

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. Martin van der Laan

MICOS und OPA1: Architekten mitochondrialer Membransysteme

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2024

vorgelegt von: Nadine Graf

geboren am: 30.10.1999 in Bensheim an der Bergstraße

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhalt

1. Zusammenfassung.....	5
2. Abstract	6
3. Einleitung	8
3.1 Mitochondrien als Teil des Zellorganellen-Netzwerkes.....	8
3.2 <i>Mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS)</i>	9
3.2.1 Evolution von MICOS.....	10
3.2.2 MIC10 und MIC60 als zentrale MICOS-Komponenten.....	10
3.2.3 Der MIC60-Subkomplex	11
3.2.4 Der MIC10-Subkomplex	13
3.2.5 Entstehung lamellarer und tubulärer Cristae.....	15
3.3 Teilung und Fusion als Voraussetzung mitochondrialer Dynamik	15
3.4 Mitochondriale Teilung.....	16
3.5 MFN1, MFN2 und OPA1 als Schlüsselspieler mitochondrialer Fusion	17
3.6 Mutationen im OPA1-Gen führen zur „autosomal-dominanten optischen Atrophie“	18
3.7 Biosynthese und Prozessierung von OPA1	18
3.8 YME1L, OMA1 und ihr Einfluss auf die OPA1-Prozessierung.....	20
3.9 Limitierung mitochondrialer Fusion durch OPA1-Prozessierung	23
3.10 OPA1 und seine regulierende Funktion auf Apoptose	23
3.11 Anhaltende OPA1-Prozessierung durch OMA1 führt zur Apoptose	24
3.12 Zielsetzung der Arbeit.....	26
4. Material & Methoden.....	27
4.1 Material	27
4.1.1 Geräte.....	27
4.1.2 Verbrauchsmaterial.....	28
4.1.3 Chemikalien	29
4.1.4 Antikörper.....	31
4.1.5 Zelllinien.....	32
4.2 Methoden.....	33
4.2.1 Arbeit in Zellkultur.....	33
4.2.1.1 Kultivierung von humanen Zellen	33
4.2.1.2 Splitten von humanen Zellen.....	33
4.2.1.3 Ernten von humanen Zellen	33
4.2.1.4 Einfrieren von humanen Zellen	34
4.2.1.5 Auftauen von humanen Zellen	34
4.2.1.6 Behandlung humaner Zellen mit FCCP	34

4.2.1.7 siRNA Transfektion.....	35
4.2.2 Proteinkonzentration-Bestimmung nach Bradford.....	35
4.2.3 Isolation von Mitochondrien aus humanen Zellen	36
4.2.4 Ganzzelllysate.....	36
4.2.5 TCA-Präzipitation	37
4.2.6 SDS-PAGE	38
4.2.7 Gießen von Bis-Tris-Gelen	38
4.2.8 Western Blot.....	39
4.2.9 SDS-PAGE auf einem Gradientengel	41
4.2.10 Wet blot.....	41
4.2.11 Blue native-PAGE	42
4.2.12 Gießen von Blue native-Gelen	43
4.2.13 Immunpräzipitation	44
4.2.14 Zählen von Zellen.....	45
4.2.15 Messung des Sauerstoffverbrauchs von lebenden Zellen	46
4.2.16 Elektronenmikroskopie.....	48
5. Ergebnisse	50
5.1 Auswirkungen des Fehlens von MIC10 und MIC60 auf MICOS, MIB und OPA1	50
5.2 OPA1-Oligomere trotz Abwesenheit von MIC10 auf Wildtyp-Niveau.....	52
5.3 Fehlen von OPA1 in Δ MIC10 führt zur Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran	53
5.4 Fehlen von OPA1 in Δ MIC10-Zellen führt zur Reduktion des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs.....	58
5.5 Menge an Atmungskettenproteinen in Δ MIC10-si OPA1-Zellen auf Wildtyp-Niveau	61
5.6 Keine Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen MICOS und OPA1	61
5.7 Mitochondrialer Stress führt zur Prozessierung von OMA1 und OPA1	64
5.8 Destabilisierung von MICOS sowie OMA1- und OPA1-Oligomeren unter Membrandepolarisierung	65
5.9 Destabilisierung von MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 unter mitochondrialem Stress.....	67
6. Diskussion	71
6.1 Verminderte Prozessierung von L-OPA1 bei Fehlen von MIC10	71
6.2 Verminderte OMA1-Expression in Δ MIC10 schützt OPA1 vor Prozessierung.....	72
6.3 Stabilisierung der <i>crista junctions</i> in Δ MIC10 durch L-OPA1	73
6.4 <i>Crista junctions</i> als Voraussetzung für optimale mitochondriale Respiration in Δ MIC10	74
6.5 Reduzierte Effektivität der Atmungskette bei Verlust der <i>crista junctions</i>	75
6.6 Keine physikalische Interaktion zwischen MICOS bzw. MIB und OPA1	76
6.7 Aktivierung von OMA1 unter mitochondrialem Stress	78

6.8 Destabilisierung von MICOS sowie OPA1- und OMA1-Oligomeren unter mitochondrialem Stress	79
6.9 Destabilisierung des MIC10-Subkomplexes unter mitochondrialem Stress.....	81
6.10 Fazit der Arbeit	85
7. Literaturverzeichnis	86
8. Abkürzungsverzeichnis	96
9. Abbildungsverzeichnis	98
10. Tabellenverzeichnis	99
11. Danksagung	100
12. Lebenslauf	102

1. Zusammenfassung

Mitochondrien werden aufgrund ihrer evolutionären Abstammung von α -Proteobakterien von zwei Membranen ummantelt. Die innere Mitochondrienmembran kann wiederum in die innere Grenzmembran und die in die Matrix ragenden Cristae-Membranen unterteilt werden, welche an den sogenannten *crista junctions* miteinander verbunden sind. Die durch diesen Aufbau entstehenden Cristae, in denen die mitochondriale Atmungskette lokalisiert ist, sind entscheidend an der Aufrechterhaltung mitochondrialer Funktionalität und Dynamik beteiligt. Schlüsselspieler der Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie sind der in den *crista junctions* lokalisierte Proteinkomplex *mitochondrial contact site and cristae organizing system* (MICOS), welcher sich aus dem MIC10- und dem MIC60-Subkomplex zusammensetzt, sowie die GTPase *optic atrophy type 1* (OPA1). OPA1 wiederum wird durch die stress-sensitive Metalloprotease *overlapping with m-AAA-Protease* (OMA1) als Reaktion auf mitochondrialen Stress prozessiert. In den letzten Jahren konnten zwar große Fortschritte bei der Erforschung von MICOS und OPA1 und ihrer jeweiligen Funktionen erzielt werden, dennoch sind nach wie vor viele zentrale Fragen zum Verständnis der Bildung und Aufrechterhaltung von Cristae-Membranen ungeklärt. Aufgrund der großen klinischen Relevanz des Themas, beschloss ich daher im Rahmen meiner Arbeit zu untersuchen, wie das Wechselspiel zwischen MICOS und OPA1 die Cristae-Biogenese und -Dynamik beeinflusst. Hierbei suchte ich nach direkten Wechselwirkungen zwischen MICOS und OPA1, sowie nach Reaktionen auf Seiten des einen Partners, wenn man den anderen verändert.

Hierfür arbeitete ich mit den beiden Zelllinien HEK293T und HeLa. Anders als in der Literatur beschrieben, konnte ich bei der Durchführung einer Immunpräzipitation keine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen OPA1 und dem MICOS-Komplex in Wildtyp-Zellen nachweisen. Bei der Untersuchung von OPA1 bzw. dessen Oligomeren gelang es mir an isolierten Mitochondrien, denen die MICOS-Untereinheit MIC10 fehlt (Δ MIC10), Hinweise zu finden, die auf eine Interaktion zwischen MIC10 und OPA1 im Wildtyp schließen lassen. Weiterhin gelang es durch elektronenmikroskopische Untersuchung und Messung des Sauerstoffverbrauchs in Δ MIC10-Zellen, in denen OPA1 durch Transfektion mit gegen die GTPase gerichtete siRNA ausgeschaltet wurde, zu bestätigen bzw. neu herauszufinden, dass OPA1 entscheidend für die Aufrechterhaltung der *crista junctions* und damit die optimale Leistungsfähigkeit der mitochondrialen Atmungskette ist. Weiterhin konnte ich Hinweise finden, die darauf schließen lassen, dass Zellen als Reaktion auf eine gefährdete Cristae-Architektur verminderte Mengen an OMA1 exprimieren. Um die Auswirkungen mitochondrialen Stresses auf die beiden Schlüsselspieler der Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie zu untersuchen, arbeitete ich mit dem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette Trifluoromethoxycarbonylcyanidphenylhydrazon (FCCP). Hierunter konnte ich bestätigen, dass sowohl der MICOS-Komplex und OPA1 als auch dessen Oligomere eine deutliche, aber dennoch reversible Destabilisierung bzw. Prozessierung unter mitochondrialem Stress erfahren. Als neue

Erkenntnis habe ich herausgefunden, dass das MIC10-Protein eine schützende Funktion auf die übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine innehat. MIC10 wird unter mitochondrialem Stress zuerst abgebaut, während die restlichen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine unter diesen Bedingungen nach wie vor stabil sind. Ich vermute, dass entweder das OPA1-Protein direkt oder aber die für die Prozessierung von OPA1 verantwortliche, aktivierte Metalloprotease OMA1 für diese Destabilisierung verantwortlich ist.

Zwar konnte im Rahmen meiner Arbeit unter Wildtyp-Bedingungen keine nennenswerte direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen MICOS und OPA1 festgestellt werden. Ein anderes Bild ergab sich aber in Zellen mit einem mutations- bzw. stressbedingt destabilisierten MICOS. OPA1 scheint unter diesen Bedingungen mit dem MIC10-Subkomplex zu interagieren und könnte – gemeinsam mit der Metalloprotease OMA1 - die Stabilität der MICOS-Subkomplexe regulieren.

2. Abstract

Due to their evolutionary descent from α -proteobacteria, mitochondria are encased in two membranes. The inner mitochondrial membrane can in turn be subdivided into the inner boundary membrane and the cristae membranes that protrude into the matrix, which are connected to each other at the so-called crista junctions. The cristae formed by this structure, in which the mitochondrial respiratory chain is localized, play a decisive role in maintaining mitochondrial functionality and dynamics. Key players in the development and maintenance of cristae morphology are the mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS) protein complex, which is localized in the crista junctions and consists of the MIC10 and MIC60 subcomplexes, and the GTPase optic atrophy type 1 (OPA1). OPA1, in turn, is processed by the stress-sensitive metalloprotease overlapping with m-AAA protease (OMA1) in response to mitochondrial stress. In recent years, great progress has been made in the study of MICOS and OPA1 and their respective functions; however, many central questions regarding the understanding of the formation and maintenance of cristae membranes remain unanswered. Due to the high clinical relevance of this topic, I decided to investigate how the interplay between MICOS and OPA1 influences cristae biogenesis and dynamics. I was looking for direct interactions between MICOS and OPA1, as well as for reactions on the part of one partner when the other is altered.

For this purpose, I worked with the two cell lines HEK293T and HeLa. Contrary to what is described in the literature, I was unable to demonstrate a direct protein-protein interaction between OPA1 and the MICOS complex in wild-type cells when carrying out immunoprecipitation. Nevertheless, by examining OPA1 or its oligomers on isolated mitochondria lacking the MICOS subunit MIC10 (Δ MIC10), I was able to find evidence suggesting an interaction between MIC10 and OPA1 in the wild type. Furthermore,

electron microscopic examination and measurement of oxygen consumption in Δ MIC10 cells, in which OPA1 was knocked down by transfection with siRNA directed against the GTPase, confirmed or newly revealed that OPA1 is crucial for the maintenance of crista junctions and thus the optimal performance of the mitochondrial respiratory chain. Furthermore, I found evidence suggesting that cells express reduced levels of OMA1 in response to compromised cristae architecture. To investigate the effects of mitochondrial stress on the two key players in the maintenance of cristae morphology, I worked with the uncoupler of the mitochondrial respiratory chain trifluoromethoxycarbonylcyanidephenylhydrazone (FCCP). This allowed me to confirm that both the MICOS complex and OPA1, as well as its oligomers, undergo a clear but reversible destabilization or processing under mitochondrial stress. As a new finding, I succeeded in discovering that the MIC10 protein has a protective function on the other proteins belonging to the MIC10 subcomplex. MIC10 is degraded first under mitochondrial stress, while the other proteins belonging to the MIC10 subcomplex are still stable under these conditions. I suspect that either the OPA1 protein directly or the activated metalloprotease OMA1 responsible for the processing of OPA1 is responsible for this destabilization.

My work did not reveal any significant direct protein-protein interaction between MICOS and OPA1 under wild-type conditions. However, a different picture emerged in cells with a mutation- or stress-induced destabilized MICOS. OPA1 appears to interact with the MIC10 subcomplex under these conditions and could - together with the metalloprotease OMA1 - regulate the stability of the MICOS subcomplexes.

3. Einleitung

3.1 Mitochondrien als Teil des Zellorganellen-Netzwerkes

Eukaryotische Zellen beherbergen verschiedene intrazelluläre Membransysteme, die man als Zellorganellen bezeichnet. Diese haben einerseits ihre jeweils spezifischen Aufgaben, denen sie nachgehen. Andererseits stehen sie auch untereinander in Kontakt, indem sie Metabolite austauschen, gemeinsamen regulatorischen Prozessen unterliegen oder in direktem Membrankontakt zueinanderstehen. Dies ist Voraussetzung dafür, dass die Zelle als Ganzes funktioniert und auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren kann [43].

Mitochondrien sind eingebettet in dieses Netzwerk aus Zellorganellen [90]. Sie sind im Zytosol lokalisiert, wo sie untereinander hochdynamische Netzwerke ausbilden [38]. Als Konsequenz ihres evolutionären Ursprunges von α -Proteobakterien sind sie von zwei Membranen umgeben: der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran (Abb. 1). Diese ummanteln zwei voneinander getrennte Kompartimente, den Intermembranraum und die mitochondriale Matrix (Abb. 1) [44,91]. Die äußere Membran trennt das Mitochondrium vom Zytosol ab und vermittelt den Kontakt bzw. die Kommunikation mit anderen Zellorganellen [6]. Die innere Membran kann weiter in die innere Grenzmembran und die Cristae-Membranen unterteilt werden (Abb. 1) [97]. Die innere Grenzmembran steht dabei in engem physischem Kontakt zur äußeren Mitochondrienmembran und ist gemeinsam mit dieser am Import von Proteinen vom Zytosol ins Mitochondrium beteiligt [101,111]. Cristae dagegen sind Membraneinstülpungen, die von der inneren Grenzmembran in die Matrix vorragen (Abb. 1). Diese dienen der Oberflächenvergrößerung und beherbergen unter anderem die Komplexe der Atmungskette, sowie die F_1F_0 -Synthase (Abb. 1), sodass via oxidativer Phosphorylierung ATP-Synthese betrieben werden kann [40,78]. Die Verbindung zwischen der inneren Grenzmembran und den Cristae wird durch die sogenannten *crista junctions* hergestellt (Abb. 1) [102]. Diese halten die unterschiedliche Proteinverteilung zwischen den beiden Subdomänen der inneren Mitochondrienmembran aufrecht und stellen somit eine Diffusionsbarriere innerhalb der inneren Membran dar (Abb. 1) [85,86]. Das Lumen der Cristae wird topographisch zum Intermembranraum gezählt. Aufgrund der Diffusionsbarriere an *crista junctions* wird es häufig als Intra-Cristae-Raum bezeichnet [85,86,102]. Studien haben zeigen können, dass Cristae hochdynamisch sind und sich ihre Membranmorphologie innerhalb von Sekunden verändern kann [73,74]. Dabei hängt ihre Morphologie von verschiedenen Faktoren ab wie bspw. dem metabolischen Status des jeweiligen Mitochondriums. Niedrige ADP-Konzentrationen mit folglich langsamer mitochondrialer Respiration führen dabei zu einem niedrigen Cristae-Volumen, während hohe ADP-Spiegel mit daraus resultierender schneller Respiration eine Expansion der Cristae-Volumina zur Folge haben [19,52].

Aus proteomischen Studien ist bekannt, dass Mitochondrien von Säugetieren über 1.500 unterschiedliche Proteine enthalten. Das Proteom variiert dabei in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebetyp in seiner Zusammensetzung. Da die maternal vererbte mitochondriale DNA (mtDNA) jedoch nur für 13 dieser Proteine codiert, ist der Großteil der mitochondrialen Proteine im Zellkern codiert und wird im Anschluss an die Translation im Zytosol in die Mitochondrien importiert [104,132].

Man unterscheidet verschiedene Wege, die ein Protein beim Import vom Zytosol ins Mitochondrium durchlaufen kann. Welchen der diversen Import-Wege das jeweilige Protein dabei durchläuft, hängt von einem jeweils spezifischen Erkennungssignal ab, das das jeweilige Protein trägt [105].

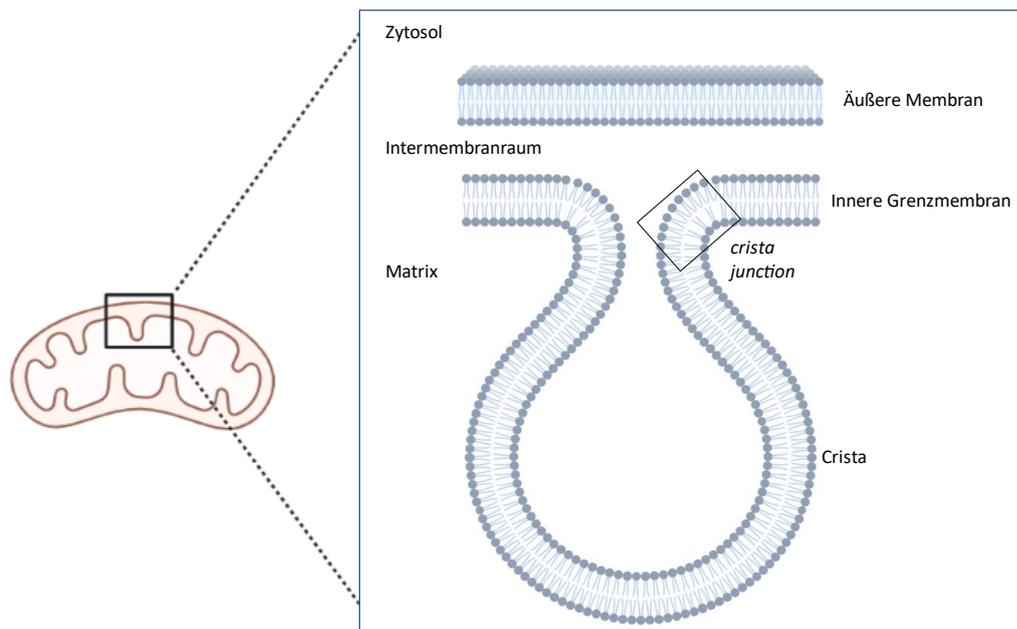


Abbildung 1: Aufbau von Mitochondrien

Abb. 1 Aufbau von Mitochondrien: Mitochondrien sind von zwei Membranen ummantelt, aus deren Konsequenz mit dem Intermembranraum und der Matrix zwei voneinander getrennte Kompartimente entstehen. Während die äußere Membran den Kontakt mit anderen Organellen des Zytosols vermittelt, kann die innere Membran in die innere Grenzmembran und die in die Matrix ragenden Cristae unterteilt werden. Die Verbindung zwischen innerer Grenzmembran und den Cristae wird durch sogenannten *crista junctions* an deren Übergang sichergestellt. Das Lumen der Cristae wird topographisch zum Intermembranraum gezählt. Aufgrund der Diffusionsbarriere an *crista junctions* wird es häufig als Intra-Cristae-Raum bezeichnet.

3.2 Mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS)

In den *crista junctions* ist ein großer Proteinkomplex lokalisiert, der 2011 etwa zur selben Zeit von drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen in den Mitochondrien der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) entdeckt wurde und entscheidend an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie beteiligt ist [53,57,131]. Diesem Proteinkomplex wurde der Name *mitochondrial contact site and cristae*

organizing system, kurz MICOS, gegeben. Die Untereinheiten des Komplexes werden mit Mic bezeichnet, gefolgt von einer Nummer, die dem Molekulargewicht des jeweiligen Proteins entspricht [104]. Bis heute sind sechs MICOS-Untereinheiten in *Saccharomyces cerevisiae* bekannt: Mic10, Mic12, Mic19, Mic26, Mic27 und Mic60. In humanen Zellen verständigte man sich auf eine Nomenklatur, bei der die drei Buchstaben großgeschrieben werden (MIC anstelle von Mic). Bei Säugetieren kommt mit MIC25 zudem noch eine weitere Untereinheit hinzu und das Mic12-Protein entspricht hier QIL1 (auch als MIC13 bekannt) [4,104].

3.2.1 Evolution von MICOS

Genauso wie das Mitochondrium selbst, stammt auch der MICOS-Komplex von α -Proteobakterien ab [89]. MIC60 zeigt dabei in seiner Sequenz signifikante Übereinstimmungen mit Proteinen, die auch in α -Proteobakterien vorkommen und scheint somit das älteste aller MICOS-Proteine zu sein [61]. Zu MIC60 kamen im Laufe der Zeit mit MIC10 und MIC19 weitere MICOS-Komponenten hinzu, bevor QIL1, MIC25, MIC26 und MIC27 den Komplex in seiner heutigen Form vervollständigten. MIC19 und MIC25 sind dabei Orthologe von Mic19 in Bäckerhefe, die durch Gen-Duplikation entstanden sind. MIC26 und MIC27 sind aus evolutionärer Sicht die jüngsten MICOS-Proteine und durch voneinander unabhängige Duplikation in Wirbeltieren und Hefen entstanden [61].

3.2.2 MIC10 und MIC60 als zentrale MICOS-Komponenten

Biochemische Analysen in der Vergangenheit haben gezeigt, dass MIC10 und MIC60 die zentralen Komponenten des MICOS-Komplexes sind. Deren Verlust führt zur massiven Destabilisierung des gesamten Proteinkomplexes mit der Konsequenz, dass es zu Defekten der mitochondrialen Membranarchitektur sowie der Funktionen, welche die einzelnen Proteine innehaben (s. Kap. 3.2.3 und 3.2.4), kommt [53,57,131]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass MIC10 und MIC60 jeweils die Kernuntereinheiten von zwei großen MICOS-Subkomplexen sind (Abb. 2). Dem MIC60-Subkomplex gehören neben Mic/MIC60, Mic/MIC19 und in Säugetieren zusätzlich noch MIC25 an. Den MIC10-Subkomplex bilden die Proteine Mic/MIC10, Mic12/QIL1, sowie Mic/MIC26 und Mic/MIC27 [35,137].

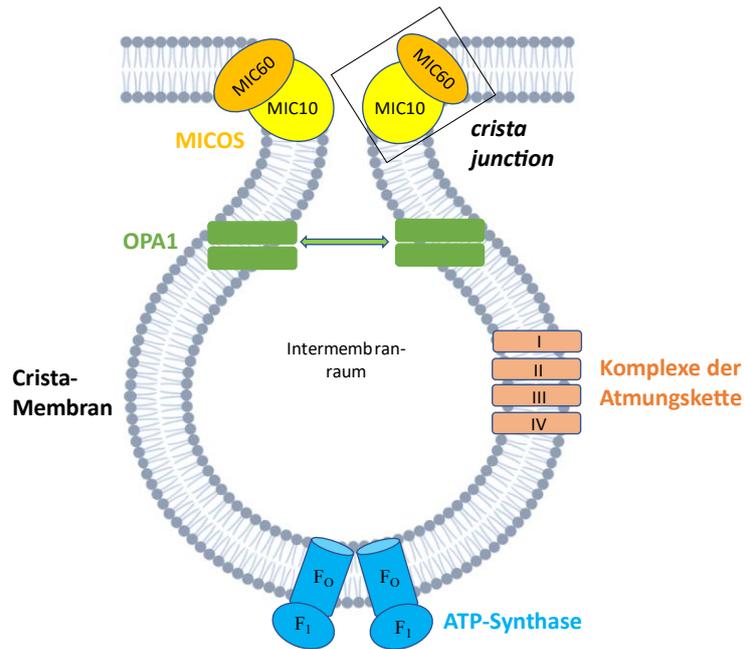


Abbildung 2: Cristae

Abb. 2 Cristae: Der MICOS-Komplex setzt sich aus den beiden Subkomplexen MIC60 und MIC10 zusammen, welche Voraussetzung für die Stabilität der *crista junctions* sind. Neben MIC10 sind OPA1 und die Dimere der F_1F_0 -ATP-Synthase entscheidend an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie beteiligt.

3.2.3 Der MIC60-Subkomplex

Die am besten untersuchte Komponente des MIC60-Subkomplexes ist dessen namensgebende Kernuntereinheit MIC60. Wesentliche Strukturelemente von Mic60 sind ein N-terminales Transmembransegment (TMS), sowie eine zentrale *coiled-coil*-Region und eine C-terminale Mitofilin-Signatur-Domäne, die in den Intermembranraum ragen [107]. Neben MIC19 stehen auch die dem MIC10-Subkomplex zugehörigen Proteine MIC10 und QIL1 in direktem Kontakt mit MIC60. Somit verbindet MIC60 beide MICOS-Untereinheiten miteinander und scheint als tragende Grundstruktur des gesamten MICOS-Komplexes zu fungieren [119].

Eine weitere bemerkenswerte Funktion des MIC60-Subkomplexes ist dessen Interaktion mit verschiedenen Proteinkomplexen der äußeren Membran. Diese Wechselwirkungen machen MICOS zu einem zentralen Verbindungsglied zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Besonders wichtige Interaktionspartner des MIC60-Subkomplexes sind dabei der TOM- (*translocase of the outer membrane*) und SAM- (*sorting and assembly machinery*) Komplex [11,28,95]. Interessant ist, dass der durch den Mic60-Subkomplex vermittelte Kontakt zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran in Bäckerhefe auch bei Abwesenheit des Mic10-Subkomplexes stabil ist,

während die Bildung der *crista junctions* auf die Anwesenheit beider MICOS-Subkomplexe angewiesen ist

MIC60 ist außerdem an verschiedenen mitochondrialen Protein-Biogenese-Mechanismen direkt oder indirekt beteiligt. So führt das Fehlen von Mic60 in Hefe dazu, dass der Import von Vorläuferproteinen in den Intermembranraum über den MIA- (*mitochondrial intermembrane space assembly*) Weg beeinträchtigt wird, während dessen Überexpression den Proteinimport über den MIA-Weg stimuliert [131]. Zudem erleichtert Mic60 den Import von mitochondrialen β -barrel-Proteinen, sodass sie mithilfe des TOM- und SAM-Komplexes in die äußere Membran eingebaut werden können [11]. Callegari et al., 2019 haben berichtet, dass der MICOS-Komplex in humanen Mitochondrien für den effizienten Import von Carrier-Proteinen in den Intermembranraum benötigt wird [13].

Mithilfe einer *Blue native-PAGE* an isolierten Mitochondrien aus Säugerzellen gelang es, einen großen Proteinkomplex zu identifizieren, welcher aus Bestandteilen des MICOS- und SAM-Komplexes besteht. Diesem beide mitochondriale Membranen umspannenden Komplex wurde der Name *mitochondrial intermembrane space bridging (MIB) complex* gegeben. Als dessen wichtigste Bestandteile erwiesen sich die beiden MICOS-Proteine MIC60 und MIC19, sowie SAM50. Das Zusammenspiel der verschiedenen MIB-Komponenten ist dabei für die Aufrechterhaltung der Cristae, sowie die Biogenese der Atmungskettenkomplexe von besonderer Bedeutung [95,96].

Bemerkenswert ist zudem, dass der *Knockdown* von MIC60 zum kompletten Verlust der Cristae führt und auch die Proteinmenge der restlichen MICOS- und SAM-Komponenten bei Abwesenheit von MIC60 stark reduziert ist [68,96]. Darüber hinaus ist die durch die Protease *yeast mitochondrial DNA escape 1-like*, kurz YME1L (s. Kap. 3.8), regulierte MIC60-Homöostase von entscheidender Bedeutung für den Zusammenbau des gesamten MICOS-Komplexes, die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie, sowie die Organisation der mtDNA [64,82]. Vereinzelt Studien mit Säuger-Mitochondrien weisen darauf hin, dass MIC60 auch mit der Dynamin-artigen GTPase *optic atrophy type 1* (OPA1) interagiert, die an der mitochondrialen Fusion und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie beteiligt ist (s. Kap. 3.5- 3.11) [9,41]. Allerdings ergibt die Literatur hier kein klares Bild, denn die Befunde verschiedener Studien zu Umfang und Intensität dieser Interaktion unterscheiden sich erstaunlich deutlich voneinander. Es könnte sich daher um eine transiente, regulatorisch bedeutsame Interaktion handeln, deren Bedeutung noch nicht vollends verstanden ist.

Vergleichsweise wenig ist über die beiden anderen, ebenfalls zum MIC60-Subkomplex gehörenden peripheren Innermembranproteine MIC19 und MIC25 bekannt [133]. MIC19 interagiert neben MIC60 auch mit dem Hitzeschockprotein HSP70, OPA1 und SAM50 [21]. In MIC19 KO- (*Knockout*) Zellen konnten zudem steigende Spiegel an *dynamin-related protein 1* (DRP1) nachgewiesen werden, welches an der mitochondrialen Teilung beteiligt ist (s. Kap. 3.4), wohingegen der Gehalt an OPA1 in diesen Zellen abnimmt. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass der *Knockdown* von MIC19 zur Fragmentierung des zytosolischen Mitochondrien-Netzwerks und zur Beeinträchtigung der Cristae-

Morphologie führt [21,96]. Die Depletion von MIC25 hat dagegen nur geringfügige Auswirkungen auf den restlichen MICOS- und MIB-Komplex, und auch die Cristae-Morphologie bleibt bei Abwesenheit von MIC25 weitgehend unbeeinträchtigt [96].

3.2.4 Der MIC10-Subkomplex

Das Protein MIC10 ist die Kernuntereinheit des MIC10-Subkomplexes. In Hefe besitzt es zwei TMS, wobei sowohl der N-, als auch der C-Terminus in den Intermembranraum hineinragen (Abb. 3). Beide TMS werden dabei durch ein in die Matrix ragendes, positiv geladenes Aminosäuremotiv miteinander verbunden. Dieses ist Voraussetzung für die Lokalisation von Mic10 in der inneren Mitochondrienmembran [12]. Mic10 besitzt außerdem charakteristische, hochkonservierte Glycinreiche Motive in beiden TMS, welche für die Bildung von Mic10-Oligomeren vonnöten sind (Abb. 3) [3]. Der Verlust dieser Glycin-Motive verhindert die Mic10-Oligomerisierung mit der Folge, dass keine Membrankrümmung mehr induziert werden kann. Daraus lässt sich schließen, dass die Mic10-Oligomerisierung Voraussetzung dafür ist, dass Mic10 die Membrankrümmung in den *crista junctions* induzieren kann [8,12]. Die Depletion von Mic/MIC10 führt in Hefen und Säugetieren zur starken Beeinträchtigung der physiologischen Cristae-Morphologie, sowie zur Reduktion der Proteinmengen von QIL1, MIC26 und MIC27. Auf die zum MIC60-Subkomplex gehörenden Proteine MIC19, MIC25 und MIC60 hat die Abwesenheit von MIC10 dagegen keinen Effekt [45,53,57,82,123,131].

In Hefe interagiert Mic10 auch mit dimeren und oligomeren Formen der F_1F_0 -ATP-Synthase [109]. Diese Dimere befinden sich an der Spitze der Cristae, wo sie Membrankrümmung induzieren und somit von großer Bedeutung für eine intakte Cristae-Morphologie sind (Abb. 2) [23,99]. Eine Subpopulation von Mic10, welche sich außerhalb des in den *crista junctions* befindlichen MICOS-Komplexes befindet, ist dazu in der Lage, an die Dimere der F_1F_0 -ATP-Synthase zu binden und so deren Oligomerisierung zu unterstützen. Daraus lässt sich ableiten, dass Mic10, neben seiner zentralen Rolle als Induktor der charakteristischen Membrankrümmung an den *crista junctions*, auch in funktionellem Austausch mit der sich am anderen Ende der Crista befindlichen F_1F_0 -ATP-Synthase steht. Dies unterstreicht seine herausragende Bedeutung für den Erhalt der Cristae-Morphologie [109].

Mic12 in Hefe bzw. QIL1 in Säugetieren ist ein kleines Protein, welches in den *crista junctions* angereichert und dort Teil des MIC10-Subkomplexes ist. Es besitzt ein N-terminales TMS, während seine C-terminale Domäne in den Intermembranraum ragt. Der KO von QIL1 in humanen Zellen führt zur Destabilisierung von MIC10, MIC26 und MIC27 und somit zum fast vollständigen Verlust des gesamten MIC10-Subkomplexes. Gleichzeitig kommt es nach QIL1-Depletion zur Akkumulation eines kleineren Subkomplexes bestehend aus MIC19, MIC25 und MIC60. Zudem führt der QIL1-KO zur Destabilisierung der *crista junctions*, sowie zu Veränderungen der gesamten Cristae-Morphologie. Interessanterweise kann auch die Überexpression von MIC10 die durch QIL1-Depletion

hervorgerufenen Defekte nicht beheben. Aus all diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass QIL1 als Bindeglied zwischen dem MIC10- und MIC60-Subkomplexen fungiert und weiterhin von herausragender Bedeutung für die Integrität des gesamten MICOS-Komplexes und die Stabilität der *crista junctions* ist [47,48].

Sowohl MIC26 als auch MIC27 gehören der Proteinfamilie der Apolipoproteine an. Beide sind Teil des MIC10-Subkomplexes in Mitochondrien, was verdeutlicht, dass die Funktion von Apolipoproteinen nicht nur auf den Transport von Lipiden durch das Blut und lymphatische System beschränkt ist. In Säugetieren werden MIC26 und MIC27 für die Stabilität der *crista junctions* und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie benötigt [75,132]. MIC27 interagiert dabei mit MIC10, MIC60 und SAM50, sowie mit dem wichtigen mitochondrialen Membranlipid Cardiolipin, das an der Entstehung von Membrankrümmungen und der Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie beteiligt ist [62,116]. Letzteres könnte ein Hinweis dafür sein, dass MIC27 für die Interaktion des MICOS-Komplexes mit den Lipiden der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist [132]. MIC26 interagiert mit MIC10, MIC27 und MIC60, und der Gehalt an MIC26 korreliert positiv mit dem von Tafazzin. Bei Tafazzin handelt es sich um ein mitochondriales Enzym, welches entscheidend am Cardiolipin-Stoffwechsel beteiligt ist [117]. Diese und andere Befunde sprechen dafür, dass neben MIC27 auch MIC26 mit Cardiolipin assoziiert ist [75].

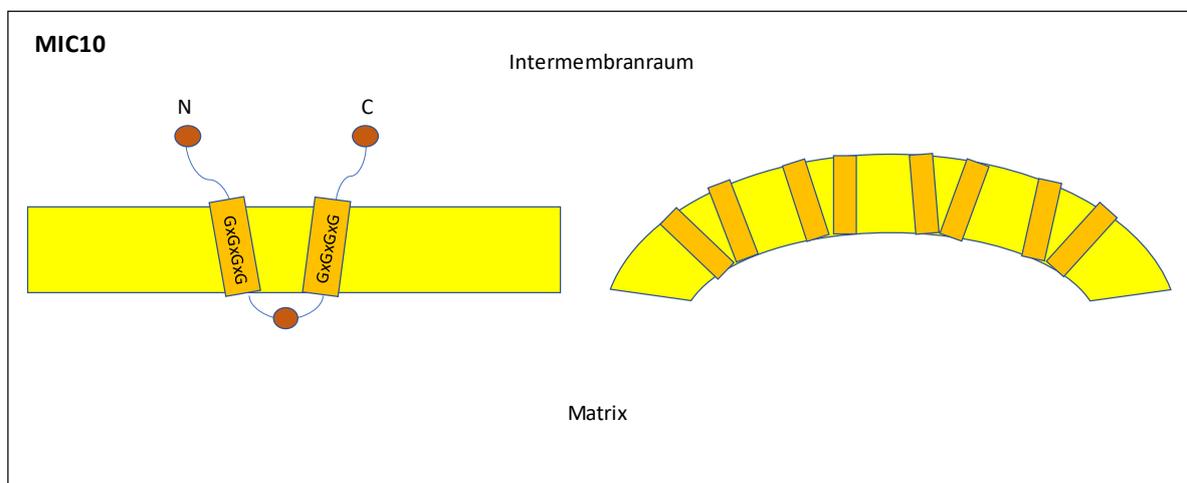


Abbildung 3: Modell MIC10

Abb. 3 Modell MIC10: Das MIC10-Protein besitzt zwei TMS, wobei sowohl der N-, als auch der C-Terminus in den Intermembranraum ragen. Die beiden TMS werden dabei durch ein in die Matrix ragendes, positiv geladenes Aminosäuremotiv miteinander verbunden, was die Voraussetzung für die Verankerung von MIC10 in der inneren Membran ist. Beide Transmembrandomänen verfügen zudem über hochkonservierte Glycin-reiche Motive (z. B. GxGxGxG), welche die MIC10-Oligomerisierung und folglich die Induktion der Membrankrümmung an den *crista junctions* unterstützen.

3.2.5 Entstehung lamellarer und tubulärer Cristae

An Entstehung und Aufrechterhaltung der dynamischen Cristae-Morphologie sind verschiedenste Faktoren beteiligt, wobei der MICOS-Komplex, OPA1, die F_1F_0 -ATP-Synthase, sowie das Phospholipid Cardiolipin als Schlüsselspieler fungieren (Abb. 2) [19]. Die Cristae können dabei verschiedene Phänotypen aufweisen, sodass unter anderem zwischen lamellaren und tubulären Cristae unterschieden werden kann [54].

Obwohl in den vergangenen Jahren große Fortschritte auf dem Gebiet der Erforschung der Cristae-Entstehung gemacht wurden und die an diesem Prozess beteiligten (Membran-) Proteine und Lipide näher charakterisiert werden konnten, ist der genaue Mechanismus der Cristae-Biogenese weiterhin unklar. Wahrscheinlich existieren verschiedene Mechanismen, die spezifisch für die Bildung bestimmter Cristae-Typen sind. Lamellare Cristae könnten dann entstehen, wenn zwei Mitochondrien miteinander fusionieren. Nach Verschmelzung der äußeren Membran führt die Aktivität von OPA1 zur Fusion der inneren Mitochondrienmembran, wobei die typische, sackähnliche Struktur der lamellaren Cristae entsteht. Diese wird durch die Dimerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase stabilisiert, indem sie die Membrankrümmung der Cristae-Ränder induziert. Schließlich wird die Verbindung der neu entstandenen lamellaren Cristae mit der inneren Grenzmembran durch die durch den MICOS-Komplex vorgenommene Entstehung der *crista junctions* sichergestellt. Die Bildung von tubulären Cristae ist dagegen das Ergebnis eines von OPA1 unabhängigen Mechanismus. Dabei kommt es zur Einstülpung der inneren Membran, welche durch die Oligomerisierung der F_1F_0 -ATP-Synthase, sowie den Einstrom des Phospholipids Cardiolipin induziert wird. Auch hierbei führt die von MICOS abhängige Formierung der *crista junctions* zur zusätzlichen Stabilisierung der neu entstandenen tubulären Cristae [19,54,72].

3.3 Teilung und Fusion als Voraussetzung mitochondrialer Dynamik

Mitochondrien bilden untereinander ein hochdynamisches Netzwerk und durchlaufen kontinuierliche Zyklen aus Teilung und Fusion. Eine fein austarierte Balance zwischen beiden Prozessen ist essentiell für die mitochondriale Qualitätskontrolle und für Anpassungsprozesse als Reaktion auf Stress oder metabolische Veränderungen. Dabei unterscheidet sich die mitochondriale Dynamik und in deren Konsequenz auch die Morphologie der Mitochondrien erheblich zwischen verschiedenen Geweben und Zelltypen je nachdem welchen Anforderungen sie entsprechen müssen [36,84]. Mitochondriale Fusion stellt dabei die Verteilung der mtDNA sicher und ist weiterhin mit einer Steigerung der respiratorischen Kapazität assoziiert [80,81,88]. Eine Ausdehnung des mitochondrialen Netzwerkes kann sowohl durch stimulierte Fusion als auch infolge supprimierter Teilung erreicht werden. Durch limitierte Teilung entstandene und aus hyperfusionierten Mitochondrien bestehende Netzwerke sind dazu in der Lage,

diese Organellen vor ihrem Abbau durch Autophagie zu schützen [42,108]. Mitochondriale Teilung ist die Voraussetzung dafür, dass Mitochondrien inklusive ihrer mtDNA während der Mitose korrekt auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden können [87]. Stimulierte Teilung mit sich anschließender, selektiver Fusion ermöglicht außerdem die Isolierung individueller (defekter) Mitochondrienpartikel aus einem bestehenden Netzwerk, welche anschließend durch Mitophagie eliminiert werden können. So ist es möglich, geschädigte Mitochondrien vom Rest des Netzwerkes zu trennen, bevor sie größeren Schaden anrichten können [126]. Veränderungen der mitochondrialen Fusion bzw. Teilung sind mit verschiedenen Krankheiten wie bspw. neurodegenerativen Erkrankungen vergesellschaftet. So konnten in der Vergangenheit Assoziationen zur Alzheimer-Demenz, Parkinson-Krankheit und zu Chorea Huntington festgestellt werden [58,65,110,127]. Dies unterstreicht die herausragende Bedeutung von korrekt ablaufender mitochondrialer Teilung und Fusion, auf deren biochemische Abläufe, sowie die daran beteiligten Schlüsselspieler, im Folgenden näher eingegangen werden soll.

3.4 Mitochondriale Teilung

Die Balance zwischen mitochondrialer Teilung und Fusion wird durch eine Gruppe verschiedener Proteine reguliert, die zur Familie der *dynamin-related proteins* gehören und an der inneren und äußeren Membran lokalisiert sind. Sie enthalten eine hochkonservierte GTPase-Domäne und besitzen die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse, Oligomerisierung und Umgestaltung von Membranen [20,79,84].

An der äußeren Membran wird die mitochondriale Teilung durch das sich normalerweise im Zytosol befindliche *dynamin-related protein 1* (DRP1) dirigiert.

Im Gegensatz zur äußeren Membran ist über die genauen Abläufe bei der Teilung der inneren Mitochondrienmembran wenig bekannt. Dies liegt unter anderem daran, dass bisher kein Schlüsselprotein, wie es das DRP1 für die äußere Membran ist, für die Teilung der inneren Membran identifiziert werden konnte. Daraus ergeben sich zwei verschiedene Theorien, wie die Teilung der inneren Membran vonstattengehen könnte. Erstens besteht die Möglichkeit, dass die Teilungsmaschinerie der äußeren Membran rund um DRP1 zusätzlich auch für die Teilung der inneren Membran verantwortlich ist [34,66,76]. Alternativ könnten aber auch Faktoren der inneren Membran in Mitochondrien existieren, welche in Kontakt mit den an der Teilung der äußeren Membran beteiligten Proteinen stehen und so die Teilung der inneren Membran induzieren [84]. Eines dieser Proteine, die an der Teilung der inneren Membran beteiligt sein könnten, ist die proteolytisch prozessierte Version der GTPase *optic atrophy type 1* (OPA1; s. Kap. 3.5- 3.7), die auch als S-OPA1 für „*short-OPA1*“ bezeichnet wird. So wurde beobachtet, dass an definierten Orten der mitochondrialen Teilung, an denen auch DRP1 nachzuweisen war, ebenfalls S-OPA1 lokalisiert ist [5].

3.5 MFN1, MFN2 und OPA1 als Schlüsselspieler mitochondrialer Fusion

Die vollständige Fusion zweier Mitochondrien erfordert die Verschmelzung der äußeren und in einem zweiten Schritt der inneren Membran. Eine Schlüsselrolle bei der Fusion der äußeren Membran nehmen dabei Mitofusine (MFN) ein. Bei diesen handelt es sich um GTP-bindende Proteine aus der Dynamin-Superfamilie. In Säugetieren sind die Mitofusine MFN1 und MFN2 für die Regulation der Fusion der äußeren Membran verantwortlich. Sie sind in der äußeren Membran lokalisiert (Abb. 4) und besitzen ein TMS, wobei sowohl der N-, als auch der C-Terminus ins Zytosol ragt [113,115]. Es wurde gezeigt, dass die Deletion von MFN1 und/oder MFN2 die mitochondriale Fusion behindert und dass eine erfolgreiche Fusion die Anwesenheit der Mitofusine auf beiden zu verschmelzenden äußeren Membranen erfordert [15,77].

Die Dynamin-ähnliche GTPase OPA1 ist dagegen für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich (Abb. 4), wobei die Anwesenheit von MFN1 in der äußeren Membran die Voraussetzung hierfür ist [10,17,135]. Neben seiner Funktion als wichtiger Faktor mitochondrialer Fusion, ist das Protein OPA1 allerdings auch an diversen anderen Prozessen wie bspw. Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie, mitochondriale Teilung oder Apoptose beteiligt, was es zu einem der Schlüsselspieler innerhalb der Aufrechterhaltung mitochondrialer Funktionen macht [84]. Im Folgenden soll daher der Fokus auf das OPA1-Protein gelegt werden, um ein besseres Verständnis für seine vielfältigen Funktionen zu entwickeln.

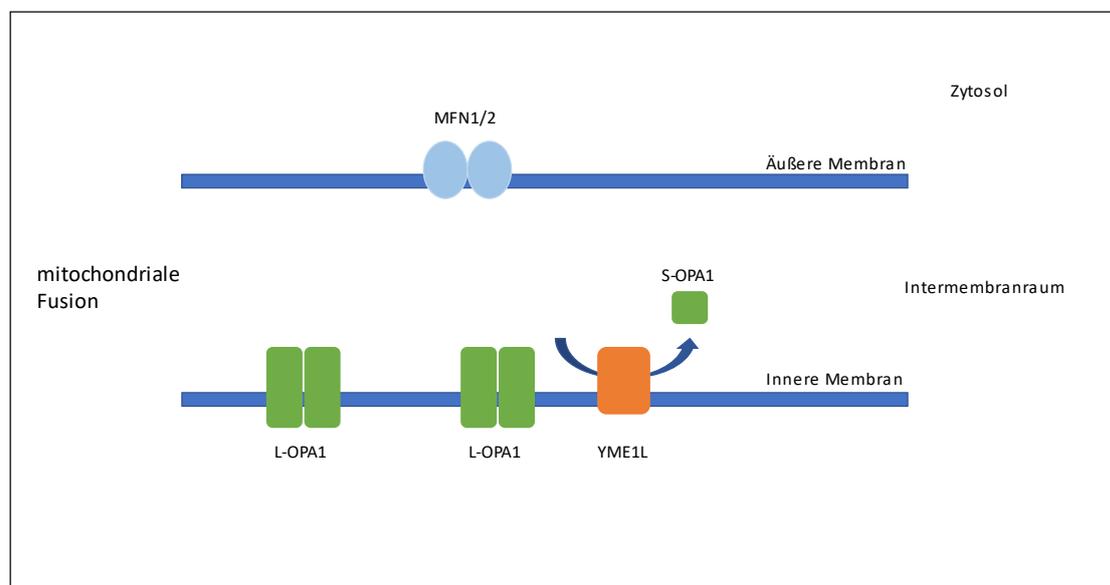


Abbildung 4: Mitochondriale Fusion

Abb. 4 Mitochondriale Fusion: Die in der äußeren Membran lokalisierten Mitofusine MFN1 und MFN2 sind die Hauptfaktoren der Fusion der äußeren Mitochondrienmembran. Schlüsselspieler der Fusion der inneren Membran sind dagegen die langen, in der inneren Membran lokalisierten und nicht prozessierten OPA1-Formen (L-OPA1). Dagegen werden nur basale Spiegel an S-OPA1, welche durch limitierte Prozessierung durch YME1L entstanden sind, für eine erfolgreiche Fusion toleriert.

3.6 Mutationen im OPA1-Gen führen zur „autosomal-dominanten optischen Atrophie“

OPA1 ist ein Akronym für *optic atrophy type 1* und wurde nach seiner genetischen Mutation benannt, welche unter anderem zur „autosomal-dominanten optischen Atrophie“ (ADOA) führt [2]. Diese optische Neuropathie ist durch eine Atrophie retinaler Ganglienzellen mit Verlust von Myelin- und Nervengewebe des Sehnervs gekennzeichnet, sodass es als Konsequenz zum progressiven Verlust der Sehkraft kommt [69]. Tatsächlich wird das OPA1-Protein in sehr großen Mengen in der Retina gebildet, man findet es aber auch weit verbreitet im gesamten Körper. Dies erklärt, warum verschiedene Krankheiten mit einer heterozygoten Mutation im OPA1-Gen assoziiert sind wie bspw. Taubheit, Parkinsonismus oder Demenz [14]. Die einzige homozygote OPA1-Mutation, die bisher identifiziert werden konnte, führte zur *early-onset* Enzephalomyopathie, hypertrophen Kardiomyopathie sowie dem Tod bereits im frühesten Kleinkindalter [122]. Sowohl in Mäusen als auch beim Menschen führen Mutationen im OPA1-Gen unter anderem zu einer gestörten Cristae-Struktur, mitochondrialer Fragmentierung, mtDNA-Instabilität, Reduktion mitochondrialer Respiration sowie einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [1,16,24]. Dies unterstreicht die klinische Relevanz des OPA1-Proteins, auf dessen Biosynthese und Prozessierung im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll.

3.7 Biosynthese und Prozessierung von OPA1

Das humane OPA1-Protein wurde im Jahre 2000 als Homolog des Dynamamin-ähnlichen Proteins *mitochondrial genome maintenance 1* (Mgm1) in Hefe entdeckt [26]. Es besitzt eine konservierte GTP-Bindungsdomäne, eine GTP-Effektor-Domäne, sowie eine N-terminale Transmembrandomäne, welche das Protein in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Dabei ragt die GTPase-Domäne in den Intermembranraum [45,51].

Da es sich bei OPA1 um ein kerncodiertes Protein handelt, muss es nach der Proteinbiosynthese im Zytosol erst noch ins Mitochondrium transportiert werden, um dort seinen vielfältigen Aufgaben nachgehen zu können. Hierfür besitzt das Vorläuferprotein zusätzlich noch eine N-terminale *mitochondrial targeting sequence* (MTS), die das Protein für den Import ins Mitochondrium kennzeichnet. Angekommen im Mitochondrium wird diese MTS des Vorläuferproteins durch die *mitochondrial processing peptidase* (MPP) entfernt und OPA1 anschließend in der inneren Mitochondrienmembran verankert (Abb. 5). Die Verankerung des OPA1-Proteins in der cardiolipinhaltigen Membran erfolgt dabei mithilfe einer lipidbindenden Paddle-Domäne. Dabei dringt eine konservierte Schleife innerhalb dieser Paddle-Domäne tief in die Doppelschicht ein und unterstützt so die Wechselwirkung von OPA1 mit Cardiolipin-enthaltenden Membranen [130].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben dabei zeigen können, dass OPA1 sowohl in den Cristae, als auch der inneren Grenzmembran und den *crista junctions* lokalisiert ist [9,129].

Aus alternativem *Splicing* von 3 der insgesamt 30 OPA1-Exons (Exon 4, 4b und 5b) resultieren acht verschiedene OPA1-mRNA-Isoformen im Menschen (Abb. 5). Dabei wird vermutet, dass Isoformen, welche das Exon 4 enthalten (1, 5, 7, 8) an mitochondrialer Fusion und Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt sind. Exon 5b enthaltende Isoformen (4, 6, 7, 8) sind dagegen an der Dichthaltung der *crista junctions* beteiligt, um die Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae-Speichern zu verhindern, wohingegen die Exon 4b enthaltenden OPA1-Isoformen (3, 5, 6, 8) an der Aufrechterhaltung der mtDNA mitwirken (Abb. 5) [25,27,93]. Nach Prozessierung durch die MPP können die membrangebundenen, langen OPA1-Formen (L-OPA1) an zwei definierten Schnittstellen, die als S1 und S2 bezeichnet werden, weiter prozessiert werden, um kurze, lösliche OPA1-Formen (S-OPA1) zu generieren [56,63]. Im Menschen besitzt jede der insgesamt acht L-OPA1-Isoformen eine S1-Schnittstelle, welche von Exon 5 codiert wird und die Hälfte zusätzlich noch eine S2-Schnittstelle (4, 6, 7, 8), deren korrespondierende DNA-Sequenz auf Exon 5b lokalisiert ist (Abb. 5) [25,63,93,121]. Dabei wird die Prozessierung an S1 und S2 durch zwei Proteasen des Intermembranraums durchgeführt. Die Prozessierung an S1 wird durch die Metalloprotease OMA1 vorgenommen, während die Protease YME1L OPA1 an S2 prozessiert (Abb. 5) [55,121].

Von der Malsburg et al., 2023 gelang es, einen Mechanismus für die durch OPA1-vermittelte Fusion der inneren Mitochondrienmembran aufzudecken: So fanden sie heraus, dass membrangebundene L-OPA1-Moleküle den Membranumbau initiieren und lösliches S-OPA1 zum Ort der Fusion rekrutieren. Letztere polymerisieren zu einem flexiblen zylindrischen Gerüst, welches die innere Membran umschließt. Die Dimerisierung der Paddle-Domäne stellt wiederum die Energie zur Verfügung, welche für die Umgestaltung der inneren Membran hin zu einer tubulären Form mit moderater Krümmung benötigt wird. Weitere Konformitätsänderungen der OPA1-Oligomere führen schließlich dazu, dass es zur Extraktion der konservierten Schleife, welche die Paddle-Domäne normalerweise tief in der Membran verankert, aus der cardiolipinhaltigen Membran kommt. Hierdurch wird zusätzlicher Krümmungsstress erzeugt, der in Summe zu einer instabilen, fusionsanfälligen inneren Membran führt. In der Folge kommt es zu einer weiteren tubulären Verformung, sodass sich der Abstand der beiden miteinander zu verschmelzenden Membranen verringert, was schließlich in einer Verschmelzung der beiden hochgekrümmten Membranen resultiert [130].

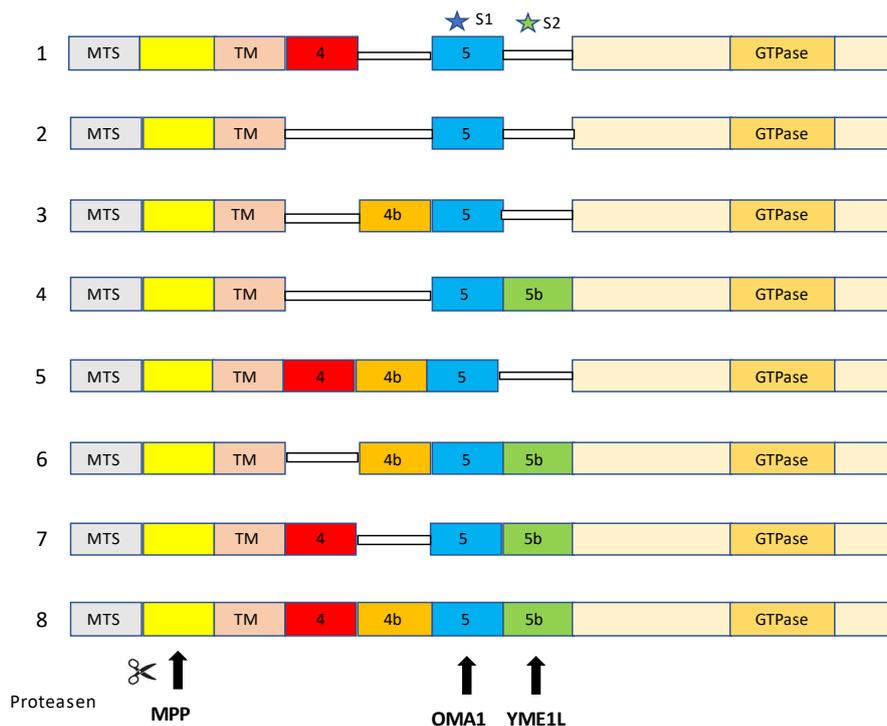


Abbildung 5: Biosynthese und Prozessierung von OPA1

Abb. 5 Biosynthese und Prozessierung von OPA1: Als Ergebnis alternativen *Splicings* von 3 der 30 OPA1-Exons (4, 4b, 5b) resultieren acht verschiedene OPA1-Isoformen. Alle 8 Isoformen besitzen dabei die Schnittstelle S1, welche von Exon 5 codiert wird. Die Isoformen 4, 6, 7 und 8 besitzen darüber hinaus zusätzlich die S2-Schnittstelle, deren korrespondierende DNA-Sequenz auf Exon 5b lokalisiert ist. Durch Prozessierung von L-OPA1 durch OMA1 an S1 und YME1L an S2 entsteht S-OPA1. Das Vorläuferprotein besitzt zudem eine MTS, um es für den Import ins Mitochondrium zu kennzeichnen. Dort angekommen, wird diese von der MPP abgespalten und L-OPA1 kann in die innere Membran eingebaut werden.

MPP: *mitochondrial processing peptidase*, MTS: *mitochondrial targeting sequence*, TM: Transmembranomäne

3.8 YME1L, OMA1 und ihr Einfluss auf die OPA1-Prozessierung

Eine gewisse Menge an S-OPA1 wird durch Prozessierung von L-OPA1 an der S2-Schnittstelle erzeugt, sodass es unter basalen Bedingungen zu einem definierten Gleichgewicht zwischen langen und kurzen OPA1-Isoformen kommt [39,45]. Wie bereits erwähnt, ist die ATP-abhängige i-AAA-Protease *yeast mitochondrial DNA escape 1-like* (YME1L) für die proteolytische Prozessierung an der S2-Schnittstelle verantwortlich [121]. YME1L ist in der inneren Mitochondrienmembran verankert, wobei ihr katalytisches Zentrum in den Intermembranraum ragt [6]. Relativ wenig ist dabei darüber bekannt, wie die durch YME1L vorgenommene OPA1-Prozessierung an S2 reguliert wird, auch wenn gezeigt werden konnte, dass sie sich durch einen Anstieg der oxidativen Phosphorylierung steigern lässt [87]. Die ATP-unabhängige *overlapping with m-AAA-Protease* (OMA1) wurde dagegen als Stress-sensitive Metalloprotease identifiziert, die L-OPA1 an der S1-Schnittstelle proteolytisch prozessiert. Sie ist ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, wobei ihr C-terminal gelegenes katalytisches Zentrum in Richtung Intermembranraum orientiert ist, während ihre N-terminale Domäne

in die mitochondriale Matrix ragt. Dort spielt dieser zur Matrix hin orientierte Teil eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung von Veränderungen des Membranpotentials [7,70]. OMA1 agiert in enger Kooperation mit YME1L, indem es unter basalen Bedingungen für ein Equilibrium bestehend aus langen und kurzen OPA1-Isoformen sorgt (Abb. 6 und 8). Stressaktiviert führt OMA1 zur kompletten OPA1-Cleavage und somit zur Entstehung ausschließlich kurzer OPA1-Isoformen, die sich frei im Intermembranraum befinden (Abb. 6, 7 und 8). So konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Inhibitoren der Atmungskette wie Valinomycin, Oligomycin oder der Entkoppler Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon (CCCP) zur Verlagerung des Gleichgewichts hin zu S-OPA1 führen, während der *Knockdown* von OMA1 dazu in der Lage ist die CCCP-induzierte L-OPA1-Prozessierung zu verhindern [30,46,49,55]. Neben mitochondrialer Depolarisierung können auch Hitze sowie oxidativer Stress eine verstärkte OMA1-Aktivierung zur Folge haben (Abb. 8) [7]. Dabei wird OMA1 nach seiner Aktivierung am C-Terminus autokatalytisch gespalten, sodass eine kürzere OMA1-Form (S-OMA1) entsteht (Abb. 7). Diese ist die eigentlich aktive OMA1-Form, welche dazu in der Lage ist, L-OPA1 an S1 zu prozessieren (Abb. 7). Dabei ist S-OMA1 deutlich instabiler als die lange, inaktive OMA1-Form (L-OMA1), lässt sich aber durch andauernde Membrandepolarisierung stabilisieren [7,138]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass S-OMA1 durch die Protease YME1L abgebaut wird, unter der Voraussetzung, dass ausreichend hohe ATP-Spiegel vorhanden sind (Abb. 7). Membrandepolarisierung und ein verminderter zellulärer ATP-Gehalt führen dagegen zur Degradierung von YME1L mit der Folge, dass die aktive S-OMA1-Form stabilisiert wird. Somit bleibt festzuhalten, dass der reziproke proteolytische Abbau von S-OMA1 und YME1L zur variablen OPA1-Prozessierung in Abhängigkeit von aktuellen metabolischen Gegebenheiten führt [71].

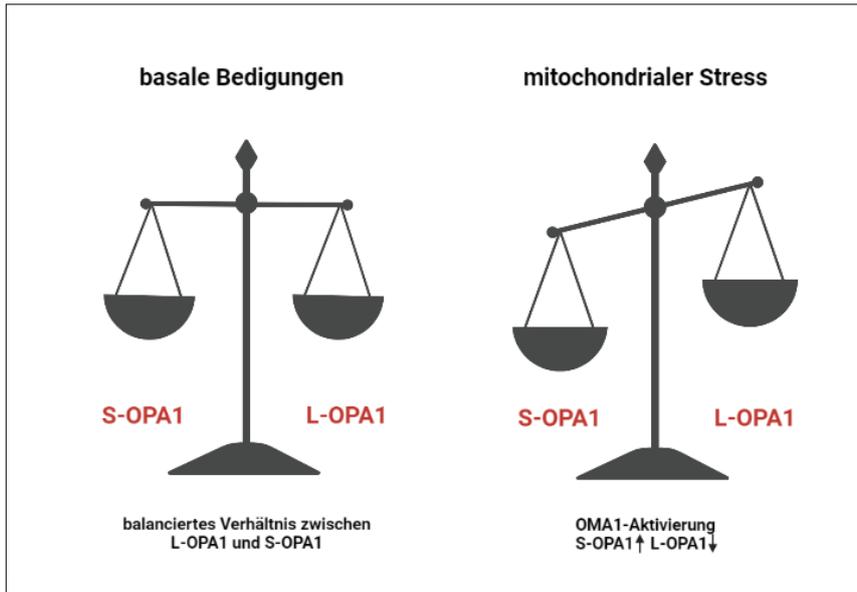


Abbildung 6: OPA1-Prozessierung unter basalen Bedingungen und mitochondrialem Stress

Abb. 6 OPA1-Prozessierung unter basalen Bedingungen und mitochondrialem Stress: Unter basalen Bedingungen sorgt die Aktivität von YME1L an S2 für ein Equilibrium aus langen und kurzen OPA1-Formen. Stressinduzierte OMA1-Aktivierung führt dagegen zur massiven Prozessierung von L-OPA1 an S1, mit der Folge, dass sich das Verhältnis zwischen langen und kurzen OPA1-Formen verschiebt und es zu einem Übergewicht von S-OPA1 kommt

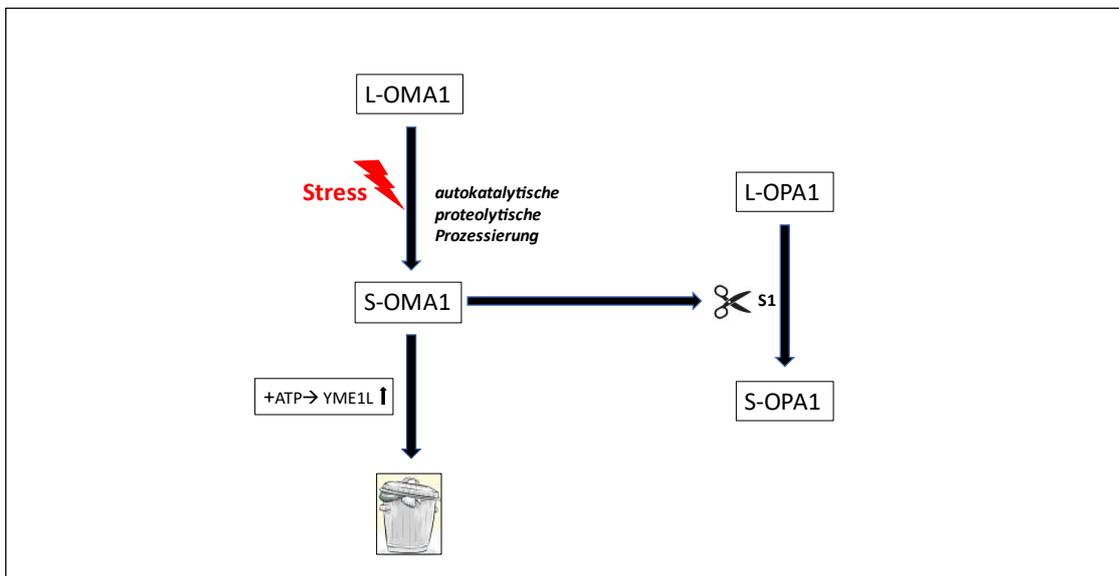


Abbildung 7: Prozessierung von L-OPA1 durch aktive Metalloprotease OMA1

Abb. 7 Prozessierung von L-OPA1 durch aktive Metalloprotease OMA1: Stressinduzierte, autokatalytische proteolytische Prozessierung von L-OMA1 führt zur Entstehung von S-OMA1. Diese aktive OMA1-Form schneidet L-OPA1 an S1, sodass S-OPA1 entsteht. S-OMA1 ist dabei sehr instabil und wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP durch YME1L abgebaut.

3.9 Limitierung mitochondrialer Fusion durch OPA1-Prozessierung

Wie bereits erwähnt, ist mitochondriale Fusion und Teilung eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung mitochondrialer Dynamik in Abhängigkeit von den aktuell vorherrschenden metabolischen Gegebenheiten. Dabei ist OPA1 sowohl an der Fusion als auch der Teilung von Mitochondrien beteiligt, was auf den ersten Blick paradox erscheinen mag. Die Prozessierung von L-OPA1 ist dabei entscheidend für die Balance zwischen mitochondrialer Fusion und Teilung. So kann durch Deletion von OMA1 die proteolytische Prozessierung von L-OPA1 an S1 verhindert werden und als Konsequenz ein verlängertes und stark verzweigtes mitochondriales Netzwerk entstehen [5,106]. Weiterhin behalten Mitochondrien die Fähigkeit zur Fusion, trotz des Fehlens von YME1L und/oder OMA1 [5,114]. Dies verdeutlicht, dass die Prozessierung von L-OPA1 entbehrlich für mitochondriale Fusion ist. Die Re-Expression von S-OPA1 in *mouse embryo fibroblasts* (MEFs), denen YME1L und OMA1 fehlt, führt dagegen zur Fragmentierung von Mitochondrien, genauso wie die Überexpression von S-OPA1 in Wildtyp-Zellen. Dies kann als Hinweis für gesteigerte mitochondriale Teilung gewertet werden [5,63]. Zudem konnte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden, dass S-OPA1 an definierten Orten mitochondrialer Teilung gemeinsam mit Schlüsselspielern mitochondrialer Teilung der äußeren Membran wie DRP1 lokalisiert ist [5]. Aus all diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die langen OPA1-Formen vor allem für mitochondriale Fusion verantwortlich sind, während die kurzen, prozessierten OPA1-Formen entscheidend für die Teilung von Mitochondrien sind und dass die durch OMA1 und YME1L vorgenommene L-OPA1-Prozessierung der limitierende Faktor für mitochondriale Fusion ist (Abb. 4 und 5) [5,84].

3.10 OPA1 und seine regulierende Funktion auf Apoptose

Apoptotische Zellen zeigen dramatische Veränderungen ihrer mitochondrialen Morphologie und Cristae-Struktur. So konnte gezeigt werden, dass die DRP1-abhängige mitochondriale Teilung, sowie Veränderungen der Cristae-Struktur zur erleichterten Freisetzung pro-apoptotischer Proteine wie Cytochrom c, aus den Cristae ins Zytosol führen und somit die apoptotische Kaskade ins Rollen bringen [103,124]. OPA1 ist an der Fusion der inneren Mitochondrienmembran, ebenso wie an der Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie beteiligt und übt somit zwei voneinander unabhängige Funktionen aus, welche die Zelle vor dem Tod durch Apoptose schützt (Abb. 8). Dabei ist die Anwesenheit von OPA1-Oligomeren entscheidend für die Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie und somit für die Tatsache, dass sich Cytochrom c unter basalen Bedingungen fast ausschließlich in den Cristae befindet [32]. Die Oligomerisierung von OPA1 wird unter anderem in Abhängigkeit von den aktuell vorherrschenden metabolischen Anforderungen der Zelle reguliert. So konnte gezeigt werden, dass die OPA1-Oligomerisierung bei Mangelernährung der Zelle stimuliert wird mit der Intention, die Zelle vor dem Tod zu bewahren [98].

Die Aktivierung der pro-apoptischen, zur Bcl-2-Familie gehörenden Proteine Bax und Bak an der äußeren Mitochondrienmembran, ebenso wie die mitochondriale Rekrutierung des BH3-Proteins Bid, führen dagegen zur Destabilisierung der OPA1-Oligomere. Daraus resultiert eine Störung der Cristae-Struktur mit der Folge, dass es zur Cytochrom c-Freisetzung aus den Cristae-Speichern ins Zytosol kommt [32,103,136]. Die gänzliche Abwesenheit von OPA1 führt ebenfalls zur Fragmentierung der Mitochondrien, sowie zur starken Störung der Cristae-Struktur, welche die Freisetzung von Cytochrom c zur Folge hat [92]. Somit bleibt festzuhalten, dass OPA1 einen starken regulatorischen Einfluss auf die Cristae-Morphologie im Allgemeinen, sowie auf die Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae ins Zytosol und damit die Einleitung der apoptotischen Kaskade hat. Welche Rolle die Prozessierung von OPA1 dabei spielt, soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

3.11 Anhaltende OPA1-Prozessierung durch OMA1 führt zur Apoptose

Der durch OMA1-Aktivierung hervorgerufene Verlust von L-OPA1 mit einer daraus resultierenden Akkumulation von S-OPA1 führt zur mitochondrialen Fragmentierung. Dabei ist eine transiente OMA1-Aktivierung dazu in der Lage, das Zellüberleben zu unterstützen, indem Fragmentierung die kontinuierliche mitochondriale Erneuerung durch Mitophagie unterstützt. Andauernde OMA1-Aktivierung führt dagegen zu exzessiver mitochondrialer Fragmentierung, gestörter Cristae-Morphologie und schließlich zum Zelltod (Abb. 8) [5,55,67]. Die durch apoptotische Stimuli hervorgerufene Oligomerisierung von Bax bzw. Bak an der äußeren Mitochondrienmembran ist dazu in der Lage OMA1 zu aktivieren. Dies wiederum hat eine verstärkte Prozessierung von L-OPA1 an S1 zur Folge, sodass vermehrt S-OPA1 entsteht. Die daraus resultierende Veränderung der Cristae-Morphologie führt schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae-Speichern ins Zytosol, welche zusätzlich noch dadurch erleichtert wird, dass die Oligomerisierung von Bax bzw. Bak, neben der Aktivierung von OMA1, auch zur verstärkten Durchlässigkeit der äußeren Membran führt [67]. Die Beobachtung, dass OMA1 offenbar eine pro-apoptische Funktion ausübt, wird durch die Tatsache untermauert, dass der *Knockout* von OMA1 die Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol zu verhindern vermag und die jeweiligen Zellen eine verstärkte Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli aufweisen [5,67,106]. Die besondere Bedeutung mitochondrialer Teilung und Fragmentierung für die Einleitung des Zelltodes wird zudem dadurch unterstrichen, dass neben der OPA1-Prozessierung via OMA1 auch Schlüsselspieler dieser Prozesse wie DRP1 für apoptotische Cristae-Veränderungen erforderlich sind [37,94]. Interessanterweise kann die durch OMA1 vorgenommene, verstärkte Prozessierung von OPA1 neben dem apoptotischen auch nekrotischen Zelltod induzieren, wie Untersuchungen an retinalen Zellen gezeigt haben, welche dem Ischämie/-Reperfusionssyndrom ausgesetzt waren [125].

Somit bleibt festzuhalten, dass eine exzessive OPA1-Prozessierung dazu in der Lage ist, sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelltod zu induzieren (Abb. 8) und diesem durch OMA1-Suppression mit daraus resultierendem stabilisiertem L-OPA1-Gehalt vorgebeugt werden kann.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von OMA1 zusätzlich zu den beschriebenen Veränderungen auf lokaler, mitochondrialer Ebene, auch eine Stressantwort auf globaler zellulärer Ebene induzieren kann. Dies geschieht, indem OMA1 den *DAP3-binding cell death enhancer 1* (DELE1) schneidet, wodurch dessen mitochondrialer Import beschränkt wird und das Protein im Zytosol akkumuliert. Dort ist DELE1 dazu in der Lage, die *integrated stress response* (ISR) auszulösen. Beim ISR handelt es sich um ein breit angelegtes Transkriptionsprogramm, welches als Reaktion auf mitochondriale Dysfunktion ausgelöst wird. Es umfasst dabei unter anderem die Hemmung der Proteinsynthese, eine verbesserte oxidative Abwehr, sowie die metabolische Umstellung der Zelle [112,120].

In Zusammenschau aller Befunde kann festgehalten werden, dass OMA1, sowohl pro-apoptische als auch das Zellüberleben sichernde Funktionen ausüben kann. Die besondere Rolle, die OMA1 einnimmt, macht sie zu einem potenziellen therapeutischen Angriffspunkt bei bspw. Brustkrebs, da in Studien gezeigt werden konnte, dass OMA1 unter anderem dazu in der Lage ist, sowohl die Aggressivität als auch das Metastasierungspotential von Brustkrebszellen zu vermindern [27].

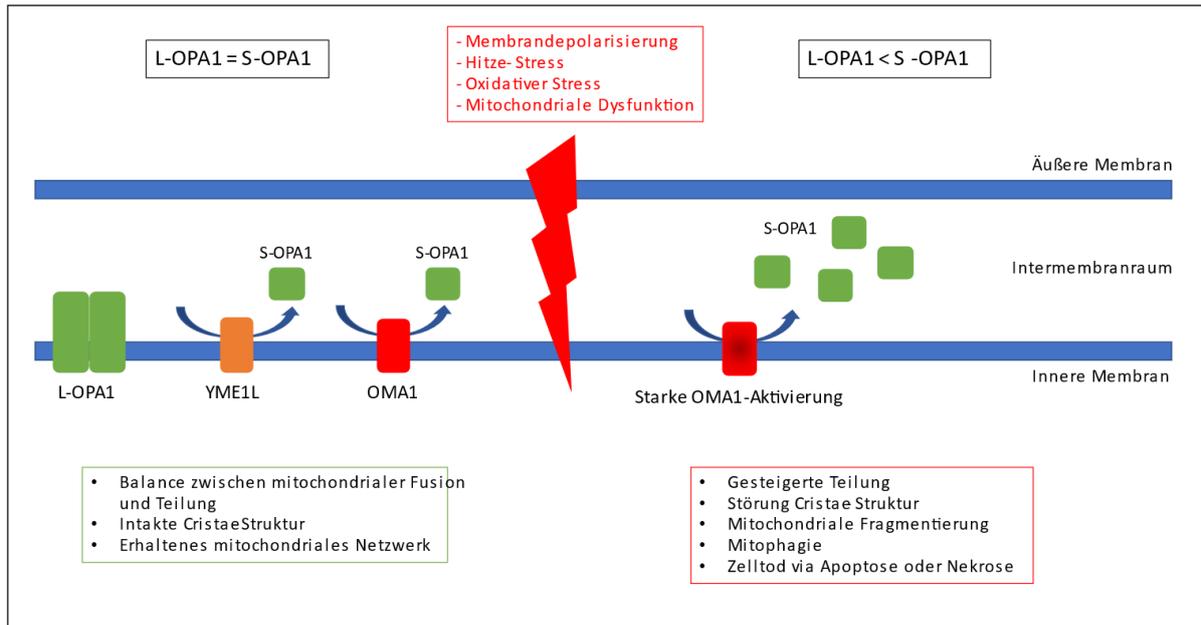


Abbildung 8: Verschiedene Funktionen von OPA1

Abb. 8 Verschiedene Funktionen von OPA1: In gesunden Mitochondrien existiert ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung und die Anwesenheit von OPA1-Oligomeren führt zur Aufrechterhaltung einer intakten Cristae-Struktur, sowie dem Erhalt des mitochondrialen Netzwerkes. Demgegenüber führen diverse Stressoren zur starken Aktivierung von OMA1 mit der Folge, dass es zum Verlust der OPA1-Oligomere kommt und L-OPA1 zu S-OPA1 prozessiert wird. Als Konsequenz kommt es zur gesteigerten mitochondrialen Teilung und bei länger andauerndem Stress zur Störung der Cristae-Struktur, mitochondrialer Fragmentierung, Mitophagie und schließlich gar zum Zelltod via Apoptose oder Nekrose.

3.12 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten im Detail beschrieben, sind sowohl MICOS als auch OPA1 Schlüsselspieler bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie und damit der mitochondrialen Dynamik. Dennoch sind nach wie vor viele Fragen zu dieser Thematik offen. Insbesondere aufgrund der großen klinischen Relevanz werden dringend Informationen darüber benötigt, wie das Wechselspiel von MICOS und OPA1 die Cristae-Biogenese und -Dynamik beeinflusst.

Um einen wissenschaftlichen Beitrag zu diesem Thema zu leisten, beschloss ich, dieses Wechselspiel zwischen MICOS und OPA1 genauer zu untersuchen und dessen Auswirkungen auf die mitochondriale Dynamik zu erforschen. Dabei suchte ich sowohl nach direkten Wechselwirkungen als auch nach Reaktionen aufseiten des einem Partners, wenn man den anderen Partner verändert.

4. Material & Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

1.000 µl Pipette	Brandt, Transferpipette S
2,5 µl Pipette	Brandt, Transferpipette S
20 µl Pipette	Brandt, Transferpipette S
200 µl Pipette	Brandt, Transferpipette S
Absaugpumpe Zellkultur	neoLab Migge GmbH Heidelberg, Vacuum-aspiration system (D-9330)
Anlage Destilliertes Wasser	Merck Millipore
Autoklav	HP-Medizintechnik GmbH, VARIOKLAV Dampfsterilisator, Baujahre 1994 und 2017
Blot-Apparatur	Thermo Scientific™ Owl™ HEP-1
BN-Apparatur	Serva, SE600X Chroma Deluxe Dual- gekühlt
BN-Gradientenmischer	Hoefer SG30 Gradient Maker
Peristaltikpumpe	Gilson minipuls 3
BN-Umwälzpumpe	Fisher Scientific, Fisherbrand™ Isotemp™ Heated Immersion Circulators: Model 4100C
Eismaschine	Scotsman, AF124
Elektrische Pipetierhilfe	Brandt, Accu-jet® pro
Feinwaage	KERN ALJ
Gradientengel-Kasten	Thermo Fisher Scientific, invitrogen, Mini Gel Tank
Heizblock	Eppendorf ThermoMixer C
Imager	Amersham Imager 600
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, HERACELL 150i CO2 Incubator
Kipprollen-Mischer	PHOENIX Instrument RS-TR05
Kipptisch	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH (#60281-00)
Magnetrührer	Heidolph MR 3001
Mikroskop Zellkultur	Leica, DMi1
pH-Meter	inoLab pH7110

Plate Reader	TECAN, Spark 10 M multimode microplate reader
Potter-Elvehjem Homogenisator (5 ml)	Hartenstein Laborbedarf
Power supplies	PowerPRO 300
Power supplies BN	Consort, EV2650
SDS-PAGE-Apparatur	Bio Rad, Mini Protean II
Seahorse	Agilent, Seahorse XFe96 Analyzer
Sterilbank Zellkultur	Thermo Fisher Scientific, SAFE 2020
Tiefkühler -80 °C	Eppendorf, Hamburg, CryoCube, FC660h
Vortexer	Scientific Industries SI™ Vortex-Genie™ 2
Waage Chemikalienraum	KERN PCB
Waage Labor	Mettler PM600
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, IsotempnGPD 20
Zentrifuge Labor	Eppendorf Centrifuge 5424 R
Zentrifuge Zellkultur	Thermo Fisher Scientific (#75004230)
Zellzähler Countess	Thermo Fisher Scientific

4.1.2 Verbrauchsmaterial

1.000 µl Pipettenspitzen	Starlab (#S1111-6701)
10 µl Pipettenspitzen	Starlab (#S1111-3700)
10 cm Zellkulturschalen	Greiner bio-one (#664160)
15 cm Zellkulturschalen	Greiner bio-one (#639160)
200 µl Pipettenspitzen	Starlab (#S1113-1706)
48-Well-Platten	Greiner bio-one (#677180)
6-Well-Platten	Greiner bio-one (#657160)
96-Well-Platten	Greiner bio-one (#655086)
Alufolie	Roth (#AA77.1)
Columns IP	MoBiTec, Mobicol „F“ (#M105135F)
ECL-Entwicklerlösung Western Blot	Thermo Scientific SuperSignal West Pico PLUS
Entsorgungsbeutel	Roth (#E706.1)
Filter Tip 1.000 µl	Starlab (#S1126-7810)
Filter Tip 20 µl	Starlab (#S1123-1810)
Filter Tip 200 µl	Starlab (#S1120-8810)

Gelbeladespitzen	Starab, Gel-Saver II Tip-1, 200 μ , Bulk
Gradientengele 4-12% Bis-Tris Plus	Thermo Fisher Scientific, invitrogen (#NW04125BOX)
Handschuhe, Größe M	Starlab (#SG-N-M)
Handschuhe, Größe M	Star-Lab, StarGuard Sensitive, Nitril Gloves
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner bio-one (#122263)
Labortücher	LABSOLUTE (#7695251)
Parafilm®	Parafilm® (#PM-996)
PVDF-Membran	Merck Millipore (#IPVH00010)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt (#72.690.001)
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt (#72.691)
Serologische Pipette 10 ml	SARSTEDT (#86.1685.001)
Serologische Pipette 25 ml	SARSTEDT (#86.1254.001)
Serologische Pipette 2 ml	Fisherbrand (#136753C)
Serologische Pipette 3,5 ml	SARSTEDT (#86.1171)
Serologische Pipette 5 ml	SARSTEDT (#86.1253.001)
Skalpell	Braun, Chirurgische Einmal-Skalpelle
Transfermembran SDS	Merck Millipore (#IPVH85R)
Whatman-Papier	Blotting-Papier MN218B, Macherey-Nagel
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner bio-one (#188271)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner bio-one (#227261)

4.1.3 Chemikalien

2. AK Hase	Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, HRP conjugate: AP187P; Sigma-Aldrich
2. AK Maus	Goat Anti-Mouse IgG, Fc, HRP conjugate: AP127P; Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, M-3148
3X FLAG® Peptid	Sigma-Aldrich (#F4799)
Uridin	Sigma-Aldrich (#U3003-5G)
6-Aminocaproic acid	Sigma-Aldrich (#A7824-100G)
Aceton	Fisher Scientific (#67-64-1)
Acrylamid	Roth (#3029.2)
Anti-FLAG® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (#A2220-5ML)
Bambanker	Nippongenetics (#BB02)

Bis-Tris	Roth (#9140.3)
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche (#04693132001)
Coomassie G	Serva, Coomassie Brilliant Blue G 250, (#17524.02)
Digitonin	Matrix BioScience (#60105)
DMEM (1x)	Thermo-Fisher Scientific, gibco (#41966029)
DMSO	Roth (#A994.2)
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth (#6908.2)
EDTA	Roth (#8043.2)
Essigsäure	Chemsolute, Art.-Nr. 2289.2500
Ethanol	ZChL UdS, 702543
FCCP	Abcam (#120081)
Fetales Rinderserum (FCS)	Gibco (#10270-106)
Glycerol	Sigma-Aldrich (#G7757-1L)
Glycin	Roth (#3908.3)
HEPES	Roth (#9105.3)
Isopropanol/2-Propanol	Sigma-Aldrich (#34863-2.5L)
Lipofectamine® RNAiMAX Reagenz	Thermo-Fisher Scientific, invitrogen (#13778)
MES	Roth (#4256.4)
Methanol	ZChL UdS, 701224
Milchpulver	Sucofin, Skimmed Milk Powder, easily soluble
MOPS	Roth (#6979.3)
Opti-MEM® Medium	Thermo-Fisher Scientific, gibco (#31985062)
PBS pH 7,2 (1x)	Thermo-Fisher Scientific, gibco (#20012-019)
PMSF	Roth (#6367.2)
Proteinmarker BN	Amersham, HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis, 17044501
Proteinmarker SDS	Thermo-Fisher Scientific, PageRuler Protein Ladder (#26619)
Proteinstandard IgG	Bio-Rad Protein Assay Standard I (#500-0005)
Roti®-Quant, 5x Konzentrat	Roth (#K015.1)
Rotiphorese® Gel30 (Acrylamid SDS-Gel)	Roth (#3029.1)
SDS, ultra pure	Roth (#2326.2)
siRNA Kontrolle	Qiagen (#1027281)
siRNA OPA1	Qiagen (#1027416)
Sucrose	Serva (#35579)
TCA	Sigma-Aldrich
TEMED	Roth (#2367.1)

Tricin	Roth (#6977.5)
Tris	Roth (#5429.2)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (#9002-93-1)
Trypsin-EDTA (0,05%)	Thermo-Fisher Scientific, gibco (#25300-054)
Tween 20	Roth (#9127.2)
Blaues Trypsin (Zellzählung) Trypanblau (Trypan Blue stain 0,4%)	Thermo-Fisher Scientific, invitrogen (#T10282)
EDTA	Roth (#8043.2)

4.1.4 Antikörper

Antikörper	Ursprung/Hersteller	Bestellnummer/Hasen-Nummer	Verdünnung	2.AK Maus/Hase
Alpha-Tubulin	Abcam	ab7291	1:500	Maus
HSPA9	Abcam	ab227215	1:500	Hase
MIC10	AG van der Laan	5032	1:500	Hase
MIC19	Sigma	HPA042935	1:500	Hase
MIC25	Sigma	HPA051975	1:500	Hase
MIC26	Sigma	HPA003187	1:500	Hase
MIC27	Sigma	HPA000612	1:500	Hase
MIC60	AG van der Laan	5041/5042	1:500	Hase
OMA1	Santa Cruz	sc-515788	1:500	Maus
OPA1	BD Biosciences	612607	1:500	Maus
QIL1	AG van der Laan	5037/5033	1:500	Hase
SAM50	Abcam	ab246987	1:500	Hase
TOM40	Abcam	ab185543	1:500	Hase
Total OXPHOS	Abcam	ab110413	1:500	Maus
YME1L1	Proteintech	11510-1-AP	1:500	Hase

4.1.5 Zelllinien

Bei den von mir verwendeten Zelllinien handelt es sich um HEK293T sowie HeLa.

HEK293, ein Akronym für *human embryonic kidney*-Zellen, ist eine permanente Zelllinie, die von embryonalen Nierenzellen abstammt. Diese wurden 1973 mit DNA von Adenovirus 5 transfiziert, sodass ein etwa 4,3 kB (Kilobasen) großes DNA-Fragment des Adenovirus-Genoms in Chromosom 19 integriert wurde. Die von mir verwendeten HEK293T-Zellen wiederum sind eine Variante dieser HEK293-Zellen, die zusätzlich noch das *SV40 large T-Antigen* exprimieren. Vorteile der Zelllinie HEK293 sind unter anderem, dass sie alle humanen posttranslationalen Modifikationen besitzen und weiterhin eine hohe Teilungsrate aufweisen, was sie ideal für die Arbeit im Labor macht [2].

Bei der zweiten von mir verwendeten Zelllinie handelt es sich um HeLa-Zellen. Diese verdanken ihren Namen der damals 30-jährigen Henrietta Lacks, die 1951 an den Folgen ihres aggressiven Adenokarzinoms der Cervix verstorben ist. Aus Gewebeproben ihres Cervixkarzinoms gelang es schließlich, die erste humane Zelllinie der Welt zu etablieren [3]. Ebenso wie HEK293T, besitzen HeLa-Zellen eine hohe Teilungsrate, wodurch sie sich schnell vermehren und somit optimal für Forschungszwecke verwendet werden können.

Die von mir verwendeten, unten aufgelisteten Zelllinien, wurden von Dr. Alexander von der Malsburg mithilfe CRISPR/CAS-9 erzeugt und mir von ihm und Prof. Dr. Martin van der Laan freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien

HEK293T, Wildtyp
HEK293T, Δ MIC10 Klon 6
HEK293T, Δ MIC60 Klon 22
HEK293T, Δ MIC10-MIC10-FLAG
HEK293T, Δ MIC25-MIC25-FLAG
HEK293T, FLAG-SAM50
HeLa, Wildtyp
HeLa, Δ MIC10 Klon 7

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeit in Zellkultur

Innerhalb der Zellkultur wurden sämtliche Schritte unter sterilen Bedingungen, sowie der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

4.2.1.1 Kultivierung von humanen Zellen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in 10 cm- und 15 cm-Schalen. Als Nährmedium wurde DMEM (1x) verwendet, welchem 10 % FCS, sowie 50 µg/ml Uridin zugefügt wurden. Das Nährmedium wurde jeweils vor Verwendung bei 37 °C im Wasserbad aufgewärmt.

4.2.1.2 Splitten von humanen Zellen

Nach dem Absaugen des gebrauchten Nährmediums werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und einige Minuten in 0,05 % Trypsin-EDTA (1x) inkubiert, um die adhärenen Zellen von der Schale zu lösen. Daraufhin wird das Trypsin durch Zugabe von frischem Nährmedium abgestoppt, die Zellen werden resuspendiert und ein Teil der Zell-Suspension in eine frische 10 cm- bzw. 15 cm-Schale überführt. Schließlich gibt man, je nach Größe der Schale, 10 ml bzw. 20 ml frisches Nährmedium hinzu, sodass die Zellen nun wieder optimale Proliferationsbedingungen haben und in den Inkubator überführt werden können.

4.2.1.3 Ernten von humanen Zellen

Hierfür wird das gebrauchte Nährmedium abgesaugt und 1x PBS hinzugefügt. Durch Abspritzen der Zellen mit 1x PBS lassen sich die HEK293T-Zellen in der Regel gut lösen. Anschließend werden die in 1x PBS gelösten Zellen in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wird der PBS-Überstand abgenommen und das erhaltene Zellpellet in 1x PBS resuspendiert. Es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 800 x g mit anschließender Abnahme des Überstandes. Das erhaltene, gut gewaschene Zellpellet steht nun zur weiteren Verwendung wie bspw. für Ganzzelllysate oder zur Isolation von Mitochondrien bereit, kann aber auch für einige Wochen bei -80 °C weggefroren werden.

4.2.1.4 Einfrieren von humanen Zellen

Hierfür wird das gebrauchte Nährmedium abgenommen und die konfluenten Zellen mit 1x PBS gewaschen. Daraufhin werden die am Boden haftenden Zellen mit 0,05 % Trypsin-EDTA (1x) gelöst. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion erfolgt die Zugabe frischen Nährmediums. Nach Resuspension der Zellen werden diese in 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 x g wird der erhaltene Überstand abgenommen und das Zellpellet erneut in frischem Nährmedium resuspendiert. Nach Wiederholung des obigen Zentrifugationsschrittes und Abnahme des Überstandes erfolgt die Resuspension des Zellpellets in *Bambanker*-Lösung. Hierbei handelt es sich um ein spezielles Gefriermedium, das es ermöglicht, Zellen bei sehr niedrigen Temperaturen wegzufrieren und welches gleichzeitig deren Erholung und Vitalität nach dem Auftauen verbessert. Es hat sich bewährt, eine 10 cm-Schale konfluenten Zellen in 600 µl *Bambanker*-Lösung zu lösen und dann jeweils 200 µl der Suspension in zwei Milliliter fassende Kryokonservierungsröhrchen zu überführen. Diese können dann bei -80 °C für einige Monate weggefroren werden.

4.2.1.5 Auftauen von humanen Zellen

Nach Auftauen der in *Bambanker*-Medium bei -80 °C tiefgefrorenen Zellen überführt man diese unverzüglich in vorbereitete 10 cm-Schalen, resuspendiert sie in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtes Nährmedium und transferiert sie schließlich zum Kultivieren in den Inkubator. Durch regelmäßige lichtmikroskopische Begutachtung der Zellen in den folgenden Tagen kann beurteilt werden, ob der Auftauprozess erfolgreich war.

4.2.1.6 Behandlung humaner Zellen mit FCCP

Um humane Zellen mit dem mitochondrialen Entkoppler Trifluoromethoxycarbonylcyanidephenylhydrazon (FCCP) zu behandeln, werden die zu untersuchenden Zellen in jeweils ein bis zwei Löcher einer 6-well-Platte ausgesät, mit jeweils zwei Millilitern Nährmedium versorgt und bis zur gewünschten Zelldichte im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Anschließend wird das gebrauchte Medium durch Frisches ersetzt. Nun wird das FCCP, welches zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde, in gewünschten Mengen in die jeweiligen Löcher der 6-well-Platte gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt, ohne dass sich die haftenden Zellen vom Boden lösen.

Es hat sich gezeigt, dass die Zugabe von 50 µM FCCP mit sich anschließender Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C optimal sind, um die von mir gewünschten Versuchsbedingungen zu schaffen.

Nach zweistündiger Inkubation wird das FCCP-haltige Medium abgenommen. Nun können die Zellen direkt geerntet werden, oder es erfolgt die erneute Zugabe frischen Nährmediums mit anschließender Überführung in den 37 °C-Inkubator für den Fall, dass die Regeneration von Proteinen nach Zugabe von FCCP untersucht werden soll und erntet diese dann zu einem späteren gewünschten Zeitpunkt.

Die geernteten Zellen können direkt weiterverwendet oder aber bei -20 °C für einige Tage weggefroren werden, bevor sie für sich anschließende Experimente wie bspw. Ganzzelllysate benötigt werden.

4.2.1.7 siRNA Transfektion

Um die Expression bestimmter Proteine gezielt zu verhindern, eignet sich die siRNA Transfektion.

Hierfür werden HeLa-Zellen in einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die eigentliche Transfektion findet bei 60-80 %iger Konfluenz der Zellen statt. Hierfür werden zunächst pro *well* 9 µl *Lipofectamine® RNAiMAX* Reagenz in 150 µl des *Opti-MEM®* Mediums gelöst. Anschließend werden 3 µl siRNA (10 µM) mit 150 µl *Opti-MEM®* Medium vermischt. Daraufhin wird die gelöste siRNA zum ebenfalls gelösten *Lipofectamine® RNAiMAX* Reagenz im Verhältnis 1:1 gegeben und diese Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die während der Inkubationszeit entstandenen siRNA-Lipidkomplexe können nun zu den HeLa-Zellen hinzugegeben werden, wobei 250 µl pro *well* ausreichend sind. Nach 72-stündiger Inkubation bei 37 °C stehen die transfizierten Zellen für experimentelle Zwecke zur Verfügung.

4.2.2 Proteinkonzentration-Bestimmung nach Bradford

Um Proteine quantitativ bestimmen zu können, wurde regelhaft ein Bradford-Test in 48-*well*-Platten durchgeführt.

Um die jeweiligen Proteinmengen zu bestimmen, wird eine Standardreihe mittels 1,47 µg/µl IgG-Proteinstandard angefertigt, die einen Nullwert aus reinem Wasser, sowie die Standardproteinmengen 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 40 µg gelöst in jeweils insgesamt 100µl Wasser umfasst. Zur Proteinbestimmung einer jeden Probe werden jeweils Triplikate angefertigt und die Proteinmenge in 1 µl oder 2 µl ermittelt, je nach vorher erwarteter Konzentration.

Nach Hinzufügen von 1x ROTI®Quant erfolgt die Bestimmung der Extinktion im *Plate Reader* der Firma Tecan bei 595 nm. Die Auswertung der Standardkurve, sowie der einzelnen Proben, kann mithilfe des Programms *Prism-GraphPad* vorgenommen werden.

4.2.3 Isolation von Mitochondrien aus humanen Zellen

Nach sterilem Ernten der konfluent gewachsenen Zellen finden alle der zur Isolation von Mitochondrien aus humanen Zellen notwendigen Schritte auf Eis statt.

Zu Beginn erfolgt die Resuspension des geernteten Zellpellets in 2,5 ml Puffer A, woraufhin die Suspension in einen Potter transferiert wird. Nach 30-maligem Pottern schließt sich die Zugabe von 2,5 ml Puffer B an. Nach Durchmischen der Suspension verteilt man diese gleichmäßig auf vorgekühlte Reaktionsgefäße. Anschließend werden die Proben bei 4 °C für 5 Minuten bei 1.000 x g zentrifugiert. Da der erhaltene Überstand unter anderem die gewünschten Mitochondrien enthält, wird dieser abgenommen und in ebenfalls vorgekühlte, frische Reaktionsgefäße überführt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 2 Minuten bei 12.000 x g. Nachdem der Überstand entfernt und verworfen worden ist, erhält man ein gelbliches Pellet bestehend aus den gewünschten isolierten Mitochondrien.

Da Mitochondrien nicht mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut werden sollten, empfiehlt es sich, aliquotierte Mengen zu erstellen. Hierfür wird das erhaltene Pellet in 60-80 µl Puffer C resuspendiert und es erfolgt eine Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (s. Kap. 4.2.2) Nach dem Erstellen von Aliquots in gewünschten Konzentrationen können diese bei -80 °C für einige Monate weggefroren werden.

- Puffer A
 - 83 mM Sucrose
 - 10 mM Hepes (pH 7,2)
- Puffer B
 - 250 mM Sucrose
 - 30 mM Hepes (pH 7,2)
- Puffer C
 - 320 mM Sucrose
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris-Cl (pH 7,4)

4.2.4 Ganzzelllysat

Nach Ernten der gewünschten Zellen finden alle Versuchsschritte der Erstellung von Ganzzelllysaten auf Eis statt.

Nach Resuspension des Zell-Pellets in einer adäquaten Menge des frisch angesetzten Lysepuffers (etwa 100 µl Lysepuffer für 2 konfluent bewachsene Löcher einer 6-well-Platte) werden die Proben für 30

Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 4 °C für 5 Minuten bei 956 x g. Anschließend wird der Überstand in frische, vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt, während die pelletierten Zellkerne verworfen werden. Um im weiteren Verlauf Proben einer definierten Proteinmenge zu erhalten, folgt eine Proteingehaltbestimmung nach Bradford (s. Kap. 4.2.2). Es hat sich bewährt, pro Tasche eines SDS-Gels jeweils 30 µg Proteinmenge des Ganzzelllysates zu laden, weswegen entsprechende Aliquotes erstellt werden. Nach Zusatz von 2x Lämmli und Inkubation der Proben bei 50 °C für 10 Minuten können die Proben bei -20 °C weggefroren und bei Bedarf weiterverwendet werden.

- Lysepuffer Ganzzelllysate
 - 20 mM Tris (pH 7,4)
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM DTT
 - 0,5 % Triton X-100
 - Proteaseinhibitor “*cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*” der Firma Roche
 - 20x Stock ansetzen und diesen in entsprechenden Mengen zum Lysepuffer hinzugeben, dass er 20 % des Gesamtvolumens ausmacht
- 1x Lämmli-Puffer
 - 8 % SDS
 - 40 % Glycerol
 - 60 mM Tris (pH 6,8)
 - 0,04 % Bromphenolblau
 - 1-2 % β-Mercaptoethanol

4.2.5 TCA-Präzipitation

Um Proteine aus einer Lösung zu fällen, bietet sich die TCA-Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) an.

Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt. Zu Beginn wird der entsprechenden Probe TCA in einer finalen Konzentration von etwa 15 % zugefügt. Nach 10 Minuten auf Eis findet anschließend ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 10 Minuten bei 21.130 x g statt. Nach Abnahme des Überstandes wird der Probe 1 ml eisgekühltes Aceton zugefügt, woraufhin eine erneute Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten bei 21.130 x g folgt. Nach Verwerfen des Überstandes und Trocknen des Pellets bei Raumluft können die Proben weiterverwendet und bspw. mit Lämmli-Puffer versetzt werden.

4.2.6 SDS-PAGE

Um Proteine elektrophoretisch entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde regelhaft eine *SDS-PAGE* (Akronym für „*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“) durchgeführt.

Nach Auftauen tiefgefrorener, aliquotierter Proben (bspw. isolierte Mitochondrien) auf Eis erfolgt eine Zentrifugation bei 4 °C für 5 Minuten bei 13.523 x g. Nach Abnahme des Überstands wird das Zellpellet in 2x Lämmli resuspendiert und die Probe anschließend bei 50 °C für 15 Minuten inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren.

Nun werden jeweils 10 µg im Falle von isolierten Mitochondrien bzw. 30 µg Proteinmenge im Falle von Ganzzelllysaten in die eigens dafür vorgesehenen Taschen der 10 %igen Bis-Tris-Gele pipettiert. Es empfiehlt sich außerdem zur Orientierung 5 µl Proteinmarker aufzutragen, um später den einzelnen Banden spezifische Molekulargewichte zuordnen zu können.

Die Gelkammern werden mit 1x MES-Puffer oder aber 1x MOPS-Puffer aufgefüllt, je nachdem ob Proteine mit kleineren oder größeren Molekulargewichten untersucht werden möchten. Im Anschluss werden die Proteine bei 120 Volt für ca. eine Stunde aufgetrennt.

- 1x MES
 - 0,05 M MES
 - 0,05 M Tris
 - 1 % SDS
 - 1,025 mM EDTA
- 1x MOPS
 - 0,05 M MOPS
 - 0,05 M Tris
 - 1 % SDS
 - 1,025 mM EDTA

4.2.7 Gießen von Bis-Tris-Gelen

Um Proteine im Rahmen einer *SDS-PAGE* gelelektrophoretisch aufzutrennen, wurden 10 %ige Bis-Tris-Gele verwendet, die selbstständig gegossen wurden.

Zum Gießen der Gele werden für das 10 %ige Trenngel identische Mengen an Acrylamid, 1 M Bis-Tris und Wasser verwendet. Anschließend werden APS und TEMED hinzugefügt (beispielhafte Mengenangaben können Tab. 2 entnommen werden) und die Suspension zügig in das zuvor gründlich mit 70 %igem Ethanol gereinigte BioRad-System zum Gießen der Gele überführt. Nach Überschichtung

mit Isopropanol werden die Trenngel bei Raumtemperatur zum Polymerisieren stehen gelassen. Für das 4,5 %ige Sammelgel werden Acrylamid im Anteil von 15 %, 1 M Bis-Tris im Anteil von etwa 33 %, sowie Wasser im Anteil von ca. 52 % miteinander vermischt (s. Tab. 3).

Nach vollständiger Polymerisierung des Trenngels wird das Isopropanol vorsichtig entfernt. Dem Sammelgel werden APS und TEMED zugefügt (beispielhafte Mengenangaben können Tab. 3 entnommen werden), die gesamte Suspension zügig über das Trenngel gegossen und bei Raumtemperatur zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Die fertigen Bis-Tris-Gele können mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

Tabelle 2: Schema 10 %iges Bis-Tris Trenngel (für 10 Gele)

Acrylamid	30 ml
1 M Bis-Tris	30 ml
Wasser	30 ml
APS	450 µl
TEMED	45 µl

Tabelle 3: Schema 4,5 %iges Bis-Tris Sammelgel (für 10 Gele)

Acrylamid	4,5 ml
1 M Bis-Tris	10 ml
Wasser	15,5 ml
APS	300 µl
TEMED	30 µl

4.2.8 Western Blot

Um die im Rahmen einer *SDS-PAGE* aufgetrennten Proteine weiter zu untersuchen, schließt sich für gewöhnlich ein *Western Blot* an.

Hierfür wird das entsprechende Gel von den Glasplatten gelöst und in 1x Transferpuffer überführt. Daraufhin werden drei ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtete *Whatman*-Papierstücke auf den Boden der *semi-dry* Blot-Kammer transferiert und darauf das Gel der vorherigen *SDS-PAGE* in spiegelverkehrter Richtung gelegt. Die zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran kann anschließend auf das Gel gelegt werden. Als letztes folgt nochmals eine Schicht aus drei Lagen in Transferpuffer befeuchtetem *Whatman*-Papier.

Bei 350 mA für 150 Minuten werden die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen. Anschließend werden die auf die Membran übertragenen Proteine für ca. 3 Minuten in Coomassie gefärbt, woraufhin sie mittels Destain entfärbt werden. Dank des ebenfalls auf die Membran übertragenen Proteinmarkers ist es möglich, die Membran mithilfe eines Skalpell so zu schneiden, dass mehrere Proteine pro Gel untersucht werden können. Die einzelnen Membranstücke werden daraufhin in Methanol vollständig entfärbt und anschließend in TBST kurz gewaschen. Es folgt die Blockierung der Membran in 5 %iger-Milchpulver-TBST-Lösung für 45 Minuten.

Die Proteine werden anschließend mittels einer immunologischen Reaktion sichtbar gemacht. Hierfür werden die einzelnen Membranstücke in den jeweiligen Erstantikörper überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen folgen drei Waschschrte in TBST für insgesamt etwa 20 Minuten, um überschüssige Reste des Primärantikörpers zu eliminieren. Anschließend werden die gewaschenen Membranstücke im zuvor frisch angesetztem Zweitantikörper für eine Stunde inkubiert. Es folgt ein erneuter dreimaliger Waschschrte in TBST für insgesamt etwa 15 Minuten. Die Auswertung erfolgt am *Amersham Imager 600* mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion, bei der die Membran für wenige Sekunden in ECL-Lösung gelegt und anschließend in den *Amersham Imager 600* überführt wird. Mit diesem können Bilder von den jeweils untersuchten Proteinen aufgenommen werden. Die abschließende Versuchsauswertung kann mit den Programmen *Affinity Photo* und *Affinity Designer* erfolgen.

- Coomassie
 - 40 % Ethanol
 - 10 % Essigsäure
 - 50 % H₂O
 - 0,2 % Coomassie R
- Destain
 - 40 % Ethanol
 - 10 % Essigsäure
 - 50 % H₂O
- Transferpuffer
 - 20 mM Tris
 - 150 mM Glycin
 - 0,02 % SDS
 - 20 % Ethanol
- 1x TBST
 - 0,02 M Tris
 - 0,15 M NaCl (pH 7,5)
 - 1 % Tween 20 der Firma Roth

- Erstantikörper
 - Jeweiliger Erstantikörper der Verdünnung 1:500 in 5 %iger Milchpulver-TBST-Lösung
- Zweitantikörper
 - Maus: Verdünnung 1: 3.000 in 5 %iger Milchpulver-TBST-Lösung
 - Hase: Verdünnung 1: 5.000 in 5 %iger Milchpulver-TBST-Lösung

4.2.9 SDS-PAGE auf einem Gradientengel

Große Proteine können mithilfe des Gradientengels „*Invitrogen Bolt 4-12 % Bis-Tris Plus*“ der Firma *Thermo Fisher Scientific* gut aufgetrennt werden. Als Laufpuffer eignet sich hierbei 1x MOPS und die Proteine werden bei 100 Volt für 95 Minuten aufgetrennt.

4.2.10 *Wet blot*

Mit dem *Wet-Blotting*-System der Firma Bio-Rad können die mithilfe des Gradientengels gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (s. Kap. 4.2.9) auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

Hierfür werden auf die eigens dafür vorgesehene Vorrichtung zwei Lagen Schwämme platziert, welche zuvor mit auf 4 °C vorgekühltem *Wet blot*-Puffer befeuchtet wurden. Es folgt eine Schicht *Whatman*-Papier, das ebenfalls mit obigem Puffer befeuchtet wird. Anschließend wird das aus der Plastikplatte herausgelöste Gradientengel in spiegelverkehrter Richtung auf das *Whatman*-Papier und darüber die in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Nach einer zusätzlichen Schicht *Whatman*-Papier, sowie zwei weiteren Schwämmen, kann die Vorrichtung verschlossen und in den eigens dafür vorgesehenen *Wet blot*-Kasten überführt werden. Anschließend wird in die Kammer *Wet blot*-Puffer gegossen und zusätzlich etwas Eis zur Kühlung der Apparatur beigefügt. Bei 100 Volt für 60 Minuten werden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen und können anschließend, wie im Kapitel 4.2.8 im Detail beschrieben, durch eine immunologische Reaktion visuell sichtbar gemacht werden.

- *Wet blot*-Puffer (Kühlung auf 4 °C)
 - 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 10 % Ethanol

4.2.11 *Blue native-PAGE*

Mithilfe einer *Blue native-PAGE* (BN) ist es möglich, ganze Proteinkomplexe in ihrer nativen Form darzustellen.

Hierfür empfiehlt es sich, ein Gradientengel von 4-13 % bereits am Vortag mithilfe eines speziellen Gradientenmischers anzufertigen und dieses über Nacht bei 4 °C eingepackt in Frischhaltefolie zu lagern (s. Kap. 4.2.12).

Am darauffolgenden Tag werden die Proben frisch vorbereitet, wobei jeder der folgenden Schritte auf Eis durchgeführt wird.

Nach Auftauen der bei -80 °C in Puffer C eingefrorenen Mitochondrien werden diese bei 4 °C für 5 Minuten bei 20.817 x g zentrifugiert und der Puffer C-Überstand anschließend entfernt. Nach Resuspension des Pellets in frisch angesetztem Digitonin-Puffer werden die Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 15 Minuten bei 21.130 x g, woraufhin der Überstand in frische, vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt wird, die bereits 10x *Loading-Dye* enthalten. Es hat sich bewährt, jede vorgesehene Gel-Tasche mit 100 µg Mitochondrien gelöst in jeweils 65 µl Digitonin-Puffer und 5 µl 10x *Loading-Dye* zu beladen. Zur Orientierung werden zudem 50 µl des BN-Markers aufgetragen, um später die Molekulargewichte der einzelnen Proteinkomplexe abschätzen zu können. In eventuell nicht für den Versuch benötigte Taschen werden jeweils 50 µl *Empty-Lane*-Puffer pipettiert, um die Versuchsqualität zu optimieren. Dadurch wird gewährleistet, dass die Proben vertikal und in einer in der Breite gleichbleibenden Linie im Gel wandern und sich nicht in horizontale Richtung ausbreiten. Anschließend wird die Apparatur mit Coomassie enthaltenden Kathodenpuffer überschichtet und die gesamte Vorrichtung in die BN-Apparatur eingebaut, welche bereits zuvor mit auf 4 °C vorgekühlten Anodenpuffer befüllt worden ist. Nachdem das BN-Gel mit dem restlichen Coomassie enthaltenden Kathoden-Puffer überschichtet ist, werden die Proteinkomplexe bei 600 V und 25 mA pro Gel ca. 15 Minuten soweit aufgetrennt, bis die Proben aus den Taschen ins Gel gelaufen sind. Nun wird der bisherige Kathodenpuffer gegen Kathodenpuffer ohne Coomassie ausgetauscht und die Proteine werden bei gleicher Stromspannung und -stärke bis zum Gelende weiterlaufen gelassen.

Schließlich wird das BN-Gel aus der Versuchsapparatur gelöst und für ca. 5 Minuten in 1x SDS inkubiert. Es folgt ein *Western Blot* nach dem in Kapitel 4.2.8 näher beschriebenen Versuchsprotokoll.

- 1x Anodenpuffer BN
 - 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)
- 1x Kathodenpuffer (hell) BN
 - 50 mM Tricin (pH 7,0)
 - 15 mM Bis-Tris

- 1x Kathodenpuffer Coomassie, BN
 - 50 mM Tricin (pH 7,0)
 - 15 mM Bis-Tris
 - 0,2 % Coomassie G
- 1x SDS BN
 - 20 mM Tris
 - 150 mM Glycin
 - 0,02 % SDS
 - 20 % Methanol
- 1x Loading Dye
 - 5 % Coomassie blue G
 - 50 mM E-amino n-caproic acid
 - 10 mM Bis-Tris (pH 7,0)
 - Filtrieren
- Empty-Lane-Puffer BN
 - 200 µl 5x Digitonin-Puffer
 - 110 µl 10x *Loading-Dye*
 - 690 µl Wasser
- 1x Digitonin-Puffer BN
 - 1 % Digitonin
 - 4 mM Tris-Cl (pH 7,4)
 - 0,02 mM EDTA
 - 10 mM NaCl
 - 10 % Glycerol
 - 0,2 mM PMSF

4.2.12 Gießen von *Blue native*-Gelen

Um Proteinkomplexe in ihrer nativen Form im Rahmen einer *BN-PAGE* darzustellen, ist es nötig, eigens dafür vorgesehene BN-Gradientengele zu gießen. Die Zusammensetzung eines 4-13 %igen Gels ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 4: Gießen eines BN-Gels

	4 %	13 %
3x Gel-Puffer (ml)	3	3
Acrylamid (ml)	0,73	2,35
Glycerol (ml)	-	1,8
Wasser (ml)	5,2	1,8
10 % APS (μ l)	30	30
TEMED (μ l)	3	3

Nach dem Ansetzen der 4 bzw. 13 %igen Lösung (s. Tab. 4) werden diese in den BN-Gradientenmischer überführt, wobei es sich empfiehlt, erst hier das 10 %ige APS, sowie TEMED hinzuzugeben.

Nach Gießen des 4-13 %igen Gradientengels wird zusätzlich noch eine oberste Schicht Sammelgel bestehend aus dem 4 %igen Ansatz gegossen. Anschließend polymerisiert das Gel für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur aus, bevor es über Nacht eingepackt in einem angefeuchteten Tuch und Frischhaltefolie im Kühlschrank gelagert wird. Am darauffolgenden Tag kann das Gradientengel im Rahmen einer *BN-PAGE* (s. Kap 4.2.11). verwendet werden.

- 3x Gel-Puffer (*BN-PAGE*)
 - 200 mM e-Amino n-caprotic Acid
 - 150 mM Bis-Tris (pH 7,0)

4.2.13 Immunpräzipitation

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eignet sich die Durchführung einer Immunpräzipitation (IP). Streng genommen kann mithilfe der IP keine direkte Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden, sondern lediglich ob Protein A und Protein B in demselben Proteinkomplex vorkommen. Zum besseren Verständnis meiner Arbeit werde ich im Folgenden jedoch von direkter Wechselwirkung in Bezug auf IPs sprechen, womit ich das Vorkommen der jeweiligen Proteine in einem Proteinkomplex meine.

Alle der folgenden Schritte sollten hierbei auf Eis durchgeführt werden. Nach Auftauen von jeweils 250 μ g von bei -80 °C weggefrorenen Mitochondrien werden die Proben bei 4 °C für 5 Minuten bei 21.130 x g zentrifugiert, woraufhin der Puffer C-Überstand abgenommen wird. Daraufhin erfolgt die Resuspension des Pellets in 1 %igem Digitonin Solubilisierungspuffer (+ 2 mM PMSF) mit sich anschließender Inkubation der Suspension für 30 Minuten auf Eis.

Nach Zentrifugation der Proben bei 4 °C für 10 Minuten bei 21.130 x g werden jeweils 25 μ l des Überstands abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt, denen zusätzlich 25 μ l 4x Lämmli

zufügt werden. Die Proteine werden daraufhin für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert, woraufhin diese sogenannten *Total*-Proben, welche später als Qualitätskontrolle dienen, bei -20 °C weggefroren werden.

Der restliche Überstand wird in spezielle Säulen überführt, die in der Zwischenzeit mit 20 µl *FLAG Beads* befüllt worden sind, welche wiederum mit 0,3 % Digitonin Solubilisierungspuffer equilibriert wurden. Anschließend werden die gefüllten Säulen für zwei Stunden bei 4 °C rotiert, sodass die *FLAG-getaggt*en Proteine mit ihren eventuell vorhandenen direkten Interaktionspartnern an die *FLAG Beads* binden können.

Es schließt sich ein achtmaliger Waschschrift an mit jeweils 300 µl 0,3 % Digitonin Waschpuffer, den man auf die Säulen gibt und diese anschließend bei 4 °C für eine Minute bei 52 x g zentrifugiert. Nach Abschluss aller Waschschriffe werden die an die *Beads* gebundenen Proteine in jeweils 25 µl Elutions-Puffer (0,3 % Digitonin in Waschpuffer, 100 µg/ml 3x *FLAG peptide*) eluiert und bei 4 °C für 5 Minuten bei 94 x g auf einem Heizblock inkubiert. Anschließend werden die eluierten Proteine für eine Minute bei 100 x g in frische Reaktionsgefäße abzentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 12,5 µl Elutions-Puffer und Zentrifugation bei obiger Einstellung erhält man je Probe 37,5 µl Elutions-Volumen. Diesem wird 29,15 µl 4x Lämmli zugegeben, woraufhin die Proteine für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert werden. Die fertigen *Eluate*-Proben können bei -20 °C weggefroren und bei Bedarf zusammen mit den *Total*-Proben im Rahmen einer *SDS-PAGE* und eines *Western Blots* auf eventuell bestehende, direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden.

- 5x Solubilisierungspuffer
 - 100 mM Tris (pH 7,4)
 - 250 mM NaCl
 - 50 % Glycerol
 - 0,5 mM EDTA
- 5x Waschpuffer
 - 100 mM Tris (pH 7,4)
 - 300 mM NaCl
 - 50 % Glycerol
 - 2,5 mM EDTA

4.2.14 Zählen von Zellen

Zum Zählen von Zellen werden die Zellen ausgesät und bis zur gewünschten Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend werden sie trypsiniert, woraufhin das Trypsin mit jeweils 10 ml Medium abgestoppt wird. Von dieser Zellsuspension werden daraufhin je 200 µl abgenommen und damit die eigentliche Zellzählung vorgenommen. Hierfür werden jeweils 11 µl der Zellsuspension mit 11 µl

Trypanblau (0,4 %) gemischt, wovon schließlich 11 µl auf jeden Objektträger pipettiert werden. Es folgt die eigentliche Zählung der Zellen mithilfe der *Countess* der Firma *ThermoFisher Scientific*, wobei es sich anbietet, eine Doppelmessung durchzuführen.

4.2.15 Messung des Sauerstoffverbrauchs von lebenden Zellen

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs von lebenden Zellen eignet sich der „*Seahorse XFe96 Analyzer*“ der Firma Agilent. Zur Vorbereitung der Messung ist es nötig, die jeweiligen Zellen auszusähen und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator wachsen zu lassen. Nach sich daran anschließender Zählung der Zellen (s. Kapitel 4.2.14) wird eine definierte Zellzahl in die eigens dafür vorgesehene „*Seahorse Microplate*“ überführt und auf insgesamt 80 µl pro *well* mit Standardmedium aufgefüllt. Dabei ist es sinnvoll, pro Bedingung mehrere Ansätze vorzubereiten, sodass das Ergebnis durch Mehrfachmessungen auf einen exakteren Mittelwert normiert werden kann. Daraufhin werden die sich nun in der „*Seahorse Microplate*“ befindlichen Zellen für eine Stunde unter der Sterilbank bei Raumtemperatur ruhen gelassen, bevor sie über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Zur weiteren Vorbereitung der Messung werden das „*XF Calibrant*“ und die Sensor-Kartusche, welche in eine mit sterilem Wasser befüllte Platte hineinragt, ebenfalls über Nacht bei 37 °C und CO₂-freien Bedingungen zum Hydratisieren inkubiert. Am eigentlichen Tag der Messung wird das „*XF Assay Medium*“, welches sich aus DMEM-Medium (pH 7,4), Glucose (1 M), Pyruvat (100 mM) und Glutamin (200 mM) zusammensetzt, zusammen pipettiert und im Wasserbad vorgewärmt. Zur Vorbereitung der Sensor-Kartusche wird das sterile Wasser vom Vortag entfernt und durch jeweils 200 µl pro *well* des vorgewärmten „*XF Calibrants*“ ersetzt. Anschließend folgt ein weiterer Inkubationsschritt bei 37 °C für 45-60 Minuten. Den sich nach wie vor in der „*Seahorse Microplate*“ befindlichen Zellen wird ihr Standardmedium vom Vortag abgenommen, welches durch jeweils 200 µl des „*XF Assay Mediums*“ ersetzt und daraufhin bei 37 °C ebenfalls für 45-60 Minuten inkubiert wird. In der Zwischenzeit werden *Stocks* der Inhibitoren Oligomycin (100 µM), FCCP (100 µM) sowie Rotenon/Antimycin A (50 µM) vorbereitet. Hierfür erfolgt die Resuspension der Inhibitoren in vorbereitetem „*XF Assay Medium*“. Schließlich werden die Inhibitoren in die eigens dafür vorgesehenen Vorrichtungen der Sensor-Kartusche überführt (s. Tab. 5 für genaue Konzentrationen), woraufhin die Messung mit dem Messprogramm „*standard Agilent Seahorse CF Cell Mito Stress Test Kit template*“ gestartet werden kann. Der „*Seahorse XFe96 Analyzer*“ führt dabei zunächst einen dreiminütigen Mischschritt der Zellen mit den Inhibitoren durch, woraufhin ein dreiminütiger Messschritt folgt. Dieses Prozedere wird jeweils drei Mal wiederholt. Dank der nacheinander erfolgenden Zugabe von verschiedenen Inhibitoren, die Komplex V (Oligomycin), Komplex I (Rotenon) und Komplex III (Antimycin A) der Atmungskette hemmen bzw. als Entkoppler der Atmungskette fungieren (FCCP), wird es dabei möglich, Parameter der mitochondrialen Respiration wie den basalen Sauerstoffverbrauch, den O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen oder die maximal mögliche Respiration von lebenden Zellen quantitativ

zu bestimmen (s. Abb. 9). Insgesamt beläuft sich die Dauer der Messung dabei auf etwa 60 bis 90 Minuten. Um die erhaltenen Messwerte schließlich miteinander vergleichen zu können, eignet sich eine Normierung der Werte via Bradford bei 595 nm im *Plate Reader*.

Tabelle 5: Pipettierschema Atmungsketten-Inhibitoren für Sauerstoffverbrauchsmessung

	finale Konzentration pro well (μM)	Menge Stock-Lösung (μL)	Menge Medium (μL)	10x Konzentration im Port (μM)	hinzuzufügende Menge pro Port (μL)
Port A: Oligomycin	0,5	150	2.850	5	20
Port A: Oligomycin	1,5	550	2.450	15	20
Port A: Oligomycin	2,5	630	1.890	25	20
Port B: FCCP	0,125	37,5	2.962,5	1,25	22
Port B: FCCP	0,25	75	2.925	2,5	22
Port B: FCCP	0,5	150	2.850	5	22
Port B: FCCP	1	300	2.700	10	22
Port B: FCCP	2	600	2.400	20	22
Port C: Rotenon/ Antimycin A	0,5	300	2.700	5	25

Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile

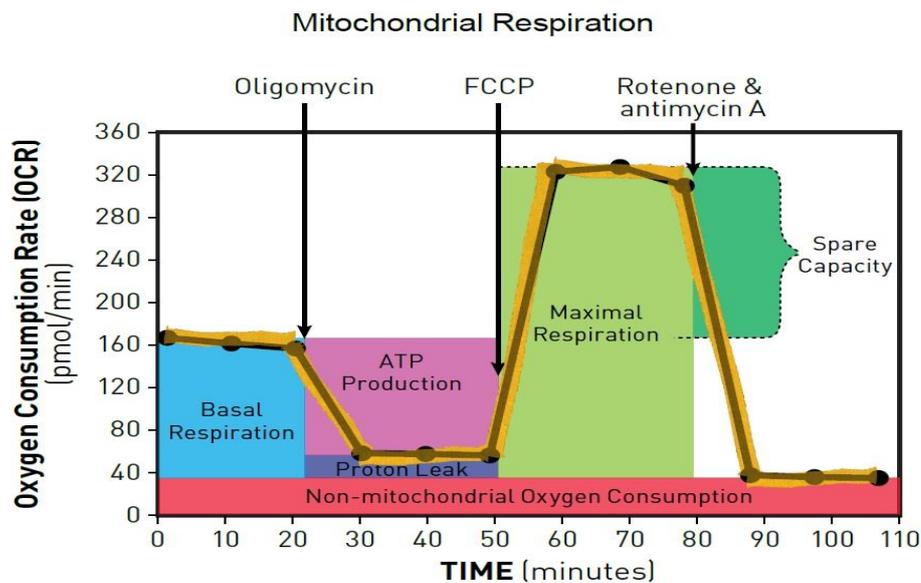


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ermittlung verschiedener Parameter mitochondrialer Respiration

Abb. 9 Schematische Darstellung der Ermittlung verschiedener Parameter mitochondrialer Respiration: Durch automatisierte, nacheinander erfolgende Zugabe von Inhibitoren bzw. Entkopplern der Atmungskette (Oligomycin, FCCP, Rotenon, Antimycin A) zu vitalen Zellen ist es mithilfe des *Seahorse XFe96 Analyzers* möglich, verschiedene Parameter der mitochondrialen Respiration zu messen.

basal respiration: O₂-Verbrauch, der zur Deckung des zellulären ATP-Bedarfs nötig ist. Er gibt Auskunft über den Energiebedarf der Zelle unter Standardbedingungen; *ATP production:* Durch Zugabe des Inhibitors des Komplexes V der Atmungskette (Oligomycin) ermittelter Anteil der Basalatmung, der für die ATP-Produktion verwendet wird; *proton leak:* Verbleibende Basalatmung, die nicht an ATP-Produktion gekoppelt ist. Sie kann Auskunft über mitochondriale Schädigung geben; *maximal respiration:* Durch Zugabe des Entkopplers FCCP der Atmungskette bricht der mitochondriale Protonengradient zusammen und es wird ein zellulärer Energiemangel simuliert. Daraus resultiert eine Stimulation der Atmungskette, sodass der O₂-Verbrauch durch Komplex IV sein Maximum erreicht; *spare capacity:* Differenz zwischen maximaler Respiration (nach FCCP-Zugabe) und basaler Respiration (nach Oligomycin-Zugabe). Dieser Parameter gibt Auskunft darüber, wie gut die Zelle dazu in der Lage ist, sich an einen erhöhten Energiebedarf oder unter Stress anzupassen; *non-mitochondrial oxygen consumption:* Durch Zugabe der Inhibitoren der Komplexe I (Rotenon) und III (Antimycin A) kommt die Atmungskette zum Stillstand. Der noch gemessene O₂-Verbrauch gibt Auskunft über die nicht-mitochondriale Atmung außerhalb von Mitochondrien; Abbildung der Homepage der Firma *Agilent* entnommen.

4.2.16 Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung von Mitochondrien und ihrer Cristae-Morphologie eignet sich die Elektronenmikroskopie, welche dankenswerterweise von Sibylle Jungbluth für mich durchgeführt wurde. Hierfür werden die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Saphirscheibchen (1,4 x 0,05 mm) bis zu einer Konfluenz von etwa 70-80 % wachsen gelassen, bevor sie bspw. mit siRNA transfiziert werden können (s. Kap. 4.2.1.7). Anschließend erfolgt das Einfrieren der Zellen mithilfe der „*High pressure freezing*“-Methode, bei der die Proben mit einer Geschwindigkeit von 20 m/s und einem Druck von 2.000 bar in flüssigen Stickstoff geschossen werden, wodurch die Kristallisation des Wassers innerhalb der Zellen beim Einfrieren verhindert wird. Anschließend erfolgt das Einbetten der Zellen

mithilfe des Einbettmediums Lowicryl bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach Aushärten der Proben werden Schnitte angefertigt, diese auf Nickel-Grid übertragen und daraufhin mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Schließlich können Bilder der Mitochondrien mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) aufgenommen und analysiert werden.

5. Ergebnisse

5.1 Auswirkungen des Fehlens von MIC10 und MIC60 auf MICOS, MIB und OPA1

Um einen Überblick über den MICOS-Komplex und die einzelnen Proteine zu erlangen, aus denen er sich zusammensetzt, wurden die Proteine isolierter Mitochondrien der Zelllinie HEK293T in einer *SDS-PAGE* gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels *Western Blot* auf die Membran übertragen und schließlich via enzymgekoppeltem Zweitantikörper dargestellt.

Mit der von mir verwendeten Methode gelang es, in Mitochondrien humaner Wildtyp-Zellen sämtliche in der Literatur beschriebenen MICOS-Komponenten darzustellen, nämlich MIC60, MIC19, MIC25, MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 (Abb. 10).

Demgegenüber sind im Einklang mit der Literatur bei Fehlen von MIC10 deutlich geringere Mengen der ebenfalls zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine MIC26 und MIC27 im Vergleich zum Wildtyp detektierbar, während QIL1 überhaupt nicht mehr sichtbar ist (Abb. 10). Auf die dem MIC60-Subkomplex angehörenden Proteine MIC60, MIC19 und MIC25 scheint das Fehlen von MIC10 dagegen keine ersichtlichen Auswirkungen zu haben, und die Intensität der Protein-Banden bewegt sich auf der des Wildtyps (Abb. 10).

Der *Knockout* von MIC60 scheint dagegen gravierendere Auswirkungen auf die Stabilität des gesamten MICOS-Komplexes zu haben. So sind in den MIC60-KO-Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp sämtliche MICOS-Untereinheiten in deutlich geringeren Mengen detektierbar, was ebenfalls den Erwartungen im Vergleich zur Literatur entspricht (Abb. 10). Hierbei ist anzumerken, dass es sich bei den von mir in meiner Arbeit verwendeten Δ MIC60-Zellen um einen *Knockout* handelt, - ich jedoch eine nicht erklärbare Restexpression von MIC60 in diesen Zellen bei all meinen Experimenten beobachten konnte.

Auch SAM50 als wichtigster Bestandteil des SAM-Komplexes ist in Mitochondrien von Δ MIC60-Zellen im Vergleich zum Wildtyp in geringeren Mengen wahrnehmbar, während das Fehlen von MIC10 scheinbar keine Auswirkungen auf diesen in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten und für den Einbau von β -barrel Proteinen verantwortlichen Komplex hat. Auch dies steht im Einklang mit der vorherrschenden Literatur (Abb. 10).

Die Abwesenheit von MIC10 bzw. MIC60 hat weder Auswirkungen auf die Proteinmengen ausgewählter Atmungskettenproteine (s. „Total OXPHOS“-Antikörper), noch auf TOM40, einem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Kanalprotein (Abb. 10).

Mithilfe eines Gradientengels gelang es, fünf OPA1-Isoformen (a-e, Abb. 10) darzustellen. Dabei stellen die oberen beiden Banden a und b die langen, unprozessierten OPA1-Formen dar, während die Aktivität der Protease YME1L an S2 zur Entstehung der Isoform d führt. Die Banden c und e sind dagegen das Resultat proteolytischer Prozessierung an S1 durch OMA1 [71].

Um Zusammenhänge zwischen dem MICOS-Komplex und OPA1 als Schlüsselspieler der Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie zu untersuchen, wurde das OPA1-Isoformen-Muster auf Veränderungen in Abwesenheit von MIC10 bzw. MIC60 hin untersucht. So scheint es, dass das Fehlen von MIC60 keine erkennbaren Auswirkungen auf die Prozessierung von L-OPA1 hat, da das Verhältnis L-OPA1 zu S-OPA1 ähnlich wie im Wildtyp ist (Abb. 10). Dagegen sind bei Fehlen von MIC10 größere Mengen an L-OPA1 im Vergleich zum Wildtyp detektierbar, wobei vor allem die b-Bande der fünf OPA1-Isoformen stärker erscheint (s. Pfeil in Abb. 10). Dies kann als Hinweis für eine eventuell bestehende gegenseitige Beeinflussung zwischen dem wichtigsten Bestandteil des MIC10-Subkomplexes MIC10 und OPA1 gewertet werden. Bei Bande b handelt es sich dabei wie bei Bande a um eine Mischung aus verschiedenen langen OPA1-Isoformen [63,121].

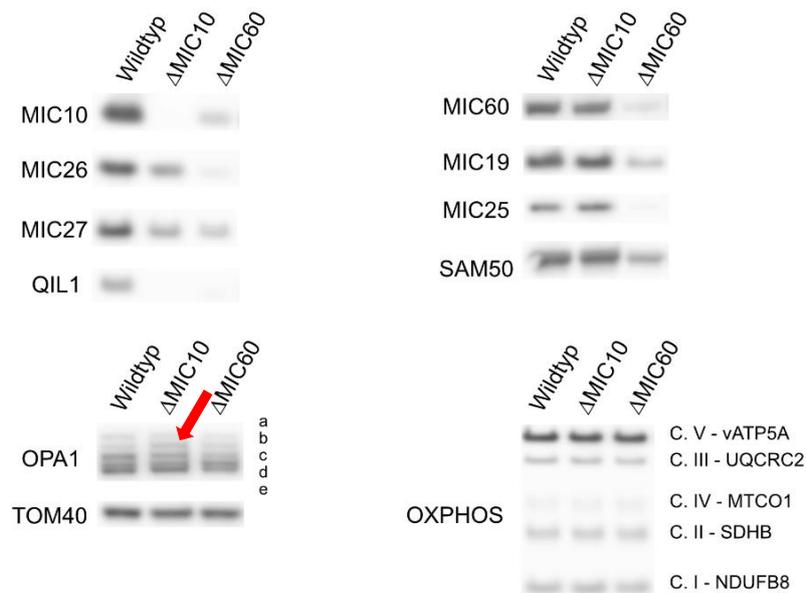


Abbildung 10: Übersicht MICOS und OPA1

Abb. 10 Übersicht MICOS und OPA1: Nach Isolation der Mitochondrien aus HEK293T wurde mit ihnen eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei pro Spur 10 µg aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Proteine via Western Blot auf die Membran übertragen und die jeweiligen Proteine mithilfe eines gegen sie gerichteten Antikörpers sichtbar gemacht.

Die Buchstaben a-e stehen hierbei stellvertretend für die 5 detektierbaren OPA1-Isoformen, wobei es sich bei den Banden a und b um L-OPA1 handelt, während die Banden c-e S-OPA1-Isoformen repräsentieren. Es fällt auf, dass Bande b (s. Pfeil), die L-OPA1 entspricht, in Δ MIC10 stärker detektierbar ist im Vergleich zum WT und Δ MIC60.

Atmungsketten-Proteine, gegen die der „Total OXPHOS-AK“ gerichtet ist: C. V – vATP5A: ATP Synthase Untereinheit α des Komplexes V; C. III – UQCRC2: Cytochrom b-c1 Komplex Untereinheit 2 des Komplexes III; C. IV – MTCO1: Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 des Komplexes IV; C. II – SDHB: Succinat Dehydrogenase Untereinheit B des Komplexes II; C. I – NDUFB8: NADH-Dehydrogenase β Subkomplex Untereinheit 8 des Komplexes I

5.2 OPA1-Oligomere trotz Abwesenheit von MIC10 auf Wildtyp-Niveau

Nach der Beobachtung im Rahmen einer *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot*, dass die langen OPA1-Formen in Δ MIC10-Mitochondrien im Vergleich zu Wildtyp- und zu Δ MIC60-Mitochondrien in größeren Mengen vorhanden zu sein scheinen (Abb. 10) interessierte mich, wie sich die OPA1-Oligomere in diesen Zelllinien darstellen. Hierfür isolierte ich aus Wildtyp-, Δ MIC10- und Δ MIC60-Zellen der Zelllinie HEK293T die Mitochondrien und führte mit diesen eine *BN-PAGE* mit folgendem *Western Blot* durch, welche es ermöglicht, ganze Proteinkomplexe in ihrer nativen Form darzustellen (Abb. 11A). Zu Kontrollzwecken führte ich mit den Proben zusätzlich noch eine *SDS-PAGE* plus *Western Blot* durch (Abb. 11B).

Dabei zeigte sich in Δ MIC10-Mitochondrien im Rahmen der *BN-PAGE* ein Größen-*Shift* beim Nachweis der MICOS-Komplexe mit dem MIC60-Antikörper (Abb. 11A). Dies ist dadurch zu erklären, dass in Δ MIC10 keine Komplexe mehr vorhanden sind, in denen die Proteine MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 enthalten sind, mit der Folge, dass der gesamte MICOS-Komplex in Δ MIC10 ein vermindertes Molekulargewicht aufweist und daher weiter im BN-Gel wandert.

Die TOM40-Banden waren sowohl bei der *SDS*-, als auch der *BN-PAGE* im WT, Δ 10 und Δ 60 in etwa gleicher Intensität detektierbar (Abb. 11A und B).

Mithilfe der *BN-PAGE* ist es möglich, OPA1-Oligomere darzustellen, welche sich sowohl aus langen als auch aus kurzen OPA1-Isoformen zusammensetzten [100]. Es ließ sich im Rahmen der *BN-PAGE* beobachten, dass die OPA1-Oligomere in Δ MIC10 in gleicher Intensität detektierbar sind wie im Wildtyp, während sie in geringeren Mengen in Δ MIC60-Mitochondrien wahrnehmbar waren (Abb. 11A). Dies weist erneut auf eine eventuell bestehende gegenseitige Beeinflussung zwischen OPA1 und MIC10 hin.

Interessanterweise scheinen auch die Oligomere der stresssensitiven Metalloprotease OMA1, welche die langen OPA1-Formen durch Prozessierung an S1 in kurze Formen überführt, in Δ MIC10 und Δ MIC60-Mitochondrien im Vergleich zum Wildtyp in geringeren Mengen vorhanden zu sein (Abb. 11A).

Somit wird mein Ergebnis der *SDS-PAGE*, dass die Banden der langen, nicht prozessierten OPA1-Formen in Δ MIC10-Mitochondrien im Vergleich zum WT und Δ MIC60 besonders stark detektierbar sind (Abb. 10 und 11B), um die im Rahmen der *BN-PAGE* erlangte Erkenntnis erweitert, dass auch die OPA1-Oligomere in Δ MIC10 im Vergleich zu Δ MIC60 deutlich stärker zu detektieren sind (Abb. 11A). Auch dies kann erneut als Hinweis auf eine eventuell bestehende gegenseitige Beeinflussung zwischen OPA1 und MIC10 angesehen werden. Aus deren Konsequenz ergibt sich die Frage, welche Funktion L-OPA1 bzw. OPA1-Oligomere in Δ MIC10-Zellen ausüben bzw. welche Rolle das MIC10-Protein bei der Prozessierung von OPA1 spielt.

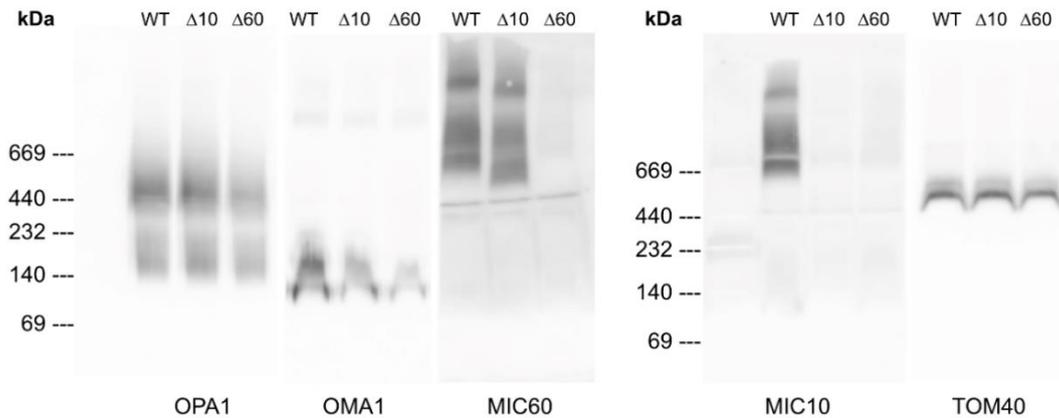
A**B**

Abbildung 11: MICOS und OPA1-Oligomere

Abb. 11 MICOS und OPA1-Oligomere

A: Aus der Zelllinie HEK293T des Wildtyps sowie Δ MIC10 und Δ MIC60 wurden die Mitochondrien isoliert und mit diesen eine *BN-PAGE* durchgeführt. Dabei wurden pro Spur 100 μ g aufgetragen. Daraufhin wurden die Proteine via *Western Blot* auf die PVDF-Membran übertragen und schließlich mittels Chemielumineszenz-*Immunoassay* nachgewiesen.

B: Zu Kontrollzwecken wurden vor Durchführung der *BN-PAGE* (Abb. 11A) Proben der isolierten Mitochondrien abgenommen, um mit diesen eine *SDS-PAGE* durchzuführen. Hierbei wurden jeweils 10 μ g pro Spur aufgetragen. Nach Durchführung eines *Western Blots* wurden die jeweiligen Proteine mithilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht.

WT = Wildtyp, Δ 10 = Δ MIC10, Δ 60 = Δ MIC60

5.3 Fehlen von OPA1 in Δ MIC10 führt zur Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran

Nach der Beobachtung an isolierten Mitochondrien, dass scheinbar eine gegenseitige Beeinflussung zwischen dem MIC10-Protein und den langen Formen bzw. Oligomeren der Dynamin-verwandten GTPase OPA1 besteht (Abb. 10 und 11) beschloss ich, diesen Aspekt in ganzen Zellen näher zu untersuchen, um mögliche Erklärungen für den vermehrten Gehalt an L-OPA1 in Δ MIC10 zu finden.

Hierfür wurden die Auswirkungen des Fehlens von MIC10 und/oder OPA1 auf die Cristae-Morphologie von Mitochondrien elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden HeLa-Zellen verwendet, da diese im Vergleich zu HEK293T ein deutlich ausgeprägteres mitochondriales Netzwerk besitzen. Die Elektronenmikroskopie (EM)-Bilder wurden dabei freundlicherweise von Sibylle Jungbluth angefertigt. Neben dem Wildtyp wurden Δ MIC10-Zellen auf eventuell bestehende Unterschiede ihrer Cristae-Morphologie hin analysiert. Zusätzlich wurde in beiden Zelllinien OPA1 durch Behandlung mit einer gegen die GTPase gerichteten siRNA ausgeschaltet, was dankenswerterweise von Dr. Alexander von der Malsburg übernommen wurde, um die Folgen des Fehlens von OPA1 auf die Cristae-Architektur sowohl im Wildtyp als auch in Δ MIC10-Zellen beurteilen zu können. Außerdem wurden von allen vier Bedingungen Ganzzelllysate angefertigt und mit diesen eine *SDS-PAGE* durchgeführt, um sicherzugehen, dass sowohl der *Knockout* von MIC10 als auch das Ausschalten von OPA1 mithilfe der siRNA erfolgreich waren. Hierbei zeigte sich, dass in den mit siRNA gegen OPA1 behandelten Zellen sowohl im WT als auch in Δ MIC10 wie erwartet keine OPA1-Banden mehr detektierbar sind (Abb. 12A). Dagegen ist das Protein Tubulin, welches die Hauptkomponente der Mikrotubuli ist, auch unter diesen Bedingungen detektierbar (Abb. 12A).

Bei Analyse der elektronenmikroskopischen Bilder konnten sechs verschiedene Cristae-Typen identifiziert werden, welche in Zusammenschau mit bereits publizierten Daten wie folgt bezeichnet werden können: lamellar (Abb. 12B), lamellar in fragmentierten Mitochondrien (Abb. 12C), tubulär (Abb. 12E), Zwiebel-förmig (Abb. 12D), diskonnektiert (Abb. 12F), sowie die gänzliche Abwesenheit von Cristae (Abb. 12G) [123]. Zu der Schlussfolgerung, dass manche der Mitochondrien dabei fragmentiert sind, komme ich dadurch, dass diese bei Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder geschwollen und deutlich kleiner als die übrigen Mitochondrien erscheinen (Abb. 12C). Ich konnte feststellen, dass die verschiedenen Cristae-Formen keineswegs in einem ausgeglichenen Verhältnis nebeneinander existieren. Vielmehr variiert das Verhältnis der verschiedenen Cristae-Typen zueinander in Abhängigkeit davon, ob es sich um den Wildtyp handelt, oder aber um Mitochondrien in Zellen, denen MIC10 und/oder OPA1 fehlt. Um eine valide Aussage über die beobachteten Unterschiede der Cristae-Morphologien unter den vier untersuchten Bedingungen treffen zu können, wurde eine quantitative Untersuchung der elektronenmikroskopisch gut identifizierbaren Mitochondrien vorgenommen und ihre jeweilige Cristae-Struktur einem der sechs Cristae-Typen zugeordnet (Abb. 12H).

Die Auswertung ergab, dass in Wildtyp-Zellen, welche ausschließlich mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden, 80% und somit die deutliche Mehrheit der Mitochondrien eine lamellare Cristae-Struktur aufweisen (Abb. 12B und H). Die restlichen 20% entfallen auf den lamellaren Typ in fragmentierten Mitochondrien, die zugleich geschwollen erscheinen, da sie ihre natürliche Konfiguration verloren haben und stattdessen eine kleinere und kreisrunde Form aufweisen (Abb. 12C und H).

In Wildtyp-Zellen, welche wie in Abb. 12A zu sehen ist, erfolgreich mit der gegen OPA1 gerichteten siRNA behandelt wurden, verschiebt sich das Verhältnis zwischen lamellaren Cristae und lamellaren Cristae in fragmentierten Mitochondrien deutlich. So stellen die lamellaren Cristae in fragmentierten Mitochondrien mit 63% nun den häufigsten Cristae-Typ dar (Abb. 12H). Die bei Anwesenheit von OPA1 noch in der Überzahl gewesenen lamellaren Cristae machen nun nur noch 14% aus (Abb. 12H). Die restlichen Prozente verteilen sich auf den tubulären Typ (11%), dessen Merkmal es ist, dass sich eine einzige Endomembran innerhalb des jeweiligen Mitochondriums befindet, welche an einzelnen Stellen noch Kontakte zur inneren Grenzmembran aufweist (Abb. 12E und H), sowie die diskonnektierte Form (7%), bei der eben jene Verbindungen zur inneren Grenzmembran nicht mehr bestehen (Abb. 12F und H). In 5% der Mitochondrien der Wildtyp-Zellen ohne OPA1 sind dagegen überhaupt keine Cristae mehr sichtbar (Abb. 12G und H).

Die quantitative Auswertung der Mitochondrien in Δ MIC10-Zellen, die ausschließlich mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden, zeigt, dass unter diesen Bedingungen der tubuläre Cristae-Typ mit 59% die deutlich dominierende Cristae-Morphologie ist (Abb. 12H). Die anderen Cristae-Typen in Δ MIC10 weisen zu etwa gleichen Anteilen den diskonnektierten (10,5%), den Zwiebel-förmigen (8%), sowie den lamellaren Typ (7%) auf. Nur 4% der Mitochondrien besitzt dagegen die typische Cristae-Morphologie der fragmentierten Mitochondrien, während in 11,5% der Organellen keine Cristae mehr detektierbar sind (Abb. 12H).

Schließlich wurden noch die Cristae in Δ MIC10 untersucht, welchen dank der erfolgreichen Behandlung mit siRNA OPA1 fehlt (Abb. 12A). Wiederum zeigte sich eine deutliche Verschiebung der Verteilung der sechs verschiedenen Cristae-Phänotypen. Mit 52% aller Mitochondrien macht nun der diskonnektierte Cristae-Typ die deutliche Mehrheit aus (Abb. 12H). Dagegen entfallen auf die tubuläre Cristae-Morphologie nur noch 20%. Die lamellaren (1%), zwiebelförmigen (2%) bzw. fragmentierten (3%) Formen sind dagegen kaum mehr ausmachbar. In 22% aller Mitochondrien sind überhaupt keine Cristae mehr detektierbar (Abb. 12H).

Somit bleibt festzuhalten, dass in Wildtyp-Zellen und somit unter physiologischen Bedingungen die lamellare Cristae-Struktur deutlich überwiegt, während das Fehlen von OPA1 in diesen Zellen zur Fragmentierung und Schwellung der Mitochondrien führt, wobei die Cristae-Morphologie als solche nach wie vor große Ähnlichkeit mit der lamellaren Struktur des Wildtyps besitzt (Abb. 12B, C und H). In Zelllinien, denen MIC10 fehlt, verschiebt sich das Verhältnis zugunsten des tubulären Cristae-Typs, bei dem eine einzelne Endomembran innerhalb des jeweiligen Mitochondriums vorliegt, welche nur noch an wenigen Stellen über einen Kontakt mit der inneren Grenzmembran verfügt (Abb. 12E und H). Diese Kontakte zwischen der Endomembran und der inneren Grenzmembran scheinen dagegen bei zusätzlichem Fehlen von OPA1 in Δ MIC10 verloren zu gehen, da nun die diskonnektierte Cristae-Morphologie vorherrschend ist (Abb. 12F und H).

Die beschriebenen Beobachtungen stellen einen möglichen Erklärungsansatz für die eingangs gestellte Frage dar, welchen Einfluss MIC10 auf die OPA1-Prozessierung hat (Abb. 10 und 11). So lässt sich aus der elektronenmikroskopischen Untersuchung ableiten, dass die langen OPA1-Formen womöglich für die Aufrechterhaltung der wenigen Kontakte der tubulären Cristae mit der inneren Grenzmembran in Δ MIC10 verantwortlich sind und diese stabilisieren (Abb. 12E). Diese Kontakte scheinen dagegen bei zusätzlichem Ausschalten von OPA1 verloren zu gehen, da die tubulären Cristae nun keine Stabilisierung durch L-OPA1 mehr erfahren.

Gleichzeitig ergibt sich aus dieser Schlussfolgerung eine neue Frage: Wie verhält es sich in Δ MIC10-Zellen mit der Aktivität der in den Cristae-Membranen lokalisierten Atmungskettenkomplexe, wenn das gleichzeitige Ausschalten von OPA1 zur Ablösung der tubulären Cristae von der inneren Grenzmembran führt und somit der direkte Kontakt zwischen den Cristae und dem übrigen Intermembranraum verloren zu gehen scheint? Um der Antwort näherzukommen, beschloss ich, den Sauerstoffverbrauch der Zellen unter denselben vier Bedingungen wie bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung zu bestimmen, um Rückschlüsse auf die Aktivität der Atmungskette ziehen zu können.

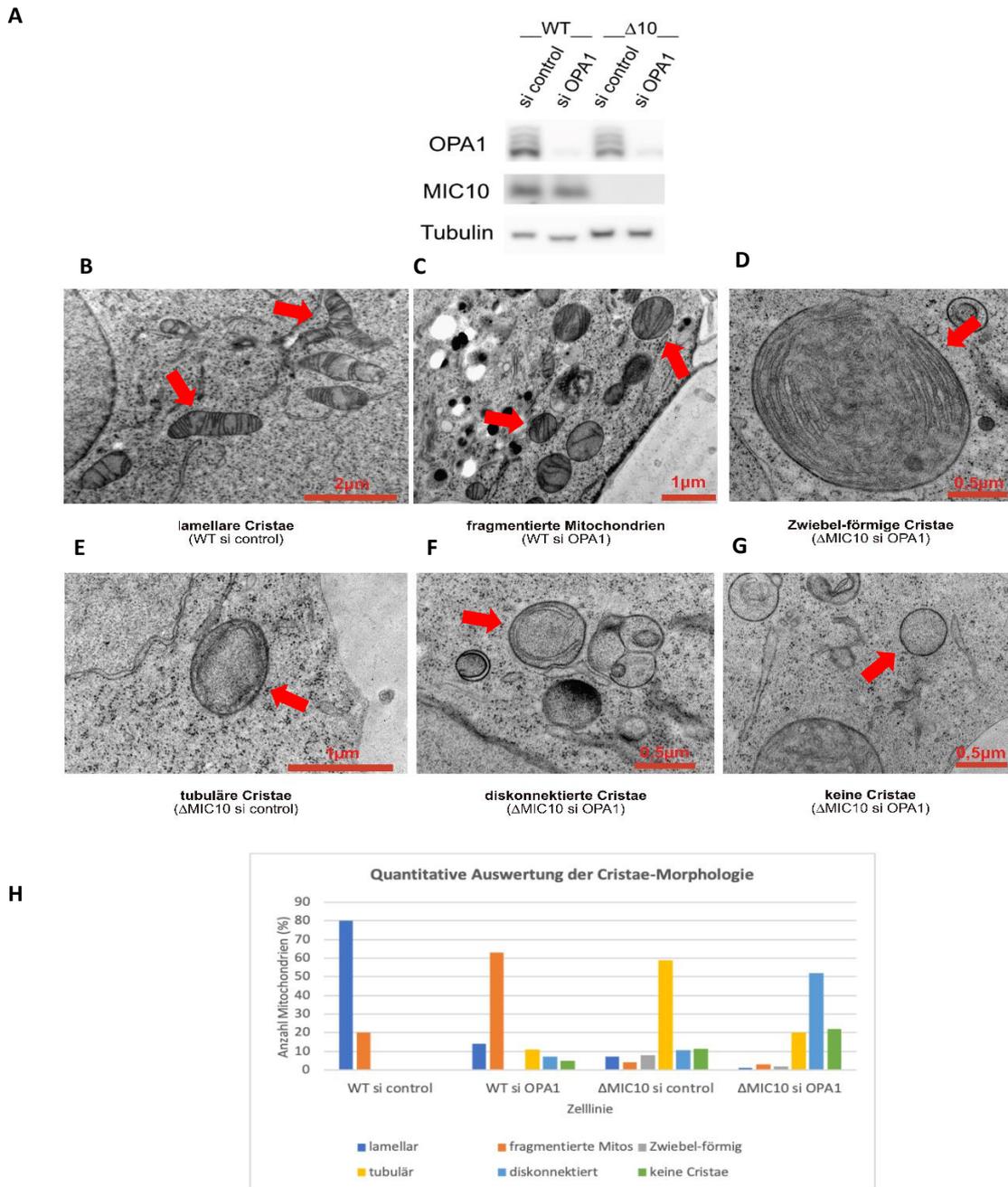


Abbildung 12: Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran bei Ausschalten von OPA1 in Δ MIC10

Abb. 12 Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran bei Ausschalten von OPA1 in Δ MIC10

A: Wildtyp und Δ MIC10 der Zelllinie HeLa wurden mit gegen OPA1 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72-stündiger Inkubation wurde ein Ganzzelllysat durchgeführt und die Proteine anschließend mittels *SDS-PAGE* gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei 30 μ g pro Spur aufgetragen wurden. Via *Western Blot* und Chemilumineszenz-*Immunoassay* wurden die jeweiligen Proteine sichtbar gemacht.

B-G: Wildtyp und Δ MIC10 der Zelllinie HeLa wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Saphirscheibchen wachsen gelassen, bevor sie mit gegen OPA1 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert wurden. Anschließend wurden von ihnen elektronenmikroskopische Bilder angefertigt.

H: Durch Auswertung der EM-Bilder vom Wildtyp bzw. Δ MIC10 mit/ohne OPA1 wurden die verschiedenen Mitochondrien analysiert und ihre Cristae-Morphologie quantitativ erfasst.

WT = Wildtyp, Δ 10 = Δ MIC10, si control = transfiziert mit Kontroll-siRNA, si OPA1 = transfiziert mit gegen OPA1 gerichteter siRNA

5.4 Fehlen von OPA1 in Δ MIC10-Zellen führt zur Reduktion des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Um auf die Frage, wie es sich mit der Aktivität der Atmungskettenkomplexe in Δ MIC10-siOPA1-Zellen verhält, eine Antwort zu finden, wurde beschlossen eine detaillierte Untersuchung des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sowie des O_2 -Verbrauchs unter ATP-produzierenden Bedingungen durchzuführen. Hierfür wurde der Wildtyp als Norm für mitochondriale Respiration unter physiologischen Bedingungen mit Zelllinien, denen MIC10 und/oder OPA1 fehlt verglichen, indem HeLa-Zellen nacheinander mit den Inhibitoren der Atmungskette Oligomycin, FCCP und Rotenon zusammen mit Antimycin A behandelt wurden. Dabei handelt es sich bei Oligomycin um einen Inhibitor der ATP-Synthase, während FCCP als Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette fungiert. Rotenon und Antimycin A blockieren dagegen Komplex I bzw. III der Atmungskette. Mittels des *Seahorse XFe96 Analyzers* der Firma *Agilent*, welcher durch automatisierte Zugabe der oben genannten Inhibitoren zu lebenden Zellen dazu in der Lage ist, verschiedenste Parameter der mitochondrialen Respiration zu messen, konnten schließlich quantitative Aussagen über die mitochondriale Atmung getroffen werden (s. Kap. 4.2.15 für detaillierte Erklärung zum Versuchsablauf). Um sicherzugehen, dass der *Knockout* von MIC10, sowie die von Dr. Alexander von der Malsburg durchgeführte Transfektion der Zellen mit gegen OPA1 gerichteter siRNA erfolgreich waren, wurden von den Zellen zusätzlich Ganzzelllysate angefertigt (Abb. 13C), sodass das Fehlen der Proteine im Rahmen einer *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot* nachgewiesen werden konnte. Die Abwesenheit der OPA1-Banden in den mit siRNA behandelten Zellen zeigt dabei, dass die Transfektion erfolgreich war (Abb. 13C). Weiterhin sind sowohl das zytosolische Protein Tubulin, sowie das mitochondriale TOM40 unter allen vier verwendeten Bedingungen in etwa gleicher Intensität detektierbar (Abb. 13C).

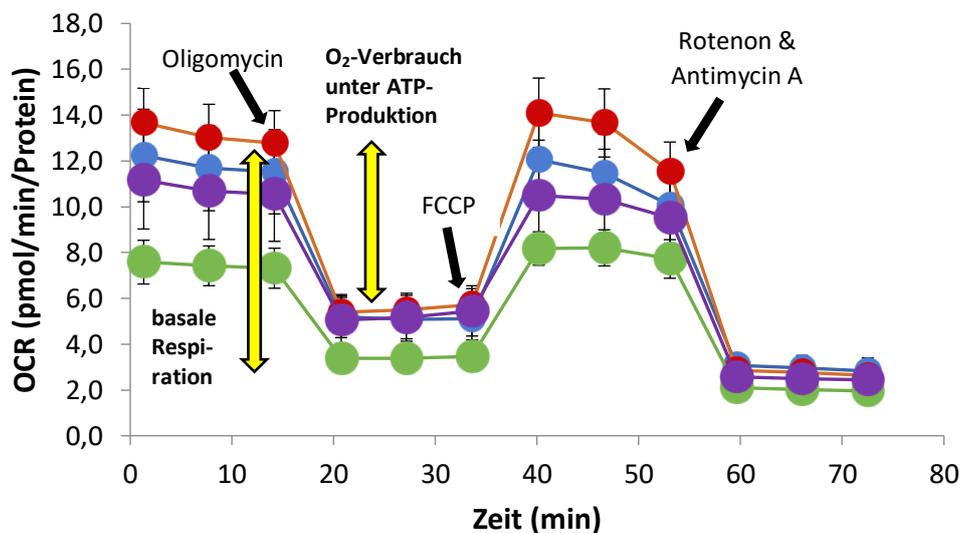
Erwartungsgemäß war der basale mitochondriale Sauerstoffverbrauch, genauso wie der O_2 -Verbrauch unter ATP-Produktion in den Wildtyp-Zellen und somit unter physiologischen Bedingungen am höchsten (Abb. 13A und B). Dagegen waren beide Parameter in Wildtyp-Zellen, welche erfolgreich mit der gegen OPA1 gerichteten siRNA behandelt wurden (Abb. 13C), um knapp 15 % reduziert (Abb. 13A und B). In Δ MIC10-Zellen sank der basale Sauerstoffverbrauch um 20 % und der O_2 -Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen um gut 25 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13A und B). Besonders drastisch waren die Auswirkungen in Zellen, denen neben dem MIC10-Protein auch OPA1 fehlt. Hier war sowohl der basale Sauerstoffverbrauch als auch der O_2 -Verbrauch unter ATP-Produktion auf nur noch 53 % des gemessenen Ausgangswertes im Wildtyp reduziert (Abb. 13A und B).

In Kombination mit den Erkenntnissen der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Cristae-Morphologie (s. Kap. 5.3), lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die überwiegend lamellare Cristae-Struktur des Wildtyps (Abb. 12B) die besten Bedingungen für die Aktivität der in den Cristae lokalisierten Atmungskettenkomplexe bietet (Abb. 13A und B). Demgegenüber führt die fragmentierte Mitochondrien-Morphologie in Wildtyp-Zellen (Abb. 12C), bei denen das OPA1-Protein ausgeschaltet

wurde, zur Reduktion um etwa 15 % was den basalen Sauerstoffverbrauch und den O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen betrifft (Abb. 13A und B). In Δ MIC10, deren Mitochondrien überwiegend tubuläre Cristae besitzen, welche nur noch an einigen wenigen Stellen Kontakt mit der inneren Grenzmembran aufweisen (Abb. 12E), beträgt der basale Sauerstoffverbrauch, sowie der O₂-Verbrauch unter ATP-Synthese immerhin noch 80 bzw. 75 % des Wildtyp-Niveaus (Abb. 13A und B). Dagegen führt die Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran (Abb. 12F), wie sie in HeLa-Zellen, denen sowohl MIC10 als auch OPA1 fehlt, beobachtet werden kann, zur deutlichen Reduktion des basalen Sauerstoffverbrauchs und des O₂-Verbrauchs unter ATP-Produktion auf nur noch 53% der Werte im Wildtyp (Abb. 13A und B). Somit scheinen die durch das Ausschalten von OPA1 in Δ MIC10 verloren gegangenen Kontaktstellen zwischen der inneren Grenzmembran und den Cristae zur Folge zu haben, dass die Aktivität der in den Cristae-Membranen lokalisierten Atmungskettenkomplexe stark beeinträchtigt wird. Daraus ergibt sich die Frage, ob der sinkende basale Sauerstoffverbrauch sowie der stark reduzierte O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen in Δ MIC10-siOPA1-Zellen, damit zu erklären ist, dass die gekappte Verbindung der Cristae von der inneren Grenzmembran den Verlust von Proteinen der Atmungskette zur Folge hat, was einen Erklärungsansatz für die beobachteten Messwerte darstellen würde. Alternativ könnten die deutlich reduzierten Werte aber auch damit zu erklären sein, dass die Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran weniger den quantitativen Verlust von Atmungskettenproteinen zur Folge hat, sondern vielmehr als Ausdruck einer deutlich reduzierten Effektivität der Atmungskette unter diesen Bedingungen gewertet werden kann. Diese beiden Hypothesen wurden daher in einem sich anschließenden Experiment auf ihre Gültigkeit hin überprüft.

A

Mitochondriale Respiration



WT si control WT si OPA1 Δ MIC10 si control Δ MIC10 si OPA1

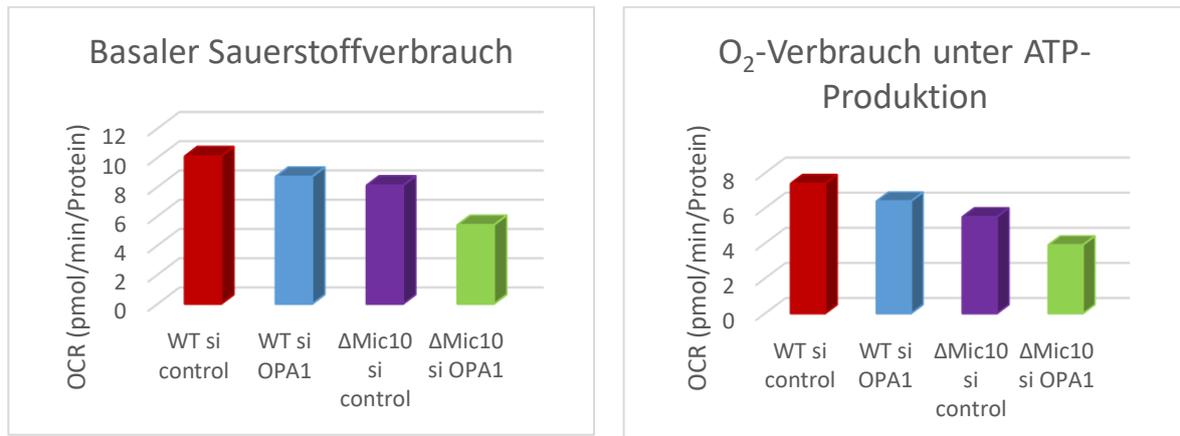
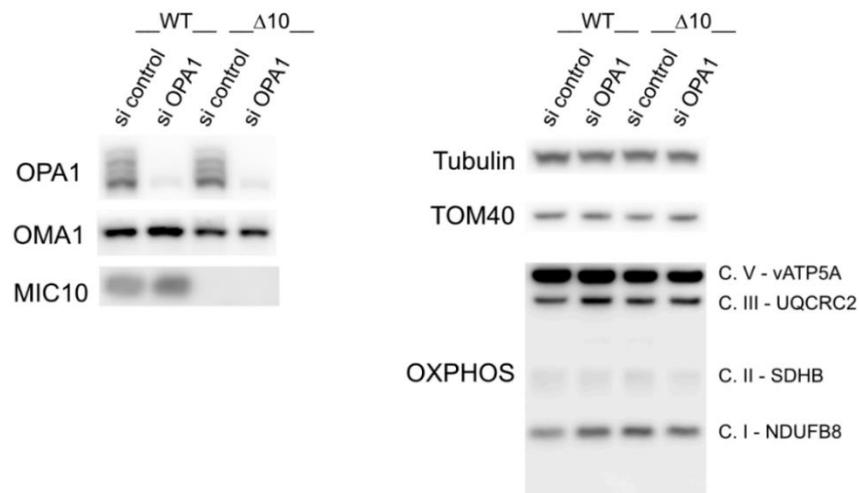
B**C**

Abbildung 13: Basaler Sauerstoffverbrauch und O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen in ΔMIC10-si OPA1-Zellen am niedrigsten

Abb. 13 A+B Basaler Sauerstoffverbrauch und O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen in ΔMIC10-si OPA1-Zellen am niedrigsten: Sowohl der Wildtyp als auch ΔMIC10 der Zelllinie HeLa wurden mit gegen OPA1 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Schließlich wurde ihr basaler Sauerstoffverbrauch, sowie der O₂-Verbrauch unter ATP-Produktion mithilfe des *Seahorse XFe96 Analyzers* gemessen und die Werte graphisch dargestellt.

C Kein Verlust von Atmungskettenproteinen in ΔMIC10-si OPA1: Es wurde ein Ganzzelllysate mit den transfizierten Zellen der *Seahorse*-Messung durchgeführt. Es folgte eine *SDS-PAGE*, wobei 30 µg pro Spur aufgetragen wurden. Schließlich wurden die Proteine mittels *Western Blot* und Chemilumineszenz-Immunoassay sichtbar gemacht.

Atmungsketten-Proteine, gegen die der „Total OXPHOS-AK“ gerichtet ist: C. V – vATP5A: ATP Synthase Untereinheit α des Komplexes V; C. III – UQCRC2: Cytochrom b-c1 Komplex Untereinheit 2 des Komplexes III; C. II – SDHB: Succinat-Dehydrogenase Untereinheit B des Komplexes II; C. I – NDUFB8: NADH-Dehydrogenase β Subkomplex Untereinheit 8 des Komplexes I

WT = Wildtyp, Δ10 = ΔMIC10, si control = transfiziert mit Kontroll-siRNA, si OPA1 = transfiziert mit gegen OPA1 gerichteter siRNA

5.5 Menge an Atmungskettenproteinen in Δ MIC10-si OPA1-Zellen auf Wildtyp-Niveau

Um eine Aussage über die Proteine der Atmungskette, der in Δ MIC10-si OPA1-Zellen diskonnektierten Cristae treffen zu können, wurden Proben von den Zellen abgenommen, bei denen der basale Sauerstoffverbrauch gemessen wurde (s. Kap. 5.4) und mit diesen ein Ganzzelllysats mit sich anschließender *SDS-PAGE* durchgeführt. Schließlich konnten nach Durchführung eines *Western Blots* einzelne Proteine der Atmungskette mithilfe eines Antikörpers gegen die ATP-Synthase Untereinheit α des Komplexes V, die Cytochrom b-c1 Komplex Untereinheit 2 des Komplexes III, die Succinat-Dehydrogenase Untereinheit B des Komplexes II sowie die NADH-Dehydrogenase β Subkomplex Untereinheit 8 des Komplexes I beurteilt werden (Abb. 13C). Anders als bei der Arbeit mit isolierten Mitochondrien (Abb. 10), war die Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 des Komplexes IV bei Durchführung einer *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot* mit Ganzzelllysaten nicht detektierbar (Abb. 13C). Es zeigte sich, dass die detektierbaren, jeweils für die einzelnen Atmungskettenproteine stehenden Banden sowohl in den WT-siOPA1-Zellen als auch in Δ MIC10 mit und ohne OPA1 in ihrer Intensität auf dem Niveau des Wildtyps liegen (Abb. 13C).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Hypothese verworfen werden kann, nach der der beobachtete, stark verringerte basale Sauerstoffverbrauch bzw. die Reduktion des O_2 -Verbrauchs unter ATP-produzierenden Bedingungen in Δ MIC10-siOPA1-Zellen (Abb. 13A und B) Folge eines Verlusts von Atmungskettenproteinen im Zuge der Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran sind. Damit stützt sie die zweite aufgestellte Hypothese, nach der die bei der Sauerstoffverbrauchsmessung festgestellten reduzierten Werte (Abb. 13A und B) das Resultat sind einer verringerten Effektivität der mitochondrialen Atmungskette in Δ MIC10-Zellen, denen OPA1 fehlt.

5.6 Keine Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen MICOS und OPA1

In Δ MIC10 hat sich sowohl auf dem *SDS*- und *BN*-Gel, bei denen die L-OPA1-Isoformen und die OPA1-Oligomere im Vergleich zum Wildtyp bzw. Δ MIC60 in starker Intensität detektierbar sind (Abb. 10 und 11), als auch im Rahmen der Elektronenmikroskopie und der Messung des basalen Sauerstoffverbrauchs (Abb. 12 und 13) gezeigt, dass MIC10 Einfluss auf die OPA1-Prozessierung haben könnte. Daher interessierte mich, ob eine direkte physikalische Interaktion zwischen dem MICOS-Komplex und OPA1 besteht.

Um zu untersuchen, ob eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen MICOS und OPA1 besteht, wurde neben dem Wildtyp und Δ MIC10-MIC10-FLAG-Zellen, auch Δ MIC25-MIC25-FLAG-

sowie FLAG-SAM50-Zellen im Rahmen einer IP untersucht, um neben dem MIC10-Subkomplex, mit dem MIC25-Protein auch den MIC60-Subkomplex, sowie den MIB-Komplex auf eine eventuell bestehende direkte, physische Interaktion mit OPA1 hin zu analysieren.

Die Δ MIC10-MIC10-FLAG- sowie Δ MIC25-MIC25-FLAG-Zelllinien wurden hierbei von Dr. Alexander von der Malsburg erzeugt, indem endogenes MIC10 bzw. MIC25 deletiert und stattdessen eine FLAG-getaggte Version des Proteins ins Genom integriert wurde. In die Zelllinie FLAG-SAM50 wurde dagegen zusätzlich zum endogenen SAM50 noch FLAG-getaggtetes SAM50 integriert. Dies erklärt, weswegen in dieser Zelllinie jeweils zwei statt nur einer Proteinbande auf der Blot-Membran bei Verwendung des SAM50-Antikörpers detektierbar sind (Abb. 14).

Es wurden aus den oben genannten Zellen die Mitochondrien isoliert und mit diesen eine Immunpräzipitation durchgeführt. Es folgte eine *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot* zur Darstellung der Proteine. Bei den Total-Spuren handelt es sich um die Gesamtheit aller in den jeweiligen Mitochondrien vorkommenden Proteine. In den Eluat-Spuren werden dagegen nur diejenigen Proteine detektiert, welche an den jeweiligen FLAG-getaggteten Proteinen binden und somit eine direkte, physische Interaktion mit ihnen aufweisen.

In den Total-Spuren aller untersuchten Zelllinien waren dabei sämtliche zum MICOS-Komplex gehörenden Proteine, sowie OPA1, OMA1, YME1L und TOM40 detektierbar (Abb. 14). Zudem sind in den Eluat-Spuren sowohl in Δ MIC10-MIC10-FLAG-Mitochondrien als auch in Δ MIC25-MIC25-FLAG- sowie FLAG-SAM50-Mitochondrien physikalische Interaktionen mit allen zum MIC10- bzw. MIC60-Subkomplex sowie dem MIB-Komplex gehörenden Proteinen nachweisbar (Abb. 14). Auffällig ist hierbei, dass die Δ MIC25-MIC25-FLAG-Mitochondrien deutlich weniger MIC19 co-präzipitieren als bspw. MIC10 oder SAM50 (Abb. 14). MIC60 ist dagegen im Eluat überall in gleicher Intensität detektierbar (Abb. 14).

In den Eluat-Spuren, welche mit dem Antikörper gegen TOM40 behandelt wurden, ließ sich in keiner der untersuchten Zelllinien das TOM40-Protein und somit keine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung nachweisen (Abb. 14).

Es zeigte sich weiterhin, dass im Eluat weder in Δ MIC10-MIC10-FLAG- noch in Δ MIC25-MIC25-FLAG- oder FLAG-SAM50-Zellen OPA1 detektierbar ist (Abb. 14).

Somit bleibt festzuhalten, dass ich keine direkte Interaktion zwischen MICOS und OPA1 nachweisen konnte, und zwar weder mit MIC10 noch mit MIC25, welches ein wichtiger Partner von MIC60 ist und somit Rückschlüsse auf den MIC60-Subkomplex erlaubt. Auch zwischen OPA1 und dem Kanalprotein SAM50 als wichtige Komponente des MIB-Komplexes, konnte keine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung festgestellt werden (Abb. 14).

Ebenjenes Bild präsentiert sich auch bei Begutachtung des Eluats nach Behandlung der *Blot*-Membran mit einem gegen OMA1 bzw. YME1L gerichteten Antikörper. Auch hier ist keine Proteinbande in den

jeweiligen Eluat-Spuren wahrnehmbar (Abb. 14), sodass sich schlussfolgern lässt, dass auch zwischen OMA1 bzw. YME1L und MICOS keine direkte Interaktion zu bestehen scheint.

Da sich unter basalen Bedingungen, worunter ich die physiologisch vorliegende Homöostase humaner Zellen ohne die Einwirkung externer Stimuli wie Hitze oder übermäßige Membrandepolarisierung verstehe, somit keine direkte physikalische Interaktion zwischen dem MICOS-Komplex und OPA1 feststellen lässt (Abb. 14), die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung, sowie der Messung des basalen Sauerstoffverbrauchs jedoch Anlass dazu geben, dass diese beiden Schlüsselspieler der Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Morphologie durchaus miteinander agieren und aufeinander reagieren (Abb. 12 und 13), beschloss ich, mitochondrialen Stress zu erzeugen. Hierunter erhoffte ich mir, weitere Rückschlüsse auf die Art der Wechselbeziehung zwischen dem MICOS-Komplex und OPA1 ziehen zu können.

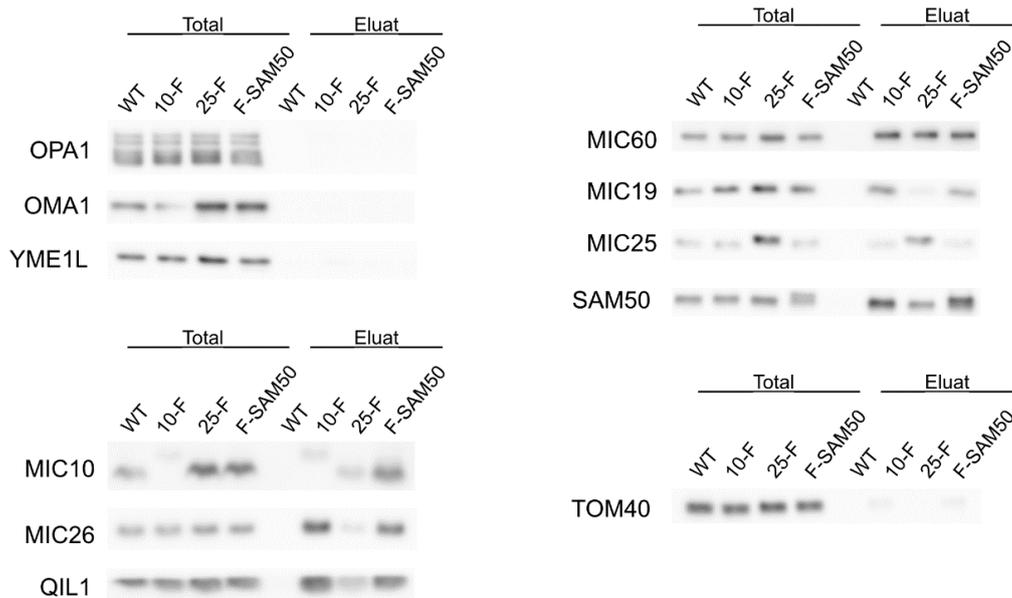


Abbildung 14: Keine detektierbare physikalische Interaktion zwischen MICOS und OPA1

Abb. 14 Keine detektierbare physikalische Interaktion zwischen MICOS und OPA1: Um eine womöglich bestehende Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen MICOS und OPA1 nachzuweisen, wurden Mitochondrien der Zellen WT, Δ MIC10-MIC10-FLAG, Δ MIC25-MIC25-FLAG und FLAG-SAM50 der Zelllinie HEK293T isoliert. Mit ihnen wurde eine Immunpräzipitation mit sich anschließender SDS-PAGE durchgeführt, wobei 10 μ g pro Spur aufgetragen wurden. Via Western Blot und Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die jeweiligen Proteine schließlich dargestellt.

WT = Wildtyp, 10-F = Δ MIC10-MIC10-FLAG, 25-F = Δ MIC25-MIC25-FLAG, F-SAM50 = FLAG-SAM50, Total = alle in den Mitochondrien lokalisierten Proteine, Eluat = Proteine, die eine physikalische Interaktion miteinander aufweisen

5.7 Mitochondrialer Stress führt zur Prozessierung von OPA1 und OMA1

Um zunächst die Auswirkungen von mitochondrialem Stress auf OPA1 und OMA1 zu untersuchen, wurden Zellen der Zelllinie HEK293T konfluent wachsen gelassen und anschließend mit 50 μM FCCP, einem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Um auszuschließen, dass eventuell zu beobachtende Unterschiede auf DMSO, in welchem das FCCP gelöst ist, zurückzuführen sind, wurden zudem auch Zellen mit ausschließlich DMSO für ebenfalls zwei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die mit dem Entkoppler bzw. nur mit DMSO behandelten Zellen geerntet und ein Ganzzelllysat gemacht. Schließlich wurden die denaturierten Proteine im Rahmen einer *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot* weiter untersucht.

Das sich im Zytosol befindliche Tubulin, sowie das zur HSP70-Familie gehörende, mitochondriale Protein HSPA9, erfahren unter Behandlung mit FCCP keine auf der Blot-Membran detektierbaren Veränderungen (Abb. 15).

Es zeigte sich dagegen, dass die oberen beiden OPA1-Banden, die L-OPA1 repräsentieren, nach Behandlung der Zellen mit 50 μM FCCP für zwei Stunden nicht mehr nachweisbar sind und sich das Gleichgewicht stattdessen hin zu ausschließlich kurzen OPA1-Banden verschiebt (Abb. 15).

Weiterhin ist zu beobachten, dass auch die Metalloprotease OMA1, welche die langen OPA1-Formen an der Schnittstelle S1 schneidet, sodass kurze OPA1-Formen entstehen können, ebenfalls eine Veränderung unter FCCP-Behandlung erfährt. So ist nach Entkoppler-Zugabe zusätzlich zur auch unter basalen Bedingungen nachweisbaren, bei etwa 43 kDa laufenden OMA1-Bande, eine weitere, kürzere OMA1-Bande detektierbar, welche bei etwa 37 kDa läuft (Abb. 15). Zudem fällt auf, dass die Signalintensität der prozessierten Form von OMA1 nach FCCP-Behandlung stark abnimmt (Abb. 15).

Somit bleibt festzuhalten, dass sowohl die mitochondriale Metalloprotease OMA1 als auch deren Zielprotein, die GTPase OPA1, bei Zugabe von FCCP eine Prozessierung hin zu kürzeren Formen durchlaufen (Abb. 15). Auf die Proteine MIC10 bzw. MIC60 scheint die Zugabe des Entkopplers FCCP für zwei Stunden dagegen keine unmittelbaren Auswirkungen zu haben.

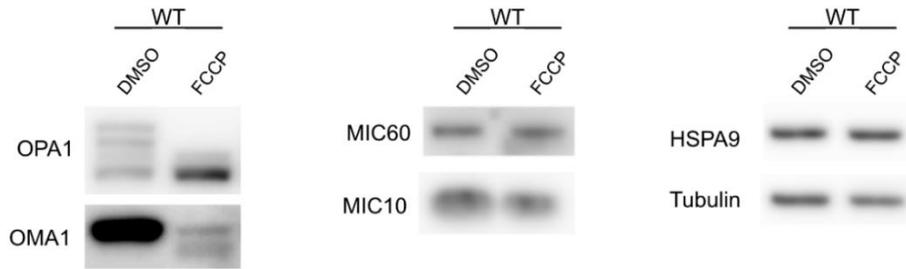


Abbildung 15: Prozessierung von OMA1 und OPA1 unter mitochondrialem Stress

Abb. 15 Prozessierung von OMA1 und OPA1 unter mitochondrialem Stress: Um die Auswirkungen mitochondrialen Stresses auf OMA1 und OPA1 zu untersuchen, wurde der Wildtyp der HEK293T-Zelllinie mit 50 μM FCCP für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde ein Ganzzelllysate mit folgender *SDS-PAGE* durchgeführt, wobei 30 μg pro Spur aufgetragen wurden. Schließlich wurden die jeweiligen Proteine via *Western Blot* und Chemilumineszenz-Immunoassay sichtbar gemacht.

WT = Wildtyp

5.8 Destabilisierung von MICOS sowie OMA1- und OPA1-Oligomeren unter Membrandepolarisierung

Nach der Beobachtung, dass sich unter basalen Bedingungen keine direkte Interaktion zwischen MICOS und OPA1 im Rahmen einer Immunpräzipitation nachweisen lässt (Abb. 14), interessierte mich, wie sich die Proteine verhalten, wenn man sie mitochondrialem Stress aussetzt.

Da sich unter basalen Bedingungen zudem gezeigt hat, dass zwischen MIC10 und OPA1, trotz fehlender direkter Protein-Protein-Wechselwirkung (Abb. 14), ein gewisser Zusammenhang zu bestehen scheint was die Aufrechterhaltung der tubulären Cristae-Morphologie (Abb. 12), sowie das Verhältnis zwischen L-/S-OPA1 betrifft (Abb. 10 und 11), entschloss ich, neben dem Wildtyp auch ΔMIC10 -Zellen der Zelllinie HEK293T näher zu untersuchen.

Hierfür wurden konfluente Wildtyp- und ΔMIC10 -Zellen jeweils für zwei Stunden mit 50 μM FCCP bzw. DMSO bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das gebrauchte Medium gegen Frisches ersetzt, woraufhin die Zellen für weitere acht Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Nach diesen acht Stunden wurden die Zellen geerntet und die Mitochondrien aus den mit FCCP bzw. nur mit DMSO behandelten Zellen isoliert. Schließlich führte ich mit den Mitochondrien eine *BN-PAGE* mit anschließendem *Western Blot* durch, um die Proteinkomplexe in ihrer nativen Form darzustellen.

Es zeigte sich, dass der MICOS-Komplex im Wildtyp und ΔMIC10 nach Behandlung der Blot-Membran mit einem gegen MIC60, MIC10, MIC26 bzw. MIC27 gerichteten Antikörper nach Zugabe des Entkopplers FCCP in geringeren Mengen detektierbar ist im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit

DMSO behandelt wurden (Abb. 16). Die TOM40 enthaltenden Komplexe erfahren dagegen keine sichtbaren Veränderungen unter FCCP-Einwirkung (Abb. 16).

Weiterhin konnte gezeigt werden, wie bereits im Rahmen einer *SDS-PAGE* beobachtet (Abb. 10), dass die MIC26 und MIC27 enthaltenden Komplexe in Δ MIC10 im Vergleich zum Wildtyp in deutlich geringeren Mengen nachweisbar sind (Abb. 16). Bei zusätzlicher FCCP-Behandlung von Δ MIC10-Zellen scheinen die detektierbaren Mengen an MIC26 und MIC27 enthaltenden Komplexen schließlich noch weiter abzufallen. Der MIC26 enthaltende Komplex ist nun gar nicht mehr auf der *BN-PAGE* erkennbar und auch der MIC27 enthaltende Proteinkomplex erscheint in deutlich schwächerer Intensität (Abb. 16). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass in mit FCCP-behandelten Δ MIC10-Zellen bei Dekoration mit einem gegen MIC27 gerichteten Antikörper die bei etwa 69 kDa laufende Bande verschwunden, während die bei etwa 230 kDa laufende Bande weiterhin detektierbar ist (Abb. 16).

Auch die OPA1-Oligomere sind nach Behandlung der Zellen mit FCCP im Vergleich zur ausschließlichen Behandlung mit DMSO in deutlich schwächerer Intensität nachweisbar (Abb. 16). Hierbei scheint es keinen gravierenden Unterschied zwischen entkoppeltem Wildtyp und Δ MIC10 zu geben, da die Intensitätsabnahme der Proteinbanden in beiden FCCP-Spuren ähnlich stark ausfällt (Abb. 16).

Bei Untersuchung der OMA1-Oligomere fällt neben der bereits beschriebenen Auffälligkeit, dass OMA1 in Δ MIC10 im Vergleich zum Wildtyp in geringeren Mengen detektierbar ist (Abb. 11), auf, dass weder im Wildtyp noch in Δ MIC10 OMA1-Oligomere nach Zugabe von FCCP wahrnehmbar sind (Abb. 16).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sowohl der MICOS-Komplex als auch OPA1- und OMA1-Oligomere durch mitochondrialen Stress destabilisiert zu werden scheinen (Abb. 16).

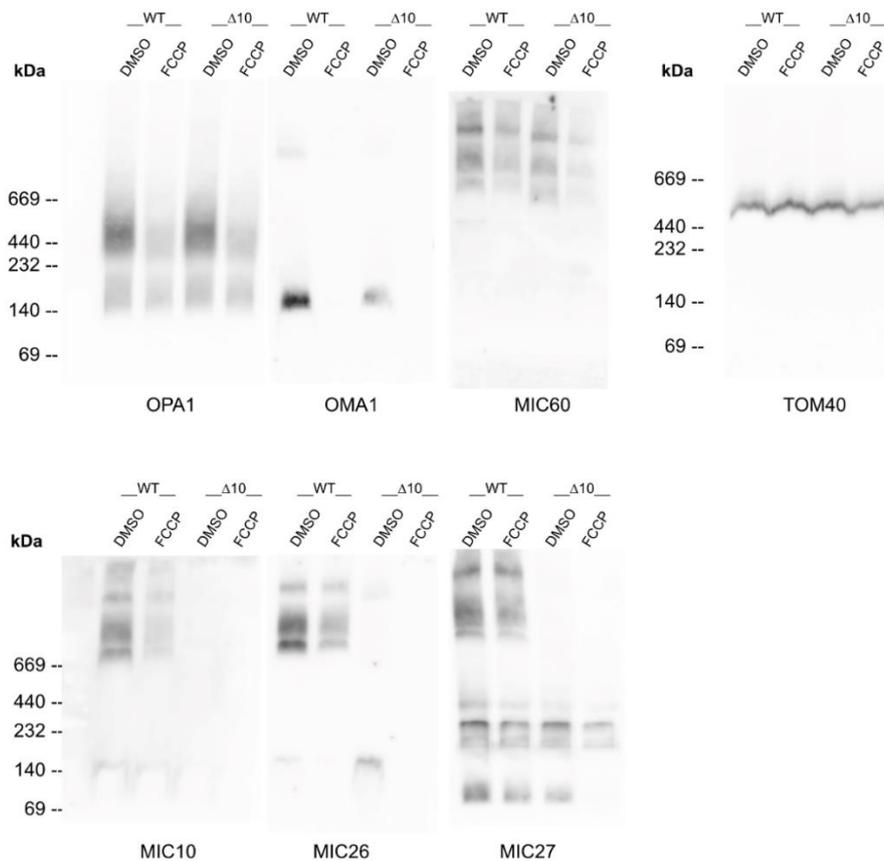


Abbildung 16: Destabilisierung von MICOS sowie OPA1- und OMA1-Oligomeren unter mitochondrialem Stress

Abb. 16 Destabilisierung von MICOS sowie OPA1- und OMA1-Oligomeren unter mitochondrialem Stress:

Um die Auswirkungen mitochondrialen Stresses auf den MICOS-Komplex und die OMA1- und OPA1-Oligomere zu untersuchen, wurde der Wildtyp sowie Δ MIC10 der Zelllinie HEK293T für zwei Stunden mit 50 μ M FCCP inkubiert. Anschließend wurde das FCCP enthaltende Medium abgenommen und durch Frisches ersetzt, woraufhin die Zellen für acht Stunden regenerierten. Es folgte die Isolation der Mitochondrien, mit denen dann eine *BN-PAGE* durchgeführt wurde, wobei 70 μ g pro Spur aufgetragen wurden. Via *Western Blot* und Antigen-Antikörper-Reaktion wurden die jeweiligen Proteinkomplexe schließlich dargestellt.

WT = Wildtyp, Δ 10 = Δ MIC10

5.9 Destabilisierung von MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 unter mitochondrialem Stress

Nach der Beobachtung im Rahmen der *BN-PAGE*, dass sowohl der MICOS-Komplex als auch OPA1- und OMA1-Oligomere durch mitochondrialen Stress mit sich anschließender achtstündiger Regeneration destabilisiert zu werden scheinen (Abb. 16), interessierte mich, welche MICOS-Untereinheiten genau für diese Destabilisierung verantwortlich sind und ob dabei alle Proteine beeinflusst werden, oder nur bestimmte. Zum anderen wollte ich wissen, wie sich eventuell bestehende Protein-Destabilisierungen nach mitochondrialem Stress darstellen, wenn man den Zellen die Gelegenheit gibt über einen längeren Zeitraum zu regenerieren.

Hierfür wurden Wildtyp und Δ MIC10-Zellen der Zelllinie HEK293T in 6-well-Platten konfluent wachsen gelassen und bei gewünschter Zelldichte für zwei Stunden mit 50 μ M FCCP bei 37 °C inkubiert, um mitochondrialen Stress zu erzeugen. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde das gebrauchte Medium durch Frisches ersetzt und die Zellen zur Regeneration zurück in den 37 °C-Inkubator überführt. Nun wurden jeweils zu den Zeitpunkten 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden nach zweistündiger FCCP-Behandlung Zellen geerntet und bei -20 °C weggefroren. Anschließend wurde mit den Proben ein Ganzzelllysat gemacht, um die Proteine daraufhin im Rahmen einer SDS-PAGE mit folgendem *Western Blot* gelelektrophoretisch auftrennen zu können.

Wie bereits beobachtet, führt die Behandlung der Zellen mit FCCP zur Prozessierung der langen OPA1-Formen, sodass ausschließlich kurze OPA1-Banden detektierbar sind (Abb. 15 und 17). Weiterhin bestätigte sich die Beobachtung, dass auch OMA1 nach Zugabe von FCCP eine Veränderung vollzieht und eine zweite, einige Dalton kleinere Bande erscheint (Abb. 15 und 17). Die für die Prozessierung von OPA1 an S2 verantwortliche Protease YME1L erfährt dagegen keine gravierende Veränderung nach FCCP-Zugabe (Abb. 17). Auch HSPA9 bleibt nach Zugabe des Entkopplers stabil (Abb. 17).

Dagegen scheint, anders als im Rahmen der *BN-PAGE*, bei der man den MIC60-Komplex in seiner nativen Form untersucht hat (Abb. 16), die FCCP-Behandlung im Wildtyp keinen größeren Einfluss auf die detektierbaren Mengen an MIC60 zu haben (Abb. 17). Ähnliches zeigt sich auch bei den restlichen zum MIC60-Subkomplex gehörenden Proteinen MIC19 und MIC25, sowie dem zum SAM-Komplex gehörenden Kanalprotein SAM50, die allesamt ebenfalls keine Destabilisierung im Wildtyp nach Zugabe des mitochondrialen Entkopplers zu durchlaufen scheinen (Abb. 17).

Demgegenüber steht jedoch eine deutliche Destabilisierung von MIC10 im Wildtyp nach FCCP-Behandlung, die ihr Maximum interessanterweise nicht direkt nach der zweistündigen Entkoppler-Zugabe hat, sondern am stärksten nach acht- bis zehnstündiger Regeneration ausgeprägt ist (Abb. 17). Bemerkenswert ist zudem die Tatsache, dass die beobachtete MIC10-Destabilisierung im Wildtyp reversibel zu sein scheint und die Intensität der MIC10-Banden nach etwa 20 Stunden auf ähnlichem Niveau ist wie in Wildtyp-Zellen, die ausschließlich mit DMSO behandelt wurden (Abb. 17). Es fällt zudem auf, dass die MIC10-Regeneration scheinbar in eben jenem Zeitfenster abgeschlossen ist, in dem auch die langen OPA1-Banden erstmals nach FCCP-Behandlung wieder detektierbar sind (Abb. 17). Dagegen zeigt sich im Wildtyp keine erkennbare Destabilisierung der übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine MIC26, MIC27 und QIL1 nach FCCP-Behandlung (Abb. 17).

In Δ MIC10-Zellen ist dagegen sowohl bei MIC26 als auch bei MIC27 nach FCCP-Zugabe jeweils eine zweite, um einige Dalton kleinere Bande detektierbar, während die unter basalen Bedingungen wahrnehmbare, höher laufende Bande an Intensität verliert (Abb. 17). Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den kürzeren Banden in Δ MIC10 um Spaltprodukte von MIC26 bzw. MIC27 handelt. Auch QIL1 scheint bei Abwesenheit von MIC10 nach Behandlung mit FCCP destabilisiert zu werden,

da auch hier deutlich geringere Proteinmengen detektierbar sind. Ein Spaltprodukt wie bei MIC26 und MIC27 ist hier jedoch nicht wahrnehmbar (Abb. 17).

Bemerkenswerterweise scheint auch die MIC26, MIC27 und QIL1-Destabilisierung in Δ MIC10-Zellen reversibel zu sein, da auch hier nach 16- bis 18-stündiger Regeneration die ursprünglichen Proteinbanden wieder in vergleichbarer Intensität wie in den ausschließlich mit DMSO behandelten Zellen detektierbar sind (Abb. 17). Im Falle von MIC26 und MIC27 sind auch die vermeintlichen Spaltprodukte in Δ MIC10 mit zunehmender Regenerationszeit in geringeren Mengen detektierbar (Abb. 17), was die Hypothese stärkt, dass es sich bei diesen leichteren und daher weiter im Gel wandernden Banden um das Resultat einer Prozessierung von MIC26 und MIC27 nach FCCP-Behandlung in Δ MIC10 handelt.

Anzumerken ist zudem, dass auch in den Δ MIC10-Zellen die vollständige Regeneration der destabilisierten MICOS-Proteine MIC26, MIC27 und QIL1 in eben jenem Zeitfenster abgeschlossen zu sein scheint, in dem auch die langen OPA1-Formen nach FCCP-Behandlung erstmals wieder detektierbar sind (Abb. 17).

Die zum MIC60-Subkomplex gehörenden Proteine MIC60, MIC19 und MIC25 erfahren in Δ MIC10-Zellen ebenfalls eine vorübergehende, reversible Destabilisierung, welche am stärksten zwischen 10 und 12 Stunden nach FCCP-Behandlung ausgeprägt ist (Abb. 17). Das SAM50-Protein erfährt dagegen auch in Δ MIC10-Mitochondrien keine deutliche Destabilisierung unter mitochondrialem Stress (Abb. 17)

Somit lässt sich abschließend festhalten, dass MIC10 im Wildtyp durch mitochondrialen Stress destabilisiert zu werden scheint, während MIC26, MIC27 und QIL1, trotz Entkopplung der Atmungskette, bei Anwesenheit von MIC10 keine ersichtliche Destabilisierung erfahren. Demgegenüber führt mitochondrialer Stress bei gleichzeitigem *Knockout* von MIC10 zur Prozessierung von MIC26, MIC27 und QIL1 (Abb. 17). In Zusammenschau mit der Messung des Sauerstoffverbrauchs im Wildtyp und Δ MIC10-Zellen nach FCCP-Zugabe (Abb. 13A) lässt sich dabei folgender Zusammenhang feststellen: So ist die Sauerstoffverbrauchsrate vor FCCP-Zugabe sowohl im WT als auch in Δ MIC10 nahezu identisch (etwa 5 pmol/min/Protein) (Abb. 13A). Nach FCCP-Zugabe steigt sie im Wildtyp, trotz der in Abb. 17 festgestellten MIC10-Destabilisierung deutlich bis auf ungefähr 14 pmol/min/Protein an (Abb. 13A). Dagegen steigt der Sauerstoffverbrauch in Δ MIC10 bei Entkopplung der Atmungskette, was wie in Abb. 17 zu sehen zur Destabilisierung von MIC26, MIC27 und QIL1 führt, weit weniger deutlich an als im Wildtyp (auf nur ca. 10 pmol/min/Protein).

Darüber hinaus scheinen sowohl die MIC10-Destabilisierung im Wildtyp als auch die MIC26-, MIC27- und QIL1-Destabilisierung in Δ MIC10 nach Entkopplung der Atmungskette reversibel zu sein, wobei die jeweilige Regeneration der genannten MICOS-Proteine in eben jenem Zeitraum abgeschlossen ist, in dem auch erstmals wieder lange OPA1-Formen detektierbar sind (Abb. 17).

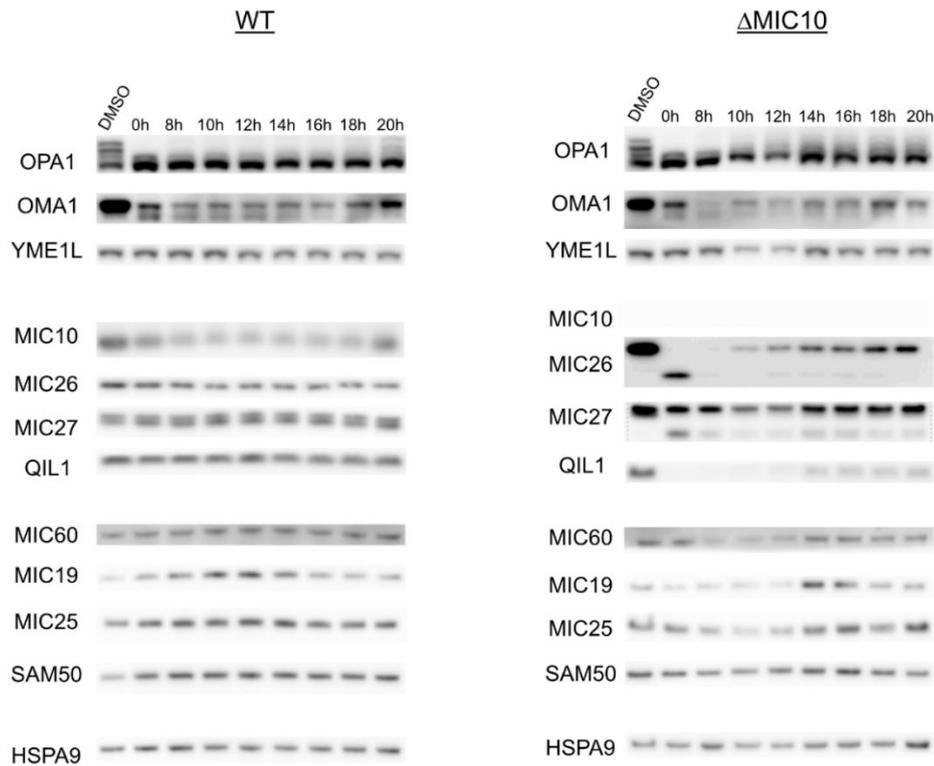


Abbildung 17: Destabilisierung von MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 unter mitochondrialem Stress

Abb. 17 Destabilisierung von MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 unter mitochondrialem Stress: Um die Auswirkungen mitochondrialen Stresses auf die einzelnen MICOS-Untereinheiten, sowie OMA1 und OPA1 zu untersuchen, wurde der Wildtyp sowie Δ MIC10 der Zelllinie HEK293T für zwei Stunden mit 50 μ M FCCP behandelt. Anschließend wurde das FCCP enthaltende Medium gegen Frisches ersetzt und die Zellen zur Regeneration zurück in den Inkubator überführt. Zu den Zeitpunkten 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden nach FCCP-Einwirkung wurden die jeweiligen Zellen geerntet. Es schloss sich ein Ganzzelllysate mit folgender SDS-PAGE an, wobei 30 μ g pro Spur aufgetragen wurden. Schließlich wurden die einzelnen Proteine via Western Blot und einem Chemilumineszenz-Immunoassay dargestellt.

WT = Wildtyp, Δ MIC10

6. Diskussion

6.1 Verminderte Prozessierung von L-OPA1 bei Fehlen von MIC10

Das Ergebnis meiner Untersuchung des MICOS-Komplexes zeigt, dass ich mit meinen Versuchsbedingungen sämtliche in der Literatur beschriebenen MICOS-Proteine in humanen Zellen, nämlich MIC60, MIC19, MIC25, MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1, nachweisen kann (Abb. 10). Dass das Fehlen von MIC10 zur Reduktion bzw. dem vollständigen Verlust der Proteine MIC26, MIC27 sowie QIL1 führt (Abb. 10), demonstriert darüber hinaus die in der Literatur beschriebene, besondere Rolle von MIC10 für die Stabilität des MICOS-Komplexes. Weiterhin bestätigen meine Resultate die herausragende Bedeutung des MIC60-Proteins für die Integrität des gesamten MICOS-Komplexes, da dessen *Knockout* zur Destabilisierung sämtlicher übriger zum Komplex gehörenden Proteine führt (Abb. 10). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ableiten, dass MIC10 und MIC60 die beiden Kernkomponenten des MICOS-Komplexes sind und deren Verlust gravierende Auswirkungen auf die Stabilität des gesamten Komplexes hat. Dabei scheinen speziell die Proteine MIC26, MIC27 und QIL1 eine direkte Abhängigkeit von MIC10 aufzuweisen, sodass sich schlussfolgern lässt, dass diese Teil des MIC10-Subkomplexes sind. Aus der Beobachtung, dass die Proteine MIC19 und MIC25 bei Abwesenheit von MIC10 in unveränderten Mengen detektierbar sind, während dagegen die Abwesenheit von MIC60 zur deutlichen Reduktion dieser beiden Proteine führt (Abb. 10), lässt sich außerdem ableiten, dass MIC60, MIC19 und MIC25 Bestandteile des MIC60-Subkomplexes sind.

All diese Beobachtungen bezüglich des MICOS-Komplexes und seiner Subkomplexe stehen im Einklang mit den Resultaten diverser anderer Gruppen in den vergangenen Jahren [4,35,53,57,131,134].

Weiterhin konnte ich bestätigen, dass der zum SAM-Komplex gehörige Kanal SAM50 auf die Anwesenheit von MIC60 angewiesen ist, da der *Knockout* von MIC60 in meinen Versuchen zur deutlichen Reduktion von SAM50 führte (Abb. 10). Damit konnte ich die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit zwischen dem in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten MICOS-Komplex und dem für den Einbau von β -barrel Proteinen in die äußere Membran zuständigen SAM-Komplex bestätigen. Diese Abhängigkeit wurde bereits von Ott et al., 2012 beschrieben, die dem beide Membranen umspannenden Komplex bestehend aus MICOS und SAM den Namen „*mitochondrial intermembrane space bridging complex* (MIB)“ gaben [95].

Als neue Erkenntnis habe ich herausfinden können, dass der Verlust von MIC60 nur geringe Auswirkungen auf die Prozessierung von L-OPA1 hat (Abb. 10). Dagegen konnte ich zeigen, dass die Abwesenheit von MIC10 zur verminderten Prozessierung von OPA1 führt, da in diesen Zellen die langen OPA1-Isoformen im Vergleich zum Wildtyp in stärkerer Intensität detektierbar sind, wobei insbesondere Bande b, welche wie Bande a eine Mischung aus verschiedenen, langen OPA1-Isoformen

darstellt [63,121], deutlich stärker als im Wildtyp nachweisbar ist (Abb.10). Diese Erkenntnis weist auf eine möglicherweise bestehende gegenseitige Beeinflussung zwischen dem MICOS-Protein MIC10 und OPA1 hin, weswegen ich beschloss, diese näher zu untersuchen. Zukünftig wäre es darüber hinaus von Interesse, welche proteolytische Prozessierung betroffen ist, wenn Bande b „akkumuliert“. Darüber hinaus wäre es interessant zu testen, wie sich andere Substrate der betreffenden Protease in Δ MIC10 verhalten bzw. ob diese wie OPA1 ebenfalls durch die Abwesenheit von MIC10 beeinflusst werden.

6.2 Verminderte OMA1-Expression in Δ MIC10 schützt OPA1 vor Prozessierung

Um die von mir beobachtete verminderte Prozessierung von OPA1 in Δ MIC10 (Abb. 10) besser verstehen zu können, beschloss ich mir die OPA1-Oligomere, sowie die stressensitive Metalloprotease OMA1, welche als Schlüsselspieler der OPA1-Prozessierung an der Schnittstelle S1 fungiert, im Rahmen einer *BN-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot* in ihrer nativen Form anzusehen (Abb. 11) [55]. Hierbei konnte ich erstmals zeigen, dass die Stabilität der OPA1-Oligomere, trotz des *Knockouts* von MIC10, vergleichbar mit der des Wildtyps ist (Abb. 11). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung erhielt ich bei der Untersuchung der OMA1-Oligomere sowie des OMA1-Proteins im Rahmen einer *BN-* bzw. *SDS-PAGE* in diesen Zellen. So konnte ich beobachten, dass die OMA1-Oligomere bzw. das OMA1-Protein in Δ MIC10-Zellen in geringerer Intensität detektierbar sind als im Wildtyp (Abb. 11A und B). Da OMA1 laut Literatur entscheidend an der Prozessierung der langen OPA1-Isoformen beteiligt ist, würde ein verminderter Gehalt an OMA1 in Δ MIC10 erklären, weshalb OPA1 in diesen Zellen eine verminderte Prozessierung erfährt. Ich vermute daher, dass in Δ MIC10-Zellen weniger OMA1 exprimiert wird, um OPA1 vor einer Prozessierung durch die Metalloprotease zu schützen und als Konsequenz daraus die Zellen vor mitochondrialer Teilung, Fragmentierung oder gar Apoptose bewahrt werden. Um diese Hypothese auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wäre es in Zukunft darüber hinaus interessant zu testen, ob die mRNA-Menge von OMA1 in Δ MIC10 ebenfalls geringer ist oder sich dieser von mir beobachtete Effekt nur auf Proteinebene darstellt. Alternativ könnte man davon ausgehen, dass OMA1 in Δ MIC10 in stressaktivierter Form vorliegt, welche wiederum eine geringere Stabilität aufweist (Abb. 15 und 17), was erklären würde, weshalb OMA1 schwächer detektierbar ist (Abb. 11). Die verminderte OPA1-Prozessierung in Δ MIC10 (Abb. 10, 11 und 16) spricht jedoch gegen eine Stressaktivierung von OMA1 und stützt damit die Hypothese, nach der in Δ MIC10 verminderte Mengen an OMA1 exprimiert werden.

Nachdem ich eine mögliche Erklärung für die verminderte Prozessierung von OPA1 in Δ MIC10-Zellen gefunden hatte, beschloss ich mich der Frage zu widmen, welche spezifische Funktion die langen OPA1-Formen in Δ MIC10 ausüben, um zu verstehen, weshalb dort ein hoher Gehalt an L-OPA1 physiologisch sinnvoll ist.

6.3 Stabilisierung der *crista junctions* in Δ MIC10 durch L-OPA1

Um der Frage nachzugehen, welche Funktion der vermehrte Gehalt von L-OPA1 in Δ MIC10 hat, untersuchte ich die Morphologie der Cristae in Zellen denen MIC10 und/oder OPA1 fehlt elektronenmikroskopisch (Abb. 12). Die Bilder der Elektronenmikroskopie wurden dabei freundlicherweise von Sibylle Jungbluth angefertigt. Die Transfektion der Zellen mit siRNA erfolgte durch Dr. Alexander von der Malsburg.

Im Vergleich zu den überwiegend lamellaren Cristae des Wildtyps (Abb. 12B und H), wiesen die Cristae in Δ MIC10-Zellen eine deutlich veränderte Cristae-Morphologie auf. Diese repräsentierten sich mehrheitlich als eine einschichtige, kreisförmige Endomembran innerhalb des jeweiligen Mitochondriums, welche nur an wenigen Stellen über *crista junctions* verfügt, die sie wiederum mit der inneren Grenzmembran verbinden (Abb. 12E und H). Genauso wie Stephan et al., 2020, die ebenfalls die mitochondriale Cristae-Architektur in Δ MIC10-Zellen untersucht haben, vermute ich, dass diese wenigen verbliebenen Verbindungen zwischen den Cristae der Δ MIC10-Zellen und der inneren Grenzmembran durch die Anwesenheit der langen OPA1-Isoformen aufrechterhalten wird und dies eine mögliche Erklärung für die verminderte Prozessierung von L-OPA1 in Δ MIC10 sein könnte [117]. Um meine Hypothese auf ihre Richtigkeit hin zu untersuchen, beschloss ich, OPA1 mithilfe einer gegen die GTPase gerichteten siRNA in Δ MIC10-Zellen auszuschalten (Abb. 12A). Wie erwartet, hatte dies zur Folge, dass die wenigen, in Δ MIC10 verbliebenen *crista junctions* durch das zusätzliche Ausschalten von OPA1 verloren gingen, sodass es zur Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran kam (Abb. 12F und H).

Somit komme ich zu dem Schluss, dass die verminderte Prozessierung von L-OPA1 in Δ MIC10 darin begründet liegt, dass diese zur Aufrechterhaltung der verbliebenen *crista junctions* benötigt werden und deren Verlust zur Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran führen würde. Um letzteres zu verhindern, erscheint es daher durchaus logisch, dass in Δ MIC10 verminderte Mengen an OMA1 exprimiert werden, wie ich im Rahmen einer SDS- sowie BN-PAGE herausgefunden habe (Abb. 10, 11 und 16), da ein erhöhter Gehalt an aktiviertem OMA1 eine vermehrte Prozessierung von OPA1 zur Folge hätte mit dramatischen Konsequenzen für die Architektur der gesamten inneren Mitochondrienmembran. Diese Erkenntnisse, die ich durch die elektronenmikroskopische Untersuchung gewinnen konnte, stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Stephan et al., 2020, welche zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Cristae-Morphologie in Δ MIC10-Zellen kommen [123].

Ich komme nach meinen bisherigen Beobachtungen zu dem Schluss, dass OPA1 offensichtlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung der mitochondrialen Cristae-Struktur beteiligt ist, indem es die *crista junctions* zu stabilisieren vermag. Außerdem vermute ich, dass Zellen als Reaktion auf eine gefährdete Architektur der inneren Mitochondrienmembran wie dies bspw. in Δ MIC10-Zellen der Fall ist, zum Schutze der *crista junctions* verringerte Mengen an OMA1 exprimieren. Darüber, wie genau dabei die

Kommunikation zwischen Mitochondrien und dem Zellkern erfolgt, sodass verminderte Mengen an OMA1 in Δ MIC10-Zellen exprimiert werden, kann ich an dieser Stelle nur mutmaßen, da in der Literatur verschiedene Kommunikationswege zwischen Mitochondrien und dem Zellkern beschrieben werden. So kann die Kommunikation zwischen den beiden Organellen bspw. über diverse Signalkaskaden ablaufen, sowie über Proteine, die in beiden Zellkompartimenten lokalisiert sind oder aber über die Erkennung mitochondrialer Produkte durch Kernproteine [31]. Es bedarf daher in Zukunft weiterer Forschung, um zu klären, wie genau die Kommunikation zwischen Mitochondrien und dem Zellkern erfolgt, sodass verminderte Mengen an OMA1 in Δ MIC10-Zellen exprimiert werden.

Alternativ zur Hypothese einer verminderten OMA1-Expression in Δ MIC10 ist es allerdings auch möglich, dass die proteolytische Aktivität von OMA1 von der Membrankrümmung abhängig ist. Da diese bei Abwesenheit des Proteins MIC10, welche normalerweise für diese Krümmung verantwortlich ist, fehlen würde, wäre OMA1 in diesem Fall nicht mehr dazu in der Lage, L-OPA1 zu prozessieren, mit der Folge, dass diese Dynamin-verwandte GTPase weiterhin an der Stabilisierung der *crista junctions* in Δ MIC10 mitwirken könnte. Eine Krümmungsabhängigkeit der OMA1-Aktivität könnte man hierbei bspw. durch Rekonstitution in Liposomen von unterschiedlichem Durchmesser nachweisen. In diesem Falle ließen sich die im Rahmen der SDS- und BN-PAGE vermindert detektierbaren Mengen an OMA1 in Δ MIC10 (Abb. 10, 11 und 16) damit erklären, dass es sich bei OMA1 prinzipiell um ein sehr instabiles Protein handelt. Weitere Untersuchungen sind in Zukunft notwendig, um abschließend klären zu können, was die genaue Ursache dafür ist, dass OPA1 in Δ MIC10 offensichtlich eine verminderte Prozessierung durch OMA1 erfährt.

6.4 *Crista junctions* als Voraussetzung für optimale mitochondriale Respiration in Δ MIC10

Da in den Cristae die Komplexe der Atmungskette lokalisiert sind, ging ich als nächstes der Frage nach, wie es sich mit der Aktivität der Atmungskettenkomplexe in Zellen, denen MIC10 und/oder OPA1 fehlt, verhält. Hierfür verglich ich den basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, sowie den O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen in den jeweiligen Zellen als Kenngrößen für die Aktivität der Atmungskette, indem ich diese Parameter mithilfe des „Seahorse XFe96 Analyzer“ durch Zugabe verschiedener Inhibitoren bzw. Entkopplern der Atmungskette quantitativ erfasste (Abb. 13).

Aus der Tatsache, dass sowohl der von mir gemessene basale Sauerstoffverbrauch als auch der O₂-Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen von allen von mir gewählten Bedingungen im Wildtyp am höchsten war (Abb. 13B), lässt sich ableiten, dass die im Wildtyp hauptsächlich vorherrschende, lamellare Cristae-Morphologie (Abb. 12B und H) die besten Voraussetzungen für eine

optimale mitochondriale Respiration bietet. Da das Ausschalten von OPA1 im Wildtyp mithilfe einer siRNA (Abb. 13C) weiterhin nur zur Reduktion um etwa 15% des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und des O₂-Verbrauchs unter ATP-produzierenden Bedingungen führte (Abb. 13B), komme ich außerdem zu dem Schluss, dass die alleinige Abwesenheit von OPA1 nur geringe Auswirkungen auf die Effektivität der mitochondrialen Respiration hat und diese auch ohne die Anwesenheit von OPA1 erfolgreich ablaufen kann, ohne dass dies gravierende Folgen für die Energieversorgung der Zelle hätte.

Überraschenderweise beträgt sowohl der basale mitochondriale Sauerstoffverbrauch als auch der O₂-Verbrauch unter ATP-Produktion in Δ MIC10-Zellen immerhin noch 80 bzw. 75 % des Niveaus im Wildtyp und ist damit vergleichbar mit den Auswirkungen, die das Fehlen von OPA1 im Wildtyp auf die mitochondriale Respiration hat (Abb. 13B). Daraus leite ich ab, dass die wenigen verbliebenen *crista junctions* in Δ MIC10, welche durch L-OPA1 stabilisiert werden (s. Kap. 6.3), ausreichend sind, um einen adäquaten Ablauf der mitochondrialen Atmung zu gewährleisten.

Um die Notwendigkeit einer Verbindung zwischen der inneren Grenzmembran und den Cristae für einen optimalen Ablauf des Elektronentransports der Atmungskette zu überprüfen, sah ich mir auch die Auswirkungen des Ausschaltens von OPA1 auf die mitochondriale Respiration in Δ MIC10-Zellen an (Abb. 13). Wie erwartet führte das gleichzeitige Fehlen von OPA1 und MIC10 zum drastischen Einbruch des basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und des O₂-Verbrauchs unter ATP-produzierenden Bedingungen auf nur noch knapp über 50% der Ausgangswerte im Wildtyp (Abb. 13B). In Kombination mit meinen im Rahmen der Elektronenmikroskopie gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Cristae-Morphologie, lässt sich daraus ableiten, dass die Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran (Abb. 12F) als Folge des Ausschaltens von OPA1 in Δ MIC10 zu einer enormen Verschlechterung der mitochondrialen Respiration führt. Da die Ablösung der beiden Teile, aus denen sich die innere Mitochondrienmembran zusammensetzt, wiederum die Folge des Verlustes der *crista junctions* ist, welche in Δ MIC10 normalerweise durch L-OPA1 stabilisiert werden (s. Kap. 6.3), komme ich weiterhin zu dem Schluss, dass die Anwesenheit der *crista junctions* die Voraussetzung für eine optimale Funktionsweise der Atmungskette ist.

6.5 Reduzierte Effektivität der Atmungskette bei Verlust der *crista junctions*

Nach meinen Erkenntnissen, dass die Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran zum drastischen Einbruch der mitochondrialen Respiration führt (s. Kap. 6.3 und 6.4), stellte ich mir die Frage, ob die beobachteten Messwerte Folge eines quantitativen Verlusts von Proteinen ist, aus denen

sich die Atmungskette zusammensetzt, oder vielmehr als Ausdruck einer deutlich reduzierten Effektivität der Atmungskette unter diesen Bedingungen gewertet werden kann.

Um meine beiden aufgestellten Hypothesen auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, untersuchte ich einzelne Proteine der Atmungskette mithilfe eines gegen sie gerichteten Antikörpers im Rahmen einer *SDS-PAGE* mit anschließendem *Western Blot* (Abb. 13C). Ich stellte hierbei fest, dass sich die Quantität der untersuchten Atmungsketten-Proteine bei Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran keineswegs verringert, sondern vielmehr auf dem gleichen Niveau des Wildtyps liegt (Abb. 13C). Somit komme ich zu dem Schluss, dass die verringerte mitochondriale Respiration, die ich beim Verlust der *crista junctions* in Δ MIC10-siOPA1-Zellen feststellen konnte (Abb. 13B), nicht durch den quantitativen Verlust von Atmungsketten-Proteinen erklärt werden kann. Vielmehr scheint sie die Konsequenz einer deutlich verminderten Effektivität der Atmungskette infolge der Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran zu sein. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust der *crista junctions*, trotz der insgesamt konstant bleibenden Menge an Atmungsketten-Proteinen, destabilisierende Auswirkungen auf die Stabilität der Komplexe der Atmungskette hat, da allein mit der Analyse der Proteine der Atmungskette im Rahmen einer *SDS-PAGE* (Abb. 13C) keine qualitative Aussage über die Stabilität der Komplexe getroffen werden kann. So ist denkbar, dass es in Δ MIC10-siOPA1-Zellen zur Destabilisierung der Atmungskettenkomplexe kommt, trotz der insgesamt konstant bleibenden Menge an den aus ihnen bestehenden Proteinen (Abb. 13C). Dies würde ebenfalls den Elektronentransport der Atmungskette behindern und damit den deutlich reduzierten basalen Sauerstoffverbrauch in diesen Zellen erklären (Abb. 13B). Um diese Frage endgültig beantworten zu können, empfiehlt es sich daher, zukünftig die Stabilität der Atmungskettenkomplexe in Δ MIC10-siOPA1-Zellen im Rahmen einer *BN-PAGE* im Detail zu untersuchen.

6.6 Keine physikalische Interaktion zwischen MICOS bzw. MIB und OPA1

Nachdem ich herausfinden konnte, dass die GTPase OPA1 in Δ MIC10-Zellen für die Stabilität der *crista junctions* verantwortlich ist und deren Fehlen gravierende Auswirkungen sowohl auf die Architektur der inneren Mitochondrienmembran (Abb. 12E, F und H), als auch auf die Effektivität der Atmungskette hat (Abb. 13B und C), stellte ich mir die Frage, ob womöglich eine direkte, physikalische Interaktion zwischen OPA1 und dem MICOS-Komplex besteht. Um dieser Frage nachzugehen, untersuchte ich sowohl den MIC10-, als auch den MIC60-Subkomplex und SAM50 als Teil des MIB auf eventuell bestehende physikalische Interaktionen mit OPA1, sowie mit den an der Prozessierung der GTPase beteiligten Enzymen OMA1 und YME1L (Abb. 14).

Überraschenderweise konnte ich im Rahmen der durchgeführten Immunpräzipitation in WT-, Δ MIC10-MIC10-FLAG-, Δ MIC25-MIC25-FLAG- und FLAG-SAM50-Mitochondrien keine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen OPA1 und MICOS bzw. MIB nachweisen (Abb. 14). Dasselbe Ergebnis erhielt ich auch bei der Untersuchung möglicher physikalischer Interaktionen zwischen OMA1 bzw. YME1L und dem in den *crista junctions* lokalisierten MICOS-Komplex (Abb. 14). Damit konnte ich keine direkte physikalische Interaktion zwischen OPA1 und den an seiner Prozessierung beteiligten Proteasen OMA1 und YME1L auf der einen Seite und MICOS bzw. MIB auf der anderen Seite nachweisen. Mein Ergebnis steht damit im Widerspruch zu den Erkenntnissen von Barrera et al., 2016, sowie Glytsou et al., 2016, welche eine direkte physikalische Interaktion zwischen OPA1 und dem größten MICOS-Protein MIC60 nachweisen konnten [9,41]. Ebenso beschreiben Viana et al., 2021 eine Assoziation zwischen MIC60 und OMA1, womit deren Ergebnisse ebenfalls im Widerspruch zu meinen Resultaten stehen [128]. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen meinen Ergebnissen und den Erkenntnissen der genannten Gruppen ist, dass diese vermutlich andere Versuchsbedingungen für die Immunpräzipitation hatten als ich, sodass trotz meiner diesbezüglich negativen Ergebnisse nicht auszuschließen ist, dass eine schwache Interaktion zwischen OPA1 bzw. OMA1 und MIC60 bestehen könnte.

Auffällig war zudem die Tatsache, dass in Δ MIC25-MIC25-FLAG-Mitochondrien deutlich weniger MIC19 co-präzipitiert wurde als bspw. MIC10 oder SAM50, während MIC60 im Eluat in allen Spuren in gleicher Intensität detektiert werden konnte (Abb. 14). Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass MICOS-Komplexe bzw. der MIC60-Subkomplex in der Regel entweder überwiegend MIC19 oder aber MIC25 enthalten.

Abschließend stelle ich fest, dass unter basalen Bedingungen keine physikalische Interaktion zwischen MICOS und OPA1 nachweisbar ist (Abb. 14). Da meine Ergebnisse der Elektronenmikroskopie (Abb. 12), sowie der Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (Abb. 13) jedoch durchaus Anlass zur Vermutung geben, dass OPA1 und MICOS miteinander agieren, um eine intakte Cristae-Architektur (Abb. 12), sowie optimale Bedingungen für einen effizienten Ablauf des Elektronentransports der mitochondrialen Atmungskette (Abb. 13) zu gewährleisten, beschloss ich, mitochondrialen Stress zu erzeugen. Hiervon erhoffte ich mir, unter diesen extremen zellulären Bedingungen Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen OPA1 und MICOS ziehen zu können, welche unter basalen Bedingungen möglicherweise verborgen bleibt.

6.7 Aktivierung von OMA1 unter mitochondrialem Stress

Bevor ich mich mit einer möglicherweise bestehenden Interaktion zwischen MICOS und OPA1 unter mitochondrialem Stress befasste, widmete ich mich zunächst der Frage, welche allgemeinen Auswirkungen der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auf OPA1 und die stressensitive Metalloprotease OMA1 hat (Abb. 15).

Hierbei beobachtete ich im Rahmen einer *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot*, dass die unter basalen Bedingungen sichtbaren, beiden oberen OPA1-Banden, welche die langen OPA1-Isoformen repräsentieren, bei Erzeugung von mitochondrialem Stress verschwinden und sich das Verhältnis L-/S-OPA1 hin zu ausschließlich kurzen OPA1-Formen verschiebt (Abb. 15). Hieraus leite ich ab, dass OPA1 bei zellulärem Stress eine verstärkte Prozessierung erfährt, an deren Ende sämtliche langen Isoformen zu kurzen OPA1-Formen proteolytisch prozessiert wurden (s. Abb. 6 und 7). Mein Ergebnis steht dabei im Einklang mit den Erkenntnissen zahlreicher anderer Gruppen, welche ebenfalls eine verstärkte Prozessierung der langen OPA1-Isoformen hinzu ausschließlich kurzen Formen bei Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bzw. mitochondrialem Stress im Allgemeinen beobachten konnten [18,29,50,63].

Weiterhin stellte ich fest, dass auch die Metalloprotease OMA1, welche die langen OPA1-Isoformen an der Schnittstelle S1 schneidet, ebenfalls eine Veränderung bei Verlust des mitochondrialen Membranpotentials erfährt [55]. So beobachtete ich nach Zugabe des Entkopplers FCCP eine zweite, um einige Dalton kleinere OMA1-Bande, welche unter basalen Bedingungen nicht sichtbar ist (Abb. 15). In Zusammenschau mit den beobachteten Auswirkungen mitochondrialen Stresses auf die OPA1-Prozessierung (Abb. 15) schlussfolgerte ich, dass es einen Zusammenhang zwischen der unter Stress erscheinenden, zweiten OMA1-Bande und der verstärkten OPA1-Prozessierung gibt. So vermute ich, dass diese zweite, um einige Dalton kleinere OMA1-Bande die eigentlich aktive OMA1-Form repräsentiert, welche die langen OPA1-Isoformen an S1 schneidet (Abb. 7). Aufgrund der Tatsache, dass diese aktive OMA1-Form erst bei Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sichtbar wird, schließe ich weiterhin, dass OMA1 nur bei zellulärem Stress aktiv ist und an der OPA1-Prozessierung mitwirkt, während sie unter basalen Bedingungen ausschließlich in einem inaktiven Zustand vorliegt (Abb. 7). Meine Ergebnisse und Hypothesen sind vereinbar mit den Beobachtungen von Zhang et al., 2014, welche unter Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ebenfalls ein zweite, um ein paar Dalton kleinere OMA1-Form ausmachen konnten und die ebenfalls vermuten, dass es sich bei dieser kürzeren OMA1-Form um die eigentlich aktive Form der Metalloprotease handelt, welche nur in diesem Zustand dazu in der Lage ist, L-OPA1 an S1 zu schneiden [138].

Aufgrund der Tatsache, dass es sich als sehr schwierig herausstellte, die kurze OMA1-Form zu stabilisieren und ich verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten des Entkopplers FCCP ausprobieren musste, bevor es mir gelang, S-OMA1 zufriedenstellend darzustellen, vermute ich

weiterhin, dass die aktive OMA1-Form äußerst instabil ist und einen raschen Abbau erfährt. Zhang et al., 2014 machten offensichtlich ähnliche Beobachtungen, da auch sie eine rasche Degradierung der aktiven OMA1-Form beschreiben [138]. Die Tatsache, dass die Signalintensität der prozessierten OMA1-Form nach FCCP-Behandlung stark abnimmt (Abb. 15), kann ebenfalls als Hinweis auf eine geringere Stabilität gewertet werden. Alternativ könnte es jedoch auch sein, dass der von mir verwendete OMA1-Antikörper die prozessierte OMA1-Form deutlich schlechter erkennt.

Rainbolt et al., 2016 wiederum gelang es, den von mir und anderen beobachteten raschen Abbau von S-OMA1 zu erklären, indem sie nachweisen konnten, dass S-OMA1 bei Anwesenheit von ATP durch die Protease YME1L rasch abgebaut wird (Abb. 7), während es unter Membrandepolarisierung und vermindertem zellulären ATP-Gehalt gelingt, die aktive OMA1-Form zu stabilisieren [71].

Nachdem ich die in der Literatur beschriebenen Auswirkungen mitochondrialen Stresses auf die OPA1-Prozessierung und OMA1 bestätigen konnte, widmete ich mich der Frage, welche Auswirkungen die Erzeugung von Stress auf die Stabilität des MICOS-Komplexes sowie die der OPA1- und OMA1-Oligomere hat.

6.8 Destabilisierung von MICOS sowie OPA1- und OMA1-Oligomeren unter mitochondrialem Stress

Um die Auswirkung mitochondrialen Stresses auf die Stabilität des MICOS-Komplexes sowie die OPA1- und OMA1-Oligomere zu erforschen, untersuchte ich diese im Rahmen einer *BN-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot*. Da ich unter basalen Bedingungen weiterhin einen Zusammenhang zwischen MIC10 und OPA1 bei der Aufrechterhaltung der *crista junctions*, sowie einen effektiv ablaufenden Elektronentransport der Atmungskette feststellen konnte (Abb. 12 und 13), untersuchte ich neben dem Wildtyp auch Δ MIC10-Zellen auf Veränderungen unter Membrandepolarisierung hin (Abb. 16).

Ich stellte fest, dass der gesamte MICOS-Komplex im Wildtyp und Δ MIC10 bei Behandlung der Blot-Membran mit Antikörpern gegen MIC60, sowie gegen die zum MIC10-Subkomplex gehörenden MIC10, MIC26 und MIC27 eine deutliche Destabilisierung unter mitochondrialem Stress erfährt (Abb. 16). Die von mir beobachtete MICOS-Destabilisierung unter mitochondrialem Stress steht dabei im Einklang mit den Ergebnissen von Viana et al., 2021, welche ebenfalls eine Destabilisierung des MICOS-Komplexes bei Dekoration der Blot-Membran mit einem gegen MIC60 gerichteten Antikörper nach Zugabe des Entkopplers CCCP in MEFs beobachten konnten [128].

Weiterhin bestätigte ich die bereits von mir im Rahmen einer *SDS-PAGE* mit sich anschließendem *Western Blot* beobachtete Abhängigkeit von MIC26 und MIC27 vom MIC10-Protein (Abb. 10), da der

MICOS-Komplex bei Behandlung der Blot-Membran mit gegen die jeweiligen Proteine gerichteten Antikörper in Δ MIC10 in deutlich geringeren Mengen detektierbar ist und seine Stabilität bei zusätzlicher Erzeugung mitochondrialen Stresses weiter abnimmt (Abb. 16). Dies unterstreicht die bereits von mir festgestellte und auch in der Literatur mehrfach beschriebene große Bedeutung des MIC10-Proteins für die gesamte Stabilität des MIC10-Subkomplexes [53,57,131].

Interessanterweise konnte ich in mit FCCP behandelten Δ MIC10-Mitochondrien bei Behandlung der Blot-Membran mit einem MIC27-Antikörper beobachten, dass die bei etwa 69 kDa laufende Proteinbande verschwindet, während die bei etwa 230 kDa laufende Bande nach wie vor detektierbar ist (Abb. 16). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die normalerweise bei 69 kDa laufende Bande Monomeres oder Dimeres MIC27 repräsentiert, welches unter Membrandepolarisierung in Δ MIC10 proteolytisch verdaut wird und daher nicht mehr detektierbar ist.

Nachdem ich bei Durchführung einer *SDS-PAGE* mit folgendem *Western Blot* eine verstärkte Prozessierung der langen OPA1-Isoformen hin zu ausschließlich kurzen Formen unter Membrandepolarisierung beobachten konnte (Abb. 15), interessierte mich darüber hinaus, welche Auswirkungen diese Verschiebung des Gleichgewichts zwischen L-/S-OPA1 auf die Stabilität der OPA1-Oligomere hat. Im Rahmen einer *BN-PAGE* plus *Western Blot* stellte ich fest, dass die OPA1-Oligomere unter Stress eine deutliche Destabilisierung erfahren (Abb. 16). Daraus lässt sich ableiten, dass die langen OPA1-Isoformen essenziell für die Stabilität der OPA1-Oligomere sind, während die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen L-/S-OPA1 hin zu ausschließlich kurzen OPA1-Isoformen unter Membrandepolarisierung (Abb. 6 und 7) dazu führt, dass die Oligomere der GTPase destabilisiert werden. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Frezza et al., 2006 und Pellegrini et al., 2007, welche ebenfalls eine Destabilisierung der großen, L-OPA1 enthaltenden OPA1-Oligomere unter zellulärem Stress bzw. apoptotischen Stimuli beobachten konnten [33,100].

Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Destabilisierung der OPA1-Oligomere unter mitochondrialem Stress in Δ MIC10-Zellen etwa gleich stark ausfällt wie im Wildtyp (Abb. 16) und nicht bei Fehlen von MIC10 im Vergleich zum Wildtyp deutlich stärker ausfällt, wie ich es bei der MICOS-Destabilisierung bei Behandlung der Blot-Membran mit Antikörpern gegen MIC26 und MIC27 feststellen konnte (Abb. 16). Dies unterstreicht, dass OPA1 nicht nur unter basalen Bedingungen von großer Bedeutung in Δ MIC10 ist, wie ich es bereits im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchung sowie der Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs feststellen konnte (Abb. 12 und 13). Denn auch unter Stressbedingungen scheinen stabile OPA1-Oligomere von großer Wichtigkeit in Δ MIC10-Zellen zu sein.

Weiterhin beschloss ich, mir auch die Stabilität der OMA1-Oligomere unter Stress genauer anzusehen, nachdem ich im Rahmen einer *SDS-PAGE* plus *Western Blot* die aktivierte, um einige Dalton kleinere als die inaktive Metalloprotease OMA1 visuell darstellen konnte (Abb. 15). Hierbei gelang es mir, mein Ergebnis zu bestätigen, dass OMA1 in Δ MIC10-Zellen im Vergleich zum Wildtyp unter basalen

Bedingungen in geringeren Mengen exprimiert zu werden scheint (Abb. 11B und 16). Alternativ könnte man meinen, dass die geringen Mengen an OMA1-Oligomeren in Δ MIC10 Ausdruck einer Stressaktivierung der Metalloprotease mit sich rasch anschließendem Abbau der aktiven Form sind. Diese Stressaktivierung müsste jedoch zur Folge haben, dass L-OPA1 verstärkt zu S-OPA1 prozessiert wird mit einem daraus resultierenden verminderten Gehalt an OPA1-Oligomeren in Δ MIC10. Es ist jedoch genau das Gegenteil der Fall: Die OPA1-Oligomere sind in Δ MIC10 unter basalen Bedingungen in ebenso starker Intensität detektierbar wie im WT (Abb. 16). Daher komme ich zu dem Schluss, dass die verminderten Mengen an OMA1-Oligomeren in Δ MIC10 Ausdruck einer reduzierten OMA1-Expression sind.

Darüber hinaus stellte ich fest, dass mitochondrialer Stress zur drastischen Destabilisierung der OMA1-Oligomere führt, da sowohl im Wildtyp als auch in Δ MIC10 nach Zugabe des Entkopplers FCCP keine OMA1-Oligomere mehr detektierbar sind (Abb. 16). Ich vermute, dass die Ursache für die vollständige Destabilisierung der OMA1-Oligomere darin begründet liegt, dass die Entkopplung der Atmungskette zur Aktivierung der stresssensitiven Metalloprotease führt, welche äußerst instabil ist und rasch durch YME1L vollständig abgebaut wird [71], wie ich bereits im vorherigen Experiment (Abb. 15) feststellen konnte.

Abschließend komme ich zu dem Schluss, dass mitochondrialer Stress zur Destabilisierung des gesamten MICOS-Komplexes sowie der OPA1- und OMA1-Oligomere führt und dass die Aufrechterhaltung mitochondrialer Homöostase somit essenziell für die Integrität des MICOS-Komplexes sowie der OPA1- und OMA-Oligomere zu sein scheint.

6.9 Destabilisierung des MIC10-Subkomplexes unter mitochondrialem Stress

Um die im Rahmen der *BN-PAGE* beobachtete Destabilisierung des gesamten MICOS-Komplexes, sowie der OPA1- und OMA1-Oligomere unter Stress (Abb. 16) näher zu untersuchen und zu prüfen, ob eventuell ein Zusammenhang bei der Destabilisierung dieser Proteine besteht, sah ich mir als nächstes die Auswirkungen der Entkopplung der Atmungskette im Zeitverlauf an, wenn man dem Wildtyp sowie Δ MIC10-Zellen die Gelegenheit dazu gibt, sich im Anschluss an eine zweistündige Zugabe von 50 μ M FCCP vom Stressor zu regenerieren.

Es bestätigte sich hierbei die bereits beobachtete Erkenntnis, dass die Zugabe des Entkopplers FCCP zum Erscheinen einer zweiten, um einige Dalton kleineren OMA1-Bande führt (Abb. 15 und 17), welche vermutlich die eigentlich aktive OMA1-Form repräsentiert. Diese wiederum ist dann dazu in der Lage L-OPA1 an der S1-Schnittstelle proteolytisch zu prozessieren, sodass kurze OPA1-Isoformen entstehen können (Abb. 7) [55]. Letzteres konnte ich ebenfalls im Rahmen dieses Experiment bestätigen, da sich

die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen L-/S-OPA1 hin zu ausschließlich kurzen OPA1-Isoformen in eben jenem Zeitfenster abspielt, in dem auch die aktive OMA1-Form detektierbar ist (Abb. 17). Da diese Beobachtungen bezüglich OPA1 und OMA1 sowohl im Wildtyp als auch in Δ MIC10 identisch sind, scheint die Aktivierung von OMA1, sowie die daraus resultierende Prozessierung von OPA1 unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit des MIC10-Proteins zu sein (Abb. 17).

Während ich im Rahmen der *BN-PAGE* sowohl im Wildtyp als auch in Δ MIC10 noch eine deutliche Destabilisierung des MICOS-Komplexes nach FCCP-Zugabe mit sich anschließender achtstündiger Regeneration beobachten konnte (Abb. 16), zeigte sich bei Durchführung einer *SDS-PAGE* im Wildtyp überraschenderweise keine Reduktion des Gehalts an den zum MIC60-Subkomplex gehörenden Proteinen MIC60, MIC19 und MIC25 (Abb. 17). Auch in Δ MIC10 repräsentierte sich im Zeitverlauf nur eine geringfügige Destabilisierung der Proteine MIC60, MIC19 und MIC25 nach FCCP-Zugabe (Abb. 17), welche deutlich geringer ausfällt als man nach Analyse der *BN-PAGE* (Abb. 16) hätte erwarten können. Daraus leite ich ab, dass die Destabilisierung des MIC60-Subkomplexes unter mitochondrialem Stress, welche sowohl von mir und auch Viana et al., 2021 beobachtet werden konnte, keineswegs zum direkten Abbau der einzelnen Bestandteile des Subkomplexes führt. Vielmehr scheinen die einzelnen Proteine weiterhin in den Zellen in freier Form vorzuliegen (Abb. 17) [128]. Über die Ursache für meine Beobachtung, dass die MIC60-Proteine, trotz MICOS-Destabilisierung, nicht abgebaut werden, sondern weiterhin in freier Form innerhalb der Zellen vorzuliegen scheinen, kann ich an dieser Stelle nur spekulieren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Neusynthese von MIC60 zu aufwendig wäre, weshalb die Zelle auf den Abbau des Proteins verzichtet und stattdessen nach Verschwinden des mitochondrialen Stresses zum Neuaufbau des MIC60-Subkomplexes die ursprünglichen Proteine verwendet und sozusagen recycelt. Eine weitere Hypothese ist, dass MIC60, trotz Destabilisierung seiner Oligomere unter mitochondrialem Stress, aus dem Grund nicht abgebaut wird, da es bekanntlich essenziell für die Stabilität des gesamten MIC10-Subkomplexes ist und deren Abbau vermutlich auch den Verlust des zweiten MICOS-Subkomplexes zur Folge hätte [53,57,131].

Darüber hinaus stelle ich fest, dass mitochondrialer Stress offenbar keine Auswirkungen auf den MIB- bzw. SAM-Komplexes zu haben scheint, da bei Untersuchung des wichtigen Kanalproteins SAM50 weder im Wildtyp noch in Δ MIC10 Veränderungen bezüglich des quantitativen Gehalts des Kanalproteins beobachtet werden konnten (Abb. 17).

Interessanterweise konnte ich eine deutliche Destabilisierung des MIC10-Proteins im Wildtyp nach Zugabe des Entkopplers FCCP beobachten, welche ihr Maximum überraschenderweise nicht direkt nach FCCP-Zugabe hatte, sondern am stärksten nach acht- bis zehnstündiger Regeneration der Zellen ausgeprägt war (Abb. 17). Bemerkenswert ist zudem, dass die MIC10-Destabilisierung scheinbar reversibel ist, da der quantitative MIC10-Gehalt nach etwa 20stündiger Regeneration wieder auf demselben Niveau wie unter basalen Bedingungen ist (Abb. 17). Auffällig ist zudem, dass die Regeneration von MIC10 in ebenjenem Zeitfenster abgeschlossen ist, in dem auch erstmals wieder lange

OPA1-Isoformen detektiert sind (Abb. 17). Auf die übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine MIC26, MIC27 und QIL1 scheint die Erzeugung mitochondrialen Stresses im Wildtyp dagegen keine Auswirkungen zu haben, da ihr quantitativer Gehalt im Zeitverlauf konstant blieb (Abb. 17).

Ein anderes Bild repräsentierte sich dagegen in den Δ MIC10-Zellen, in denen ich eine drastische Destabilisierung mit sich anschließendem Abbau der Proteine MIC26, MIC27 und QIL1 nach Entkoppler-Zugabe beobachten konnte, wobei ich im Falle von MIC26 und MIC27 sogar die vermutlichen Spaltprodukte dieses Abbaus nachweisen konnte (Abb. 17). Auch hier konnte ich darüber hinaus feststellen, dass die Destabilisierung der zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine in Δ MIC10 reversibel ist, wobei die vollständige Regeneration erneut in eben jenes Zeitfenster der Rückkehr der langen OPA1-Isoformen fällt (Abb. 17).

Aus all diesen Beobachtungen leite ich ab, dass das MIC10-Protein im Wildtyp eine schützende Funktion für die übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörigen Proteine MIC26, MIC27 und QIL1 zu haben scheint, sodass diese auch unter mitochondrialem Stress weiterhin stabil sind, während MIC10 abgebaut wird (Abb. 17). Diese Hypothese wird gestützt durch die drastische Destabilisierung von MIC26, MIC27 und QIL1 in Δ MIC10-Zellen nach Zugabe des Stressors (Abb. 17). Bei Abwesenheit von MIC10 scheint der Schutzfaktor, den MIC10 normalerweise ausübt, wegzufallen, sodass die übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine destabilisiert und infolgedessen abgebaut werden (Abb. 17).

Die potenziell schützende Funktion von MIC10 auf die übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörigen Proteine unter Membrandepolarisierung spiegelt sich auch bei meiner durchgeführten Analyse der Sauerstoffverbrauchsrate wider (Abb. 13). So ist der Sauerstoffverbrauch vor FCCP-Zugabe sowohl im Wildtyp als auch in Δ MIC10 auf ähnlichem Niveau (etwa 5 pmol/min/Protein, Abb. 13A). Nach Zugabe des Entkopplers FCCP steigt sie im Wildtyp bis auf etwa 14 pmol/min/Protein an (Abb. 13A), trotz der in Abb. 17 beobachteten MIC10-Destabilisierung. Dagegen lässt sich dieser Parameter in Δ MIC10, bei der es unter Membrandepolarisierung wie beobachtet zur Destabilisierung von MIC26, MIC27 und QIL1 kommt (Abb. 17), nur auf ca. 10 pmol/min/Protein steigern (Abb. 13A). Daraus lässt sich ableiten, dass die Anwesenheit des gesamten MIC10-Subkomplexes und nicht nur des MIC10-Proteins entscheidend für eine optimale mitochondriale Respiration zu sein scheint.

Nachdem ich den Abbau von MIC10 im Wildtyp bzw. des gesamten MIC10-Subkomplexes in Δ MIC10 unter mitochondrialem Stress beobachten konnte (Abb. 17), stellte ich mir die Frage, wer oder was für den Abbau dieser Proteine zuständig ist. Aufschluss auf diese Frage geben mir die beobachteten Veränderungen des OPA1- und OMA1-Phänotyps unter mitochondrialem Stress bzw. deren Regeneration. So ist auffällig, dass sich der Abbau der Proteine MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 in eben jenem Zeitfenster abspielt, in dem OMA1 in einem aktivierten Zustand vorliegt und OPA1 eine verstärkte Prozessierung hin zu ausschließlich kurzen Isoformen erfährt (Abb. 17). Die beobachtete Regeneration der zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine scheint darüber hinaus zeitgleich zur

Inaktivierung von OMA1 und der Rückkehr der langen OPA1-Isoformen stattzufinden (Abb. 17). Aus diesen Beobachtungen leite ich ab, dass es offenbar einen Zusammenhang zwischen der Destabilisierung bzw. dem Abbau des MIC10-Subkomplexes, der Aktivierung von OMA1 und Prozessierung von OPA1 zu geben scheint. Drei mögliche Theorien habe ich hierbei dafür, wie genau sich der Abbau des MIC10-Subkomplexes abspielen könnte.

Eine Hypothese ist, dass die Aktivierung der Metalloprotease OMA1 unter mitochondrialem Stress nicht nur dazu führt, dass OPA1 von ihr verstärkt an S1 prozessiert wird, sondern auch direkt für den Abbau der Proteine MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 verantwortlich ist, indem die Protease sie an definierten Sequenzen spaltet, wie es die beobachteten Spaltprodukte im Falle von MIC26 und MIC27 nahelegen (Abb. 17). Dies würde dabei die in Kapitel 6.3 aufgestellte Hypothese, nach der die proteolytische OMA1-Aktivität möglicherweise von der durch MIC10 induzierten Membrankrümmung abhängig ist, widerlegen, da diese folglich bei Abwesenheit von MIC10 nicht für den Abbau von MIC26, MIC27 und QIL1 verantwortlich gemacht werden könnte.

Alternativ könnten aber auch die durch die OMA1-Aktivierung verstärkt entstehenden kurzen OPA1-Isoformen für den Abbau des MIC10-Subkomplexes unter mitochondrialem Stress verantwortlich sein, sodass OMA1 nicht direkt in deren Abbau eingreift, sondern vielmehr über den Zwischenschritt der verstärkten OPA1-Prozessierung am Abbau von MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 mitwirkt. Diese verstärkte Prozessierung von L-OPA1 durch OMA1 hätte nämlich, wie von mir im Rahmen einer *BN-PAGE* beobachtet wurde zur Folge, dass es zu einer Destabilisierung der OPA1-Oligomere kommt (Abb. 16). Wie bereits in Kapitel 3.11 genauer beschrieben, hätte dies wiederum als Konsequenz, dass es zu einer Veränderung der Cristae-Struktur und schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae-Speichern ins Zytosol kommt, womit die apoptotische Kaskade eingeleitet würde (s. Kap. 3.10 und 3.11). Es ist daher auch denkbar, dass die von mir beobachtete Destabilisierung von MIC10 im Wildtyp bzw. MIC26, MIC27 und QIL1 in Δ MIC10 Ausdruck einer beginnenden durch Zugabe des Entkopplers induzierten Apoptose ist, an deren Anfang die verstärkte Prozessierung von L-OPA1 zu S-OPA1 steht.

Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass OPA1 selbst dazu in der Lage ist, Proteasen wie bspw. OMA1 oder YME1L zu aktivieren, die im Anschluss wiederum für die von mir beobachtete Destabilisierung des MIC10-Subkomplexes unter mitochondrialem Stress sorgen könnten. Welche der verschiedenen Hypothesen letztendlich zutreffend ist, gilt es in Zukunft weiter zu untersuchen.

Somit konnte ich insgesamt einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem MIC10-Subkomplex, OPA1 und OMA1 nachweisen, welcher insbesondere unter mitochondrialem Stress zum Tragen kommt. Um die Auswirkungen der beobachteten Veränderungen von OMA1, OPA1 und des MIC10-Subkomplexes unter Stress auf die Cristae-Morphologie zu untersuchen, wäre es in Zukunft interessant, diese im Rahmen einer elektronenmikroskopischen Untersuchung genauer zu erforschen, um ein noch besseres Verständnis für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Cristae-Struktur und der an ihr beteiligten Proteine zu erhalten.

6.10 Fazit der Arbeit

Im Rahmen meiner Forschung konnte ich zahlreiche in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse, wie das Wechselspiel von MICOS, OMA1 und OPA1 die Cristae-Biogenese und -Dynamik beeinflusst, bestätigen. Darüber hinaus gelang es mir, einige ganz neue Erkenntnisse zu diesem Thema beizusteuern:

1. L-OPA1 bzw. dessen Oligomere weisen auch bei Abwesenheit des MIC10-Proteins eine ähnliche Stabilität wie im Wildtyp auf mit dem Ziel, den Verlust der verbliebenen *crista junctions* in diesen Zellen zu verhindern. L-OPA1 leistet damit einen Beitrag bei der Aufrechterhaltung der *crista junctions* und wird daher bei Abwesenheit von MIC10 vermindert durch OMA1 prozessiert.
2. Zellen exprimieren als Reaktion auf eine gefährdete Cristae-Architektur geringere Mengen an OMA1 zum Schutze der *crista junctions*.
3. Der Verlust der *crista junctions* führt zu einer verringerten Effektivität der mitochondrialen Atmungskette.
4. Das MIC10-Protein hat eine schützende Funktion auf die übrigen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine MIC26, MIC27 und QIL1. MIC10 wird unter mitochondrialem Stress zuerst abgebaut, während die restlichen zum MIC10-Subkomplex gehörenden Proteine unter diesen Bedingungen nach wie vor stabil sind.
5. Die Destabilisierung des MIC10-Subkomplexes unter mitochondrialem Stress ist reversibel.

Damit konnte ich einen Beitrag zur Untersuchung des komplexen Wechselspiels von MICOS, OMA1 und OPA1 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der mitochondrialen Cristae-Morphologie leisten. Meine Erkenntnisse können dabei zukünftig helfen zu verstehen, wie Zellen auf eine gefährdete Cristae-Architektur reagieren bzw. welche Auswirkungen mitochondrialer Stress auf die Cristae-Morphologie hat. Insbesondere aufgrund der großen klinischen Relevanz der Cristae-Architektur bzw. der an ihr beteiligten Proteine OPA1, OMA1 und MICOS bei bspw. der Tumorentstehung bedarf es auch in Zukunft dringend weiterer Forschung zu diesem Thema, um diese Erkrankungen besser verstehen und therapeutische Ansatzmöglichkeiten entwickeln zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. Alavi M v., Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC, Tonagel F, Pichler BJ, Knipper M, Peters T, Laufs J, Wissinger B (2007) A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130:1029–1042
2. Alexander C, Votruba M, Pesch UEA, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26:211–215
3. 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
4. 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
5. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, Langer T (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* 204:919
6. Arnold I, Langer T (2002) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1592:89–96
7. Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsuta T, Langer T (2014) Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J* 33:578
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. Bertholet AM, Delerue T, Millet AM, Moulis MF, David C, Daloyau M, Arnauné-Pelloquin L, Davezac N, Mils V, Miquel MC, Rojo M, Belenguer P (2016) Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol Dis* 90:3–19
11. Bohnert M, Wenz LS, 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
12. 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
13. Callegari S, Müller T, Schulz C, Lenz C, Jans DC, Wissel M, Opazo F, Rizzoli SO, Jakobs S, Urlaub H, Rehling P, Deckers M (2019) A MICOS–TIM22 Association Promotes Carrier Import into Human Mitochondria. *J Mol Biol* 431:2835–2851
 14. Carelli V, Musumeci O, Caporali L, Zanna C, la Morgia C, del Dotto V, Porcelli AM, Rugolo M, Valentino ML, Iommarini L, Maresca A, Barboni P, Carbonelli M, Trombetta C, Valente EM, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P, Rizzo G, Tonon C, Lodi R, Avoni P, Liguori R, Baruzzi A, Toscano A, Zeviani M (2015) Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. *Ann Neurol* 78:21–38
 15. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160:189–200
 16. Chen L, Liu T, Tran A, Lu X, Tomilov AA, Davies V, Cortopassi G, Chiamvimonvat N, Bers DM, Votruba M, Knowlton AA (2012) OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. *J Am Heart Assoc* 1:
 17. Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927–15932
 18. 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
 19. Colina-Tenorio L, Horten P, Pfanner N, Rampelt H (2020) Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. *J Intern Med* 287:645–664
 20. Danino D, Hinshaw JE (2001) Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr Opin Cell Biol* 13:454–460
 21. 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. *Journal of Biological Chemistry* 286:2918–2932
 22. Daverey A, Levytskyy RM, Stanke KM, Viana MP, Swenson S, Hayward SL, Narasimhan M, Khalimonchuk O, Kidambi S (2019) Depletion of mitochondrial protease OMA1 alters proliferative properties and promotes metastatic growth of breast cancer cells. *Sci Rep* 9:
 23. Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-Gómez JD, Kühlbrandt W (2012) Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13602–13607
 24. Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME, Votruba M (2007) Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 16:1307–1318
 25. del Dotto V, Fogazza M, Carelli V, Rugolo M, Zanna C (2018) Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859:263–269

26. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature Genetics* 26:2 26:207–210
27. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 109:584–591
28. 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:
29. Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W, Reichert AS (2006) Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry* 281:37972–37979
30. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI, Langer T (2009) Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 187:1023–1036
31. Eisenberg-Bord M, Schuldiner M (2017) Ground control to major TOM: mitochondria–nucleus communication. *FEBS J* 284:196–210
32. 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
33. 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
34. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334:358–362
35. Friedman JR, Mourier A, Yamada J, Michael McCaffery J, Nunnari J (2015) MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *Elife* 4:1–61
36. Gao S, Hu J (2021) Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out. *Trends Cell Biol* 31:62–74
37. Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC (2005) Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 24:1546–1556
38. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:204–224
39. Gilkerson R, de La Torre P, st. Vallier S (2021) Mitochondrial OMA1 and OPA1 as Gatekeepers of Organellar Structure/Function and Cellular Stress Response. *Front Cell Dev Biol* 9:
40. Gilkerson RW, Selker JML, Capaldi RA (2003) The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 546:355–358
41. 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
42. Gomes LC, Benedetto G di, Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13:589–598
 43. Gottschling DE, Nyström T (2017) The Upsides and Downsides of Organelle Interconnectivity. *Cell* 169:24–34
 44. Gray MW (2012) Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a011403
 45. Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Bliek AM (2004) Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279:18792–18798
 46. Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178:757–764
 47. Guarani V, McNeill EM, Paulo JA, Huttlin EL, Fröhlich F, Gygi SP, Vactor D van, Wade Harper J (2015) QIL1 is a novel mitochondrial protein required for MICOS complex stability and cristae morphology. *Elife* 4:1–23
 48. Guarani V, Jardel C, Chrétien D, Lombès A, Bénit P, Labasse C, Lacène E, Bourillon A, Imbard A, Benoist JF, Dorboz I, Gilleron M, Goetzman ES, Gaignard P, Slama A, Elmaleh-Bergès M, Romero NB, Rustin P, de Baulny HO, Paulo JA, Harper JW, Schiff M (2016) QIL1 mutation causes MICOS disassembly and early onset fatal mitochondrial encephalopathy with liver disease. *Elife* 5:
 49. Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombès A, Lombès L, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M (2008) Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100:315–325
 50. Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombès A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M (2008) Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100:315–325
 51. Guillou E, Bousquet C, Daloyau M, Emorine LJ, Belenguer P (2005) Msp1p is an intermembrane space dynamin-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. pombe*. *FEBS Lett* 579:1109–1116
 52. Hackenbrock CR (1966) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30:269–297
 53. 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
 54. Harner ME, Unger AK, 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:
 55. Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Bliek AM (2009) Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* 187:959–966

56. Herlan M, Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS (2003) Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278:27781–27788
57. 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
58. Hroudová J, Singh N, Fišar Z (2014) Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014:
59. Hu D, Li S, Hu S, Sun Y, Xiao L, Li C, Wang J, Wang Y, Ni L, Zhao C, Wang DW (2020) A Common Missense Variant in OMA1 Associated with the Prognosis of Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 34:345–356
60. Hu J, Han J, Li H, Zhang X, Liu LL, Chen F, Zeng B (2018) Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs* 205:1–8
61. 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* 1863:91–101
62. Ikon N, Ryan RO (2017) Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859:1156–1163
63. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25:2966–2977
64. Itoh K, Tamura Y, Iijima M, Sesaki H (2013) Effects of Fcj1-Mos1 and mitochondrial division on aggregation of mitochondrial DNA nucleoids and organelle morphology. *Mol Biol Cell* 24:1842–1851
65. Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H (2013) Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol* 23:64–71
66. Ji WK, Hatch AL, Merrill RA, Strack S, Higgs HN (2015) Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* 4:
67. Jiang X, Jiang H, Shen Z, Wang X (2014) Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14782–14787
68. 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
69. Johnston PB, Gaster RN, Smith VC, Tripathi RC (1979) A clinicopathologic study of autosomal dominant optic atrophy. *Am J Ophthalmol* 88:868–875
70. Käser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T (2003) Oma1, a Novel Membrane-bound Metallopeptidase in Mitochondria with Activities Overlapping with the m-AAA Protease *. *Journal of Biological Chemistry* 278:46414–46423

71. Kelly Rainbolt T, Lebeau J, Puchades C, Luke Wiseman R (2016) Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. *Cell Rep* 14:2041–2049
72. Kojima R, Kakimoto Y, Furuta S, Itoh K, Sesaki H, Endo T, Tamura Y (2019) Maintenance of Cardiolipin and Crista Structure Requires Cooperative Functions of Mitochondrial Dynamics and Phospholipid Transport. *Cell Rep* 26:518
73. Kondadi AK, Anand R, Hänsch S, Urbach J, Zobel T, Wolf DM, Segawa M, Liesa M, Shirihai OS, Weidtkamp-Peters S, Reichert AS (2020) Cristae undergo continuous cycles of membrane remodelling in a MICOS-dependent manner. *EMBO Rep* 21:
74. Kondadi AK, Anand R, Reichert AS (2020) Cristae Membrane Dynamics - A Paradigm Change. *Trends Cell Biol* 30:923–936
75. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853:1551–1563
76. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN (2013) An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* 339:464–467
77. Koshihara T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305:858–862
78. Kozjak-Pavlovic V (2017) The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res* 367:83–93
79. Labbé K, Murley A, Nunnari J (2014) Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:357–391
80. Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins. *Mol Biol Cell* 13:4343
81. Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 117:2653–2662
82. Li H, Ruan Y, Zhang K, Jian F, Hu C, Miao L, Gong L, Sun L, Zhang X, Chen S, Chen H, Liu D, Song Z (2016) Mic60/Mitofilin determines MICOS assembly essential for mitochondrial dynamics and mtDNA nucleoid organization. *Cell Death Differ* 23:380–392
83. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133:1463–1467
84. MacVicar T, Langer T (2016) OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it. *J Cell Sci* 129:2297–2306
85. Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru II, Slepchenko B, Loew LM, Hsie CE, Buttler K, Marko M (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52:93–100
86. Mannella CA (2006) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae.
87. Mishra P, Chan DC (2014) Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:634

88. Mishra P, Varuzhanyan G, Pham AH, Chan DC (2015) Mitochondrial dynamics is a distinguishing feature of skeletal muscle fiber types and regulates organellar compartmentalization. *Cell Metab* 22:1033
89. 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
90. Murley A, Nunnari J (2016) The Emerging Network of Mitochondria-Organelle Contacts. *Mol Cell* 61:648–653
91. Nunnari J, Suomalainen A (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148:1145–1159
92. 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. *Journal of Biological Chemistry* 278:7743–7746
93. Olichon A, ElAchouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G (2007) OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 14:682–692
94. Otera H, Miyata N, Kuge O, Mihara K (2016) Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. *J Cell Biol* 212:531–544
95. 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
96. Ott C, Dorsch E, Fraunholz M, Straub S, Kozjak-Pavlovic V (2015) Detailed analysis of the human mitochondrial contact site complex indicate a hierarchy of subunits. *PLoS One* 10:
97. PALADE GE (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1:188–211
98. Patten DA, Wong J, Khacho M, Soubannier V, Mailloux RJ, Pilon-Larose K, MacLaurin JG, Park DS, McBride HM, Trinkle-Mulcahy L, Harper M-E, Germain M, Slack RS (2014) OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J* 33:2676–2691
99. Paumard P, Vaillier J, Audebert C, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller D, Brette D, Di Rago J-P, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21:221–230
100. Pellegrini L, Scorrano L (2007) A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 2007 14:7 14:1275–1284
101. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T (1997) Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts. *J Struct Biol* 119:260–272
102. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T (1997) Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts. *J Struct Biol* 119:260–272

103. Pernas L, Scorrano L (2016) Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011> 78:505–531
104. 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, Tsuchida N, van der Blik AM, van der Klei IJ, Weissman JS, Westermann B, Zha J, Neupert W, Nunnari J (2014) Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol* 204:1083–1086
105. Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N (2019) Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:267–284
106. Quirós PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernández-Vizarra E, Rodríguez F, Peinado JR, Fernández-García MS, Vega JA, Enríquez JA, Zorzano A, López-Otín C (2012) Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *EMBO J* 31:2117
107. 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. *Journal of Cell Biology* 185:1047–1063
108. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10190–10195
109. Rampelt H, Bohnert M, Zerbes RM, Horvath SE, Warscheid B, Pfanner N, van der Laan M (2017) Mic10, a Core Subunit of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System, Interacts with the Dimeric F₁F₀-ATP Synthase. *J Mol Biol* 429:1162–1170
110. Reddy PH (2014) Increased mitochondrial fission and neuronal dysfunction in Huntington’s disease: implications for molecular inhibitors of excessive mitochondrial fission. *Drug Discov Today* 19:951–955
111. Reichert AS, Neupert W (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria—role in protein transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1592:41–49
112. Rivera-Mejías P, Narbona-Pérez ÁJ, Hasberg L, Krocze L, Bahat A, Lawo S, Folz-Donahue K, Schumacher AL, Ahola S, Mayer FC, Gialisco P, Nolte H, Lavandero S, Langer T (2023) The mitochondrial protease OMA1 acts as a metabolic safeguard upon nuclear DNA damage. *Cell Rep* 42:
113. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115:1663–1674
114. Ruan Y, Li H, Zhang K, Jian F, Tang J, Song Z (2013) Loss of Yme1L perturbs mitochondrial dynamics. *Cell Death Dis* 4:
115. Santetl A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116:2763–2774

116. Schlame M, Ren M (2009) The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788:2080–2083
117. Schlame M, Xu Y (2020) The Function of Tafazzin, a Mitochondrial Phospholipid–Lysophospholipid Acyltransferase. *J Mol Biol* 432:5043–5051
118. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:9 11:655–667
119. Schweppe DK, Chavez JD, Lee CF, Caudal A, Kruse SE, Stuppard R, Marcinek DJ, Shadel GS, Tian R, Bruce JE (2017) Mitochondrial protein interactome elucidated by chemical cross-linking mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:1732–1737
120. Shamma MK, Huang X, Wu BP, Fessler E, Song IY, Randolph NP, Li Y, Bleck CKE, Springer DA, Fratter C, Barbosa IA, Powers AF, Quirós PM, Lopez-Otin C, Jae LT, Poulton J, Narendra DP (2022) OMA1 mediates local and global stress responses against protein misfolding in CHCHD10 mitochondrial myopathy. *J Clin Invest* 132:
121. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178:749
122. Spiegel R, Saada A, Flannery PJ, Burté F, Soiferman D, Khayat M, Eisner V, Vladovski E, Taylor RW, Bindoff LA, Shaag A, Mandel H, Schuler-Furman O, Shalev SA, Elpeleg O, Yu-Wai-Man P (2016) Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous OPA1 mutation. *J Med Genet* 53:127–131
123. 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:e104105
124. Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22:1577
125. Sun Y, Xue W, Song Z, Huang K, Zheng L (2016) Restoration of Opa1-long isoform inhibits retinal injury-induced neurodegeneration. *J Mol Med (Berl)* 94:335–346
126. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27:433–446
127. van Laar VS, Berman SB (2013) The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications for Parkinson’s disease. *Neurobiol Dis* 51:43–55
128. Viana MP, Levytsky RM, Anand R, Reichert AS, Khalimonchuk O (2021) Protease OMA1 modulates mitochondrial bioenergetics and ultrastructure through dynamic association with MICOS complex. *iScience* 24:102119
129. Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS (2006) Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 175:237

130. von der Malsburg A, Sapp GM, Zuccaro KE, von Appen A, Moss FR, Kalia R, Bennett JA, Abriata LA, Dal Peraro M, van der Laan M, Frost A, Aydin H (2023) Structural mechanism of mitochondrial membrane remodelling by human OPA1. *Nature* 2023 620:7976 620:1101–1108
131. 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 JC, Rospert S, Rehling P, Meisinger C, Veenhuis M, Warscheid B, van der Klei IJ, Pfanner N, Chacinska A, van der Laan M (2011) Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell* 21:694–707
132. Weber TA, Koob S, Heide H, Wittig I, Head B, van der Blik 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* 8:63683
133. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864:1481–1489
134. Wollweber F (2020) Assembly, regulation and molecular architecture of mitochondrial cristae organising systems. *Universität des Saarlandes, Homburg/Saar*
135. Wong ED, Wagner JA, Scott S v., Okreglak V, Holewinske TJ, Cassidy-Stone A, Nunnari J (2003) The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *Journal of Cell Biology* 160:303–311
136. Yamaguchi R, Perkins G (2009) Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. *Biochim Biophys Acta* 1787:963
137. 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
138. Zhang K, Li H, Song Z (2014) Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Rep* 15:576–585

8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Δ	Delta
°C	<i>Grad Celsius</i>
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan,
BN-PAGE	<i>blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i>
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CCCP	Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon
CJ	<i>crista junctions</i>
Cm	Zentimeter
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
DELE1	<i>DAP3-binding cell death enhancer 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DRP1	<i>dynamamin-related protein 1</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
F1	F1-Fraktion der mitochondrialen ATP-Synthase
FCCP	Trifluoromethoxycarbonylcyanidphenylhydrazone
FCS	fetales Rinderserum
Fo	Oligomycin-sensitive Fraktion der mitochondrialen ATP-Synthase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ISR	<i>integrated stress response</i>
Kap.	Kapitel
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton

KO	<i>knockout</i>
L-OPA1	<i>long OPA1</i>
M	Molare Masse
m/s	Meter pro Sekunde
mA	Milliampere
MEF	<i>mouse embryo fibroblasts</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFN	Mitofusin
mg	Milligramm
Mgm1	<i>mitochondrial genome maintenance 1 protein</i>
MIA	<i>mitochondrial intermembrane space import and assembly pathway</i>
MIB	<i>mitochondrial intermembrane space bridging complex</i>
MICOS	<i>mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i>
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
O ₂	Sauerstoff
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
OMA1	<i>overlapping with m-AAA-Protease</i>
OPA1	<i>optic atrophy type 1</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
s.	siehe
S1	Schnittstelle 1
S2	Schnittstelle 2
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-OMA1	<i>short OMA1</i>
S-OPA1	<i>short OPA1</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TOM	<i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt

WT	Wildtyp
x g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
YME1L	<i>yeast mitochondrial DNA escape 1-like</i>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von Mitochondrien	9
Abbildung 2: Cristae	11
Abbildung 3: Modell MIC10.....	14
Abbildung 4: Mitochondriale Fusion.....	17
Abbildung 5: Biosynthese und Prozessierung von OPA1	20
Abbildung 6: OPA1-Prozessierung unter basalen Bedingungen und mitochondrialem Stress	22
Abbildung 7: Prozessierung von L-OPA1 durch aktive Metalloprotease OMA1	22
Abbildung 8: Verschiedene Funktionen von OPA1	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ermittlung verschiedener Parameter mitochondrialer Respiration	48
Abbildung 10: Übersicht MICOS und OPA1.....	51
Abbildung 11: MICOS und OPA1-Oligomere.....	53
Abbildung 12: Ablösung der Cristae von der inneren Grenzmembran bei Ausschalten von OPA1 in Δ MIC10	57
Abbildung 13: Basaler Sauerstoffverbrauch und O ₂ -Verbrauch unter ATP-produzierenden Bedingungen in Δ MIC10-si OPA1-Zellen am niedrigsten	60
Abbildung 14: Keine detektierbare physikalische Interaktion zwischen MICOS und OPA1	63
Abbildung 15: Prozessierung von OMA1 und OPA1 unter mitochondrialem Stress.....	65
Abbildung 16: Destabilisierung von MICOS sowie OPA1- und OMA1-Oligomeren unter mitochondrialem Stress.....	67
Abbildung 17: Destabilisierung von MIC10, MIC26, MIC27 und QIL1 unter mitochondrialem Stress	70

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien	32
Tabelle 2: Schema 10 %iges Bis-Tris Trenngel (für 10 Gele)	39
Tabelle 3: Schema 4,5 %iges Bis-Tris Sammelgel (für 10 Gele)	39
Tabelle 4: Gießen eines BN-Gels	44
Tabelle 5: Pipettierschema Atmungsketten-Inhibitoren für Sauerstoffverbrauchsmessung.....	47

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen besonderen Dank an alle Personen aussprechen, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben und ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin van der Laan, der mit seinen konstruktiven Ideen und Anmerkungen einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Dissertation hat. Danke, dass deine Tür jederzeit für mich offenstand und du immer ein offenes Ohr für Probleme hattest.

Weiterhin möchte ich einen großen Dank an meine Betreuerin Dr. Karina von der Malsburg sowie Dr. Alexander von der Malsburg aussprechen. Ich bin euch für eure Unterstützung in den letzten Jahren wirklich unendlich dankbar und ihr habt mit all euren Ideen und Tipps wirklich einen unendlich großen Anteil an dieser Arbeit. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für Probleme, seien sie experimenteller oder privater Natur und ich hatte immer das Gefühl, dass ich jederzeit bei euch vorbeikommen und um euren Rat bitten kann. Dafür bin ich euch wirklich wahnsinnig dankbar. Ihr wart die besten Betreuer, die man sich für seine Promotion nur wünschen kann.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch Sibylle Jungbluth, Katja Noll und Dr. Janina Laborenz, die mir dank all ihrer Laborerfahrung zahlreiche Tipps für das Gelingen der Experimente geben konnten und an die ich mich bei Fragen jederzeit wenden konnte.

Ferner danke ich auch meiner Mitdotorandin, Kommilitonin und mittlerweile auch sehr guten Freundin Larissa Novák. Ohne dich wäre die Laborarbeit niemals dieselbe gewesen, und ich werde mich immer gerne an unsere tiefgründigen Gespräche in der Zellkultur oder Besenkammer zurückerinnern, genauso wie an unsere gegenseitigen Besuche an unserer *Bench*, wenn einer von uns mal wieder eine Zentrifugationspause absitzen musste. Außerdem bin ich dir auch sehr dankbar, dass wir uns jederzeit über unsere Ergebnisse austauschen konnten und einander beigestanden haben, wenn ein Experiment einmal missglückt ist oder unsere Zellen gestorben sind. Du hast wirklich einen großen Anteil daran, dass ich mich in der AG van der Laan so wohl gefühlt habe, und ich bin darüber hinaus sehr glücklich, in dir eine so gute Freundin gewonnen zu haben.

Neben all den tollen Mitarbeitern der AG van der Laan, möchte ich auch den Menschen außerhalb des Labors danken, die mich bei meiner Promotion unterstützt und somit ebenfalls einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Hervorzuheben sind dabei zum einen meine Eltern Anke Graf und Klaus Wachter, die mich nicht nur mit dem Schenken eines Resilienz-Tagebuchs am Beginn der Laborarbeit unterstützt haben, sondern auch mit unseren täglichen Telefonaten (manchmal auch mehrmals am Tag) eine große emotionale Stütze waren. In einem Atemzug mit ihnen möchte ich auch meiner Schwester Natalie Graf danken, bei der ich mich ebenfalls jederzeit melden konnte, wenn ich mal jemanden zum Sprechen gebraucht habe. Darüber hinaus möchte ich auch meine Freunde Catherine

Bopp, Alisia Dalhäuser, Nicholas Fuchs sowie Anika Teusch an dieser Stelle erwähnen. Danke, dass ihr mir immer zugehört habt, wenn ich euch einmal wieder mit für euch vermutlich nur mäßig interessanten Storys über OPA, OMA, MICOS oder meine Zellen beglückt habe und dass ihr trotzdem immer für mich da wart, wenn ich traurig oder gefrustet nach Hause kam, weil ein Experiment missglückt ist, oder das Ergebnis nicht so war, wie ich es mir erhofft hatte. Ihr seid wirklich die tollsten Freunde der Welt und habt meine Lebensqualität im Saarland deutlich verbessert. Ich hoffe daher, dass es uns auch nach dem Studium und dem Abschied aus Homburg gelingen wird, in Kontakt zu bleiben.

12. Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 31.01.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin van der Laan

Prof. Dr. Barbara Anne Niemeyer-Hoth