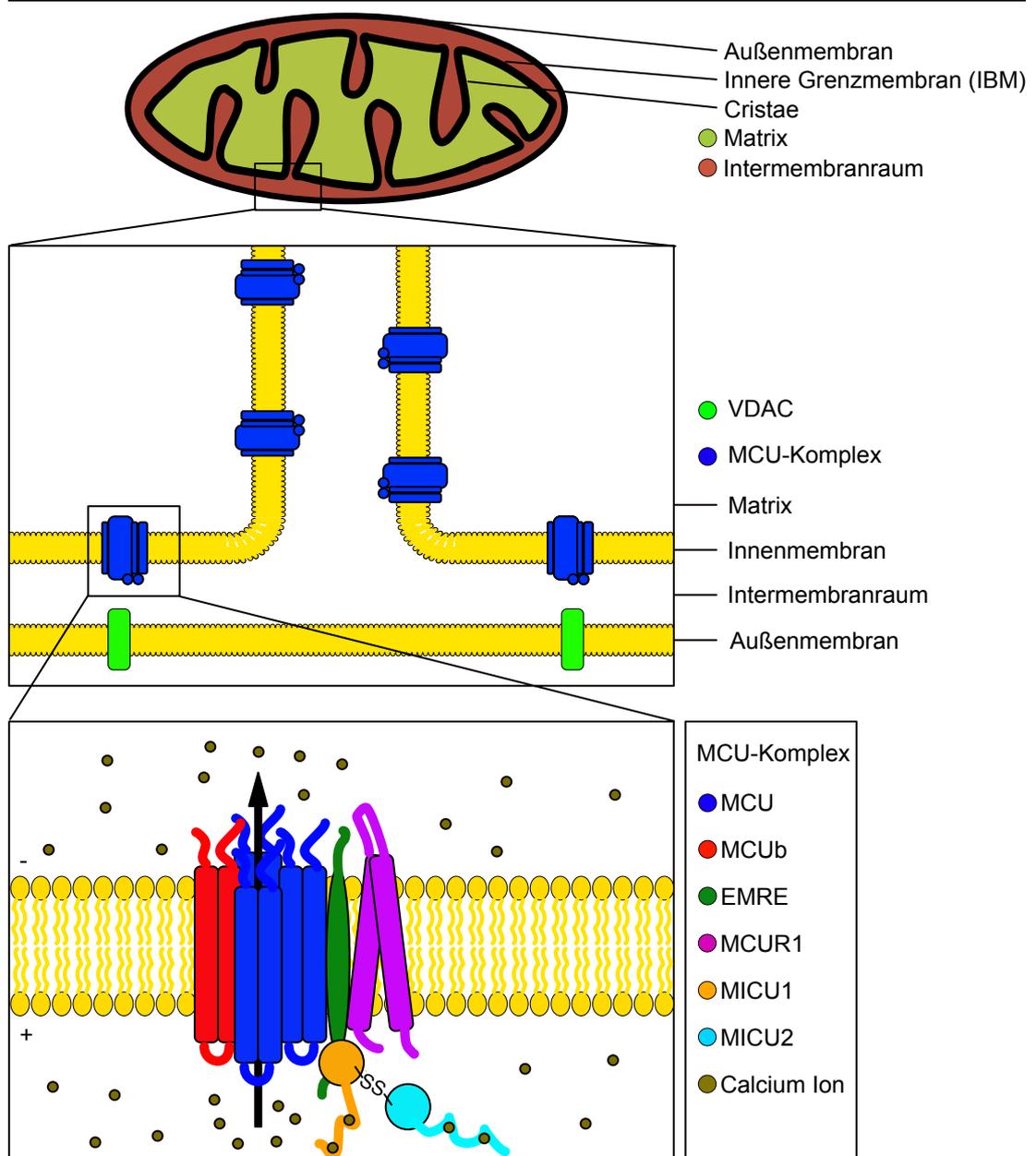


Abbildung 6: Schematische Darstellung und mögliche Lokalisation sowie Zusammensetzung des MCU-Komplexes

Ausgehend von der Aufsicht auf ein schematisches Mitochondrium wird der Fokus auf gezeigte Ausschnitte gelegt. Im ersten Ausschnitt zeigt sich die mögliche submitochondriale Lokalisation des MCU-Komplexes in der mitochondrialen Innenmembran. Der nächste Fokus zeigt die molekularen Bausteine des MCU-Komplexes und wahrscheinliche Interaktionen. Die kovalente Verbindung zwischen MICU1 und MICU2 wird durch eine Disulfidbrücke bewerkstelligt. Beide sind durch EF-Motive zur Calciumbindung befähigt.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Die Zusammenhänge zwischen mitochondrialer Membranarchitektur und mitochondrialer Calcium-Homöostase sind derzeit nur unzureichend verstanden. Jüngste Erkenntnisse und neue Hypothesen erwecken jedoch ein zunehmendes Interesse am Einfluss der mitochondrialen Membranarchitektur auf die mitochondriale Calcium-Homöostase. Es stellte sich somit nun die Frage, ob sich eine gestörte Membranarchitektur auf die mitochondriale Calcium-Homöostase auswirkt. Um mögliche Störungen der Calcium-Homöostase im Zellorganell unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, sollte eine neue Methode zur Detektion der relativen Änderung der mitochondrialen Calciumkonzentration in Mitochondrien, bestehend aus Calcium-Import und Calcium-Export infolge eines Calciumstimulus, etabliert werden. Hierbei handelte es sich um ein Calciumtransport Assay auf der Basis isolierter Mitochondrien. Mittels diesem sollten dann verschiedener Zelllinien mit Defekten in der Membranarchitektur hinsichtlich ihres Calciumtransports untersucht werden. Einen Defekt in der Membranarchitektur wiesen die Knockout Zelllinien der MICOS-Kernuntereinheiten MIC10 und MIC60 auf (Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012). Ebenfalls sollten die Tafazzin- als auch die DNAJC11-Knockout Zelllinien hinsichtlich potenzieller Defekte im Calciumtransport untersucht werden, da diese ebenfalls eine gestörte Membranarchitektur aufwiesen (Acehan et al, 2011; Phoon et al, 2012; Ioakeimidis et al, 2014). Mit Ausnahme des MICOS-Interaktionspartners CCDC127 standen diese Knockouts als Modellzelllinien für eine veränderte Membranarchitektur mit einem Verlust an Crista *Junctions* und lamellären Membranstapeln in der mitochondrialen Matrix. Ziel dieser Arbeit war es somit, die Relevanz der mitochondrialen Membranarchitektur in Bezug auf die mitochondriale Calcium-Homöostase zu analysieren.

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Absaugpumpe	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Vacuum-Aspiration System
Autoklav	HP Medizintechnik GmbH, VARIOKLAV Dampfsterilisator, Baujahre 1994 und 2017
Blott Apparatur	Thermo Scientific, Owl HEP1
Destilliertes Wasser Apparatur	Millipore, Elix
Eismaschine	Scotsman, AF124
Elektronische Pipettierhilfe	<ul style="list-style-type: none"> - Hirschmann Laborgeräte, Pipetus®Akku - Brand, Wertheim, accu-jet® Pro
Imager	GE, Amersham Imager 600
Inkubator	Thermo Scientific, HERACELL 150i CO ₂ Incubator
Kipprollmischer	Phoenix Instrument, RS-TR05
Magnetrührer	VARIOMAG, Elektronikrührer Mono
Mikroskop	Leica, DMI1
Milli Q Wasser Apparatur	Millipore, Biocel
pH-Meter	inoLab, ph7110
Pipetten	<ul style="list-style-type: none"> - Gilson, Pipetman P1000, P200, P20, P2 - Brand, Wertheim, Transferpette® 1000, 200, 20, 2
Plate reader	TECAN Spark 10M
Plattformschüttler	<ul style="list-style-type: none"> - Heidolph, Duomax 2030 - Heidolph, Unimax 1010
Potter	Dounce Homogenizer
Power Supply	DESAGA Sarstedt-Gruppe, Desatronic 500/500
SDS-Kammern	<ul style="list-style-type: none"> - BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra System

	- BIO-RAD Mini-PROTEAN
Sterilbank	Thermo Scientific, SAFE 2020
Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer C
Tiefkühler (-80°C)	Eppendorf, Hamburg, CryoCube FC660h
Vortex	Scientific Industries, VORTEX-GENIE 2
Waage	Kern, PCB
Wasserbad	Fisher Scientific, Isotemp GPD 20
Zentrifugen	- Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5424R - Eppendorf, Hamburg, Centrifuge 5417C - Thermo Scientific, HERAEUS MEGAFUGE 16 Centrifuge

2.1.2 Chemikalien

0,05% Trypsin-EDTA	Gibco, (#25300-054)
100mM Natrium Pyruvat	Gibco, (#11360-070)
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim (#M6250-100ML)
Acrylamid	Roth, Karlsruhe (#7906.2)
Adenosin-5´-triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim (#10127531001)
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe (#K029.2)
Ampuwa H ₂ O	Fresenius, Bad Homburg (#B207151-06)
Anti-Mouse IGG HRP	Merck, Darmstsd (AP127P)
Anti-Rabbit IgG HRP	Merck, Darmstadt (AP187P)
Bacto Agar	BD, Frankreich (#214010)
Bacto Peptone	BD, Frankreich (#211820)
Bacto Tryptone	BD, Frankreich (#211705)
Bambanker®	NIPPON Genetics Europe, Düren (#302-1468)
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe (#9140.3)
Bovine Serum Albumin	Sigma, Steinheim (A6003-10G)
Brillant Blau R 250	Roth, Karlsruhe (#3862.2)
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe (#5239.2)
Coomassie Brilliant Blue G 250	SERVA, Heidelberg (#17524.02)
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid)	Sigma, Steinheim (#D9542)
di-Kaliumhydrogenphosphat	Grüssing GmbH, Filsum (#120321000)
DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Gibco, (#41966-029)
EDTA	Roth, Karlsruhe (#8043.2)
EGTA	SERVA, Heidelberg (#11290.01)
Essigsäure	Fisher Chemical, UK (A/0400/PC17)
Ethanol	Universität des Saarlandes, Zentrale Beschaffung und Dienste (#702543)
Glycerol	Sigma, Steinheim (#G7757-1L)
Glycin	Roth, Karlsruhe (#3908.3)

HEPES	Roth, Karlsruhe (#9105.3)
Kaliumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum (#120081000U)
Kaliumdihydrogenphosphat	Grüssing GmbH, Filsum (#120171000U)
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe (#6751.1)
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe (#KK36.1)
Maleinsäure	Sigma, Steinheim (#M0375-500G)
Mannitol	Fagron, Glinde (#170980-0003)
MES	Roth, Karlsruhe (#4256.4)
Methanol	Universität des Saarlandes, Zentrale Beschaffung und Dienste (#701224)
MOPS	Roth, Karlsruhe (#6979.3)
N-N'-Methylene-Bisacrylamide 2x	SERVA, Heidelberg (#29195.03)
Natriumchlorid	VWR Chemicals, Belgien (#27810.364)
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt (#6498)
Natriumsuccinat	Sigma, Steinheim (#W327700-1KG-K)
PageRuler Plus	Thermo Scientific, Lithuania (#26619)
PBS – Phosphate Buffered Saline	Gibco, (#20012-019)
PEI – 25kDa	Polyscience, Hirschberg an der Bergstraße (#23966-2)
PMSF	Roth, Karlsruhe (#6367.1)
Propan-2-ol	Fisher Chemical, UK (#P/7500/17)
Protein Marker BN-PAGE Amersham	GE, UK (#17044501)
Proteinase K, recombinant PCR Grade	Sigma, Steinheim (#03115879001)
Proteinstandard IgG	BioRad, USA (#500-0005)
ROTI®Quant	Roth, Karlsruhe (#K015.1)
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe (#3029.1)
Salzsäure	Bernd Kraft, Duisburg (#05430-4700)
SDS, ultra pure	Roth, Karlsruhe (#2326.2)
Sucrose, ultra pure	MP, Frankreich (#821721)
TEMED	Roth, Karlsruhe (#2367.1)
Tris	Roth, Karlsruhe (#AE15.3)
Tween® 20	Roth, Karlsruhe (#9127.2)
Yeast Extrakt	BD, Frankreich (#291920)
ε-Aminohexansäure	Sigma, Steinheim (#A7824-100G)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

48-well Platten	Greiner Bio One, Austria (#677180)
96-well Platten	Greiner Bio One, Austria (#655180)
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe (#E706.1)
Labortücher	Th. Geyer, Renningen (#7695251)
Pipettenspitzen, 1000 µl steril	Greiner Bio One, Austria (#740288)
Pipettenspitzen, 20 µl steril	Greiner Bio One, Austria (#774288)
Pipettenspitzen, 200 µl steril	Greiner Bio One, Austria (#739288)
Pipettenspitzen, blau (1000 µl)	Starlab, Hamburg (#S1111-6701)
Pipettenspitzen, gelb (200 µl)	Starlab, Hamburg (#S1112-1706)
Pipettenspitzen, rot (10 µl)	Starlab, Hamburg (#S1111-3700)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (#72.690.001)
Röhrchen 15 ml	Greiner Bio One, Austria (#188271)
Röhrchen 50 ml	Greiner Bio One, Austria (#227261)

Serologische Pipette, 10 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht (#86.1254.001)
Serologische Pipette, 25 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht (#86.1685.001)
Serologische Pipette, 5 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht (#86.1253.001)
Serologische Pipette, 50 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht (#86.1256.001)
Starguard Sensitive L	Starlab, Hamburg (#SG-N-L)
Zellkultur Schale 10 cm	Greiner Bio One, Austria (#664160)
Zellkultur Schale 15 cm	Greiner Bio One, Austria (#639160)

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller/Ursprung	Bestellnummer/ Hasen-Nr.	Verdünnung	LOT
ATP5B	AG Prof. Rehling, Göttingen	4826 5.Blut	1:5000	/
BiP	AG Prof. Zimmermann, Homburg		1:500	/
CCDC127	Sigma	HPA045052	1:500	R42246
DNAJC11	Abcam	ab183518	1:500	GR153679-1
HSPA9	Abcam	ab227215	1:500	GR10279-6
MCU	Sigma	AMAb91189	1:500	03028
MIC10	AG Prof van der Laan, Homburg	5032	1:500	/
MIC13/ MIC12	AG Prof van der Laan, Homburg	5037/5033	1:500	/
MIC19	Sigma	HPA042935	1:500	
MIC25	Sigma	HPA051975	1:500	R67320
MIC26	Sigma	HPA003187	1:500	A96569
MIC27	Sigma	HPA000612	1:500	
MIC60	AG Prof van der Laan, Homburg	5041	1:500	/
MTX2	LifeSpanBio.	C482932	1:500	169966
NCLX	Abcam	ab83551	1:500	GR3296570- 1
SAM50	Abcam	Ab246987	1:500	GR3306079- 2
SERCA	AG Prof. Zimmermann, Homburg		1:500	
TAZ	AG Prof. van der Laan, Homburg	1604	1:500	/
TOM22	Abcam	Ab179826	1:500	GR155160-2

2.1.5 Zelllinien

Die Zelllinien wurden von Dr. Alexander von der Malsburg in der AG Prof. van der Laan in Homburg erzeugt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Um die jeweilige Knockout-Zelllinie vergleichen zu können, wurden diese jeweils einer unveränderten HEK293T-Zelllinie gegenübergestellt

Betroffenes Protein	Zelllinie
MIC10	HEK293T, ΔMIC10-6
MIC60	HEK293T, ΔMIC60-22
Tafazzin	HEK293T, ΔTAZ-29
DNAJC11	HEK293T, ΔDNAJC11-5
MCU	HEK293T, ΔMCU-30
CCDC127	HEK293T, ΔCCDC127 G2-4

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit in der Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen und der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

2.2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung erfolgte im Inkubator in 10 und 15 cm Schalen bei 37°C sowie 5% CO₂. Als Nährmedium wurde ein 1xDMEM Nährmedium verwendet. Zusätzlich wurde dem DMEM-Nährmedium 10% FCS (v/v) sowie 50 µg/ml Uridin zugesetzt. Das Nährmedium wurde vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.1.2 Passagieren humaner Zellen

Die lichtmikroskopische Begutachtung der Zelldichte stellt einen wesentlichen Aspekt der Sicherstellung der Zellvitalität dar. Dementsprechend wurde diese regelmäßig durchgeführt, um die Zellkonfluenz zu beurteilen. Einen weiteren wichtigen Marker der Zellvitalität stellt der pH-Wert der Nährlösung dar. Die Beurteilung dessen erfolgte durch die visuelle Begutachtung der Nährlösung und den darin enthaltenen pH-Indikator Phenolrot. Bei hoher Zellkonfluenz und auffälliger Indikatorfärbung wurde sich zum Passagieren der Zellen entschieden, um durchgehend optimale Proliferationsbedingungen zu gewährleisten.

Hierfür wurde zunächst die PBS-Lösung sowie das Nährmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zuerst wurde das veraltete Nährmedium abgesaugt und anschließend die Zellen mit einer 1x PBS-Lösung gewaschen. Um die Zellen vom beschichteten Schalenboden zu lösen, wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin (v/v); 0,1% EDTA (v/v)) verwendet und kurz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von frischem Nährmedium gestoppt, die gewünschte Zellmenge eingestellt und die Zellen resuspendiert. Letztlich wurden die

Zellsuspension in eine frische Schale überführt und auf 10 ml, im Falle von 10 cm Schalen, beziehungsweise 20 ml, bei Verwendung von 15 cm Schalen, mit Nährmedium aufgefüllt.

2.2.1.3 Einfrieren von humanen Zellen

Um Zellen nicht dauerhaft in Kultur halten zu müssen, können diese bei -80°C in einem speziellen Gefriermedium gelagert werden. Hierfür wurde das Nährmedium sowie die 1xPBS-Lösung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Nährlösung wurde abgenommen und anschließend die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Mittels einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin, 0,1% EDTA) wurden die Zellen abgelöst und kurz in den Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 verbracht. Nachfolgend wurden die Zellen resuspendiert, in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in Nährmedium resuspendiert und nochmals 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 900 μl Bambanker-Lösung aufgenommen. Hierbei handelt es sich um ein spezielles Gefriermedium, welches ein schonendes Einfrieren sowie einen hohen Anteil an vitalen Zellen beim Auftauen sicherstellt. Letztlich wurden je 300 μl der Suspension in 2 ml Kryokonservierungsröhrchen aufgenommen und langsam bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.1.4 Auftauen von humanen Zellen

Um Zellen von der -80°C Lagerung wieder in Kultur nehmen zu können ist ein schneller Auftauprozess entscheidend. Um diesen zu gewährleisten, wurde zunächst das Nährmedium auf 37°C erwärmt. Zudem wurde eine 10 cm Schale mit 10 ml frischem, 37°C warmen, Nährmedium vorbereitet. Das zuvor bei -80°C gelagerte Kryokonservierungsröhrchen wurde nun für kurze Zeit ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen im Bambankermedium aufgetaut waren, wurden diese unverzüglich in die vorbereitete Schale transferiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen passagiert.

2.2.1.5 Transiente Transfektion

Um die verschiedenen Zelllinien den Calcium-Messungen zugänglich zu machen, wurden diese mittels einer transienten Transfektion mit einem genetisch-kodierten Calcium-Sensor ausgestattet. Hierfür wurden zunächst Zellen ausgesät und kultiviert. Zur Transfektion wurde eine Konfluenz von 75-80% angestrebt. Der Transfektionsansatz für 15cm Schalen bestand aus 150 mM NaCl, 15 μg DNA sowie 60 μg PEI in 2 ml sterilem Ampuwa Wasser. Damit wurde ein Verhältnis von DNA zu PEI von 1:4 eingestellt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurden je 2 ml dieses

Transfektionsansatzes tropfenweise zu den Zellen im Nährmedium zugegeben und mindestens 24 Stunden darin belassen.

2.2.2 Isolation von Mitochondrien

Für die Zellernte wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit 10 ml PBS von der Platte abgespült und anschließend bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis beziehungsweise bei 4°C durchgeführt. Pro geerntete 15 cm Platte wurde das Pellet in je 1 ml Import-Puffer A (20 mM HEPES-KOH, pH 7,6; 220 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 2 mg/ml BSA sowie 0,5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfourid)) resuspendiert. Der Protease-Inhibitor PMSF wurde direkt vor der Verwendung des Puffers frisch dazugegeben. Anschließend erfolgte der mechanische Zellaufschluss in einem *Dounce Homogenizer*. Nach dem Überführen in Reaktionsgefäße erfolgte der erste Zentrifugationsschritt bei 800 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nun bei 12.000 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Das braun-gelbliche Pellet wurde mit 400 µl Import-Puffer B (20 mM HEPES-KOH, pH 7,6; 220 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 1 mM EDTA sowie 0,5 mM PMSF) gewaschen und erneut bei 12.000 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet insgesamt in 150 µl Import-Puffer B vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung.

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Proteinmenge von Lösungen zu bestimmen, wurde in einer 48-well Platte eine Standardkurve mittels 1,47 µg/µl IgG-Proteinstandard angefertigt. Die Standardkurve wurde durch eine Verdünnungsreihe um den Faktor 0,5 von 36,75 bis 2,3 µg/µl erstellt und ein Nullwert mittels reinem Wasser angefügt. Bei der Proteinbestimmung einer Probe wurden mindestens Triplikate angefertigt und die Proteinmenge in 2 µl ermittelt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mittels ROTI®Quant im TECAN *plate-reader* bei 595 nm. Anschließend wurde die Proteinmenge anhand der optischen Dichte der Standardkurve bestimmt.

2.2.4 Proteinase K Verdau (*protease accessibility assay*)

Um die osmotischen Eigenschaften von Pufferlösung auf Mitochondrien einschätzen zu können, wurde ein Proteinverdau mittels Proteinase K (PK) (*protease accessibility assay*) durchgeführt. Hierfür wurden vier Proben mit je 100 µg isolierter Mitochondrien bei 16 363 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand

verworfen. Die Pellets wurden zu je 100 µl in Puffern mit verschiedenen osmotischen Eigenschaften resuspendiert. Zwei Proben wurden in SM-Puffer (10 mM MOPS (pH 7,2); 320 mM Sucrose) resuspendiert. Diese Beiden stellten später die Kontrollen für den PK-Verdau sowie isotonische Bedingungen dar. Die dritte Probe wurde in einen hypotonen Puffer eingebracht, der sich aus 20:1 MOPS (10 mM MOPS (pH 7,2)) zu SM (10 mM MOPS (pH 7,2); 320 mM Sucrose) zusammensetzte. Die vierte Probe wurde in dem zu untersuchenden Puffer resuspendiert. Alle Proben wurden anschließend für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 16.363 g für 5 Minuten. Die ersten beiden Proben wurden nun in 100 µl Import-Puffer (10 mM MOPS (pH 7,2); 320 mM Sucrose; 80 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 5 mM KPi) resuspendiert. Die dritte und vierte Probe wurden mit je 100 µl derselben Pufferlösungen wie zuvor resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurden zu den Proben, mit Ausnahme der Ersten, welche die Kontrolle für den PK-Verdau darstellte, 5 µl Proteinase K (1 mg/ml) zugegeben. Die Proben wurden vorsichtig gemischt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 2 µl frisch angesetztem PMSF (200 mM). Nach vorsichtigem Mischen wurde nochmals für 5 Minuten bei 16.363 x g und 4°C zentrifugiert und die Pellets in je 200 µl SEM-Puffer (10 mM MOPS (pH 7,2); 320 mM Sucrose; 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach erneut identischer Zentrifugation wurden die Pellets in je 100 µl SDS-Ladepuffer (2% SDS (w/v); 10% Glycerol (v/v); 60 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,2% 2-Mercaptoethanol (v/v); 0,01% Bromphenolblau (w/v)) resuspendiert und für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Proben konnten nun bei -20°C gelagert werden. Die anschließende Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE und Western Blot Analysen.

2.2.5 Das Calciumtransport-Assay mit isolierten Mitochondrien

Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit Ampuwa-Wasser hergestellt. Zunächst wurden die Zellen auf 15 cm Platten ausgesät und mittels transienter Transfektion (siehe 2.2.1.5) mit dem genetisch kodierten mitochondrialen Calcium-Sensor Mito-LAR-GECO1.2 ausgestattet. Nach mindestens 24 Stunden Transfektion wurden die Zellen bei ca. 95% Konfluenz in 10 ml PBS geerntet und anschließend die Mitochondrien isoliert (siehe 2.2.2). Darauf folgte die Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford (siehe 2.2.3). Es wurde bei den folgenden Schritten entweder auf Eis oder bei 4°C gearbeitet. Die noch in Import-Puffer B (20mM HEPES-KOH (pH: 7,6); 220mM Mannitol; 70mM Sucrose; 1mM EDTA sowie 0,5mM PMSF) befindlichen Mitochondrien wurden bei 12.000 x g und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um ein calciumfreies System zu schaffen und die an den Mitochondrien anhaftenden Reste des Endoplasmatischen Retikulums von Calcium zu befreien, wurde das Pellet in einer Thapsigargin-EGTA-Lösung (20 mM

HEPES (pH 7,2); 140 mM KCl; 1 mM Kaliumphosphat; 1 mM MgCl₂; 10 mM Glucose; 1 mM EGTA (pH 8); 200 nM Thapsigargin) resuspendiert, sodass sich eine 1 µg/µl Proteinkonzentration einstellte. Durch das in der Lösung enthaltene EGTA wurde das Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum entfernt sowie komplexiert und durch Thapsigargin die Wiederaufnahme ins Endoplasmatische Retikulum durch die Sarkoplasmatische/Endoplasmatische Calcium ATPase (SERCA) inhibiert. In dieser Lösung wurden die Mitochondrien 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12.000 g, 4°C für 3 Minuten und ein Verbringen der Proben auf Eis. Der Überstand wurde abgenommen und eine 1 µg/µl Proteinkonzentration mittels IMG-Puffer (20 mM HEPES (pH 7,2); 140 mM KCl; 1 mM Kaliumphosphat; 1 mM MgCl₂; 10 mM Glucose; 2 mM Natrium Succinat; 1 mM Natrium Pyruvat; 1 mM Mg-ATP) eingestellt. Standardmäßig wurden 15 µg Mitochondrien in 100 µl IMG-Puffer für die Calcium Messungen verwendet.

Die Calcium Messungen wurden im TECAN *plate reader* in Platten mit 96 Vertiefungen vorgenommen, wobei in einer Messung lediglich 8 Vertiefungen gemessen wurden. Zunächst wurden die zu messenden Vertiefungen ausgewählt. Die Anregung erfolgte bei 535 nm und die Emission wurde bei 595 nm detektiert. Die Verstärkung des Fluoreszenzsignals wurde manuell auf 90 eingestellt. Für die Messung wurden zunächst 8 Vertiefungen der Platte mit je 15 µg der Mitochondrien befüllt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der Start der Messung und somit die Bestimmung der Fluoreszenz der 8 Vertiefungen in 20 Zyklen. Ein Zyklus entsprach hierbei der einmaligen Detektion des Fluoreszenzsignals an jeder Probe. Nach diesen 20 Messpunkten im Ruhezustand wurden nun jeweils 25 µl einer 5x Calcium-Lösung (20 mM HEPES (pH 7,2); 140 mM KCl; 1 mM Kalium-Phosphat; 1 mM MgCl₂; 2 mM Natrium Succinat; 1 mM Natrium Pyruvat; 1 mM Mg-ATP; 50 µM CaCl₂) zugegeben. So konnte die mitochondriale Calciumaufnahme in weiteren 80 Zyklen gemessen werden. Um auch den mitochondrialen Calciumefflux zu visualisieren, wurden nun 25 µl einer 6x EGTA-Lösung (20 mM HEPES (pH 7,2), 140 mM KCl, 1 mM Kalium Phosphat, 1 mM MgCl₂, 2 mM Natrium Succinat, 1 mM Natrium Pyruvat, 1 mM Mg-ATP, 12mM EDTA) zugegeben, um eine finale EGTA-Konzentration von 2 mM zu erhalten. Dieser Calciumefflux wurde für weitere 100 Zyklen gemessen. Ein exemplarisches Versuchsprotokoll des TECAN plate readers ist unten dargestellt (Anhang 5.1).

Um den Messvorgang zu validieren, wurden verschiedenste Kontrollen verwendet. Um die erfolgreiche Transfektion zu bestätigen, erfolgte das Procedere ebenfalls mit nicht transfizierten HEK293T Zellen. Die aus diesen Zellen gewonnenen Mitochondrien trugen keinen Calciumsensor und somit konnte die Calciumaufnahme nicht visualisiert werden. Durch 0,5% Triton X-100 (v/v) wurden die mitochondrialen

Membranen aufgelöst und der Calciumsensor in die Lösung freigesetzt. Durch Zugabe von 100 μM Calciumchlorid erfolgte eine Sättigung des Calciumsensors und repräsentierte somit das maximal mögliche Signal. Die Fluoreszenzzunahme bei Calciumzugabe wurde durch eine Calcium-freie Kontrolle (20 mM HEPES (pH 7,2); 140 mM KCl; 1 mM Kalium-Phosphat; 1 mM MgCl_2 ; 2 mM Natrium Succinat; 1 mM Natrium Pyruvat; 1 mM Mg-ATP) überprüft.

2.2.5.1 Auswertung, Normierung & Statistik

Die Rohdaten der Messung wurden in Form einer Excel-Tabelle von der Software des TECAN *plate readers* bereitgestellt. Da sich bei verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Grundlinien zeigten und somit die Vergleichbarkeit unzureichend war, wurde eine Normierung der Daten auf die Grundlinie vorgenommen. Die Grundlinie entspricht hierbei dem Mittelwert der ersten 20 Messpunkte einer Probe. Im Anschluss wurde jeder einzelne Messpunkt durch diesen Mittelwert geteilt, um so die relative Zunahme der Fluoreszenz der verschiedenen Proben bei Calciumzugabe beurteilen zu können. Die graphische Darstellung sowie die statistische Auswertung gewonnener Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism. Wie zuvor erläutert, wurden die Messdaten auf die Grundlinie normiert, welche sich graphisch bei $y = 1$ befindet. Um statistische Tests durchführen zu können, wurde nun von jedem Messpunkt 1,0 subtrahiert. Somit befindet sich die Grundlinie auf $y = 0$. Um den Effekt der Calciumzugabe beurteilen zu können, wurden nun die 80 Messsignale, welche nach Calciumzugabe und vor der EGTA-Zugabe generiert wurden, in einem eigenen Graph dargestellt und schließlich die *Area under the curve* (AUC) ermittelt. Diese Werte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden in eine Excel-Tabelle transferiert und der Mittelwert für jede einzelne Zellpopulation gebildet. Um eine gewisse Vergleichbarkeit der Calciumaufnahme der verschiedenen Zelllinien zu schaffen, wurden die Werte der AUC der verschiedenen Zelllinien in prozentualen Bezug zum Wildtyp gestellt. Hierfür wurde jeder einzelne AUC-Wert durch den Mittelwert der AUC-Werte des Wildtyps geteilt. Diese wurden wieder in das GraphPad Prism übertragen und sowohl der Mittelwert als auch der Standardfehler mit dessen Hilfe berechnet und graphisch dargestellt. Um statistisch-fundierte Aussagen treffen zu können wurde folgend eine Einfache-ANOVA mit einer Greenhouse-Geisser Korrektur durchgeführt. Jede Spalte zur Berechnung entsprach hierbei einer Zelllinie und jede Zeile stellte hierbei die AUC der Mittelwerte der jeweiligen Zelllinie in einem unabhängigen Experiment dar. Somit waren die Werte in einer Zeile als zusammengehörig anzusehen. Des Weiteren wurde der Mittelwert jeder einzelnen Zelllinie mit dem Mittelwert des Wildtyps verglichen. Hierfür wurde der Holm-Sidak Post-hoc Test benutzt und daran angepasste p-Werte ermittelt.

2.2.6 SDS-PAGE

Um die verschiedenen verwendeten Zelllinien zu charakterisieren und den Verlust des jeweiligen Proteins zu bestätigen, wurden SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Aliquots mit Mitochondrien, welche zuvor bei -80°C weggefroren waren, auf Eis aufgetaut und bei 12.000 g und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in $100\text{ }\mu\text{l}$ Lämmli-Puffer (2% SDS (w/v); 10% Glycerol (v/v); 60 mM Tris pH 6,8; 0,2% 2-Mercaptoethanol (v/v); 0,01% Bromphenolblau (w/v)) resuspendiert. Um die enthaltenen Proteine zu denaturieren wurde die Probe letztlich bei 50°C und 800 rpm für 10 Minuten im Thermomixer inkubiert. $10\text{ }\mu\text{g}$ der Probe wurden pro Spur auf ein 10% Bis-Tris Gel (10 ml 30% Acrylamidstammlösung, 10ml 1M Bis Tris, 10 ml Wasser, $150\text{ }\mu\text{l}$ APS, $15\text{ }\mu\text{l}$ TEMED) geladen. Um den Fortschritt der Auftrennung innerhalb des Gels sowie eine Zuordnung der Banden an definierte Molekulargewichte beurteilen zu können, wurde ebenfalls ein Proteinmarker geladen. Spuren, in die keine Probe geladen wurden, waren mit 1x Lämmli-Puffer aufgefüllt worden, um ein Divergieren der Spuren zu vermeiden. Die Gelkammern wurden mit 1x MES-Puffer (0,05 M MES, 0,05 M Tris - HCl (pH 7,5), 0,1% SDS (w/v), 1 mM EDTA) aufgefüllt und im Anschluss bei 120 V für eine Stunden belassen.

2.2.7 Western Blot

Die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) *semidry* übertragen. Dafür wurden 3 *Whatman*-Papierstücke in Transfer-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 0,02% SDS (w/v); 10% Ethanol (v/v)) befeuchtet und anschließend auf den Boden der Blot-Kammer gelegt und glattgestrichen. Auf diese wurde das Gel der zuvor durchgeführten SDS-PAGE gelegt und ebenfalls mit Transfer-Puffer befeuchtet sowie glattgestrichen. Nachdem die PVDF-Membran in reinem Ethanol aktiviert und kurz in Transfer-Puffer gewaschen wurde, konnte sie auf das Gel verbracht und ebenfalls sorgfältig glattgestrichen werden, um Luftblasen zwischen dem Gel und der PVDF-Membran zu beseitigen. Als Letztes wurden drei in Transfer-Puffer angefeuchtete *Whatman*-Papiere auf die PVDF-Membran gelegt und die Blot-Kammer verschlossen. Bei 350 mA für zwei Stunden erfolgte die Übertragung der Proteinbanden vom Gel auf die PVDF-Membran. Danach wurde die Membran in einer Färbelösung (40% Ethanol (v/v); 10% Essigsäure (v/v); 1% Coomassie R (w/v)) angefärbt. Die Färbung der übertragenen Proteinbanden dient als Qualitätskontrolle für den Blot-Vorgang. Anschließend wurde die Membran mit Entfärbelösung (40% Ethanol (v/v); 10% Essigsäure (v/v)) gewaschen. Um die Membran vollständig zu

entfärben, wurde sie mit reinem Methanol versetzt und anschließend mit TBST (20 mM Tris (pH 7,5); 125 mM NaCl; 0,1% Tween (v/v)) gewaschen. Es erfolgte die Blockierung der Membran in einer 5%-Milch-TBST-Lösung (20 mM Tris (pH 7,5); 125 mM NaCl; 0,1% Tween (v/v) ; 5% Milch (w/v)) für eine Stunde. Danach wurde die Membran in den Primärantikörper verbracht und in diesem eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippröllschüttler inkubiert. Um überschüssige Reste des Primärantikörpers zu entfernen, erfolgten drei Waschschriffe in TBST für jeweils 10 Minuten. Die Inkubation im Zweitantikörper erfolgte wieder auf dem Kippröllschüttler für eine Stunde, deren sich ebenfalls drei Waschriffe mit TBST für jeweils 10 Minuten anschlossen. Die Auswertung erfolgte am *GE Amersham Imager* mittels Chemilumineszenz. Hierfür wurde die Membran mit ECL-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence*) inkubiert und in den *Imager* verbracht.

2.2.8 Blue Native Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mittels der Blue Native Gelelektrophorese können Proteinkomplexe in ihrer nativen Form analysiert werden. Hierfür wurden zunächst Gradientengele von 4 bis 13% Polyacrylamid (4% Stacker (w/v); 4-13% Polyacrylamidgradient (w/v); 50 mM Bis-Tris pH 7,0; 66 mM ϵ -Aminohexansäure) gegossen und nach der Polymerisation bei 4°C im Kühlschrank gekühlt. Um mitochondriale Proteinkomplexe beurteilen zu können, wurden 100 μ g Mitochondrien, welche zuvor isoliert und bei -80°C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut und anschließend bei 21.130 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig und gleichmäßig in 1% Digitonin-Puffer (1% Digitonin (w/v); 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 0.1 mM EDTA; 50 mM NaCl; 10% Glycerol (v/v); 1 mM PMSF) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die Mitochondrien aufzuschließen. Um nicht solubilisiertes Material zu entfernen, wurde nun für 10 Minuten bei 21.130 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 10 μ l 10x Probenpuffer (5 % Coomassie Blue G (w/v); 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure; 100 mM Bis Tris (pH 7,0)) wurde erneut bei 21.130 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden in das zuvor gekühlte Gel 50 μ g Protein je Spur geladen. Im Anschluss wurden die Taschen mit Coomassie-haltigen Kathoden-Puffer (15 mM Bis-Tris (pH 7,0); 50 mM Tricin; 0.02% Coomassie Brilliant Blue G250 (w/v)) aufgefüllt und in die Hoefer-Gelkammer verbracht. Für die Elektrophorese ist eine durchgängig gehaltene Temperatur von 5°C essenziell. Dementsprechend wurden die Puffer innerhalb der Gelkammer mittels einer Wasserkühlung konstant bei 5 °C eingestellt. Als Anoden-Puffer fungierte eine Lösung mit 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0). Zusammen mit dem zuvor schon verwendeten Kathoden-Puffer wurde die Elektrophorese bei 25 mA pro Gel und maximal 600 V gestartet. Sobald die Proben mit dem Coomassie-

haltigen Kathodenpuffer vollständig in das Gel eingelaufen waren, wurde der Kathoden-Puffer gewechselt und ein Coomassie-freier Kathoden-Puffer (15 mM Bis-Tris (pH 7,0); 50 mM Tricin) verwendet. Sobald die Reste des Coomassie-haltigen Kathoden-Puffer aus dem Gel liefen, war die Elektrophorese abgeschlossen. Um die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen zu können, wurde das Gel zunächst in einer 10%igen SDS-Lösung (w/v) verbracht. Danach wurde beim Western Blot analog zum Procedere nach SDS-PAGE verfahren (siehe hierfür 2.2.6).

2.2.9 Das TMRE-Assay Kit zur Erfassung des Membranpotentials

Da das mitochondriale Membranpotential einen wichtigen Einflussfaktor für die mitochondriale Calciumaufnahme darstellt, wurde mittels dem TMRE-Assay Kit der Firma abcam (ab113852) nach möglichen Unterschieden der Membranpotentiale mittels Tetramethylrhodaminmethylester (TMRE) zwischen den verschiedenen Zelllinien gesucht. Das TMRE-Assay wurde unter sterilen Kulturbedingungen durchgeführt. Hierfür wurden Zellen in jeweils zwei *Vertiefungen* einer 96-well Platte ausgesät und für 24 Stunden in DMEM mit 10% FCS (v/v) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als optimale Zelldichte wurde eine Konfluenz von etwa 70% nach 24 Stunden angestrebt. Die jeweils zweite Vertiefung mit Zellen diente als Kontrolle für die eigentliche TMRE Färbung und wurde zunächst für 10 Minuten mit 20 µM FCCP in FCS freiem DMEM inkubiert. Während dieser Zeit wurden die anderen Proben in lediglich FCS freiem DMEM inkubiert.

Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die eigentliche TMRE-Färbung. Nicht mit FCCP vorinkubierte Proben wurden mit 500 nM TMRE in FCS freiem DMEM behandelt. Proben, welche mit FCCP vorinkubiert wurden, erhielten nun 500 nM TMRE und 20 µM FCCP, ebenfalls in FCS-freiem DMEM bei 37°C und 5% CO₂. FCCP als Entkoppler fungiert als Kontrolle zur Darstellung eines zusammengebrochenen Membranpotentials. Zusätzlich enthielten beide Lösungen 1 µg/ml DAPI, um die TMRE-Fluoreszsignale auf das DAPI-Signal normieren zu können. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurden die TMRE-Lösungen abgenommen und mit 100 µl 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl des abcam *cell imaging buffers* wurde unverzüglich die Messung im TECAN *plate reader* begonnen. Hierfür wird eine Extinktion von 549 nm und eine Emission von 575 nm für TMRE sowie das vorprogrammierte DAPI-Spektrum des TECAN *plate readers* verwendet (siehe Anhang 5.2). Nach der Messung wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und bei 595 nm gemessen. Neben der FCCP-Kontrolle wurde eine negativ TMRE Kontrolle sowie eine negative DAPI Kontrolle verwendet.

2.2.10 Molekularbiologische Methoden

2.2.10.1 Transformation kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA

Um genügend Plasmid-DNA für die Transiente Transfektion zu besitzen, musste die Plasmid-DNA vervielfältigt werden. Hierfür wurden kompetente *E. coli*, welche tiefgefroren in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl kompetenter *E. coli* wurden 32,5 ng Plasmid-DNA zugegeben und anschließend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Danach wurde der Ansatz sofort für eine Minute auf Eis verbracht, mittels 200 µl LB-Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl) verdünnt und schließlich auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10.2 Plasmid Isolation mittels QIAGEN® Plasmid Midi Kit

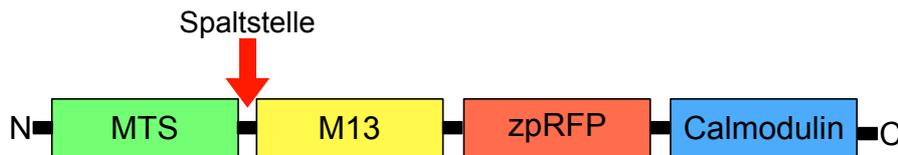
Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden zunächst Vorkulturen angefertigt. Dazu wurde eine über Nacht gewachsene Bakterienkolonie von der LB-Platte in 5 ml LB-Medium mit 1 µg/ml Ampicillin überführt und bei 37°C und 210 rpm schüttelnd inkubiert. Nach 6 Stunden kann die Vorkultur komplett in 100 ml LB-Medium mit 1 µg/µl Ampicillin überführt werden. Diese wurde dann über Nacht bei 37°C und 210 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4700 x g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Im weiteren Verlauf der Plasmid Isolation wurde sich an das Protokoll des QIAGEN® Plasmid Midi Kits und die enthaltenen Puffer gehalten. Letztlich wurde die DNA in steril filtriertem Ampuwa-Wasser gelöst und die Konzentration mittels einer Nano-Quant im TECAN *plate reader* bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Calciumtransport-Assays mit isolierten Mitochondrien

Um Defekte der mitochondriale Calciumaufnahme möglichst frei von zellulärem Einfluss erfassen zu können, wurden die Messungen in isolierten Mitochondrien durchgeführt. Voraussetzung für Calciummessungen war die Anwesenheit eines Calciumsensors. Im Kontext isolierter Mitochondrien zeigten sich dementsprechend für diesen zwei mögliche Lokalisationen. Entweder befand sich der Calciumsensor in der Pufferlösung, in der die Mitochondrien resuspendiert wurden, oder der Sensor befand sich innerhalb der Mitochondrien. Wenn der Calciumsensor in der Pufferlösung gewesen wäre, wäre dies zwar technisch einfacher, jedoch ist das Ansprechen eines Calciumsensors, welcher innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist, eindeutiger dem mitochondrialen Calciumtransport zuzuordnen als die Abnahme des Signals der Lösung. An dieser Stelle gilt es zu beachten, dass es sich bei den so genannten "isolierten Mitochondrien" nicht um hoch reine Mitochondrien handelte, sondern um eine stark angereicherte Mitochondrien-Fraktion aus der differenziellen Zentrifugation, die noch Reste von ER auf der Oberfläche der zellfreien Mitochondrien enthielt. Dies konnte mittels SDS-PAGE und Western Blots unter Verwendung ER-spezifischer Markerproteine, wie der Calcium-ATPase SERCA oder dem luminalen Hsp70-Chaperon BIP gezeigt werden (siehe Abbildungen 15 und 17). Diese wichtigen Kontrollexperimente legten eindeutig die Wahl eines mitochondrial lokalisierten Calciumsensors, wie Mito-LAR-GECO 1.2, nahe. Mito-LAR-GECO 1.2 ist ein genetisch kodierter Calciumsensor basierend auf einem zyklisch-permutierten RFP-Molekül (*red fluorescent protein* Molekül). Dieses wurde gentechnisch modifiziert. Am carboxy-terminalen (C-terminalen) Ende wurde eine Calmodulin-Domäne und am amino-terminalen (N-terminalen) Ende eine M13-Domäne an das RFP-Molekül gekoppelt (Wu et al, 2014). Bei Calmodulin handelt es sich um ein Calcium-bindendes Protein, das durch ein EF-hand-Motiv, einem evolutionär konservierten Calciumbindemotiv, infolge veränderter zellulärer Calciumkonzentrationen eine Konformationsänderung durchläuft (Chin & Means, 2000). M13 ist hingegen ein kurzes Calcium/Calmodulin-bindendes Peptid. Durch die Calcium-abhängige Interaktion zwischen M13 und Calmodulin wird eine Konformationsänderung des RFP-Molekülteils induziert, sodass es zu einer intensimetrischen Zunahme der Fluoreszenz kommt. Seine mitochondriale Lokalisation erhält der Calciumsensor durch die Kopplung von LAR-GECO 1.2, dem

A



B

Abwesenheit von Calcium

Anwesenheit von Calcium

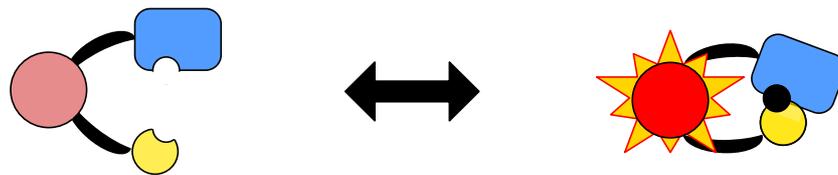


Abbildung 7: Der genetisch codierte mitochondriale Calciumsensor Mito-LAR-GECO 1.2

- (A) *Mito-LAR-GECO1.2* ist ein auf einem zyklisch-permutierten RFP (zpRFP) basierender intensimetrischer mitochondrialer Calciumsensor. N-terminal enthält dieser eine M13 Peptidsequenz, welche ihren Ursprung in der Myosin Leichtketten Kinase (MLCK) hat. Eine Calmodulin-Domäne bildet das C-terminale Ende. Da es sich um einen genetisch kodierten Sensor handelt, wird seine Lokalisation in der mitochondrialen Matrix durch zwei Kopien der mitochondrialen Zielsequenz (MZS) der Cytochrom c Oxidase VIII am N-terminalen Ende sichergestellt.
- (B) Schematischer Ablauf der Fluoreszenzzunahme in Anwesenheit von Calciumionen. Durch Calciumbindung an die Calmodulin-Domäne kommt es zur Interaktion zwischen Calcium-Calmodulin und dem Bindeprotein M13. Somit kommt es subsequent zu Konformationsänderungen innerhalb des zpRFP, welche in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals einhergehen.

Calmodulin-RFP-M13 Fusionsprotein, und einer doppelten Ausführung der mitochondrialen Zielsteuerungssequenz der Cytochrom c Oxidase Untereinheit VIII am amino-terminalen Ende. Die Dissoziationskonstante (K_d) für Calcium von Mito-LAR-GECO 1.2 beträgt $12 \mu\text{M}$. Folglich handelt es sich hierbei um einen Calciumsensor mit geringer Affinität (Wu et al, 2014). Die K_d von $12 \mu\text{M}$ wurde gewählt, um den erwarteten intramitochondrialen Konzentrationsbereich an Calcium abzubilden und Calciumzugaben zwischen 0 und $15 \mu\text{M}$ in einem möglichst linearen Bereich des Fluoreszenzsignals zu ermöglichen, ohne eine vorzeitige Absättigung befürchten zu müssen. Die Verwendung eines genetisch kodierten Calciumsensors ging jedoch mit der Notwendigkeit einer Transfektion der Zellen einher. Deshalb wurden die Zellen vor der Isolation der Mitochondrien mit dem Plasmid, welches Mito-LAR-GECO 1.2 enthielt, transient transfiziert. Die Tatsache, dass bei der Isolation von Mitochondrien ER-Reste an diesen verbleiben, brachte einen weiteren Einflussfaktor in die Calciummessung, da das ER einen intrazellulären Calciumspeicher darstellt (Rizzuto & Pozzan, 2006). Zudem sind Calcium Leckströme aus dem ER ins Zytosol bekannt, welche beispielsweise durch SEC61 bedingt sind (Lang et al, 2011). Somit war es notwendig, diese ER-Speicher zu leeren und die

Wiederaufnahme zu blockieren. Hierfür wurden die Mitochondrien nach ihrer Isolation mit Thapsigargin und EGTA behandelt. EGTA ist ein hochaffiner Calcium-Chelator. Durch seine Zugabe sollte es zu einer Entleerung der Calciumspeicher im ER kommen. Damit das freigesetzte Calcium nicht wieder aufgenommen wurde, wurde zusätzlich Thapsigargin, ein spezifischer Inhibitor der Sarko-/Endoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase (SERCA), hinzugefügt. Hierdurch sollte ein calciumfreies Umfeld um die Mitochondrien geschaffen werden. Die Basis des Calciumtransport-Assays in isolierten Mitochondrien waren folglich isolierte Mitochondrien zusammen mit dem genetisch kodierten Calciumsensor Mito-LAR-GECO 1.2 in einer möglichst Calcium-freien Suspension. Ein schematischer Ablauf des Calcium Assays ist in Abbildung 8 dargestellt. Der typische Fluoreszenzsignalverlauf des Calciumsignals ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

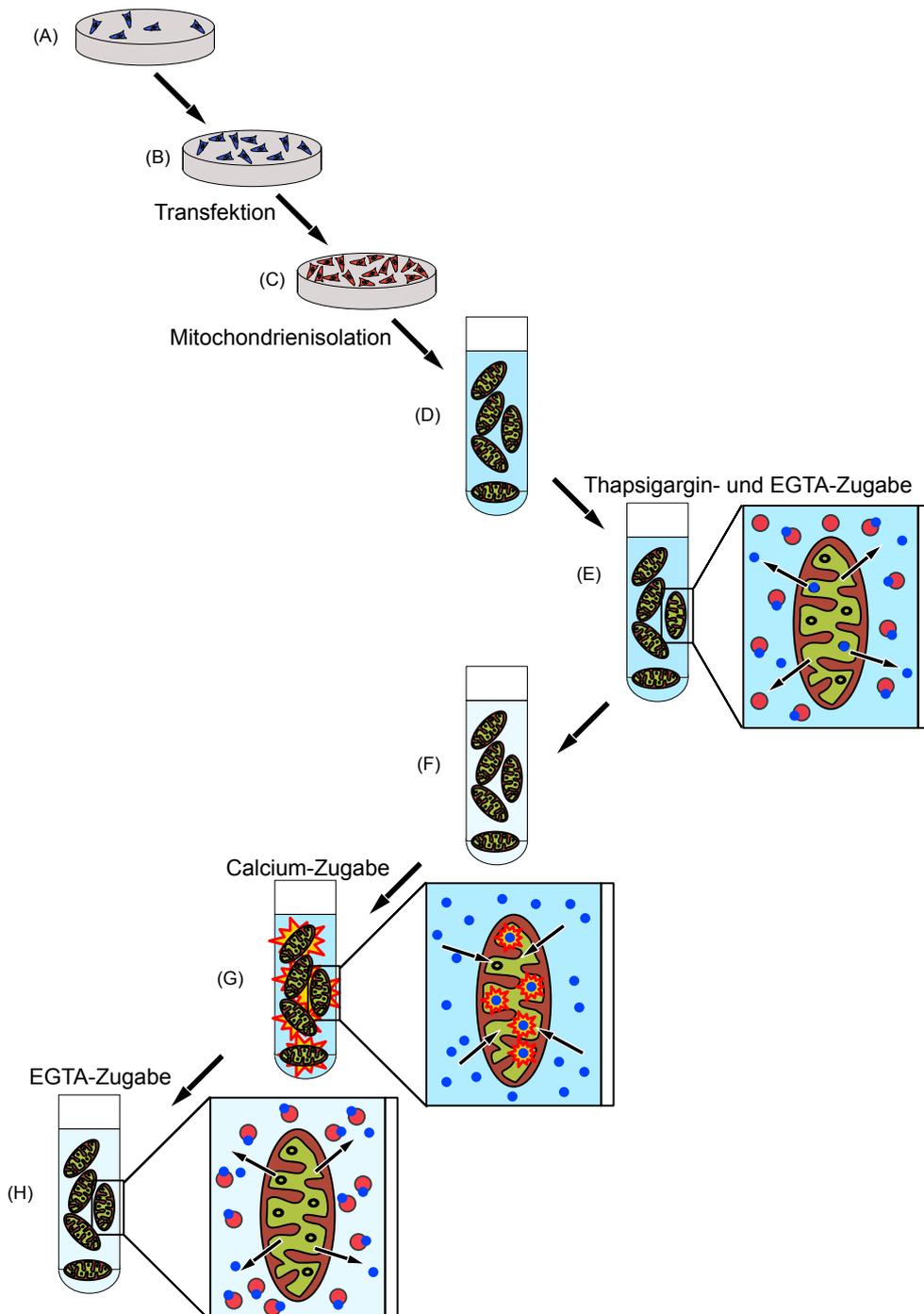


Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines Calciumtransport-Assays mit isolierten Mitochondrien

- (A) Zu Beginn werden HEK293T in Petrischalen ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert
- (B) Tansfektion der Zellen mit einem Mito-LAR-Geco-1.2-beinhaltenen Plasmid. Dieser Ansatz wird für weitere 24 Stunden unter identischen Bedingungen inkubiert.
- (C) Zellen nach der Transfektion, die Zellernte kann erfolgen.
- (D) Es erfolgt der mechanische Zellaufschluss sowie die Isolation der Mitochondrien
- (E) Inkubation der Mitochondrien in 200 nM Thapsigargin sowie 1 mM EGTA. Thapsigargin inhibiert die SERCA des Endoplasmatischen Retikulums (nicht dargestellt) während EGTA (rote Punkte) freies Calcium (blaue Punkte) komplexiert.
- (F) Ziel des Inkubationsschrittes in (E) ist die Erstellung eines möglichst Calcium freien Milieus
- (G) Nach Zugabe von 10 µM Calcium kommt es zu einer Calcium-abhängigen Intensitätszunahme des Fluoreszenzsignals. In der Vergrößerung zeigt sich die Fluoreszenzzunahme in der Bindung von Calcium-Ionen (blaue Punkte) an den Calciumsensor begründet (rotes Signal um die Calcium-Ionen in der mitochondrialen Matrix).
- (H) Nach 80 Messzyklen im TECAN *plate reader* erfolgt die Zugabe von 2 mM EGTA, welche analog zu Schritt (E) eine Komplexierung des Calciums vollziehen. Hierbei kommt es letztlich zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals.

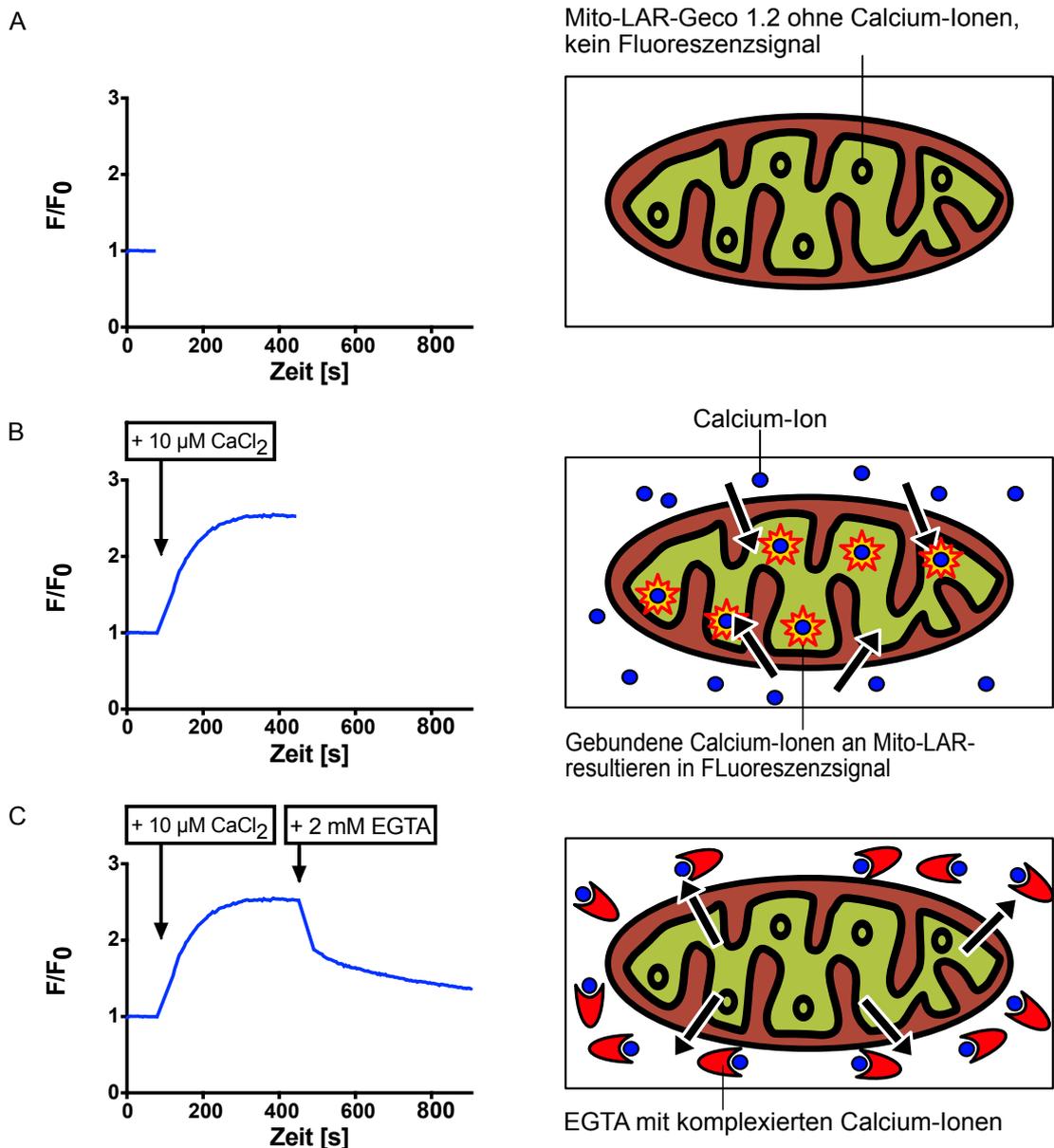


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines typischen Kurvenverlaufs während einer Calciummessung und den zugrunde liegenden molekularen Vorgängen.

- (A) Zu Beginn der Calciummessungen wird das Ruhesignal unter calciumfreien Bedingungen in 20 Messzyklen ermittelt. In der Kurve zeigt sich dies als initial annähernd horizontaler Verlauf. Auf der molekularen Ebene entspricht dies am ehesten dem Grundfluoreszenzsignal der in der Probe enthaltenen Mitochondrien mit dem in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Calciumsensor im calciumfreien Zustand. Dieses Grundsignal bildet den Bezugspunkt für die Normierung der Daten. Hierfür wird jeder Messpunkt (F) durch den Mittelwert dieser 20 Messpunkte (F_0) dividiert und ergibt so eine normiertes Fluoreszenzsignal (F/F_0).
- (B) Nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Calcium zur Probe kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Diese Signalzunahme korreliert mit der Aufnahme von Calcium via MCU (nicht dargestellt) in die Mitochondrien. Calcium bindet in der Matrix den Calciumsensor Mito-LAR-GECO 1.2, wodurch sich dessen Konformation ändert (nicht dargestellt). Diese Konformationsänderung resultiert in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals. Letztlich erreicht der Kurvenverlauf ein Plateau, welches wohl dem Gleichgewichtszustand zwischen Calciumeinstrom und Calciumausstrom entspricht. Die Messung des Fluoreszenzsignals nach Calciumzugabe beinhaltet 80 Messzyklen.
- (C) Im Anschluss erfolgt der Zusatz von 2 mM EGTA. Es folgen weitere 100 Messzyklen. Der Kurvenverlauf zeigt eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals. Auf molekularer Ebene ist dies vermutlich durch Komplexierung des Calciums durch EGTA bedingt, infolgedessen es zu einem Efflux des Calciums aus den Mitochondrien und damit auch weg vom Calciumsensor kommt. Die Dauer einer Calciummessung mit insgesamt 200 Messzyklen beträgt etwa 900 Sekunden.

3.1.1 Isolierte Mitochondrien zeigten Fluoreszenzsignalantwort infolge eines Calciumstimulus

Initial war zu klären, welche Menge an Mitochondrien im Assay einzusetzen seien, um eine starke Fluoreszenzantwort generieren zu können. Hierfür wurden verschiedene Mitochondrien-Konzentrationen einem starken Calciumstimulus von 100 μM ausgesetzt. Die Mitochondrien-Konzentration bezeichnete dabei vereinfachend die eingesetzte Menge an gemessenem mitochondrialem Protein pro Volumeneinheit aus der Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.3). Hierbei zeigte sich eine Zunahme des Fluoreszenzsignals zwischen 5 und 20 μg Mitochondrien. Zwischen 20 und 25 μg zeigte sich kein deutlicher Unterschied bezüglich der Antwort auf den Calciumstimulus (Abbildung 10). Um die Verlässlichkeit innerhalb einer Messung unter identischen Bedingungen zu testen, wurden 5 $\mu\text{g}/100$ μl Mitochondrien doppelt in einer Messung durchgeführt. Diese zeigten qualitativ und quantitativ vergleichbare Signale. Durch die Zugabe von 2 mM EGTA sollte der mitochondriale Calciumausstrom stimuliert werden, welcher sich als Abnahme des Fluoreszenzsignals manifestierte. Da durch die unterschiedlichen Mitochondrien-Konzentrationen sich auch die Fluoreszenzsignale der Grundlinie vor der Calciumzugabe unterschieden haben, und um eine Vergleichbarkeit der Proben zu generieren, wurden neben den Rohdaten (Abbildung 10 A) auch die auf die Grundlinie normierten Daten dargestellt (Abbildung 10 B). Hierdurch ergab sich eine bessere Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Mitochondrien-Konzentrationen. Als Kontrollen dienten einerseits lediglich IMG-Puffer, der als Standardpuffer für alle Proben verwendet wurde, sowie Mitochondrien, die mit 0,5% Triton X-100 behandelt wurden. Das Fluoreszenzsignal der Probe, die lediglich IMG-Puffer enthielten, konnte somit als Hintergrundfluoreszenz interpretiert werden. Die Bedeutung der Triton X-

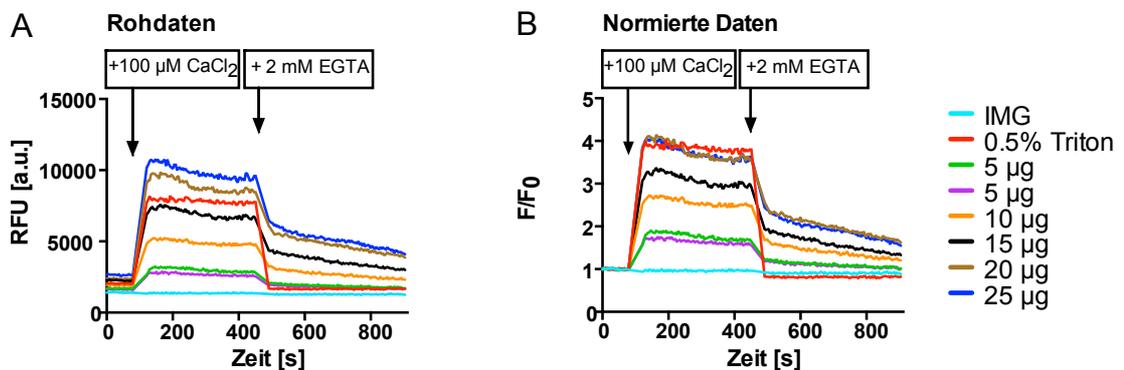


Abbildung 10: Titration verschiedener Mitochondrien-Konzentrationen

Um ein adäquates Signal der Mitochondrien bei Calciumzugabe zu erhalten, werden verschiedene Mitochondrien-Konzentrationen in 100 μl IMG-Puffer eingestellt. Die reine IMG-Pufferlösung ohne Mitochondrien diente als Kontrolle. Die Probe, welche mit Triton X-100 versetzt wurde, enthält 20 μg Mitochondrien. Die Bedeutung der Triton X-100 Kontrolle wird in Abschnitt 3.1.3 genauer beleuchtet. Graph (A) stellt die Rohdaten dar. In (B) sind diese normiert auf das Grundsignal dargestellt.

100 Probe wird in Abschnitt 3.1.3 genauer beleuchtet. Ziel dieses Experiments war es, eine Mitochondrien-Konzentration zu finden, welche sich im mittleren Bereich der Antworten auf den Calciumstimulus befand. Somit sollte gewährleistet werden, dass Veränderungen der Calciumaufnahme sowohl als Zunahme und auch als Abnahme zuverlässig detektiert werden konnten. Des Weiteren sollte die gewählte Mitochondrien-Konzentration auch ein starkes Fluoreszenzsignal auf den Calciumstimulus darbieten. Unter diesen Gesichtspunkten wurde eine Mitochondrien-Konzentration von 15 µg/100 µl als optimale Messbedingung festgelegt, welche auch in folgenden Messungen beibehalten wurde. Auffallend war schon in diesen Messungen der unterschiedliche Verlauf zwischen den Mitochondrien in IMG-Puffer und den Mitochondrien, welche 0,5% Triton X-100 ausgesetzt wurden. Besonders nach Zugabe von 2 mM EGTA zeigten sich deutliche Unterschiede in der Calciumkinetik. In den verschiedenen Mitochondrien-Konzentrationen zeigten sich langsame Abnahmen des Fluoreszenzsignals. Bei den mit 0,5% Triton X-100 behandelten Mitochondrien hingegen war ein abruptes Absinken auf die Grundlinie wahrnehmbar. Da Triton X-100 als Detergenz Membranen angreift und somit die Integrität der Mitochondrien zerstört, stellte sich nun die Frage nach der Intaktheit der Mitochondrien in IMG-Puffer. Diese wurden zunächst anhand der osmotischen Eigenschaft des IMG-Puffers beleuchtet.

3.1.2 Der IMG-Puffer schaffte eine isotonische Umgebung

Da die mitochondriale Integrität eine wichtige Voraussetzung für ihre Funktion darstellt, wurde diese im Kontext der Calciummessung näher begutachtet. Hierfür wurde ein Proteinase K (PK)-Verdau durchgeführt, um den osmotischen Einfluss des IMG-Puffers auf die Mitochondrien genauer zu beleuchten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Mitochondrien aus HEK293T-Zellen wurden in Puffern mit verschiedenen osmotischen Eigenschaften inkubiert. Die ersten beiden Spuren in Abbildung 11 entsprachen den Proben mit isotonischen SM- und Import-Puffer (IB). Mit Ausnahme der Ersten wurden die weiteren Proben in Puffer mit Proteinase K inkubiert. Die zweite Spur zeigte das Ergebnis des PK-Verdau bei isotonischen Bedingungen. Die Mitochondrien der dritten Spur wurden vor dem PK-Verdau in einem hypotonen Puffer (20:1 MOPS/SM) inkubiert. Dies führte zum Anschwellen der Mitochondrien. Durch den osmotischen Stress auf die Mitochondrien kam es zum Platzen der äußeren Mitochondrienmembran. Durch die Membraneinstülpungen, den sogenannten Cristae, ist die Innenmembran der Mitochondrien in der Lage zu expandieren und bedingt so ein Anschwellen der Mitochondrien. Somit stellte die dritte Spur das Ergebnis des PK-Verdau geschwollener Mitochondrien dar. Die letzte Spur entspricht Mitochondrien, die in dem zu untersuchenden IMG-Puffer

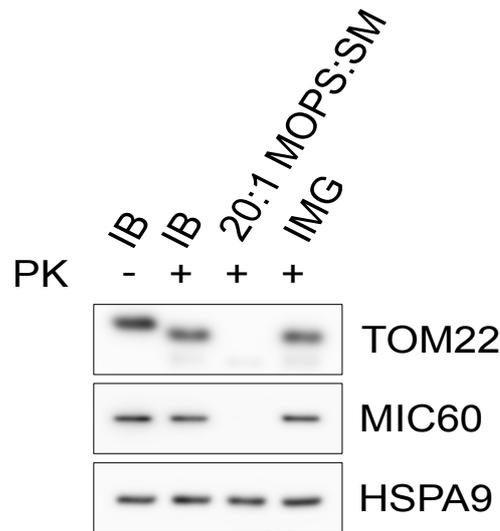


Abbildung 11: Die osmotischen Eigenschaften des IMG-Puffers

Die Mitochondrien wurden aus HEK293T-Zellen isoliert und für 30 Minuten in den jeweiligen Puffern inkubiert, bevor der Proteinase K Verdau für 30 Minuten durchgeführt wurde. Die erste Spur stellt die Mitochondrien in Importpuffer (IB) mit 320 mM Sucrose, aber ohne PK-Verdau dar und dient als dessen Kontrolle. Die zweite Spur stellt dieselben Bedingungen dar, jedoch mit PK-Verdau. Sie entspricht dem Ergebnis des PK-Verdau bei isotonischer Umgebung. Die dritte Spur stellt hypotone Bedingungen mit 16 mM Sucrose dar. Die letzte Spur entspricht dem zu untersuchenden IMG-Puffer. Als Marker für die mitochondriale Oberfläche und Außenmembran dient ein TOM22 Antikörper. Der Intermembranraum wird durch MIC60 abgebildet. HSPA9 repräsentiert die mitochondriale Matrix. Das Profil des IMG-Puffers entspricht den isotonischen Verhältnissen des Importpuffers.

resuspendiert wurden. Die Oberfläche der Mitochondrien wurde durch TOM22 repräsentiert, während der Intermembranraum durch MIC60 dargestellt wurde. Die mitochondriale Matrix wurde durch HSPA9 abgebildet. Unter isotonischen Bedingungen zeigte sich ein Verdau oberflächlicher mitochondrialer Proteine (zweite Spur), welcher sich in einer Fragmentierung von TOM22 widerspiegelte. Hervorzuheben ist, dass sich keine Veränderungen des Bandenmusters im Intermembranraum oder der mitochondrialen Matrix zeigten. Mitochondrien, welche in einem hypotonen Puffer resuspendiert und dann mit PK versetzt wurden, zeigten ein vollständigen Verdau oberflächlicher Proteine, welcher sich im kompletten Verlust der TOM22 Bande widerspiegelte (dritte Spur). Im Vergleich zu isotonischen Verhältnissen fiel des Weiteren der Verlust der MIC60 Bande auf. Folglich fand der Proteinase K Verdau auch innerhalb des Intermembranraums statt, worauf diese erst durch die veränderten osmotischen Verhältnisse Zugriff erhalten hatten. Der osmotische Stress führte zum Aufplatzen der äußeren Membran, wodurch der Intermembranraum für die Proteinase K zugänglich wurde. Die Innenmembran blieb allerdings intakt. Folglich war die HSPA9-Bande unverändert, da die Proteinase K keinen Zugriff auf die mitochondriale Matrix erhielt.

Der zu beurteilenden IMG-Puffer zeigte große Ähnlichkeit mit dem Bandenmuster der isotonischen Kondition in der zweiten Spur. Es zeigte sich ein Verdau oberflächlicher Proteine, welcher sich in einer Fragmentierung von TOM22 offenbarte. Der

Intermembranraum sowie die mitochondriale Matrix waren nicht beeinflusst. Das Profil des IMG-Puffers entsprach dem des isotonischen Importpuffers, weshalb von isotonischen Eigenschaften des IMG-Puffers ausgegangen werden konnte. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass der IMG-Puffer die osmotische Integrität der Mitochondrien bewahrt, was sich in einer intakten äußeren mitochondrialen Membran widerspiegelte.

3.1.3 Triton X-100 zeigte maximales Calciumsignal, gab Hinweise auf mitochondriale Integrität und Transporter-vermittelten Calciumtransport

Nachdem im PK-Verdau gezeigt wurde, dass die Mitochondrien in IMG-Puffer keinem osmotischen Stress ausgesetzt waren, sollte nun geklärt werden, ob die Integrität auch während der Calciummessung erhalten bleibt. Der Extremfall eines totalen Kollapses der mitochondrialen Membransysteme sollte in diesem Experiment durch die Behandlung mit Triton X-100 simuliert werden. Triton X-100 ist ein Detergenz, wodurch die mitochondrialen Membranen solubilisiert wurden und der Inhalt innerer mitochondrialer Kompartimente in die Pufferlösung freigesetzt wurde. Somit konnte das Verhalten zerstörter Mitochondrien innerhalb der Calciummessung beurteilt werden. Diese zeigten eine deutlich veränderte Kinetik im Vergleich zu intakten Mitochondrien. Betrachtet man nun die beiden Kurven in Abbildung 12A, denen 5 μM Calcium hinzugefügt wurden, so fällt auf, dass die Mitochondrien, welche mit 0,5% Triton X-100 behandelt wurden, infolge der Calciumzugabe direkt ihr Plateau erreichten und dieses auch beibehalten haben. Die intakten Mitochondrien in IMG-Puffer zeigten hingegen eine Kinetik im Verlauf ihres Fluoreszenzsignals. Sie erreichten ihr Plateau erst kurz vor EGTA-Zugabe. Diese unterschiedliche Zunahme des Fluoreszenzsignals zwischen diesen beiden Proben war deutlich wahrzunehmen, obwohl sie beide jeweils 15 μg Mitochondrien beinhalten haben und auch mit dem gleichen Calciumstimulus von 5 μM Calcium behandelt wurden. Trotzdem ist das Maximum dem Fluoreszenzsignal der intakten Mitochondrien, welche mit 5 μM Calcium stimuliert wurden, deutlich über dem der mit 0,5% Triton X-100 behandelten Mitochondrien gewesen. Bedenkt man, dass bei der Auflösung der Membranen auch der komplette Calciumsensor freigesetzt wurde, sich dieser daraufhin in Lösung befand, so ist dieser dem Calcium vollständig zugänglich gewesen. Da es allerdings durch den frei in der Lösung liegenden Sensor womöglich zu einer Verhältnisänderung zwischen diesem und dem applizierten Calcium gekommen war, wurde zu weiteren Proben, die mit 0,5% Triton X-100 behandelt wurden, 100 μM Calcium zugegeben. Diese sind in der Abbildung 12 A und 12 B zu sehen. Durch die

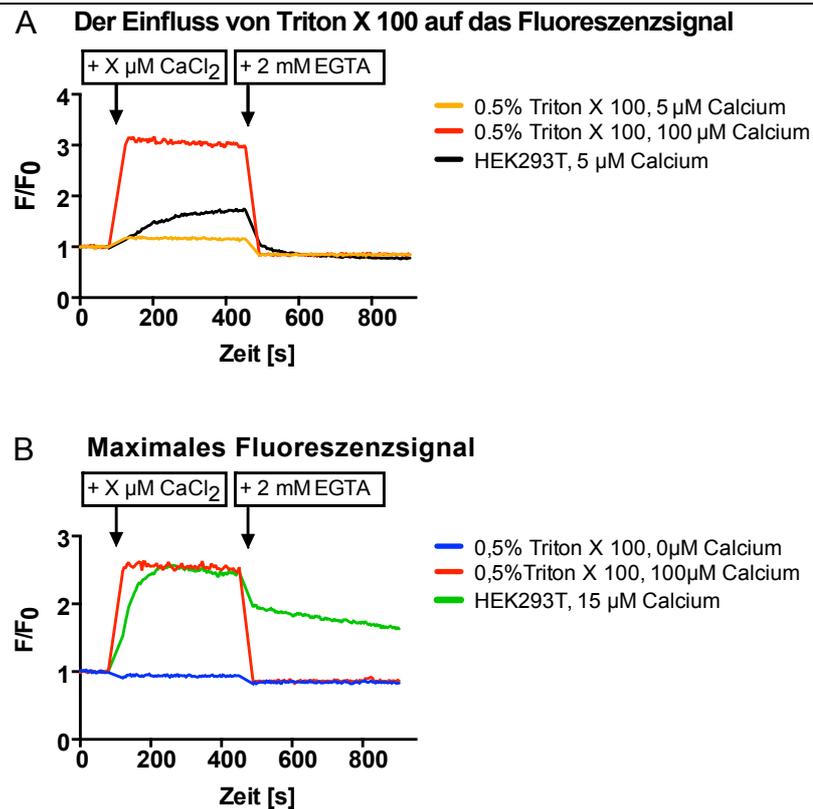


Abbildung 12: Triton-Kontrolle lieferte Hinweise auf maximales Calciumsignal, auf die mitochondriale Integrität sowie die Transporter-vermittelte Calciumaufnahme

Es wurden 15 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Mitochondrien pro Kondition verwendet. Die ersten beiden Konditionen wurden mit 0,5% Triton X 100 behandelt. Dadurch werden die Mitochondrien zerstört und somit liegt der Calciumsensor Mito-LAR-GECO1.2 frei im IMG-Puffer vor. Das erste Experiment (A) zeigt das resultierende Fluoreszenzsignal auf ein Calciumstimulus von 5 μM . Zudem wurde in einer weiteren Probe mit Triton X 100 100 μM Calcium zugesetzt. Das zweite Experiment (B) zeigt einen ähnlichen Versuchsaufbau. Jedoch wurde die Proben mit 0,5% Triton X 100 einmal maximal stimuliert mit 100 μM Calcium und einmal 0 μM Calcium ausgesetzt. Zu den Mitochondrien, die nicht mit 0,5% Triton X 100 behandelt wurden, ist ein 15 μM Calciumlösung zugegeben worden. Auch hier zeigen sich noch Unterschiede in der Kinetik nach Calciumzugabe. Die

Zugabe von 100 μM Calcium zeigte sich derselbe Verlauf des Fluoreszenzsignals wie bei der Zugabe von 5 μM Calcium. Das Plateau wurde unverzüglich erreicht und auch beibehalten. Jedoch war dieses nun deutlich höher als bei 5 μM Calcium. Somit ist davon auszugehen, dass es bei der Freisetzung des Sensors durch die Behandlung der Mitochondrien mit 0,5% Triton X 100 zu einer Verhältnisänderung gekommen war. Diese konnte aber durch die Zugabe von höher konzentrierten Calciumlösungen kompensiert werden. Auch höhere Calciumkonzentrationen führten zu keiner weiteren Steigerung des Signals (Daten nicht gezeigt). Der Graph Abbildung 12 B zeigt einen ähnlichen Versuchsaufbau. Es wurden zwei Proben mit 0,5% Triton X-100 behandelt. Eine von diesen wurde mit 100 μM Calcium stimuliert und der andere wurde eine 0 μM Calciumlösung zugegeben. Durch Zugabe von 100 μM Calcium stellte sich ebenfalls wieder unverzüglich das Plateau ein. Bei Zugabe von 0 μM Calcium zeigte sich kein Anstieg, sondern eine leichte Abnahme des Fluoreszenzsignals, welche am ehesten der Verdünnung der Lösung entsprach. Die dritte Kondition beinhaltete isolierte Mitochondrien aus HEK293T Zellen, die mit 15

μM Calcium versetzt wurden. Es zeigte sich daraufhin eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals, welches nach einem kurzen Anstieg ein Plateau erreichte. Dieses Plateau entsprach dem der mit $100 \mu\text{M}$ Calcium stimulierten Triton X-100 Probe. Jedoch zeigten sich selbst bei diesem steilen Anstieg nach Stimulation mit $15 \mu\text{M}$ Calcium noch Unterschiede im zeitlichen Verlauf zwischen diesen beiden Proben. Betrachtet man nun das Verhalten der verschiedenen Kurven nach EGTA-Zugabe, so zeigten sich hier noch drastischere Unterschiede in der Kinetik. Bei allen mit $0,5\%$ Triton X-100 behandelten Konditionen zeigte sich ein abrupter und quasi vollständiger Abfall des Fluoreszenzsignals. In Abbildung 12 B ist zu sehen, dass die mit $100 \mu\text{M}$ stimulierte Triton X-100 Probe auf dasselbe Fluoreszenzsignal abfiel wie die $0 \mu\text{M}$ Calcium ausgesetzte Probe. Somit konnte von einer vollständigen Komplexbildung des Calciums durch die zugegebene Menge EGTA ausgegangen werden. Ein vollkommen abweichendes Bild zeigte sich in den intakten Mitochondrien. Hier zeigte sich vor allem bei der Verwendung höherer Calciumkonzentrationen wie $15 \mu\text{M}$ (Abbildung 14 B) aber auch andeutungsweise bei $5 \mu\text{M}$ Calciumzugabe (Abbildung 14 A) eine deutlich langsamere Abnahme des Fluoreszenzsignals. Da der Unterschied zwischen diesen Konditionen das Vorhandensein von Membranen und damit der mitochondrialen Integrität war, zeigte sich hierdurch wahrscheinlich der Transporter-vermittelte Calciumtransport der Mitochondrien. Diese Kinetik war sowohl in der Zunahme des Fluoreszenzsignals nach Calciumstimulus sowie in der Abnahme des Fluoreszenzsignals nach EGTA-Zugabe in den intakten Mitochondrien sichtbar. Außerdem zeigte sich, dass intakte Mitochondrien im Vergleich zu Mitochondrien, die mit Triton X-100 behandelt wurden, bei gleicher Calciumzugabe eine Akkumulation des Calciums bewerkstelligen konnten, was sich in einer stärkeren Zunahme des Fluoreszenzsignals äußerte (Abbildung 14 A). Bekräftigt wurde die Annahme des Transporter-vermittelten Calciumsignals zudem durch die abrupten Verläufe der Kurven der Mitochondrien, welche mit $0,5\%$ Triton X-100 behandelt wurden. In diesen Proben lag der Calciumsensor frei in Lösung und war somit, unabhängig von jeglichem Transport über Membranen, für die zugegebenen Calcium-Ionen erreichbar. Auch konnten vorhandene Calcium-Ionen durch EGTA-Zugabe schnell komplexiert werden.

Der Erkenntnisgewinn aus diesen Experimenten lässt sich in drei Punkten zusammenfassen. Einerseits zeigten die mit Triton X-100 versetzten Proben, wie sich das Fluoreszenzsignal nach Auflösung der mitochondrialen Membranen verhält und erbrachte Hinweise auf Intaktheit der mitochondrialen Membranen und implizierte somit mitochondriale Integrität innerhalb des Calciumtransport Assays. Andererseits gab der unterschiedliche Kurvenverlauf zwischen intakten und mit Triton X-100 versetzten Mitochondrien Hinweise auf eine Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals

von Transportmechanismen über die mitochondrialen Membranen. Letztlich offenbarten die mit Triton X-100 versetzten Proben das maximal mögliche Fluoreszenzsignal. Durch Zugabe von hohen Mengen Calcium konnte der nun in der Lösung frei vorliegende Sensor abgesättigt werden und so das maximal mögliche Fluoreszenzsignal generiert werden. Die Kenntnis über das maximale Fluoreszenzsignal war fundamental bei der Beurteilung verschiedener Calciumkonzentrationen.

3.1.4 Calciumtitration zeigt Beziehung zwischen zugegebener Calciummenge und Fluoreszenzantwort

Da schon die Analyse der Proben mit Triton X 100 gezeigt hatten, wie wichtig die Wahl einer optimalen Calciumkonzentration war, sollte anschließend der Kurvenverlauf und somit das Ansprechen des Calciumsensors auf verschiedene Calciumkonzentrationen begutachtet werden. Um die Zunahme des Fluoreszenzsignals auf die Zugabe von Calcium zurückführen zu können, wurden in Abbildung 13 A und 13 B Mitochondrien aus transfizierten Zellen 0 μM Calcium ausgesetzt. Diese zeigten keinerlei Anstieg des Fluoreszenzsignals. In den anderen Proben wurden jeweils 15 μg Mitochondrien transfizierter HEK293T Zellen unterschiedlichen Calciumkonzentrationen ausgesetzt. Die Zunahme der Calciumkonzentration erfolgte gleichmäßig in 2,5 μM Schritten bis zu 10 μM . Der Graph in Abbildung 13 A stellt die Verläufe der Kurven bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen dar. Es zeigte sich eine Zunahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Calciumkonzentration. Allerdings wurde ab einer Konzentration von 7,5 μM der Größenzuwachs des Fluoreszenzsignals kleiner, sodass davon auszugehen war, dass 10 μM Calcium bereits dem maximale Fluoreszenzsignal entsprachen. Des Weiteren wurde die AUC (*area under the curve*), also die Fläche unter der Kurve, zwischen Calciumstimulus und EGTA-Zugabe der einzelnen Calciumkonzentrationen bestimmt und in Abbildung 13 B in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die in Abbildung 13 B dargestellten AUC-Werte stammen aus den in Abbildung 13 A abgebildeten Experimenten. Auch hier wurde nochmal die nicht-lineare Zunahme des Calcium-abhängigen Fluoreszenzsignals bei höheren Calciumkonzentrationen deutlich. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass der Sensor mit 10 μM Calcium schon im Sättigungsbereich agierte, weshalb zur Bestätigung dieser Hypothese eine noch höhere Calciumkonzentration eingesetzt wurde. Abbildung 13 C zeigt einen ähnlichen Versuchsaufbau, allerdings wurden nun

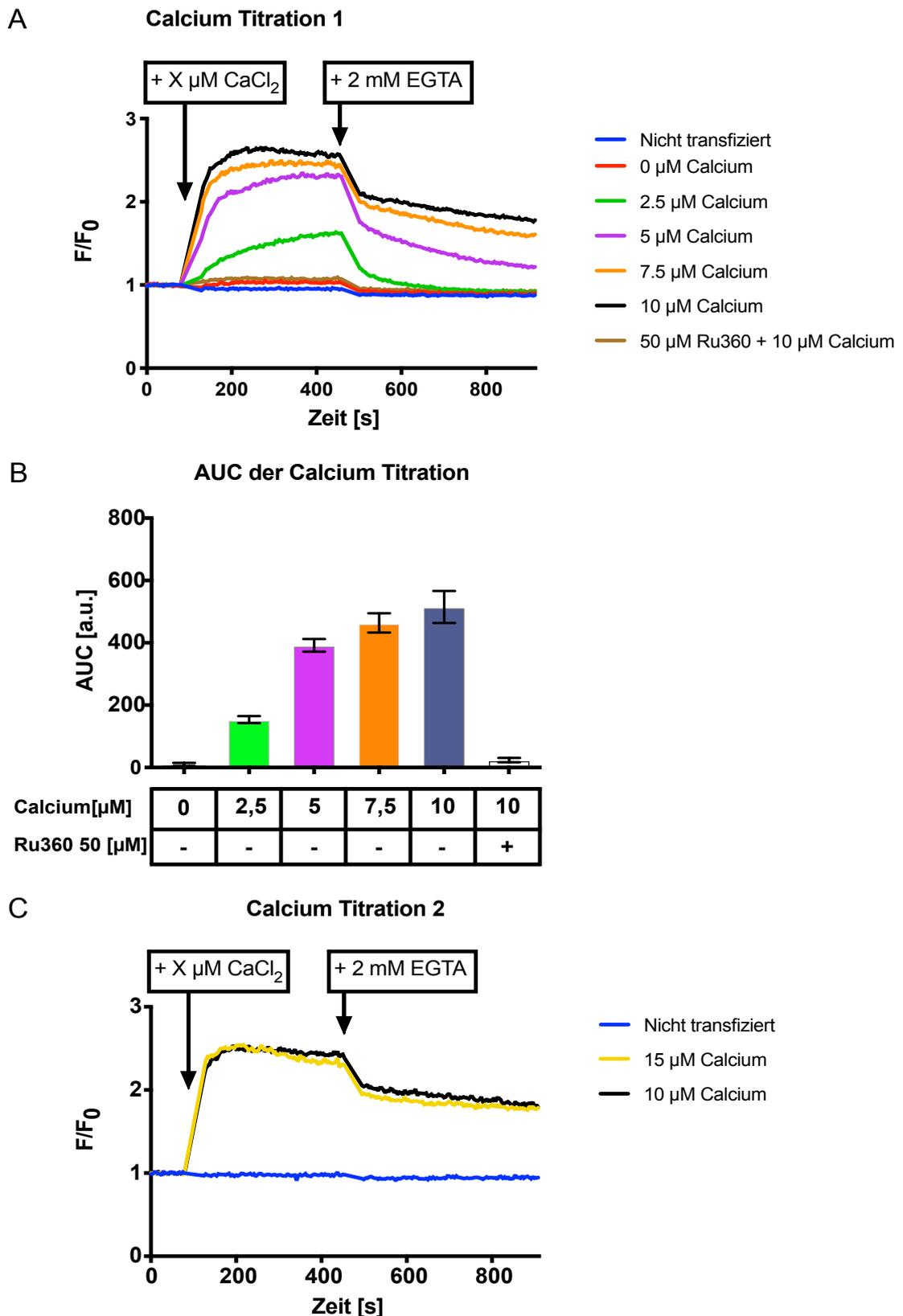


Abbildung 13: Titration verschiedener Calciumkonzentrationen

Um einen möglichst linearen Calciumkonzentrationsbereich zu finden, wurden zu 15 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ isolierten Mitochondrien unterschiedliche Calciumkonzentration zugegeben. Mitochondrien aus nicht transfizierten HEK293T-Zellen dienen als Transfektionskontrolle. Eine 0 μM Calcium-Kontrolle diente zur Validierung, dass der Anstieg des Fluoreszenzsignals tatsächlich auf der Zugabe von Calcium beruht. Durch Zugabe von 50 μM Ru360, einem spezifischen MCU-Inhibitor, konnte die Calciumaufnahme bei 10 μM Calcium inhibiert werden. In (A) ist die Calcium Titration in graphischer Form abgebildet. (B) zeigt die AUC des Calciumsignals ausgewählter Konditionen aus (A). (C) stellt das Ansprechen des Fluoreszenzsignals auf einen Calciumstimulus von 10 und 15 μM dar.

10 und 15 μM Calcium den Mitochondrien zugegeben. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Fluoreszenzsignal zwischen 10 und 15 μM Calciumzugabe. Die Kurvenverläufe waren nahezu identisch. Aus der Analyse mit Triton X-100 war zu entnehmen, dass bei Stimulation der Triton-Kontrolle mit 100 μM Calcium sich ein maximales Calciumsignal einstellte. In Abbildung 12 B ist der Verlauf der Triton-Kontrolle mit 100 μM Calcium sowie intakter Mitochondrien, die mit 15 μM Calcium stimuliert wurden, dargestellt. Es zeigte sich, dass durch die Zugabe von 15 μM Calcium dasselbe Plateau erreicht wurde, wie bei der Triton-Kontrolle nach Zugabe von 100 μM Calcium. Dementsprechend wurde hierbei von einer maximalen Sättigung des Calciumsensors ausgegangen, da das Fluoreszenzsignal der Triton-Kontrolle durch die Detegenz-bedingte Ausschaltung der mitochondrialen Membranen unabhängig von Transportersystemen war. Da sich aber zwischen 10 und 15 μM Calciumzugabe keine Unterschiede des Fluoreszenzsignals zeigten, konnte auch bei 10 μM Calciumzugabe von einer maximalen Sättigung des Calciumsensors ausgegangen werden. Um nochmals den Verlauf nicht transfizierter Mitochondrien darzustellen, wurden diese ebenfalls in IMG-Puffer gelöst und mit 10 μM Calcium behandelt. Sie zeigten keinen Anstieg des Fluoreszenzsignals infolge der Calciumzugabe.

Es lässt sich folglich zusammenfassend bemerken, dass bis zu einer Konzentration von 10 μM ein graduiertes Ansprechen auf steigende Calcium-Konzentrationen erreicht wurden. Bei 10 μM Calcium stellte sich das maximale Fluoreszenzsignal ein. Zudem wurde eine weitere Kontrolle verwendet. Zu 15 μg Mitochondrien wurde zusätzlich zu 10 μM Calcium noch 50 μM Ru360 zugegeben. Bei Ru360 handelt es sich um einen spezifischen MCU-Inhibitor (Oxenoid et al, 2016; Maxwell et al, 2018). Durch dessen Zugabe konnte das Calcium-abhängige Fluoreszenzsignal deutlich blockiert werden. Im folgenden Abschnitt soll der Einfluss von Ru360 auf das Fluoreszenzsignal genauer betrachtet werden.

3.1.5 Ru360 blockiert mitochondriale Calciumaufnahme und unterstreicht so Bedeutung von MCU für das Fluoreszenzsignal

Schon in der Analyse der Proben mit Triton X-100 im Vergleich zu unbehandelten Mitochondrien, kamen Hinweise auf einen Transporter-abhängigen Transport über die mitochondrialen Membranen auf. Ob dieser tatsächlich Transporter-abhängig war und wenn ja, welcher Transporter für die Zunahme des Fluoreszenzsignals verantwortlich war, soll in folgenden Abschnitten adressiert werden. Die äußere mitochondriale Membran gilt allgemein als durchlässig für Calcium-Ionen. Hierfür verantwortlich ist der sogenannte *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC)

(Rizzuto et al, 2012; Pan et al, 2014; Gottschalk et al, 2019). In der Literatur ist der Mitochondriale Calcium Uniporter, kurz MCU, für den mitochondrialen Calcium-Aufnahme über die innere Mitochondrienmembran (Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011) und Ru360 als spezifischer MCU-Inhibitor zu finden (Oxenoid et al, 2016; Maxwell et al, 2018). Um nun den verantwortlichen Transporter zu identifizieren, wurden 2 verschiedene Experimente durchgeführt.

Zuerst wurden Mitochondrien aus HEK293T-Zellen mit Mito-LAR-GECO1.2 als Calciumsensor transfiziert und 10 μM Calcium sowie unterschiedlichen Konzentrationen Ru360 zugegeben. Als Kontrollen für die Messung fungierten Konditionen, in denen 0 μM Calcium sowie kein Ru360 zugegeben wurde. Außerdem wurde eine Kondition lediglich mit 10 μM Calcium und ohne Ru360 stimuliert. Sie dienten als Vergleichskurven für die Übrigen. Das Schema für die Titration orientierte sich an einer logarithmischen Abnahme der Inhibitor-Konzentration von 10 μM bis 1 nM. Abbildung 14 zeigt die Verläufe dieser Kurven (A) sowie die AUC-Werte nach Calciumzugabe als Balkendiagramm in (B). Nach Zugabe von 2 mM EGTA konnte der Calciumausstrom beurteilt werden. Bei 1 nM Ru360 ließ sich kaum ein Unterschied zum Verlauf der Kurve ohne Ru360 erkennen. Folglich gab es in dieser Konzentration kaum einen inhibitorischen Effekt auf die mitochondriale Calciumaufnahme. Nach der Zugabe von 10 nM ließ sich eine sehr leichte Abnahme des Fluoreszenzsignals feststellen. Erst bei 100 nM zeigte sich eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von 10 μM Calcium. Ein lediglich noch marginaler Anstieg des Fluoreszenzsignals erhielt man bei einer Ru360 Konzentration von 1 μM . Eine komplette Blockade des Calciumsignals konnte durch 10 μM Ru360 induziert werden. In Abbildung 14 verläuft die Kurve annähernd kongruent mit den Kontrollen, denen 0 μM Calcium und kein Ru360 zugegeben wurde.

Um die IC_{50} von Ru360 in diesem System bestimmen zu können, wurde die AUC des Calciumstimulus aus den in Abbildung 14 A vereinigten Kurven errechnet. Die verschiedenen logarithmischen Inhibitorkonzentrationen wurden nun zur Erstellung einer Nicht-Linearen Regression verwendet. Dadurch konnte eine IC_{50} von 167 nM errechnet werden. Hieraus ließ sich ableiten, dass es sich bei der gemessenen Zunahme des Fluoreszenzsignals mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um die mitochondriale Calciumaufnahme handelte, welche vom Mitochondrialen Calcium Uniporter MCU vermittelt wurde. Um dies zu bestärken, sollte anschließend das Verhalten von Mitochondrien aus MCU Knockout Zellen beurteilt werden.

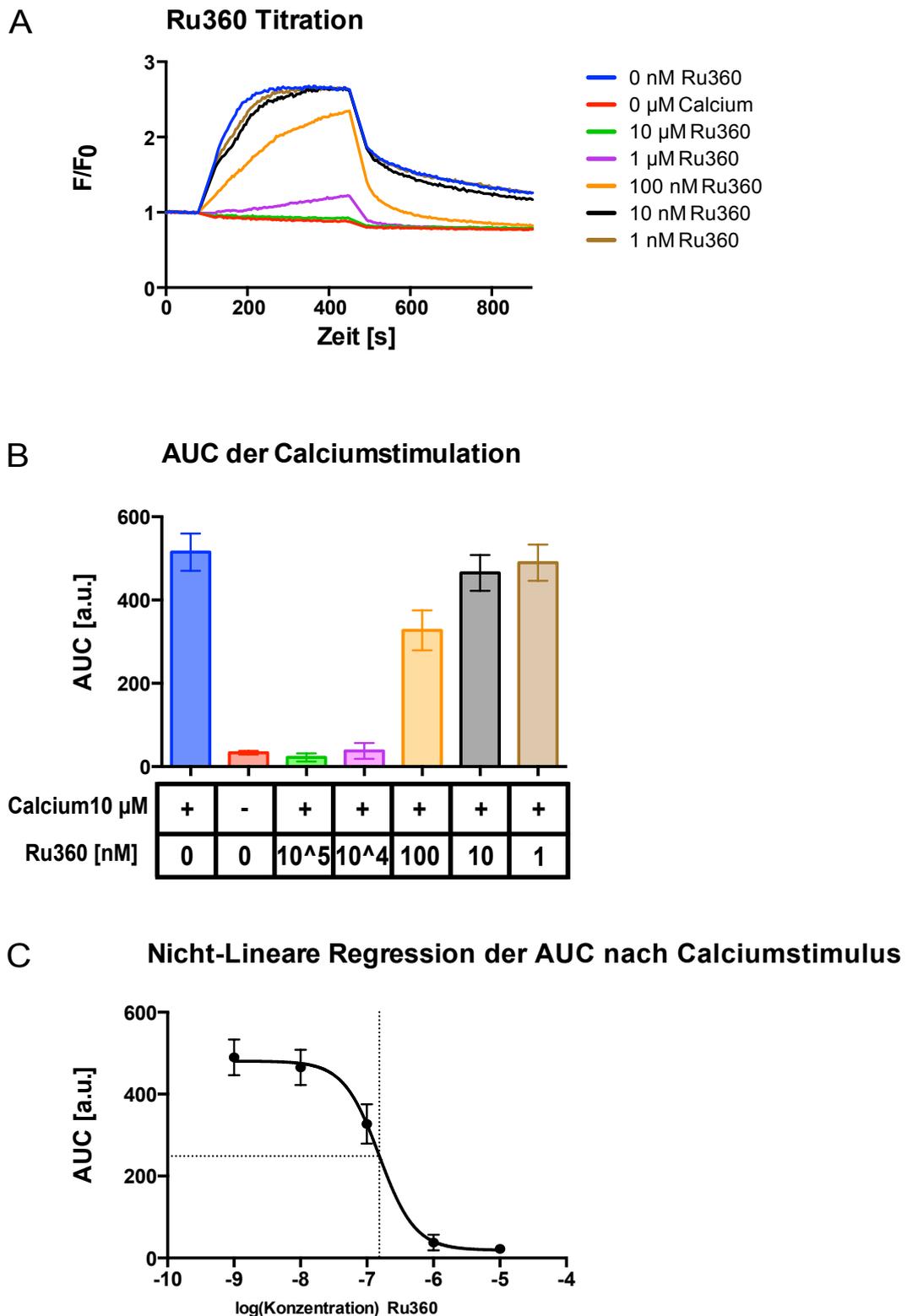


Abbildung 14: Titration des spezifischen MCU-Inhibitors Ru360

Die Mitochondrien wurden aus HEK293T-Zellen isoliert und 10 μ M Calcium ausgesetzt. Des Weiteren wurden unterschiedliche Konzentrationen des spezifischen MCU-Inhibitors Ru360 zugegeben. Die Titration von Ru360 erfolgte logarithmisch von 10 μ M bis 1 nM. In (A) ist der Kurvenverlauf der Ru360 Titration dargestellt. Als Kontrollen dienten einmal die Zugabe von 0 μ M Calcium für das Calciumsignal sowie die Zugabe von 10 μ M Calcium ohne Ru360 als Referenz. (B) zeigt die AUC des Calciumsignals in Form eines Balkendiagramms. (C) zeigt eine Nicht-Lineare Regression der AUC-Werte der logarithmischen Ru360-Konzentrationen aus Graph (B). Die eingezeichnete gestrichelte Linie stellt hierbei eine logarithmische Konzentration von $10^{-6,777}$ Ru360 dar, welche der errechneten IC_{50} von etwa 167 nM entspricht.

3.1.6 Das Fluoreszenzsignal entspricht der MCU vermittelten Calciumaufnahme

Die Blockade des Fluoreszenzsignals durch die Zugabe des spezifischen MCU-Inhibitors Ru360, bestärkte die Annahme, dass es sich bei dem gemessenen Fluoreszenzsignal um die MCU vermittelte Calciumaufnahme in Mitochondrien handelte. Da bei Inhibitoren aber auch immer potenzielle Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können, wurde die Rolle von MCU anhand von MCU Knockout Zelllinien weiter beleuchtet. Isolierte Mitochondrien aus Δ MCU-Zellen zeigten im Vergleich zu HEK293T Zellen keinerlei Ansprechen des Fluoreszenzsignals auf die Zugabe von 10 μ M Calcium (siehe Abbildung 17). Es zeigte sich sogar eine leichte Abnahme des Signals sowohl nach Calcium- als auch nach EGTA-Zugabe. Dies entsprach am ehesten einem Verdünnungseffekt der transfizierten Mitochondrien aus den MCU-Knockout Zelllinien. In Zusammenschau dieser Daten mit den erhobenen Daten aus der Ru360 Titration, in denen sich das Fluoreszenzsignal und somit die Calciumaufnahme in Mitochondrien blockieren ließ, konnte davon ausgegangen werden, dass sich hinter dem gemessenen Fluoreszenzsignal tatsächlich die MCU-vermittelte mitochondriale Calciumaufnahme verbarg.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Methode für Calciummessungen in isolierten Mitochondrien im TECAN *plate reader* etabliert wurde. Hierfür wurden eine Mitochondrien-Konzentration von 15 μ g/100 μ l in einem isotonischen IMG-Puffer eingestellt. Anhand einer Behandlung der Mitochondrien mit 0,5% Triton X-100 konnten wichtige Informationen über das maximale Calciumsignal sowie durch deren charakteristische Kurvenverlauf im Vergleich zu intakten Mitochondrien, Hinweise auf das Vorliegen eines Transporter-abhängigen Calciumflusses sowie das maximale Fluoreszenzsignal gefunden werden. Die optimale Calciumkonzentration wurde mittels einer Calciumtitration in einem Bereich zwischen 2,5 und 10 μ M Calcium analysiert und mit einer Konzentration von 10 μ M für folgende Messungen als geeignet erachtet. Es blieb jedoch die Frage, ob MCU tatsächlich diese Calciumaufnahme in Mitochondrien, welche als Fluoreszenzzunahme im Assay gemessen wurde, bewerkstelligt. Durch eine Titration des MCU-Inhibitors Ru360 konnte die Calciumaufnahme vollständig blockiert werden. Zudem zeigten Mitochondrien aus der MCU-Knockoutzelllinien keinerlei Fluoreszenzzunahme infolge einer Calciumzugabe, sodass es sich bei dem gemessenen Fluoreszenzsignal um eine MCU-abhängige Calciumaufnahme in Mitochondrien handelte. Nachdem nun eine Methode zur Visualisierung der Calciumaufnahme in Mitochondrien erarbeitet wurde, soll diese nun zum Einsatz in verschiedenen Knockout-Zelllinien kommen und ein Einblick in mögliche Defekte der

mitochondrialen Calciumaufnahme im Kontext einer gestörten Innenmembranarchitektur geben.

3.2 Mitochondrien aus den MIC10- und MIC60-Knockout Zelllinien zeigen defizitäre mitochondriale Calciumaufnahme

Der MICOS-Komplex ist ein integraler Bestandteil der mitochondrialen Membranintegrität. Dies wird durch seine Funktion in der Aufrechterhaltung der Cristae-Struktur, vor allem durch die Formation von *Crista Junctions*, sowie die Verbindung zum Protein-Transit innerhalb von Mitochondrien deutlich (zusammengefasst in Wollweber et al, 2017). Knockouts der Hauptuntereinheiten MIC10 sowie MIC60 zeigen eine veränderte Cristae-Architektur. Die Deletion verursacht eine Loslösung der Cristae-Membranen von der restlichen Innenmembran und erzeugt dadurch lamellenartige Membranstapel innerhalb der mitochondrialen Matrix (John et al, 2005; von der Malsburg et al, 2011). Mitochondrien aus den Knockout-Zelllinien weisen eine gestörte Innenmembranarchitektur auf. Auswirkungen dieser Störung der Membranorganisation sind bereits für den Proteinimport sowie die oxidative Phosphorylierung beschrieben (von der Malsburg et al, 2011; Bohnert et al, 2012; Friedman et al, 2015). Auswirkungen auf Signalwege sind bislang unbekannt. In dem folgenden Kapitel soll die Auswirkung der Deletion von MIC10 sowie MIC60, welche eine gestörte Innenmembranarchitektur aufweisen, auf mögliche Veränderungen des Calciumtransports in Mitochondrien beurteilt werden.

3.2.1 Die Calciumtransport Assays von MIC10- und MIC60-Knockout

Mitochondrien zeigten eine verminderte Calciumaufnahmekapazität

Um zu klären, ob die Folgen der Deletion der MICOS-Kernuntereinheiten sich auch auf die Calciumaufnahme auswirken, wurden das Calciumtransport Assay mit isolierten Mitochondrien aus mit Mito-LAR-GECO 1.2 transfizierten Δ MIC10- sowie Δ MIC60 HEK293T-Zellen durchgeführt. Um nun die Calciumaufnahme beurteilen zu können, wurden je 10 μ M Calcium zu den einzelnen Proben zugegeben. Als Vergleichsgruppe dienten isolierte Mitochondrien aus transfizierten HEK293T-Zellen. In Abbildung 15 A sind die Mittelwerte der Fluoreszenzsignale aus drei biologischen Replikaten dargestellt. Alle drei Kurvenverläufe zeigten einen Anstieg des Fluoreszenzsignals auf den Calciumstimulus. Jedoch fiel dieser in den Δ MIC10 sowie

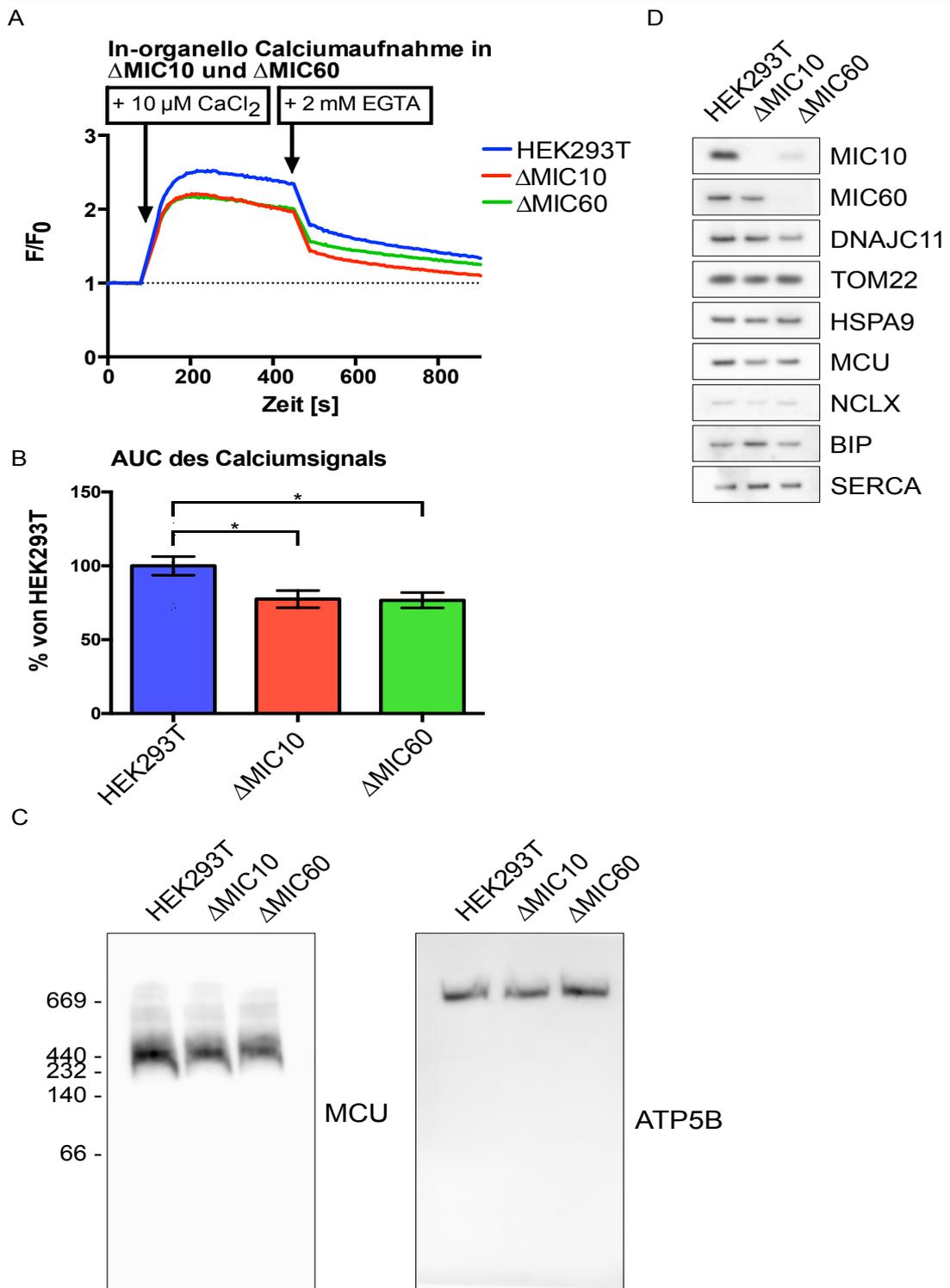


Abbildung 15: Mitochondrien aus den MICOS Kernuntereinheiten Knockout Zelllinien Δ MIC10 und Δ MIC60 zeigten einen reduzierten Calciumtransport

- (A) Calciumtransport Assay mit Mitochondrien aus der Δ MIC10- sowie der Δ MIC60 Knockout Zelllinie. Diese zeigten im Vergleich zu Mitochondrien aus HEK293T-Zellen eine reduzierte Calciumtransport. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten.
- (B) AUC-Werte des Calciumstimulus aus (A). Dargestellt sind der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten und der Standardfehler. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen HEK293T Mitochondrien und Mitochondrien aus Δ MIC10- bzw. Δ MIC60 Zellen ($p < 0,05$).
- (C) Blue Native Gel der Mitochondrien aus Δ MIC10- und Δ MIC60 Zellen. Dargestellt sind der MCU-Komplex sowie ATP5B als Ladekontrolle. Herzlichen Dank an Frau Katja Noll für die tatkräftige Unterstützung beim Anfertigen der BN-Gele.
- (D) Western Blot eines SDS-Gels mit Dekoration der Antikörper des MICOS Kernuntereinheiten sowie verschiedener Marker für das Endoplasmatische Retikulum, den Calciumtransport sowie den MIB-Komplex.

den Δ MIC60 Mitochondrien im Vergleich zu den Wildtyp HEK293T-Mitochondrien geringer aus. Nach Zugabe von 2 mM EGTA zeigte sich in allen Kurven eine Ausstromkinetik. Diese war jedoch in Δ MIC60 Mitochondrien langsamer als in den übrigen Beiden. Um das Calciumsignal weiter zu analysieren, wurde die AUC des Calciumsignals unter den drei einzelnen biologischen Replikaten bestimmt. Da diese Werte isoliert sich nur wenig zum Vergleich eigneten, wurden sie noch in prozentualen Vergleich zum Mittelwert der AUC des Calciumsignals von Wildtyp HEK293T Mitochondrien gesetzt. Die Ergebnisse sind im Balkendiagramm in Abbildung 15 B dargestellt. Gezeigt ist sowohl der Mittelwert der einzelnen Zelllinien im prozentualen Vergleich zu HEK293T als auch die Standardfehler. Es zeigte sich bei einem p-Wert $< 0,05$ eine statistisch signifikante defizitäre Calciumaufnahme sowohl von Δ MIC10- als auch von Δ MIC60- im Vergleich zu normalen Wildtyp HEK293T-Mitochondrien. Um der Ursache dieser defizitären Calciumaufnahme weiter auf die Spur zu gehen, wurden im nächsten Schritt die Menge an mitochondrialen Calcium-Transportsystemen bestimmt, da eine veränderte Menge dieser eine reduzierte Calciumaufnahme zur Folge hätte.

3.2.2 Moderat verminderte MCU-Menge in Kernuntereinheiten-Knockouts

Die zuvor isolierten Mitochondrien wurden weiterführend mittels SDS-Gelen und Western Blots analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 D dargestellt. Die Anfertigung dieser Blots hatte einerseits die Validierung der verwendeten Knockout-Zelllinien sowie ein Blick auf die Proteinverhältnisse im Vergleich zu Mitochondrien aus den Wildtyp HEK293T Zellen zum Ziel.

Zuerst sollten MIC10 bzw. MIC60 betrachtet werden, um deren tatsächlichen Verlust in den Knockout Zelllinien nachzuweisen, was sich durch eine fehlende Bande bei MIC10 sowie eine stark reduzierte Bande bei MIC60 äußerte. Zudem zeigten sich deutlich verminderte MIC10-Level in Δ MIC60 und nur marginal verminderte MIC60-Level in Δ MIC10 Mitochondrien. DNAJC11 stellt neben MIC60 eine Komponente des MIB-Komplexes dar (Ott et al, 2012). Die Banden für DNAJC11 zeigten in Δ MIC10 Mitochondrien ein unauffälliges Bandenmuster, verglichen mit HEK293T-Mitochondrien. Hingegen fanden sich in Δ MIC60 Mitochondrien verminderte Level DNAJC11. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Zugehörigkeit von MIC60 zum MIB-Komplex (Ott et al, 2012). Die Antikörper gegen TOM22 bzw. HSPA9 dienten als Ladekontrollen und zeigten identische Signalintensitäten in allen drei untersuchten Mitochondrien-Populationen. Als essenzielles Protein für die mitochondriale Calciumaufnahme, stellte sich MCU lediglich als leicht schwächere Bande in Δ MIC60 sowie in Δ MIC10 Mitochondrien dar, wobei die MCU-Bande in Δ MIC10 Mitochondrien noch etwas schwächer als in Δ MIC60 Mitochondrien ausgebildet war. Der NCLX-

Antikörper zeigte eine etwas schwächere Signalintensität in Δ MIC10 Mitochondrien. Die Verhältnisse von ER-Resten wurden durch SERCA- und BIP-Antikörper dargestellt. Sie wurden als stärkere Banden in Δ MIC10- sowie unveränderte in Δ MIC60-Mitochondrien, im Vergleich zu Mitochondrien aus HEK293T Zellen, wahrgenommen. Die schwächeren MCU-Banden sind im Kontext der Ergebnisse des Calciumtransport Assays zu diskutieren. Da MCU allerdings als Komplex vorliegt, soll dieser MCU-Komplex und dessen Verhalten in Δ MIC10 und Δ MIC60 Mitochondrien im folgenden Abschnitt beurteilt werden.

3.2.3 Der MCU-Komplex in Mitochondrien aus den Δ MIC10 und Δ MIC60 Zelllinien

Die Intention des Experiments bestand in der Identifikation vermeidlicher Defekte im Aufbau des MCU-Komplexes. Dafür wurden die Mitochondrien mit 1% Digitonin-Puffer solubilisiert und mit Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde die Probe auf ein Gel mit einem Gradienten von 4 bis 13% Acrylamid geladen. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper für ATP5B, einer Untereinheit der ATP-Synthase, dekoriert. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 C abgebildet.

Mittels eines Antikörpers gegen MCU konnte der MCU-Komplex detektiert werden. Dieser zeigte keine Veränderungen im Migrationsverhalten in Mitochondrien aus Δ MIC10- sowie Δ MIC60-Zellen, im Vergleich zu Mitochondrien aus Wildtyp HEK293T Zellen. Der MCU-Komplex zeigte sich als Bande bei etwa 440 kDa. Diese schien, verglichen mit Wildtyp HEK293T Mitochondrien, in den Mitochondrien der Knockout Zelllinien etwa schwächer ausgebildet zu sein. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen aus der SDS-PAGE. Bei der Ladekontrolle ATP5B zeigten sich keine Veränderungen in der Größe des ATP-Synthase-Komplexes.

3.2.4 Mitochondrien der Δ MIC10 und Δ MIC60 Knockout Zelllinien besitzen ein intaktes Membranpotential

Eine elementare Voraussetzung für die mitochondriale Calciumaufnahme stellt ein intaktes mitochondriales Membranpotential dar (Gunter & Pfeiffer, 1990). Dieses kann mittels Fluoreszenzfarbstoffen wie TMRE gemessen werden. Bei TMRE handelt es sich um einen Farbstoff, welcher abhängig vom Membranpotential in den Mitochondrien akkumuliert und eine Anregung bei 549 nm sowie eine Emission bei 575 nm aufweist. Die Durchführung erfolgte im TECAN *plate reader*. Die initialen Messungen sollten eine geeignete TMRE-Konzentration identifizieren (Abbildung 16 A). Hierfür wurden verschiedenen TMRE-Konzentrationen zwischen 200 nM und 1000 nM eingestellt. Als Kontrollen dienten jeweils die Zugabe von 0 nM TMRE als

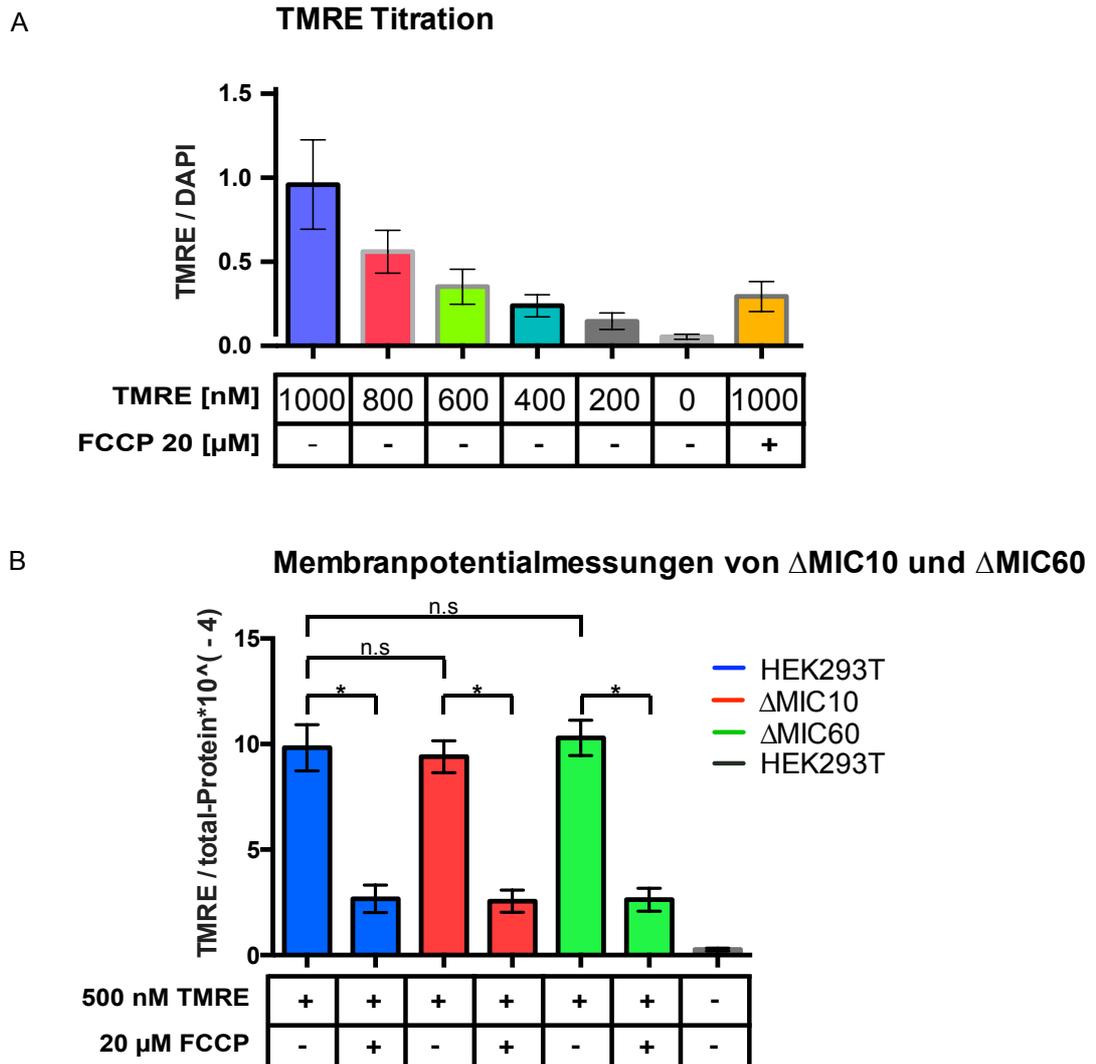


Abbildung 16: TMRE-Titration und TMRE-Membranpotentialmessung der MICOS-Kernuntereinheiten Knockout Zelllinie

- (A) Das Balkendiagramm zeigt das Fluoreszenzsignal verschiedener TMRE-Konzentrationen zwischen 1000 und 0 nM TMRE. 0 nM TMRE fungiert als Negativkontrolle. Außerdem wurden zu 1000 nM TMRE in einer weiteren Probe 20 μM FCCP zugegeben, wodurch sich eine deutliche Abnahme des Fluoreszenzsignals erzielt werden konnte. Normiert wurde auf das DAPI-Fluoreszenzsignal.
- (B) Dargestellt ist das TMRE-Fluoreszenzsignal der Δ MIC10- und Δ MIC60-Zellen im Vergleich zu Wildtyp HEK293T Zellen. Die Fluoreszenzwerte bei 500 nM TMRE zeigten keine signifikante Abweichung der Knockoutzelllinie gegenüber den HEK293T Wildtyp Zellen. Allerdings lassen sich die jeweiligen TMRE-Signale durch Zugabe von 20 μM FCCP deutlich und auch statistisch signifikant ($p < 0,05$) reduzieren. Als Negativkontrolle diente die Zugabe von 0 nM TMRE.

Negativkontrolle sowie die Zugabe von 20 μM des Entkopplers FCCP (Carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon) zu 1000 nM TMRE, um einen Zusammenbruch des Membranpotentials zu erzielen. Die verschiedenen Konditionen wurden auf das DAPI-Signal der jeweiligen Probe normiert. Da mittels DAPI die Zellkerne angefärbt wurden, konnte somit indirekt auf die Zellmenge normiert werden. Die Titration zeigte im Balkendiagramm (Abbildung 16 A) bei der Negativkontrolle mit der Zugabe von 0 nM TMRE ein zu erwartendes minimales Fluoreszenzsignal. Die 20 μM FCCP führten zu einer deutlich sichtbaren Reduktion des Fluoreszenzsignals

verglichen mit 1000 nM TMRE ohne FCCP. Hierin zeigte sich die Wirkung des Entkopplers FCCP, dessen Zugabe zu einem stark reduzierten Membranpotential führte. Das Fluoreszenzsignal zeigte ein abgestuftes Ansprechen auf die unterschiedlichen TMRE-Konzentrationen. Innerhalb dieses Verlaufs zeigte sich ein annähernd linearer Abfall zwischen 800 und 400 nM TMRE. Dementsprechend wurden für Membranpotentialmessungen im weiteren Verlauf eine TMRE-Konzentration von 500 nM verwendet. Mittels eines TMRE-Assays und unter Zuhilfenahme des Entkopplers FCCP wurden die Knockout Zelllinien auf mögliche Membranpotentialdefekte gegenüber Wildtyp-Zellen untersucht. Die Zellen wurden hierfür in 500 nM TMRE für 20 Minuten inkubiert und anschließend im TECAN *plate reader* das jeweilige Fluoreszenzsignal detektiert. Das Signal wurde auf den mittels Bradford bestimmten Proteingehalt der Probe normiert (Abbildung 18 B). Sowohl die Δ MIC10- als auch die Δ MIC60-Zellen zeigten ein annähernd identisches Fluoreszenzsignal, verglichen mit den HEK293T Zellen, es konnte keine statistisch signifikante Abweichung gemessen werden. Zudem ließen sich die jeweiligen Fluoreszenzsignale alle durch Zugabe von 20 μ M FCCP stark reduzieren. Verglichen mit dem jeweiligen korrespondierenden, nicht entkoppelten, Signal, waren die Unterschiede hierbei auch statistisch signifikant. Somit ergab sich kein Anhalt für ein eingeschränktes Membranpotential.

Zusammenfassend zeigten die Experimente zu den Mitochondrien aus der Δ MIC10- und Δ MIC60-Zelllinie eine defizitäre Calciumaufnahme im Calciumtransport Assay. In den korrespondierenden Western Blots zeigten sich zudem leichte Veränderungen der MCU-Proteinlevel. Zudem zeigte sich auch eine abgeschwächte NCLX-Bande in Δ MIC10 Mitochondrien. Der MCU-Komplex wies auf BN-Gelen keine Auffälligkeiten in seinem Migrationsverhalten auf. Allerdings gab es keinen Anhalt für ein gestörtes Membranpotential. Weitere Zelllinien mit einer gestörten Innenmembranarchitektur sollen im folgenden Abschnitt näher beurteilt werden.

3.3 Mitochondrien aus Tafazzin- und DNAJC11-Knockout-Zelllinien zeigten Defekte im mitochondrialen Calciumtransport

Nachdem sich in den isolierten Mitochondrien der Knockout Zelllinien der MICOS Kernuntereinheiten MIC10 und MIC60, für die eine gestörte Innenmembranarchitektur beschrieben ist (Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012), eine defizitäre

Calciumaufnahme feststellen ließ, sollten nun weitere, mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie im Labor von Prof. van der Laan hergestellten, HEK293T Knockout-Zelllinien mit einer mehr oder weniger stark veränderten Innenmembran-Architektur in ähnlicher Weise analysiert werden. Die Fettsäurezusammensetzung der Membran hat einen Einfluss auf die Architektur dieser (siehe 1.2.2.1). Der Einfluss von reifem Cardiolipin, welches eine konus- bzw- kegelartige Form aufweist (zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017), auf die Membranintegrität von Mitochondrien wurde unter anderem im Mausmodellen dargestellt (siehe 1.2.2.4). In Tafazzin-defizitären Mäusen zeigten die Mitochondrien eine reduzierte Zahl an Crista *Junctions* und lamellenartige Membranstapel innerhalb der mitochondrialen Matrix (Acehan et al, 2011; Phoon et al, 2012). Ein weiterer MICOS Interaktionspartner, für den eine veränderte Membranarchitektur mit Blick auf die Feinstruktur der Cristae im Mausmodell beschrieben wurde, stellt DNAJC11 dar (Ioakeimidis et al, 2014).

3.3.1 Verminderte Calciumaufnahme in Mitochondrien aus Tafazzin- und DNAJC11 Knockout Zelllinien

Um die Calciumaufnahme in den Mitochondrien der zuvor beschriebenen Knockout-Zelllinie zu untersuchen, wurden jeweils 15 μg Mitochondrien verwendet und in IMG-Puffer einer Calciumkonzentration von 10 μM ausgesetzt. Als Vergleichskurve dienten isolierte Mitochondrien aus Wildtyp HEK293T-Zellen (Abbildung 17 A). Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier biologischen Replikaten. Es zeigte sich ein deutliches Ansprechen von Mitochondrien aus den Wildtyp HEK293T Zellen auf den 10 μM Calciumreiz, welches sich in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals darstellte. ΔTAZ - sowie $\Delta\text{DNAJC11}$ -Mitochondrien zeigten ebenfalls einen Anstieg des Fluoreszenzsignals infolge des Calciumstimulus. Jedoch fiel der Anstieg und das erreichte Plateau des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den Wildtyp HEK293T Mitochondrien deutlich geringer aus. Nach Zugabe von 2 mM EGTA zeigte sich eine Kinetik des Calciumausstroms, welches sich in einer Abnahme der Fluoreszenz äußerte. Zudem wurde auch der Kurvenverlauf der ΔMCU -Mitochondrien detektiert. Sie zeigten keinerlei Ansprechen auf Calciumzugabe. Lediglich eine Abnahme des Fluoreszenzsignals war feststellbar. Von den jeweiligen Calciumsignalen wurden die AUC-Werte von jedem einzelnen biologischen Replikat ermittelt. Auch bei diesen Mitochondrien aus den Knockout Zelllinien wurden diese in prozentualen Vergleich zu den AUC-Werten der Wildtyp HEK293T-Mitochondrien gesetzt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Mittelwerte der AUC-Werte im prozentualen

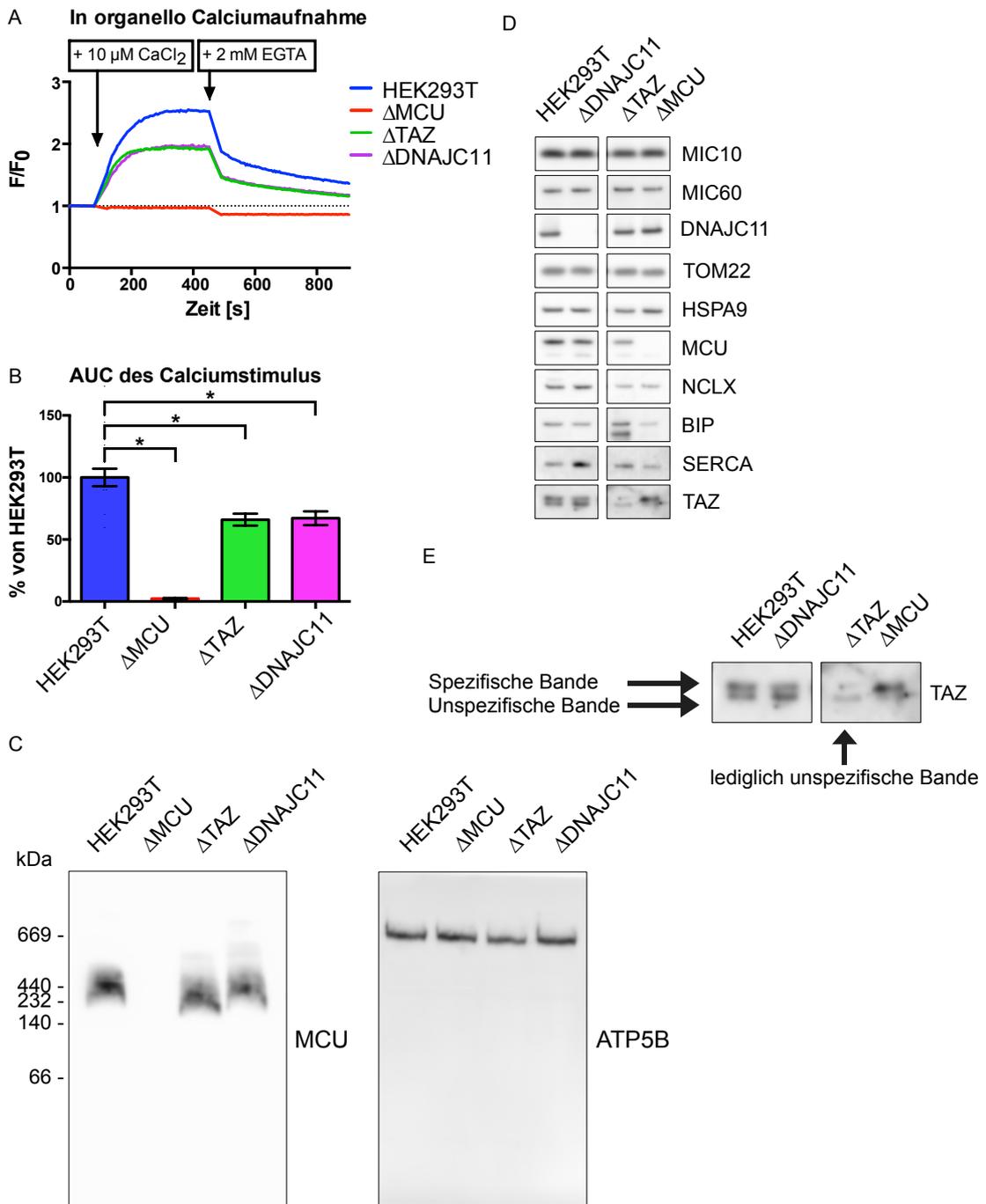


Abbildung 17: Mitochondrien aus Δ DNAJC11- und Δ TAZ-Zellen zeigten eine defizitäre Calciumaufnahme

- (A) Das Calciumtransport Assay zeigte eine reduzierte Calciumaufnahme in Mitochondrien aus Δ TAZ- und Δ DNAJC11 Zellen verglichen mit Mitochondrien aus HEK293T Zellen. Mitochondrien aus Δ MCU-Zellen zeigten keinerlei Ansprechen auf den Calciumstimulus. Dargestellt ist der Mittelwert der Fluoreszenzsignale aus vier biologischen Replikaten.
- (B) AUC-Werte des Calciumstimulus aus (A). Die verwendeten Mitochondrien-Populationen zeigten jeweils eine signifikante Reduktion der Calciumaufnahme verglichen mit Mitochondrien aus HEK293T auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler aus vier biologischen Replikaten.
- (C) Darstellung des MCU-Komplexes auf Blue Native Gelen. Hierbei zeigte sich ein *Downshift* des MCUC der Mitochondrien aus Δ TAZ-Zellen. ATP5B fungierte als Ladekontrolle. Herzlichen Dank an Frau Katja Noll für die tatkräftige Unterstützung beim Anfertigen der BN-Gele.
- (D) Darstellung des Western Blots einer SDS-PAGE. Dekoriert wurden unter anderem Antikörper für die MICOS-Kernuntereinheiten sowie die jeweiligen Knockoutproteine. Zusätzlich Marker für das Endoplasmatische Retikulum, den MIB-Komplex, Proteine der mitochondrialen Calciumaufnahme sowie TOM22 und HSPA9 als Ladekontrollen.
- (E) Darstellung der spezifischen und unspezifischen Bande des Tafazzin-Antikörpers

Vergleich zu HEK293T sowie deren Standardfehler sind im Balkendiagramm in Abbildung 17 B, dargestellt. Das Diagramm verdeutlichte nochmals die defizitäre Calciumaufnahme in Δ TAZ- als auch in Δ DNAJC11-Mitochondrien. Δ MCU-Mitochondrien zeigten keinerlei Calciumaufnahme. Die Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp HEK293T-Mitochondrien waren bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ statistisch signifikant. Mit diesem Experiment konnte eine reduzierte Calciumaufnahme in Mitochondrien aus Tafazzin- und DNAJC11-Knockout Zelllinien beobachtet werden. Im nächsten Schritt wurden mögliche ursächliche Faktoren für eine reduzierte Calciumaufnahme untersucht. Da reduzierte Proteinlevel der Calcium-Transportsysteme eine mögliche Ursache darstellen könnten, wurden diese im nächsten Schritt begutachtet.

3.3.2 Die Proteinlevel von Δ DNAJC11-5, Δ TAZ-29 und Δ MCU-30 im Western Blot

Analog zur oben genannten Methodik und Vorgehensweise wurden Western Blots angefertigt (Abbildung 17 D). Zunächst konnten die jeweilige Knockout Zelllinie verifiziert werden. In Δ DNAJC11 konnte keine Bande für DNAJC11 detektiert werden. Auch zeigte sich keine Bande für MCU in den Mitochondrien der Δ MCU-Zelllinie. Der Tafazzin-Antikörper führte zu einer Doppelbande. Die obere stellte die spezifische Tafazzin Bande dar, während die untere eine Unspezifische darstellte (siehe Abbildung 17 E). In Mitochondrien aus der Δ TAZ-Zelllinie zeigte sich eine fehlende spezifische Tafazzin-Bande. HSPA9 und TOM22 fungierten als Ladekontrollen und zeigten keine Auffälligkeiten.

Die meisten Bandenmuster und -intensitäten der untersuchten Knockout Zelllinien waren überwiegend vergleichbar. Allerdings zeigte sich auch gewissen Unterschiede im Vergleich mit den HEK293T Mitochondrien. In den Mitochondrien aus der Δ TAZ-Zelllinie zeigte sich die Bande für MCU mit leicht verminderter Intensität. Auch die Bande für NCLX stellte sich in den Δ TAZ-Mitochondrien intensitätsgemindert dar. Auch in Mitochondrien aus der Δ MCU-Zelllinie zeigte sich die NCLX-Bande weniger stark sichtbar. BIP zeigte in Mitochondrien aus der Δ TAZ-Zelllinie eine Doppelbande mit erhöhter Bandenintensität. Die vermehrte Intensität sprach möglicherweise für vermehrten ER-Anteilen aus dem Isolationsprozess der Mitochondrien oder für vermehrten Stress für die Zelle bzw. das Endoplasmatische Retikulum. Auch könnte die Doppelbande ein Anzeichen für proteolytische Aktivität innerhalb der Probe darstellen. In Mitochondrien der Δ MCU-Zelllinie war die BIP-Bandenintensität reduziert. Bezüglich der SERCA zeigte sich in den Δ DNAJC11- als auch in Δ TAZ-Mitochondrien eine verstärkte Bandenintensität, wobei in Mitochondrien der

Δ DNAJC11 Zelllinie die Intensität deutlicher verstärkt war. Eine verstärkte spezifische Tafazzin Bande zeigte sich in Δ MCU Mitochondrien. Zusammenfassend zeigten die Western Blots folglich, dass es sich bei den verwendeten Mitochondrien tatsächlich um die jeweilige Knockout Zelllinie handelte. Die MCU-Level waren in Δ DNAJC11 Mitochondrien nicht reduziert. Allerdings sind sie leichtgradig reduziert in Mitochondrien aus der Tafazzin Knockout Zelllinie. Ob sich auch Einflüsse auf den MCU-Komplex feststellen ließen, soll im folgenden Teil beleuchtet werden.

3.3.3 BN-PAGE zeigte *Downshift* des MCU-Komplexes in Δ TAZ Mitochondrien

Da MCU die Calciumaufnahme nicht allein bewerkstelligt, sondern einen Komplex mit anderen Proteinen bildet, soll nun der sogenannte MCU-Komplex der verschiedenen Knockouts auf Blue Native Gelen beurteilt werden (Abbildung 17 C). Die Beurteilung des MCU-Komplexes erfolgte im Vergleich zu Wildtyp HEK293T-Mitochondrien. In den Mitochondrien der MCU Knockout Zelllinie war kein MCU-Komplex nachweisbar. Beim Vergleich des MCU-Komplexes zwischen Wildtyp HEK293T und Δ TAZ-Mitochondrien zeigte sich ein deutlicher MCU-Komplex, jedoch ist dieser weiter im Gradienten-Gel gewandert. In Kontrast dazu zeigte der MCU-Komplex in Δ DNAJC11 im Vergleich zu HEK293T Mitochondrien keinen Unterschied im Migrationsverhalten des Komplexes. Jedoch war eine leicht verminderte Intensität des Signals erkennbar. Als Ladekontrolle wurde ein ATP5B-Antikörper dekoriert. Dieser zeigte keine Abweichung im Migrationsverhalten oder Bandenintensität zwischen den verschiedenen Mitochondrien-Populationen. Zusammenfassend ließ sich sagen, dass in den Blue Native Gelen ein *Downshift* des MCU-Komplexes in Δ TAZ Mitochondrien aufgefallen war. Δ DNAJC11 Mitochondrien zeigten jedoch keine Unterschiede im Laufverhalten des MCU-Komplexes auf BN-Gelen. In Mitochondrien aus Δ MCU-Zellen war kein MCU-Komplex detektierbar. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Calciumaufnahme stellt das mitochondriale Membranpotential dar, welches für diese Populationen im folgenden Abschnitt beleuchtet werden soll.

3.3.4 TMRE-Assay zu Detektion potenzieller Membranpotentialdefekte

Da auch ein reduziertes Membranpotential für eine reduzierte Calciumaufnahme ursächlich sein könnte, wurden auch bei diesen Mutanten TMRE-Messungen zur Erfassung des Membranpotentials mit 500 nM TMRE, nach analogem Prozedere,

Membranpotentialmessungen von Δ DNAJC11, Δ TAZ und Δ MCU

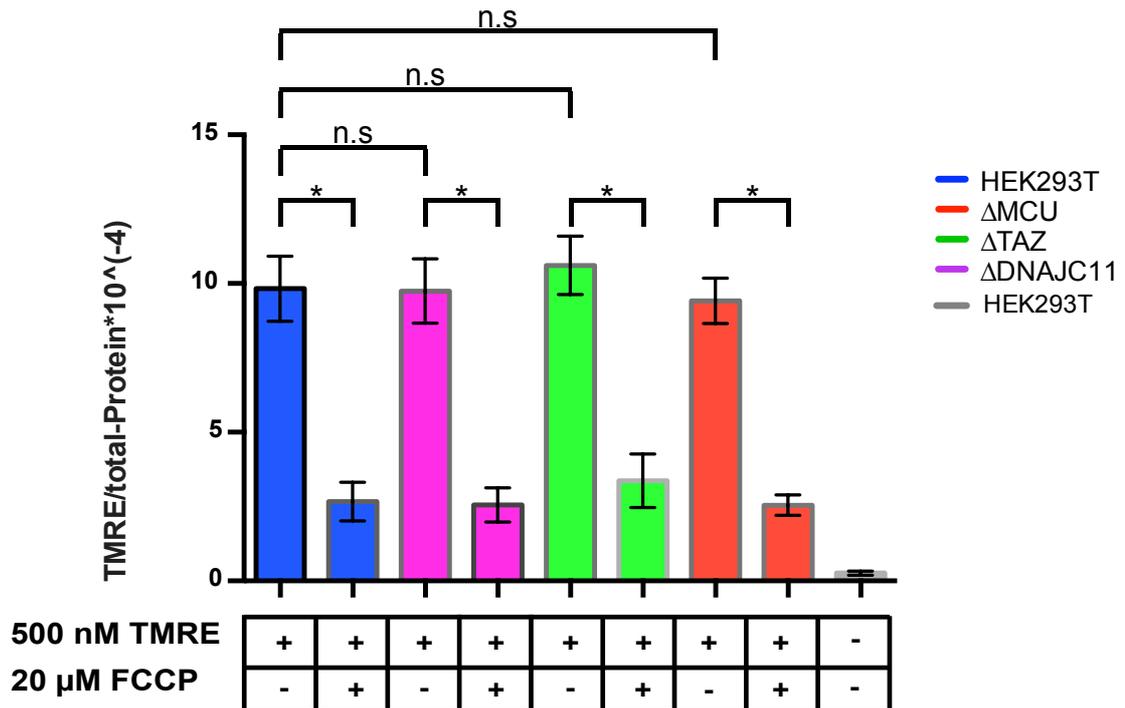


Abbildung 18: Membranpotentialmessungen von Δ DNAJC11-, Δ TAZ- und Δ MCU-Zellen

Membranpotentialmessungen mittels 500 nM TMRE an Δ DNAJC11-, Δ TAZ- und Δ MCU-Zellen. Als Vergleichspopulationen dienten HEK293T-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Keiner der untersuchten Zelllinien zeigte einen signifikanten Unterschied des TMRE-Signals verglichen zu dem von HEK293T-Zellen. Jedoch ließ sich das Signal jeder Mitochondrien-Population durch Zugabe von 20 μ M FCCP signifikant reduzieren ($p < 0,05$). Zur Kontrolle wurde eine Probe mit HEK293T Zellen keinem TMRE ausgesetzt und das Fluoreszenzsignal detektiert.

durchgeführt. Es zeigte sich hierbei ein annähernd gleiches Fluoreszenzsignal der verschiedenen Knockout-Zelllinien verglichen mit HEK293T-Zellen. Hierbei wurde auch keinerlei statistische Signifikanz erreicht. In gleicher Weise wurden die Zellen mit dem Entkoppler FCCP versetzt. Die TMRE-Signale ließen sich hierbei bei HEK293T und allen Knockouts deutlich reduzieren. Diese Signale waren, verglichen mit den reinen TMRE-Signalen, statistisch signifikant reduziert bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Die Abhängigkeit des Signals von TMRE wurde durch die Zugabe von 0 nM TMRE deutlich. Es ergab sich somit kein Anhalt für ein defektes Membranpotential in den dargestellten Knockout Zelllinien.

Betrachtet man nun zusammenfassend alle erhobenen Daten zu Δ DNAJC11- sowie Δ TAZ-Mitochondrien, zeigte sich in diesen eine reduzierte Calciumaufnahme. Dies äußerte sich in einem reduzierten Fluoreszenzsignal infolge eines Calciumstimulus im Calciumtransport Assay. Zudem zeigten die Mitochondrien aus den MCU-Knockout Zelllinien keinerlei Zunahme der Fluoreszenz und unterstrichen die Bedeutung von MCU für das Fluoreszenzsignal. Die Western Blots bestätigten die Identität der verwendeten Knockout-Zelllinien und zeigten, verglichen mit Wildtyp

HEK293T Mitochondrien, keine Abweichungen in den MCU-Leveln für Δ DNAJC11-Mitochondrien, aber eine reduzierte Bandenintensität bei Δ TAZ-Mitochondrien. Besonders hervorzuheben ist der *Downshift* des MCU-Komplexes in den Δ TAZ-Mitochondrien. Des Weiteren konnten keine Hinweise für ein erniedrigtes Membranpotential in den verwendeten Knockout Ziellinien festgestellt werden.

3.4 HEK293T-Zellen mit CCDC127-Knockout besaßen eine suffiziente Calciumaufnahme

In den vorherigen Abschnitten lag der Fokus auf Zelllinien mit Defekten in den MICOS-Kernuntereinheiten, einem MICOS assoziierter Protein sowie einem Protein der Cardiolipin-Homöostase. Diese vier Proteine haben die gestörte Innenmembranarchitektur gemeinsam und zeigten alle eine reduzierte Calciumaufnahme im Calciumtransport Assay. Es stellte sich nun die Frage, ob die gestörte Innenmembranarchitektur den wahrscheinlicheren Einflussfaktor für die verminderte Calciumaufnahme darstellt oder ob eine Beteiligung an MICOS-gekoppelten Vorgängen bzw. die reine Bindung von MICOS diese beeinflusst.

Um dies näher zu untersuchen, sollte das mit MIC19-interagierende CCDC127 (AG van der Laan, AG Fan Liu, unpublizierte Daten) genauer beleuchtet werden. Mitochondrien aus Δ CCDC127 Zellen weisen eine intakte Innenmembranarchitektur auf. Mitochondrien aus der Δ CCDC127-Zelllinie wurden ebenfalls im Calciumtransport Assay analysiert. Der Kurvenverlauf von 3 unabhängigen Calciummessungen ist in Abbildung 19 A dargestellt. Es zeigte sich ein deckungsgleicher Verlauf des Fluoreszenzsignals zu den Mitochondrien aus Wildtyp HEK293T Zellen. Besonders deutlich war dieser kongruente Verlauf im Ruhesignal als auch im Fluoreszenzsignalanstieg nach Zugabe von 10 μ M Calcium. Nach Calciumzugabe zeigte die Kurve des Knockouts somit ein deutliches Ansprechen. Dieses äußerte sich in einem etwa 2,5-fachen Zuwachs des Fluoreszenzsignals, das nach kurzer Zeit ein Plateau erreichte. Eine minimale Diskrepanz des Kurvenverlaufs von Wildtyp HEK293T und Δ CCDC127 Mitochondrien zeigte sich in der Abnahme des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von 2 mM EGTA. Das Fluoreszenzsignal der Mitochondrien GECO 1.2 enthaltenden CCDC127-Knockout-Mitochondrien entsprach somit dem der HEK293T-Mitochondrien. Dementsprechend war bei den Mitochondrien aus den Δ CCDC127-Zellen von keinem gravierenden Defekt der mitochondrialen Calciumaufnahme auszugehen. Der Kurvenverlauf legte eher die Vermutung nahe, dass es sich um eine annähernd identische Calciumaufnahme der Δ CCDC127 Mitochondrien, verglichen mit denen aus Wildtyp HEK293T Mitochondrien, handelte.

Damit konnten die aus Δ CCDC127 Zellen gewonnenen Mitochondrien als ein Beispiel für Mitochondrien mit intakter mitochondrialer Calciumaufnahme angesehen werden.

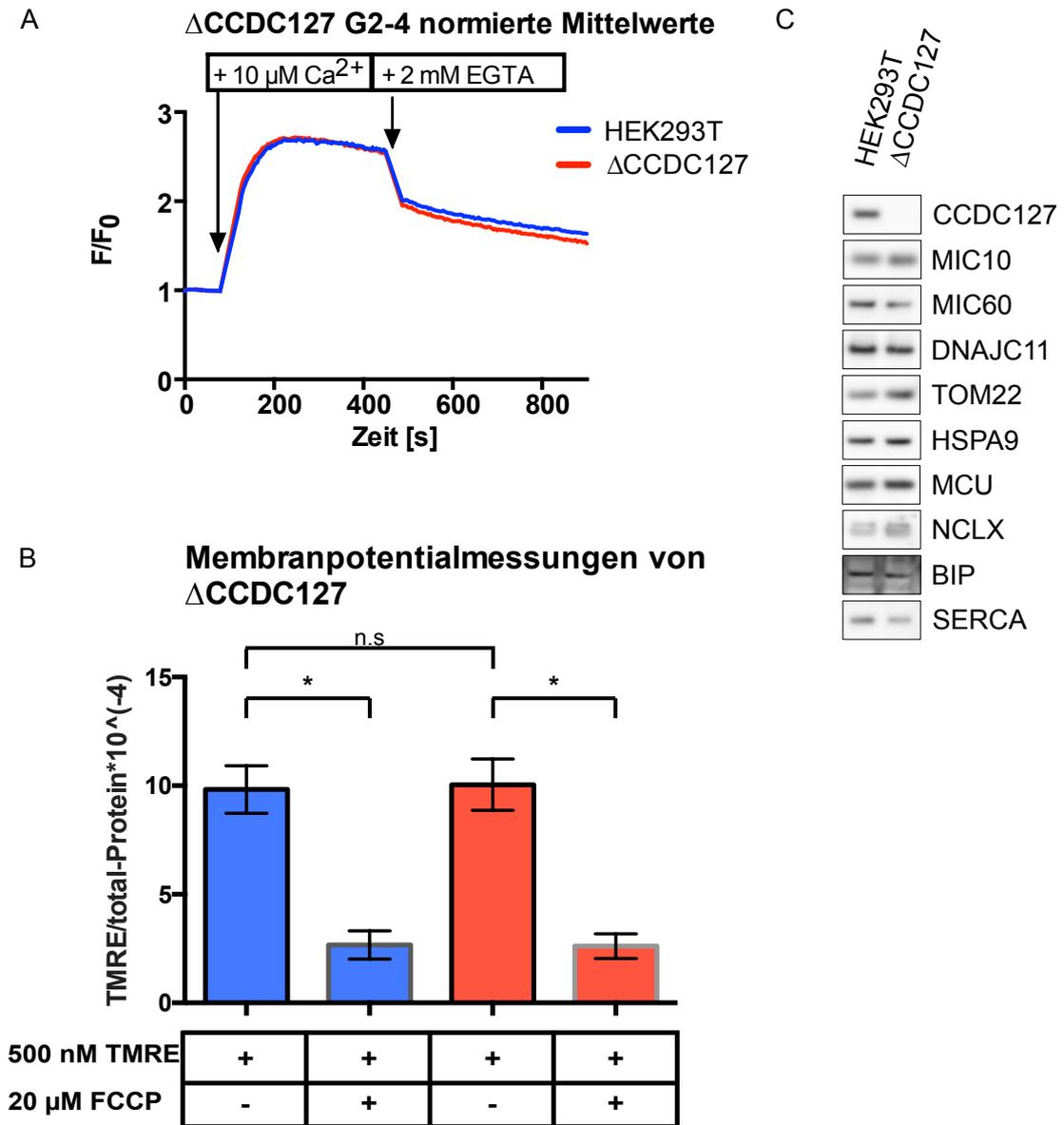


Abbildung 19: Mitochondrien aus Δ CCDC127 Zellen zeigen eine regelrechte Calciumaufnahme

- (A) Calciumtransport Assay mit Mitochondrien aus der CCDC127 Knockout Zelllinie. Als Vergleichskurve dienten Mitochondrien aus HEK293T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten.
- (B) TMRE-Membranpotentialmessungen an Δ CCDC127 Zellen sowie HEK293T_Zellen als Referenz. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten sowie die Standardabweichung. Δ CCDC127-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede verglichen mit HEK293T-Zellen. Jedoch ließ sich bei beiden Populationen das TMRE-Signal durch Zugabe von 20 μ M FCCP signifikant reduzieren ($p < 0,05$)
- (C) Western Blot der SDS-Gele mit Mitochondrien aus HEK293T-Tellen und Δ CCDC127-Zellen. Dekoriert wurden unter anderem Antikörper gegen CCDC127 sowie gegen den MICOS-Komplex und verschiedene Calciumtransporter sowie ER-Marker.

3.4.1 Unveränderte Proteinlevel in Δ CCDC127 G2-4 im Vergleich zu HEK293T Mitochondrien

Um die Proteinlevel der Mitochondrien aus der Δ CCDC127-Zellelinie betrachten zu können, wurden Western Blots angefertigt (Abbildung 19 C). Diese zeigten keine Bande für CCDC127, wodurch die Knockout-Zelllinie validiert werden konnte. Hingegen zeigte sich CCDC127 bei den HEK293T-Mitochondrien als deutliche Bande. Die weiteren Banden der Δ CCDC127 Mitochondrien zeigten sich größtenteils vergleichbar mit den HEK293T Wildtyp Mitochondrien. Lediglich die Bande für die SERCA als Marker für das ER war in Mitochondrien der CCDC127 Knockout Zelllinie leicht intensitätsgemindert. Hervorzuheben ist, dass die Banden für MCU, welcher die Calciumaufnahme ins Mitochondrium bewerkstelligt, in den Mitochondrien der Knockout-Zelllinie in gleicher Weise ausgebildet war wie in den HEK293T Mitochondrien. Dies war im Einklang mit den Ergebnissen des zuvor gezeigten Calciumtransport Assays.

3.4.2 Die CCDC127 Knockout-Zellen zeigten keine Defekte des Membranpotentials

Trotz der zuvor beleuchteten Calciumaufnahme der Mitochondrien aus den Δ CCDC127 Zellen, die keine verminderte Calciumaufnahme aufwiesen, wurde auch kurz der Blick auf das Membranpotential dieser Zellen gelenkt (Abbildung 19 B). Verglichen wurde dieses mit HEK293T Zellen. Analog zur Calciumaufnahme zeigte die CCDC127 Knockout Zelllinie keinen Defekt des Membranpotentials. Dies wurde dem nahezu identischen Fluoreszenzsignal der Δ CCDC127 Zellen in Bezug auf das korrespondierende Signal der HEK293T Zellen auf die Zugabe von 500 nM TMRE entnommen. Dies manifestierte sich somit im Fehlen statistischer Signifikanz zwischen diesen beiden Populationen. Zum Zusammenbruch des Membranpotentials wurden beide Zelllinien zusätzlich mit 20 μ M des Entkopplers FCCP behandelt. Sowohl die HEK293T- als auch die Δ CCDC127 Zellen zeigten einen deutlichen Abfall des Membranpotentials, verglichen mit den Proben ohne FCCP. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit und ohne FCCP innerhalb einer Zelllinie (p-Wert < 0,05). Dies war Ausdruck einer Störung des Membranpotentials unter FCCP-Einfluss. Zusammenfassend lässt sich somit für die Mitochondrien aus der CCDC127 Knockout Zelllinie formulieren, dass für diese eine suffiziente mitochondriale Calciumaufnahme angenommen wurden. Es zeigten sich keine gravierenden Abweichungen bezüglich der Proteinlevel und auch ihre Membranpotentiale zeigten keinen signifikanten Unterschied, verglichen mit HEK293T-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Das Calciumtransport Assay – eine neue Methode zur Visualisierung mitochondrialer Calciumaufnahme von isolierten Mitochondrien

Ziel dieser Arbeit war es, die mitochondriale Calciumaufnahme unter den Bedingungen einer veränderten Membranarchitektur zu beurteilen. Um den Calciumtransport in Mitochondrien detektieren zu können, wurde zuerst eine Methode etabliert, welche die Calciumaufnahme und -abgabe mithilfe eines genetisch codierten Calciumsensors in isolierten Mitochondrien darstellen konnte.

4.1.1 Mitochondrien – das Organell im Fokus

Schon vor dieser Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 894 (SFB 894) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. van der Laan der Einfluss einer gestörten Innenmembranarchitektur auf die mitochondriale Calciumaufnahme adressiert. Erste Experimente hierfür wurden mit semipermeabilisierten MICOS-Mutanten durchgeführt. Die Zellfunktionen in bestimmten subzellulären Kompartimenten zu untersuchen, stellt jedoch immer eine Herausforderung dar. Leider zeigten die Messungen keine eindeutigen und schlüssigen Ergebnisse. Die nun aufkommende Arbeitshypothese war, dass durch die gestörte mitochondriale Membranarchitektur auch weitere zelluläre Prozesse, wie beispielsweise im ER, in Mitleidenschaft gezogen werden. Zudem gibt es derzeit wenig Evidenz darüber, wie die Calcium-Mikrodomänen, also die Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien, in den MICOS-Mutanten aussehen. Dementsprechend war ein Ziel dieser Arbeit, die Calciumaufnahme in isolierten Mitochondrien zu beurteilen. So wurde es möglich, den Einfluss des zellulären Kontextes, vor allem der Mitochondrien assoziierten Membranen (MAM, mitochondria associated membranes), bei denen es sich um physikalische Kontakte zwischen dem ER und Mitochondrien handelt (Vance, 1990; zusammengefasst in Raturi & Simmen, 2013), auf einem Minimum zu reduzieren und durch die sehr kontrollierte Versuchsanordnung reproduzierbare Ergebnisse zu generieren.

Die Isolation der Mitochondrien gelang nach mechanischem Zellaufschluss und differentieller Zentrifugation. Allerdings ergaben sich hierbei auch gewisse Limitationen, denn auch hiermit bleiben reine isolierte Mitochondrien in Lösung ein Idealzustand. Neben den Mitochondrien wurden auch Reste des Endoplasmatischen Retikulums mit präpariert. Dies zeigte sich an den vorhandenen Banden für BIP und

SERCA auf den Western Blots, welche aus isolierten Mitochondrien der verschiedenen Zelllinien angefertigt wurden (siehe Abbildungen 15 D und 17 D). Besondere Bedeutung kommt diesen ER-Resten bei der Interpretation der mitochondrialen Calciumaufnahme zu, da das ER als zellulärer Calciumspeicher fungiert und somit auch über Transportsysteme für Calcium verfügt. Um trotzdem dem Idealzustand reiner Mitochondrien so nah wie möglich zu kommen, wurden vor den Messungen 1 mM EGTA den Proben zugegeben. Ziel dieser EGTA-Zugabe war es, das Calcium vor allem aus den verbliebenen ER-Resten zu entfernen. Zudem wurde die unbeabsichtigte Calciumaufnahme in die ER-Reste durch Zugabe von 200 nM Thapsigargin blockiert. Thapsigargin inhibiert die Calciumaufnahme ins ER über Blockade der SERCA. Durch die Zugabe von EGTA und Thapsigargin wurde eine Mitochondrien-zentrierte Messanordnung, trotz darin enthaltener ER-Reste, generiert. Um ergänzende Daten aus dem intakten zellulären System zu erhalten, könnten in Zukunft Daten zur mitochondrialen Calciumaufnahme auch zusätzlich in intakten Zellen analysiert und verglichen werden. Es stellte sich nun die Frage, wie man veränderte Calciumkonzentrationen in isolierten Mitochondrien zugänglich machen konnte. Hierfür soll im nächsten Abschnitt auf den verwendeten Calciumsensor näher eingegangen werden.

4.1.2 Mito-LAR-GECO 1.2 als Calciumsensor

Die Wahl des verwendeten Sensors stellte eine grundlegende Frage bei der Verwendung dieser Methode dar. Für Calcium-Messungen gibt es eine Reihe verschiedenster chemischer als auch genetisch-codierter Sensoren. Die meisten hiervon sind vor allem im zellulären Kontext etabliert (zusammengefasst in Gökerküçük et al, 2020). Für das Calciumtransport Assay wurde der genetisch-codierten Calciumsensor Mito-LAR-GECO 1.2 verwendet. Derzeit etablierte Methoden an isolierten Mitochondrien verwenden in der Regel chemische Calciumsensoren, wie zum Beispiel Calcium 5N-Green (Maxwell et al, 2018). Im zellulären Kontext können chemische Calciumsensoren in der Regel die Zellmembran überwinden und werden dann nach Spaltung durch unspezifische Esterasen in der Zelle gefangen. Somit ist eine subzelluläre Anreicherung, beispielsweise in Mitochondrien, für viele nicht verfügbar (zusammengefasst in Gökerküçük et al, 2020). Infolgedessen wird mit den meisten chemischen Sensoren im zellulären Kontext, ebenso wie mit Calcium 5N-Green an isolierten Mitochondrien, nur eine indirekte Calciumaufnahme durch die Mitochondrien dargestellt, die sich in einer Abnahme des Fluoreszenzsignals äußert. Hierdurch wird die Aussagekraft dieser teilweise limitiert. Dies wird umso relevanter, wenn die Kontamination isolierter Mitochondrien mit ER-Resten berücksichtigt wird. Diese können ebenfalls Calcium

aufnehmen und können so ebenfalls zur Abnahme des Fluoreszenzsignals beitragen. Eine Differenzierung zwischen ER und Mitochondrien ist so nicht möglich. Allerdings soll an dieser Stelle nicht vorenthalten werden, dass auch chemische Calciumsensoren zur Verfügung stehen, welche sich in Mitochondrien anreichern können. So besitzt beispielsweise Rhod-2 auch nach Esterhydrolyse eine positive Nettoladung und akkumuliert somit relativ spezifisch in der mitochondrialen Matrix (zusammengefasst in Gökerküçük et al, 2020). Allerdings wird auch dieser fluoreszente Farbstoff vor allem im zellulären Kontext angewandt (Maxwell et al, 2018). Limitationen entstehen bei Rhod-2 durch seine schnelle Dislokation aus der mitochondrialen Matrix. Somit entsteht ab einer gewissen Länge der Messungen eine Unverlässlichkeit über die intakte Lokalisation des Sensors (zusammengefasst in Gökerküçük et al, 2020). Jedoch spricht für chemische Sensoren, dass diese lediglich der Mitochondrien- bzw. Zelllösung zugegeben werden und nicht, wie genetisch codierte Sensoren, in Zellen transfiziert werden müssen. Allerdings bieten die genetisch codierten Calciumsensoren auch zahlreiche Vorteile. So wird die subzelluläre Lokalisation genetisch codierter Sensoren über eine eingefügte Zielsequenz determiniert. Im Falle von Mito-LAR-GECO 1.2 handelt es sich hierbei um die mitochondriale Zielsequenz der Cytochrom c Oxidase VIII (Wu et al, 2014). Zudem weisen sie, verglichen mit chemischen Sensoren, eine höhere Substratspezifität auf, zeigen eine geringere Heterogenität zwischen verschiedenen Proben und sind minimalinvasiv im Erreichen ihrer subzellulären Lokalisation (De Michele et al, 2014). Innerhalb genetisch codierter Calciumsensoren können nun noch einmal zwei verschiedene Gruppen unterschieden werden. Einerseits die Chamäleon-Sensoren, welche auf dem Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) beruhen, von den andererseits einfachen, zirkulären Fluorophoren, zu denen auch Mito-LAR-GECO 1.2 gehört (Wu et al, 2014). Der Vorteil von FRET-Sensoren besteht in einer konzentrationsabhängigen Veränderung der Fluoreszenzsignale. Es handelt sich hierbei um konzentrationsabhängige, ratiometrische Veränderungen, worüber letztlich die Calciumkonzentration errechnet werden kann (Wu et al, 2014; Gökerküçük et al, 2020). Der Nachteil von FRET-Sensoren liegt in einer ineffizienteren Translokation über die mitochondrialen Membranen. Dies ist wahrscheinlich ihrer komplexeren und größeren Struktur geschuldet. Hierdurch kann es auch zu fälschlichen Lokalisationen kommen (De Michele et al, 2014). Diesen gegenüber stehen die intensimetrischen Sensoren, welche, neben einer Calmodulin- und einer M13-Domäne, nur ein einzelnes zirkuläres, fluoreszierendes Protein beinhalten. Sie verfügen nicht über ratiometrische Eigenschaften, zeigen aber stärkere Fluoreszenzsignale (Wu et al, 2014). Unter diese Kategorie fällt auch der verwendete Sensor Mito-LAR-GECO 1.2. Durch die Verwendung von Mito-LAR-

GECO 1.2 konnte somit eine effiziente und sichere Lokalisation in der mitochondrialen Matrix angenommen werden. Laborintern wurde die mitochondriale Lokalisation mittels Immunfluoreszenz durch Dr. Alexander von der Malsburg in Gegenüberstellung mit einer MitoTracker Färbung validiert. Zu beachten sind allerdings die intensimetrischen Eigenschaften des Fluoreszenzsignals dieses Sensors, wodurch lediglich eine qualitative Beschreibung des Fluoreszenzsignals möglich ist. Als genetischer Sensor ermöglichte er einen direkten Zugriff auf Veränderungen der Calciumkonzentration innerhalb der mitochondrialen Matrix und nicht indirekt durch Messung der Calciumkonzentration in der verwendeten Lösung, wie dies häufig bei chemischen Sensoren anzutreffen ist. Im Vergleich zu anderen genetisch-codierten Sensoren garantierte er starke Veränderungen des Fluoreszenzsignal, lieferte somit ein solides Messsignal, und gewährleistete eine sichere Translokation über die mitochondrialen Membranen und somit dessen Lokalisation in der mitochondrialen Matrix. Für die Wahl des Calciumsensors war es entscheidend, einen Sensor auszuwählen, welcher die mitochondriale Calciumkonzentration bei Calciumzugabe in einem linearen Sensitivitätsbereich darstellt. Mito-LAR-GECO 1.2 besitzt eine K_d von 12 μM (Wu et al, 2014). Dessen Fluoreszenzantwort auf verschiedene Calciumkonzentrationen wird in Kapitel 4.1.4 näher ausgeführt. Besondere Bedeutung können genetisch codierte Sensoren bekommen, wenn sie, durch gezielte Auswahl der Zielsequenz, bestimmte submitochondriale Areale darstellen. Hierdurch können in Zukunft weitere Einblicke in definierte Kompartimente auf submitochondrialer Ebene erhalten werden. Dies ist in jüngster Zeit schon von einer Arbeitsgruppe in Graz angewendet worden, welche die Calciumkonzentration im Cristae-Lumen sowie im Intermembranraum mittels modifizierter Sensoren darstellten (Waldeck-Weiermair et al, 2019). Über das Vorhandensein von Mito-LAR-GECO 1.2 wurde die intramitochondriale Calciumkonzentration über ein Fluoreszenzsignal zugänglich. Im Folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob das hierdurch generierte Fluoreszenzsignal tatsächlich die mitochondriale Calciumkonzentration widerspiegelte und wovon dieses abhängig war.

4.1.3 MCU-vermittelter Calciumtransport als Grundlage des Fluoreszenzsignals

Bei der Durchführung des Calciumtransport Assays kam es nach Zugabe der Calciumlösung zu einem Sättigungskinetik-ähnlichen Kurvenverlauf. Nach einem initial starken Anstieg zeigte sich eine abnehmende Steigung, wodurch die Kurve allmählich ein Plateau erreichte. Bei der Beurteilung des Kurvenverlaufs ist primär zu

berücksichtigen, dass nach Zugabe der Calciumchlorid Lösung etwa für 30 Sekunden keine Messpunkte erhoben wurden. Dies lag im Ablauf des Assays ohne Injektor begründet, da nach Zugabe der Calciumlösung die Platte wieder eingezogen werden musste und vor der Messung nochmals gemischt wurde. Jedoch stellte sich die Frage, ob es sich bei der Zunahme der Fluoreszenz tatsächlich um ein calciumabhängiges Signal handelte. Weil nach Zugabe desselben Puffers ohne Calcium keine Zunahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten war, sondern eine Abnahme, wurde im Folgenden von einem calciumabhängigen Signal ausgegangen (Abbildung 12 B, 13 A und 14 B). Die Abnahme des Fluoreszenzsignals durch den Calcium-freien Puffer wurde als Verdünnungseffekt interpretiert. Auch gilt es hervorzuheben, dass sowohl Mitochondrien aus nicht-transfizierte Zellen als auch der IMG-Puffer keine relevante Eigenfluoreszenz besaßen und somit keinen relevanten Einfluss auf das Signal nahmen (Abbildung 10 und 13). Diese lieferten wenig Grundsignal sowie keine Antwort auf die Calciumzugabe. Da die mitochondriale Calciumaufnahme maßgeblich durch MCU vermittelt wird (Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011), soll dessen Beitrag zum Fluoreszenzsignals analysiert werden. Hierfür stellt die Integrität der Mitochondrien eine Grundvoraussetzung dar. Da sich der Kurvenverlauf der Mitochondrien nach Zugabe von 0,5% Triton X 100 zur Lösung deutlich von denen unterschied, welche nicht dem Detergenz ausgesetzt waren (Abbildung 12) und auch der verwendete IMG-Puffer keinen osmotischen Stress auf die isolierten Mitochondrien ausübt (Abbildung 11), konnte von einer erhaltenen mitochondrialen Integrität ausgegangen werden.

Die Bedeutung von MCU für die Generation des Signals konnte anhand zweier Herangehensweisen untersucht werden. Einerseits durch die Zugabe des bekannten MCU-Inhibitors Ru360 (Baughman et al, 2011; Pan et al, 2014; Kwong et al, 2015; Oxenoid et al, 2016), wodurch sich das Fluoreszenzsignal in Mitochondrien aus HEK293T supprimieren ließ (Abbildung 14). Andererseits zeigte sich in Mitochondrien aus der MCU-Knockout Zelllinie keinerlei Fluoreszenzsignalzunahme infolge des Calciumstimulus (Abbildung 17 A und B). Die hierbei festzustellende Fluoreszenzabnahme entsprach am ehesten einem Verdünnungseffekt. Diese Ergebnisse unterstrichen die Relevanz von MCU für das Calcium-abhängige Fluoreszenzsignal des Calciumtransport Assays.

Dieses Fluoreszenzsignal zeigte nach Calciumzugabe einen charakteristischen Kurvenverlauf. Diese Kinetik soll nun genauer hinterfragt werden. Sie kann ihren Ursprung einerseits in der MCU-abhängigen Calciumaufnahme haben oder die allmähliche Sättigung des Sensors darstellen. Betrachtet man zunächst die Affinitätseigenschaften von MCU, so ist bekannt, dass dieser eine niedrige Affinität zu Calcium hat. Die Dissoziationskonstante wird mit etwa 20-30 μM angegeben

(Rizzuto, 1998; zusammengefasst in Marchi & Pinton, 2014). Dies hat im Umkehrschluss zur Folge, dass Calciumkonzentrationen von etwa 5-10 μM Calcium benötigt werden, um einen messbaren Einstrom in die mitochondriale Matrix zu generieren. Solche Konzentrationen kommen allerdings nicht im ganzen Zytoplasma der Zelle vor, sondern stellen sich an Mikrodomänen zwischen ER und Mitochondrien ein (Rizzuto, 1998; zusammengefasst in Marchi & Pinton, 2014). Jedoch gilt es bei der Interpretation der Transportaktivität zu beachten, dass dieser in der Regel in einem Gleichgewicht mit seinem Gegenspieler steht. Dieser Gegenspieler von MCU ist der Natrium-Calcium-Austauscher NCLX (Rizzuto et al, 2012; Boyman et al, 2013; Marchi & Pinton, 2014; Sommakia et al, 2017). Der verwendete Calciumsensor, Mito-LAR-GECO 1.2, besitzt hingegen eine Dissoziationskonstante von 12 μM (Wu et al, 2014). Beim Calciumtransport Assay wurden nach Titrationsversuchen jeweils 10 μM Calciumchlorid verwendet. Infolgedessen sollte durch die relative hohe Konzentration an Calcium, welche den isolierten Mitochondrien zugesetzt wurde, MCU durch seine hohe K_d den limitierenden Schritt darstellen. Das in die Matrix transportierte Calcium würde somit schnell vom Sensor gebunden werden und ein Fluoreszenzsignal generieren. Somit würde der zuvor beschriebene und gemessene Kurvenverlauf eher die MCU-Transportaktivität als die des Sensors widerspiegeln.

Zudem wird diese Aussage gestärkt durch den Vergleich der Kurvenverläufe zwischen intakten Mitochondrien und Mitochondrien nach Zugabe von 0,5% Triton X-100 unter identischen Bedingungen (Abbildung 12). Im Gegensatz zu intakten Mitochondrien zeigten mit Triton X-100 behandelte Mitochondrien keinerlei Kinetik, sondern direkt das maximale Signal nach Calciumzugabe (siehe 3.1.3). Die mitochondriale Integrität der Proben im IMG-Puffer wurde zusätzlich durch *Swelling*-Experimente überprüft und ergab kein Hinweis auf osmotisch-bedingtes Schwellen der Mitochondrien (Abbildung 11). Der Unterschied zwischen beiden Proben war, dass nach Zugabe von Triton X 100 die Membranen aufgelöst wurden. Demnach lag der Calciumsensor frei in Lösung vor und war den zugesetzten Calciumionen ohne Barriere zugänglich. Bei den intakten Mitochondrien bestanden zwischen dem in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Sensor und den Calciumionen zwei Hindernisse, verglichen mit den Triton X-100 ausgesetzten Mitochondrien: Die äußere und die inneren Mitochondrienmembran. Derzeit akzeptiert ist, dass die äußere Mitochondrienmembran durchlässig ist für lösliche Teilchen, wenn diese kleiner als 5 kDa sind. Die tragende Rolle bei der Überwindung der Membran wird hierbei VDAC (*voltage-dependent anion channel*) zugeschrieben und sollte demnach auch den Transport von Calcium bewerkstelligen. Die äußere Membran ist folglich permeabel für Calcium. Der Fokus bei der Suche nach limitierenden Schritten bei der Membranüberwindung liegt demnach in der inneren Membran (Rapizzi et al, 2002;

Rizzuto et al, 2012; Pan et al, 2014; Gottschalk et al, 2019). Für die Überwindung der undurchlässigen Innenmembran ist der Mitochondriale Calcium Uniporter MCU verantwortlich (Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011). Dass das gemessene Calcium-abhängige Fluoreszenzsignal durch MCU vermittelt wurde, konnte aus den Experimenten zu Ru360 (Abbildung 14) sowie dem Calciumtransport Assays mit Mitochondrien der MCU-Knockoutzelllinie (Abbildung 17) gezeigt werden.

Betrachtet man nun den Kurvenverlauf nach Zugabe des Chelators EGTA, so zeigte sich bei Zugabe von Triton X-100 keinerlei Kinetik mehr (Abbildung 12). Da der Unterschied zwischen beiden wieder die gestörte innere und äußere Mitochondrienmembran nach Zugabe von 0,5% Triton X 100 darstellte, soll nun analysiert werden, was sich hinter dem dynamischen Signal intakter Mitochondrien verbarg. Der bekannteste Vertreter des mitochondrialen Calciumausstroms ist der Natrium-Calcium-Austauscher NCLX (Palty et al, 2010). Ob sich hinter dem exponentiellen Signalabfall tatsächlich die NCLX-Aktivität verbarg, bleibt derzeit jedoch offen. Dies könnte durch Zugabe eines NCLX-Inhibitors wie CGP37157 durch weitere Experimente in Zukunft analysiert werden (De Marchi et al, 2014). In diesem Fall würde durch Zugabe des Inhibitors eine deutlich verringerte Abnahme des Fluoreszenzsignals bis zu einer kompletten Blockade des Calciumausstromes erwartet werden. Zudem sind auch Experimente denkbar, in welchen die extramitochondriale Natriumkonzentration reguliert wird, um verschiedene Aktivitätslevel von NCLX einzustellen. Betrachtet man das Ausstromsignal der Calciumtitrationskurve (Abbildung 13), so zeigte diese, dass, mit Ausnahme der Probe mit 2,5 μM Calcium, keine der höheren Calciumkonzentrationen nach Zugabe von 2 mM EGTA in den dargestellten 100 Messzyklen seinen Ausgangswert des Fluoreszenzsignals erreichte. Somit ist davon auszugehen, dass noch eine gewisse Menge Calcium in den Mitochondrien verblieben war. Bei den in folgenden Experimenten verwendeten 10 μM Calcium war dies ebenfalls sehr deutlich festzustellen (Abbildung 15 und 17). Um den Ausstrom zu beschleunigen könnte eine höhere EGTA-Konzentration als die in den oben aufgeführten Experimenten verwendeten 2 mM EGTA angewendet werden.

Somit kann die in den Calciumtransport Assays gezeigte Kinetik, in Zusammenschau mit der Gegenüberstellung von MCU und Calciumsensor sowie der generierten Daten über das Sensorverhalten in intakten und mit 0,5% Triton X 100 behandelten Mitochondrien, als Hinweis für die Abbildung der MCU-Aktivität gedeutet werden. Andererseits scheint die annähernd exponentielle Abnahme nach Zugabe von EGTA möglicherweise die NCLX-Aktivität zu sein und könnte somit den mitochondrialen

Calciumausstrom darstellen. Nun gilt es, den Einfluss verschiedener Calciumkonzentrationen auf das Fluoreszenzsignal zu analysieren.

4.1.4 Einfluss der verwendeten Calciumkonzentration auf das Fluoreszenzsignals

Welchen Einfluss verschiedene Calciumkonzentrationen auf das Fluoreszenzsignal haben, wurde in Kapitel 3.1.4 ausführlich beschrieben. Zwischen 0 bis 10 μM Calciumchlorid zeigte sich eine sigmoidale Beziehung zwischen Fluoreszenzantwort und eingesetzter Calciumkonzentration (Abbildung 13). Vergleicht man das Fluoreszenzsignal von Mitochondrien, welche mit 0,5% Triton X-100 behandelt wurden, mit dem Signal intakter Mitochondrien, so fand man ein maximales Fluoreszenzsignal bei 10 μM Calciumstimulus (Abbildung 12 und 13, siehe 3.1.3). Hieraus kann gefolgert werden, dass, im Gegensatz zur Kinetik des Kurvenverlauf, das maximale Fluoreszenzsignal durch den Sensor determiniert wurde und nicht durch die mitochondrialen Transportsysteme. Nachdem nun die Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzsignal und dessen Bedeutung erläutert wurden soll nun das Verhalten des spezifischen MCU Inhibitors Ru360 diskutiert werden.

4.1.5 Die Inhibition der Calciumaufnahme durch Ru360 und die MCU Knockout Zelllinie

Die mitochondriale Calciumaufnahme wird durch Ruthenium Red und dessen effektiverem Abkömmling Ru360 inhibiert (Gunter & Pfeiffer, 1990; Kirichok et al, 2004; Gunter & Sheu, 2009; Oxenoid et al, 2016; Maxwell et al, 2018). Folglich wurden auch die Auswirkungen der Inhibition von MCU durch Ru360 (Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011) auf das Fluoreszenzsignal untersucht (Abbildung 14). Das Fluoreszenzsignal, welches repräsentativ für die mitochondriale Calciumaufnahme steht, ließ sich durch Zugabe von Ru360 komplett supprimieren. Jedoch waren hierfür verhältnismäßig hohe Dosen notwendig. Ab etwa 1 μM Ru360 zeigte sich keine Fluoreszenzantwort und damit keine MCU-Aktivität mehr. Mittels Daten aus den Titrationsexperimenten und einer nichtlinearen Regression konnte die IC_{50} im Rahmen des Calciumtransport Assays ermittelt werden. Diese betrug gemittelt aus 3 unabhängigen Experimenten 167 nM. Jedoch war diese deutlich über der angegebenen IC_{50} des Inhibitors von etwa 0,2 nM (Zhou et al, 1998). Gründe hierfür könnten zum einen die vom Hersteller angegebene Instabilität des Inhibitors in wässriger Lösung sein. Um dies so gut wie möglich zu kontrollieren, wurde die zeitliche Verwendung auf ein Minimum reduziert, indem der Inhibitor unmittelbar vor der Messung dem Probenansatz zugegeben wurde. Zum anderen sind die Daten

bezüglich der angegebenen IC_{50} mittels *patch-clamp* Technik generiert worden und entsprechen somit einer anderen Methode. Die errechnete IC_{50} von 167 nM spiegelt die Bedingungen für das hier etablierte Calciumtransport Assay wider. Zahlreiche Gruppen verwenden noch deutlich höhere Inhibitor-Konzentrationen. Diese lagen in der Regel zwischen 200 bis 500 nM (Kirichok et al, 2004; Baughman et al, 2011; de la Fuente et al, 2014) und damit sehr nahe an der errechneten IC_{50} . Zum Teil wurden auch Werte bis 10 μ M verwendet (Maxwell et al, 2018). Außerdem war die MCU-Inhibition durch Ru360 konsistent mit den Ergebnissen aus dem Calciumtransport Assay, welches Mitochondrien aus der MCU Knockout Zelllinie enthielt (Abbildung 17 A und B). Diese zeigten kein Anstieg des Fluoreszenzsignals infolge eines Calciumstimulus. Somit kann resümiert werden, dass das Fluoreszenzsignal auf Grundlage der MCU-Inhibition durch Ru360 supprimierbar war. Dies wurde als wichtiger Hinweis für eine MCU vermittelte Calciumaufnahme in die Mitochondrien als Grundlage des Fluoreszenzsignals interpretiert. Die errechnete IC_{50} von 167 nM erschien im Vergleich zu den angegebenen IC_{50} von 0,2 nM mit etwa drei Zehnerpotenzen zunächst irritierend. Jedoch sollte diese auf das verwendete System bezogen und im Licht verwendeter Inhibitor-Konzentrationen anderer Gruppen interpretiert werden. Hervorzuheben ist, dass das Fluoreszenzsignal, welches die MCU-Aktivität widerspiegelt, allmählich ein Plateau bildete. Dieses Plateau entspricht am ehesten einem Gleichgewichtszustand zwischen dem Calciumeinstrom, vermittelt durch MCU, sowie dem Calciumausstrom. Dieser wird in der Literatur vor allem dem Natrium Calciumaustauscher NCLX zugeschrieben (Palty et al, 2010; Boyman et al, 2013). Zudem ist die Bedeutung von MCU für das Fluoreszenzsignal, und damit stellvertretend für die mitochondriale Calciumaufnahme, über die Mitochondrien aus der MCU Knockout Zelllinie unterstrichen worden. Nachdem nun vor allem die Vorteile des Calciumtransport Assays dargestellt wurden, soll im folgenden Abschnitt auf dessen Grenzen eingegangen werden.

4.1.6 Limitationen des in-organello Calcium Assays

Limitationen ergeben sich unter anderem aus der Verwendung isolierter Mitochondrien. Somit sind nur bedingt Rückschlüsse auf deren Verhalten im zellulären Kontext möglich. Zudem befinden sich nach der Isolation der Mitochondrien noch ER-Reste in der Probe, welche, trotz des Entzugs von Calcium mittels EGTA und Inhibition der SERCA, als Störgröße berücksichtigt werden muss. Weitere Einschränkung entstehen durch die Verwendung des TECAN *plate readers*. Da ohne Injektor gearbeitet wurde, ergab sich nach der Detektion des Grundsignals durch die Ausgabe der Platte, die Zugabe der Calciumlösung, die Rücknahme der Platte und anschließendem Mischen durch den TECAN *plate reader* ein blindes Fenster von

etwa 30 Sekunden. Dieses war sowohl nach Calcium- als auch nach EGTA-Zugabe zu beachten. Die komplette Dauer, inklusive Ausgabe, betrug im Schnitt etwa 38 Sekunden. Innerhalb des blinden Fensters nach Zugabe von Calcium bzw. EGTA wirkten diese bereits auf die Mitochondrien ein. Der Kurvenverlauf zwischen dem letzten und ersten Punkt nach Stimulation bzw. EGTA-Zugabe wurde in der graphischen Darstellung verbunden. Die Interpretation dieses Abschnitts ist somit nur sehr eingeschränkt möglich. Des Weiteren gilt es auch zu beachten, dass durch die Verwendung eines intensimetrischen Calciumsensors Unterschiede in den verwendeten Populationen nur qualitativ und nicht quantitativ beurteilt werden können. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte dementsprechend auf die bedingte Übertragbarkeit auf den zellulären Kontext, den möglichen Einfluss des Endoplasmatischen Retikulums als Calciumspeicher, die blinden Fenster im Kurvenverlauf und die Besonderheiten intensimetrischer Calciumsensoren berücksichtigt werden.

4.2 MIC10- und MIC60 Knockout Mitochondrien zeigen reduzierte Antwort auf Calciumstimulus

Die Knockouts der MICOS-Kernuntereinheiten MIC10 und MIC60 wurden im Calciumtransport Assay beurteilt (Abbildung 15 A und B) und offenbarten Beide eine Reduktion des Fluoreszenzsignals. Dieser defizitäre Calciumtransport war nicht durch ein gestörtes Membranpotential bedingt. Dies ließ sich aus TMRE-Membranpotentialmessungen schlussfolgern (Abbildung 16). Weitere Gründe für ein reduziertes Plateau innerhalb der Calciummessungen könnten veränderte MCU-Level darstellen. In Western Blots zeigten sich leicht reduzierte MCU-Level in beiden Knockouts (Abbildung 15 D). Diese Reduktion schien in den Δ MIC10-Mitochondrien etwas stärker ausgeprägt zu sein. Dementsprechend ist eine Abnahme der MCU-Menge als mögliche Ursache des reduzierten Signals in Betracht zu ziehen. Neben der leicht reduzierten MCU-Menge auf den SDS-Gelen zeigte sich auch eine leicht verringerte Bandenintensität des MCU-Komplexes auf BN-Gelen (Abbildung 15 C). Allerdings ist es durchaus fraglich, ob die geringe Reduktion der MCU-Level die deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals erklärt. Des Weiteren ist die Calciumaufnahme stets in Zusammenschau mit NCLX zu beurteilen, da sich eine Balance zwischen MCU und NCLX einstellt (Boyman et al, 2013; De Marchi et al, 2014). Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Western Blot Analysen schien NCLX in den MIC10-Knockout Mitochondrien ebenfalls reduziert zu sein. In den Δ MIC60 Mitochondrien zeigten sich annähernd identische Level verglichen mit den HEK293T Mitochondrien. Dies könnte ursächlich sein für das Phänomen, dass in den Δ MIC10

Mitochondrien die Level von MCU zwar stärker reduziert waren, diese aber nicht in einer stärkeren Reduktion des Calcium-Plateaus als das von den Δ MIC60 Mitochondrien resultierte, da in den Δ MIC10 Mitochondrien ebenfalls der Calciumausstrom kompromittiert sein könnte.

4.2.1 Die Verbindung zwischen MICOS und mitochondrialer Calciumhomöostase

Neben dem reduzierten Fluoreszenzsignal im Calciumtransport Assay präsentierten die SDS- als auch die BN-Gele eine leichte Abnahme der MCU bzw. MCU-Komplex Level (Abbildung 15). Derzeit ist über eine mögliche Verbindung zwischen MICOS und Calcium nur wenig bekannt. Allerdings ist ein Einfluss von Calcium auf die Dynamik der Cristamembran sehr wohl beschrieben worden (Gottschalk et al, 2018). Mitochondrien sind sehr dynamische Zellorganelle (Lackner, 2014). An den Schnittstellen zwischen ER und Mitochondrien, den sogenannten MAMs (Mitochondria associated Membranes), scheint sich unter Calciumeinfluss die Dynamik der Crista Membran zu vermindern (Gottschalk et al, 2018). Interessant ist an dieser Stelle jedoch, dass weder für den MICOS-Komplex noch OPA1 (Optic Atrophy 1) Calcium-Bindestellen beschrieben worden sind (Gottschalk et al, 2019). OPA1 ist eine Dynamin-ähnliche GTPase, welcher ebenfalls Bedeutung für den Erhalt sowie die Weite der Cristae zugeschrieben wird (Glytsou et al, 2016). Eine neuere Publikation zeigte kürzlich die Relevanz von MICU1, einem regulatorischen Protein des MCU-Komplexes. Die Deletion von MICU1 führte in TEM-Aufnahmen (Transmissionselektronenmikroskopie) zu einer Aufweitung der *Crista Junction*, vergleichbar zu denen im OPA1-Knockout. Auch zeigte sich in Folge der MICU1-Deletion eine Verminderung der Dynamik von Cristamembranen. Hieraus schlussfolgerten die Autoren eine mögliche Funktion von MICU1 bei der Erhaltung der *Crista Junction* Integrität (Gottschalk et al, 2019). Aufgrund der ähnlichen Befunde, verglichen mit dem OPA1-Knockout, wurde eine Verbindung zwischen MICU1 als auch der Crista-Dynamik auf Calciumstimulus mit OPA1 vermutet (Gottschalk et al, 2018, 2019). Jedoch wurde eine direkte Verbindung zwischen OPA1 und MICU1 bis dato nicht nachgewiesen. In jüngster Zeit erschien ein Preprint auf BioRxiv, welches vor allem das MCU-unabhängige Interaktom von MICU1 adressierte. Die Daten stützen sich auf einer auf Nähe-basierenden Biotinylierungs Reaktion. Hierbei wurde eine MCU-unabhängige direkte Interaktion zwischen MICU1 und MIC60, einer Kernuntereinheit des MICOS-Komplexes, nachgewiesen. Hinzu kommt, dass MIC60 und MICU1 gemeinsam coimmunopräzipitiert werden konnten. Zudem detektierten die Autoren auch ein *Shift* in der Größe von MIC60-Komplexen

nach MICU1-Deletion. In TEM-Aufnahmen des MICU1-Knockouts zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Intercristae-Distanz als auch der *Crista Junction* Weite. Somit könnte MICU1 für ein calciumabhängiges *Remodelling* der *Crista Junctions* verantwortlich sein und hierbei möglicherweise eine Rolle als Calciumsensor für den MICOS-Komplex darstellen (Tomar et al, 2019). Diese Ergebnisse stellen somit eine Verbindung zwischen der Regulation der Calciumaufnahme und dem MICOS-Komplex her. Derzeit sind wenig Daten über das Vorkommen und das Verhalten von Regulatorproteinen der Calciumaufnahme im Kontext der MICOS Kernuntereinheiten verfügbar. Denkbar wäre eine Detektion dieser auf Western Blots, um deren Proteinlevel zu bestimmen, sowie BN-Gele, um Aussagen über das Komplexverhalten treffen zu können. Betrachtet werden sollte zunächst die Funktion von MICU1. Dieses fungiert einerseits zusammen mit MICU2 als Türsteher für MCU und verhindert somit übermäßigen Calciumeinstrom. Andererseits scheint MICU1 bei einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration eine kooperative Aktivierung von MCU zu vermitteln (Mallilankaraman et al, 2012b; Csordás et al, 2013; de la Fuente et al, 2014; Patron et al, 2014; Pendin et al, 2014). Es wäre somit möglich, dass es durch den Knockout von MIC60 eine Abnahme der MICU1-Level in den jeweiligen Mitochondrien kommt. Veränderungen der Stöchiometrie zwischen MICU1 und MCU verändern das mitochondriale Calciumaufnahmeverhalten, denn das Verhältnis zwischen beiden ist mitverantwortlich für Unterschiede der Calciumaufnahme in unterschiedlichen Geweben (Fieni et al, 2012; Paillard et al, 2017; Pallafacchina et al, 2018). So wäre es denkbar, dass durch eine mögliche Reduktion der MICU1-Level eine gestörte Calciumaufnahme möglich wäre. Eine potenzielle Reduktion von MICU1 könnte somit unter Umständen eine analoge Reduktion von MCU bedingen, wie sie auch in den Western Blots detektiert wurde. In Experimenten konnte durch eine Steigerung der MICU1 Expression die MCU-Level erhöht werden (Paillard et al, 2017). Allerdings erscheint die Verbindung von Calcium und dem MICOS Komplex über MICU1 als fragwürdig, da die beschriebene Interaktion von MIC60 und MICU1 MCU-unabhängig zu sein schien und die MIC60 Level in der Δ MIC10 Zelllinie erhalten waren (Abbildung 15 D). Zudem enthielten die BN-Gele des MCU-Komplexes sowohl in Δ MIC10 als auch Δ MIC60 Mitochondrien keinen Auffälligkeiten im Migrationsverhalten, durch welchen sich ein Verlust einer Untereinheit, resultierend in einer Abnahme der Molekulare Masse, äußern würde (Abbildung 15 C). Somit ist von keinem gravierenden MICU1-Verlust auszugehen. Die Abnahme der MCU-Level könnte zudem durch die Struktur der Innenmembran in den Knockoutzellen bedingt sein. Sowohl der MIC10- als auch der MIC60-Knockout zeigen eine Abschnürung der Cristamembranen von der restlichen Innenmembran, sodass diese als Membranstapel in der Matrix liegen (Hoppins et al, 2011; von der

Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012; Bohnert et al, 2015). Neue Daten legen nahe, dass MICU1 vor allem in der Inneren Randmembran (IBM) lokalisiert ist und, aufgrund einer poly-basischen Domäne, sich kaum in der Cristamembran befindet. Hingegen sind beispielsweise MCU und auch EMRE über die ganze innere Membran verteilt. Ein neues, dynamisches Modell der MCU-Komplexbildung beschreibt, dass auf einen Calciumstimulus die zuvor über die gesamte Innenmembran verteilten MCU und EMRE zur inneren Grenzmembran gelangen und dort den MCU Komplex formen (Gottschalk et al, 2019). Die Verbindung von MICU1 und den restlichen Komponenten des MCU-Komplexes wären infolge der gestörten Membranarchitektur beeinträchtigt. Im Labor von Prof. Dr. van der Laan konnte in Elektronenmikroskopischen Aufnahmen in einer Immunogoldfärbung den MCU-Komplex über die gesamte Innenmembran verteilt nachgewiesen werden (van der Laan, unpublizierte Daten). Somit ist es durchaus denkbar, dass infolge der gestörten Membranarchitektur es zu einem Verlust von Calcium zugänglichem MCU kommt, da dieser zu großem Anteil innerhalb der Membranstapel in der mitochondrialen Matrix gefangen ist. Diese MCU-Moleküle können somit nicht zum Calciumtransport über die Innenmembran beitragen und können so in einer reduzierten Calciumaufnahme resultieren. Diese Aussage wird gestützt durch weitere Mitochondrien-Populationen aus anderen Knockoutzelllinien, welche ebenfalls eine gestörte Innenmembranarchitektur mit lammellenartigen Membranstapeln in der Matrix aufweisen und ebenfalls eine reduzierte Calciumaufnahme aufweisen.

4.3 Hinweise auf defizitäre Calciumaufnahme in Mitochondrien der DNAJC11 Knockout Zelllinie

Δ DNAJC11 Mitochondrien wiesen ebenfalls einen reduzierten Calciumtransport im Calciumtransport Assay auf (Abbildung 17 A), zeigten aber keine Abweichungen in den Proteinlevel der Calciumtransporter MCU und NCLX. Folglich gab es keine Hinweise auf gravierend reduzierte MCU-Level als Ursache für den Calciumphänotyp der Mitochondrien des DNAJC11-Knockouts. Beim Betrachten der Blots fiel eine verstärkte Bande für die im ER befindliche SERCA auf. Diese entsprach einem vermehrten Vorkommen von ER-Resten in der Probe. Da die SERCA, wie zuvor ausführlich erläutert, die Calciumaufnahme ins ER bewerkstelligt (zusammengefasst in Chemaly et al, 2018), war die Inhibition der SERCA durch Thapsigargin von besonders großer Bedeutung. Durch Thapsigargin konnte eine ungewollte Calciumaufnahme in die ER-Reste verhindert werden und so ein falsch niedriges Fluoreszenzsignal durch diese unerwünschte Calciumaufnahme ins ER vorgebeugt werden. In BN-Gelen zeigte der MCU-Komplex sowohl in den Δ DNAJC11 als auch in

den HEK293T Mitochondrien ein identisches Migrationsverhalten (Abbildung 17 C). Jedoch schien die Signalintensität des Komplexes, verglichen mit den Mitochondrien aus HEK293T Zellen, etwas reduziert zu sein. Folglich sollte, im Kontrast zu den Blots der SDS-Gele, doch eine mögliche Reduktion der MCU-Komplexdichte als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden. Dies steht in Bezug mit der vermuteten Funktion von DNAJC11 im Proteinimport des Zellorganells (Ott et al, 2012; Violitzi et al, 2019). DNAJC11 ist ein HSP40 Protein (Xie et al, 2007), welches mit zytosolischen HSP70 interagiert (Violitzi et al, 2019). Durch diese Interaktion sind HSP40-Proteine an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Hierunter fallen beispielsweise die Bindung ungefalteter Proteine, Assembly von Proteinkomplexen und die Translokationen über Membranen (Ioakeimidis et al, 2014). Somit ist eine Beeinträchtigung des Proteinimports von Proteinen der Calciumaufnahme denkbar. Hinweise könnte in diesem Kontext mittels Import-Experimenten mit radioaktiv markiertem Methionin gewonnen werden. Durch diese könnte ein reduzierter Import für MCU aber auch dessen Regulatorproteine wie MICU1 oder EMRE adressiert werden. Ein reduzierter Import für VDAC, mithilfe dessen Calcium die äußere Membran passieren kann, konnte schon in unserem Labor nachgewiesen werden (Wollweber, unpublizierte Daten). Da eine Überexpression von VDAC einen effizienteren und schnellen Calciumtransport zwischen ER und Mitochondrien bewerkstelligen kann (Rapizzi et al, 2002), ist es im Umkehrschluss auch denkbar, dass die äußere Membran durch den reduzierten Import von VDAC ein neues Hindernis für die Calciumaufnahme ins Mitochondrium darstellen könnte, was in einer reduzierten Calciumaufnahme resultieren würde. Da die Aufnahme von Calcium als zweiwertiges Kation vom Membranpotential getrieben wird (Gunter & Pfeiffer, 1990; Kirichok et al, 2004; Gunter & Sheu, 2009; Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011; Oxenoid et al, 2016), wurde anhand eines TMRE-Assays nach möglichen Membranpotentialdefekten gesucht (Abbildung 18). Hierbei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Δ DNAJC11-Zellen im Vergleich zu den HEK293T-Zellen. Somit gab es keinen Anlass ein gestörtes Membranpotential als Ursache des Phänotyps anzunehmen. Des Weiteren ist DNAJC11 Bestandteil des MIB-Komplexes und Interaktionspartner von MIC60 (Xie et al, 2007; Violitzi et al, 2019). Somit könnte auch eine gestörte MIC60 Funktion ursächlich für die defizitäre Calciumaufnahme sein. Da der MIC60 Knockout ebenfalls eine reduzierte Calciumaufnahme im Calciumtransport Assay zeigte, scheint ein mechanistischer Zusammenhang denkbar. Jedoch zeigten sich die MIC60 Level im Western Blot der Δ DNAJC11 Mitochondrien nicht reduziert (Abbildung 17 D). Somit fällt es schwer, dieser Vermutung Kausalität zuzuschreiben. Allerdings ist dennoch eine Verbindung zwischen den MICOS Kernuntereinheiten Knockouts und der reduzierten

Calciumaufnahme in den Mitochondrien aus den DNAJC11 Knockout Zelllinie denkbar. Wie auch die MICOS Kernuntereinheiten Knockouts besitzen auch die Mitochondrien aus der DNAJC11 Knockout Zelllinie eine gestörte Innenmembranarchitektur. Lamelläre Membranstapel in der mitochondrialen Matrix sowie eine reduzierte Zahl an *Crista Junctions* sind in Δ DNAJC11 Mitochondrien ebenfalls anzutreffen (Ioakeimidis et al, 2014). Es ist somit auch bei dieser Mitochondrien-Population denkbar, dass durch die Membranstapel in der Matrix ein Mangel an zugänglichem MCU in der Innenmembran resultiert. Dieser könnte somit die reduzierte Calciumaufnahme bedingen. Bestärkt wird dieser womöglich ursächliche Mechanismus über die Gemeinsamkeiten in der Membranarchitektur und der ebenfalls reduzierten Calciumaufnahme in den Mitochondrien aus den Δ MIC10 und Δ MIC60 Zellen.

4.4 Der Tafazzin-Knockout bedingt eine reduzierte mitochondriale Calciumaufnahme

Tafazzin gilt als Schlüsselenzym des Cardiolipin-Remodellings (Xu et al, 2003; zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017b). Das Calciumtransport Assay zeigte eine reduzierte Calciumaufnahme in Mitochondrien aus Δ TAZ-Zellen (Abbildung 17 A und B). Zudem zeigte sich eine verminderte Intensität der MCU- und der NCLX-Bande (Abbildung 17 D). Dies wies auf eine reduzierte MCU-Menge in den Δ TAZ-Mitochondrien hin. Da neben MCU, welcher die Calciumaufnahme vermittelt, auch dessen Gegenspieler NCLX eine reduzierte Bandenintensität aufwies, erscheint die Reduktion der MCU-Level als ursächlicher Mechanismus für das reduzierte Fluoreszenzsignal im Calciumtransport Assay als unwahrscheinlich. Allerdings zeigten die Mitochondrien aus der Tafazzin Knockout Zelllinie einen auffälligen MCU-Komplex auf BN-Gelen (Abbildung 17 C). Dessen Bedeutung soll nun diskutiert werden.

4.5.1 Störung im *Assembly* des MCU-Komplexes als potenzielle Ursache defizitärer Calciumaufnahme in Δ TAZ-Mitochondrien

Die BN-Gele der Mitochondrien aus der Δ TAZ-Zelllinie zeigten zum einen eine reduzierte Bandenintensität, konsistent mit den Ergebnissen der SDS-Gele, sowie ein *Downshift* des MCU-Komplexes, verglichen mit HEK293T-Mitochondrien (Abbildung 17 C). Dieses veränderte Migrationsverhalten könnte ein Hinweis auf eine reduzierte Größe des MCU-Komplexes sein. Derzeit kann bedauerlicherweise keine Aussage über eine möglicherweise fehlende Komponente des MCU-Komplexes getroffen

werden. Durch den Tafazzin-Knockout kommt es letztlich zu einem verminderten Cardiolipin *Remodelling* (Xu et al, 2003, 2006; zusammengefasst in Ikon & Ryan, 2017b). Kryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen untermauern das Vorhandensein von Cardiolipin im MCU Komplex (Zhuo et al, 2021). Ob der *Downshift* lediglich auf einem Verlust des reifen Cardiolipins beruhte, könnte durch experimentelle Zugabe von Cardiolipin zur Probe und anschließender Komplexdetektion auf BN-Gelen analysiert werden. Ähnliche Experimente wurden schon durchgeführt, um den stabilisierenden Effekt von Cardiolipin auf die Atmungsketten-Superkomplexe zu untersuchen (Pfeiffer et al, 2003). Zudem ist eine Interaktion zwischen MICU1 und Cardiolipin (Gottschalk et al, 2019), als auch dem Heterodimer MICU1:MICU2 mit Cardiolipin (Kamer et al, 2017) bekannt. Diese Interaktionen mit Cardiolipin werden als möglicher Anker des MCU-Komplexes in der inneren Membran diskutiert (Kamer et al, 2017). Hinzu kommt ein neueres Modell der MCU-Komplexformation und MICU1-Verteilung in der IBM, welches auf einer Cardiolipin-abhängigen Verteilung von MICU1 beruht. Nach neuen Erkenntnissen befindet sich MICU1 hauptsächlich in der IBM und rekrutiert auf Calciumstimulus MCU und EMRE zur Komplexformation in diese (Gottschalk et al, 2019). In Mitochondrien aus der Tafazzin Knockout Zelllinie zeigte sich eine Verteilung von MICU1 über die gesamte innere Mitochondrienmembran (Gottschalk et al, 2019). Die Folgen dieser Fehlverteilung sind derzeit weitestgehend unklar. Allerdings vermuten die Autoren eine enge Korrelation zwischen Calciumaufnahme und IBM-Lokalisation des MCU-Komplexes (Gottschalk et al, 2019). Somit ist es denkbar, dass es durch das gestörte Tafazzin vermittelte Cardiolipin *Remodelling* zu einer eingeschränkten MICU1-Funktion kommt. Ob die verminderte Calciumaufnahme durch eine gestörte Verteilung von MICU1 über die innere Membran bedingt ist oder ob dies möglicherweise auch in reduzierten Proteinlevel bedingt ist, könnte in Zukunft weiter analysiert werden. Die Dekoration weiterer Antikörper gegen Bestandteile des MCU-Komplexes sowohl auf BN- als auch auf SDS-Gelen könnte hierbei weitere Einblicke bringen. Jedoch könnte auch ein gestörtes Membranpotential in den Mitochondrien aus den Δ TAZ-Zellen ursächlich sein. Die Analyse des Membranpotentials der Δ TAZ-Zellen ist an dieser Stelle aus zwei Gründen wichtig. Einerseits ist die Calciumaufnahme abhängig vom Membranpotential (Gunter & Pfeiffer, 1990; Kirichok et al, 2004; Gunter & Sheu, 2009; Baughman et al, 2011; Stefani et al, 2011; Oxenoid et al, 2016) und andererseits ist in Tafazzin-Knockout-Zellen ein Membranpotentialdefekt vorbeschrieben (Brandner et al, 2005; Dudek et al, 2013). Jedoch zeigten die Ergebnisse aus den TMRE-Messungen keine signifikanten Abweichungen des Membranpotentials im Vergleich mit den Wildtyp HEK293T-Zellen (Abbildung 18). Auf Grundlage dieser Beobachtungen gibt es derzeit keinen Grund zur Annahme eines gestörten

Membranpotentials in den verwendeten Δ TAZ-Zellen. Dies ist vereinbar mit neueren Publikationen zu Tafazzin-Knockout Modellen. Beispielsweise zeigt sich in Untersuchung von Kardiomyozyten aus Tafazzin-Knockout Mäusen zwar eine vermehrte Produktion von Wasserstoffperoxid aber keine Unterschiede im Membranpotential in Bezug auf Wildtyp-Mäuse (Le et al, 2020). Zudem zeigen sich beschriebene Zellatmungsdefekte vor allem in kardialen Mitochondrien. Mitochondrien der Leber sowie der Niere aus Tafazzin-defizitären Mäusen weisen hingegen keine gestörte Zellatmung auf (Dudek et al, 2016). Somit erscheint es nicht abwegig, dass die auf HEK293T-Zellen basierende Tafazzin-Knockout ein erhaltenes TMRE-Signal aufgewiesen haben und somit ein intaktes Membranpotential angenommen werden konnte.

Allerdings gilt es zu bedenken, dass auch in Tafazzin-Knockoutzellen die Mitochondrien-Morphologie gestört ist. Im Mausmodell zeigte sich die Zahl der Mitochondrien reduziert und die Cristamembranen stellten sich als Vakuolen in der Matrix dar (Acehan et al, 2011; Phoon et al, 2012). Auffallend sind auch hier die Parallelen zwischen den Tafazzin, DNAJC11 und MICOS-Kernuntereinheiten Knockout Zelllinien. Neben einer gestörten Ultrastruktur der Mitochondrien zeigten auch diese einen gestörten Calciumtransport. Naheliegender ist nun, dass die gestörte Calciumaufnahme auf einem gemeinsamen Mechanismus beruht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die gestörte Cristae Struktur, es zum Verlust funktionsfähiger MCU-Moleküle in den abgeschnürten Cristae Membranen in der Matrix kommt, da diese in größerer Zahl auch in der Cristamembran lokalisiert sind (AG van der Laan, unpublizierte Daten). Dies könnte die reduzierte Calciumaufnahme in allen untersuchten Mitochondrien-Populationen erklären, da sowohl die gestörte Innenmembranstruktur als auch eine gestörte Calciumaufnahme sowohl in den Mitochondrien der MICOS Kernuntereinheiten MIC10 und MIC60 als auch der aus der DNAJC11 und Tafazzin Knockout Zelllinie anzutreffen waren. Auch scheint eine alleinige Beteiligung an MICOS-gekoppelten Vorgängen bzw. eine reine Bindung an MICOS nicht für die defizitäre Calciumaufnahme in den verschiedenen Mutanten verantwortlich zu sein, da für den kürzlich entdeckten MIC19 Interakteur CCDC127 (AG van der Laan, AG Fan Liu, unpublizierte Daten), für welchen keine Störung der Innenmembran beschrieben wurde, eine unauffällige Calciumaufnahme im Calciumtransport Assay gezeigt werden konnte.

4.5 Limitationen der Calcium-Phänotypen

Mit Hilfe des Calciumtransport Assays konnte eine defizitäre Calciumaufnahme in Mitochondrien der Knockout Zelllinie der MICOS-Kernuntereinheiten, MIC10 und

MIC60, sowie in DNAJC11 und Tafazzin detektiert werden. Neben den zuvor beschriebenen methodischen Einschränkungen sind weitere zu beachten. Dass das maximale Fluoreszenzsignal durch die Sensormenge in den Mitochondrien limitiert war, wurde zuvor erörtert. Dies hat jedoch nun ebenfalls Auswirkungen auf die Interpretation der Phänotypen. Es ist derzeit unklar, ob die beschriebenen Phänotypen auch hinsichtlich ihres Gehalts an importiertem Sensor vergleichbar sind. Dies wäre wichtig, da die defizitären Phänotypen auch durch einen Mangel an Sensor bedingt sein könnten. Jedoch wird durch den Bezug der Messwerte auf das Grundsignal, im Sinne einer Normierung, sichergestellt, dass Abweichungen der Menge des importierten Sensors nivelliert werden. Nichtsdestotrotz sollten potenzielle Unterschiede in der Expression erfasst werden. Dies ist von besonderer Relevanz bei der DNAJC11 Knockout Zelllinie, da diese einen möglichen Importdefekt aufweisen (Ott et al, 2012; Violitzi et al, 2019). Eine Erfassung der Sensorlevel könnte beispielsweise zusätzlich mit einem RFP-Antikörper auf SDS-Gelen durchgeführt werden. Des Weiteren könnten auch die jeweiligen Knockout Mitochondrien mit 0,5% Triton X-100 versetzt werden und analog zum oben beschriebenen Vorgehen stimuliert werden. Da somit der Sensor frei in Lösung wäre, könnte somit auch das maximale Signal und damit auch die Sensormenge in den Knockouts indirekt bestimmt und verglichen werden. Hierdurch wird der Einfluss von Membrantransportsystemen ausgeschaltet und erlaubt lediglich den Vergleich des enthaltenen Sensors.

Außerdem wirkt sich die ausstehende Analyse der Regulationsproteine im Kontext der untersuchten Knockouts vor allem auf die Interpretation der Ursache der gestörten Calciumaufnahme aus. So ist beispielsweise MICU1 als Interaktionspartner von MIC60 (Tomar et al, 2019) als auch als Interaktionspartner von Cardiolipin (Gottschalk et al, 2019) beschrieben. Auch die Bedeutung von Tafazzin und damit eines adäquaten *Remodellings* von Cardiolipin auf die MICU1-Verteilung wurde herausgearbeitet (Gottschalk et al, 2019). Durch das derzeit noch unbekannt Verhalten von MICU1 und anderen Regulatorproteinen der mitochondrialen Calciumaufnahme in den untersuchten Mitochondrien-Populationen, kann über die mechanistische Bedeutung und deren Auswirkung auf diese, derzeit nur spekuliert werden.

Hinzu kommt, dass bei der Interpretation der Ergebnisse aus dem Calciumtransport Assay der zelluläre Kontext fehlt. Dieser sollte allerdings bei der Interpretation von Ergebnissen, vor allem mit Bezug auf die zelluläre Homöostase, zusätzlich beachtet werden.

Des Weiteren wäre es wünschenswert, Calcium Messungen in den Knockout-Zellen bzw. korrespondierender Mitochondrien durchzuführen, welche wieder das jeweilige

Wildtyp-Protein exprimieren. Somit können potenzielle *off-target* Effekte, welche durch den Knockout entstanden sein könnten, ausgeschlossen werden.

4.6 Das Calciumtransport Assay zeigte eine reduzierten Calciumtransport in verschiedenen Mitochondrien-Populationen – Ein Überblick

Ergebnisübersicht	HEK293T	Δ MIC10	Δ MIC60	Δ DNAJC11	Δ TAZ
Membranarchitektur	+	-	-	-	-
Defizitärer Calciumtransport	+	-	-	-	-
MCU-Level	+	-	-	+	-
NCLX-Level	+	-	+	+	-
MIC10-Level	+	X	-	+	+
MIC60-Level	+	-	X	+	+
Intensität MCU-Komplex auf BN-Gelen	+	-	-	-	-
<i>Downshift</i> MCU-Komplex auf BN-Gelen	/	/	/	/	+
Membranpotential	+	+	+	+	+

Tabelle 1: Ergebnisübersicht der Knockout Zelllinien mit Auffälligkeiten im Calciumtransport Assay

Legende: + = erhalten bzw. vorhanden; - = nicht erhalten bzw. reduziert; X = Knockout; / = unauffällig

Das Calciumtransport Assay stellt eine neue Methode zur Visualisierung des Calciumtransports in isolierten Mitochondrien dar. Die Mitochondrien stammten aus HEK293T Zellen und wurden mit dem genetisch-codierten Calciumsensor Mito-LARGE 1.2 ausgestattet. Dieser garantiert eine spezifische Lokalisation in der mitochondrialen Matrix und gestattet eine starke Fluoreszenzzunahme sowie hierdurch ein adäquates Signal nach Calciumzugabe. Anhand des Fluoreszenzverlaufs konnten Rückschlüsse auf die Integrität der Mitochondrien gezogen werden. Zudem gab es keinen Hinweis auf ein osmotisch bedingtes Schwellen der Mitochondrien im verwendeten IMG-Puffer. Hinter dem im TECAN *plate reader* detektierten, kinetischen Fluoreszenzsignals nach Calciumstimulus verbarg sich die MCU-Aktivität. Jedoch wurde das maximale Fluoreszenzsignal durch die enthaltene Sensormenge determiniert. Maximale Signale wurden bereits ab 10 μ M Calciumzugabe generiert. Zudem wurde nach EGTA-Zugabe eine exponentielle Abnahmekinetik sichtbar, welche der NCLX-Aktivität entsprechen könnte. Dies muss derzeit allerdings kritisch hinterfragt werden und sollte in Zukunft unter Verwendung des NCLX-Inhibitors CGP37157 beurteilt werden. Das Fluoreszenzsignal war durch Blockade von MCU und damit der mitochondrialen Calciumaufnahme vollständig

supprimierbar. Die mittels nichtlinearer Regression errechnete IC_{50} beträgt in diesem System 167 nM und liegt damit im Konzentrationsbereich, welchen andere Arbeitsgruppen für Inhibitionsexperimente benutzen (Kirichok et al, 2004; Baughman et al, 2011; de la Fuente et al, 2014). Auch zeigte sich in Mitochondrien aus der MCU Knockout Zelllinie keinerlei Fluoreszenzsignalzunahme auf Calciumzugabe.

Mittels dieser Methode konnte dann der eigentlichen Fragestellung nachgegangen werden, ob sich eine gestörte mitochondriale Membranarchitektur auf die mitochondriale Calciumaufnahme auswirkt. Die Mitochondrien aus den $\Delta CCDC127$ -Zellen, für welche keine gestörte Innenmembranstruktur beschrieben ist, zeigten einen kongruenten Kurvenverlauf mit den HEK293T-Mitochondrien im Calcium Assay. Auch offenbarten sich ein intaktes Membranpotential und keine größeren Defekte im Western Blot. Für eine gestörte Membranarchitektur wurden repräsentativ Mitochondrien aus den MICOS Kernuntereinheiten- (Rabl et al, 2009; Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011; von der Malsburg et al, 2011; Alkhaja et al, 2012), Tafazzin- (Acehan et al, 2011; Phoon et al, 2012) und DNAJC11 Knockout Zelllinien (Ioakeimidis et al, 2014) untersucht. Die Mitochondrien der Knockouts der MICOS Kernuntereinheiten MIC10 und MIC60 wiesen eine Reduktion des maximalen Fluoreszenzsignals im Calcium Assay auf. In beiden Mitochondrien-Populationen zeigten sich reduzierte MCU-Level. Diese waren in den Mitochondrien aus den $\Delta MIC10$ Zellen etwas stärker reduziert, gingen aber ebenfalls mit einer Reduktion von NCLX einher. Dies könnte ursächlich sein, warum die $\Delta MIC10$ Mitochondrien, trotz verstärkt reduzierter MCU-Level, nicht eine noch größere Abnahme des maximalen Fluoreszenzsignals aufgewiesen haben. Auch der MCU-Komplex zeigte sich auf BN-Gelen mit einer verminderten Intensität, aber regelrecht im Migrationsverhalten. Zudem gab es keine Hinweise auf eine gestörtes Membranpotential. In den ebenfalls analysierten Mitochondrien aus den $\Delta DNAJC11$ Zellen konnte ebenfalls eine Reduktion des Floreszenz-Plateaus auf Calciumstimulus beobachtet werden, welches somit auf eine defizitäre Calciumaufnahme hindeutet. Da sowohl die Level von MCU als auch NCLX der SDS-Gele kaum reduziert erschienen, lediglich die Intensität des MCU-Komplexes auf BN-Gelen leicht reduziert war und auch keine Hinweise für ein defizitäres Membranpotential vorlagen, erscheint ein Einfluss der gestörten Innenmembranarchitektur durchaus wahrscheinlich. Auffällige Ergebnisse mit reduzierten Antworten auf Calciumstimuli konnte auch in Mitochondrien aus ΔTAZ -Zellen detektiert werden. Hierbei zeigte sich sowohl eine Reduktion von MCU aber auch NCLX in den Blots der SDS-Gele. Auffallend ist auch ein *Downshift* des MCU-Komplexes in den BN-Gelen. Ob es sich hierbei um einen Mangel von gereiftem Cardiolipin handelt oder ob es sich um eine veränderte Zusammensetzung der Regulatorproteine, vor allem mit Fokus auf MICU1, handelt, bleibt derzeit offen und

könnte in Zukunft adressiert werden. Hervorzuheben ist, dass alle untersuchten Mitochondrien-Populationen, welche eine gestörte Innenmembranstruktur mit veränderter Cristae Morphologie aufweisen, auch eine reduzierte Calciumaufnahme zeigten. Da CCDC127 ein MICOS Interakteur, welcher über eine erhaltene Innenmembranarchitektur verfügt, keine defizitäre Calciumaufnahme zeigte, kann auch nicht von einer Beteiligung an MICOS-gekoppelten Vorgängen als ursächlicher Mechanismus angenommen werden. Ein Einfluss der gestörten Membranarchitektur erscheint somit wahrscheinlich und könnte durch den Verlust an Calcium-zugänglichen MCU in den abgeschnürten Membranstapeln bedingt sein. Dies stützt sich auf derzeit unpublizierte Daten aus dem Labor von Prof. Dr. van der Laan, welche in Immunogold TEM-Aufnahmen MCU-Moleküle in der gesamten Innenmembran zeigten sowie auf den Daten von Gottschalk et al., welche ebenfalls MCU über der gesamten Innenmembran verteilt darstellen konnten. Durch das Abschnüren der Cristamembran würden die darin enthaltenen MCU-Moleküle nicht mehr für den Transport von Calcium über die Innenmembran zur Verfügung stehen und könnten für die reduzierte Calciumaufnahme ursächlich sein. Da die gestörte Innenmembranarchitektur der gemeinsame Nenner aller untersuchten Mitochondrien-Populationen mit einem defizitären Calciumtransport darstellt und in Mitochondrien mit intakter Struktur eine suffiziente Calciumaufnahme anzutreffen war, erscheint die gestörte Innenmembranarchitektur als ursächlicher Mechanismus derzeit am wahrscheinlichsten.

5. Anhang

5.1 Protokoll des TECAN *plate readers* für das Calciumtransport Assays

Method name: TD 1.8 (In organello Calcium Assay)
 Application: SparkControl V2.1
 Device: Spark 10M Serial number: 1611002762
 Firmware: ABS:V4.2.10|ABS_MEX:V5.0.4|MTP:V11.0.2|FLUOR:V5.0.8

Date: 2020-10-24
 Time: 11:41
 System: DESKTOP-9JPR338
 User: DESKTOP-9JPR338\Admin
 Plate: [GRE96ft_CellCulture]- Greiner 96 Flat Transparent [GRE96ft_CellC
 Lid lifter: No lid
 Humidity Cassette: No humidity cassette
 Smooth mode: Selected

List of actions in this measurement script:

```

Plate
  Kinetic
    Fluorescence Top Reading
    Condition
      Move plate
      User intervention
      Move plate
      Shaking
      Wait
  Move plate
  User intervention
  Move plate
  Wait
  Kinetic
    Fluorescence Top Reading
  
```

Name	GRE96ft_CellCulture		
Plate layout			
Plate area	A3-A10		
Mode	Kinetic		
Kinetic cycles		100	
Interval time		Not defined	
Mode	Fluorescence Top Reading		
Name	Label 1		
Excitation	Filter		
Excitation wavelength		535 nm	
Excitation bandwidth		25 nm	
Emission	Filter		
Emission wavelength		590 nm	
Emission bandwidth		20 nm	
Gain		90	Manual

Mirror	AUTOMATIC	
Number of flashes		15
Integration time		40 μ s
Lag time		0 μ s
Settle time		0 ms
Z-Position		16500 μ m
Z-Position mode	Manual	
Part of Plate	A3-A10	
Mode	Condition	
Type	Start at cycle	
Executed once		
Operation	at cycle 20	
Movement	Out	
User intervention text	Addition of Calcium	
Movement	In	
Shaking (Linear) Duration		5 s
Shaking (Linear) Position	Current	
Shaking (Linear) Amplitude		2,5 mm
Shaking (Linear) Frequency		630 rpm
Wait (Time)	00:00:01	hh:mm:ss
Wait position	Current	
Start Time	2020-10-24 11:25:49	
End Time	2020-10-24 11:33:30	
Movement	Out	
End Time	2020-10-24 11:33:40	
User intervention text	Add EGTA	
Movement	In	
End Time	2020-10-24 11:33:59	
Start Time	2020-10-24 11:33:59	
Shaking (Linear) Duration		5 s
Shaking (Linear) Position	Current	
Shaking (Linear) Amplitude		2,5 mm
Shaking (Linear) Frequency		630 rpm
End Time	2020-10-24 11:34:04	
Start Time	2020-10-24 11:34:07	

Wait (Time)	00:00:01	hh:mm:ss
Wait position	Current	
End Time	2020-10-24 11:34:08	
Mode	Kinetic	
Kinetic cycles		100
Interval time	Not defined	
Mode	Fluorescence Top Reading	
Name	Label 3	
Excitation	Filter	
Excitation wavelength		535 nm
Excitation bandwidth		25 nm
Emission	Filter	
Emission wavelength		590 nm
Emission bandwidth		20 nm
Gain		90 Manual
Mirror	AUTOMATIC	
Number of flashes		15
Integration time		40 μ s
Lag time		0 μ s
Settle time		0 ms
Z-Position		16500 μ m
Z-Position mode	Manual	
Part of Plate	A3-A10	
Start Time	2020-10-24 11:34:08	
End Time	2020-10-24 11:41:08	

5.2 Protokoll des TECAN *plate readers* für die TMRE-Membranpotentialmessungen

Method name: TMRM-DAPI
 Application: SparkControl V2.1
 Device: Spark 10M Serial number: 1611002762
 Firmware: ABS:V4.2.10 | ABS_MEX:V5.0.4 | MTP:V11.0.2 | FLUOR:V5.0.8

Date: 2020-10-02
 Time: 11:14
 System: DESKTOP-9JPR338
 User: DESKTOP-9JPR338\Admin
 Plate: [LUM96fb_Lumox] - Greiner 96 Flat Black [LUM96fb_Lumox]
 Lid lifter: No lid
 Humidity Cassette: No humidity cassette
 Smooth mode: Not selected

List of actions in this measurement script:

Plate		
	Fluorescence Top Reading	Label 1
	Fluorescence Top Reading	Label 2

Name: LUM96fb_Lumox
 Plate layout:
 Plate area: C3-D10

Mode: Fluorescence Top Reading
 Name: Label 1

Excitation: Filter
 Excitation wavelength: 535 nm
 Excitation bandwidth: 25 nm
 Emission: Filter
 Emission wavelength: 590 nm
 Emission bandwidth: 20 nm
 Gain: 86 Optimal
 Mirror: AUTOMATIC
 Number of flashes: 30
 Integration time: 40 µs
 Lag time: 0 µs
 Settle time: 50 ms
 Z-Position: 17481 µm
 Z-Position mode: From well C3
 Part of Plate: C3-D10

Start Time: 2020-10-02 11:13:17
 Temperature: 25,4 °C

End Time: 2020-10-02 11:13:34

Mode: Fluorescence Top Reading
 Name: Label 2

Excitation	Filter
Excitation wavelength	340 nm
Excitation bandwidth	20 nm
Emission	Filter
Emission wavelength	485 nm
Emission bandwidth	20 nm
Gain	84 Optimal
Mirror	AUTOMATIC
Number of flashes	30
Integration time	40 μ s
Lag time	0 μ s
Settle time	50 ms
Z-Position	17481 μ m
Z-Position mode	Same as Label 1
Part of Plate	C3-D10
Start Time	2020-10-02 11:13:52
Temperature	25,5 $^{\circ}$ C
End Time	2020-10-02 11:14:08

Literaturverzeichnis

- [1] Acehan D, Vaz F, Houtkooper RH, James J, Moore V, Tokunaga C, Kulik W, Wansapura J, Toth MJ, Strauss A, Khuchua Z (2011) Cardiac and Skeletal Muscle Defects in a Mouse Model of Human Barth Syndrome. *J. Biol. Chem.* 286: 899–908
- [2] Alkhaja AK, Jans DC, Nikolov M, Vukotic M, Lytovchenko O, Ludewig F, Schliebs W, Riedel D, Urlaub H, Jakobs S, Deckers M (2012) MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol. Biol. Cell* 23: 247–257
- [3] An J, Shi J, He Q, Lui K, Liu Y, Huang Y, Sheikh MS (2012) CHCM1/CHCHD6, Novel Mitochondrial Protein Linked to Regulation of Mitofilin and Mitochondrial Cristae Morphology. *J. Biol. Chem.* 287: 7411–7426
- [4] Anand R, Strecker V, Urbach J, Wittig I, Reichert AS (2016) Mic13 Is Essential for Formation of Crista Junctions in Mammalian Cells. *PLoS One* 11: e0160258
- [5] Anderson AJ, Jackson TD, Stroud DA, Stojanovski D (2019) Mitochondria—hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biol.* 9: 190126
- [6] Arnoult D, Grodet A, Lee Y-J, Estaquier J, Blackstone C (2005) Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *J. Biol. Chem.* 280: 35742–35750
- [7] Baradaran R, Wang C, Siliciano AF, Long SB (2018) Cryo-EM structures of fungal and metazoan mitochondrial calcium uniporters. *Nature* 559: 580–584
- [8] Barbot M, Jans DC, Schulz C, Denkert N, Kroppen B, Hoppert M, Jakobs S, Meinecke M (2015) Mic10 Oligomerizes to Bend Mitochondrial Inner Membranes at Cristae Junctions. *Cell Metab.* 21: 756–763
- [9] Barrera M, Koob S, Dikov D, Vogel F, Reichert AS (2016) OPA1 functionally interacts with MIC60 but is dispensable for crista junction formation. *FEBS Lett.* 590: 3309–3322
- [10] Barth PG, Van den Bogert C, Bolhuis PA, Scholte HR, van Gennip AH, Schutgens RBH, Ketel AG (1996) X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): Respiratory-chain abnormalities in cultured fibroblasts. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19: 157–160
- [11] Boughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476: 341–345
- [12] Bernhard W, Rouiller C (1956) CLOSE TOPOGRAPHICAL RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIA AND ERGASTOPLASM OF LIVER CELLS IN A DEFINITE PHASE OF CELLULAR ACTIVITY. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 73–78
- [13] Billups B, Forsythe ID (2002) Presynaptic Mitochondrial Calcium Sequestration Influences Transmission at Mammalian Central Synapses. *J. Neurosci.* 22: 5840–5847
- [14] Bohnert M, Wenz L-S, Zerbes RM, Horvath SE, Stroud DA, von der Malsburg K, Müller JM, Oeljeklaus S, Perschil I, Warscheid B, Chacinska A, Veenhuis M, van der Klei IJ, Daum G, Wiedemann N, Becker T, Pfanner N, van der Laan M (2012) Role of mitochondrial inner membrane organizing system in protein biogenesis of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* 23: 3948–3956
- [15] Bohnert M, Zerbes RM, Davies KM, Mühleip AW, Rampelt H, Horvath SE, Boenke T, Kram A, Perschil I, Veenhuis M, Kühlbrandt W, van der Klei IJ, Pfanner N, van der Laan M (2015) Central Role of Mic10 in the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System. *Cell Metab.* 21: 747–755
- [16] Boyman L, Williams GSB, Khananshvilii D, Sekler I, Lederer WJ (2013) NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 59: 205–

- [17] Brandner K, Mick DU, Frazier AE, Taylor RD, Meisinger C, Rehling P (2005) Taz1, an Outer Mitochondrial Membrane Protein, Affects Stability and Assembly of Inner Membrane Protein Complexes: Implications for Barth Syndrome. *Mol. Biol. Cell* 16: 5202–5214
- [18] de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605–610
- [19] Chang KT, Niescier RF, Min K-T (2011) Mitochondrial matrix Ca²⁺ as an intrinsic signal regulating mitochondrial motility in axons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 15456–15461
- [20] Chemaly ER, Troncone L, Lebeche D (2018) SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium* 69: 46–61
- [21] Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10: 322–328
- [22] Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D’Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D’Hooge R, Scorrano L, De Strooper B (2006) Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling. *Cell* 126: 163–175
- [23] Colina-Tenorio L, Horten P, Pfanner N, Rampelt H (2020) Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. *J. Intern. Med.:* 1–20
- [24] Cretin E, Lopes P, Vimont E, Tatsuta T, Langer T, Gazi A, Sachse M, Yu-Wai-Man P, Reynier P, Wai T (2021) High-throughput screening identifies suppressors of mitochondrial fragmentation in OPA1 fibroblasts. *EMBO Mol. Med.* 13: 2014
- [25] Csordás G, Golenár T, Seifert EL, Kamer KJ, Sancak Y, Perocchi F, Moffat C, Weaver D, Perez S de la F, Bogorad R, Koteliensky V, Adijanto J, Mootha VK, Hajnóczky G (2013) MICU1 Controls Both the Threshold and Cooperative Activation of the Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter. *Cell Metab.* 17: 976–987
- [26] D’Adamo P, Fassone L, Gedeon A, Janssen EAM, Bione S, Bolhuis PA, Barth PG, Wilson M, Haan E, Ørstavik KH, Patton MA, Green AJ, Zammarchi E, Donati MA, Toniolo D (1997) The X-Linked Gene G4.5 Is Responsible for Different Infantile Dilated Cardiomyopathies. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 862–867
- [27] Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, Murphy AN, Koller A, Perkins GA, Ellisman MH, Taylor SS (2011) ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function. *J. Biol. Chem.* 286: 2918–2932
- [28] David G, Barrett EF (2003) Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J. Physiol.* 548: 425–438
- [29] Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, Duchon MR (2012) Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. *Cardiovasc. Res.* 93: 445–453
- [30] Deluca HF, Engstrom GW (1961) Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 47: 1744–1750
- [31] Ding C, Wu Z, Huang L, Wang Y, Xue J, Chen S, Deng Z, Wang L, Song Z, Chen S (2015) Mitofilin and CHCHD6 physically interact with Sam50 to sustain cristae structure. *Sci. Rep.* 5: 16064
- [32] Dudek J, Cheng I-F, Balleininger M, Vaz FM, Streckfuss-Bömeke K, Hübscher D, Vukotic M, Wanders RJA, Rehling P, Guan K (2013) Cardiolipin deficiency affects respiratory chain function and organization in an induced pluripotent stem cell model of Barth syndrome. *Stem Cell Res.* 11: 806–819
- [33] Dudek J, Cheng I, Chowdhury A, Wozny K, Balleininger M, Reinhold R, Grunau S, Callegari S, Toischer K, Wanders RJ, Hasenfuß G, Brügger B, Guan K, Rehling P (2016) Cardiac-specific succinate dehydrogenase deficiency in Barth syndrome. *EMBO Mol. Med.* 8: 139–154

- [34] Dudek J, Maack C (2017) Barth syndrome cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 113: 399–410
- [35] Fieni F, Bae Lee S, Jan YN, Kirichok Y (2012) Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. *Nat. Commun.* 3: 1317
- [36] Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G V., Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L (2006) OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* 126: 177–189
- [37] Friedman JR, Mourier A, Yamada J, McCaffery JM, Nunnari J (2015) MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *Elife* 4:
- [38] Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, Mooga VP, Stroud DA, Kulkarni G, Wenk MR, Rehling P, Meisinger C, Ryan MT, Wiedemann N, Greenberg ML, Pfanner N (2009) Mitochondrial Cardiolipin Involved in Outer-Membrane Protein Biogenesis: Implications for Barth Syndrome. *Curr. Biol.* 19: 2133–2139
- [39] Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* 405: 199–221
- [40] Glytsou C, Calvo E, Cogliati S, Mehrotra A, Anastasia I, Rigoni G, Raimondi A, Shintani N, Loureiro M, Vazquez J, Pellegrini L, Enriquez JA, Scorrano L, Soriano ME (2016) Optic Atrophy 1 Is Epistatic to the Core MICOS Component MIC60 in Mitochondrial Cristae Shape Control. *Cell Rep.* 17: 3024–3034
- [41] Gökerküçük EB, Tramier M, Bertolin G (2020) Imaging Mitochondrial Functions: From Fluorescent Dyes to Genetically-Encoded Sensors. *Genes (Basel)*. 11: 125
- [42] Gottschalk B, Klec C, Leitinger G, Bernhart E, Rost R, Bischof H, Madreiter-Sokolowski CT, Radulović S, Eroglu E, Sattler W, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2019) MICU1 controls cristae junction and spatially anchors mitochondrial Ca²⁺ uniporter complex. *Nat. Commun.* 10: 1–17
- [43] Gottschalk B, Klec C, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2018) Intracellular Ca²⁺ release decelerates mitochondrial cristae dynamics within the junctions to the endoplasmic reticulum. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 470: 1193–1203
- [44] Guarani V, Jardel C, Chrétien D, Lombès A, Bénit P, Labasse C, Lacène E, Bourillon A, Imbard A, Benoist J-F, Dorboz I, Gilleron M, Goetzman ES, Gaignard P, Slama A, Elmaleh-Bergès M, Romero NB, Rustin P, Ogier de Baulny H, Paulo JA, et al (2016) QIL1 mutation causes MICOS disassembly and early onset fatal mitochondrial encephalopathy with liver disease. *Elife* 5: 1–18
- [45] Guarani V, McNeill EM, Paulo JA, Huttlin EL, Fröhlich F, Gygi SP, Van Vactor D, Harper JW (2015) QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife* 4: 1–23
- [46] Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 258:
- [47] Gunter TE, Sheu SS (2009) Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca²⁺ transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787: 1291–1308
- [48] Hansford RG (1994) Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26: 495–508
- [49] Harner ME, Unger A-K, Geerts WJC, Mari M, Izawa T, Stenger M, Geimer S, Reggiori F, Westermann B, Neupert W (2016) An evidence based hypothesis on the existence of two pathways of mitochondrial crista formation. *Elife* 5: 1–25
- [50] Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W (2011) The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 30: 4356–4370

- [51] Hasegawa T, Yoshida S, Sugeno N, Kobayashi J, Aoki M (2018) DnaJ/Hsp40 Family and Parkinson's Disease. *Front. Neurosci.* 11: 1–9
- [52] Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, DeVay RM, Lackner LL, Westermann B, Schuldiner M, Weissman JS, Nunnari J (2011) A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* 195: 323–340
- [53] Horvath SE, Daum G (2013) Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* 52: 590–614
- [54] Houtkooper RH, Akbari H, van Lenthe H, Kulik W, Wanders RJA, Frentzen M, Vaz FM (2006) Identification and characterization of human cardiolipin synthase. *FEBS Lett.* 580: 3059–3064
- [55] Huynen MA, Mühlmeister M, Gotthardt K, Guerrero-Castillo S, Brandt U (2016) Evolution and structural organization of the mitochondrial contact site (MICOS) complex and the mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863: 91–101
- [56] Hwang H, Bowen BP, Lefort N, Flynn CR, De Filippis EA, Roberts C, Smoke CC, Meyer C, Hojlund K, Yi Z, Mandarino LJ (2010) Proteomics Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals Novel Abnormalities in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 59: 33–42
- [57] Ikon N, Ryan RO (2017) Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1859: 1156–1163
- [58] Ioakeimidis F, Ott C, Kozjak-Pavlovic V, Violitzi F, Rinotas V, Makrinou E, Eliopoulos E, Fasseas C, Kollias G, Douni E (2014) A splicing mutation in the novel mitochondrial protein DNAJC11 causes motor neuron pathology associated with cristae disorganization, and lymphoid abnormalities in mice. *PLoS One* 9:
- [59] Jacobson J, Duchon MR (2002) Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes - Requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J. Cell Sci.* 115: 1175–1188
- [60] Jans DC, Wurm CA, Riedel D, Wenzel D, Stagge F, Deckers M, Rehling P, Jakobs S (2013) STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: 8936–8941
- [61] John GB, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JML, Rangell L, Bennett MJ, Zha J (2005) The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology. *Mol. Biol. Cell* 16: 1543–1554
- [62] Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 13807–13812
- [63] Kamer KJ, Grabarek Z, Mootha VK (2017) High-affinity cooperative Ca²⁺ binding by MICU 1– MICU 2 serves as an on–off switch for the uniporter. *EMBO Rep.* 18: 1397–1411
- [64] Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 579–592
- [65] Karpova T, Danchuk S, Kolobova E, Popov KM (2003) Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1652: 126–135
- [66] Khuchua Z, Yue Z, Batts L, Strauss AW (2006) A Zebrafish Model of Human Barth Syndrome Reveals the Essential Role of Tafazzin in Cardiac Development and Function. *Circ. Res.* 99: 201–208
- [67] Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427: 360–364
- [68] Koob S, Barrera M, Anand R, Reichert AS (2015) The non-glycosylated isoform of MIC26 is a constituent of the mammalian MICOS complex and promotes formation of crista junctions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853: 1551–1563

- [69] Körner C, Barrera M, Dukanovic J, Eydtt K, Harner M, Rabl R, Vogel F, Rapaport D, Neupert W, Reichert AS (2012) The C-terminal domain of Fcj1 is required for formation of crista junctions and interacts with the TOB/SAM complex in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 23: 2143–2155
- [70] Kovačs-Bogdán E, Sancak Y, Kamer KJ, Plovanich M, Jambhekar A, Huber RJ, Myre MA, Blower MD, Mootha VK (2014) Reconstitution of the mitochondrial calcium uniporter in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 8985–8990
- [71] Kutik S, Rissler M, Guan XL, Guiard B, Shui G, Gebert N, Heacock PN, Rehling P, Dowhan W, Wenk MR, Pfanner N, Wiedemann N (2008) The translocator maintenance protein Tam41 is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis. *J. Cell Biol.* 183: 1213–1221
- [72] Kwong JQ, Lu X, Correll RN, Schwanekamp JA, Vagnozzi RJ, Sargent MA, York AJ, Zhang J, Bers DM, Molkentin JD (2015) The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Rep.* 12: 15–22
- [73] de la Fuente S, Matesanz-Isabel J, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J (2014) Dynamics of mitochondrial Ca²⁺ uptake in MICU1-knockdown cells. *Biochem. J.* 458: 33–40
- [74] Lackner LL (2014) Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol.* 12: 35
- [75] Lamant M, Smih F, Harmancey R, Philip-Couderc P, Pathak A, Roncalli J, Galinier M, Collet X, Massabuau P, Senard JM, Rouet P (2006) ApoO, a novel apolipoprotein, is an original glycoprotein up-regulated by diabetes in human heart. *J. Biol. Chem.* 281: 36289–36302
- [76] Lang S, Erdmann F, Jung M, Wagner R, Cavalie A, Zimmermann R (2011) Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels* 5: 228–235
- [77] Le CH, Benage LG, Specht KS, Li Puma LC, Mulligan CM, Heuberger AL, Prenni JE, Claypool SM, Chatfield KC, Sparagna GC, Chicco AJ (2020) Tafazzin deficiency impairs CoA-dependent oxidative metabolism in cardiac mitochondria. *J. Biol. Chem.* 295: 12485–12497
- [78] MacAskill AF, Rinholm JE, Twelvetrees AE, Arancibia-Carcamo IL, Muir J, Fransson A, Aspenstrom P, Attwell D, Kittler JT (2009) Miro1 Is a Calcium Sensor for Glutamate Receptor-Dependent Localization of Mitochondria at Synapses. *Neuron* 61: 541–555
- [79] Malhotra A, Xu Y, Ren M, Schlame M (2009) Formation of molecular species of mitochondrial cardiolipin. 1. A novel transacylation mechanism to shuttle fatty acids between sn-1 and sn-2 positions of multiple phospholipid species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791: 314–320
- [80] Mallilankaraman K, Cárdenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenár T, Csordás G, Madireddi P, Yang J, Müller M, Miller R, Kolesar JE, Molgó J, Kaufman B, Hajnóczky G, Foskett JK, Madesh M (2012a) MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.* 14: 1336–1343
- [81] Mallilankaraman K, Doonan P, Cárdenas C, Chandramoorthy HC, Müller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgó J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak D-OD, Foskett JK, Madesh M (2012b) MICU1 Is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca²⁺ Uptake that Regulates Cell Survival. *Cell* 151: 630–644
- [82] von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, Hutu DP, Zerbes RM, Schulze-Specking A, Meyer HE, Martinou J-C, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, et al (2011) Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis. *Dev. Cell* 21: 694–707
- [83] Mannella CA (2006a) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1763: 542–548

- [84] Mannella CA (2006b) The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1762: 140–147
- [85] Marchi S, Pinton P (2014) The mitochondrial calcium uniporter complex: Molecular components, structure and physiopathological implications. *J. Physiol.* 592: 829–839
- [86] De Marchi U, Santo-Domingo J, Castelbou C, Sekler I, Wiederkehr A, Demarex N (2014) NCLX Protein, but Not LETM1, Mediates Mitochondrial Ca²⁺ Extrusion, Thereby Limiting Ca²⁺-induced NAD(P)H Production and Modulating Matrix Redox State. *J. Biol. Chem.* 289: 20377–20385
- [87] Maxwell JT, Tsai C-H, Mohiuddin TA, Kwong JQ (2018) Analyses of Mitochondrial Calcium Influx in Isolated Mitochondria and Cultured Cells. *J. Vis. Exp.* 2018: 1–7
- [88] McCormack JG, Denton RM (1979) The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 180: 533–544
- [89] McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 391–425
- [90] Medler K, Gleason EL (2002) Mitochondrial Ca²⁺ Buffering Regulates Synaptic Transmission Between Retinal Amacrine Cells. *J. Neurophysiol.* 87: 1426–1439
- [91] De Michele R, Carimi F, Frommer WB (2014) Mitochondrial biosensors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 48: 39–44
- [92] Missiroli S, Danese A, Iannitti T, Patergnani S, Perrone M, Previati M, Giorgi C, Pinton P (2017) Endoplasmic reticulum-mitochondria Ca²⁺ crosstalk in the control of the tumor cell fate. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864: 858–864
- [93] Mitchell P (1961) Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191: 144–148
- [94] Muñoz-Gómez SA, Slamovits CH, Dacks JB, Baier KA, Spencer KD, Wideman JG (2015) Ancient Homology of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System Points to an Endosymbiotic Origin of Mitochondrial Cristae. *Curr. Biol.* 25: 1489–1495
- [95] Muñoz-Gómez SA, Wideman JG, Roger AJ, Slamovits CH (2017) The origin of mitochondrial cristae from alphaproteobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 34: msw298
- [96] Naia L, Ferreira IL, Ferreira E, Rego AC (2017) Mitochondrial Ca²⁺ handling in Huntington's and Alzheimer's diseases – Role of ER-mitochondria crosstalk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483: 1069–1077
- [97] Nickel AG, von Hardenberg A, Hohl M, Löffler JR, Kohlhaas M, Becker J, Reil J-C, Kazakov A, Bonnekoh J, Stadelmaier M, Puhl S-L, Wagner M, Bogeski I, Cortassa S, Kappl R, Pasiëka B, Lafontaine M, Lancaster CRD, Blacker TS, Hall AR, et al (2015) Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell Metab.* 22: 472–484
- [98] Odgren PR, Toukatly G, Bangs PL, Gilmore R, Fey EG (1996) Molecular characterization of mitofilin (HMP), a mitochondria-associated protein with predicted coiled coil and intermembrane space targeting domains. *J. Cell Sci.* 109: 2253–2264
- [99] Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G (2003) Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 7743–7746
- [100] Ott C, Ross K, Straub S, Thiede B, Gotz M, Goosmann C, Krischke M, Mueller MJ, Krohne G, Rudel T, Kozjak-Pavlovic V (2012) Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 32: 1173–1188
- [101] Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, Grabarek Z, Kong L, Liu Z, Ouyang B, Cong Y, Mootha VK, Chou JJ (2016) Architecture of the

- mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 533: 269–273
- [102] Paillard M, Csordás G, Szanda G, Golenár T, Debattisti V, Bartok A, Wang N, Moffat C, Seifert EL, Spät A, Hajnóczky G (2017) Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca²⁺ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell Rep.* 18: 2291–2300
- [103] Pallafacchina G, Zanin S, Rizzuto R (2018) Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake [version 1; referees: 4 approved]. *F1000Research* 7: 1–14
- [104] Palsdottir H, Hunte C (2004) Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1666: 2–18
- [105] Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvil D, Sekler I (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 436–441
- [106] Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Maria M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T (2014) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU). *15*: 1464–1472
- [107] Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, Granatiero V, Szabò I, De Stefani D, Rizzuto R (2014) MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity. *Mol. Cell* 53: 726–737
- [108] Pendin D, Greotti E, Pozzan T (2014) The elusive importance of being a mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Calcium* 55: 139–145
- [109] Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao RX, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake Fabiana. *Nature* 476: 291–296
- [110] Pfanner N, van der Laan M, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, Darshi M, Deckers M, Hoppins S, Icho T, Jakobs S, Ji J, Kozjak-Pavlovic V, Meisinger C, Odgren PR, Park SK, Rehling P, Reichert AS, Sheikh MS, Taylor SS, et al (2014) Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J. Cell Biol.* 204: 1083–1086
- [111] Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H (2003) Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 52873–52880
- [112] Phoon CKL, Acehan D, Schlame M, Stokes DL, Edelman-Novemsky I, Yu D, Xu Y, Viswanathan N, Ren M (2012) Tafazzin Knockdown in Mice Leads to a Developmental Cardiomyopathy With Early Diastolic Dysfunction Preceding Myocardial Noncompaction. *J. Am. Heart Assoc.* 1: 1–13
- [113] Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R (1998) The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 17: 5298–5308
- [114] Pivovarova NB, Hongpaisan J, Andrews SB, Friel DD (1999) Depolarization-Induced Mitochondrial Ca Accumulation in Sympathetic Neurons: Spatial and Temporal Characteristics. *J. Neurosci.* 19: 6372–6384
- [115] Rabl R, Soubannier V, Scholz R, Vogel F, Mendl N, Vasiljev-Neumeyer A, Körner C, Jagasia R, Keil T, Baumeister W, Cyrklaff M, Neupert W, Reichert AS (2009) Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *J. Cell Biol.* 185: 1047–1063
- [116] Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, Checchetto V, Moro S, Szabò I, Rizzuto R (2013) The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *EMBO J.* 32: 2362–2376
- [117] Rampelt H, Bohnert M, Zerbes RM, Horvath SE, Warscheid B, Pfanner N, van der Laan M (2017a) Mic10, a Core Subunit of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System, Interacts with the Dimeric F₁F_o-ATP Synthase. *J. Mol. Biol.* 429: 1162–1170
- [118] Rampelt H, Zerbes RM, van der Laan M, Pfanner N (2017b) Role of the

- mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864: 737–746
- [119] Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G, Tuft RA, Fogarty KE, Rizzuto R (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J. Cell Biol.* 159: 613–624
- [120] Raturi A, Simmen T (2013) Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833: 213–224
- [121] Renner LD, Weibel DB (2011) Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 6264–6269
- [122] Rizzuto R (1998) Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science (80-)*. 280: 1763–1766
- [123] Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca²⁺: Molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 86: 369–408
- [124] Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- [125] Saini-Chohan HK, Holmes MG, Chicco AJ, Taylor WA, Moore RL, McCune SA, Hickson-Bick DL, Hatch GM, Sparagna GC (2009) Cardiolipin biosynthesis and remodeling enzymes are altered during development of heart failure. *J. Lipid Res.* 50: 1600–1608
- [126] Saito Y, Nakagawa T, Kakihana A, Nakamura Y, Nabika T, Kasai M, Takamori M, Yamagishi N, Kuga T, Hatayama T, Nakayama Y (2016) Yeast Two-Hybrid and One-Hybrid Screenings Identify Regulators of hsp70 Gene Expression. *J. Cell. Biochem.* 117: 2109–2117
- [127] Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovacs-Bogdan E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK (2013) EMRE Is an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex. *Science (80-)*. 342: 1379–1382
- [128] Schlame M (2008) Thematic Review Series: Glycerolipids. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J. Lipid Res.* 49: 1607–1620
- [129] Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002) A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Dev. Cell* 2: 55–67
- [130] Sommakia S, Houlihan PR, Deane SS, Simcox JA, Torres NS, Jeong M-Y, Winge DR, Villanueva CJ, Chaudhuri D (2017) Mitochondrial cardiomyopathies feature increased uptake and diminished efflux of mitochondrial calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 113: 22–32
- [131] Song M, Dorn GW (2015) Mitoconfusion: Noncanonical Functioning of Dynamism Factors in Static Mitochondria of the Heart. *Cell Metab.* 21: 195–205
- [132] Stefani D De, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R (2011) A 40 kDa protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476: 336–340
- [133] Stephan T, Brüser C, Deckers M, Steyer AM, Balzarotti F, Barbot M, Behr TS, Heim G, Hübner W, Ilgen P, Lange F, Pacheu-Grau D, Pape JK, Stoldt S, Huser T, Hell SW, Möbius W, Rehling P, Riedel D, Jakobs S (2020) MICOS assembly controls mitochondrial inner membrane remodeling and crista junction redistribution to mediate cristae formation. *EMBO J.* 39:
- [134] Steward CG, Newbury-Ecob RA, Hastings R, Smithson SF, Tsai-Goodman B, Quarrell OW, Kulik W, Wanders R, Pennock M, Williams M, Cresswell JL, Gonzalez IL, Brennan P (2010) Barth syndrome: an X-linked cause of fetal cardiomyopathy and stillbirth. *Prenat. Diagn.* 30: 970–976

- [135] Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR, Kühlbrandt W (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 27: 1154–1160
- [136] Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnóczky G (1999) Apoptosis driven by IP3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 18: 6349–6361
- [137] Tang J, Zhang K, Dong J, Yan C, Hu C, Ji H, Chen L, Chen S, Zhao H, Song Z (2020) Sam50–Mic19–Mic60 axis determines mitochondrial cristae architecture by mediating mitochondrial outer and inner membrane contact. *Cell Death Differ.* 27: 146–160
- [138] Tatsuta T, Langer T (2017) Intramitochondrial phospholipid trafficking. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862: 81–89
- [139] Teague WE, Soubias O, Petrache H, Fuller N, Hines KG, Rand RP, Gawrisch K (2013) Elastic properties of polyunsaturated phosphatidylethanolamines influence rhodopsin function. *Faraday Discuss.* 161: 383–395
- [140] Tomar D, Dong Z, Shanmughapriya S, Koch DA, Thomas T, Hoffman NE, Timbalia SA, Goldman SJ, Breves SL, Corbally DP, Nemani N, Fairweather JP, Cutri AR, Zhang X, Song J, Jaña F, Huang J, Barrero C, Rabinowitz JE, Luongo TS, et al (2016) MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics. *Cell Rep.* 15: 1673–1685
- [141] Tomar D, Thomas M, Garbincius JF, Kolmetzky DW, Salik O, Jadia P, Carpenter AC, Elrod JW (2019) MICU1 regulates mitochondrial cristae structure and function independent of the mitochondrial calcium uniporter channel. *bioRxiv*
- [142] Tsai M-F, Phillips CB, Ranaghan M, Tsai C-W, Wu Y, Williams C, Miller C (2016) Dual functions of a small regulatory subunit in the mitochondrial calcium uniporter complex. *Elife* 5: 1–17
- [143] Tsai P-I, Lin C-H, Hsieh C-H, Papakyrikos AM, Kim MJ, Napolioni V, Schoor C, Couthouis J, Wu R-M, Wszolek ZK, Winter D, Greicius MD, Ross OA, Wang X (2018) PINK1 Phosphorylates MIC60/Mitofilin to Control Structural Plasticity of Mitochondrial Crista Junctions. *Mol. Cell* 69: 744-756.e6
- [144] Valente EM (2004) Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* (80-.). 304: 1158–1160
- [145] Vance JE (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265: 7248–7256
- [146] Vasington FD, Murphy J V. (1962) Ca⁺⁺ Uptake by Rat Kidney Mitochondria and Its Dependence on Respiration and Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 237:
- [147] Violitzi F, Perivolidi VI, Thireou T, Grivas I, Haralambous S, Samiotaki M, Panayotou G, Douni E (2019) Mapping Interactome Networks of DNAJC11, a Novel Mitochondrial Protein Causing Neuromuscular Pathology in Mice. *J. Proteome Res.* 18: 3896–3912
- [148] Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS (2006) Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 175: 237–247
- [149] Waldeck-Weiermair M, Gottschalk B, Madreiter-Sokolowski CT, Ramadani-Muja J, Ziomek G, Klec C, Burgstaller S, Bischof H, Depaoli MR, Eroglu E, Malli R, Graier WF (2019) Development and Application of Sub-Mitochondrial Targeted Ca²⁺ Biosensors. *Front. Cell. Neurosci.* 13: 1–12
- [150] Weber TA, Koob S, Heide H, Wittig I, Head B, van der Bliet A, Brandt U, Mittelbronn M, Reichert AS (2013) APOOL Is a Cardiolipin-Binding Constituent of the Mitofilin/MINOS Protein Complex Determining Cristae Morphology in Mammalian Mitochondria. *PLoS One* 8: e63683
- [151] Weihofen A, Thomas KJ, Ostaszewski BL, Cookson MR, Selkoe DJ (2009) Pink1 Forms a Multiprotein Complex with Miro and Milton, Linking Pink1 Function to Mitochondrial Trafficking †. *Biochemistry* 48: 2045–2052
- [152] Wiedemann N, Pfanner N (2017) Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 86: 685–714
- [153] Wilson EL, Metzakopian E (2020) ER-mitochondria contact sites in

- neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. *Cell Death Differ.*
- [154] Wollweber F, von der Malsburg K, van der Laan M (2017) Mitochondrial contact site and cristae organizing system: A central player in membrane shaping and crosstalk. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864: 1481–1489
- [155] Wu J, Prole DL, Shen Y, Lin Z, Gnanasekaran A, Liu Y, Chen L, Zhou H, Chen SRW, Usachev YM, Taylor CW, Campbell RE (2014) Red fluorescent genetically encoded Ca²⁺ indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*
- [156] Xie J, Marusich MF, Souda P, Whitelegge J, Capaldi RA (2007) The mitochondrial inner membrane protein Mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett.* 581: 3545–3549
- [157] Xu Y, Kelley RI, Blanck TJJ, Schlame M (2003) Remodeling of Cardiolipin by Phospholipid Transacylation. *J. Biol. Chem.* 278: 51380–51385
- [158] Xu Y, Malhotra A, Ren M, Schlame M (2006) The Enzymatic Function of Tafazzin. *J. Biol. Chem.* 281: 39217–39224
- [159] Yoo J, Wu M, Yin Y, Herzik MA, Lander GC, Lee S-Y (2018) Cryo-EM structure of a mitochondrial calcium uniporter. *Science (80-.).* 361: 506–511
- [160] Yu B, Wu C, Zhao S (2012) Plasma apolipoprotein O level increased in the patients with acute coronary syndrome. *J. Lipid Res.* 53: 1952–1957
- [161] Zeharia A, Friedman JR, Tobar A, Saada A, Konen O, Fellig Y, Shaag A, Nunnari J, Elpeleg O (2016) Mitochondrial hepato-encephalopathy due to deficiency of QIL1/MIC13 (C19orf70), a MICOS complex subunit. *Eur. J. Hum. Genet.* 24: 1778–1782
- [162] Zerbes RM, Bohnert M, Stroud DA, von der Malsburg K, Kram A, Oeljeklaus S, Warscheid B, Becker T, Wiedemann N, Veenhuis M, van der Klei IJ, Pfanner N, van der Laan M (2012a) Role of MINOS in Mitochondrial Membrane Architecture: Cristae Morphology and Outer Membrane Interactions Differentially Depend on Mitofilin Domains. *J. Mol. Biol.* 422: 183–191
- [163] Zerbes RM, Höß P, Pfanner N, Van Der Laan M, Bohnert M (2016) Distinct roles of Mic12 and Mic27 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J. Mol. Biol.* 428: 1485–1492
- [164] Zerbes RM, van der Klei IJ, Veenhuis M, Pfanner N, van der Laan M, Bohnert M (2012b) Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol. Chem.* 393: 1247–1261
- [165] Zhou Z, Matlib MA, Bers DM (1998) Cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ signals in patch clamped mammalian ventricular myocytes. *J. Physiol.* 507: 379–403
- [166] Zhuo W, Zhou H, Guo R, Yi J, Zhang L, Yu L, Sui Y, Zeng W, Wang P, Yang M (2021) Structure of intact human MCU supercomplex with the auxiliary MICU subunits. *Protein Cell* 12: 220–229
- [167] Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009) Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793: 5–19

Danksagung

Mein Dank gebührt Prof. Dr. Martin van der Laan für die Möglichkeit und die Bereitstellung der Mittel, in seinem Labor meine Promotionsarbeit durchführen zu dürfen. Zudem möchte ich Herrn Prof. van der Laan für sein allzeit offenes Ohr und für seine Impulse bezüglich dieser Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Karina von der Malsburg und Herrn Dr. Alexander von der Malsburg bedanken. Ganz besonders möchte ich euch für die unzähligen Gespräche danken, die mir oftmals einem neuen Fokus verhelfen. Zudem bin ich euch sehr dankbar für all die Anregungen, die ihr mir im Rahmen dieser Arbeit gegeben habt. Euer Rat und eure Hilfestellung haben oft wichtige Impulse für mich gesetzt. Vielen Dank für eure große Unterstützung.

Zudem möchte ich mich auch sehr herzlich bei Dr. Florian Wollweber bedanken. Einerseits im Labor aber auch außerhalb von diesem, bist du immer ein offener Ansprechpartner gewesen. Sehr genossen habe ich unsere fachlichen Gespräche. Ich möchte mich auch sehr bei Frau Katja Noll bedanken. Ohne zu zögern warst du mit Rat und Tat immer ansprechbar und hast mir des Öfteren weiterhelfen können. Hervorheben möchte ich deinen Einsatz und deine Hilfestellung vor allem bei den Blue-Native Gelen dieser Arbeit. Ohne dich und deine Hilfe wären diese nicht möglich gewesen. Vielen herzlichen Dank.

Auch bedanken möchte ich mich bei Frau Sybille Jungbluth. Auch du hattest immer ein offenes Ohr für mich und warst mit Rat und Tat für mich da.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Amjad Aladawi.

Des Weiteren danke ich auch Jun.-Prof. Dr. David Mick und dessen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen für den fachlichen Austausch, euren Anregungen und Hilfe.

Zuletzt möchte ich auch meiner Familie danken. Zum einen seid ihr immer mein Rückzugsort und ich kann immer auf eure Unterstützung bauen. Zum anderen macht es mich einfach glücklich zu wissen, dass ich euch immer bei mir habe.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 13. November 2023

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin van der Laan
Prof. Dr. Frank Schmitz