

Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von MICOS mittels STED-Mikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

“Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Lena Große

aus Oberndorf am Neckar

Göttingen, 2015

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Stefan Jakobs, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien, Abt. NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Prof. Dr. Reinhard Schuh, Abt. Molekulare Entwicklungsbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Stefan Jakobs, Abt. NanoBiophotonik, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Schuh, Abt. Molekulare Entwicklungsbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Michael Kessel, Abt. Entwicklungsbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Dr. Dieter Klopfenstein, Abt. Biophysik, Drittes physikalisches Institut

Dr. Wilfried Kramer, Abt. Molekulare Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik,

Prof. Dr. Peter Rehling, Abt. Biochemie II, Universitätsmedizin Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2015

*“The mitochondrion is not only the cell's powerhouse,
it is also its arsenal.” (Prof. Dr. M. Hengartner)*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY	9
1 EINLEITUNG	11
1.1 MITOCHONDRIEN	11
1.1.1 <i>Funktion der Mitochondrien</i>	11
1.1.2 <i>Ursprung der Mitochondrien</i>	11
1.1.3 <i>Struktur der Mitochondrien</i>	12
1.2 REAKTIONEN NEUROMUSKULÄRER MITOCHONDRIEN AUF TRAINING	23
1.2.1 <i>Die neuromuskuläre Synapse</i>	23
1.2.2 <i>Funktion der Mitochondrien an der neuromuskulären Synapse</i>	26
1.3 APOPTOSE	28
1.3.1 <i>Bedeutung der Apoptose</i>	28
1.3.2 <i>Apoptotische Signaltransduktion</i>	29
1.3.3 <i>Dynamik der Mitochondrien während der Apoptose</i>	31
1.4 HOCHAUFLÖSENDE MIKROSKOPIEVERFAHREN	33
1.5 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	37
2 MATERIAL UND METHODEN	39
2.1 MATERIAL	39
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	39
2.1.2 <i>Verwendete Antikörper</i>	39
2.1.3 <i>Weitere Farbstoff-gekoppelte Chemikalien</i>	40
2.2 METHODEN	41
2.2.1 <i>Zellbiologie</i>	41
2.2.2 <i>Mausmodelle</i>	44
2.2.3 <i>Proteinbiochemie</i>	45
2.2.4 <i>Fluoreszenzfärbungen</i>	47
2.2.5 <i>Mikroskopie</i>	49

2.2.6	<i>Bildbearbeitung und Auswertung</i>	52
3	ERGEBNISSE	57
3.1	DIE NEUROMUSKULÄRE SYNAPSE	57
3.1.1	<i>Visualisierung der Mitochondrien in der neuromuskulären Synapse</i>	58
3.1.2	<i>Veränderungen der neuromuskulären Synapse vor und nach erhöhter physischer Aktivität</i>	59
3.2	APOPTOSE	73
3.2.1	<i>Geeignetes System zur Untersuchung der Apoptose</i>	74
3.2.2	<i>Veränderungen mitochondrialer Morphologie während der Apoptose</i>	80
3.2.3	<i>Veränderungen sub-mitochondrialer Proteinverteilung während der Apoptose</i>	83
3.3	OLIGOMERISIERUNG VON BAX.....	93
4	DISKUSSION	100
4.1	VERÄNDERUNGEN DER NEUROMUSKULÄREN SYNAPSE NACH ERHÖHTER PHYSISCHER AKTIVITÄT	100
4.1.1	<i>Morphologie der neuromuskulären Synapse</i>	101
4.1.2	<i>Konzentration von Mitochondrien in der neuromuskulären Synapse</i>	104
4.1.3	<i>Sub-mitochondriale Proteinverteilung von Mic60</i>	105
4.1.4	<i>Ausblick</i>	111
4.2	APOPTOSE	113
4.2.1	<i>Proteinverteilung vor und nach Induktion von Apoptose</i>	113
4.2.2	<i>Oligomerisierung von Bax</i>	117
4.2.3	<i>Ausblick</i>	120
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
	LITERATURVERZEICHNIS	124
5	ANHANG	132
5.1	VERWENDETE FARBTABELLEN.....	132
5.2	VERWENDETER PROTEINGRÖßENSTANDARD	132
5.3	VERWENDETE PLASMIDE	133
5.4	HETEROGENE MORPHOLOGIE NEUROMUSKULÄRE SYNAPSEN	134
5.5	HETEROGENE PROTEINVERTEILUNG VON MIC60.....	136
5.6	KONTROLLFÄRBUNG MIT A-BUNGAROTOXIN	136
5.7	HETEROGENTITÄT DER BAX-RINGE	137
5.8	KOKALISIERUNG VON MIC60 MIT WEITEREN KOMPONENTEN DES MICOS KOMPLEXES	138
5.9	KONTROLLFÄRBUNG DER ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN IM MURINEN RÜCKENMARK	139

6	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE	140
6.1	WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN	140
6.2	KONFERENZBEITRÄGE	140
	DANKSAGUNG	141
	LEBENS LAUF	142

Zusammenfassung

Mitochondrien sind ein essentieller Bestandteil eukaryotischer Zellen. Sie bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran, welche wiederum in die innere Grenzflächenmembran und den Cristae unterteilt wird. Der Übergang von der inneren Grenzflächenmembran zu den Cristae wird als Cristae junctions bezeichnet. Für die Aufrechterhaltung der Cristae junctions ist der Multiproteinkomplex MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) essentiell. Bisherige Studien haben sich hauptsächlich mit der Charakterisierung von MICOS und der Identifizierung seiner Komponenten sowie deren Interaktionspartnern beschäftigt, jedoch ist über Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung als Reaktion auf externe Stimuli bislang wenig bekannt. Während elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass sich die mitochondriale Innenarchitektur dem Energiebedarf der Zellen anpasst, ist nicht bekannt, ob sich die Proteinverteilung des MICOS Komplexes verändert. Um eine detaillierte Untersuchung der Proteincluster einzelner Komponenten von MICOS vorzunehmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Situationen ausgewählt, in denen Mitochondrien eine zentrale Aufgabe zukommt: die Energieversorgung neuromuskulärer Synapsen bei erhöhter physischer Aktivität und die Veränderungen der Mitochondrien während der Apoptose. Durch die Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie und quantitativer Analyse mit entsprechenden Algorithmen, konnten Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung gezeigt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie die Veränderungen neuromuskulärer Synapsen im Allgemeinen und der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 im Speziellen als Reaktion auf eine gesteigerte physische Belastung untersucht. Die Gesamtflächen motorischer Endplatten waren als Reaktion auf die erhöhte Aktivität des innervierten Muskels im Soleus leicht vergrößert, im Tibialis anterior jedoch nicht. Die sub-mitochondriale Proteinverteilung von Mic60 war in Folge des Lauftrainings heterogener im Soleus und unverändert im Tibialis anterior. Alle Veränderungen auf den Trainingsreiz, sowohl in den Endplatten im Allgemeinen als auch bei der Proteinverteilung von Mic60, waren äußerst subtil, konnten jedoch aufgrund der hohen Sensibilität der Aufnahmen und Auswertungen erfasst werden. Die Daten zeigen somit muskelspezifische Veränderungen der Proteinverteilung von Mic60 und der Gesamtfläche motorischer Endplatten als Reaktion auf externe Signale.

Als zweiter zellulärer Prozess wurde der programmierte Zelltod untersucht. Die sub-mitochondriale Proteinverteilung der untersuchten Proteine, darunter drei Komponenten des MICOS Komplexes, ergaben

eine hoch signifikante Veränderung nach Induktion von Apoptose. Es zeigte sich ein Verlust distinkter Proteincluster, welcher vor der Freisetzung von Cytochrom *c*, einem pro-apoptotischen Faktor der hauptsächlich in den Cristae lokalisiert, erfolgte. Essentiell für die Freisetzung von Cytochrom *c* ist die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) durch Proteine der Bcl-2 Familie, darunter Bax. MOMP stellt den Zeitpunkt dar, an dem das apoptotische Programm in der Regel irreversibel ist. Durch die Untersuchung von Bax mittels 2D und 3D STED-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass dieses Protein nach Induktion von Apoptose zu ringförmigen Strukturen oligomerisiert, die mit fragmentierten Mitochondrien kolokalisieren.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass sich subtile, muskelspezifische Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 nach Lauftraining in Mäusen ergeben, während massive Umstrukturierungen der Proteincluster untersuchter MICOS Komponenten sowie weiterer mitochondrialer Proteine im Zuge der Apoptose stattfinden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die untersuchten Stimuli unterschiedliche Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung des MICOS Komplexes hervorrufen.

Summary

Mitochondria are essential components of eukaryotic cells. They consist of an outer and inner membrane, which itself is divided into the inner boundary membrane and the cristae. The transition from the inner boundary membrane and the cristae is termed cristae junctions. Essential for the maintenance of these cristae junctions is the multi-protein complex MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*). Previous studies have focused on the characterization of MICOS and on the identification of its components and their interaction partners, but to date little is known about alterations of the submitochondrial protein distribution as a reaction to external stimuli. Even though electron microscopy has shown that the interior architecture of mitochondria adapts to the energy demand of the cells, it is not known whether the submitochondrial protein distribution of the MICOS complex is altered. In order to investigate the protein clusters of certain MICOS components, we selected two processes in which mitochondria play a central role: first, the energy supply of the neuromuscular junctions after increased physical strain and the alterations of mitochondria during apoptosis. By investigating the submitochondrial protein distribution using fluorescence microscopy and quantitative image analysis of the protein clusters, I showed the adaptation of the protein distribution of MICOS components.

In the first part of this work I used fluorescence microscopy to depict alterations of the neuromuscular junctions in general and of the submitochondrial protein distribution of Mic60 in particular, in reaction to enhanced physical strain. The cross-sectional area of motor endplates were slightly enlarged in the Soleus but not in the Tibialis anterior following enhanced activity of the innervated muscle. The submitochondrial protein distribution of Mic60 was more heterogeneous in the Soleus but was unchanged in the Tibialis anterior in reaction to the endurance exercises. The observed changes after the training stimuli, both to the area of the endplates as well as to the submitochondrial protein distribution of Mic60, were extremely subtle, but could be detected due to the high sensitivity both of the imaging and of the analysis procedures. The data shows muscle-specific alterations of the submitochondrial protein distribution of Mic60 and of the total area of motor endplate in reaction to external signals.

The second process to be studied was the programmed cell death, or apoptosis. I observed highly significant alterations of the submitochondrial protein distribution of all investigated proteins, among them three components of the MICOS complex, after induction of apoptosis. A loss of distinct protein clusters took place before the release of cytochrome *c*, a pro-apoptotic factor which resides in the cristae. For the release of cytochrome *c* to take place, it is essential that the outer mitochondrial

membrane is permeabilized (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) by proteins of the Bcl-2 family, among them Bax. MOMP is the point in time after which the onset of apoptosis is normally irreversible. By investigating Bax using 2D and 3D STED microscopy, I showed that the Bax-proteins form ring-like structures that colocalize with fragmented mitochondria.

In summary the data shows subtle, muscle-specific changes of the submitochondrial protein distribution of Mic60 following endurance exercises in mice, but massive alterations of MICOS components as well as other mitochondrial proteins occurring during apoptosis. In this dissertation I show that the examined stimuli evoke different changes to the submitochondrial protein distribution of the MICOS components.

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

1.1.1 Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Bestandteile eukaryotischer Zellen. Sie sind als einziges Zellorganell neben dem Zellkern von zwei Membranen umschlossen und gelten aufgrund ihrer bedeutenden Rolle bei der Bereitstellung des universellen Energielieferanten Adenosintriphosphat (ATP) gemeinhin als die Kraftwerke der Zelle (Lill et al. 2005, McBride et al. 2006). Darüber hinaus kommen ihnen ein Vielzahl weiterer Aufgaben sowohl im anabolen als auch im katabolen Stoffwechsel zu. Neben der Regenerierung von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat im Zuge der oxidativen Phosphorylierung sind sie an einer Reihe weiterer Stoffwechselwege beteiligt. Darunter fallen die Herstellung von Eisen-Schwefel-Proteinen sowie die Häm-Biogenese. Des Weiteren sind Mitochondrien an der Pufferung von Kalziumionen beteiligt und spielen eine zentrale Rolle im Signalweg der Apoptose, dem programmierten Zelltod (Lill et al. 2005, Peralta et al. 2012). Hier verknüpfen sie sowohl extra- als auch intrazelluläre Signale und sorgen somit für eine koordinierte Durchführung dieses streng kontrollierten Zellprogramms. Neben ihren vielfältigen Funktionen im gesunden Organismus, stehen Fehlfunktionen innerhalb der Mitochondrien oftmals in direktem Zusammenhang mit der Entstehung neurodegenerativen Erkrankungen, darunter Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson (Davis and Williams 2012).

1.1.2 Ursprung der Mitochondrien

Nach der Endosymbiontentheorie stammen die Vorläufer der heutigen Mitochondrien von freilebenden gram-negativen Bakterien ab. Durch die Aufnahme und Eingliederung dieser α -Proteobakterien in eukaryotische Zellen erklärt sich die Tatsache, dass diese Organellen von zwei Membranen umschlossen sind, die sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung nachhaltig voneinander unterscheiden. Anhand der Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion einiger Proteinkomplexe der Atmungskette von Proteobakterien und Mitochondrien lässt sich deren enge Verwandtschaft noch heute nachvollziehen (Esposti 2014).

Eine weitere Besonderheit dieser Organellen ist das Vorhandensein eines spezifischen mitochondrialen Genoms, dessen Ursprung sich ebenfalls auf ihre bakteriellen Vorläufer zurückführen lässt. Die mitochondriale DNA (mtDNA) besteht aus einem zirkulären doppelsträngigen Molekül, das in Säugetierzellen aus 16,5 Kilobasen besteht und 37 Gene kodiert, darunter 13 Untereinheiten für die oxidative Phosphorylierung, zwei ribosomale- und 22 transfer-RNAs (Peralta et al. 2012). Durch die Lyse der aufgenommenen Endosymbionten innerhalb der eukaryotischen Zelle, wanderten immer mehr Gene in den Zellkern des Wirts. Anhand dieser Theorie erklärt sich, dass alle weiteren Proteine, darunter Faktoren für die Translation und Transkription der mtDNA sowie zusätzliche Komponenten der Atmungskette, im Zellkern kodiert vorliegen und über spezifische Transportmechanismen in die Mitochondrien importiert werden (Gross and Bhattacharya 2011).

1.1.3 Struktur der Mitochondrien

1.1.3.1 Zusammensetzung der mitochondrialen Membranen

Mitochondrien sind komplexe Zellorganellen, die strukturell und funktional in mehrere Kompartimente unterteilt werden können. Sie sind von zwei Membranen umgeben, die sich in ihrer Zusammensetzung und Funktion stark unterscheiden.

Für die innere mitochondriale Membran konnte gezeigt werden, dass diese einen ungewöhnlich hohen Proteinanteil aufweist, deren Hauptkomponente die Komplexe der Atmungskette sowie die F_1F_0 ATP-Synthase ausmachen (Becker et al. 2009). Entlang der inneren mitochondrialen Membran wird mit Hilfe dieser Proteine ein pH- und Protonengradient aufgebaut, der zur Regenerierung des universellen Energieträgers ATP benötigt wird (Chen 1988). Auch anhand des Lipidanteils können beide Membransysteme voneinander unterschieden werden. Während die innere mitochondriale Membran zu etwa 18% aus Cardiolipin besteht, kommt dieses Phospholipid in der äußeren Membran lediglich zu einem Prozent vor. Dieser ungewöhnlich hohe Prozentsatz ist spezifisch für Mitochondrien und zeigt sich in keiner anderen Membran. Dabei interagiert Cardiolipin unter anderem mit den Proteinkomplexen der Atmungskette sowie Cytochrom *c* und spielt potenziell eine Rolle bei der Herstellung des Protonengradienten sowie bei der Ausbildung von Membraneinstülpungen innerhalb der Mitochondrien (Schlame and Ren 2009).

Der Proteinanteil der äußeren mitochondrialen Membran fällt deutlich kleiner aus. In diesem mitochondrialen Subkompartiment befinden sich unter anderem die Proteinkomplexe, die den Import

kernkodierter Faktoren gewährleisten und strukturell entweder aus mehreren membranverankerten β -Faltblätter oder einer Reihe hydrophober α -Helices bestehen. (Horvath and Daum 2013). Die äußere Membran ist wichtig für die Kommunikation der Mitochondrien mit der restlichen Zelle. Durch die Interaktion membranverankerter Proteine und weiteren zellulären Faktoren, werden wichtige Signalwege eukaryotischer Zellen gesteuert, darunter auch der programmierte Zelltod über die Proteine der Bcl-2 Familie (Abschnitt 1.3) (Walther and Rapaport 2009).

Beide Membranen umschließen die mitochondriale Matrix, bei der es sich um einen Reaktionsraum handelt, der unter anderem für eine effiziente Kompartimentierung des Zitratzyklus und weiterer Stoffwechselwege verantwortlich ist (Osellame et al. 2012). An den Stellen an der die innere mitochondriale Membran parallel zur äußeren mit einem Abstand von rund 22–25 nm verläuft, wird die Innenmembran als innere Grenzflächenmembran bezeichnet (Abbildung 1.1). Die Parallelität beider Membranen kann an den sogenannten Kontaktstellen nicht beobachtet werden. An dieser Stelle befinden sich beide Membransysteme in engem Kontakt. Es wird spekuliert ob diese Kontaktstellen für den Import von Proteinen und den Austausch von ATP und ADP benötigt werden. Biochemische Daten konnten große hetero-oligomere Proteinkomplexe in der inneren mitochondrialen Membran identifizieren, die in Kontakt mit der Importpore stehen und des Weiteren für die Organisation der komplexen mitochondrialen Innenarchitektur verantwortlich ist, die sogenannten MICOS Komplexe (Abschnitt 1.1.3.3) (Harner et al. 2011, Pfanner et al. 2014).

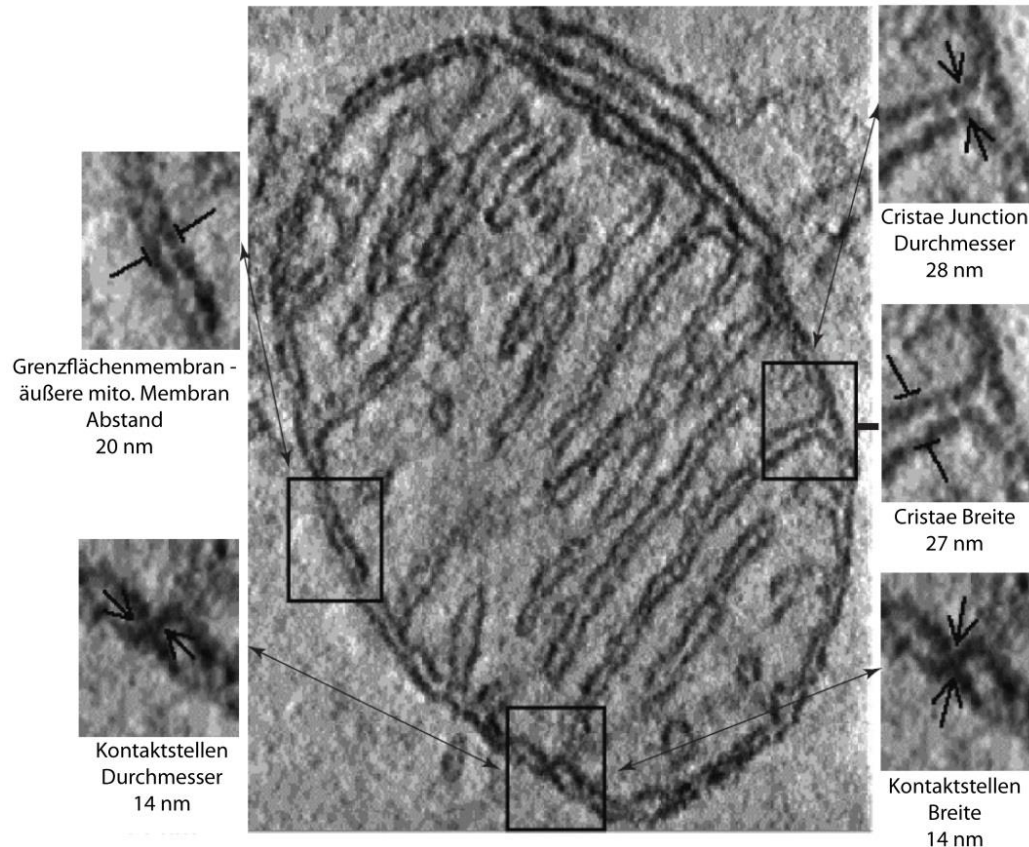


Abbildung 1.1: Ultrastruktur von Mitochondrien. Elektronenmikroskopische Darstellung der inneren und äußeren mitochondrialen Membran. In den Ausschnitten sind einige strukturelle Eigenschaften plus Größenordnung (gemittelt über mehrere gemessene Strukturen) umrissen (bearbeitet aus (Frey and Mannella 2000)).

Neben dem parallelen Verlauf der Grenzflächenmembran sowie den Kontaktstellen, lassen sich an vielen Stellen auch Einstülpungen der inneren Membran in den Matrixraum beobachten. Sie werden als Cristae bezeichnet. Diese Strukturen sind der Ort der oxidativen Phosphorylierung, da sich hier ein Großteil der Atmungskettenkomplexe befindet. Die Verbindung zwischen Intermembranraum und den Cristae bilden die Cristae junctions. Sie stellen Verengungen der Cristae am Übergang zur Grenzflächenmembran, für deren Aufrechterhaltung der MICOS Komplex essentiell ist (Perkins et al. 1997, Harner et al. 2011).

1.1.3.2 Struktur und Organisation der Cristae

Sjöstrand und Palade konnten anhand elektronenmikroskopischer Studien schon früh die Existenz von Cristae zeigen. Während Sjöstrand postulierte, dass diese Membrankompartimente abgetrennt von der äußeren mitochondrialen Membran isoliert in der Matrix vorliegen, entwickelte Palade ein Modell, in dem die Cristae als Membraneinstülpungen mit weiter Öffnung dargestellt sind (Mannella 2000, Palade 1952). Die Verbesserung elektronenmikroskopischer (EM) Aufnahmen insbesondere der EM-Tomographie,

führte zu einem detaillierteren Verständnis der mitochondrialen Ultrastruktur und widerlegte zum großen Teil beide Modelle der Cristae Organisation.

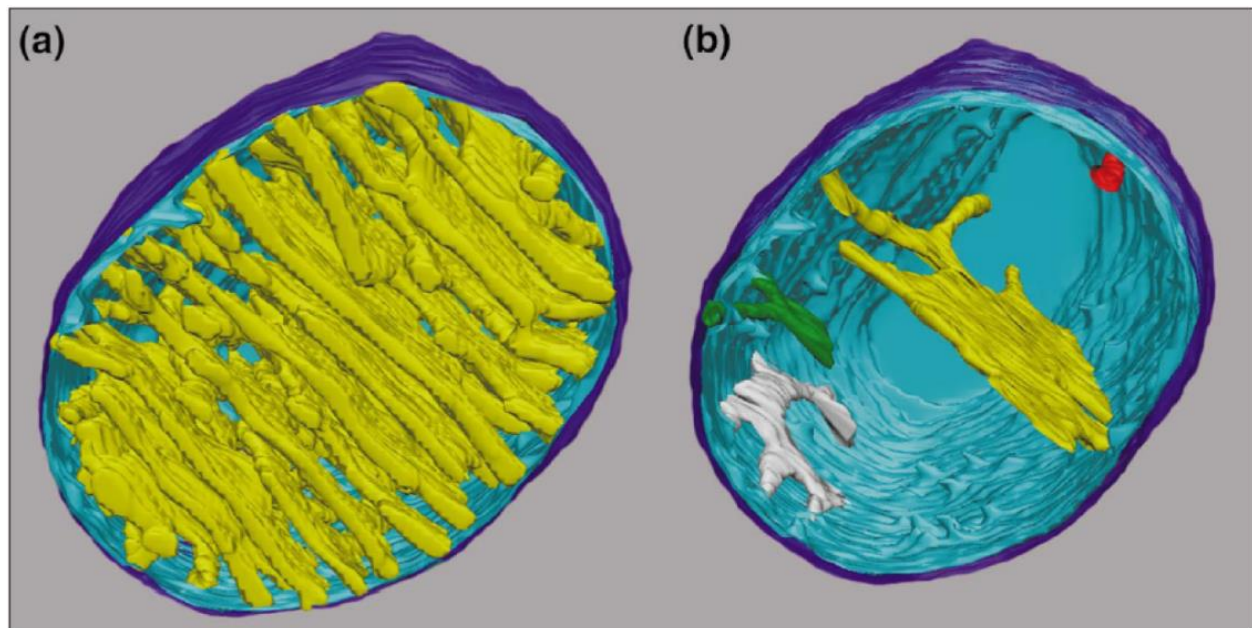


Abbildung 1.2: Organisation der Cristae in Mitochondrien. Modell der Tomographieaufnahme von Abbildung 1.1. In (a) sind alle Cristae (gelb), die innere Grenzflächenmembran (hellblau) und die äußere mitochondriale Membran (dunkelblau) dargestellt. Die hohe morphologische Diversität (b) wird anhand der farblich unterschiedlich markierten Cristae (gelb, grün, weiß, rot) verdeutlicht (Frey and Mannella 2000).

Die innere mitochondriale Membran weist aufgrund der zahlreichen Cristae eine hoch komplexe Organisation auf (Abbildung 1.2). Schmale, tubuläre Cristae sind eher untypisch. Häufig zeigen sich komplexere Einstülpungen mit unterschiedlicher Morphologie (Abbildung 1.2; grün, grau, gelb) (Frey and Mannella 2000).

Die Vielfalt der Ausprägungen dieser Cristae zeigt sich insbesondere bei Betrachtung verschiedener Organismen beziehungsweise unterschiedlicher Zelltypen. Ein Beispiel dafür bieten die Mitochondrien der Astrozyten. Auch durch diverse Erkrankungen wie dem Raynaud-Syndrom, einer Gefäßerkrankung die mit Erblässen des betroffenen Gewebes einhergeht (Prete et al. 2014), kann die Ausprägung der Einstülpungen variieren (Abbildung 1.3).

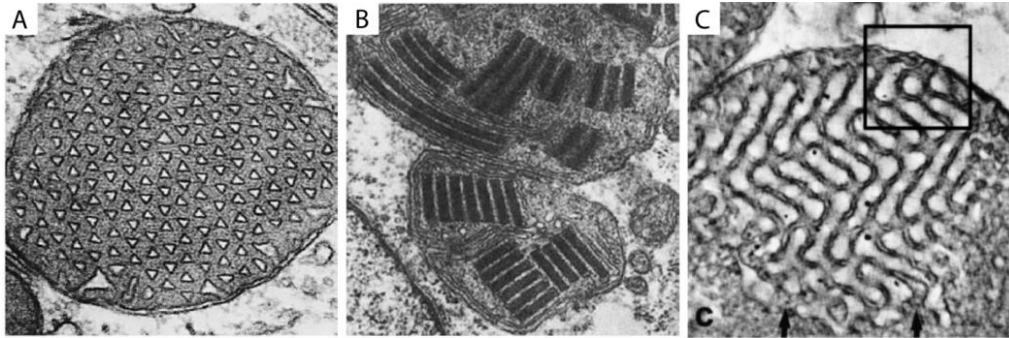


Abbildung 1.3: Heterogene Ausprägung der Cristae. Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus unterschiedlichen Geweben zur Darstellung der heterogenen mitochondrialen Innenarchitektur. Die Mitochondrien stammen aus Astrozyten (A), dem Muskelgewebe verändert durch Raynaud-Syndrom (B) und der Amöbe (C) (bearbeitet aus (Zick et al. 2009, Deng et al. 1999))

Die Ultrastruktur der Mitochondrien passt sich den physiologischen Bedürfnissen der Zellen an und variiert daher innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen entsprechend ihrem jeweiligen Energiebedarf. Auch innerhalb eines Gewebes unterscheidet sich die Ausprägung der Cristae. Die Mehrzahl der Mitochondrien liegt in der sogenannten „orthodoxen“, konventionellen Struktur vor (Abbildung 1.4). Dabei befindet sich die innere Grenzflächenmembran sehr nah an der äußeren Membran und schafft ein großes Volumen der Matrix. Während der Aktivierung der Respiration erweitern sich die Cristae und die innere Membran entfernt sich von der äußeren mit Ausnahme der Kontaktstellen. Reguliert durch den ADP-Gehalt der Zelle geht damit einhergehend die konventionelle Struktur in eine kondensierte Form mit vermindertem Matrixvolumen über (Hackenbrock 1966, Perkins and Ellisman 2011).

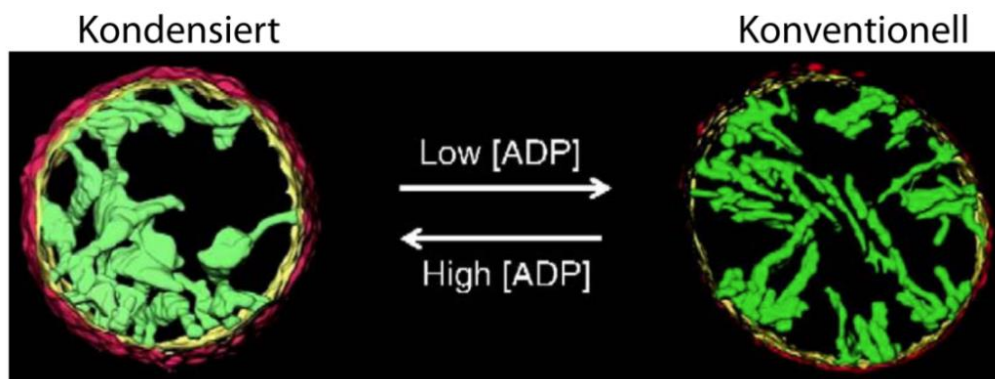


Abbildung 1.4: Anpassung der Cristae an verschiedene Stimuli. Veränderungen der inneren mitochondrialen Membran abhängig von dem ADP-Gehalt der Zelle. Zu sehen ist sowohl die kondensierte (links) Ausprägung mit erweiterten Cristae als auch die konventionelle Form mit großem Matrix-Volumen (rechts) (bearbeitet aus (Mannella 2006)).

1.1.3.3 Organisation der Cristae junctions

Lange Zeit war die Frage nach der Organisation der Cristae junctions ungeklärt und wurde erst durch die Entdeckung des MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) Komplexes, als

strukturebendes Element, verstanden. Innerhalb eines Jahres wurde dieser Multiproteinkomplex biochemisch durch vier unterschiedlichen Studien beschrieben (Hoppins et al. 2011, von der Malsburg et al. 2011, Harner et al. 2011, Alkhaja et al. 2012). Der Komplex hat eine Größe von mehreren Megadalton und beinhaltet eine Reihe an Transmembranproteinen, wobei ein erheblicher Proteinteil vieler dieser Komponenten in den Intermembranraum ragt (Abbildung 1.5) (Zerbes et al. 2012).

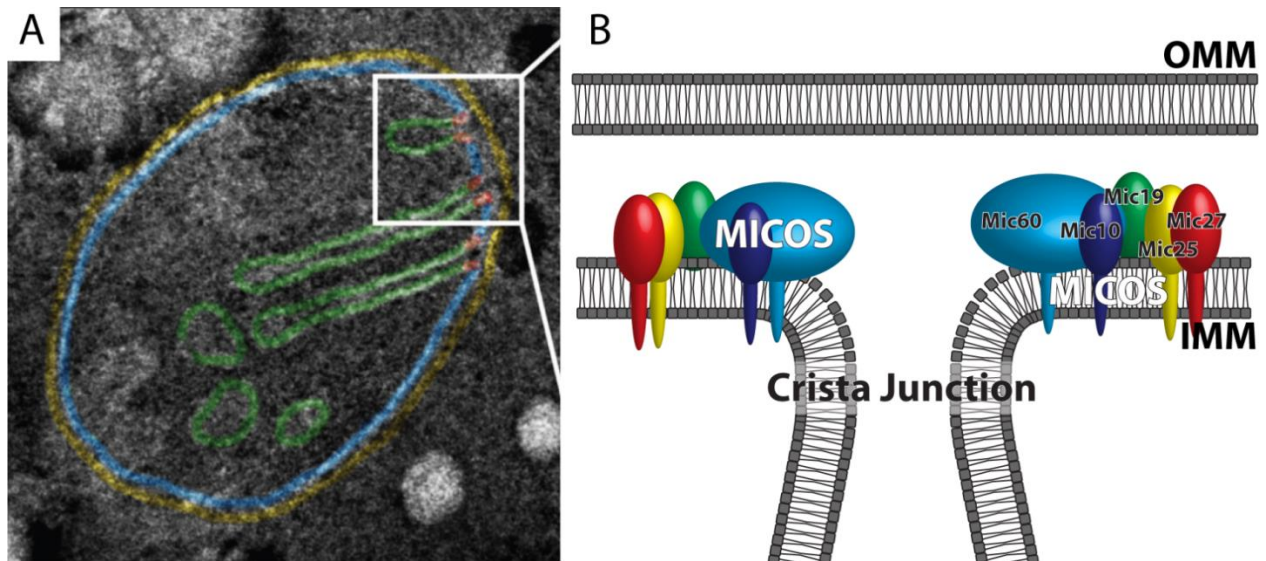


Abbildung 1.5: MICOS Komplex als Organisator der Cristae junctions in Mitochondrien. Der MICOS Komplex stellt eine molekulare Grenze zwischen innerer Grenzflächenmembran (A, blau) und Cristae (A, grün) her und ist essentiell für die Funktion und Struktur der Cristae junctions (A, rot). In Säugerzellen wird er gebildet aus mehreren Transmembranproteinen (Mic60, Mic10, Mic27, Mic25) und dem peripheren Protein Mic19 (A.) bearbeitet aus (Zerbes et al. 2012)).

Proteine die als Komponenten des MICOS Komplex identifiziert werden konnten, tragen das Präfix „Mic“ um ihre Zugehörigkeit zum Komplex zu kennzeichnen und nachfolgend eine Zahl, die die Größe der maturierten Proteine in Kilodalton angibt (Pfanner et al. 2014).

Tabelle 1.1: Zusammensetzung des MICOS Komplexes in Metazoa. IM: innere mitochondriale Membran, IMS (*intermembrane space*): Intermembranraum, OM (*outer membrane*): äußere mitochondriale Membran

Name	Funktion	Referenz
Mic10	Kernkomponente des MICOS Komplexes. Essentiell für die Aufrechterhaltung der Cristae junctions. Knockout in Hefe führt zu vermehrter Stapelung der Cristae.	(Harner et al. 2011) (Hoppins et al. 2011) (Alkhaja et al. 2012)
Mic19	Stabilisiert den MICOS Komplex und ist wichtig für die mitochondriale Morphologie. Wichtig für die mitochondriale Spaltung und Fusion.	(Darshi et al. 2011)

Mic25	<p>Homolog zu Mic19</p> <p>Herunterregulierung führt zu veränderter Morphologie der Cristae junctions.</p> <p>Interaktion mit Mic60 über C-Terminus.</p>	<p>(Xie et al. 2007)</p> <p>(An et al. 2012)</p>
Mic27	<p>Knockout in Hefe führt zu defekter Morphologie der Cristae.</p> <p>Bindet an Cardiolipin.</p>	<p>(von der Malsburg et al. 2011)</p> <p>(Weber et al. 2013)</p>
Mic60	<p>Kernkomponente des MICOS Komplexes mit Interaktionspartnern unter anderem in der äußeren mitochondrialen Membran.</p> <p>Knockout in Hefe führt zum Verlust der Cristae junctions und einer veränderten Morphologie der Cristae.</p>	<p>(Rabl et al. 2009)</p> <p>(von der Malsburg et al. 2011)</p>

Mic10, neben Mic60 eine der beiden Kernkomponenten des MICOS Komplexes und früher bekannt unter den Proteinnamen Mio10 (in Hefe) beziehungsweise MINOS1 (in Säuger), ist essentiell an der Ausbildung der Cristae junctions beteiligt. Knockout dieser Komponente des MICOS Komplexes führt zum Verlust der Engstellen und zur Ausbildung von Cristae Stapel in der mitochondrialen Matrix. Anstelle der normalen Innenarchitektur bilden sich beim Verlust von Mic10 konzentrische Ringe aus innerer mitochondrialer Membran. Durch seine zwei postulierten Membrandomänen befindet sich das Protein in der Innenmembran, ragt jedoch zu weiten Teilen in den Intermembranraum (Alkhaja et al. 2012, Hoppins et al. 2011).

Die zweite Kernkomponente des MICOS Komplexes ist Mic60, früher bekannt unter den Bezeichnungen Fcj1 (*formation of crista junction protein 1*) beziehungsweise Mitofilin. Das Protein ist wie Mic10 wesentlich an der Aufrechterhaltung der Cristae junctions beteiligt. Herunterregulierung der Proteinexpression von Mic60 führt zu starken Veränderungen der Ultrastruktur von Mitochondrien. Unter diesen Bedingungen verringert sich die Anzahl an Cristae junctions dramatisch und die innere mitochondriale Membran bildet zwiebelähnliche konzentrische Ringe, wie sie auch bei Verlust von Mic10 beobachtet werden können (Rabl et al. 2009, John et al. 2005). Wie sein Name bereits andeutet, hat Mic60 eine Größe von 60 kDa. Das Protein ist durch seinen N-terminalen, hydrophoben Teil in die innere mitochondriale Membran verankert. Der hydrophile Anteil, der in den Intermembranraum ragt, kann in zwei Segmente unterteilt werden: Eine *coil-coiled* Domäne, die für die Bildung der Cristae junctions essentiell ist und der C-terminale Bereich, der für die Interaktionen mit Proteinkomplexe der äußeren mitochondrialen Membran, darunter der SAM Komplex, verantwortlich ist (Korner et al. 2012). Neben

seiner strukturegebenden Rolle, wird Mic60 eine zweite Funktion im Transport von Proteinen in Mitochondrien zugesprochen. Frühere Studien konnten die direkte Interaktion dieses Proteins mit Komponenten des TOM (*translocase of the outer membrane*) Komplexes, der Proteintranslokase der äußeren mitochondrialen Membran demonstrieren. Untersuchungen inwieweit Mic60 über diese Interaktion den Transport von Proteinen über die äußere mitochondriale Membran beeinflusst zeigten, dass insbesondere der Import in den Intermembranraum von Mic60 abhängig ist. Diese doppelte Funktion konnte bisher für keine andere Komponente des MICOS Komplexes nachgewiesen werden (von der Malsburg et al. 2011).

Bei Mic27 handelt es sich um ein Cardiolipin-bindendes Transmembranprotein. Es steht im Verdacht für die Biogenese beziehungsweise den Transport dieses Phospholipids verantwortlich zu sein. Früher bekannt unter der Bezeichnung Apolipoprotein O-like protein (APOOL) führt eine Herunterregulierung zur Veränderungen der Cristae Struktur und beeinträchtigt die oxidativen Phosphorylierung (Weber et al. 2013).

Als weiterer Interaktionspartner von Mic60 wurde das *coiled-coil helix coiled-coil helix* (CHCH) Protein CHCHD3 identifiziert und im Zuge der vereinheitlichten Nomenklatur in Mic19 umbenannt (Xie et al. 2007, Pfanner et al. 2014). Nach Transport des Proteins durch die äußere mitochondriale Membran, wird Mic19 durch seine CHCH-Domäne im Intermembranraum festgehalten und durch post-translationale Addition eines Myristinankers an das N-terminale Ende des Proteins an die Membran angeheftet (Darshi et al. 2012).

1.1.3.4 Dynamik des mitochondrialen Netzwerks

Mitochondrien bilden ein stark verzweigtes Netzwerk, das sich über das gesamte Zytoplasma der Zellen erstreckt. Wie ausgeprägt die Vernetzungen untereinander sind, ist unterschiedlich in verschiedenen Zelltypen und abhängig von den physiologischen Bedürfnissen der Zelle.

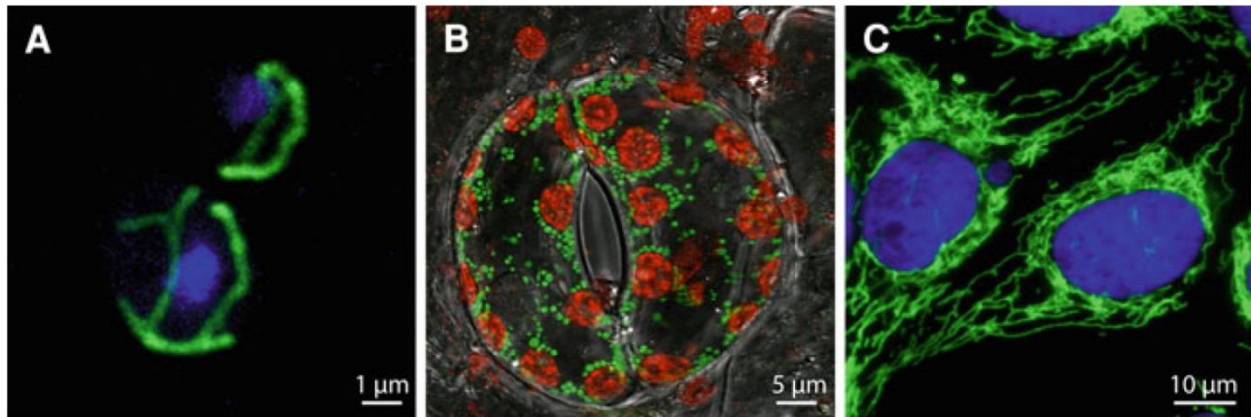


Abbildung 1.6: Unterschiedliche Morphologie des mitochondrialen Netzwerks. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mitochondrien verschiedener Organismen. Zu sehen sind die vielfältigen Ausprägungen des Netzwerks in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (A), der Schließzelle der Tabakpflanze (B) und der humanen Krebszelllinie U2OS (C) (Jakobs et al. 2011).

Mitochondrien sind äußerst dynamische Organellen die einer stetigen Fusion und Teilung unterliegen. Die korrekte Verteilung der Organellen besonders in Neuronen mit langen Axonen wird durch Abspaltung einzelner Mitochondrien vom Netzwerk gewährleistet (Kageyama et al. 2011). Dem entgegen wird durch konstante Fusion sowohl der Austausch von Metaboliten als auch die Kommunikation der Organellen vereinfacht. Zudem konnte gezeigt werden, dass vorübergehende Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion durch die Vermischung ihrer Inhalte abgefangen werden können (Lackner 2014).

Das koordinierte Zusammenspiel der inneren und äußeren mitochondrialen Membran während Fusion und Spaltung erfolgt dabei durch eine Reihe an GTPasen die im gesamten phylogenetischen Stammbaum hoch konserviert sind. In humanen Zellen sind die Proteine der Mitofusin Familie für die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran verantwortlich. Sie sind membranverankerte Mitglieder der Dynamin Familie und werden in Säugerzellen als Mitofusin1 und -2 bezeichnet (Abbildung 1.7) (Westermann 2010, Youle and van der Bliek 2012). Durch homo- und heterotypische Interaktion zweier Mitofusine benachbarter Mitochondrien kommt es zur Annäherung der Membranen und schließlich zu deren Fusion. Frühere Publikationen konnten zeigen, dass Mutationen von Mitofusin2 zur Charcot-Marie-Tooth Krankheit führen, eine Erkrankung des peripheren Nervensystems die sich in Schwächung der Gliedmaßen äußert. Die Fusion der inneren mitochondrialen Membran wird über das Protein *optic atrophy protein 1* (OPA1) gesteuert. Die GTPase befindet sich im Intermembranraum der Mitochondrien und liegt assoziiert mit der inneren mitochondrialen Membran vor (Chan 2006). Nach ihrem Transport in Mitochondrien wird die lange Isoform von OPA1 (l-OPA1) durch proteolytische Spaltung in eine kürzere Form (s-OPA1) überführt. Während l-OPA1 durch seine Transmembrandomäne ein integrales Membranprotein der

inneren mitochondrialen Membran darstellt, fehlt der kurzen Isoform diese Domäne und s-OPA1 assoziiert lediglich peripher mit der inneren mitochondrialen Membran im Intermembranraum. Welche Funktion der beiden Isoformen während der Fusion der inneren mitochondrialen Membran zukommt, konnte bislang nicht ausreichend aufgeklärt werden. Anhand von Studien in Hefe wurde postuliert, dass I-OPA1 lediglich als Anker für die kurze Isoform dient und die GTPase Domäne von s-OPA1 für die Fusion beider Membran zuständig ist (Belenguer and Pellegrini 2013). Wie der Name bereits andeutet führen Mutationen von OPA1 zu Optikusatrophy, einer neurodegenerativen Erkrankung des optischen Nervs, die unter anderem zu einer Beeinträchtigung des Sehvermögens führt (Lenaers et al. 2012).

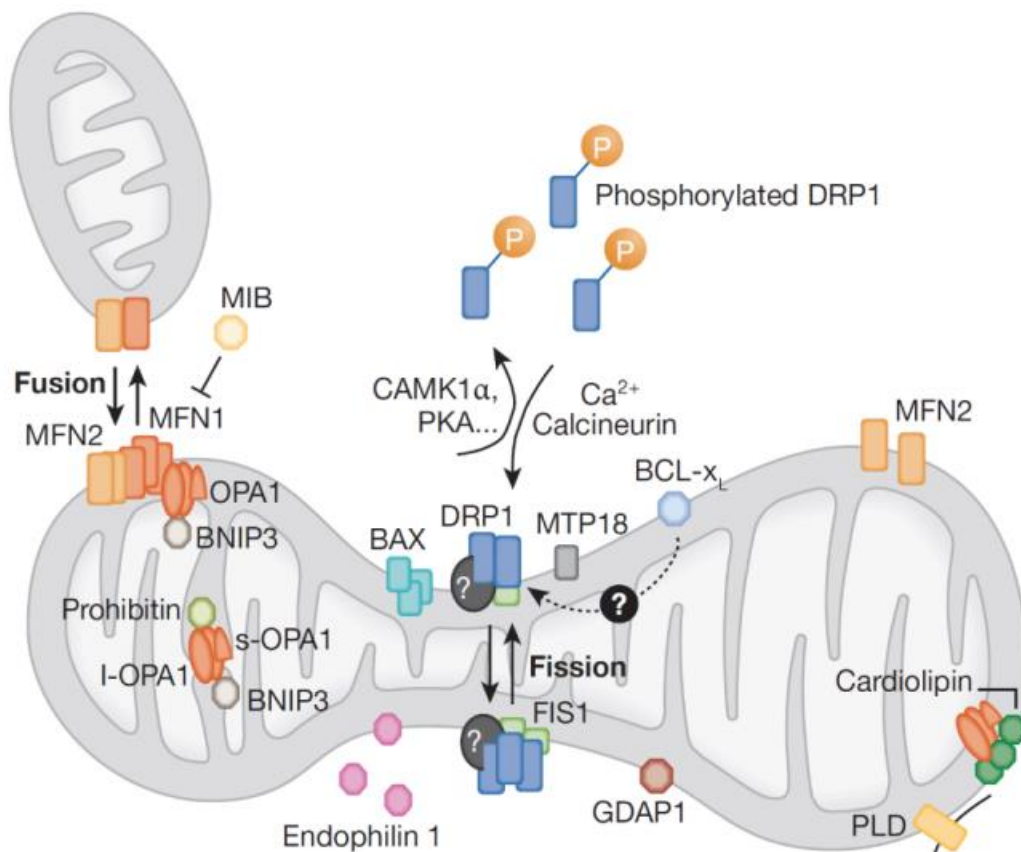


Abbildung 1.7: Dynamik des mitochondrialen Netzwerks durch Spaltung und Fusion. Die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran wird durch Mitofusin1 und -2 (MFN1, MFN2) gesteuert, während für die innere Membran die beiden Isoformen von OPA1 (I-OPA1, s-OPA1) verantwortlich sind. Die Spaltung (Fission) der Mitochondrien in zwei Organellen wird durch die GTPase Drp1 gesteuert. Auch zu sehen sind die posttranslationalen Modifikationen sowie die Interaktionspartner der jeweiligen Proteine (Campello and Scorrano 2010).

Der mitochondriale Spaltungsprozess wird in Säugerzellen durch zwei Proteine gewährleistet, Drp1 (*dynamamin-related protein 1*) und Mff (*mitochondrial fission factor*) die ebenfalls zur Familie der GTPasen gehören (Reddy et al. 2011). Die Kernkomponente zur erfolgreichen Spaltung von Mitochondrien stellt Drp1 dar. Ausgelöst durch die Bindung von Guanosin triphosphat (GTP) an das Protein lagert sich Drp1 als

Helix um die Mitochondrien herum an. Dies wiederum führt zur Spaltung von GTP in Guanosindiphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat, wodurch es zur Einschnürung der äußeren mitochondrialen Membran und schlussendlich zur Teilung der Organellen kommt (Lackner 2014). Die Rekrutierung der GTPase an die Mitochondrien wird durch Mff, ein Transmembranprotein der äußeren mitochondrialen Membran, gesteuert. Da es sich hierbei um eher schwache Interaktionen handelt, wird allerdings vermutet dass weitere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind (Kageyama et al. 2011). Da der Durchmesser der Drp1 Helix kleiner ist als der von Mitochondrien, wurde schon früh spekuliert dass eine Verengung der Organellen schon vor der Einschnürung durch Drp1 stattfindet. Friedman und Kollegen konnten zeigen, dass die Spaltung der Organellen bevorzugt an Kontaktstellen von Mitochondrien mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt und postulierten eine Verengung der Organellen durch Ausläufer des ER. Diese Voreinschnürung verengt die Mitochondrien passend auf den Durchmesser der Drp1 Helix und kann die Spaltung der Organellen initiieren (Friedman et al. 2011).

1.1.3.5 Interaktionen der Mitochondrien mit dem Endoplasmatischen Retikulum

Nicht nur im Zuge der Spaltung von Mitochondrien sondern auch in verschiedenen anderen Situationen können Interaktionen der Mitochondrien mit dem ER und anderen Zellorganellen beobachtet werden. Für die Ausläufer des Endoplasmatischen Retikulums, die in Kontakt mit Mitochondrien stehen, wurde sogar eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung postuliert, womit diese Stellen den Charakter eines ER-Subkompartiments erlangen. Neben weiteren postulierten Aufgaben ist der Kontakt von Endoplasmatischen Retikulum zu den Mitochondrien besonders für die Kalzium Homöostase von Bedeutung. Nach ihrer Ausschüttung aus dem ER werden Ca^{2+} -Ionen an diesen Kontaktstellen deutlich effizienter in die Mitochondrien aufgenommen (Michel and Kornmann 2012). Anhand eines Screenings in Hefen konnte ein Komplex, ERMES (*ER-mitochondria encounter structures*) genannt, identifiziert werden, der die Kontaktstelle zwischen ER und Mitochondrien herstellt (Kornmann et al. 2009). Er besteht aus einem integralen ER Protein (Mmm1), einem zytosolischen Protein (Mdm12) und zwei Proteinen der äußeren mitochondrialen Membran (Mdm10 und Mdm34) und wurde bislang lediglich in *Saccharomyces cerevisiae* detailliert beschrieben (Lahiri et al. 2014).

1.1.3.6 Interaktion zwischen den Mitochondrien und dem Zytoskelett

Als dynamische Zellorganellen besitzen Mitochondrien auch zahlreiche Kontakte mit dem Zytoskelett der Zelle. Ihr Transport wird durch die Interaktion der Organellen mit dem Tubulin Zytoskelett und dessen zugehörige Motor- und Adaptoproteine gewährleistet. Neben dem stetigen Transport innerhalb aller

eukaryotischer Zellen, muss insbesondere der aktive Transport der Mitochondrien in Neuronen aufgrund ihrer Morphologie streng koordiniert ablaufen. Durch Motorproteine der Kinesin Familie (KIF1B α und KIF5) werden Mitochondrien entlang von Axonen transportiert und somit die Energieversorgung der Synapsen sichergestellt (Hirokawa et al. 2009). Als Adaptorproteine wurden durch frühere Studien in *Drosophila* Miro, ein Protein der äußeren mitochondrialen Membran, sowie Milton als Bindeglied zwischen den Motorproteine und Miro beschrieben (Stowers et al. 2002, Glater et al. 2006). Die zwei orthologe Proteine zu Milton in Säugetierzellen sind TRAK1 und -2. Sie regulieren den Kinesin-vermittelten Transport von Mitochondrien und weiteren Zellbestandteilen. Knockdown der beiden Proteine zeigte eine verminderte Dynamik der Mitochondrien in beide Richtungen, sowohl in anterograd, das heißt in Richtung Synapse, als auch retrograd, in Richtung Zytoplasma der Neuronen (Brickley and Stephenson 2011). Als Isoformen von Miro finden sich in Säugetieren die Proteine Miro1- und -2. Die Kontrolle des mitochondrialen Transport findet an dieser Stelle über die Bindung von Kalziumionen an Miro statt und mobilisiert Mitochondrien zu aktiven Synapsen (Sheng 2014, Chen and Sheng 2013). Auch die Assoziierung der Mitochondrien an Aktin spielt besonders in Neuronen eine wichtige Rolle. Durch die Mikrofilamente können die Organellen über kurze Distanzen transportiert werden. Morris und Hollenbeck postulierten, dass Mikrotubuli-dissoziierte Mitochondrien durch Interaktion mit Aktin schnellstmöglich an das Tubulin Netzwerk zurückgeführt werden können, um einen effektiven Transport entlang von Axonen zu gewährleisten (Morris and Hollenbeck 1995). Mitochondrien zeigen zusätzlich auch Interaktionen mit den Intermediärfilamenten. Ein Verlust von Desmin zum Beispiel führt zu einer abnormalen Verteilung von Mitochondrien in der Zelle einhergehend mit einem Verlust der Anzahl und einer Schädigung der Funktion dieser Organellen (Milner et al. 2000).

1.2 Reaktionen neuromuskulärer Mitochondrien auf Training

1.2.1 Die neuromuskuläre Synapse

Als neuromuskuläre Synapse wird die chemische Synapse zwischen Motoneuron und Skelettmuskel verstanden. Hier findet die Übertragung des Signals der präsynaptischen Membran der Nervenendigung auf die postsynaptische Membran der Muskelzelle über Acetylcholin (ACh) auf der einen und Acetylcholinrezeptoren (AChR) auf der anderen Seite statt (Witzemann et al. 2013).

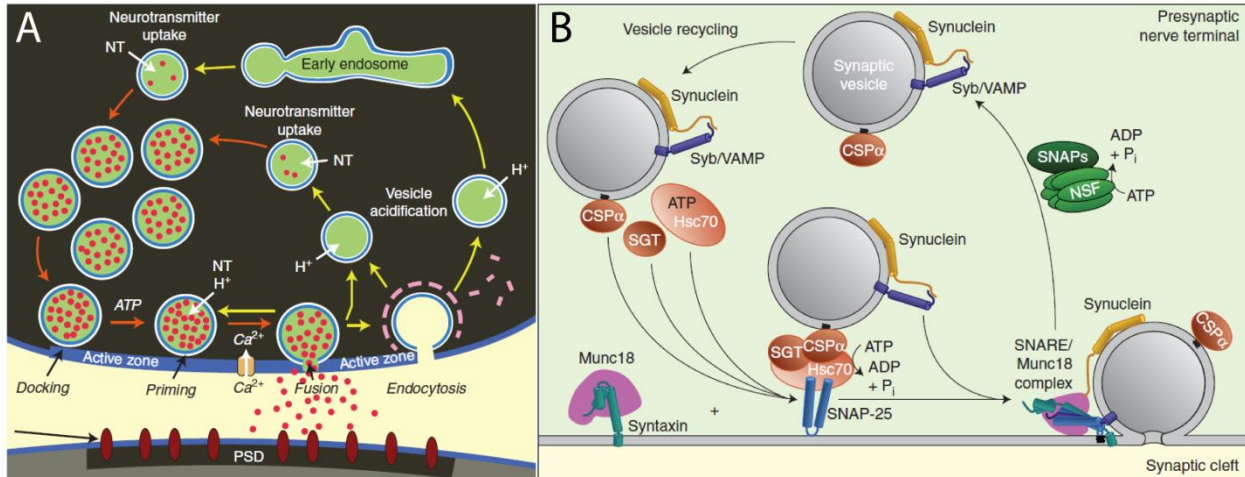


Abbildung 1.8: Freisetzung von Neurotransmitter an der neuromuskulären Synapse. A.) Die Signalübertragung von präsynaptischer Membran auf einen Muskel beziehungsweise postsynaptische Nervenzelle wird über Neurotransmitter beladene Vesikel vermittelt. Der Zyklus aus Andocken, Fusion und Freisetzung der Botenstoffe schließt sich durch das Recyceln der Vesikel per Endozytose. B.) Proteine der SNARE Familie sind an der Exozytose der synaptischen Vesikel beteiligt und steuern mit Hilfe von Chaperonen und dem Energielieferanten ATP die Ausschüttung der Transmitter in den synaptischen Spalt (bearbeitet aus (Sudhof and Rizo 2011))

Sobald das Aktionspotential die Membran der synaptischen Endplatte depolarisiert, öffnen sich Kalziumkanäle und die Ionen gelangen in das Nervenende. Durch Bindung der Ca^{2+} -Moleküle an Synaptotagmin, einem SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) Protein auf den synaptischen Vesikeln, wird die Exozytose und die damit einhergehende Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt, den Zwischenraum von prä- und postsynaptischer Membran, ausgelöst. Nach Freisetzung von Acetylcholin, dem Neurotransmitter der Motoneuronen, werden die Vesikel durch Endozytose recycelt und können nun wieder mit weiteren Botenstoffen aufgefüllt werden (Abbildung 1.8 A) (Sudhof and Rizo 2011). Um die koordinierte Ausschüttung von Acetylcholin zu gewährleisten, bedarf es eines kontrollierten Zusammenspiels einer Reihe von Proteinen, die Andocken, Fusion und Recycling der Vesikel steuern (Abbildung 1.8 B). Ein Zusammenspiel von Synaptobrevin/VAMP (*vesicle-associated membrane protein*) auf den Vesikeln innerhalb der Synapse, sowie Syntaxin und SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein 25*), auf der präsynaptischen Membran, ist für die Ausschüttung der neuronalen Transmitter in den synaptischen Spalt verantwortlich. Sie sind Vertreter der SNARE Familie und koordinieren das spezifische Andocken beider Membranen. Nach Freisetzung der Neurotransmitter erfolgt die Trennung durch NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) und SNAPs und die Proteine stehen einem erneuten Zyklus zur Verfügung.

Die Energie für den Vorgang wird durch die Spaltung von ATP in ADP und anorganisches Phosphat bereitgestellt. Eine Reihe weiterer Chaperone, wie sie in Abbildung 1.8 B dargestellt sind, ist an dem

koordinierten Zusammenspiel der SNARE Proteine beteiligt, deren Zusammenlagerung beziehungsweise Dissoziierung ebenfalls von ATP abhängig ist (Sudhof and Rizo 2011, Tobaben et al. 2001).

Sobald das Signal der Nervenzelle auf den Muskel übergeht, werden Kalziumionen aus der Zisterne des sarkoplasmatischen Retikulums (Abbildung 1.9 A) freigesetzt.

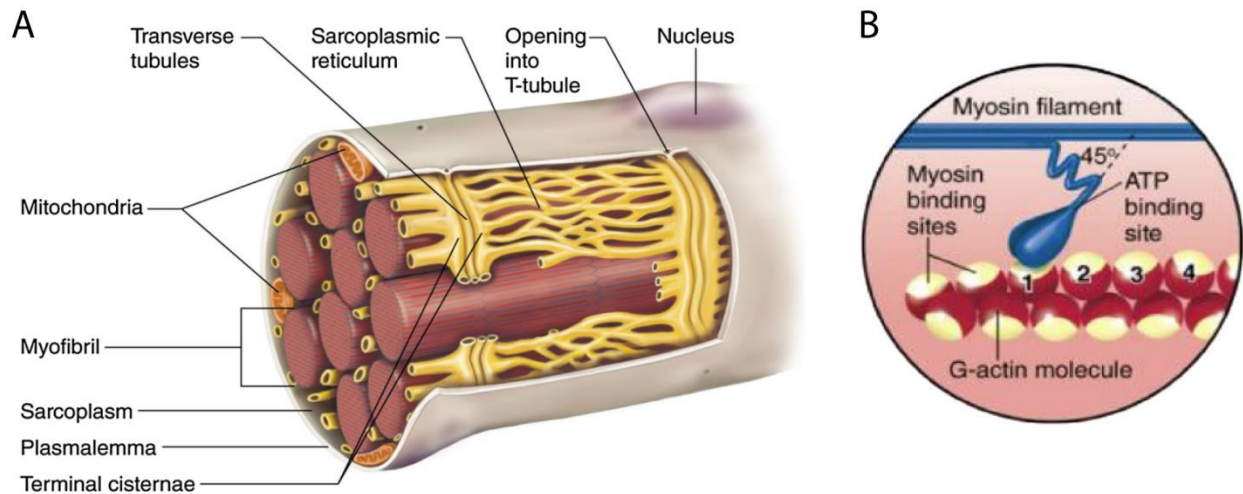


Abbildung 1.9: Aufbau des Skelettmuskels. Kalziumionen strömen aus den Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums in die Muskelfaser (A) wo sie die Inhibierung der Aktinfilamente aufheben. Dadurch kommt die Interaktion der Mikrofilamente und Myosin zustande. Durch die ATPase Funktion des Myosinkopfs kommt es nach Bindung von ATP und dessen Hydrolyse zu Konformationsänderungen und Myosin gleitet entlang der Aktinfilamente (B). Dies führt schlussendlich zu Kontraktion des Muskels (bearbeitet aus (Frontera and Ochala 2014)).

Die Ca^{2+} -Moleküle gelangen in das Sarkoplasma der Muskelfaser, wo sie an Troponin C, ein regulatorisches Protein auf den dünnen Myofilamenten, binden. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Reihe an Konformationsänderungen die dazu führen, dass Tropomyosin das aktive Zentrum der Aktinmoleküle verlässt. Durch Aufhebung der sterischen Hinderung, kann Myosin unter Zuhilfenahme von ATP an die Mikrofilamente binden und schlussendlich zur Kontraktion des Muskels führen. Dies geschieht über einen Zyklus aus ATP-Bindung, Hydrolyse und anschließender Freisetzung von ADP und anorganischem Phosphat am Myosinkopf, einhergehend mit dessen Konformationsänderung (Abbildung 1.9 B). Durch die Bewegungen von Myosin entlang der Aktinfilamente, kommt es zum Zusammenziehen der Muskelfaser und somit zur Kontraktion des gesamten Muskels (Frontera and Ochala 2014).

1.2.2 Funktion der Mitochondrien an der neuromuskulären Synapse

Mitochondrien kommt eine zentrale Rolle bei der Pufferung von Ca^{2+} -Ionen sowie bei der Regenerierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat innerhalb neuronaler Synapsen zu, wobei ihre Beteiligung an der Reizweiterleitung bei unterschiedlichen Stimuli sehr variiert.

Studien in *Drosophila* konnten zeigen, dass die Pufferung von Kalziumionen bei milder Stimulation der Neurone hauptsächlich durch das endoplasmatische Retikulum und nicht durch die Mitochondrien per se gewährleistet wird. Diese Situation ändert sich während einer anhaltenden Reizung. Die dauerhafte Stimulation führt zur Aufnahme der Ca^{2+} -Ionen in Mitochondrien und der damit einhergehenden Pufferung durch diese Organellen. Die Antwort der Mitochondrien auf die unterschiedlichen Reizstärken lässt auf mitochondriale Kalziumporen mit geringer Affinität schließen, die erst bei intensiver Stimulation zur Aufnahme der Ionen führen (Verstreken et al. 2005). Darüber hinaus kommt diesen Organellen auch eine indirekte Rolle im Kalziumhaushalt neuromuskulärer Synapsen zu. Während die direkte Pufferung der Ionen nur bei anhaltender Reizung gezeigt werden konnte, wird bereits bei milder Stimulation ATP aus den Mitochondrien benötigt, um Ca^{2+} über spezifische Membrantransporter aus den Neuronen zu pumpen (Zenisek and Matthews 2000). Die Regenerierung von Adenosintriphosphat aus ADP und anorganischem Phosphat innerhalb der neuromuskulären Synapse ist ebenfalls für die Rekrutierung von Vesikeln zur präsynaptischen Membran von Bedeutung. Während bei milder Stimulation der Neuronen die Energie hauptsächlich aus der Glykolyse stammt und somit unabhängig von mitochondrialen Funktionen bereitgestellt werden kann, bedarf es bei intensiver Stimulation der Beteiligung der oxidativen Phosphorylierung um genügend ATP bereit zu stellen (Abbildung 1.10) (Verstreken et al. 2005).

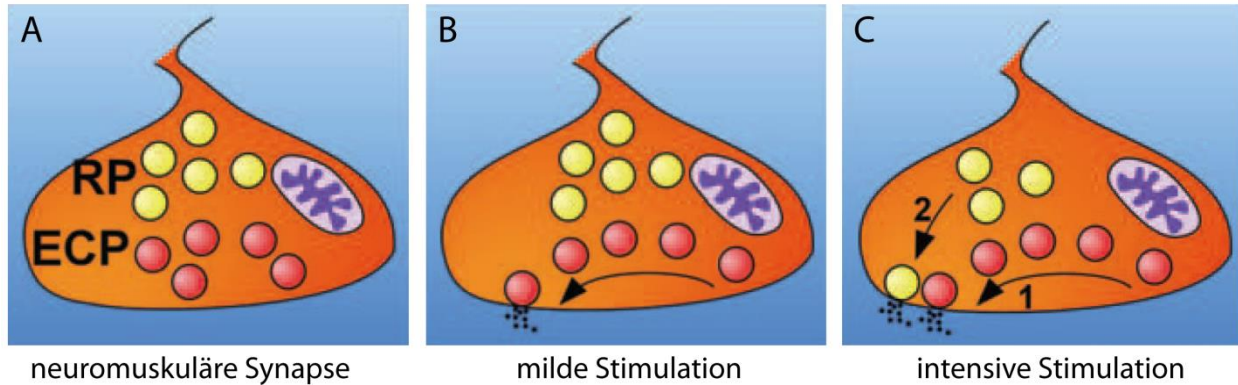


Abbildung 1.10: Freisetzung von *endo-exo cycling* und *reserve pool* Vesikeln in Abhängigkeit der Stimulationsintensität. Die zwei Vesikelpopulationen von *endo-exo cycling* (ECP) und *reserve pool* (RP) werden bei unterschiedlichen Stimuli an die präsynaptische Membran rekrutiert. Nur unter intensiver Stimulation werden die RP-Vesikel durch die Energie aus den Mitochondrien zur Freisetzung ihrer Neurotransmitter angeregt (bearbeitet aus (Ly and Verstreken 2006))

Diese abgestufte Reaktion kann durch das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Vesikelpopulationen erklärt werden. Während eine milde Nervenreizung zur Freisetzung von Neurotransmitter aus den Vesikeln des *endo-exo cycling pools* (ECP) führt, werden bei intensiver Stimulation der Neuronen die Vesikel des *reserve pools* (RP) zur präsynaptischen Membran rekrutiert. Anhand der Herunterregulierung von Drp1 in *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Mitochondrien an der neuronalen Endplatte die Reizweiterleitung in diesem Fall unterbindet. Die Freisetzung der Reserve-Vesikel wird durch die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) gesteuert. Mitochondrial produziertes ATP wird durch die Adenylylzyklase zu zyklischem AMP gespalten, welches wiederherum für die Aktivierung der PKA entscheidend ist. Sobald die Vesikel durch die Proteinkinase A aktiviert werden, gelangen sie entlang der Aktinfilamente zur präsynaptischen Membran. Der Transport wird durch die Motoproteine der Myosin Familie vermittelt, die für ihre Aktivität ebenfalls ATP aus den Mitochondrien benötigen. Zusätzlich wird die Phosphorylierung der leichten Ketten von Myosin über eine Kinase gesteuert, die für diesen Vorgang auf mitochondriales ATP angewiesen ist (Ly and Verstreken 2006). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Mitochondrien in der neuromuskulären Synapse eine Schlüsselrolle bei der Pufferung von Kalzium sowie bei der Produktion von ATP insbesondere unter intensiver Stimulation zukommt.

1.3 Apoptose

Neben den vielfältigen Aufgaben der Mitochondrien in stoffwechselaktiven Zellen kommt ihnen ebenfalls eine essentielle Funktion innerhalb der Apoptose, dem programmierten Zelltod zu. Aus dem Griechischen stammend beschreibt das Wort Apoptose das Abfallen von Blütenblätter einer Blume und wurde ursprünglich von J. F. Kerr (Kerr et al. 1972) eingeführt, um den Vorgang des programmierten Zelltods zu beschreiben. Dieser aktive, energieverbrauchende Prozess wird strikt vom passiven Zelltod, der Nekrose mit anschließender Nekrose, unterschieden (Majno and Joris 1995). Zu den prominentesten morphologischen Veränderungen während der Apoptose zählen die Kondensation des Chromatins mit anschließender Fragmentierung sowie die Verdichtung des Zytoplasmas (Elmore 2007). Im Endstadium schnürt sich die Zelle zu mehreren apoptotischen Körperchen zusammen, die durch Phagozytose aufgenommen und über den lysosomalen Abbauweg entsorgt werden können (Hacker 2000).

1.3.1 Bedeutung der Apoptose

In multizellulären Organismen kommt der Apoptose eine zentrale Bedeutung zu. Während der Embryogenese werden Zellen, die nicht mehr gebraucht werden über diese Form des regulierten Zelltods entsorgt (Abbildung 1.11).

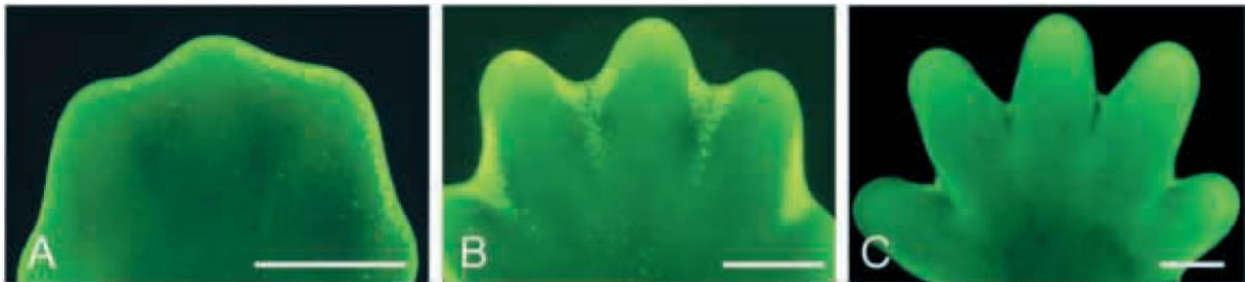


Abbildung 1.11: Bedeutung der Apoptose während der Embryogenese. Durch den programmierten Zelltod während der Embryogenese können die Finger der Hand ausgebildet werden (bearbeitet aus (Wood et al. 2000))

Der ausgewachsene Organismus würde ohne Apoptose ebenfalls nicht überleben können. Die Initiation des programmierten Zelltods kann unter anderem aufgrund von DNA Schäden oder oxidativem Stress stattfinden und schützt den Organismus vor der Entstehung von Tumoren durch gezielte Entsorgung pathologisch veränderter Zellen. Eine Störung des apoptotischen Signalwegs sowie ein verändertes Niveau an Apoptose zeigen sich häufig unter pathologischen Bedingungen. In einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielweise der Alzheimer-Krankheit, findet das vermehrte Absterben der Neuronen

ebenfalls über den apoptotischen Signalweg statt. Pathologisch veränderte Level an Apoptose zeigen sich aber auch als Folge einiger Vireninfektionen, wodurch die Erreger die zelluläre Homöostase aus dem Gleichgewicht bringen können (Green and Kroemer 2004, Favalaro et al. 2012).

1.3.2 Apoptotische Signaltransduktion

Die morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen werden durch den proteolytische Abbau hunderter Proteine durch sogenannte Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) initiiert. Als Vorläuferenzyme produziert können diese Proteasen, nach Aktivierung durch autokatalytische Spaltung, entweder weitere Caspasen aktivieren oder ihre Zielproteine abbauen. Dazu verwenden sie ein Cystein im aktiven Zentrum wodurch sie alle Substrate enzymatisch am Carboxylende von Aspartat spalten können. Aufgrund ihrer Funktion während der Apoptose werden diese Proteasen in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt. Während Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) nicht die Fähigkeit haben sich autokatalytisch zu aktivieren, können die Initiatorcaspasen (Caspase -2, -8 und -9) durch ihre verlängerte Prodomäne durch autokatalytische Spaltung die apoptotische Signaltransduktion beschleunigen (Kaufmann and Hengartner 2001, Sakamaki and Satou 2009, Thornberry and Lazebnik 1998).

Die Aktivierung der Caspasen und der damit einhergehende zelluläre Selbstmord, kann auf zwei Wegen erfolgen. Der rezeptor-gesteuerte, extrinsische Signalweg und der mitochondrial-initiierte, intrinsische Signaltransduktionsweg (Abbildung 1.12) (Elmore 2007).

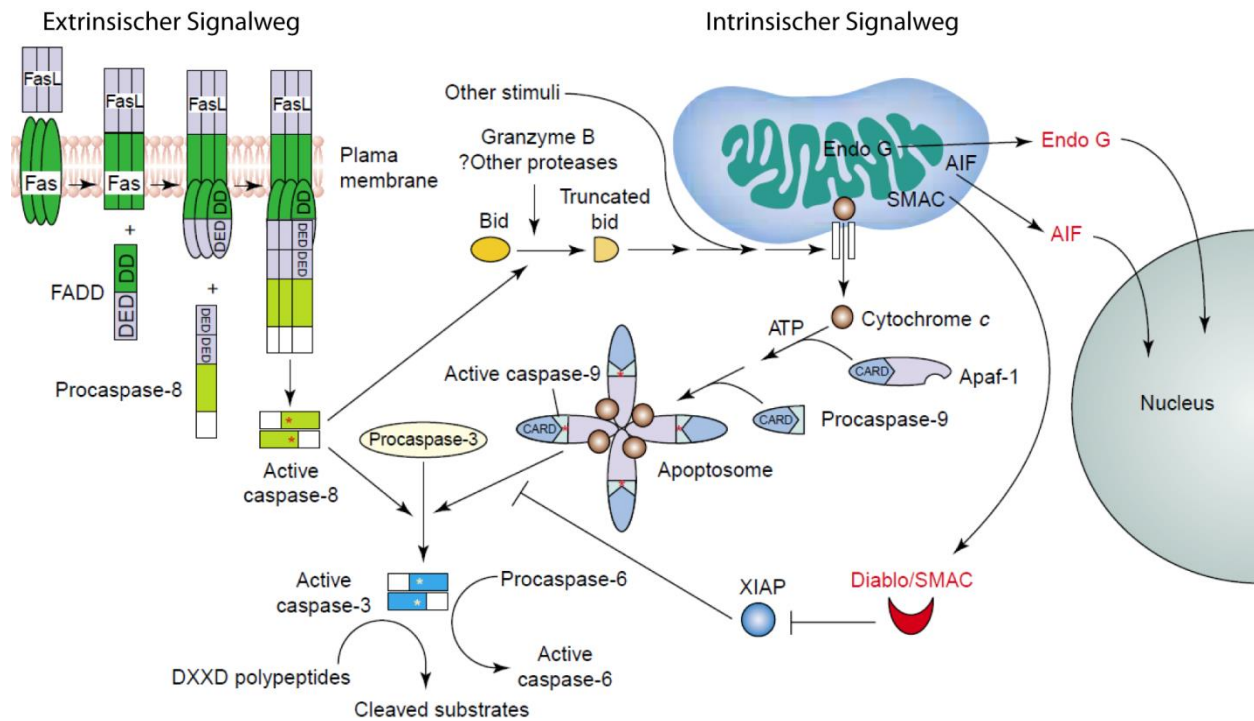


Abbildung 1.12: Übersicht der unterschiedlichen Signalwege von extrinsischer und intrinsischer Apoptose. Externe Signale führen zur Aktivierung der Rezeptoren der Tumornekrose Faktor Familie sowie der nachfolgenden Effektorcaspasen. Mitochondrien nehmen eine zentrale Rolle bei der Durchführung des intrinsischen Wegs ein und führen durch die Freisetzung von Cytochrom *c* zur Bildung des Apoptosoms und damit einhergehenden Tod der Zelle (bearbeitet aus (Kaufmann and Hengartner 2001)).

1.3.2.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung extrazellulärer Signale an sogenannte Todesrezeptoren eingeleitet. Nach der Aktivierung dieser Rezeptoren, die zur Familie der Tumornekrose Faktoren (TNF) zählen, erfolgt die Rekrutierung intrazellulärer Adapterproteine (FADD; Abbildung 1.12) durch homologe Bindung ihrer Todesdomänen (DD; Abbildung 1.12). Aktivierung des Adapters führt zu Assoziierung von Procaspase-8 und zur Bildung des DISC Komplexes (*death-inducing signaling complex*) bestehend aus Rezeptor, Adapter und der nun aktivierten Caspase-8 (Elmore 2007, Kaufmann and Hengartner 2001). Durch katalytische Spaltung erfolgen die Aktivierung der ersten Effektorcaspase (Caspase-3) und die Durchführung des programmierten Zelltods.

1.3.2.2 Der intrinsische Signalweg

Dem extrinsischen Signalweg, der über Ligand-Rezeptorbindung vermittelt wird, steht die intrinsische Form des programmierten Zelltod gegenüber, dessen Einleitung über die Mitochondrien gesteuert wird. Schlüsselproteine für den Beginn der mitochondrial-gesteuerten Apoptose sind die Proteine der Bcl-2 (*B-*

cell lymphoma 2) Familie. Diese funktionell heterogene Gruppe kann aufgrund der Anzahl ihrer BH-Domänen (Bcl-2 Homologeidomänen) in drei Kategorien aufgeteilt werden. Zu den anti-apoptotischen Proteinen mit 4 BH-Domänen (BH1-BH4) zählen Bcl-xL und Bcl-2. Die pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie werden unterteilt in Proteine mit nur einer BH-Domäne (BH3-only), darunter Puma oder Bid, die zur Aktivierung von Bax und Bak, ebenfalls pro-apoptotischen Vertreter mit 3 BH-Domänen (BH1-BH3), benötigt werden (Rolland and Conradt 2010). In gesunden Zellen befindet sich Bax als Monomer im Zytoplasma. Aktivierung durch DNA Schäden und ähnlichem führt zur Konformationsänderung und Einlagerung von Bax-Oligomeren in die äußere mitochondriale Membran (Wang and Youle 2009). Die dadurch entstandenen Bax-Poren führen zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) und zur Freisetzung mitochondrialer Proteine ins Zytoplasma, darunter Cytochrom *c* und PUMA. Freigesetztes Cytochrom *c* aktiviert daraufhin Apaf-1 (*Apoptotic protease activation factor-1*) durch Bindung im Zytoplasma und führt zur schrittweisen Zusammensetzung des Apoptosoms. Procaspase-9 ist ebenfalls an der Bildung dieses Heptamers beteiligt. Der nun entstandene Komplex führt zur enzymatischen Spaltung und Aktivierung von Procaspase-3 (Yuan and Akey 2013). Vergleichbar wie im extrinsischen Signalweg, führt die aktivierte Caspase-3 auch im intrinsischen Signalweg zur proteolytischen Spaltung weiterer Effektorcaspasen und damit einhergehend zum programmierten Zelltod.

Beide apoptotischen Signalwege stehen bereits früh in der Signaltransduktionskaskade in Kontakt. Durch aktivierte Caspase-8 des extrinsischen Signalwegs wird Bid, ein pro-apoptotischer Vertreter der Bcl-2 Familie, durch enzymatische Spaltung aktiviert. Das C-terminale Fragment (tBid) lagert sich daraufhin in die äußere mitochondriale Membran ein und führt ebenfalls zur Rekrutierung von Bax und damit zu Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (Billen et al. 2008).

1.3.3 Dynamik der Mitochondrien während der Apoptose

1.3.3.1 Bax Oligomerisierung

Bax, ein pro-apoptotischer Vertreter der Bcl-2 Familie, ist ein globuläres Protein bestehend aus neun α -Helixen mit einer mitochondrialen Signalsequenz am N-Terminus, wobei diese Sequenz allein nicht ausreichend ist um eine Lokalisierung von Bax in die äußere mitochondriale Membran zu gewährleisten (Lalier et al. 2007, Cartron et al. 2003). Nach Induktion von Apoptose durch tBid, kommt es zu einer Konformationsänderung von Bax und damit einhergehend zur Einlagerung der hydrophoben Helixen α 5-

$\alpha 6$ in die äußere mitochondriale Membran. Nach Einlagerung der Helix $\alpha 9$ kommt es zu Oligomerisierung von Bax und damit einhergehend zur Porenbildung durch dieses Protein (Lalier et al. 2007). Während die Struktur dieses pro-apoptotischen Mitglieds der Bcl-2 Familie aufgeklärt werden konnte (Suzuki et al. 2000), wird nach wie vor über die Anzahl aktivierter Bax-Moleküle beziehungsweise der Porengröße debattiert (Neumann 2010, Saito et al. 2000, Zhou and Chang 2008). Des Weiteren herrscht weiterhin Unklarheit über die Zusammensetzung dieser Poren. Bis heute gibt es sowohl Anzeichen, dass diese Poren allein aus Proteinen gebildet werden als auch Publikationen die von einem großen Lipidanteil ausgehen (Basanez et al. 2002, Muchmore et al. 1996, Suzuki et al. 2000, Martinez-Caballero et al. 2009).

Auch die Frage nach den Interaktionspartnern von Bax und Bak und deren putative Funktion bei der Porenbildung bleibt bislang ungeklärt. Insbesondere die Rolle von Drp1, eine GTPase die für die Spaltung von Mitochondrien verantwortlich ist, bei der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran durch Bax ist weiterhin umstritten. Montessuit und Kollegen zeigten, dass die Interaktion von Drp1 mit dem pro-apoptotischen Faktor während der Apoptose für dessen Oligomerisierung notwendig ist und das Zusammenspiel von Bax und Drp1 somit zu MOMP führt (Montessuit et al. 2010). Auch wenn die Interaktion der beiden Proteine in der Literatur bekannt ist, so konnte in Studien mit OMVs der Einfluss von Drp1 an der Bildung der Bax-Poren nicht bestätigt werden (Kushnareva et al. 2012).

1.3.3.2 Cytochrom c Freisetzung und Veränderung der mitochondrialen Ultrastruktur

Die Freisetzung von Cytochrom *c* ins Zytoplasma der Zelle wird bis heute in der Literatur kontrovers debattiert. Während nur 15% des Botenstoffs zwischen äußerer und innerer mitochondrialer Membran vorliegt, befindet sich der Großteil innerhalb der Cristae (Scorrano et al. 2002). Ob und in wieweit es zu massiver Umstrukturierung der Cristae junctions kommt, um eine schnelle Freisetzung zu gewährleisten, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Scorrano und Kollegen postulierten anhand mehrerer Studien, dass eine vollständige Freisetzung von Cytochrom *c* nur durch Umstrukturierung und Öffnung der Cristae erfolgen kann (Scorrano 2009, Scorrano et al. 2002). Dem entgegen konnte ein massiver Umbau der mitochondrialen Ultrastruktur vor Cytochrom *c* Freisetzung durch weitere Veröffentlichungen anderer Gruppen nicht bestätigt werden (Yamaguchi and Perkins 2009, Tam et al. 2010, Yang et al. 2012). Yamaguchi und Kollegen postulierten darüber hinaus eine etwaige Verengung der Cristae junctions vor der Freisetzung des pro-apoptotischen Faktors (Yamaguchi et al. 2008). Welche Rolle den Cristae sowohl vor als auch nach Freisetzung von Cytochrom *c* zukommt wird somit noch immer kontrovers diskutiert.

1.3.3.3 Morphologische Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks

Während der Apoptose kommt es zu massiven morphologischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks. Die Fragmentierung der Mitochondrien in kleine, abgerundete Organellen findet noch vor der Aktivierung der Caspasen statt und stellt ein frühes Ereignis im apoptotischen Zellprogramm dar (Suen et al. 2008). In gesunden Zellen wird die Integrität des mitochondrialen Netzwerks durch ein koordiniertes Zusammenspiel von Spaltung und Fusion gewährleistet. Auch hier spielen die Proteine der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle. In gesunden Zellen interagiert Bax und Bak mit Mitofusin2 (Mfn2), ein Protein, das für die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran von Bedeutung ist. Ohne die Induktion von Apoptose sind diese Vertreter der Bcl-2 Familie wichtig um die Morphologie der Mitochondrien zu gewährleisten. Erst nach Aktivierung von Bax und der damit einhergehenden Konformationsänderung, kann Bax Mfn2 inhibieren und führt damit zur einer Hemmung mitochondrialer Fusion (Karbowski et al. 2006). Nicht nur die Hemmung der Fusion sondern auch eine vermehrte Spaltung der Mitochondrien wird durch Bax und Bak gewährleistet. In gesunden Zellen pendelt Drp1 zwischen Zytoplasma und Mitochondrien. Dieses Protein kann durch Adapterproteine an die mitochondriale Membran andocken und durch ihre GTPase-Funktion zur Einschnürung von Mitochondrien führen. Sumoylierung von Drp1 durch aktiviertes Bax führt zu stabiler Integration in die äußere mitochondriale Membran und zu unkontrollierter Fission (Wasiak et al. 2007). Im Einklang damit führt die Herunterregulierung von Drp1 zu einer Verzögerung der Fragmentierung von Mitochondrien und einem Aufschub der Apoptose. Trotz Aktivierung von Bax und Bak, wird die Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae ins Zytoplasma der Zellen teilweise unterbunden und findet zeitverzögert statt (Estaquier and Arnoult 2007).

1.4 Hochauflösende Mikroskopieverfahren

Zur Detektion von Proteinen mittels Lichtmikroskopie braucht es sowohl eine spezifische Markierung als auch ein Mikroskop mit ausreichender Auflösung. Dies kann *in vivo* durch Fusion der zu untersuchenden Proteine mit Fluoreszenzproteinen wie GFP (*green fluorescent protein*), mit RSFPs (*reversibly switchable fluorescent proteins*) sowie durch Addition eines Fluorophor-bindenden Markers (SNAP-, CLIP- und Halo-Technologie) mit anschließender Färbung durchgeführt werden (Stagge et al. 2013). Diese Methoden funktionieren auch in fixierten Präparaten, wobei hier eine Vielzahl anderer Möglichkeiten der spezifischen Markierung vorhanden ist. Neben der konventionellen indirekten Immunfluoreszenz mit einem Primär- und mehreren Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern stehen weitere Proteine zur Antigenerkennung zur Verfügung (unter anderem DARPs, Nanobodies und Affibodies).

Um die markierten Proteine betrachten zu können, bedarf es neben der spezifischen Färbung ebenfalls ein Mikroskop mit ausreichend guter Auflösung, wie Ernst Abbé mit seiner theoretisch berechneten Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie deutlich machte. Er errechnete, dass zwei Objekte die näher als die halbe Wellenlänge des Lichts voneinander entfernt sind, durch konventionelle Lichtmikroskopie nicht voneinander getrennt werden können, sondern als ein einziges, beugungsbegrenztes Objekt abgebildet werden. Diese Auflösung ist dabei durch die Fokussierung des Lichtstrahls und der auftretenden Beugung aufgrund des Wellencharakters von Licht auf etwa 250 nm limitiert. In der von Abbé entwickelten Formel zur Berechnung der Auflösungsgrenze ist d proportional zur Wellenlänge des Lichts λ ($\lambda = 400\text{--}700$ nm) und korreliert invers mit der numerischen Apertur ($n \sin \alpha$) des Mikroskops, wobei n für den Brechungsindex des Mediums und α für den halben Öffnungswinkel des Objektivs steht.

$$d = \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha}$$

Für die Untersuchungen sub-mitochondrialer Proteinverteilungen sind allerdings höhere Auflösungen notwendig, da bereits der Durchmesser von Mitochondrien typischerweise zwischen 250 und 500 nm rangiert und damit nur knapp über der Auflösungsgrenze eines konventionellen Lichtmikroskops von etwa 250 nm liegt. Eine detaillierte Betrachtung der Proteinverteilung dieser Organellen ist demnach ohne verbesserte Auflösung nur in Ausnahmefällen möglich (Jakobs and Wurm 2014).

Um die Auflösungsgrenze von Abbé zu durchbrechen, wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Fluoreszenzmikroskopie-Verfahren entwickelt, die nicht auf bessere Fokussierung des Lichtstrahls beruhen. Stattdessen nutzen sie alle das Prinzip des Schaltens zwischen zwei molekularen Zuständen, meist einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand. Diese neuen Methoden lassen sich in zwei Kategorien einteilen, die stochastischen Methoden wie GSDIM (*ground state depletion microscopy followed by individual molecule return*) (Fölling et al. 2008) und PALM (*photoactivated localization microscopy*) (Betzig et al. 2006), sowie die Methoden mit gezieltem Auslesen der Fluoreszenz wie STED (*stimulated emission depletion*). In der Theorie haben diese neuen Verfahren eine unlimitierte maximale Auflösung (Abbildung 1.13).

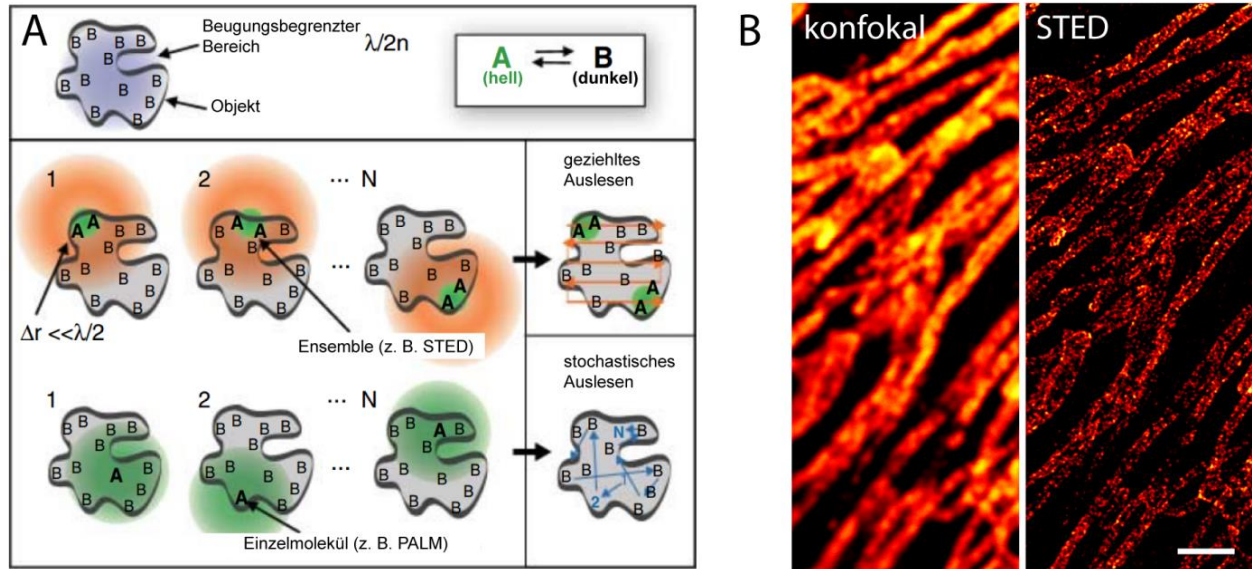


Abbildung 1.13: Darstellung der Unterschiede zwischen den stochastischen und den gezielten hochauflösenden Mikroskopieverfahren. A.) Bei gezielten Mikroskopieverfahren wie STED können Objekte bestehend aus einer bestimmten Anzahl an fluoreszierenden Molekülen („B“) durch das koordinierte Scannen mit einem Anregungsstrahl (grün) und einem Abregungsstrahl (rot) beugungsunbeschränkt aufgenommen werden. Durch den ringförmigen STED-Strahl werden die Fluorophore in der Peripherie ausgeschaltet, wodurch lediglich Photonen aus dem Fokuszentrums der Probe emittiert werden. Auch Methoden wie PALM nutzen das Schalten zwischen einem nichtfluoreszierenden und einem fluoreszierenden Zustand. Welche Moleküle sich im aus- beziehungsweise an-Zustand befinden geschieht bei diesen Verfahren allerdings stochastisch. (bearbeitet aus (Hell 2007)) B.) Gezeigt ist die verbesserte Auflösung der STED-Mikroskopie anhand der Proteinverteilung in Mitochondrien. (Größenbalken: 2 µm)

Das Prinzip der STED-Mikroskopie wurde theoretisch 1994 durch Hell und Wichmann beschrieben und wenige Jahre später praktisch umgesetzt (Hell and Wichmann 1994, Klar et al. 2000). Bei diesem gezielten Mikroskopieverfahren wird die Emission der Fluorophore am Rande des Fokuspunktes mittels eines ringförmigen Laserstrahls unterdrückt, dessen Wellenlänge am roten Ende des Emissionsspektrums der jeweiligen Fluorophore liegt.

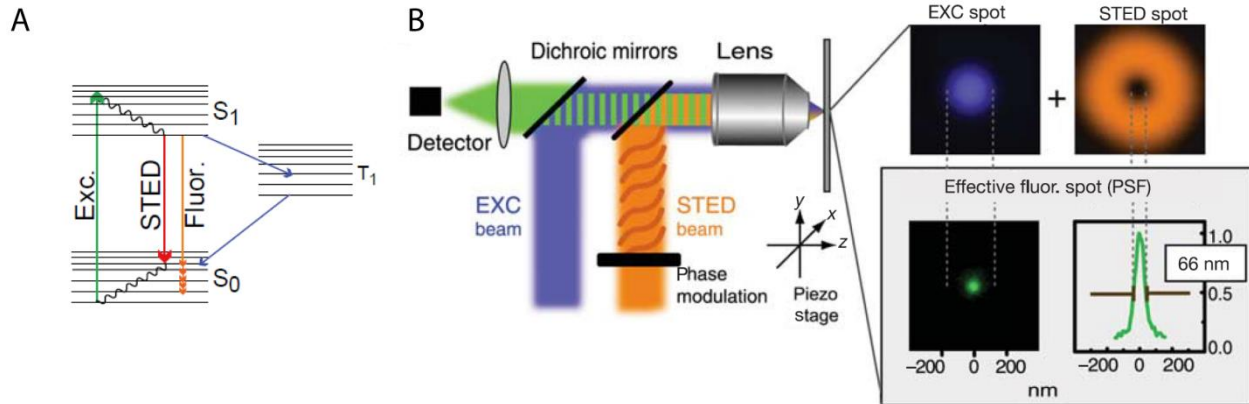


Abbildung 1.14: Prinzip von Anregungs- und STED-Strahl. Fluorophore können von ihrem Grundzustand S_0 durch Licht einer bestimmten Wellenlänge in ihren angeregten Zustand S_1 versetzt werden. Nach einer gewissen Lebensdauer fallen sie in den Grundzustand zurück und emittieren dabei jeweils ein Photon einer charakteristischen Wellenlänge. Der STED-Strahl führt zu Unterdrückung dieser Fluoreszenzemission, indem es die Fluorophore durch stimulierte Emission dazu bringt, von S_1 in S_0 überzugehen indem sie ein Photon einer deutlich anderen Wellenlänge emittieren (A). Diese stimulierten Photonen können optisch von den Fluoreszenzphotonen getrennt werden. Während der Anregungsstrahl (B, blau) die Fluorophore im Zentrum des Fokus anregt, wird ein ringförmiger STED-Strahl benutzt um die Fluoreszenz in der Peripherie durch stimulierte Emission zu verhindern. Dies erhöht die effektive Auflösung (dargestellt durch die PSF (*point spread function*)) (bearbeitet aus (Hell 2003, Willig et al. 2006)).

Der ringförmige STED-Strahl führt dazu, dass Fluorophore am Rand des Fokus durch stimulierte Emission abgeregt werden, indem sie ein Photon der gleichen Wellenlänge wie die des STED-Strahls emittieren. Dadurch fallen die Fluorophore von S_1 auf einen höheren Vibrationslevel des Grundzustands S_0 zurück, wodurch eine Wiederanregung verhindert werden kann (Abbildung 1.14 A). Die nachstehende Formel erklärt das Prinzip der verbesserte Auflösung durch den STED-Strahl.

$$d \approx \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha \sqrt{1 + a I_{max}/I_s}}$$

Hierbei ist I_{max} die Intensität des STED-Strahls, I_s ist die „Sättigungsintensität“ und $a > 0$ ein Parameter, welcher die Form des Nullpunktes (punkt- oder linienförmig) berücksichtigt. Wird ein Abregungsstrahl mit der Intensität I_{max} einer bestimmten Wellenlänge genutzt, werden die Fluorophore am Rand des Fokus, die nicht im zentralen Bereich des Strahls liegen, ausgeschaltet. Die „gesättigte Intensität“ I_s ist eine Farbstoff-spezifische Konstante, die charakteristisch vom Schaltvorgang abhängt und negativ mit der Lebensdauer der Zustände korreliert. Während für $I_{max} = 0$ die Auflösung d der beugungsbeschränkten Formel von Abbé folgt, kann bei $I_{max}/I_s \rightarrow \infty$ eine theoretisch unlimitierte Auflösung erreicht werden (Hell 2009). Die Anordnung der Strahlen (punktförmige Anregung sowie ringförmiger STED-Strahl) im Mikroskop sowie die daraus resultierende effektive Auflösung sind in Abbildung 1.14 B dargestellt.

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Kurz vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde der Multiproteinkomplex MICOS unabhängig voneinander durch mehrerer Arbeitsgruppen als strukturgebendes Element der Cristae junctions sowohl in Hefe als später auch in Säugerzellen identifiziert. Während sich in der darauf folgenden Zeit zahlreiche Arbeiten mit der Charakterisierung des MICOS Komplexes und deren Interaktionspartnern beschäftigt haben, ist bislang wenig über die Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung seiner Komponenten als Antwort auf verschiedene externe Stimuli bekannt. Durch eine detaillierte Untersuchung von MICOS im Kontext unterschiedlicher zellulärer Situationen, sollte etwaigen Veränderungen nachgegangen werden. Dafür wurden zwei Situationen ausgewählt, in denen Mitochondrien eine zentrale Funktion zukommt: Die Versorgung von Neuronen gemäß ihres Energiebedarfs und der programmierte Zelltod.

Zur Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung scheidet konfokale Mikroskopie aufgrund der beugungsbeschränkten Auflösung von rund 250 nm aus, da bereits der Durchmesser der Mitochondrien zwischen 250 und 500 nm liegt. Um diesen Veränderungen nachgehen zu können, sollten hochauflösende Mikroskopieverfahren angewendet werden. Ergänzend zu der qualitativen Beurteilung der STED-Bilder, wurde in beiden untersuchten Situationen eine quantitative Auswertung der Varianz der Fluoreszenzintensitäten, als Maß für die Heterogenität der Proteinverteilung, durchgeführt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit, wurden Veränderungen der Proteinverteilung des MICOS Komplexes aufgrund der zentralen Position von Mitochondrien im Energiestoffwechsel untersucht. Bei der Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt handelt es sich um einen aktiven, energieverbrauchenden Prozess. Die neuromuskuläre Synapse eignet sich daher zur Untersuchung einer potentiellen Veränderung der Proteincluster dieses Komplexes, insbesondere als Reaktion auf einen erhöhten Energiebedarf. Die Analyse der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 als strukturgebende Kernkomponente bietet sich an, um Rückschlüsse auf etwaige Veränderungen des MICOS Komplexes in Folge auf eine erhöhte physische Aktivität des innervierten Muskels ziehen zu können.

Des Weiteren wurde eine Untersuchung der Veränderung sub-mitochondrialer Proteinverteilung während der Apoptose, als essentieller Prozess für multizelluläre Organismen, durchgeführt. Trotz der zentralen Rolle von Mitochondrien im programmierten Zelltod, ist wenig über etwaige Veränderungen der Verteilung mitochondrialer Proteine bekannt. Anhand von Daten, die mittels hochauflösender Lichtmikroskopie gewonnen wurden, sollte der Frage nachgegangen werden, ob Veränderungen der sub-

mitochondrialen Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose beobachtet werden können. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Cristae junctions im Zusammenhang mit der Freisetzung von Cytochrom *c* stehen, wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Komponenten des MICOS Komplexes gelegt. Für eine vollständige Freisetzung des pro-apoptischen Faktors bedarf es zudem einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran durch die Proteine der Bcl-2 Familie. Um diesen Prozess näher zu untersuchen, wurde die Fragestellung im letzten Teil der vorliegenden Arbeit auf die Oligomerisierung von Bax ausgeweitet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Solange nicht anders angegeben, handelt es sich bei den verwendeten Chemikalien um Produkte mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ der Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland).

Alle Lösungen sowie sämtliche Puffer wurden mit Wasser aus der Reinstwasseraufbereitungsanlage ELGA (LabWater, Celle, Deutschland) hergestellt.

2.1.2 Verwendete Antikörper

Verdünnungen der verwendeten Antikörper wurden bei Immunfluoreszenzfärbungen in 10 % (w/v) BSA in PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) angesetzt.

Tabelle 2.1: Liste aller verwendeten Antikörper. Abcam (Cambridge, England), Proteintech (Chicago, USA), Atlas (Stockholm, Schweden), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA), Trevigen (Gaithersburg, USA), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland), BD Bioscience (Franklin Lakes, USA), Life Technologies (Carlsbad, USA)

Antikörper gegen	Ursprung	Fluorophor	Quelle
ATP-Synthase, β -Untereinheit	Maus	-	Abcam (ab5432)
Bax	Maus	-	Trevigen (2282)
Bax	Kaninchen	-	Merck Millipore (06-499)
Bak	Kaninchen	-	Merck Millipore (06-536)
Cyclophilin F (auch bekannt unter Cylophilin D)	Maus	-	Abcam (ab110324)

Cytochrom c	Maus	-	BD Bioscience (556432)
Drp1 (DLP1)	Maus	-	BD Bioscience (611113)
Kaninchen	Ziege	KK114	selbst gekoppelt
Kaninchen	Ziege	Atto594	selbst gekoppelt
Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor 488	Life Technologies (A11034)
Maus	Schaf	KK114	selbst gekoppelt
Maus	Schaf	Atto594	selbst gekoppelt
Maus	Ziege	Alexa Fluor 488	Life Technologies (A11001)
Mic19 (CHCHD3)	Kaninchen	-	Atlas (HPA042935)
Mic27 (APOOL)	Kaninchen	-	Atlas (HPA000612)
Mic60 (Mitofilin)	Kaninchen	-	Abcam (ab48139)
Mic60 (Mitofilin)	Kaninchen	-	Proteintech (10179-1AP)
Tom20		-	Santa Cruz Biotechnology (sc-11415)
ChAT	Maus	-	Till Marquart (ENI, Göttingen, Deutschland)

2.1.3 Weitere Farbstoff-gekoppelte Chemikalien

Neben der konventionellen Antikörperfärbung wurde α -Bungarotoxin (Life Technologies (Carlsbad, USA)), gekoppelt an Alexa Fluor 555, verwendet. Dies ermöglichte die Darstellung der neuromuskulären Synapse innerhalb des Soleus und Tibialis anterior.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie

2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenzte, humane Zellen. Für die Untersuchung der Apoptose wurden immortalisierte U2OS Zellen verwendet, eine Zelllinie ursprünglich aus dem Schienbein einer an Knochenmark erkrankten 15-Jährigen (Niforou et al. 2008). Als weitere Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl HeLa- als auch HDFn-Zellen benutzt. Bei den HeLa-Zellen handelt es sich um die ersten immortalisierten, humanen Zellen aus dem Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks im Jahr 1951 (Callaway 2013). Die *human dermal fibroblast neonatal* (HDFn) sind ebenfalls menschlichen Ursprungs und entstammen einer primären Fibroblastenkultur, isoliert aus einer neonatalen Vorhaut.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung aller verwendeten Zelllinien. DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland), ECACC: European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK), Life Technologies (Carlsbad, USA)

Name	Organismus	Gewebe	Quelle
U2OS	<i>Homo sapiens</i>	Osteosarkom	ECACC
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Zervixkarzinom	DSMZ
HDFn	<i>Homo sapiens</i>	Fibroblasten, neonatal	Life Technologies (C-004-5C)

2.2.1.2 Kultivierung und Passage

Alle Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) im CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in DMEM-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.3) kultiviert. Die mikroskopische Kontrolle der Morphologie und Konfluenz erfolgte mit einem Leica DMI3000B-Mikroskop (Leica PL Fluotar (10x/0.30 PH1)-Objektiv).

Die Passage der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS durch Inkubation mit Trypsin bei 37 °C im CO₂-Brutschrank. Nachdem sich die Zellen vom Substrat ablösten, wurde die Reaktion durch Zugabe von DMEM-Medium abgestoppt. Schließlich konnte nun ein Viertel bis ein Sechstel der Zellen in eine neue Medium-gefüllte 75 cm²-Zellkulturflasche überführt werden.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Zellkulturmedien. Life Technologies (Carlsbad, USA), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

Reagenzien	Ansatz für 500 ml	Quelle
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>), high glucose	435 ml	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin, 10000 U/ml / 10000 µg/ml	5 ml	Merck Millipore
Natrium-Pyruvat, 100nM	5 ml	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA, 10x	5 ml	Merck Millipore
FBS Superior (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	50 ml	Merck Millipore

2.2.1.3 Aussaat der Zellen auf Deckgläschen

Zur Sterilisierung der Deckgläschen (10 mm, 12 mm) (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden diese zuerst in Ethanol und anschließend in Isopropanol geschwenkt und zum Trocknen unter die Sterilbank gestellt.

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen ein bis zwei Tage vor Durchführung des Experiments auf Deckgläschen ausgesät, um deren Anheftung auf das neue Substrat zu gewährleisten. Dabei wurden die Zellen nach einmaligem Waschen in PBS durch Inkubation mit Trypsin bei 37 °C im CO₂-Brutschrank vom Substrat abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit DMEM-Medium wurden die Zellen in vorbereitete Zellkulturschalen der gewünschten Größe (6-well Tissue Culture Plate (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), 12-well Tissue Culture Plate (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) beziehungsweise in eine 100 x 20 mm Cell Culture Dish (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt, sodass am Tag des Experiments eine Konfluenz von ungefähr 50 % erreicht wurde.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Für Versuche die eine spezifische Zellzahl erforderten, wurde diese mit dem automatischen Zellzähler Scepter 2.0 (Millipore, Darmstadt, Deutschland) nach Ablösen der Zellen durch Trypsin und Aufnahme in einem bestimmten Volumen DMEM-Medium bestimmt.

2.2.1.5 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung der Dauerkulturen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation bei 37 °C im CO₂-Brutschrank mit Trypsin vom Substrat abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in normalem Zellkulturmedium werden diese für 5 min bei 160 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in Einfriermedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 1.5) resuspendiert und in die Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Nach langsamem Einfrieren der Zellen im Einfriercontainer (Nalgene Mr. Frosty, Thermo Scientific, Waltham, USA) für 24 bis 48 Stunden bei -80 °C wurden die Röhrchen in den Stickstofftank überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Einfriermediums. Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland),

Reagenzien	Ansatz für 100 ml	Quelle
DMEM, high glucose	70 ml	Merck Millipore
FBS Superior (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	20 ml	Merck Millipore
DMSO (Dimethylsulfoxid)	10 ml	Sigma-Aldrich

2.2.1.6 Transfektionen in Säugetierzellen

Um DNA in Form von Plasmiden in Säugetierzellen zu transfizieren, wurden je nach Zelltyp und Experiment zwei unterschiedliche Methoden verwendet, die Elektroporation und die chemische Transfektion mittels TurboFect (Thermo Scientific, Waltham, USA)

2.2.1.6.1 Elektroporation

Um Zellen mittels Elektroporation zu transfizieren, wurden diese nach einmaligem Waschen mit PBS durch Inkubation mit Trypsin bei 37 °C im CO₂-Brutschrank vom Substrat abgelöst und in DMEM-Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe 1.2.1.4) wurden eine Million Zellen pro Reaktion in ein Falcon (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 10 min bei 90 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Elektroporationspuffer (Cell Line Nucleofector Kit V für U2OS und HeLa, NHDF Nucleofector Kit für HDFn) der Firma Lonza (Basel, Schweiz) aufgenommen und in Elektroporations-Küvetten, in die zuvor 2 bis 5 µg DNA pipettiert wurde, überführt. Durch Auswahl des zellspezifischen, voreingestellten Elektroporationsprogramms im Nucleofector 2D Gerät der Firma Lonza wurde die DNA in die Zellen geschleust. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in 1 ml vorgewärmten DMEM-Medium resuspendiert und auf das entsprechende Substrat ausgesät.

2.2.1.6.2 Chemische Transfektion

Für die chemische Transfektion wurden die Zellen bereits einen Tag zuvor mit einer Konfluenz von etwa 50 % ausgesät. Für die Transfektion wurden 2 bis 5 µg der DNA in 400 µl serumfreiem DMEM-Medium aufgenommen und der Transfektionsansatz nach Zugabe von 6 µl TurboFect gut vermischt und bei Raumtemperatur für 15–20 min inkubiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben.

2.2.1.7 *shRNA Knockdown in U2OS Zellen*

Für den Knockdown von Drp1 in U2OS Zellen wurde das shRNA-Plasmid (5 µg) mittels Elektroporation (siehe 1.2.1.4.1) in die Zellen transfiziert und diese in einer 10 cm Schale mit Deckgläschen ausgesät (siehe 1.2.1.3). Um transfizierte Zellen zu selektieren, wurden diese für eine Woche mit Hygromycin B (Life Technologies, Carlsbad, USA) behandelt, wobei auf 8 ml DMEM-Medium an Tag 1 und 2 nach Transfektion 16,8 µl Hygromycin B und an Tag 3 und 4 4,2 µl Hygromycin B auf die Zellen gegeben wurde.

2.2.1.8 *Induktion von Apoptose*

Zur Induktion von Apoptose wurden die Zellen in 6-well Platten überführt und durch Zugabe von 5 µl Actinomycin D (10 µM in DMSO) und 4 µl z-vad-fmk (Santa Cruz Biotech, Dallas, USA) auf 2 ml DMEM-Medium für 14 beziehungsweise 18 Stunden behandelt. Die Addition des Caspase-Inhibitors (z-vad-fmk) erfolgte nur bei U2OS Wildtyp-Zellen und erübrigte sich nach Drp1 Knockdown. Den Kontrollzellen wurde die entsprechende Menge DMSO zugegeben.

2.2.2 Mausmodelle

Alle Mausversuche fanden in Kooperation mit Camille Lancelin (European Neuroscience Institute, Göttingen) aus der Arbeitsgruppe von Dr. Till Marquardt (European Neuroscience Institute, Göttingen) statt.

Camille Lancelin war verantwortlich für die Paarung, Unterbringung und Versorgung der Mäuse sowie die freiwilligen Laufexperimente und die Präparierung des Musculus tibialis anterior und Musculus soleus mit anschließender Herstellung der Kryoschnitte.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Zur Isolierung des Gesamtzellproteins aus Säugetierzellen wurden diese nach Entfernung des Zellkulturmediums zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml PBS pro 75 cm²-Zellkulturflasche konnten die Zellen mit einem Zellschaber (Sarsted, Nümbrecht, Deutschland) vom Substrat entfernt werden. Durch Verdünnung des Zellpellets mit weiteren 2 ml PBS (4 °C) und anschließender Überführung in ein 15 ml Falcon (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden die Zellen mittels Zentrifugation (160 g, 5 min) pelletiert. Es erfolgten zwei weitere Waschschrirte mit 1 ml PBS (4 °C), wonach die Zellen in SDS-Probenpuffer bestehend aus 6-fach SDS-Ladepuffer (6 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 M Tris/Cl (pH 6,8)), Proteaseinhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Deutschland) sowie PBS, aufgenommen und bei -20 °C eingefroren werden konnten.

2.2.3.2 Western-Blot Methode

Bei Durchführung eines Western-Blots können Proteingemische nach Größe durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch anschließende Übertragung auf eine Membran mittels Antikörperbindung nachgewiesen werden.

2.2.3.2.1 SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Das Trenngel hatte eine Acrylamidkonzentration von 12,5 % (w/v) (6,3 ml ddH₂O, 5 ml 1,5 M Tris/Cl (pH 8,8), 8,3 ml Acrylamid (30 %), 200 μ l SDS (10 %), 200 μ l APS (10 %), 20 μ l TEMED) und einen pH-Wert von 8,8. Für das Sammelgel wurde die Konzentration des Acylamids auf 5 % (w/v) gesetzt (5,6 ml H₂O, 2,5 ml 0,5 M Tris/Cl, 1,7 ml Acrylamid (30 %), 100 μ l SDS (10 %), 100 μ l APS (10 %), 10 μ l TEMED) und der pH-Wert lag bei 6,8. Die Gesamtzelllysate in SDS-Probenpuffer wurden für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt und nach Zentrifugation für 1 min bei 15700 g auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Stromstärke von 20–25 mA im Sammelgel und 30–40 mA für das Trenngel verwendet. Als Puffer für die Gelelektrophorese wurde Lämmli-Puffer (0,25 M Tris, 1,925 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3) verwendet. Als Größenreferenz zur Einteilung der Proteinbanden in entsprechende Größen diente der Proteinmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, Burlington, Canada).

2.2.3.2.2 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Um einzelne Proteine spezifisch detektieren zu können, wurde das Gel über Nacht bei 4 °C im Nass-Blot bei 160 mA auf eine Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) übertragen. Ein Tris-basierendes System diente dabei als Puffer (20 mM Tris, 150 Glycin, 20 % (v/v) Methanol) zwischen mehreren Lagen Vlies und Filterpapier.

2.2.3.2.3 Ponceau-S-Färbung

Nach der Übertragung auf die Nitrocellulose-Membran wurden die Proteine mittels Ponceau-S-Färbung detektiert. Dazu wurde die Membran für 10 min in der Ponceau-S-Lösung geschwenkt (2,5 g/l Ponceau-S, 40 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Essigsäure) und durch mehrere Waschschriffe mit ddH₂O soweit entfärbt, bis einzelne Proteinbanden sichtbar waren. Die detektierten Proteinbanden wurden zur Dokumentation eingescannt.

2.2.3.2.4 Antikörperfärbung zur Detektion spezifischer Proteine

Zur Detektion einzelner Proteine auf der Nitrocellulose-Membran wurde eine Antikörpermarkierung durchgeführt. Hierfür wurde die Membran nach 30-minütiger Blockierung in Waschpuffer A (10 mM Tris/Cl (pH 7,4), 0,9 % (w/v) NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver, weitere 30 min mit Waschpuffer A ohne Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Bindung des primären Antikörpers (1:500 bis 1:200 verdünnt in Waschpuffer A mit Magermilchpulver) fand durch Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde statt. Nach fünfminütigem Waschen in Waschpuffer A, danach zweimaligem Waschen (je 3 min) in Waschpuffer B (0,9 % (w/v) NaCl, 0,05 % (w/w) Triton X-100, 0,2 % (w/v) SDS) und einem letzten Waschschriffe in Waschpuffer A für 5 min, wurde die Membran mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (ECL-Antikörper, Verdünnung 1: 10000) in Waschpuffer A mit zusätzlichem Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschüttelt. Die beschriebenen Waschschriffe wurden nochmals wiederholt, wonach die Proteine durch Inkubation der Membran mit Detektionslösung (Western Lightning Plus ECL, Perkin Elmer LAS GmbH, Waltham, USA) anhand ihrer Chemilumineszenz nachgewiesen werden konnten.

2.2.4 Fluoreszenzfärbungen

2.2.4.1 Herstellung Fluorophor-gekoppelter Antikörper

Einige der nicht-kommerziell erworbenen Sekundärantikörper wurden durch NHS-Esterbindung mit den jeweiligen Fluorophoren gekoppelt. Zusätzlich wurde der Antikörper gegen Cytochrom *c*, als einziger Primärantikörper, direkt mit Atto532 gelabelt.

Um eine Kopplung von Fluorophoren an Antikörper durchführen zu können, erfolgte eine Reaktion der N-hydroxy-succinimidyl-Ester (NHS-Ester) aller verwendeten Fluorophore mit den Aminogruppen der Antikörper. 200 µg der jeweiligen Fluorophore wurden dafür in 20 µl DMF (Dimethylformamid) gelöst, um eine Konzentration von 10 mg/ml zu erreichen. Parallel wurden die Antikörper durch Zugabe von ½ Volumen 1 M NaHCO₃ (pH 8,3–9,0) vorbereitet. Unter ständigem Rühren wurde der gelöste Fluorophor tropfenweise zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Tris/Cl (pH 8) über 5 min abgestoppt. Die Auftrennung des Antikörper-Fluorophor-Gemisches fand mittels Größenausschluss-Chromatographie unter Verwendung einer Sephadex G-25-Säule (PD-10, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) statt. Diese wurde während der Reaktion von Antikörper und Fluorophor durch mehrfache Zugabe von PBS equilibriert. Nachdem das Antikörper-Fluorophor-Gemisch auf die Säule aufgetragen wurde, erfolgte die Eluierung mittels Zugabe von PBS auf das Säulenmaterial. Die Proteinkonzentrationen aller gesammelten Fraktionen wurden mittels Bradford-Assay (1.2.3.1.1) bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und anschließend in Aliquots von 10 µl bis 50 µl aufgeteilt und bei -20 °C beziehungsweise -80 °C eingefroren.

2.2.4.1.1 Bradford-Assay zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde ein Bradford-Assay (BioRAD, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Proteinlösung zu je 1 ml einer fünffach verdünnten Bradfordlösung gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Messung der Absorption der Proben bei 600 nm und anschließendem Vergleich mit einer Eichkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die spezifische Darstellung von Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie findet unter Zuhilfenahme Fluorophor-gekoppelter Antikörper statt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden zwei Antikörper verwendet, ein spezifischer Primärantikörper und ein Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper. Der

Primärantikörper erkennt selektiv ein Protein durch Bindung an einem oder mehreren Antigenen. Diese gebundenen Antikörper werden durch den Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt und können somit mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Die Vorteile der Methode gegenüber der direkten Immunfluoreszenz, bei dem der Fluorophor direkt an den Primärantikörper gekoppelt ist, liegen in der Amplifizierung des Signals und der Kosten der spezifischen Antikörper.

2.2.4.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit zwei Antikörpern

Die Zellen wurden am Vortag in der gewünschten Dichte auf sterilen Deckgläschen ausgesät (1.2.1.3). Die Fixierung der Proben fand durch frisch aufgetautes, auf 37 °C angewärmtes Formaldehyd (8 % (w/v) Formaldehyd in PBS, pH 7,5) statt. Danach wurden die Zellen durch Inkubation für 5 min in Triton X-100 (0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS) permeabilisiert und anschließend 5 min in BSA (10 % (w/v) BSA in PBS) geblockt. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (je nach Antikörper 1:100 oder 1:200 in BSA (10 % (w/v) BSA in PBS)) fand für eine Stunde bei Raumtemperatur statt, wobei die Proben in einer Feuchtekammer vor dem Austrocknen geschützt wurden. Nach dreimaligem Waschen in PBS und einer weiteren Permeabilisierung und Blockierung wurde der Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur (in der Feuchtekammer), wurden die Proben dreimal in PBS gewaschen und anschließend als letzten Waschschrift für eine halbe Stunde bei 4 °C in PBS inkubiert, bevor die Zellen in Mowiol mit DABCO (25 % (w/v) Glycerin, 9 % (w/v) Mowiol 4-88, 0,1 M Tris/Cl, 0,1 % (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane, pH 8,5) eingedeckelt werden konnten. Eine Färbung der Zellkerne wurde optional durch Zugabe von DAPI (Sigma-Aldrich) im Mowiol vorgenommen.

2.2.4.2.2 Indirekte Immunfluoreszenz mit drei Antikörpern

Durch eine Kombination aus indirekter und direkter Immunfluoreszenz konnten Färbungen mit mehr als einem Antikörper derselben Spezies durchgeführt werden. Als Fluorophor-gekoppelten Primärantikörper diente der Cytochrom *c*-Antikörper aus der Maus. Durch mehrfache Blockierungsschritte wurden dabei etwaige Kreuzreaktionen minimiert.

Nach Inkubation der Proben mit Primär- und Sekundärantikörper, sowie dem dreimaligen Waschen in PBS (siehe 1.2.3.2.1), wurden freie Bindungsstellen der Sekundärantikörper gegen Maus durch Zugabe eines Antikörpers muriner Herkunft blockiert, um eine Kreuzreaktion des Cytochrom *c*-Antikörpers (ebenfalls aus Maus) zu verhindern. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Bindung durch Zugabe von Formaldehyd (8 % (w/v) Formaldehyd in PBS, pH 7,5) für 5 min fixiert. Nach weiterer Permeabilisierung und Blockierung wurde der Cytochrom *c*-Antikörper für eine Stunde auf die Proben

inkubiert und diese nach einer Stunde erneut dreimal in PBS gewaschen. Der letzte Waschschriff sowie das Eindeckeln in Mowiol fanden wie in Abschnitt 1.2.3.2.1 beschrieben statt.

2.2.4.2.3 Antikörpermarkierung in Gewebeschnitten

Für die Färbung der Kryoschnitte (Dicke: 10 μm) wurden die Proben nach 10–20-minütiger Auftauphase bei Raumtemperatur dreimal für 10 min in PBS getaucht. Danach fand eine einstündige Blockierung der Gewebeschnitte durch Blockierungslösung (4 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS) bei Raumtemperatur in der Feuchteammer statt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C ebenfalls in der Blockierungslösung. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in PBS wurde der Sekundärantikörper mit Fluorophor-gekoppeltem α -Bungarotoxin für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung zugegeben. Die letzten drei Waschschriffe fanden durch Inkubation für je 10 min in PBS statt, wonach die Proben in Mowiol mit DABCO eingedeckelt werden konnten.

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Für epifluoreszente Aufnahmen wurde das Leica Mikroskop DM6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Das Mikroskop war ausgestattet mit einem Öl-Immersionsojektiv (PL APO, 100 x /1.40–0.70 Öl), einer CCD-Kamera (DFC350FX) und einer Metallhalogenidlampe (EL6000, Leica Microsystems) zur Beleuchtung der Proben. Durch eine Reihe spezifischer Filterwürfel wurden die entsprechenden Wellenlängen selektiert (A4-Filterwürfel (Anregung 360/40 nm, Emission 470/40 nm), GFP-Filterwürfel (Anregung 470/40 nm, Emission 525/50 nm), N3-Filterwürfel (Anregung 546/12 nm, Emission 600/40 nm), BGR-Filterwürfel (Anregung 570/20 nm, Emission 640/40 nm), SFRED-Filterwürfel (Anregung 630/20 nm, Emission 667/30 nm)).

2.2.5.2 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Aufnahmen fanden an zwei kommerziellen Laser Raster Mikroskopen von Leica statt (TCS SP5, TCS SPE).

Aufnahmen mit dem Leica TCS SP5 wurden unter Verwendung des Öl-Immersionsojektivs (Leica HCX PL APO CS 63 x / 1,40–0.60 Öl) gemacht. Es standen folgende Laser zur Anregung der Fluorophore zur Verfügung: 405er Diode (405 nm), Argon-Laser (458 nm/ 476 nm/ 488 nm/ 496 nm/ 514 nm), DPSS 561

(561 nm) und HeNe-Laser (630 nm). Die Detektion fand durch vier Photomultiplier (PMT) statt. Der AOBs (*acusto optical beam splitter*) wurde verwendet, um den Strahlengang von Anregung und Emission zu trennen. Für die Aufnahme mehrerer Kanäle wurde im sequenziellen Modus gearbeitet, wobei nach jedem Bildfeld der Fluoreszenzkanal gewechselt wurde. Alle Daten sind als z-Stapel aufgenommen und als Maximalprojektion dargestellt. Für die optimale Voxel-Größe wurde gemäß des Nyquist-Kriteriums gearbeitet.

Für die Messungen am Leica TCS SPE wurde ebenfalls mit einem Öl-Immersionsobjektiv (Leica HC PL APO 63 x /1,40–0,60 Öl) gearbeitet. Die Anregung der Fluorophore fand über einen *Solid-State Laser* (Festkörperlaser) mit den Wellenlängen 488, 561 und 635 nm statt. Zur Detektion der Photonen wurde eine eingebaute PMT verwendet, die bei Mehrfarben Aufnahmen im sequenziellen Modus benutzt wurde. Die aufgenommenen Bilder entsprechen Maximalprojektionen über mehrere Ebenen. Die Voxel-Größe wurde anhand des Nyquist-Kriteriums ausgewählt.

2.2.5.3 Hochauflösende Mikroskopie

2.2.5.3.1 Einfarben STED-Mikroskopie

Für alle Messungen die nur eine STED-Farbe benötigten (mit Ausnahme der Gewebeschnitte), wurde ein nicht-kommerzielles Setup mit einem Öl-Immersionsobjektiv (NA 1.4, 100 x PL APO, Leica) und einer effektiven Auflösung von 40 bis 50 nm benutzt (Harke et al. 2008) (Abbildung 2.1). Die Anregung erfolgte durch eine gepulste Laserdiode (Picoquant, Berlin, Germany) mit einer Wellenlänge von 640 nm und einer Pulsdauer von etwa 70 ps. Jedem Anregungspuls folgte ein ins rote verschobener STED-Puls des Titanium Sapphire Lasers (MIRA900, Coherent, USA) mit einer Wellenlänge von 760 nm und einer Pulslänge von etwa 300 ps. Der zeitliche Versatz beider Pulse wurde über eine elektronische *delay* Einheit gesteuert und durch das Ausgangssignal des STED-Lasers getriggert. Zusätzlich konnten zwei weitere konfokale Kanäle aufgenommen werden. Die Anregung erfolgte dabei über Laserdioden von Picoquant mit Wellenlängen von 470 nm und 532 nm. Das Signal aller konfokalen Aufnahmen wurde über spezifische Filter selektiert (510/40 nm, 590/60 nm, 670/40 nm). Die Detektion erfolgte über 4 APDs (*avalanche photo diode*).

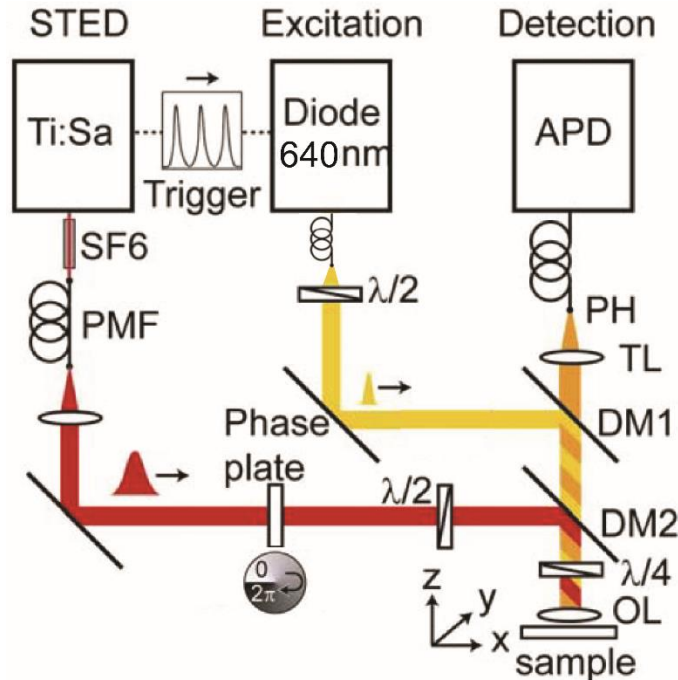


Abbildung 2.1: Das Einfarben STED-Mikroskop. Schematische Darstellung des nicht-kommerziellen STED-Mikroskops für Einfarben STED-Aufnahmen. (Excitation: Anregung, Detection: Detektion, PMF (polarisation maintaining fiber): Polarisations-erhaltende Faser, APD (avalanche photo diode): Avalanche Photo-Diode, PH: pinhole, TL (tube lens): Tubus-Linse, DM (dichroic mirror): dichroitischer Spiegel, OL (objective lens): Objektiv-Linse, SF6 (glass rods): Glas-Stäbe) (bearbeitet aus (Harke et al. 2008)).

2.2.5.3.2 Zweifarben STED-Mikroskopie

Sowohl für die Messungen in den Gewebeschnitten als auch für alle Aufnahmen die eine zweite STED-Farbe benötigten (mit Ausnahme der Aufnahmen zur Bestimmung der Kolokalisierung der MICOS Komponenten), wurde das kommerzielle STED-Mikroskop „2-color STED 775 QUAD Scan“ der Firma Abberior Instruments (Göttingen, Deutschland) verwendet.

Die Anregung fand über drei gepulste Diodenlaser mit den Wellenlängen 485 nm (Picoquant, Berlin, Deutschland), 594 nm (Abberior, Göttingen, Deutschland), 640 nm (Picoquant, Berlin, Deutschland) statt und ermöglichte eine zusätzliche Aufnahme mehrerer konfokaler Farben. Der STED-Strahl hatte eine Wellenlänge von 775 nm und ermöglichte eine effektive Auflösung von 20–30 nm. Zusätzlich war das Mikroskop ausgestattet mit einem Mikroskopstand (IX83) von Olympus (Shinjuku, Tokio, Japan) mit einem Öl-Immersionsobjektiv (UPlanSApo 100 x NA 1.4, Olympus) und einer 4 Farben LED Beleuchtung zur epifluoreszenten Anregung der Proben. Die Detektion fand über mehrere APDs statt.

Für die Aufnahmen zur Bestimmung der Kolokalisierung von Mic60 mit Tom20 beziehungsweise verschiedener Komponenten des MICOS Komplexes, wurde ein nicht-kommerzielles Zweifarben STED-Mikroskop verwendet. Dabei lagen die STED-Leistung bei 140 mW, die Anregungsleistung bei 4 μ W und

die Detektionszeit pro Pixel bei 100 μ s. Weitere Spezifikationen sind in der Veröffentlichung von Göttfert und Kollegen beschrieben (Göttfert et al. 2013).

2.2.5.3.3 3D STED-Mikroskopie

Zudem wurden 3D STED-Aufnahmen an dem kommerziellen 3D STED-Mikroskop „Abberior Instruments easy3D STED“ der Firma Abberior Instruments (Göttingen, Deutschland) erstellt. Die Anregung fand über mehrere gepulste Diodenlaser mit einer Pulsdauer von 80–120 ps statt und ermöglichte neben der Aufnahme einer zweiten hochaufgelösten weitere konfokale Farben. Der STED-Strahl hatte eine Wellenlänge von 775 nm und eine Pulsdauer von 1,2 ns. Das STED-Mikroskop war mit einem Mikroskopstand (IX83) von Olympus (Shinjuku, Tokio, Japan) ausgestattet und erlaubte die visuelle Einschätzung der Probe vor Aufnahme der STED-Bilder durch eine 4 Farben LED Beleuchtung.

2.2.6 Bildbearbeitung und Auswertung

2.2.6.1 *Bildbearbeitung*

Nachbearbeitungen an konfokalen und hochauflösenden Bildern wurden nach Bedarf vorgenommen. Dies beinhaltete folgende Veränderungen: Kontrastanpassungen (*contrast stretching*), Gaußscher Weichzeichner (*gaussian blur*), Interpolation (*Lagrange interpolation*, verdoppelte Pixelzahl) und lineare Entfaltung (*deconvolution*), 3D-Rekonstruktion (nur bei STED-Aufnahmen). Die dafür verwendeten Programme waren: Inspector (Schönle, A. 2006. ImSpector Image Acquisition and Analysis Software, v0.1), Fiji (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI), University of Wisconsin-Madison, Madison, USA), Adobe Photoshop CS3 (Adobe, San Jose, USA), MATLAB (The Mathworks, Natick, USA) und ParaView (Kitware Inc. Sandia National Laboratories, Albuquerque, USA).

2.2.6.2 *Auswertung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung während der Apoptose*

Für die Auswertung der Proteinverteilung während der Apoptose wurden binäre Masken per MATLAB Skript erstellt, die sich aus den erweiterten Mittellinien der Mitochondrien ergaben, und die Varianz der Fluoreszenzintensität automatisch berechnet.

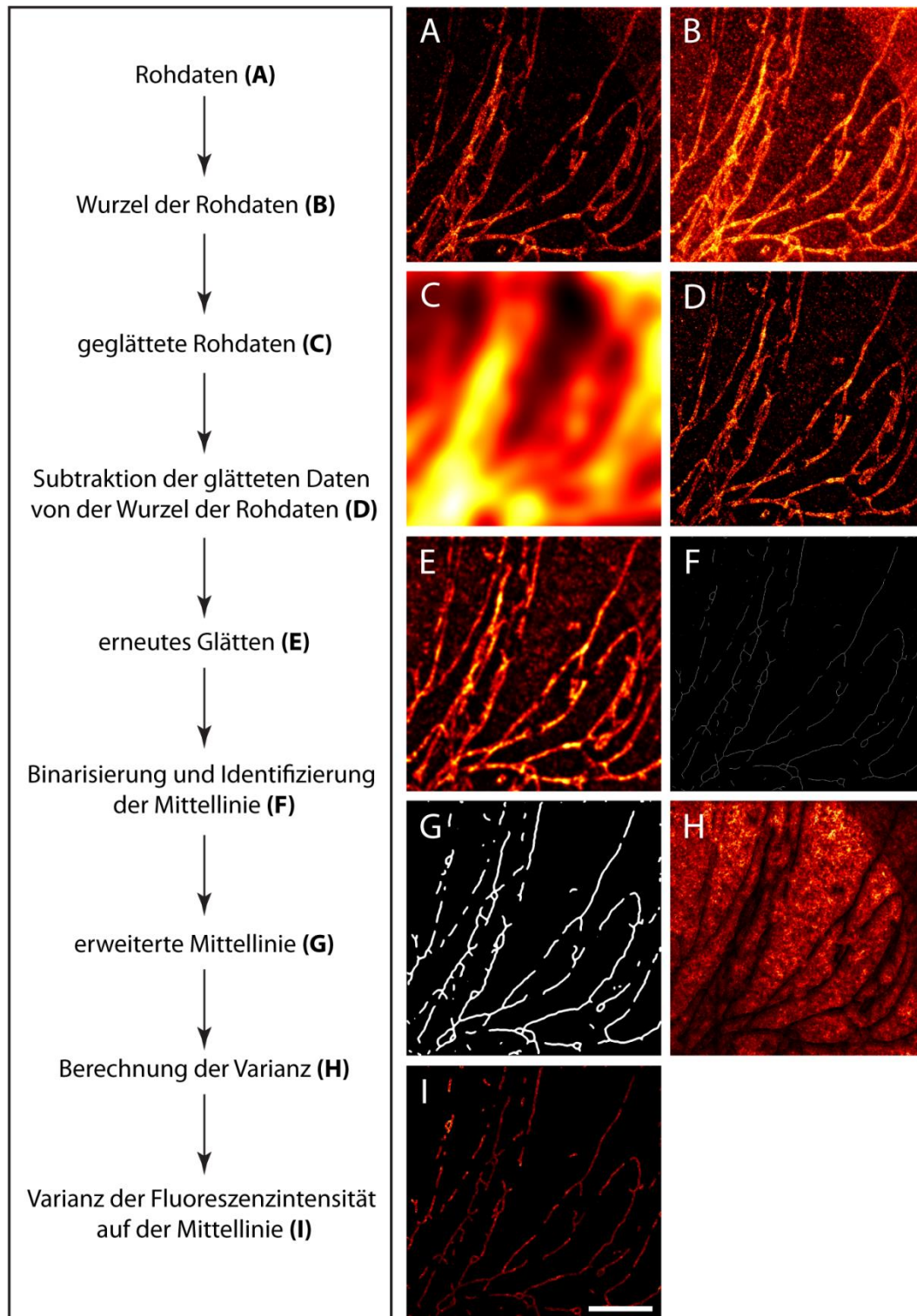


Abbildung 2.2: Auswertung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung während der Apoptose. Um binäre mitochondriale Mittellinien (F) zu erstellen, wurden die STED-Aufnahmen (A) zunächst in mehreren Schritten bearbeitet (B-E) und die Varianz der Fluoreszenzintensität (H) mit den erweiterten Mittellinien (G) multipliziert. Dadurch konnte die Varianz der Proteinverteilung innerhalb der Mitochondrien (I) quantifiziert werden. (Größenbalken: 5 μm)

Dafür wurde zunächst von den Rohdaten (Abbildung 2.2 A) die Wurzel der Fluoreszenzintensität pro Pixel berechnet (Abbildung 2.2 B). Dies diente dazu lichtschwache Pixel hervorzuheben, sodass diese bei der Berechnung der Mittellinien nicht missachtet werden. Des Weiteren wurden die Rohdaten mit einer Gaussfunktion (mit einem Durchmesser von 2 μm) geglättet (Abbildung 2.2 C). Nach Subtraktion des geglätteten Bildes (Abbildung 2.2 C) von dem ersten Zwischenschritt (Abbildung 2.2 B) erfolgte erneutes Glätten durch eine Gaussfunktion mit einem Durchmesser von 200 nm (Abbildung 2.2 E). Diese Aufbereitung der Rohdaten diente dazu, sowohl lichtschwache als auch lichtintensive Pixel gleichermaßen zu berücksichtigen. Daraus konnten binäre, mitochondriale Mittellinien erstellt werden (Abbildung 2.2 F), die anschließend um 150 nm erweitert wurden (Abbildung 2.2 G). Die Berechnung der Varianz der Fluoreszenzintensität erfolgte zunächst für das gesamte Bild (Abbildung 2.2 H). Die hohe Varianz außerhalb der Mitochondrien ergibt sich aufgrund einzelner Hintergrundcluster. Durch die Multiplikation der Varianz (Abbildung 2.2 H) mit den erweiterten Mittellinien (Abbildung 2.2 G), konnte im letzten Schritt die Varianz der Fluoreszenzintensität der Mitochondrien berechnet werden (Abbildung 2.2 I). Dabei werden die Intensitäten eines Pixels mit den Signalen der umliegenden Fläche (mit einem Durchmesser von 7 Pixeln) verglichen. Eine hohe Varianz der Fluoreszenzintensität entspricht daher einer heterogenen Proteinverteilung und ein niedriger Wert einer homogenen Verteilung der Proteine.

Da die Werte normalverteilt vorlagen, konnte die Signifikanz der unterschiedlichen Varianzen von apoptotischen zu nicht-apoptotischen Zellen mittels Zweistichproben-t-Test durchgeführt werden. Dazu wurde das Programm „OriginPro“ verwendet.

Kennzeichnung der Signifikanz: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)

2.2.6.3 Auswertung der neuromuskulären Synapsen

2.2.6.3.1 Berechnung des Varianzwertes der Fluoreszenzintensität

Für die Berechnung der Varianz der Fluoreszenzintensität für Mic60 in der neuromuskulären Synapse wurden binäre, mitochondriale Masken per MATLAB Skript erstellt, anhand derer die Varianz berechnet werden konnte.

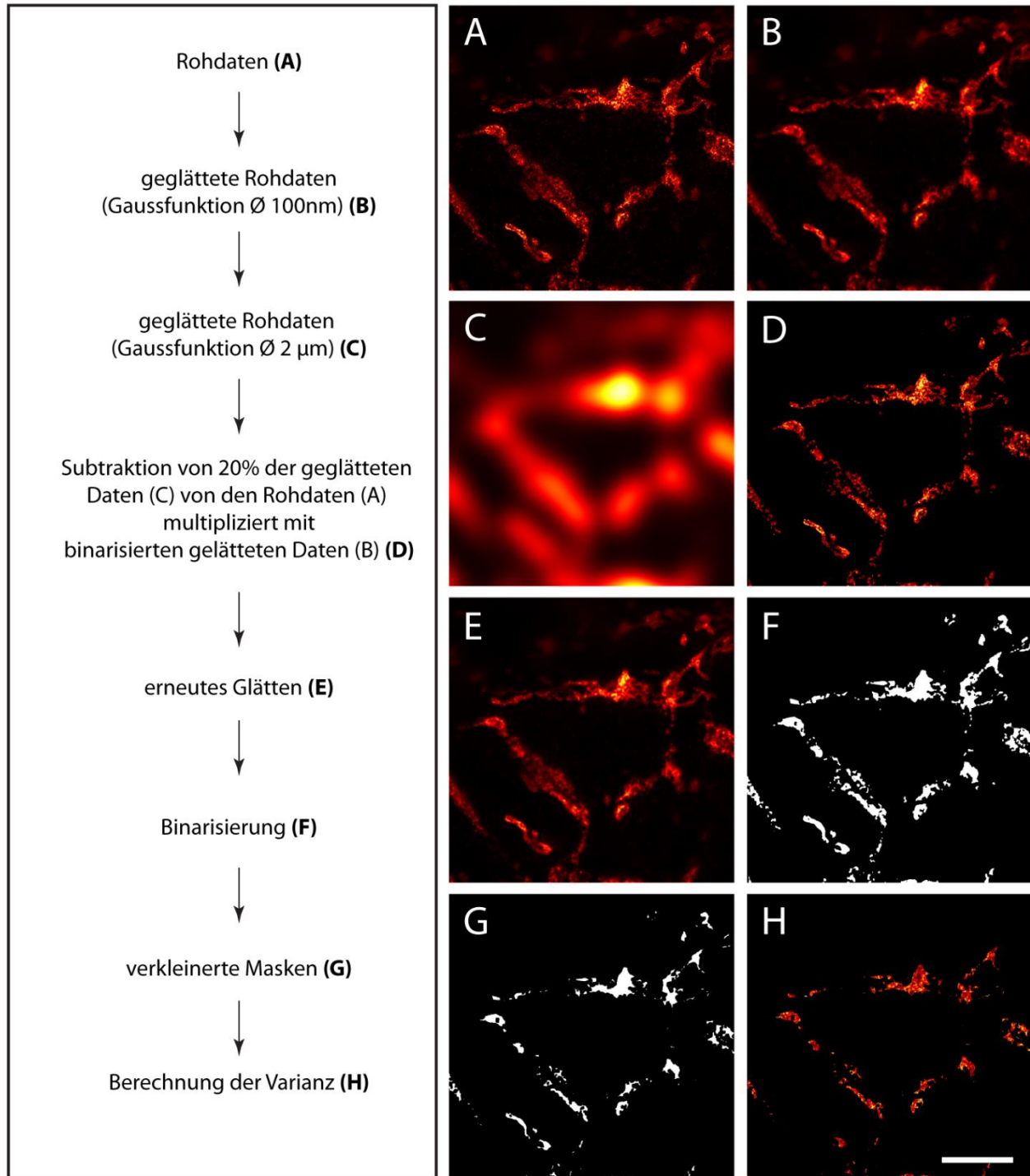


Abbildung 2.3: Generierung binärer Masken zu Berechnung der Varianz in neuromuskulären Synapsen. Für Auswertung der Varianz der Fluoreszenzintensität für Mic60 (H) wurden die STED-Bilder (A) zunächst in mehreren Schritten (B-F) bearbeitet. Die binären Masken (F) wurden im letzten Schritt am Rand um wenige Pixel verkleinert (G) um Randeffekte zu vermeiden. (Größenbalken: 5 µm)

Für die Erstellung binärer Mitochondrienmasken, wurden zunächst die Rohdaten (Abbildung 2.3 A) im Rahmen des Schwellwertverfahrens zweimal einzeln mit Gaussfunktionen unterschiedlichen

Durchmessers geglättet (Durchmesser: 100 nm (Abbildung 2.3 B); 2 μm (Abbildung 2.3 C)). Im nächsten Schritt wurde 20% des geglätteten Bildes (Abbildung 2.3 C) von den Rohdaten abgezogen. Dieses Zwischenbild wurde mit dem binarisierten, geglätteten Bild (Abbildung 2.3 B) multipliziert. Um die Masken zu erstellen, wurde das Ergebnis (Abbildung 2.3 D) anschließend mit einem Medianfilter bearbeitet. Nach dem letzten Glättungsschritt mit einer Gaussfunktion (100 nm Durchmesser) (Abbildung 2.3 E) konnten die binarisierten Mitochondrienmasken (Abbildung 2.3 F) fertig gestellt werden. Für spätere Auswertungen wurden die Masken um wenige Pixel am Rand verkleinert (Abbildung 2.3 G). Berechnung der Varianz (Abbildung 2.3 H) erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6.2 beschrieben. Die verkleinerten Masken wurden für die Berechnung des Anteils der mitochondrialen Fläche zur Gesamtfläche der Synapse verwendet. Bei der Berechnung der Varianz wurden die Masken ohne Verkleinerung am Rand ausgewertet.

2.2.6.3.2 Erstellung binärer Masken anhand der Färbung mit α -Bungarotoxin

Die Berechnung der Fläche neuromuskulärer Synapsen fand anhand binärer Masken mittels Fiji statt. Dabei wurde zunächst eine Maximalprojektion der aufgenommenen α -Bungarotoxin-Stapel erstellt. Die binäre Maske konnte im nächsten Schritt über die *Auto Threshold* Funktion von Fiji ermittelt, wobei hier auf die Methode von Li zurückgegriffen wurde, um den Schwellenwert zwischen Signal und Hintergrund zu bestimmen (Li and Tam 1998, Li and Lee 1993). Die Berechnung der Fläche konnte anschließend automatisch über die *Analyze Particles* Funktion von Fiji durchgeführt werden. Die Genauigkeit der Masken wurde für jedes Bild einzeln verifiziert und die berechnete Fläche erst danach in die Statistik aufgenommen.

2.2.6.4 Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson

Die Generierung mitochondrialer, binärer Masken und die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurde automatisch per MATLAB Skript durchgeführt. Der Koeffizient gibt die Korrelation beider Fluoreszenzsignale an, indem für jeden Pixel die relative Intensität beider Kanäle miteinander verglichen wird. Dabei sind Werte von +1 (perfekte Korrelation), 0 (keine Korrelation) und -1 (perfekte negative Korrelation) möglich und geben Aufschluss über die Kolokalisierung zweier Fluoreszenzsignale (Adler and Parmryd 2010)

3 Ergebnisse

3.1 Die neuromuskuläre Synapse

Die neuromuskuläre Synapse stellt die Verbindung zwischen dem Nervensystem auf der einen Seite und dem Skelettmuskel auf der anderen Seite dar. Sobald das Aktionspotential entlang des Nervs bis hin zu motorischen Endplatte gelangt, wird Acetylcholin ausgeschüttet. Der Neurotransmitter bindet an die entsprechenden Rezeptoren der postsynaptischen Membran, in diesem Fall des Skelettmuskels, und ruft die Kontraktion des Muskels hervor (Witzemann et al. 2013). Die notwendige Energie für die Rekrutierung der transmittergefüllten Vesikel wird nicht nur durch die Glykolyse sondern, bei starker Reizung der Skelettmuskulatur, auch zu einem großen Anteil in den Mitochondrien produziert. Insbesondere unter hoher physischer Aktivität nimmt die Bedeutung dieser Organellen zur Bereitstellung von ATP und zur Mobilisierung entsprechender Vesikel zu (Ly and Verstreken 2006). Eine Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung, insbesondere in Bezug auf den MICOS Komplex, ist aufgrund seiner strukturgebenden Rolle bei der Erhaltung der Cristae junctions wichtig, um ein detailliertes Verständnis der Energieversorgung neuromuskulärer Reizweiterleitung bei erhöhter physischer Aktivität zu erlangen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit es zu Veränderungen in der Morphologie motorischer Endplatten im Allgemeinen und der sub-mitochondrialen Proteinverteilung neuromuskulärer Mitochondrien im Speziellen kommt, wenn man Mäuse einem Trainingsreiz aussetzt.

Die Kontraktion des Muskels findet durch die relative Verschiebung von Aktin- und Myosinfilamenten gegeneinander statt. Hierfür verantwortlich sind die schweren Ketten von Myosin (MHC, *myosin heavy chain*), die sich innerhalb des Muskels zu dicken Filamenten zusammenlagern (Wells et al. 1996). Aufgrund der unterschiedlichen Isoformen dieser MHC-Moleküle, kann der Skelettmuskel in schnelle und langsame Muskelgruppen eingeteilt werden. Während es sich bei dem *Musculus soleus* (Soleus) um einen Muskel in der Wadenregion handelt, der vorwiegend langsam kontrahierenden Myosinisoformen enthält, befindet sich der *Musculus tibialis anterior* (Tibialis anterior) in der Schienbereinregion und setzt sich überwiegend aus schnell reagierende Myosinvarianten zusammen (Pette and Staron 2000). Die Betrachtung von Präparaten beider Muskeln innerhalb der vorliegenden Arbeit, soll zu einem differenzierten Verständnis der Anpassungen an einen entsprechenden Trainingsreiz führen.

3.1.1 Visualisierung der Mitochondrien in der neuromuskulären Synapse

Um die Mitochondrien der motorischen Endplatte zu untersuchen, wurde der Mausstamm MitoDendra-Olig2Cre mit dem fluoreszenzmarkierten Fusionskonstrukt mito-Dendra2 verwendet. Dieses Protein besteht, für die spezifische Markierung der Mitochondrien, aus der mitochondrialen Importsequenz einer Untereinheit der Cytochrom *c* Oxidase und dem photokonvertierbaren Dendra2 aus der Koralle *Dendronephthya sp.*. Somit wurde eine Betrachtung der Organellen entlang der Nerven bis hin zur motorischen Endplatte ermöglicht (Abbildung 3.1). Eine Besonderheit dieser Methode ist der spezifische Promotor Olig2 zur transkriptionellen Regulierung des Fusionskonstrukts, wodurch mito-Dendra2 ausschließlich in Motoneuronen und Oligodendrozyten exprimiert wird.

Für eine zusätzliche Darstellung der Morphologie neuromuskulärer Synapsen, wurde Farbstoffgekoppeltes α -Bungarotoxin verwendet. Dabei handelt es sich um ein Zellgift, das unter pathophysiologischen Bedingungen an die Acetylcholin-Rezeptoren der postsynaptischen Membran bindet und somit zur Paralyse des Muskels führt (Utkin 2013). Diese Färbung ermöglichte die Darstellung der Endplatte und ließ eine genaue Zuordnung der untersuchten Mitochondrien zur neuromuskulären Synapse zu. Die konfokale Aufnahme von mito-Dendra2 zeigt ein spezifisches, mitochondriales Signal sowohl entlang des Axons (Abbildung 3.1, Pfeil) als auch ausgestreckt über die gesamte Synapse verteilt.

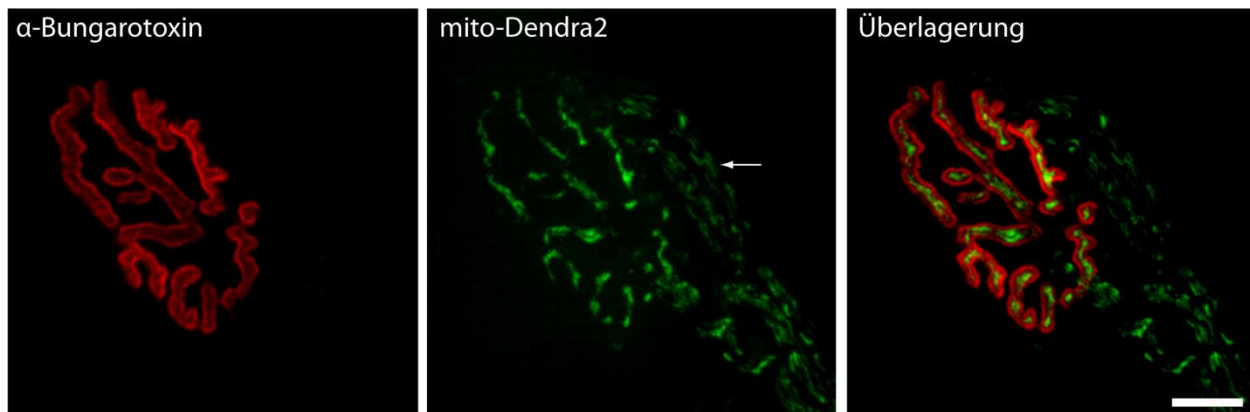


Abbildung 3.1: Die Mitochondrien der neuromuskulären Synapse in Motoneuronen. Zur Darstellung der Mitochondrien in Motoneuronen der Maus wurde Dendra2 mit der mitochondrialen Importsequenz fusioniert, das aufgrund eines spezifischen Promotors nur in diesen Neuronen exprimiert wird. Die Kryoschnitte (Dicke: 10 μ m) wurden mit Alexa Fluor 555-gekoppeltem α -Bungarotoxin gefärbt, um die post-synaptische Membran darzustellen. Durch das mito-Dendra2 Signal lassen sich die Mitochondrien parallel angeordnet entlang des Axons (Pfeil) und in der gesamten Endplatte verteilt visualisieren. (Größenbalken: 10 μ m)

Die Herstellung der Kryoschnitte erfolgte nach Perfusion und milder Fixierung der Tiere. Nach Entnahme des Soleus und Tibialis anterior wurden diese eingebettet und in durch flüssigen Stickstoffgekühltem

Isopentan schockgefroren. Aus den Muskelpräparaten wurden 10 µm dicke Kryoschnitte erstellt, um den Fluoreszenzhintergrund der α -Bungarotoxin Färbung möglichst gering zu halten.

Anhand der hohen Spezifität der α -Bungarotoxin Färbung lässt sich die komplexe Morphologie der neuromuskulären Synapse detailliert darstellen (Abbildung 3.1). Es zeigen sich zahlreiche Verästelungen und nur wenige zusammenhängende, gradlinige Bereiche. Die Anzahl an Verzweigungen lässt vermuten, dass sich dadurch eine Maximierung der Oberfläche ergibt, die eine Optimierung der synaptischen Übertragung zur Folge hat. Da eine Steigerung der Verästelung bei erhöhter Aktivität von anderen Gruppen gezeigt werden konnte, kann spekuliert werden, dass eine große Oberfläche für die synaptische Übertragung wichtig ist (Deschenes et al. 1993). Bei differenzierter Betrachtung neuronaler beziehungsweise neuromuskulärer Mitochondrien zeigt sich, dass die Organellen streckenweise äußerst parallel entlang des Nervs verlaufen (Abbildung 3.1; Pfeil). Diese Ordnung ist in der motorischen Endplatte aufgehoben. Die Mitochondrien füllen die gesamte Struktur aus, wobei die Helligkeit des mito-Dendra2 Signals innerhalb der Synapse den Eindruck erweckt, dass die Anzahl der Mitochondrien in diesem Bereich besonders hoch ist. Da es sich bei der Freisetzung von Neurotransmitter in den synaptischen Spalt um einen aktiven, energieverbrauchenden Prozess handelt, lässt die starke Präsenz der Mitochondrien eine Beteiligung an der Energieversorgung neuromuskulärer Synapsen vermuten. Um etwaige Anpassungen der Morphologie motorischer Endplatten im Allgemeinen beziehungsweise neuromuskulärer Mitochondrien im Speziellen auf einen veränderten Energiebedarf zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Vergleich der Gesamtfläche neuromuskulärer Synapsen sowie einer detaillierten Untersuchung der Mitochondrien mit Einbeziehung eines Trainingsreizes durchgeführt werden.

3.1.2 Veränderungen der neuromuskulären Synapse vor und nach erhöhter physischer Aktivität

3.1.2.1 *Morphologie motorischer Endplatten nach Training*

Studien in Ratten deuteten an, dass es zu Anpassungen in der Gesamtfläche sowie der Komplexität neuromuskulärer Synapsen als Antwort auf einen Trainingsreiz kommen kann (Andonian and Fahim 1988, Deschenes et al. 1993). Ob eine Veränderung der Morphologie motorischer Endplatten auch nach dem Training der Mäuse zu beobachten ist, sollte anhand konfokaler Aufnahmen von Muskelschnitten des Tibialis anterior und Soleus untersucht werden. Dafür wurden die Tiere (P28) nach einer initialen Eingewöhnungsphase an ihre Umgebung willkürlich in zwei Gruppen aufgeteilt. Die bewegungsarmen

Mäuse verbrachten das 12wöchige Experiment in einem Standardkäfig ohne Bewegungsmöglichkeit, während die trainierten Tiere jederzeit freien Zugang zu einem individuellen Laufrad hatten. Anhand der aufgezeichneten Umdrehungen während der gesamten Trainingsphase, wurden die Mäuse in vier Gruppen unterteilt: Während schnelle Tiere pro Tag durchschnittlich mehr als 3 km rannten, liefen mittlere Läufer zwischen 2–3 km und langsame Mäuse weniger als 2 km durchschnittlich am Tag. Die bewegungsarmen Mäuse dienten als Kontrollgruppe, um die entsprechenden Veränderungen dokumentieren zu können.

Um eine detaillierte Betrachtung der Morphologie neuromuskulärer Endplatten durchführen zu können, wurden die Muskelschnitte der einzelnen Läufergruppen mit Alexa Fluor 555-gekoppeltem α -Bungarotoxin gefärbt und die motorische Endplatte konfokal über mehrere Ebenen aufgenommen. Aus der Maximalprojektion konnten automatisierte Masken generiert werden, um deren Fläche zu bestimmen. Eine Auswahl dieser Masken (Abbildung 3.2) zeigt die hohe Spezifität des verwendeten Algorithmus.

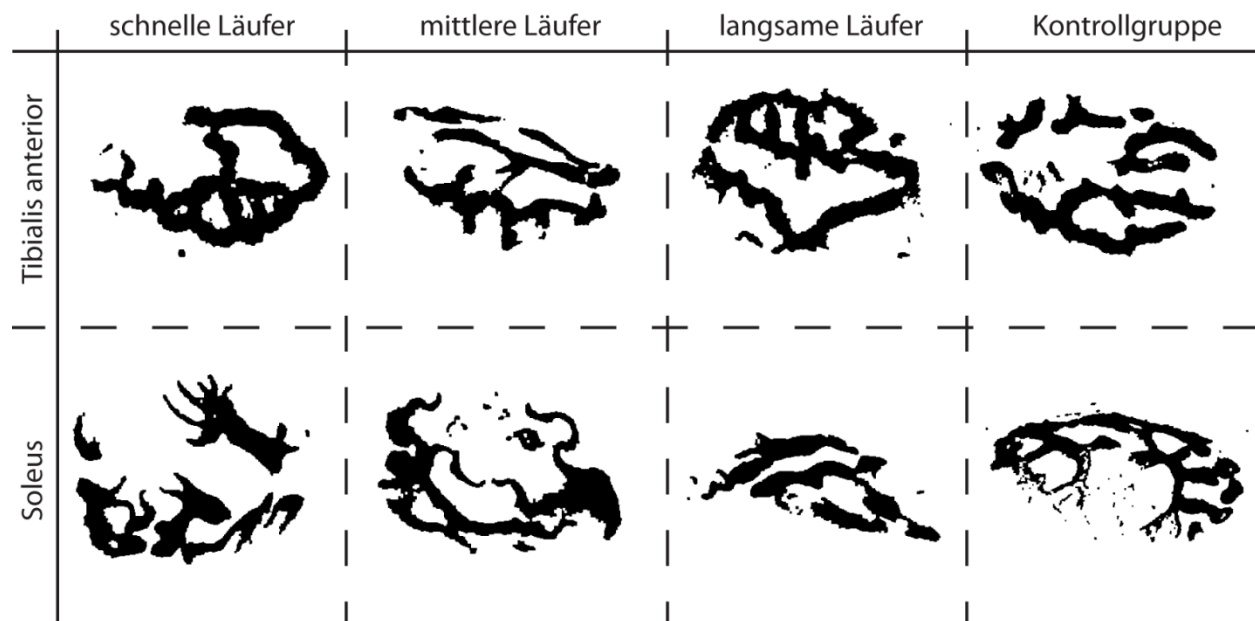


Abbildung 3.2: Masken aus α -Bungarotoxin im Soleus und Tibialis anterior. Anhand der Maximalprojektion der α -Bungarotoxin Färbung wurden automatisch Masken aller Läufergruppen sowie der bewegungsarmen Mäuse generiert.

Die morphologische Heterogenität neuromuskulärer Synapsen (Anhang 5.4), erschwert eine Beurteilung der Veränderungen motorischer Endplatten nach Training erheblich. Um Unterschiede innerhalb der Läufergruppen beziehungsweise im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe im Soleus und Tibialis anterior quantitativ beurteilen zu können, wurden die Flächen aller motorischen Endplatten automatisch

berechnet. Durch die Vielzahl aufgenommener neuromuskulärer Synapsen kann eine Gegenüberstellung aller ermittelten Gesamtflächen beider Muskelgruppen durchgeführt werden. Durch diesen Ansatz sollte untersucht werden, ob eine Vergrößerung motorischer Endplatten, wie sie durch frühere Arbeitsgruppen in Ratten beobachtet wurde (Andonian and Fahim 1988, Deschenes et al. 1993, Waerhaug et al. 1992), auch in Folge des angesetzten Trainingsreizes in Mäusen erfolgt.

3.1.2.2 Quantitative Auswertung der neuromuskulären Synapse nach Training

Durch die automatische Generierung der Masken mit anschließender Berechnung der Fläche, lässt sich eine umfangreiche Anzahl an neuromuskulären Synapsen auswerten. Zunächst wurden alle Läufergruppen des Soleus und Tibialis anterior getrennt betrachtet, um eine differenzierte Analyse etwaiger Veränderungen durchzuführen.

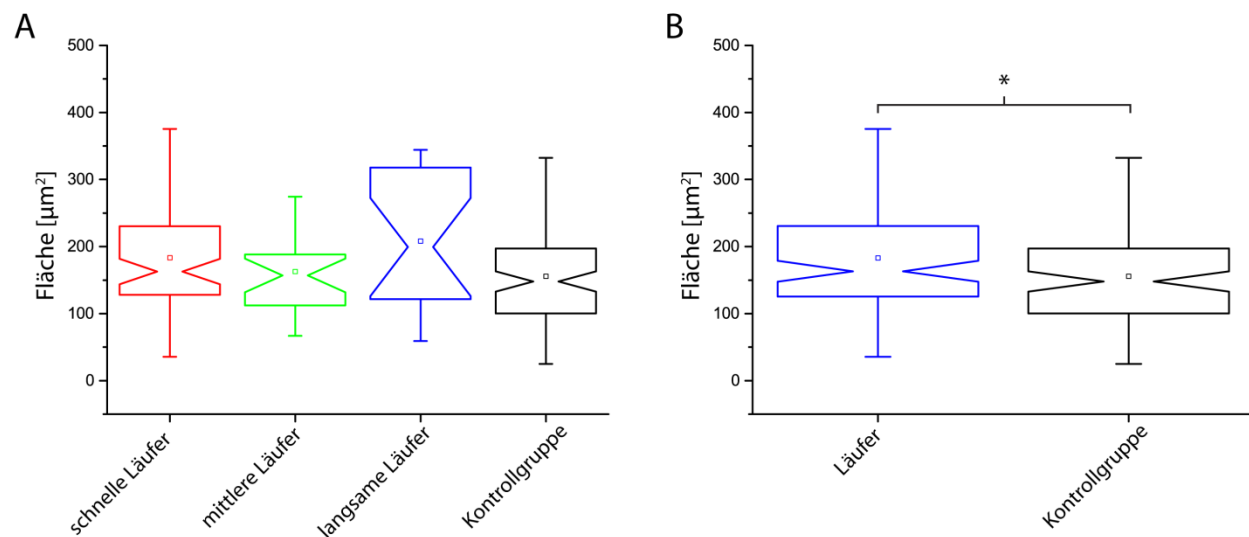


Abbildung 3.3: Fläche der neuromuskulären Synapsen anhand generierter Masken im Soleus. Aus den automatisch generierten Masken wurden die Flächen berechnet und innerhalb aller Läufergruppen verglichen. A.) Zu sehen ist die hohe Streuung innerhalb der einzelnen Mausgruppen. B.) Der Vergleich zwischen der Gruppe aller Läufer und der Kontrollgruppe ergibt eine signifikante Veränderung der Fläche nach Training. Signifikanzen wurden durch den Zweistichproben-t-Test ermittelt.

Bei Beurteilung der Fläche neuromuskulärer Synapsen des Soleus in den einzelnen Läufergruppen zeigt sich, dass die Werte bereits innerhalb einer Gruppe stark streuen (Abbildung 3.3 A). Da es sich bei den untersuchten Präparaten um Muskelschnitte handelt, variiert die Lage der jeweiligen Endplatte innerhalb des Gewebes erheblich. Die Dreidimensionalität der Präparate hat Auswirkungen auf die Berechnung der Fläche. Demnach ist eine solche Streuung zu erwarten und spiegelt die Schnittebene der Muskelpräparate wider. Durch den Vergleich der schnellen, mittleren und langsamen Läufer mit den Kontrolltieren lässt sich keine eindeutige Tendenz erkennen (Abbildung 3.3 A). Fasst man alle Läufergruppen zusammen und

vergleicht diese mit den bewegungsarmen Tieren zeigt sich eine signifikante Vergrößerung (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,05$) der Fläche motorischer Endplatten in den trainierten Tieren (Abbildung 3.3 B). Aufgrund der hohen Streuung der berechneten Flächen sowie des marginalen Unterschieds zwischen Läufer und Kontrollgruppe, kann allerdings nicht von einer dramatischen Vergrößerung neuromuskulärer Synapsen in Folge erhöhter physischer Aktivität im Soleus ausgegangen werden.

Da es sich bei dem Soleus um einen Muskel handelt, der sich vorwiegend aus langsamen Muskelfasern zusammensetzt, sollte die Untersuchung, aufgrund seiner Zusammensetzung aus überwiegend schnellen MHC-Molekülen, auf den Tibialis anterior ausgeweitet werden. Bereits Andonian und Kollegen konnten in Ratten zeigen, dass eine Anpassung der Flächen motorischer Endplatten in Muskelgruppen bestehend aus schnell reagierenden Myosinisoformen stärker ausgeprägt ist (Andonian and Fahim 1988).

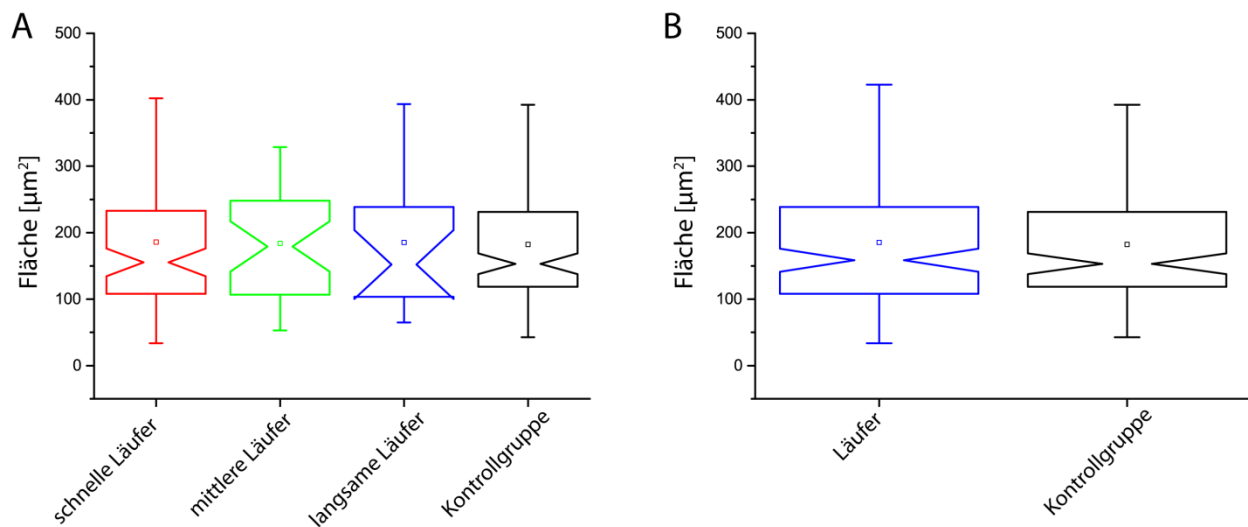


Abbildung 3.4: Fläche der neuromuskulären Synapse anhand generierter Masken im Tibialis anterior. Die Flächenberechnung wurde anhand der Masken automatisch durchgeführt. Die Messwerte streuen stark und zeigen keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung der Mausgruppen einzeln (A) und gesamt (B) im Gegensatz zu bewegungsarmen Tieren (Kontrollgruppe).

Auch bei der Untersuchung des Tibialis anterior zeigen die Werte eine gewisse Streuung (Abbildung 3.4 A). Allerdings lässt schon die Betrachtung der einzelnen Mausgruppen eine eindeutige Tendenz erkennen: Alle Läufergruppen streuen um einen ähnlichen Mittelwert. Dies bestätigt sich bei Betrachtung der gesamten Läufer im Vergleich zu bewegungsarmen Mäusen (Abbildung 3.4 B). In den motorischen Endplatten des Tibialis anterior lässt sich keine signifikante Vergrößerung in Folge erhöhter physischer Aktivität feststellen.

Um die Fläche neuromuskulärer Synapsen trotz der Dreidimensionalität der Präparate bestimmen zu können, wurden in früheren Publikationen ausschließlich Nervenenden ausgewertet, die in der

Fokusebene des Mikroskops lagen (Waerhaug et al. 1992, Andonian and Fahim 1988). Dies steht im Gegensatz zu der Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit. Damit ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit nicht um ein Artefakt aufgrund der Dreidimensionalität der Präparate handelt, wurden alle generierten Masken erneut kontrolliert und nur Endplatten, die subjektiv in der Fokusebene lagen, ausgewertet (Tabelle 3.1 B).

Tabelle 3.1: Vergleich der Flächen des Soleus und Tibialis anterior ohne (A) beziehungsweise mit (B) Einbeziehung der Lage zur Fokusebene. Die Berechnung der Fläche ohne Vorauswahl neuromuskulärer Synapsen aufgrund ihrer Lage zur Fokusebene (A) im Vergleich zu der Berechnung nach einer subjektiven Vorauswahl motorischer Endplatten (B) zeigt die unterschiedlichen Ergebnisse der Gesamtfläche vor und nach Training. Angegeben ist die Standardabweichung.

A	Soleus		Tibialis anterior		B	Soleus		Tibialis anterior	
		n		n			n		n
Läufer	183.09 ± 81.77	114	185.41 ± 102.88	142	Läufer	247.25 ± 70.63	13	343.70 ± 85.23	20
Kontrollgruppe	155.51 ± 72.32	102	182.36 ± 104.95	128	Kontrollgruppe	207.48 ± 50.40	10	300.47 ± 95.29	14

Aufgrund der Komplexität neuromuskulärer Synapsen ist eine Beurteilung der Lage zur Fokusebene des Mikroskops nicht immer zweifellos möglich. Eine Selektion der Nervenenden kann nur unter stringenten Bedingungen erfolgen, um die Einbeziehung schräg angeschnittener Endplatten zu verhindern. Dadurch verkleinert sich die Stichprobenanzahl bis zu einer Zehnerpotenz (Tabelle 3.1 B) im Vergleich zu der Anzahl ausgewerteter Flächen ohne Selektion (Tabelle 3.1 A). Der Vergleich von Läufer- und Kontrollmäusen ohne eine Einbeziehung der Lage neuromuskulärer Synapsen innerhalb der Muskelpräparate (Tabelle 3.1 A), zeigt für den Soleus eine Vergrößerung der Fläche nach Training jedoch keinen signifikanten Unterschied für die Nervenenden des Tibialis anterior. Durch Vorauswahl motorischer Endplatten, die sich in der richtigen Lage zur Fokusebene befinden lässt sich eine Tendenz zur Vergrößerung der Flächen in beiden Muskelgruppen erkennen (Tabelle 3.1 B). Aufgrund der stringenten Selektion der neuromuskulärer Synapsen und der damit zusammenhängenden geringen Anzahl ausgemessener Masken, sind diese Daten nicht signifikant. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch beide Versuchsansätze eine Vergrößerung der Fläche motorischer Endplatten des Soleus in Folge erhöhter physischer Aktivität gezeigt werden kann, wobei der Unterschied durch vorherige Selektion der Nervenenden für diesen Muskel nicht signifikant ist. Die Kombination beider Versuchsansätze zeigt, dass es sich bei den Veränderungen im Soleus um eine subtile Anpassungen der Gesamtfläche handelt. Ob eine Veränderung der Fläche motorischer Endplatten nach Training im Tibialis anterior stattfindet, kann durch die Kombination beider Auswertungen nicht eindeutig geklärt werden.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Energie für die Freisetzung der Neurotransmitter aus der motorischen Endplatte in den synaptischen Spalt bei milder Stimulation aus der Glykolyse bezogen wird.

Erst unter hoher physischer Belastung der innervierten Muskulatur wird ATP aus den Mitochondrien benötigt, um die Rekrutierung der Reserve-Vesikel und damit einhergehend die Ausschüttung einer adäquaten Konzentration an Acetylcholin zu gewährleisten (Verstreken et al. 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich der Anteil an Mitochondrien pro neuromuskulärer Synapse als Reaktion auf einen Trainingsreiz im Soleus beziehungsweise verändert.

3.1.2.3 Konzentration an Mitochondrien in motorischen Endplatten nach Training

Um den Anteil der Fläche neuromuskulärer Mitochondrien an der Gesamtfläche motorischer Endplatten bestimmen zu können, wurden die generierten Masken der Synapsen aus Abschnitt 3.1.2.1 in ein Verhältnis zu mitochondrialen Masken gesetzt (Abbildung 3.5).

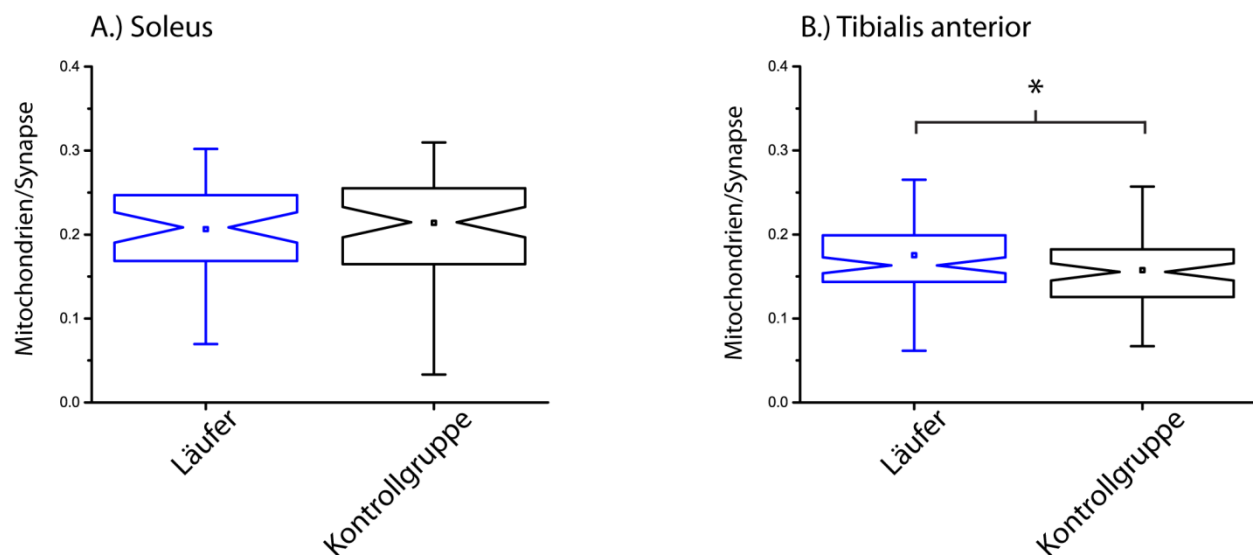


Abbildung 3.5: Anteil der Fläche von Mitochondrien an der Gesamtfläche neuromuskulärer Synapsen. Anhand automatisch generierter Masken für die Mitochondrien beziehungsweise für motorische Endplatten, wurden die Flächen berechnet und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Während die Konzentration an Mitochondrien im Soleus (A) keine Veränderung zeigt, lässt sich ein Anstieg der Konzentration in trainierten Mäusen im Tibialis anterior (B) beobachten. Signifikanzen wurden durch Zweistichproben-t-Test ermittelt.

Diese Mitochondrienmasken wurden per Matlab automatisch berechnet und für die Verwendung in späteren Auswertungen am Übergang zwischen Mitochondrium und Zytoplasma um wenige Pixel verkleinert. Aufgrund dessen kann anhand der mitochondrialen Masken nicht die absolute Fläche der Mitochondrien beurteilt werden. Sie dienen lediglich dem Vergleich der anteiligen Fläche von Mitochondrien zwischen trainierten und bewegungsarmen Tieren im Soleus (Abbildung 3.5 A) und Tibialis anterior (Abbildung 3.5 B).

Trotz der erheblichen Streuung der Werte lassen sich leichte Unterschiede zwischen der Läufergruppe und den Kontrolltieren im Tibialis anterior feststellen (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,05$). In dieser Muskelgruppe in trainierten Tieren nehmen die Mitochondrien einen größeren Anteil der Fläche innerhalb motorischer Endplatten ein (Abbildung 3.5 B). Dieser signifikante Unterschied lässt sich im Soleus nicht zeigen (Abbildung 3.5 A). Der Vergleich der trainierten Tiere zu den bewegungsarmen Mäusen ergibt keine Veränderung der anteiligen Fläche der Mitochondrien.

Setzt man diese Ergebnisse in einen Kontext zu den Anpassungen der Gesamtfläche motorischer Endplatten aus Abschnitt 3.1.2.2 kann vermutet werden, dass in beiden Muskelgruppen eine vermehrte Rekrutierung der Mitochondrien in Folge erhöhter physischer Aktivität stattfindet. Während der Anteil der Fläche von Mitochondrien zur Fläche der Nervenendigung im Soleus nicht erhöht ist, findet die Anpassung durch eine Vergrößerung der Gesamtfläche statt. Im Tibialis anterior kann keine signifikante Vergrößerung motorischer Endplatten detektiert werden. Da sich die Konzentration der Mitochondrien allerdings signifikant, wenn auch nicht dramatisch, erhöht, kann auch hier von einer vermehrten Konzentration an Mitochondrien in Folge des Lauftrainings ausgegangen werden.

Neben der Vergrößerung der Gesamtfläche neuromuskulärer Synapsen beziehungsweise einer etwaigen Rekrutierung von Mitochondrien, kann es in Folge einer erhöhten physischen Aktivität auch zu Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung kommen. Ob sich die Verteilung mitochondrialer Proteine verändert, sollte mittels hochauflösender Mikroskopie überprüft werden. Dafür wurde Mic60, eine der Kernkomponenten des MICOS Komplexes und damit essentiell für die Aufrechterhaltung der Cristae junctions, ausgewählt. Bei starker Stimulation der Motoneuronen bedarf es der Rekrutierung von Reserve-Vesikeln, um eine ausreichende Konzentration von Acetylcholin freizusetzen. Dieser Prozess findet unter Bereitstellung von ATP aus den Mitochondrien statt (Verstreken et al. 2005). Da die Proteinkomplexe der Atmungskette entlang der Cristae lokalisieren, eignet sich die Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung des MICOS Komplexes, als strukturgebendes Element der Cristae junctions, um etwaige Anpassungen der Mitochondrien auf erhöhte physische Aktivität darzustellen.

3.1.2.4 Mic60 in der neuromuskulären Synapse

Um einen Einblick in die Anpassungen der Proteinverteilung des MICOS Komplexes als Antwort auf einen Trainingsreiz zu erlangen, ist eine detaillierte Betrachtung von Mic60, als eine der Kernkomponenten und essentiell für die Aufrechterhaltung der Cristae junctions, besonders geeignet. Durch die indirekte

Immunfluoreszenz mit anschließender Aufnahme der neuromuskulären Synapsen mittels konfokaler Mikroskopie, konnte die hohe Spezifität des Antikörpers gegen Mic60 dargestellt werden (Abbildung 3.6). Vergleichbar mit dem mito-Dendra2 Signal, zeigt sich auch bei der Färbung von Mic60 innerhalb der neuromuskulären Synapse eine Verteilung der Organellen innerhalb der gesamten Struktur (Abbildung 3.6).

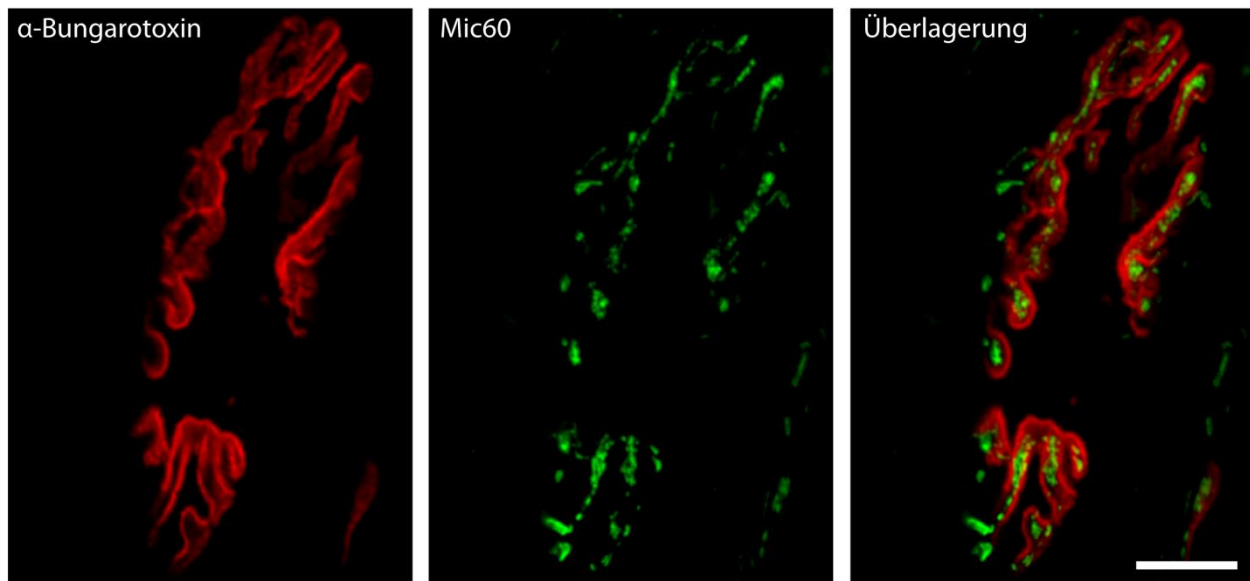


Abbildung 3.6: Mic60 in der neuromuskulären Synapse von murinen Motoneuronen. Durch Immunfluoreszenz wurde Mic60 in den Kryoschnitten (Dicke: 10 μm) visualisiert. α -Bungarotoxin kennzeichnet die postsynaptische Membran und lässt eine exakte Zuordnung der Mitochondrien in dieses Kompartiment zu. (Größenbalken: 10 μm)

Während die Untersuchung der Mitochondrien anhand des mito-Dendra2 Signals lediglich eine Beurteilung der Morphologie und Verteilung der Organellen in der neuromuskulären Synapse zuließ, kann eine detaillierte Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung anhand des Mic60 Signals unter Verwendung hochauflösender Mikroskopieverfahren durchgeführt werden.

3.1.2.5 Sub-mitochondriale Proteinverteilung von Mic60

Nach Markierung von Mic60 durch indirekte Immunfluoreszenz und anschließender Analyse mittels hochauflösender Mikroskopieverfahren zeigt sich die Verteilung der MICOS Komponenten in distinkten Proteinclustern innerhalb der Mitochondrien motorischer Endplatten (Abbildung 3.7).

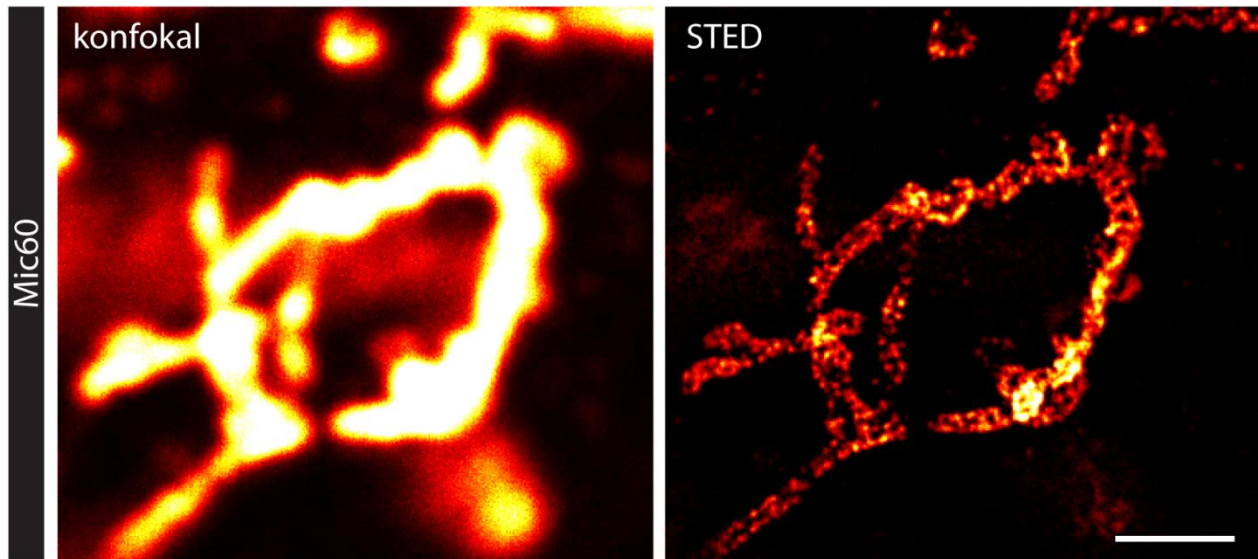


Abbildung 3.7: Mic60 in der neuromuskulären Synapse visualisiert mittels STED-Mikroskopie. Durch indirekte Immunfluoreszenz gegen Mic60 in Kryoschnitten (Dicke: 10 μm) und anschließender Analyse per STED-Mikroskopie lassen sich distinkte Proteincluster erkennen, die in beugungsbeschränkten Mikroskopieverfahren (konfokal) nicht voneinander getrennt werden können. (Größenbalken: 1 μm)

Während eine Trennung der Proteincluster in der konfokalen Aufnahme aufgrund der beugungsbeschränkten Auflösung nicht möglich ist, kann mittels STED-Mikroskopie die Verteilung von Mic60 in klar abgegrenzte Strukturen visualisiert werden (Abbildung 3.7). Frühere Studien zeigten bereits, dass ein Großteil mitochondrialer Proteine in einzelnen Cluster vorliegt, wobei ihre Dichte mit dem Energiebedarf der Zelle korreliert (Wurm et al. 2011, Jans et al. 2013). Ob es nach physischer Aktivität zu einer Veränderung der Proteincluster von Mic60 kommt und inwieweit diese muskelspezifisch sind, sollte anhand der Kryoschnitte des Soleus und Tibialis anterior in den trainierten beziehungsweise bewegungsarmen Tieren untersucht werden.

3.1.2.6 Sub-mitochondriale Proteinverteilung neuromuskulärer Mitochondrien

Um einen Einblick in die Verteilung von Mic60 vor Training zu erlangen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen dieses Protein in Muskelpräparaten der Kontrollgruppe durchgeführt und mittels STED-Mikroskopie analysiert. Dabei wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 μm verwendet, um den Hintergrund der Färbung möglichst gering zu halten (Abbildung 3.8).

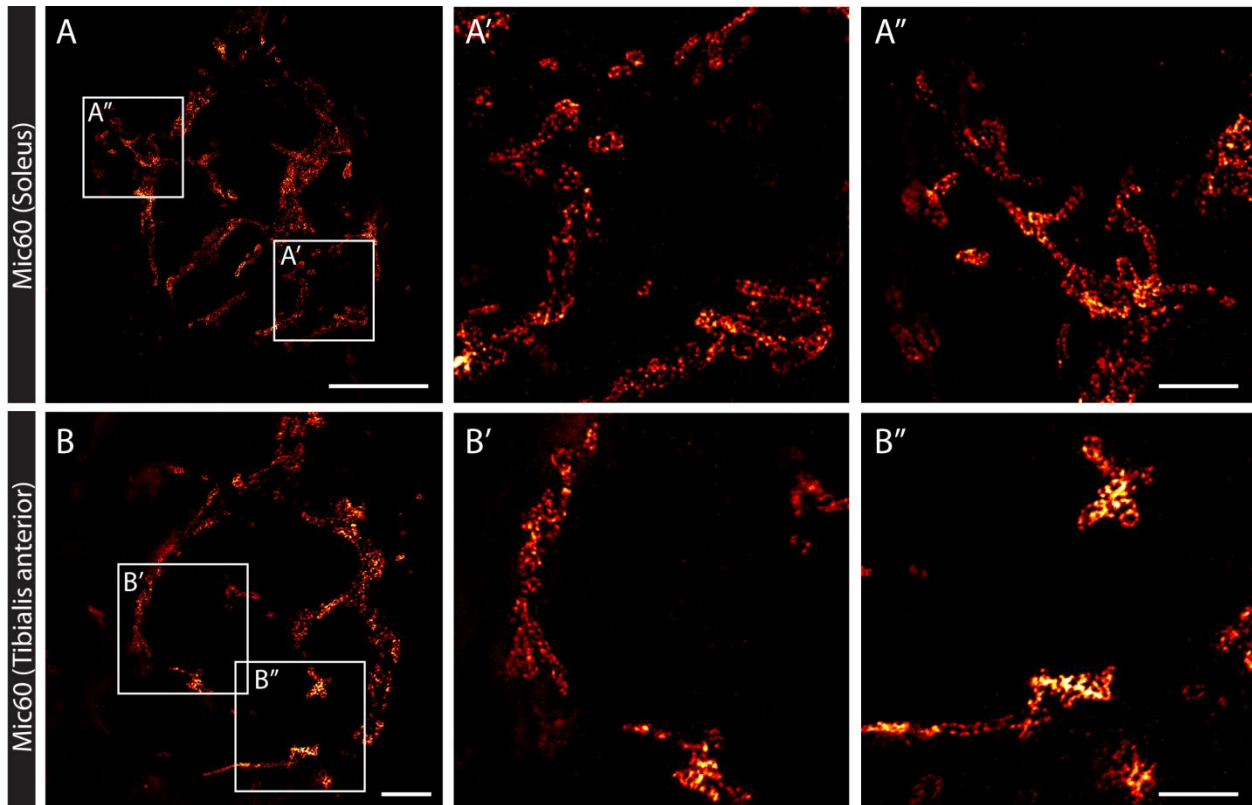


Abbildung 3.8: Mic60 im Soleus und Tibialis anterior. STED-mikroskopische Aufnahmen von Mic60 in Kryoschnitten der Kontrollgruppe (Dicke: 10 µm) des Soleus und Tibialis anterior. In beiden Muskelgruppen können die einzelnen Proteincluster durch indirekte Immunfluoreszenz mittels STED-Mikroskopie visualisiert werden. (Größenbalken: 10 µm (Übersicht); 2 µm (Ausschnitt))

Die Aufnahmen von Mic60 zeigen in beiden Muskelpräparaten des Soleus und Tibialis anterior eine Verteilung des Proteins in distinkte Cluster (Abbildung 3.8), wobei die Proteindichte von Mic60 im Tibialis anterior (Abbildung 3.8 B'; B'') im Vergleich zu dem Soleus (Abbildung 3.8 A'; A'') tendenziell höher ist. Allerdings lassen sich bei der visuellen Beurteilung einer Vielzahl an STED-Bildern keine auffälligen Unterschiede beobachten. Vielmehr zeigt sich eine große Bandbreite unterschiedlich dichter Proteincluster (Anhang 5.5), deren eindeutige Auswertung aufgrund der hohen Heterogenität rein qualitativ nicht möglich ist. Ob Unterschiede in den einzelnen Muskelgruppen vorliegen und inwieweit sich die sub-mitochondriale Proteinverteilung nach Training verändert, muss durch eine ausführliche Untersuchung eines großen Datensatzes mit Einbeziehung der Trainingsreize überprüft werden. Aus diesem Grund wurden weitere STED-mikroskopische Analysen von Mic60 in den oben genannten Mausgruppen durchgeführt, um durch den direkten Vergleich der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von trainierten beziehungsweise bewegungsarmen Tieren einer potenziellen Veränderung nachgehen zu können.

3.1.2.7 Qualitative Betrachtung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung nach Training

Um eine etwaige Anpassung mitochondrialer Proteine auf erhöhte physische Aktivität darstellen zu können, wurden die Kryoschnitte von Läufer und Kontrolltieren mit einem Antikörper gegen Mic60 dekoriert und mittels STED-Mikroskopie visualisiert (Abbildung 3.9). Eine zusätzliche Kontrollfärbung mit α -Bungarotoxin (Anhang 5.6) gewährleistete die eindeutige Zuordnung der Mitochondrien zur entsprechenden motorischen Endplatte.

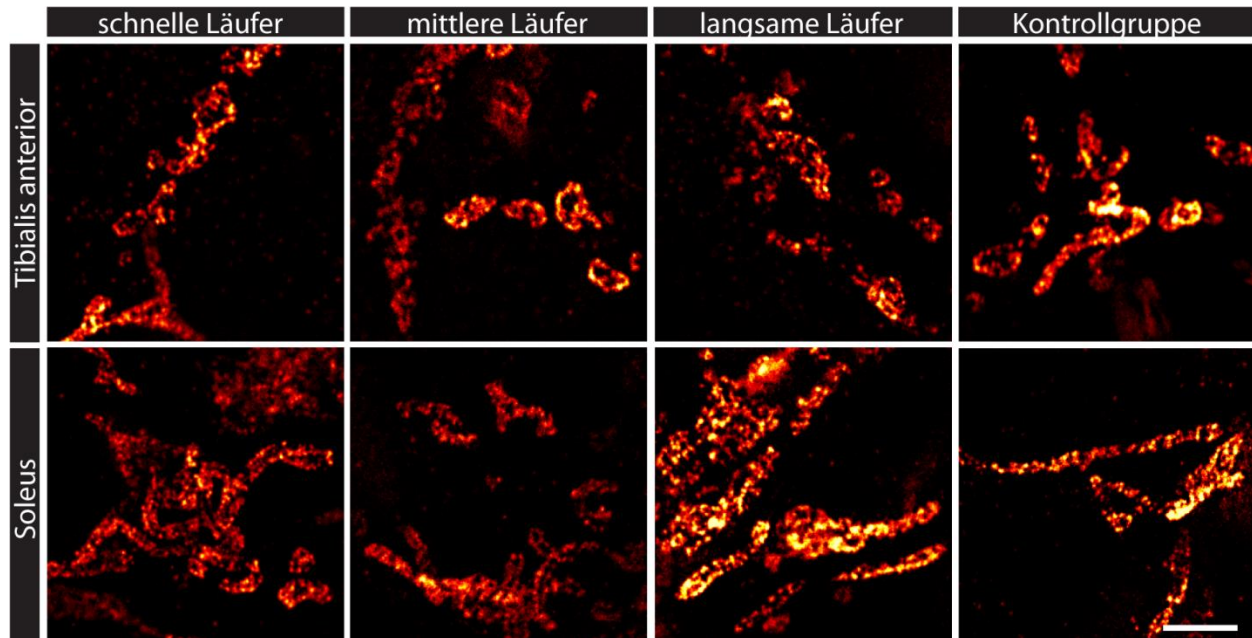


Abbildung 3.9: Sub-mitochondriale Proteinverteilung im Soleus und Tibialis anterior nach Training. Mic60 wurde nach Antikörperfärbung mittels STED-Mikroskopie in allen Mausgruppen aufgenommen. Die Proteincluster der schnellen, mittleren und langsamen Läufer sowie der Kontrollgruppe zeigen eine hohe Heterogenität. (Größenbalken: 1 μ m)

Die Aufnahmen zeigen eine unterschiedlich dichte Proteinverteilung von Mic60 sowohl im Vergleich des Tibialis anterior und Soleus im Allgemeinen als auch innerhalb der einzelnen Läufergruppen beziehungsweise im Vergleich zu den Kontrolltieren im Speziellen (Abbildung 3.9). Eine eindeutige Tendenz zu dichteren Proteinclustern nach Training lässt sich visuell nicht feststellen. Vergleichbar mit der allgemeinen Darstellung der Proteincluster beider Muskelgruppen in Abschnitt 3.1.2.6, zeigt sich innerhalb der Läufer- beziehungsweise Kontrollgruppe eine hohe Heterogenität der Dichte der Proteincluster. Es können in allen aufgenommenen Präparaten sowohl Cluster mit hoher als auch mit geringer Dichte beobachtet werden. Auch die Morphologie der einzelnen Organellen variiert sehr stark und verhindert eine verlässliche Bewertung der einzelnen Gruppen. Um etwaige Umstrukturierungen eindeutig zu charakterisieren, muss demnach eine quantitative Auswertung der sub-mitochondrialen

Proteinverteilung von Mic60 durchgeführt werden. Dies sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit durch eine automatisierte Erkennung der Mitochondrien neuromuskulärer Synapsen mit anschließender Berechnung der Verteilung des Fluoreszenzsignals in den unterschiedlichen Mausgruppen untersucht werden.

3.1.2.8 Quantitative Auswertung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung nach Training

Als Maß der Heterogenität sub-mitochondrialer Proteinverteilung wurde die Varianz der Fluoreszenzintensität ermittelt. Wurm und Kollegen konnten in einer früheren Veröffentlichung zeigen, dass dieser Wert äußerst sensitiv auf Unterschiede in der Proteinverteilung reagiert. Eine gleichmäßige Verteilung der Proteine innerhalb der Mitochondrien resultiert dabei in einem niedrigen Varianzwert, während Inhomogenität und dünn gestreute Proteincluster zu hohen Werten in der Varianz führen (Wurm et al. 2011). Demzufolge sollten Umstrukturierungen der Proteinverteilung, die sich als Antwort auf eine Muskelreizung ergeben, in einer Veränderung der Varianz resultieren.

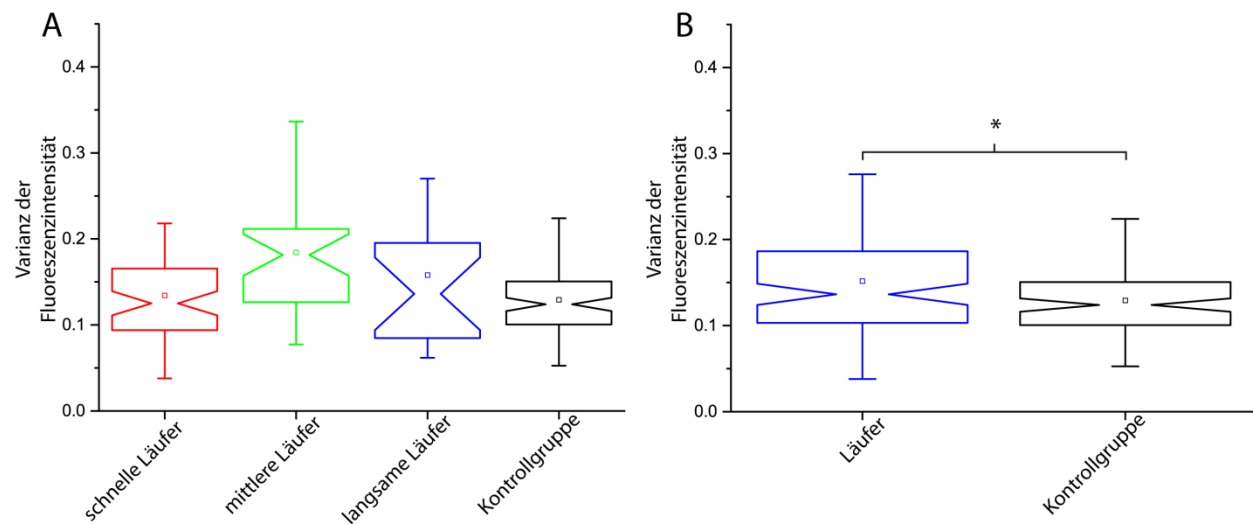


Abbildung 3.10: Varianzwerte der Fluoreszenzintensität im Soleus. Mitochondrien der untersuchten Präparate wurden automatisch erkannt und der Varianzwert der Fluoreszenzintensität ermittelt. Dabei zeigt sich innerhalb aller Läufergruppen eine breite Streuung der Werte. Beim Vergleich der gesamten Läufer zu den bewegungsarmen Tieren (Kontrollgruppe) ist ein signifikanter Abfall der Varianz erkennbar. Signifikanzen wurden durch Zweistichproben-t-Test ermittelt.

Als Markerprotein der Cristae junctions wurde, wie in Abschnitt 3.1.2.7, Mic60 verwendet und durch indirekte Immunfluoreszenz visualisiert. Die Markierung der Endplatten fand unter Verwendung des Farbstoff-gekoppelten α -Bungarotoxins (Anhang 5.6) statt und diente der spezifischen Zuordnung der Mitochondrien zur Synapse.

Trotz der hohen Streuung der Daten lassen sich bereits subtile Unterschiede der Varianzwerte im Vergleich von schnellen, mittleren sowie langsamen Läufern und den bewegungsarmen Tieren im Soleus zeigen (Abbildung 3.10 A). Fasst man alle trainierten Tiere zusammen, zeigt sich ein signifikanter Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3.10 B). In Folge des Lauftrainings ergeben sich dementsprechend subtile, signifikante Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 in den motorischen Endplatten des Soleus. Ob sich Umstrukturierungen der Kernkomponenten von MICOS auch im Tibialis anterior ergeben, sollte anhand hochauflösender Aufnahmen dieser Muskelpräparate ebenfalls untersucht werden (Abbildung 3.11).

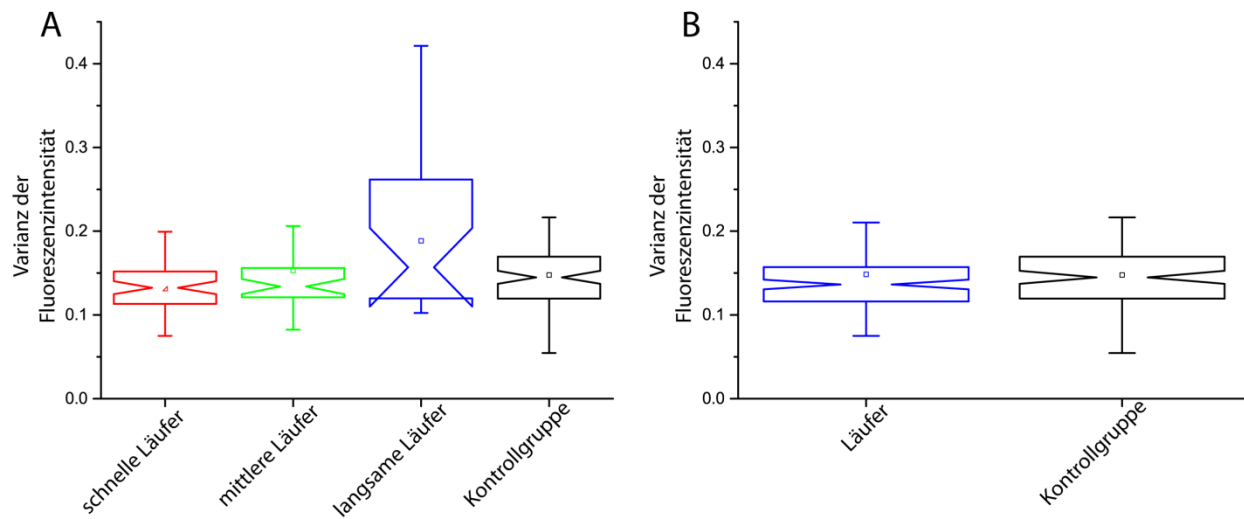


Abbildung 3.11: Varianzwerte der Fluoreszenzintensität im Tibialis anterior. Die Erkennung der Mitochondrien aller Mausgruppen für die Berechnung der Varianz erfolgte automatisch. Insbesondere innerhalb der langsamen Läufer ist eine breite Streuung der Werte sichtbar. Im Vergleich der gesamten Läufer im Gegensatz zur Kontrollgruppe mitteln sich die Streuungen und es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Varianz von Mic60 nach Training.

Während bei der langsamen Läufergruppe eine hohe Streuung der Varianzwerte zu sehen ist (Abbildung 3.11 A), sind die Werte der schnellen und mittleren Läufer sowie der Kontrollgruppe deutlich weniger breit gestreut. Fasst man die trainierten Mäuse zusammen und vergleicht diese mit bewegungsarmen Tieren zeigt sich keine signifikante Veränderung der Varianz als Reaktion auf den angesetzten Trainingsreiz (Abbildung 3.11 B). Dies lässt darauf schließen, dass die Mitochondrien der motorischen Endplatte im Tibialis anterior bereits optimal auf den Trainingsreiz reagieren können und sich demzufolge keine Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 in Folge eines erhöhten Energiebedarfs ergeben.

Die Ergebnisse der Untersuchungen motorischer Endplatten zeigen, dass Anpassungen neuromuskulärer Synapsen im Allgemeinen sowie der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 in Folge erhöhter

physischer Aktivität des Soleus beziehungsweise Tibialis anterior sehr unterschiedlich verlaufen. Während sich die Gesamtfläche motorischer Endplatten im Soleus von trainierten Tieren vergrößert, kann eine solche signifikante Anpassung für den Tibialis anterior nicht demonstriert werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit zeigte sich für die Muskelpräparate des Tibialis anterior, dass der Anteil der Fläche von Mitochondrien im Verhältnis zu der Gesamtfläche motorischer Endplatten ansteigt. Des Weiteren ergab die Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung für diesen Muskel keine Veränderung aufgrund des Lauftrainings. Dementgegen konnte ein Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität von Mic60 von trainierten zu bewegungsarmen Tieren in den motorischen Endplatten des Soleus demonstriert werden. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass Anpassungen der neuromuskulären Synapsen sowie der Mitochondrien im Allgemeinen beziehungsweise der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 im Speziellen an einen erhöhten Energiebedarf in den unterschiedlichen Muskelgruppen auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Die Beurteilung etwaiger Umstrukturierungen in Folge eines Lauftrainings kann nur durch die Gesamtheit der Ergebnisse erfolgen.

3.2 Apoptose

Apoptose ist eine streng regulierte Form des programmierten Zelltods in eukaryotischen Zellen. Dieses Suizidprogramm spielt nicht nur während der Embryogenese eine entscheidende Rolle bei der Entsorgung überschüssiger Zellen sondern ist im normalen Organismus maßgeblich an der Erhaltung zellulärer Homöostase beteiligt. Auch die Entsorgung pathologisch veränderter Zellen geschieht über den apoptotischen Signalweg und ist essentiell um der Entstehung von Tumoren vorzubeugen.

Den Mitochondrien kommt eine zentrale Position in dem ex- und intrinsischem Signalweg der Apoptose zu, da sie nicht nur auf apoptotische Signale innerhalb der Zelle reagieren sondern über das aktivierte Protein Bid auch an der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionskaskade beteiligt sind (Wei et al. 2000). Sie verflechten beide apoptotischen Signalwege und führen zu einer koordinierten Ausführung des programmierten Zelltods. Eine Entschlüsselung der genauen Prozesse innerhalb der Mitochondrien eignet sich daher, um das Verständnis für den Verlauf dieses Suizidprogramms entscheidend voranzubringen.

STED-mikroskopische Untersuchungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung demonstrierten bereits, dass eine Vielzahl an Proteinen in distinkten Clustern vorliegt, wobei die Dichte dieser Proteincluster dem Energiebedarf der Mitochondrien innerhalb einer Zelle angepasst ist. Wurm und Kollegen zeigten, dass Proteine entlang des mitochondrialen Netzwerks nicht homogen verteilt sind, sondern einen Gradienten von Zellkern zur Zellperipherie hin aufweisen (Wurm et al. 2011). Neumann und Kollegen konnten bereits eine subtile Veränderung der Proteincluster nach Induktion von Apoptose demonstrieren (Neumann 2010). Aufgrund der geringen Auflösung war eine genaue Untersuchung der mitochondrialen Proteine jedoch nicht möglich. Durch die Verbesserung mikroskopischer Systeme insbesondere mit der Möglichkeit mehrere Fluoreszenzkanäle hochaufgelöst aufnehmen zu können, sollte innerhalb dieser Arbeit untersucht werden, ob es zu Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung während des programmierten Zelltods kommt und inwieweit die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran durch die Proteine der Bcl-2 Familie, als essentieller Prozess für die Freisetzung von Cytochrom *c*, dargestellt werden kann.

Besonders die Fokussierung auf Proteine des MICOS Komplexes ist durch die anhaltende Kontroverse (Tam et al. 2010, Yamaguchi et al. 2008, Scorrano et al. 2002, Yang et al. 2012), inwieweit Cristae junctions Veränderungen nach Aktivierung des intrinsischen Signalwegs erfahren, ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit. Elektronenmikroskopische Studien an apoptotischen Mitochondrien ließen gegensätzliche Schlussfolgerungen zu. Während mehrere Untersuchungen zeigten, dass eine vollständige

Freisetzung von Cytochrom *c* lediglich nach einer Erweiterung der Cristae stattfinden kann, beschrieben andere Studien eine exakt gegenteilige Situation (Tam et al. 2010, Yang et al. 2012, Scorrano et al. 2002). Yamaguchi und Kollegen postulierten darüber hinaus eine Verengung der Cristae junctions nach Bax-Aktivierung (Yamaguchi et al. 2008). Da die Elektronenmikroskopie keine direkten Schlüsse auf den MICOS Komplex zulässt, sollte mittels STED-Mikroskopie untersucht werden, ob eine Veränderung der Proteinverteilung von Komponenten des Komplexes zu beobachten ist und ob Rückschlüsse auf eine Umstrukturierung der Cristae junctions getroffen werden können.

3.2.1 Geeignetes System zur Untersuchung der Apoptose

3.2.1.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie

Um Veränderungen sub-mitochondrialer Proteinverteilungen während der Apoptose untersuchen zu können, ist die Auswahl eines geeigneten Zellmodells, zur Darstellung der morphologischen Veränderungen im Allgemeinen und der Umstrukturierungen auf Proteinebene im Speziellen, wichtig. Aufgrund ihrer ausgeprägt vernetzten Mitochondrien sowie der deutlich erkennbaren Proteincluster bei STED-mikroskopischen Aufnahmen stellen insbesondere U2OS Zellen ein geeignetes System zur Betrachtung mitochondrialer Umstrukturierungen dar (Neumann 2010). Bei dieser humanen Zelllinie handelt es sich um immortalisierte Epithelzellen einer an Osteosarkom erkrankten 15-Jährigen. Trotz ihrer Herkunft weisen U2OS Zellen normale Werte des Tumorsuppressorgens p53 auf (Niforou et al. 2008). Eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt zu vermehrter Expression von PUMA, zu Oligomerisierung von Bax und Bak in Mitochondrien und wirkt antagonistisch auf anti-apoptische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xl (Amaral et al. 2010). Die uneingeschränkte Funktion von p53 ist somit unerlässlich für einen normalen Ablauf der Apoptose. Des Weiteren ermöglicht ihre humane Abstammung den direkten Bezug zur menschlichen Physiologie und erhöht die klinische Relevanz der nachfolgenden Untersuchungen. Abbildung 3.12 zeigt das mitochondriale Netzwerk dieser Zellen durch Antikörpermarkierung mit Cytochrom *c* und Mic60, einer Kernkomponente des MICOS Komplexes, der für die Ausprägung der Cristae junctions verantwortlich ist.

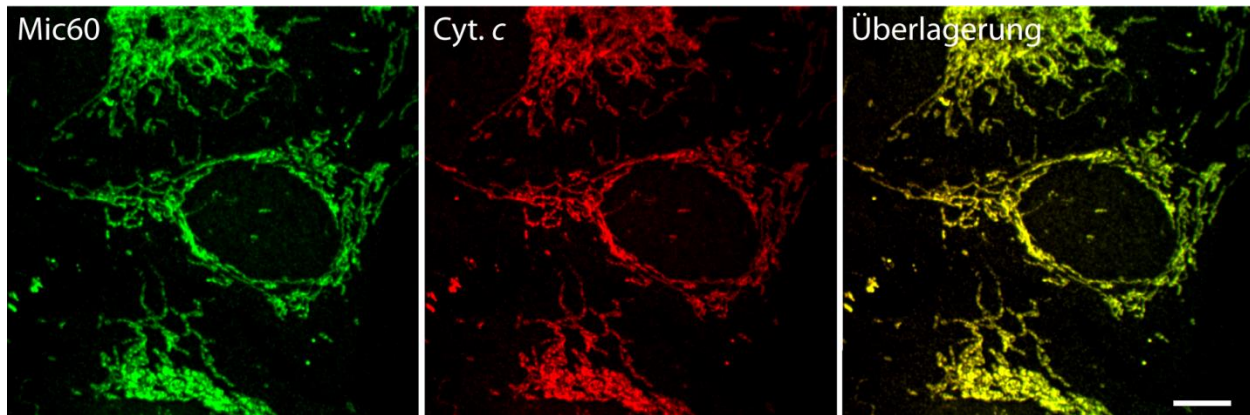


Abbildung 3.12: Das mitochondriale Netzwerk von U2OS Zellen. U2OS Zellen wurden fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen Cytochrom *c* (Cyt. *c*) sowie einem Antiserum gegen Mic60 dekoriert. Die Mitochondrien bilden ein Netzwerk im Zytoplasma der Krebszelllinie. (Größenbalken: 10 µm)

3.2.1.2 Auswahl eines geeigneten Apoptose-Induktors

Um Apoptose in Zellkultur induzieren zu können, stehen eine Reihe unterschiedlicher Chemikalien zur Verfügung. Welche davon geeignet sind, um mitochondriale Veränderungen während der Apoptose zu untersuchen, hängt von einer Vielzahl an Faktoren ab, darunter die vollständige Freisetzung von Cytochrom *c* sowie die charakteristische Umstrukturierung innerhalb des mitochondrialen Netzwerks. Um unerwünschte Nebenwirkungen einiger gängiger Zellgifte zu vermeiden, wurde für diese Arbeit der Apoptoseinduktor Actinomycin D ausgewählt (Neumann 2010). Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum, das durch Bindung an DNA die Synthese von RNA inhibiert (Sobell 1985).

Für die Induktion von Apoptose wurden die Zellen, neben der Inkubation mit Actinomycin D, mit z-vad-fmk behandelt. Es handelt sich hierbei um einen Caspase-Inhibitor, der die Aktivität von Effektorcaspasen nicht aber von Initiatorcaspasen beeinflusst (Rodriguez-Enfedaque et al. 2012, Van Noorden 2001, Kaufmann and Hengartner 2001). Dadurch wird der apoptotische Signalweg nach Freisetzung von Cytochrom *c* verlangsamt und eine genaue Untersuchung der Mitochondrien vor Ablösung der Zellen vom Deckglas ermöglicht. Abbildung 3.13 stellt das mitochondriale Netzwerk nach Inkubation mit Actinomycin D dar und zeigt die Unterschiede mit und ohne Behandlung mit z-vad-fmk. Ohne Zugabe des Inhibitors runden sich Zellen vollständig ab und eine detaillierte Betrachtung der Mitochondrien ist nicht mehr möglich.

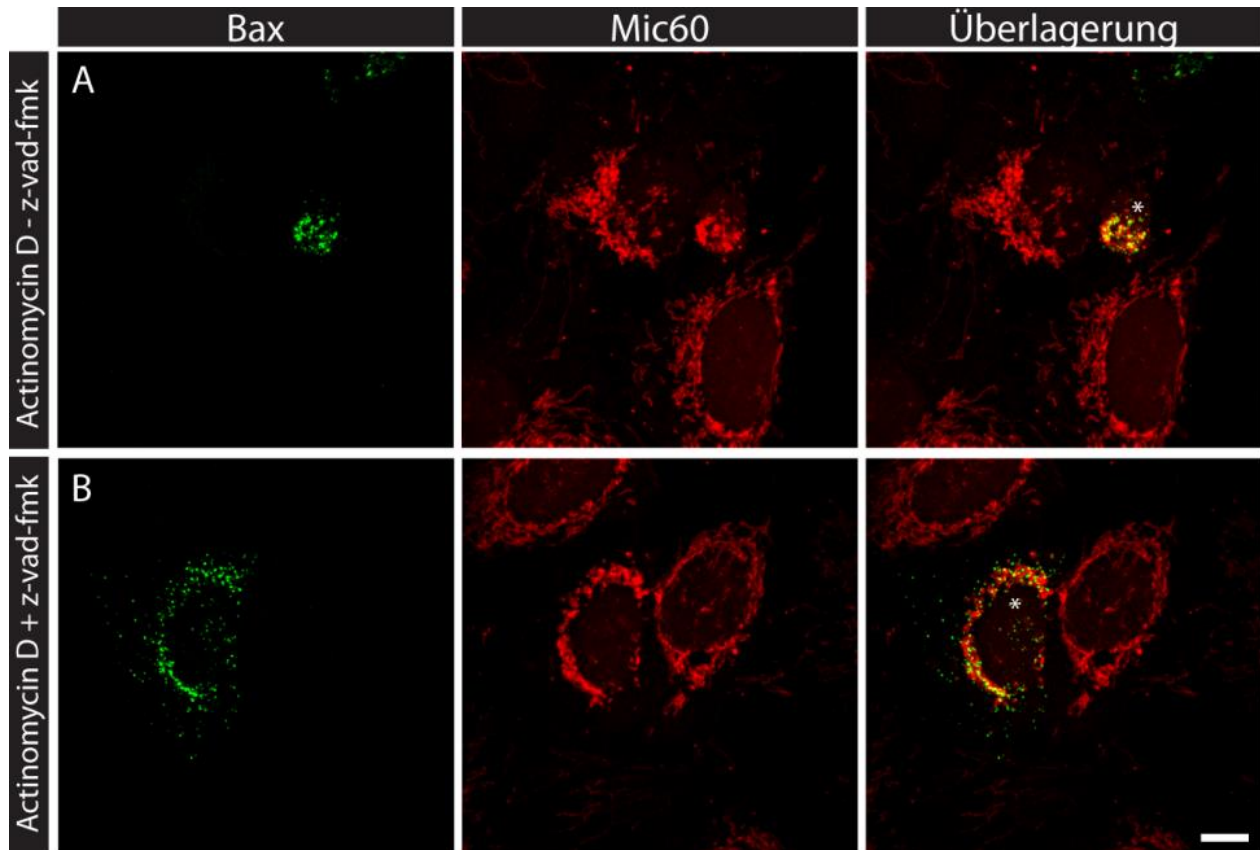


Abbildung 3.13: Mitochondriale Morphologie nach Behandlung mit Actinomycin D ohne und mit z-vad-fmk. Um Apoptose auszulösen wurden U2OS Zellen 14 bis 18 Stunden mit Actinomycin D ohne (A) und mit dem Caspaseinhibitor (B) z-vad-fmk behandelt. Anschließend wurden apoptotische Zellen (*) durch Immunfluoreszenzfärbung gegen aktiviertes Bax nachgewiesen. Durch Inkubation mit einem Antiserum gegen Mic60 konnte das mitochondriale Netzwerk visualisiert werden. In Abwesenheit des Caspaseinhibitors (A) runden sich die Zellen nach Fragmentierung der Mitochondrien sehr schnell ab und lösen sich von dem Deckglas. Dies kann durch Zugabe von z-vad-fmk verhindert werden, wodurch die Untersuchung der Mitochondrien von U2OS Zellen möglich ist. (Größenbalken: 10 μm)

Apoptotische Zellen können anhand der Entstehung von Bax-Oligomeren identifiziert werden (Abbildung 3.13). Die Aktivierung des Bcl-2 Proteins steht am Anfang der intrinsischen Signaltransduktionskaskade und markiert somit apoptotische Zellen in einem frühen Stadium. Dabei kommt es zu Konformationsänderungen von Bax, woraufhin das Protein Oligomere bildet, die sich stabil in die äußere mitochondriale Membran einlagern (Bleicken et al. 2010). Diese Strukturen können durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem Antikörper, der ausschließlich aktiviertes Bax erkennt, nachgewiesen werden und lassen eine Einteilung der Zellen in nicht-apoptotische und apoptotische Zellen zu. Während Mitochondrien in nicht-apoptotischen Zellen ein verzweigtes Netzwerk ausbilden, weisen Zellen mit aktiviertem Bax starke Veränderungen auf (Abbildung 3.13).

Die Antikörperfärbung gegen Mic60 zeigt eine deutliche Fragmentierung der Mitochondrien in apoptotischen Zellen (Abbildung 3.13). Das intakte Netzwerk ist nach Behandlung mit Actinomycin D

vollständig aufgelöst und die vereinzelt Organellen liegen in vesikulärer Form vor. Eine Untersuchung der Proteinverteilung in Mitochondrien kann aufgrund der morphologischen Veränderungen nur bedingt durchgeführt werden. Deshalb ist es wichtig auch während der Apoptose einer Fragmentierung entgegenzuwirken, sodass die hochauflösende Darstellung mitochondrialer Proteine möglich ist.

3.2.1.3 Hemmung der mitochondrialen Fragmentierung während der Apoptose

Um eine detaillierte Charakterisierung mitochondrialer Veränderungen durchführen zu können, wurde die Fragmentierung der Mitochondrien durch Herunterregulierung von Drp1 verlangsamt. Insbesondere vergrößert diese Behandlung das Zeitfenster zwischen Aktivierung von Bax und anschließender Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae in das Zytoplasma der Zelle (Estaquier and Arnoult 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von Drp1 eine Veränderung des mitochondrialen Proteinniveaus von OPA-1 zur Folge hat. Da dieses Protein wichtig für die Ausbildung der Cristae junctions ist, liegt die Vermutung nahe, dass Drp1 über OPA-1 die Freisetzung von Cytochrom c und somit den Verlauf der Apoptose beeinflussen kann (Estaquier and Arnoult 2007). Daher erlaubt eine Herunterregulierung von Drp1 durch RNAi eine zeitlich detailliertere Betrachtung der einzelnen Vorgänge und lässt die Untersuchung mitochondrialer Veränderungen noch vor der Freisetzung von Cytochrom c und einer damit verbundenen eventuellen Umstrukturierung der Cristae junctions zu.

Des Weiteren könnte die mitochondriale Fragmentierung und die damit einhergehende Formveränderung die Auswertung der Proteincluster beeinflussen. Die abgerundeten Mitochondrien, die sich in Folge der Auflösung des mitochondrialen Netzwerks ergeben, unterscheiden sich erheblich von den länglichen, vernetzten Organellen. Da diese Fragmentierung mit einem vergrößerten Umfang und einer komplett veränderten Morphologie der Mitochondrien korreliert, sollte getestet werden, ob Veränderungen, die in abgerundeten Mitochondrien beobachtet werden können, tatsächlich auf einer Umstrukturierung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung beruhen und nicht ein Artefakt der veränderten Morphologie darstellen.

Die effiziente Herunterregulierung von Drp1 wurde durch Transfektion der Zellen mit shRNA gegen dieses Protein und anschließender Selektion mit Hygromycin B erreicht (Abbildung 3.14).

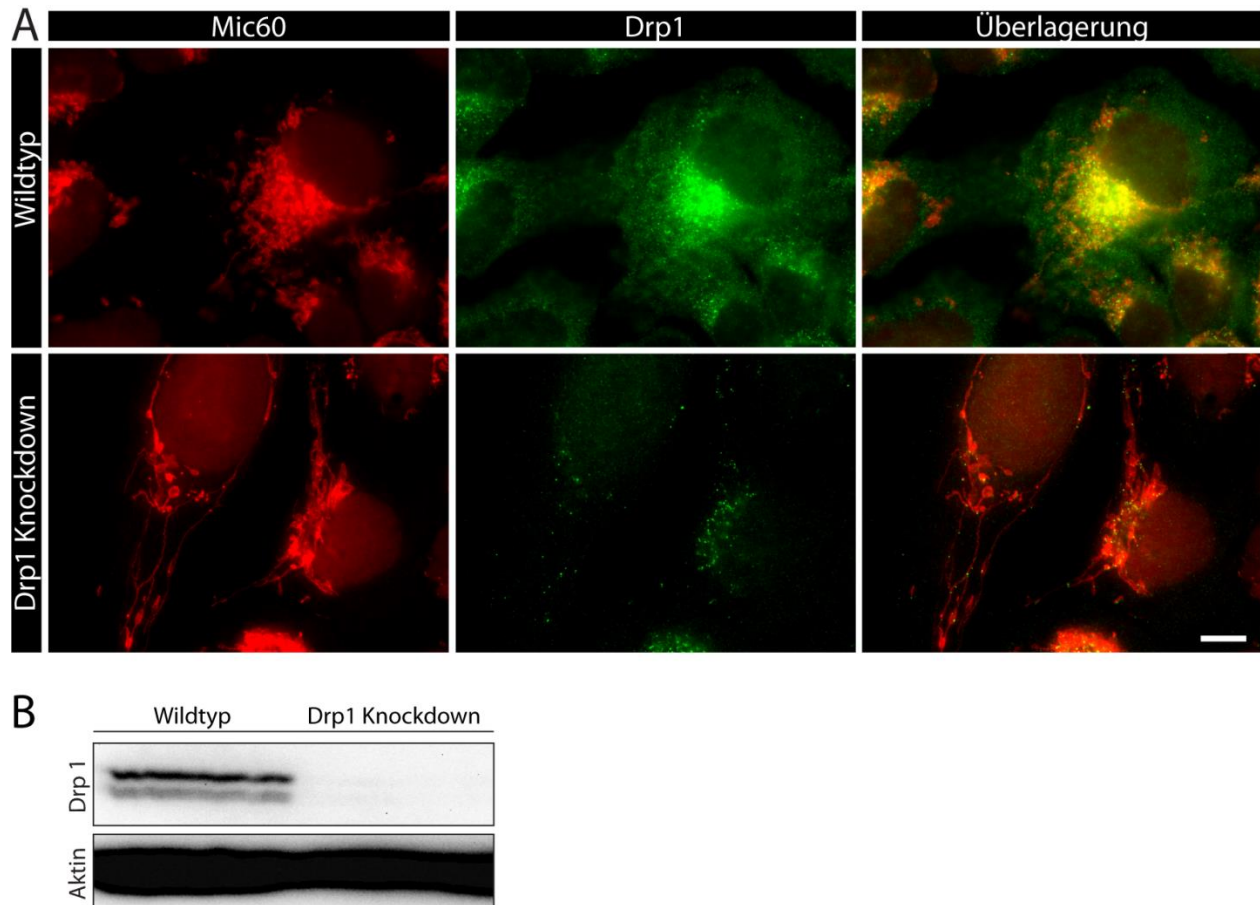


Abbildung 3.14: Herunterregulierung von Drp1 in U2OS Zellen. Transfektion mit shRNA gegen Drp1 und anschließende Selektion zeigt eine deutliche Herunterregulierung von Drp1 in U2OS Zellen. Dies kann durch Immunfluoreszenz (A) mit einem spezifischen Antikörper gegen Drp1 und zusätzlichem Nachweis der mitochondrialen Morphologie durch Färbung von Mic60 bestätigt werden. Bei Drp1 Knockdown Zellen zeigt sich ein deutlich verändertes mitochondriales Netzwerk mit verlängerten Organellen. Der Western Blot (B) von Gesamtzelllysaten bestätigt die effiziente Herunterregulierung durch Inkubation der Membran mit Drp1 Antikörper. Als Ladekontrolle diente Aktin. (Größenbalken: 10µm)

Während U2OS Zellen mit physiologischer Proteinexpression von Drp1 ein normal ausgeprägtes mitochondriales Netzwerk mit freien Enden aufweisen, lassen sich ausgeprägte morphologische Veränderungen durch die Hemmung der mitochondrialen Spaltung nach Herunterregulierung von Drp1 feststellen (Abbildung 3.15). Drp1 Knockdown Zellen weisen ein hyperfusioniertes mitochondriales Netzwerk mit ausgestreckten, stark vernetzten Organellen ohne freie Enden auf.

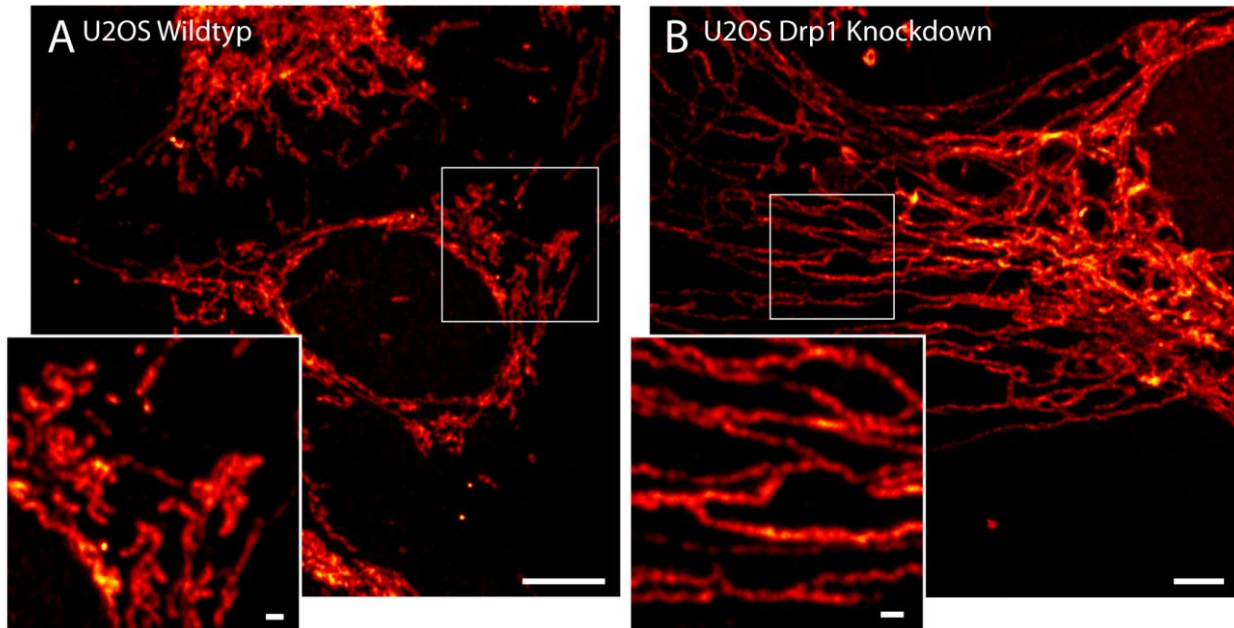


Abbildung 3.15: Veränderungen der mitochondrialen Morphologie nach Herunterregulierung von Drp1. Nach Knockdown von Drp1 wurden die Zellen mit Antiserum gegen Mic60 zur Darstellung der Mitochondrien dekoriert. Dabei zeigt sich in unbehandelten Zellen (A) das mitochondriale Netzwerk von U2OS Zellen mit ausgeprägten Vernetzungen und freien Enden der einzelnen Organellen. Durch Hemmung der Fission weisen Drp1 Knockdown Zellen (B) ein hyperfusioniertes Netzwerk mit länglichen Mitochondrien ohne freie Enden auf. (Größenbalken: 10 μm (Übersicht); 1 μm (Ausschnitt))

Aufgrund der beugungsbeschränkten Auflösung konventioneller bildgebender Verfahren, kann eine Darstellung der Proteinverteilung nur unter Verwendung hochauflösender Mikroskopieverfahren erfolgen. Wie bereits in Abschnitt 3.1.2.5 erwähnt, lagern sich eine Vielzahl mitochondrialer Proteine in distinkten Proteinclustern an. Um die Proteinverteilung innerhalb apoptotischer Zellen interpretieren zu können, sollte zunächst untersucht werden, wie sich Mic60 in U2OS Zellen unter Kontrollbedingungen verhält.

3.2.1.4 STED-mikroskopische Untersuchung mitochondrialer Proteincluster

Alle Untersuchungen wurden mittels STED-Mikroskopie durchgeführt, um die Unterschiede der sub-mitochondrialen Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose hinreichend adressieren zu können. Vergleichbar mit den Beobachtungen in der neuromuskulären Synapse (Abbildung 3.7), zeigen sich auch in U2OS Zellen distinkte Proteincluster für Mic60 (Abbildung 3.16). Hochauflösende Mikroskopieverfahren eignen sich somit gut, um etwaige Veränderungen der Proteinverteilung während der Apoptose zu visualisieren.

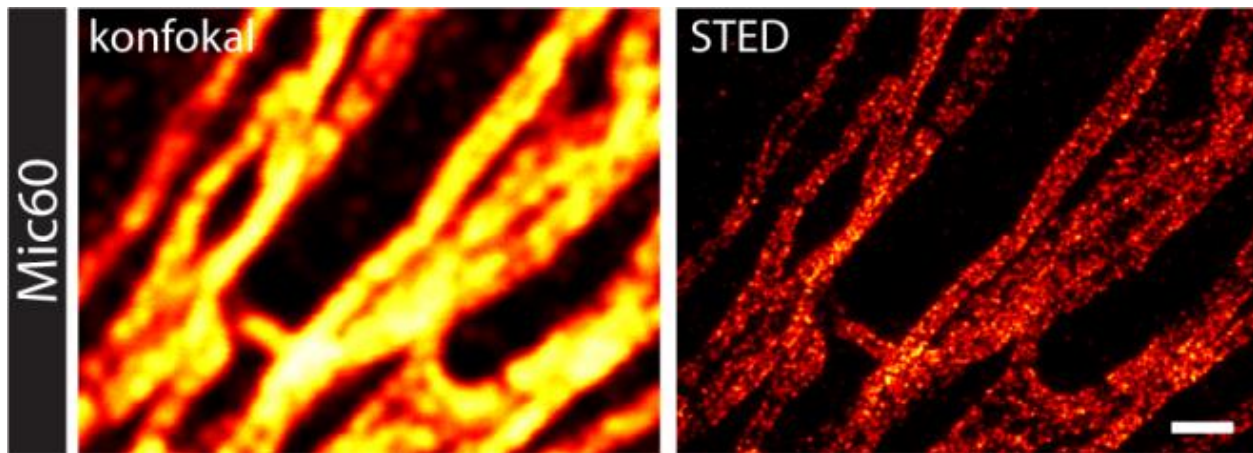


Abbildung 3.16: Mitochondriale Proteincluster visualisiert mittels STED-Mikroskopie. U2OS Zellen wurden mit Antiserum gegen Mic60 inkubiert und durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellt. Bei beugungsbeschränkten Mikroskopieverfahren (konfokal) können distinkte Proteincluster nicht voneinander getrennt werden. Erst durch Untersuchung der Mitochondrien mittels STED-Mikroskopie können die einzelnen Signale voneinander getrennt werden. (Größenbalken: 1 μm)

Um Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose in einen Kontext mit dem Verlauf des programmierten Zelltods setzen zu können, sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit zunächst ein Überblick über die Veränderungen der Mitochondrien in U2OS Wildtyp und Drp1 Knockdown Zellen verschafft werden.

3.2.2 Veränderungen mitochondrialer Morphologie während der Apoptose

Die Inhibierung der mitochondrialen Fragmentierung während der Apoptose durch den Knockdown von Drp1 wurde verwendet, um die Freisetzung von Cytochrom *c* zu verzögern und die Mitochondrien in ihrer länglichen Form zu erhalten. Eine Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung in unbehandelten U2OS Zellen erschwert die Beurteilung der Proteincluster durch die markante Veränderung der mitochondrialen Morphologie. Eine Untersuchung sowohl in U2OS Wildtyp Zellen als auch in Drp1 Knockdown Zellen diente der Analyse, ob die Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung weder ein Artefakt aufgrund der abgerundeten Form darstellen noch in Folge des Knockdown entstehen.

Morphologische Veränderungen der Mitochondrien können nach einer Inkubation mit Actinomycin D und z-vad-fmk in U2OS Wildtyp Zellen bereits nach 14 bis 18 Stunden durch Immunfluoreszenzfärbungen und anschließender Untersuchung mittels beugungsbeschränkter konfokaler Mikroskopie dargestellt werden.

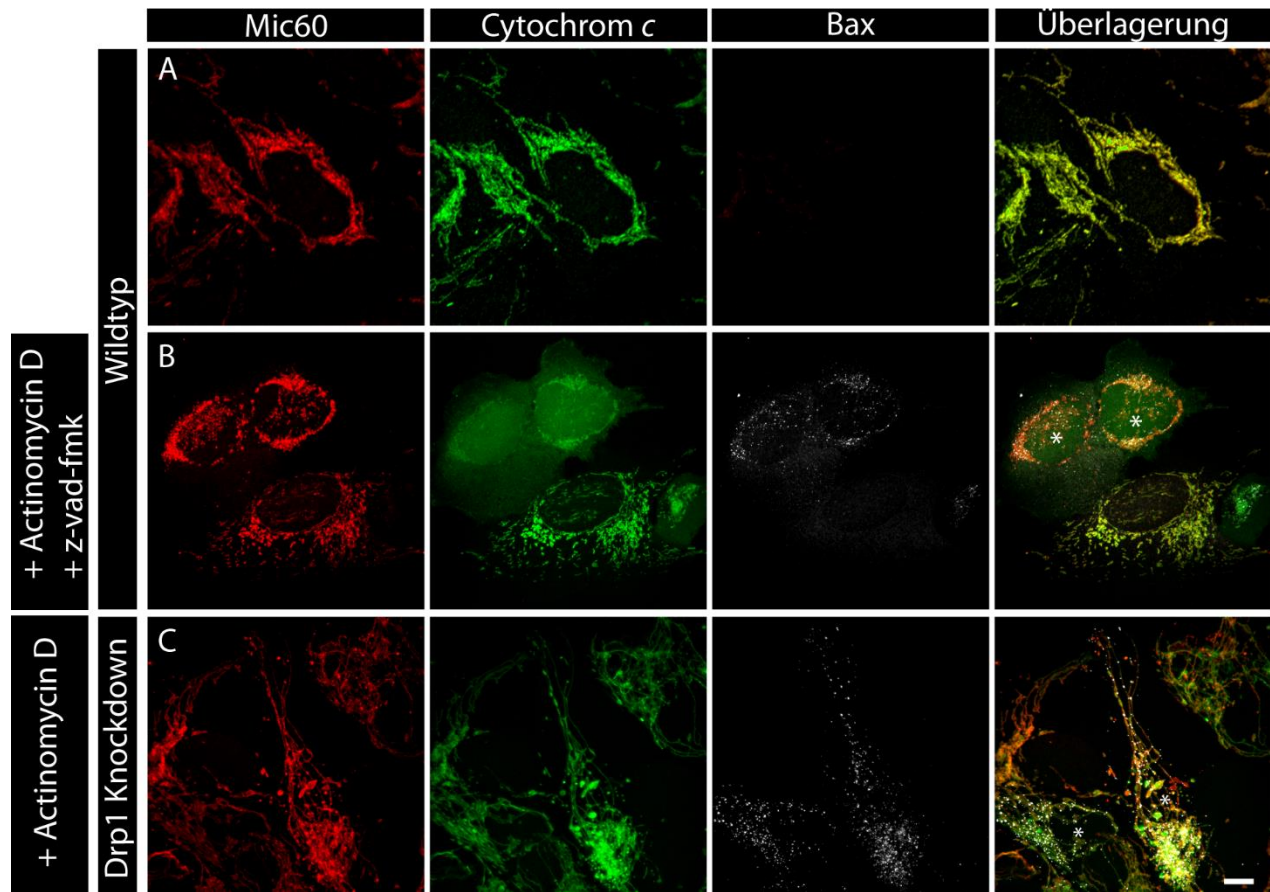


Abbildung 3.17 Übersicht der morphologischen Veränderungen während der Apoptose. Um den programmierten Zelltod zu induzieren, wurden U2OS Wildtyp Zellen mit Actinomycin D und z-vad-fmk behandelt (B) während bei Drp1 Knockdown Zellen auf den Caspaseinhibitor verzichtet werden konnte (C). Durch Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen aktiviertes Bax und Cytochrom c sowie einem Antiserum gegen Mic60 können apoptotische Zellen identifiziert und das mitochondriale Netzwerk dargestellt werden (*). Es zeigen sich starke Veränderungen der Mitochondrien mit Freisetzung von Cytochrom c in den U2OS Wildtyp Zellen (B) im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen (A). Diese morphologischen Veränderungen lassen sich nur bedingt in Drp1 herunterregulierten Zellen beobachten (C). (Größenbalken: 10 μm)

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1.2 erwähnt, zeigt sich eine frühzeitige Fragmentierung der Mitochondrien nach Aktivierung von Bax in U2OS Zellen mit einhergehender Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma. Das mitochondriale Netzwerk apoptotischer Zellen (Abbildung 3.17 B; Stern) ist im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 3.17 A) deutlich weniger ausgeprägt. Die Mitochondrien liegen als einzelne Fragmente nahe dem Zellkern im Zytoplasma vor. Aufgrund der verzögerten Freisetzung von Cytochrom c in Drp1 herunterregulierten U2OS Zellen, ist eine zusätzlich Inhibierung der Effektorcaspasen durch Zugabe von z-vad-fmk nicht erforderlich. Die Induktion der Apoptose erfolgte in diesen Zellen durch Actinomycin D ohne den Caspase-Inhibitor. In Drp1 Knockdown Zellen lassen sich auch nach Aktivierung von Bax, und dessen Einlagerung in die äußere mitochondriale Membran, längliche Mitochondrien beobachten (Abbildung 3.17 C).

Der Bildausschnitt (Abbildung 3.18) von diesen Zellen zeigt, dass eine vollständige Freisetzung von Cytochrom *c* in apoptotischen U2OS Wildtyp Zellen direkt nach der Aktivierung von Bax beobachtet werden kann (Abbildung 3.18 A). Dementgegen resultiert die Inhibierung von Drp1 zum einen in einer partiellen Hemmung der mitochondrialen Fragmentierung, wodurch einige Mitochondrien ihre längliche Form beibehalten (Abbildung 3.18 B), und zum anderen in einer verzögerten Freisetzung von Cytochrom *c* (Abbildung 3.18 B; Pfeil). In diesen Zellen haben nur einzelne Mitochondrien Cytochrom *c* in das Zytoplasma freigesetzt (Abbildung 3.18 B; Stern).

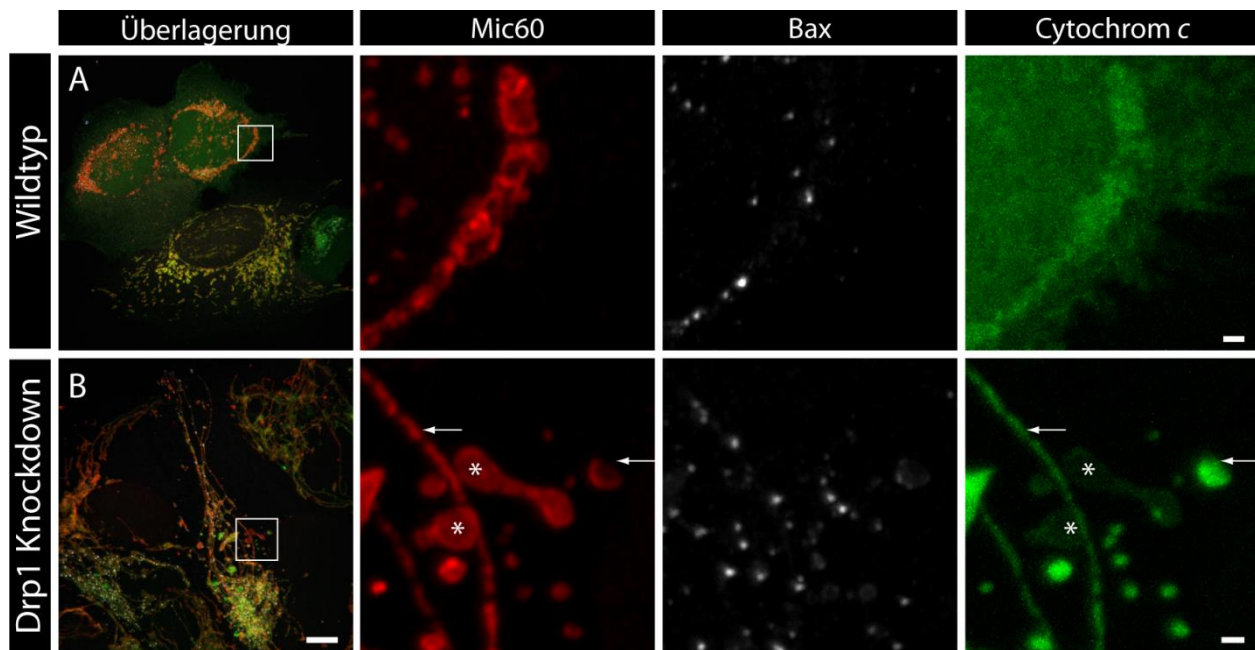


Abbildung 3.18: Freisetzung von Cytochrom *c* nach Induktion von Apoptose. Während die Behandlung der U2OS Wildtyp Zellen zu Fragmentierung aller Mitochondrien (Mic60) und zur vollständigen Freisetzung von Cytochrom *c* ins Zytoplasma der Zellen führt (A), trifft dies nicht auf das mitochondriale Netzwerk der Drp1 Knockdown Zellen zu (B). Das Ausschütten von Cytochrom *c* kann nur in einigen Mitochondrien (*) beobachtet werden. Auch nach Aktivierung von Bax lassen sich Cytochrom *c* positive Organellen beobachten (Pfeile). (Größenbalken: 10 μm (Überlagerung); 1 μm (Ausschnitt))

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Herunterregulierung von Drp1 durch RNAi nicht nur die Fragmentierung verzögert sondern, dass auch nach Abrunden der Organellen eine Freisetzung von Cytochrom *c* teilweise unterbunden werden kann. Nach dem Knockdown von Drp1 lassen sich einige scheinbar aufgeblähte, vergrößerte Mitochondrien beobachten (Abbildung 3.18 B). Dies steht im Einklang mit früheren Studien und stellt kein Artefakt der vorliegenden Arbeit dar (Lee et al. 2004). Da bei der Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung in Drp1 herunterregulierten Zellen lediglich längliche, nicht-abgerundete Mitochondrien ausgewertet wurden, beeinflusst diese morphologische Veränderung die Analyse der Proteinverteilung nicht.

Die konfokale Untersuchung der Mitochondrien apoptotischer U2OS Wildtyp Zellen macht deutlich, dass es im Verlauf der Apoptose zu einer schnellen Freisetzung von Cytochrom *c* kommt und die Mitochondrien kurz nach Aktivierung von Bax fragmentieren. Eine Inhibierung dieser Fragmentierung durch Knockdown von Drp1 verzögert die Freisetzung von Cytochrom *c* und ermöglicht eine Untersuchung der Mitochondrien in ihrer ursprünglich länglichen Form.

3.2.3 Veränderungen sub-mitochondrialer Proteinverteilung während der Apoptose

3.2.3.1 *Untersuchung der Proteinverteilung in U2OS Wildtyp Zellen*

Um einer potenziellen Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose nachgehen zu können, wurden U2OS Zellen 14 bis 18 Stunden mit Actinomycin D und z-vad-fmk behandelt und eine Auswahl mitochondrialer Proteine nach indirekter Immunfluoreszenz mittels STED-Mikroskopie untersucht. Die Untersuchung der Proteinverteilung in U2OS Wildtyp Zellen sollte Aufschluss über etwaige Veränderungen der Proteincluster unter physiologischem Expressionsniveau an Drp1 geben.

Für die einzelnen Subkompartimente der Mitochondrien wurde repräsentativ ein Protein ausgewählt und in apoptotischen und unbehandelten Zellen hochauflösend analysiert. Dadurch konnte eine umfassende Untersuchung etwaiger Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung gewährleistet werden. Aufgrund der potenziellen Sonderstellung der Cristae junctions während der Apoptose, lag der Fokus der Untersuchung auf dem MICOS Komplex. Demzufolge wurden die Messungen auf drei Komponenten, Mic27, Mic60 und Mic19, ausgeweitet, die mittels indirekter Immunfluoreszenz markiert und anschließend hochauflösend analysiert wurden.

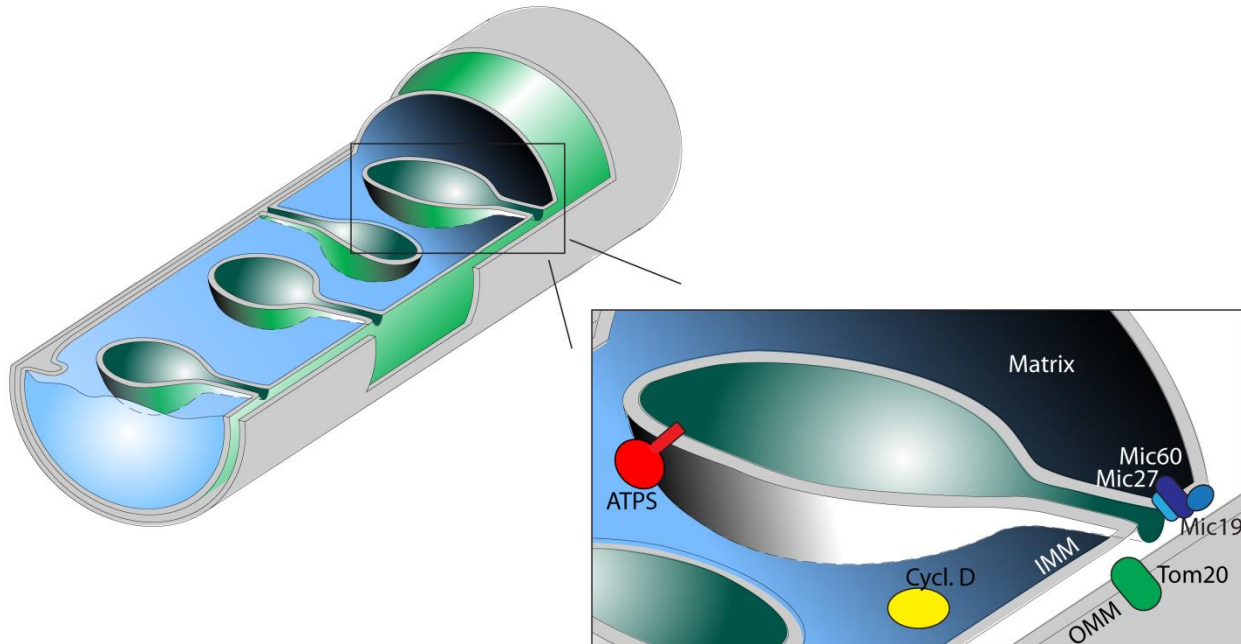


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung der untersuchten Proteine. Um die Proteinverteilung in verschiedenen Subkompartimenten von Mitochondrien zu untersuchen wurde die ATP-Synthase (ATPS) für die innere mitochondriale Membran, Cyclophilin D (Cycl. D) als Matrixprotein und Tom20 als Protein der äußeren mitochondrialen Membran ausgewählt. Eine Untersuchung von MICOS fand durch die Analyse der Komponenten Mic60, Mic19 und Mic27 statt.

Um Veränderungen der Proteinverteilung entlang der inneren mitochondrialen Membran zu untersuchen, wurde die F_0F_1 -ATPase (Abbildung 3.19; ATPS) ausgewählt. Frühere Studien demonstrierten, dass es sich hierbei um einen Proteinkomplex handelt, der am Scheitelpunkt der Cristae vorliegt und an der Krümmung der inneren mitochondrialen Membran beteiligt ist (Davies et al. 2012). Bei Tom20 handelt es sich um ein Rezeptorprotein des TOM Komplexes in der äußeren mitochondrialen Membran. Das Protein dient zur Erkennung mitochondrialer Importsequenzen und ist ein essentieller Faktor für die Versorgung der Zelle mit ATP (Perry et al. 2008). Cyclophilin D, eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase, ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Giorgio et al. 2010). Studien konnten zeigen, dass dieses Protein eine essentielle Komponente der sogenannten mitochondrialen Permeabilisationspore darstellt, von der vermutet wird, dass sie im Zusammenhang mit der Permeabilisierung der inneren mitochondrialen Membran als Antwort auf oxidativen Stress und niedrige Konzentrationen von ATP steht (Schinzel et al. 2005).

Um etwaige Veränderungen der sub-mitochondrialen Verteilung der oben genannten Proteine analysieren zu können, sollten als erster Schritt die Proteincluster in U2OS Wildtyp Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht werden. Die Experimente mit physiologischen Proteinkonzentrationen von Drp1 dienen als Kontrolle, um ausschließen zu können, dass Veränderungen der Proteinverteilung ein

Artefakt des Drp1 Knockdowns darstellen. Kontrollfärbungen gegen Cytochrom *c* sowie aktiviertem Bax erfolgten bei allen nachfolgenden Experimenten um apoptotische Zellen von nicht-apoptotischen zu unterscheiden (nicht dargestellt).

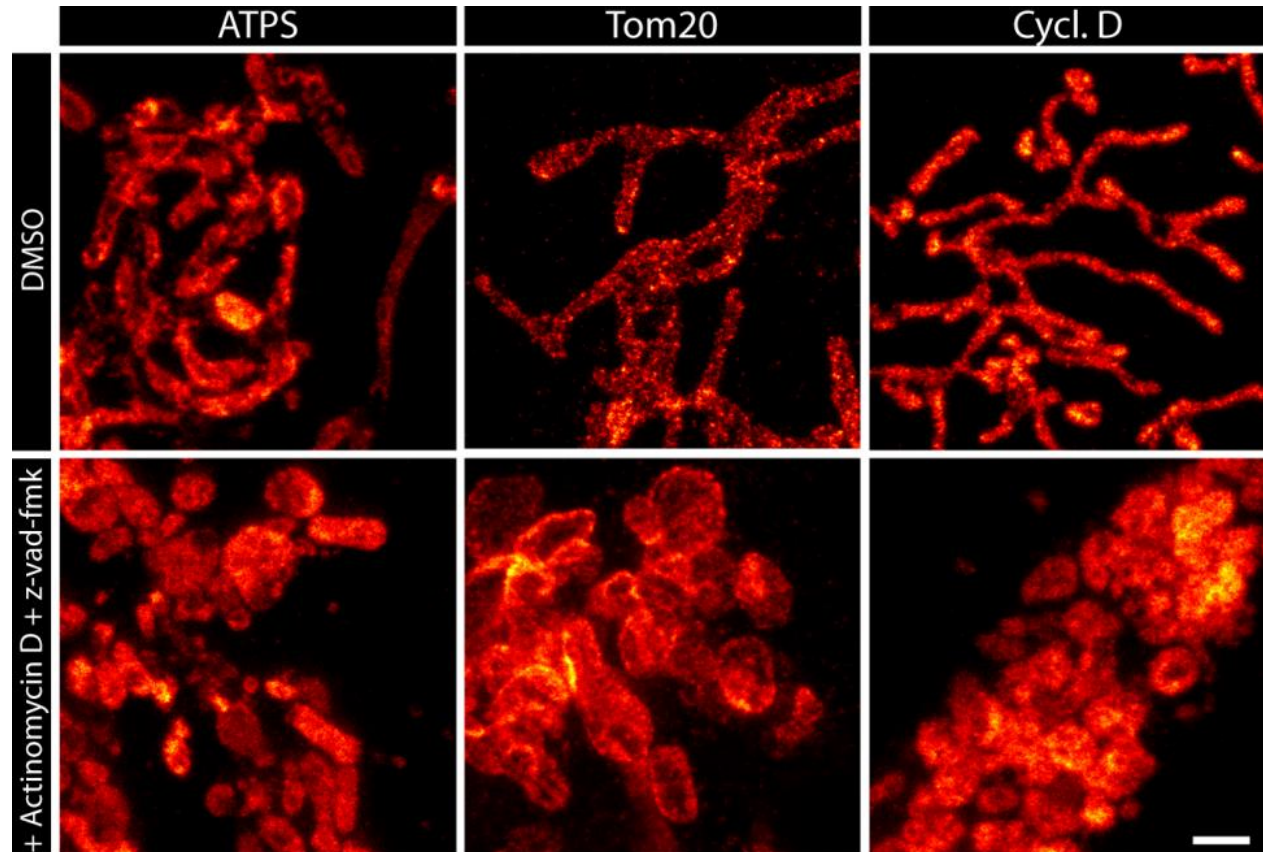


Abbildung 3.20: Proteinverteilung in U2OS Wildtyp Zellen vor und nach Induktion von Apoptose. U2OS Zellen wurden mit Antikörpern gegen verschiedene mitochondriale Proteine dekoriert und mittels STED-Mikroskopie aufgenommen. Die Proteincluster der ATP-Synthase (ATPS), Tom20 beziehungsweise Cyclophilin D (Cycl. D) zeigen in Wildtyp Zellen unter Kontrollbedingungen (DMSO) eine andere Verteilung als nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D zusammen mit z-vad-fmk. (Größenbalken: 1 µm)

Bei der Beurteilung der Proteincluster von ATP-Synthase, Tom20 und Cyclophilin D fallen bereits innerhalb der Kontrollgruppe deutliche Unterschiede auf (Abbildung 3.20). Während Tom20 in U2OS Wildtyp Zellen in diskreten Clustern vorliegt, können klar abgegrenzte Proteincluster von F_0F_1 -ATPase und Cyclophilin D nicht erkannt werden. Lediglich vereinzelt lassen sich bei der F_0F_1 -ATPase Unterbrechungen der homogenen Verteilung beobachten. Als Matrixprotein zeigen sich bei Cyclophilin D keine klar abgegrenzten Proteincluster, wie sie bei Membranproteinen vorkommen.

Nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D in Kombination mit z-vad-fmk kommt es zu deutlicher Fragmentierung der Mitochondrien einhergehend mit einer Veränderung der Proteincluster insbesondere

von Tom20. Während in nicht-apoptotischen Zellen distinkte Cluster beobachtet werden können, zeigt sich eine homogenere Verteilung nach Induktion der Apoptose (Abbildung 3.20). Im Gegensatz zu Tom20 liegen Cyclophilin D und F_0F_1 -ATPase in unbehandelten Zellen bereits deutlich homogener verteilt vor. Der Unterschied der Proteinverteilung in apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen ist bei diesen beiden Proteinen weniger stark ausgeprägt.

Aufgrund der potenziellen Sonderstellung der Cristae junctions in der Apoptose, fand eine detaillierte Betrachtung des MICOS Komplexes anhand der Untersuchung von drei Komponenten, Mic60, Mic19 und Mic27 (Abbildung 3.19; blau) statt.

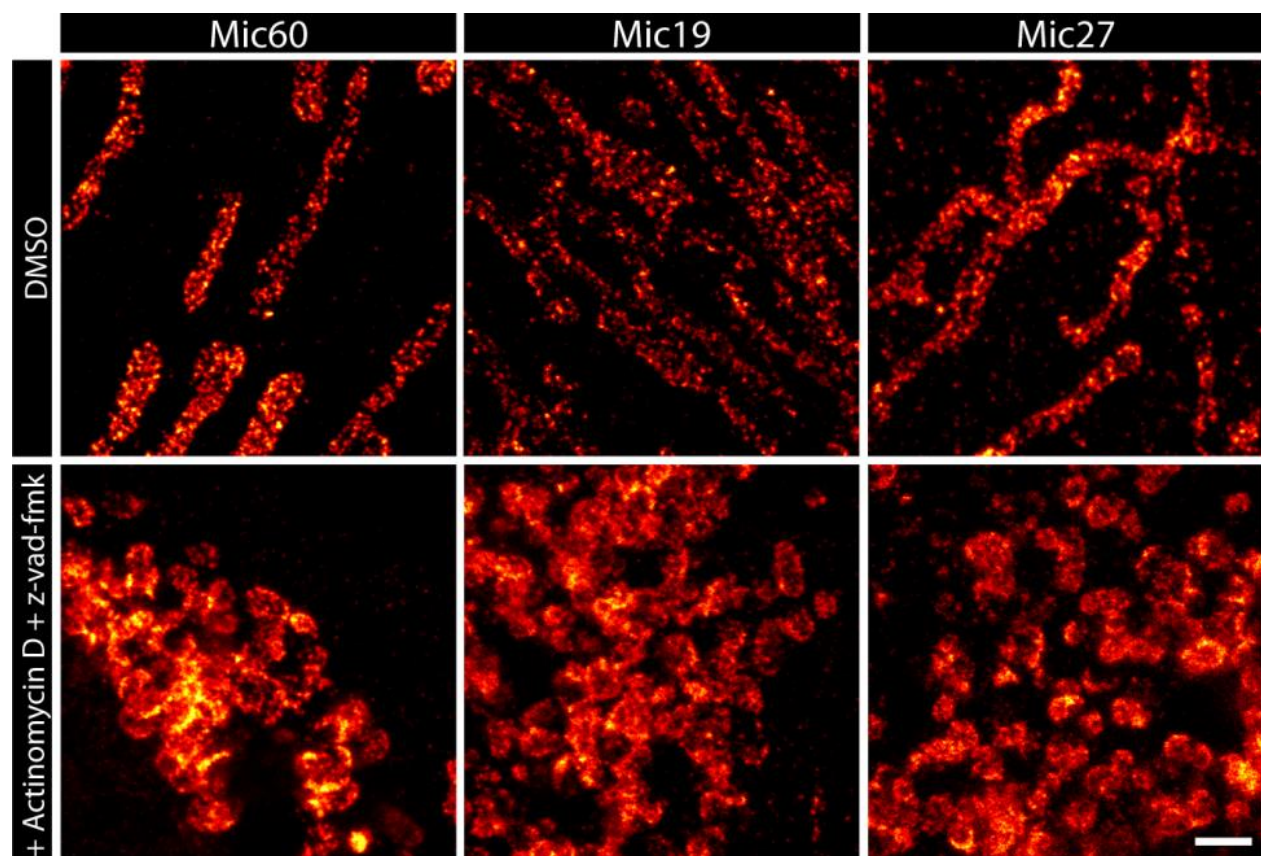


Abbildung 3.21 : Proteinverteilung des MICOS Komplexes nicht-apoptotischer und apoptotischer U2OS Wildtyp Zellen. U2OS Zellen wurden mit Antiserum (Mic60) beziehungsweise mit spezifischen Antikörpern (Mic19; Mic27) inkubiert und durch Immunfluoreszenz im STED-Mikroskop visualisiert. Dabei zeigen Kontrollzellen (DMSO) eine andere Proteinverteilung als Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D zusammen mit z-vad-fmk. (Größenbalken: 1 μ m)

In den Kontrollzellen zeigen sich klar abgegrenzte Proteincluster mit deutlichen Lücken zwischen den supramolekularen Proteinkomplexen (Abbildung 3.21). Nach Induktion von Apoptose durch Actinomycin D (mit z-vad-fmk) lässt sich, vergleichbar mit den STED-Daten von Tom20 (Abbildung 3.20),

eine Auflösung der Proteincluster und damit einhergehend eine deutlich homogenere Proteinverteilung für alle MICOS Komponenten in apoptotischen Zellen darstellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Großteil der untersuchten Proteine eine Tendenz zur gesteigerten Homogenität der Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose aufzeigt. Um auch subtile Veränderungen, insbesondere von Cyclophilin D und F_0F_1 -ATPase, analysieren zu können, wurde eine automatisierte Erkennung der Mitochondrien mit anschließender Berechnung der Varianz der Fluoreszenzintensität durchgeführt.

3.2.3.2 Quantitative Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung

Als Maß zur Beurteilung der Heterogenität sub-mitochondrialer Proteinverteilungen diene die Berechnung des Varianzwerts der Fluoreszenzintensität, wie sie bereits bei der Untersuchung neuromuskulärer Synapsen durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 3.1.2.8).

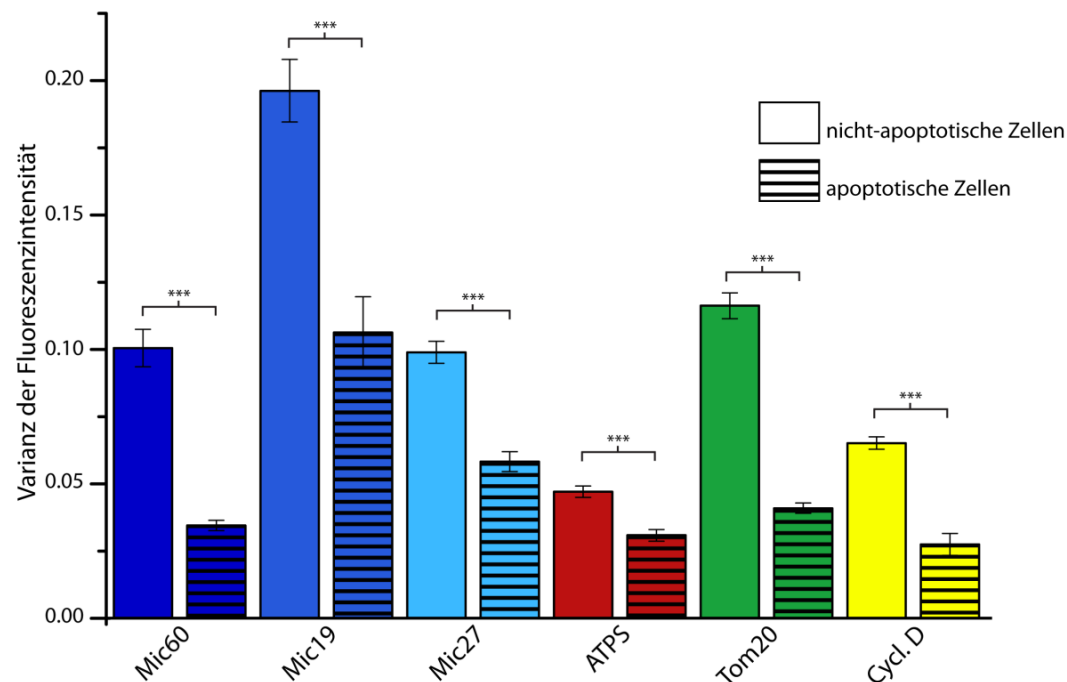


Abbildung 3.22: Varianz der Fluoreszenzintensität in nicht-apoptotischen und apoptotischen U2OS Wildtyp Zellen. Mitochondrien von DMSO beziehungsweise Actinomycin D mit z-vad-fmk behandelten U2OS Wildtyp Zellen wurden automatisch erkannt und die Varianz der Fluoreszenzintensität ermittelt. Dabei zeigt sich unter Kontrollbedingungen (durchgehende Balken) im Vergleich mit Mitochondrien apoptotischer Zellen (gestreifte Balken) ein signifikant höherer Varianzwert in allen Proteinen. Signifikanzen wurden durch den Zweistichproben-t-Test ermittelt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Betrachtet man lediglich die einzelnen Proteine unter Kontrollbedingungen (Abbildung 3.22, durchgehende Färbung) zeigen sich bereits innerhalb des MICOS Komplexes unterschiedlich hohe

Varianzwerte für die einzelnen Komponenten. Während Mic19 einen erkennbar höheren Wert aufweist, streuen die Werte von Mic60 und Mic27 um den gleichen Mittelwert. Auch die Varianz von Tom20 liegt deutlich höher als der Wert für die F₀F₁-ATPase beziehungsweise Cyclophilin D und spiegelt, vergleichbar mit den Komponenten des MICOS Komplexes, die Proteinverteilung der STED-Bilder wider. Die Proteincluster der ATP-Synthase sowie von Cyclophilin D waren bereits in unbehandelten Zellen deutlich weniger klar voneinander trennbar. Vergleicht man die unterschiedlichen Varianzwerte zwischen den jeweiligen Proteinen unter Kontrollbedingungen beziehungsweise nach Induktion der Apoptose lässt sich ein einheitliches Ergebnis formulieren: Bei allen untersuchten Proteinen zeigt sich ein signifikanter Abfall der Varianz im Vergleich von nicht-apoptotischen zu apoptotischen Zellen (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,001$). Auch die subtilen Veränderungen von Cyclophilin D beziehungsweise der F₀F₁-ATPase, können durch die Berechnung der Varianz der Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Da die Beurteilung der Proteinverteilung durch die starke Formveränderung der Mitochondrien beeinflusst werden könnte, sollten die Untersuchungen auf Drp1 Knockdown Zellen mit nicht-fragmentieren Mitochondrien ausgeweitet werden. Zudem konnten bislang nur Proteincluster nach Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien gezeigt werden. Ob sich eine Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung bereits vor der Freisetzung des pro-apoptotischen Faktors ergibt, kann aufgrund des verzögerten Verlaufs der Apoptose in Drp1 Knockdown Zellen untersucht werden.

3.2.3.3 Untersuchung der Proteinverteilung in U2OS Drp1 Knockdown Zellen

Eine Ausweitung der bisherigen Experimente auf Drp1 herunterregulierten Zellen ist in zweierlei Hinsicht von Vorteil. Zum einen kann durch die Unterbindung mitochondrialer Fragmentierung untersucht werden, ob es sich bei den beobachteten Veränderungen der Proteinverteilung um ein Artefakt aufgrund der abgerundeten Form der Mitochondrien handelt. Des Weiteren verzögert die Herunterregulierung von Drp1 die Freisetzung von Cytochrom *c* nach Aktivierung von Bax (Estaquier and Arnoult 2007).

Durch die verzögerte Freisetzung von Cytochrom *c*, kann die Untersuchung in Drp1 Knockdown Zellen auf dieses Protein ausgeweitet werden. Alle untersuchten Proteine wurden durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und mittels hochauflösender STED-Mikroskopie visualisiert (Abbildung 3.23).

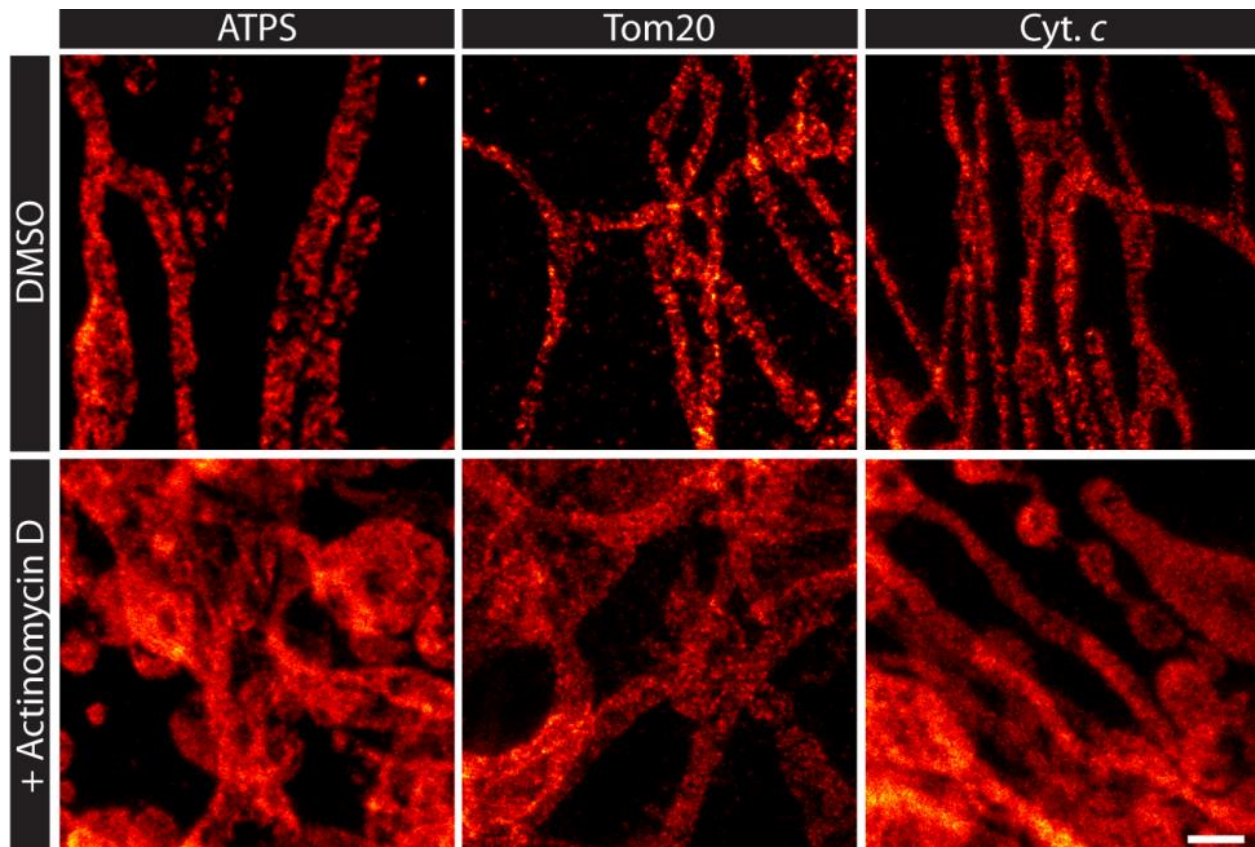


Abbildung 3.23: Proteinverteilung in Drp1 Knockdown Zellen vor und nach Induktion von Apoptose. U2OS Zellen wurde mit Antikörpern gegen verschiedene mitochondriale Proteine gefärbt und mittels STED-Mikroskopie aufgenommen. Die sub-mitochondriale Proteinverteilung von ATP-Synthase (ATPS), Tom20 und Cytochrom c (Cyt. c) zeigen in Drp1 Knockdown Zellen unter Kontrollbedingungen (DMSO) eine andere Verteilung als nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D. (Größenbalken: 1 μm)

Vergleichbar wie in Abschnitt 3.2.3.1 zeigen die untersuchten Proteine auch nach Inhibierung der mitochondrialen Fragmentierung durch Knockdown von Drp1 eine Tendenz zur homogeneren Verteilung nach Induktion von Apoptose. Distinkte Proteincluster können in apoptotischen Zellen nur bei Tom20 beobachtet werden (Abbildung 3.23). Der Vergleich zwischen unbehandelten und apoptotischen Zellen zeigt auch bei diesem Protein eine Tendenz zur gesteigerten homogenen Proteinverteilung nach Inkubation der Zellen mit Actinomycin D.

Aufgrund der potenziellen Sonderstellung des MICOS Komplexes bei der Freisetzung von Cytochrom c, sollte die Untersuchung auch in Drp1 Knockdown Zellen auf Mic60, Mic19 und Mic27 erweitert werden (Abbildung 3.24).

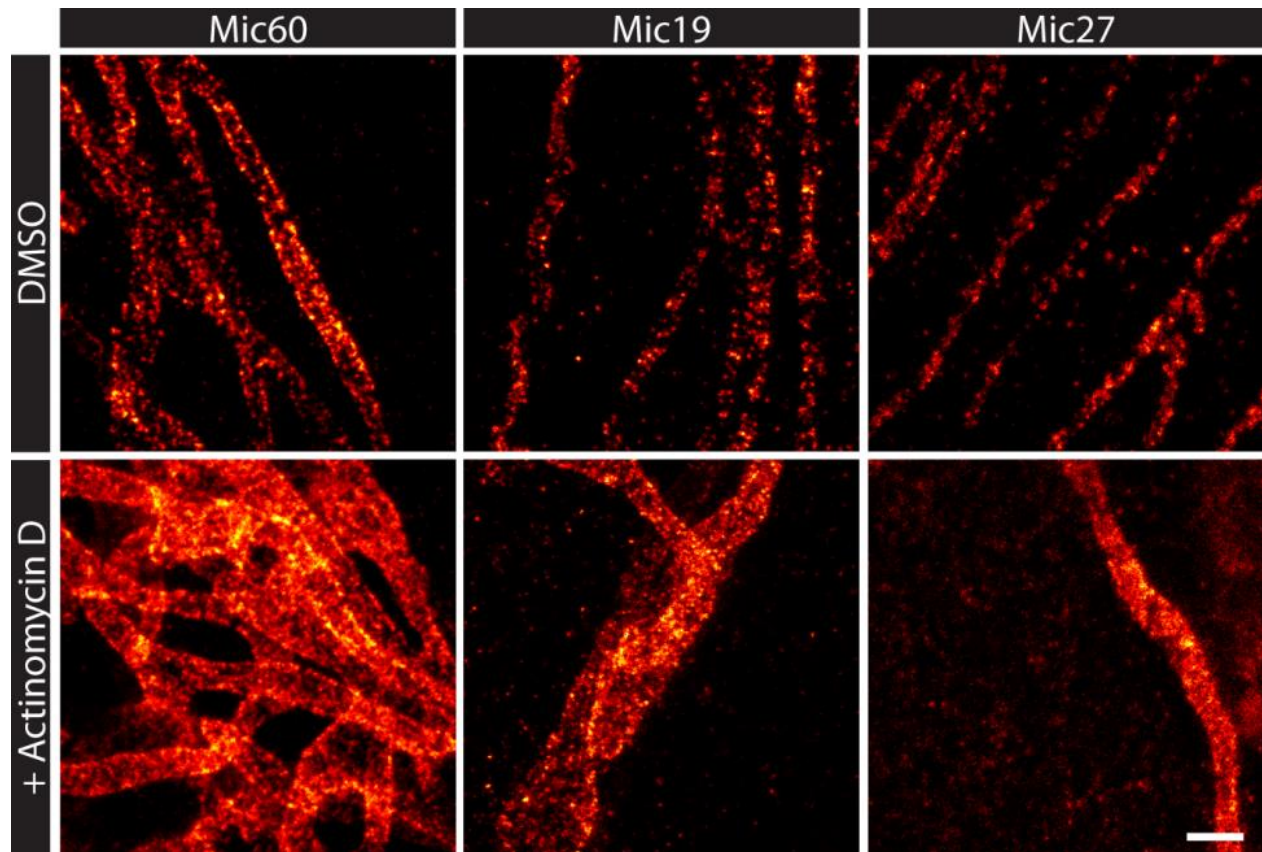


Abbildung 3.24: Proteinverteilung des MICOS Komplexes nicht-apoptotischer und apoptotischer Drp1 Knockdown Zellen. U2OS Drp1 Knockdown Zellen wurden mit Antiserum (Mic60) beziehungsweise mit spezifischen Antikörpern (Mic19; Mic27) dekoriert. Die Aufnahmen mittels STED-Mikroskopie zeigen in U2OS Drp1 Knockdown Zellen unter Kontrollbedingungen (DMSO) eine heterogenere Proteinverteilung als in Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D. (Größenbalken: 1 μm)

Alle untersuchten Komponenten des MICOS Komplexes zeigen unter Kontrollbedingungen sichtbare, klar abgegrenzte Proteincluster, die nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D nicht mehr beobachtet werden können (Abbildung 3.24). Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen aus Abschnitt 3.2.3.1 und macht deutlich, dass es sich bei den Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60, Mic19 und Mic27 nicht um Artefakte aufgrund der mitochondrialen Fragmentierung handelt.

Um eine Beurteilung subtiler Veränderungen anstellen zu können, wurde auch bei U2OS Drp1 Knockdown Zellen eine Berechnung der Varianz der Fluoreszenzintensität durchgeführt (Abbildung 3.24). Da trotz Herunterregulierung von Drp1 eine Fragmentierung der Mitochondrien während der Apoptose nicht vollständig verhindert werden kann, lassen sich auch hier abgerundete Organellen beobachten. Um einem etwaigen Einfluss der veränderten mitochondrialen Morphologie auf die Berechnung der Varianz entgegen zu wirken, wurden nur längliche Mitochondrien apoptotischer Zellen in die Analyse einbezogen.

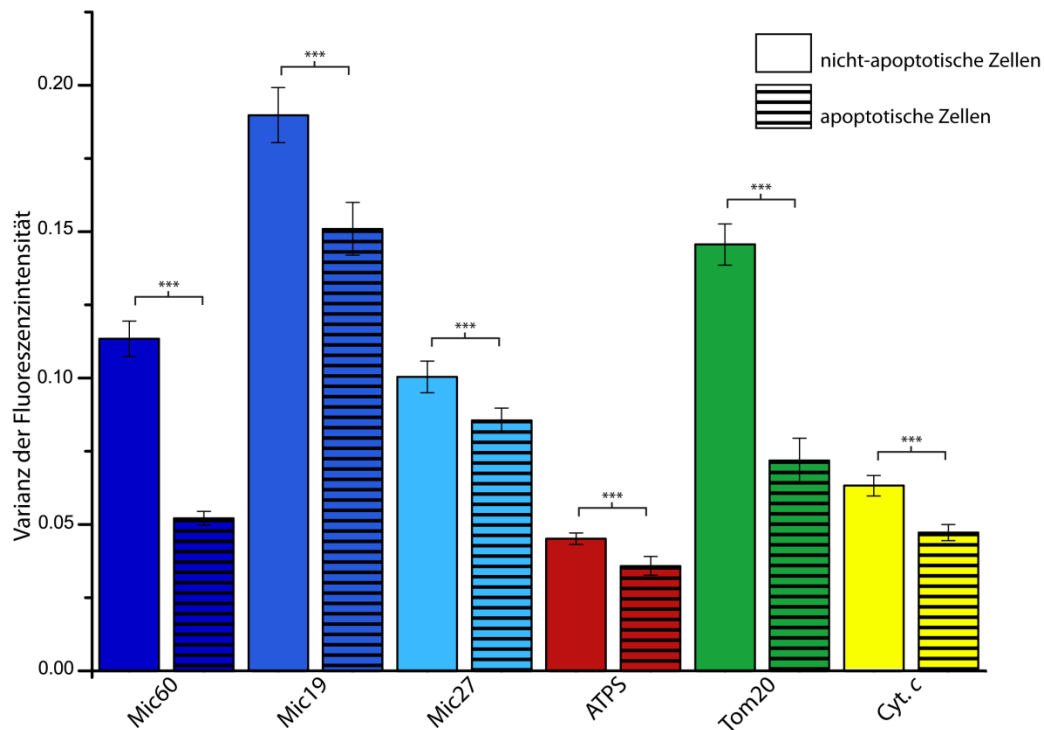


Abbildung 3.25: Varianz der Fluoreszenzintensität in nicht-apoptotischen und apoptotischen Drp1 Knockdown Zellen. Die Erkennung der Mitochondrien von Kontrollzellen (DMSO) beziehungsweise Actinomycin D behandelten U2OS Drp1 Knockdown Zellen wurde automatisch durchgeführt, um die Varianz der Fluoreszenzintensität zu ermitteln. Dabei zeigt sich unter Behandlung mit DMSO (Kontrollbedingungen, durchgehende Balken) im Vergleich mit Actinomycin D behandelten Zellen (Apoptose, gestreifte Balken) ein signifikant höherer Wert der Varianz. Signifikanzen wurden durch den Zweistichproben-t-Test ermittelt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Betrachtet man die unterschiedlichen Werte der Varianz in Kontrollzellen und mit Actinomycin D behandelten Zellen zeigt sich ein signifikanter Abfall der Varianz bei allen untersuchten Proteinen (Abbildung 3.25) (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,001$). Dies bestätigt die initiale Beobachtung der STED-Bilder und zeigt deutlich, dass eine Veränderung keinesfalls aufgrund der abgerundeten Form in Folge der Fragmentierung zustande kommt. Vielmehr kann von einer Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung ausgegangen werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass es in allen untersuchten Proteinen zu einer signifikanten Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung kommt. Ob diese massiven Umstrukturierungen bereits vor der Freisetzung von Cytochrom c stattfinden, sollte anhand zweier Proteine des MICOS Komplexes in Drp1 Knockdown Zellen untersucht werden.

3.2.3.4 Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung vor und nach Freisetzung von Cytochrom c

Um zu untersuchen ab welchem Zeitpunkt Veränderungen der Proteinverteilung stattfinden, wurden die Varianzwerte von Drp1 Knockdown Zellen vor und nach Freisetzung von Cytochrom c separat betrachtet. Durch die differenzierte Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung sollte geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt der Apoptose die Veränderung der Proteincluster stattfindet. Insbesondere die separate Untersuchung der Proteinverteilung von Komponenten des MICOS Komplexes eignet sich aufgrund der potenziellen Sonderstellung der Cristae junctions bei der Freisetzung von Cytochrom c. Für diese Untersuchung wurde die Berechnung der Varianz für die Proteine Mic60 und Mic27, stellvertretend für den MICOS Komplex, vor und nach Freisetzung von Cytochrom c durchgeführt (Abbildung 3.26).

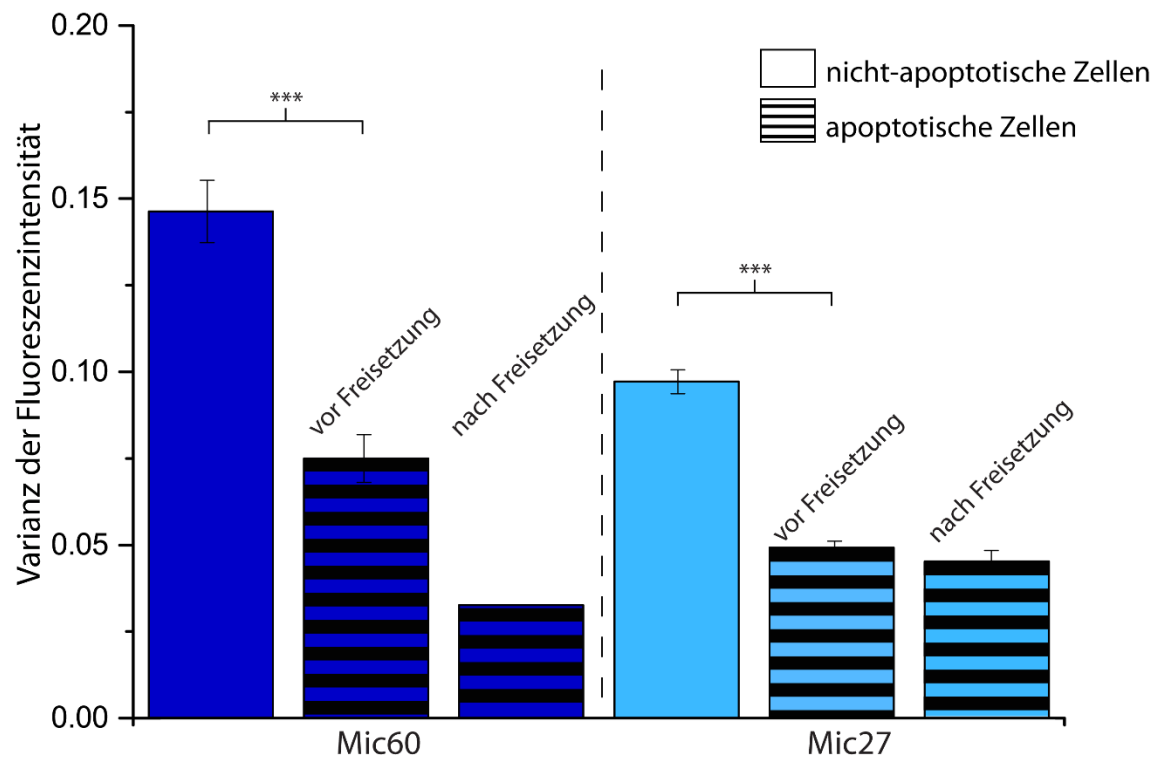


Abbildung 3.26: Varianz der Fluoreszenzintensität vor und nach Freisetzung von Cytochrom c in Drp1 Knockdown Zellen. Der signifikante Abfall der Varianzwerte in U2OS Drp1 Knockdown Zellen von Kontrollzellen (DMSO, durchgehende Balken) zu mit Actinomycin D behandelten Zellen (gestreifte Balken) zeigt sich sowohl vor als auch nach Freisetzung von Cytochrom c. Die Erkennung der Mitochondrien fand automatisch statt. Signifikanzen wurden durch den Zweistichproben-t-Test ermittelt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Der Vergleich der Varianz von Mic60 und Mic27 in apoptotischen Zellen vor beziehungsweise nach Freisetzung von Cytochrom c mit den Werten in unbehandelten Zellen, zeigt einen signifikanten Abfall nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D (Abbildung 3.26; gestreifte Balken) (Zweistichproben-t-

Test; $p \leq 0,001$). Da lediglich längliche Mitochondrien ausgewertet wurden, konnte bei Mic60, aufgrund des vergrößerten Zeitfensters im apoptotischen Verlauf, nur ein Wert für die Varianz der Fluoreszenzintensität nach Freisetzung von Cytochrom *c* ermittelt werden. Durch den signifikanten Abfall der Varianz sowohl vor als auch nach Freisetzung des pro-apoptotischen Faktors kann darauf geschlossen werden, dass Veränderungen der Proteinverteilung ein frühes Ereignis im apoptotischen Signalweg darstellen.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung des MICOS Komplexes vor der Freisetzung von Cytochrom *c* stattfinden. Die signifikanten Veränderungen der Proteinverteilung von MICOS deuten auf eine Umstrukturierung der mitochondrialen Innenarchitektur hin und stellen ein frühes Ereignis im Verlauf der Apoptose dar.

Um eine vollständige Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma der Zelle zu gewährleisten, bedarf es der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran durch die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie. Eine Untersuchung der Veränderung von Bax eignet sich demnach, um einen Einblick in diesen Prozess zu erlangen.

3.3 Oligomerisierung von Bax

Die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) stellt den Zeitpunkt im apoptotischen Verlauf dar, an dem das zelluläre Programm in der Regel irreversibel ist. Für eine vollständige Freisetzung von Cytochrom *c* ins Zytoplasma apoptotischer Zellen, muss die äußere mitochondriale Membran für diesen Botenstoff durchlässig werden. Diese Permeabilisierung wird durch die pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie, Bax und Bak, ausgelöst (Kuwana et al. 2002). Die stabile Integration aktivierter Bax-Oligomere in die äußere mitochondriale Membran findet vor Freisetzung von Cytochrom *c* statt und stellt das erste messbare Indiz für den intrinsischen Apoptoseweg dar.

Trotz einer Reihe von Studien konnte weder der Aufbau noch die molekulare Zusammensetzung der Bax-Poren bislang eindeutig geklärt werden. Es wird kontrovers diskutiert, ob die Permeabilisierung durch Bax beziehungsweise Bak allein stattfindet oder ob eine Interaktion verschiedener Proteine mit den Lipiden der äußeren mitochondrialen Membran für MOMP verantwortlich ist (Jourdain and Martinou 2009). Auch die Anzahl aktivierter Bax-Moleküle pro Pore konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Während Xu und Kollegen in artifiziellen Membranen zeigen konnten, dass bereits ein Bax-Monomer zur

Permeabilisierung der Lipidschicht führen kann, gehen andere Arbeitsgruppen von weit mehr Molekülen pro Pore aus (Xu et al. 2013, Zhou and Chang 2008, Saito et al. 2000). Des Weiteren konnte die ultrastrukturelle Anordnung aktivierter Bax-Moleküle bislang nicht detailliert verstanden werden (Zhou and Chang 2008, Neumann 2010). Viele dieser Studien sind auf beugungsbeschränkte Mikroskopieverfahren beziehungsweise auf eine indirekte Untersuchung von Bax beschränkt (Zhou and Chang 2008, Gillies et al. 2014). Da es sich hierbei allerdings um Strukturen nahe an der Auflösungsgrenze handelt, kann eine detaillierte Betrachtung nur unter hochauflösenden Bedingungen erfolgen. Hierfür wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine ausführliche Untersuchung von Bax nach Oligomerisierung durchgeführt, um der Frage nach einer Bildung potenziell übergeordneter Strukturen nachgehen zu können.

3.3.1.1 Untersuchung der Bax Komplexe während der Apoptose

Nach Induktion von Apoptose durch Actinomycin D wurde Bax in U2OS Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz angefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Die konfokalen Aufnahmen in Abbildung 3.27 zeigen bereits, dass sich Bax-Moleküle nach Aktivierung des apoptotischen Signalwegs zu unterschiedlich großen Strukturen zusammenlagern. Ob es sich hierbei um mehrere punktförmige Oligomere oder um eine weit komplexere Anordnung handelt, kann aufgrund der beugungsbegrenzten Auflösung nur spekuliert werden. Durch die detaillierte Untersuchung aktivierter Bax-Moleküle mittels STED-Mikroskopie erhärtet sich der Eindruck, dass die Zusammenlagerung der Oligomere nicht rein zufällig ist. Neben vereinzelt, punktförmigen Proteinclustern (Abbildung 3.27 A, Pfeil) lassen sich sichtlich komplexere Anordnungen aktivierter Bax-Moleküle beobachten.

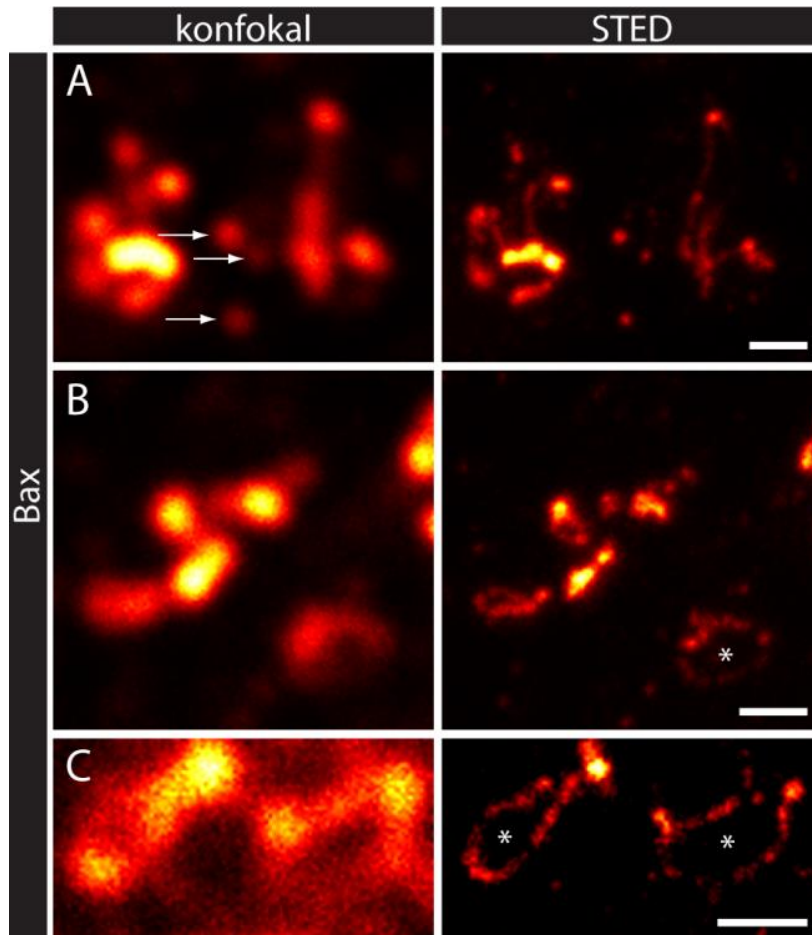


Abbildung 3.27: Bax Komplexe nach Induktion von Apoptose. U2OS Wildtyp Zellen wurden mit einem Antikörper gegen aktiviertes Bax dekoriert und mittels STED-Mikroskopie analysiert. Es zeigen sich komplexe Strukturen (A) aus mehreren Bax-Molekülen, die unter anderem geschlossene Ringe (B und C; Stern) verschiedener Durchmesser darstellen. (Größenbalken: 0,5 μm)

Hervorzuheben sind hierbei neben einigen länglichen Strukturen besonders die nahezu geschlossenen Ringe aus einzelnen Bax-Molekülen (Abbildung 3.27 B und C; Stern), die durch die schlechtere Auflösung im konfokalen Bild nicht als solche zu erkennen sind. Ob es sich bei diesen dreidimensionalen Komplexen, um geschlossene Kreise mit durchgängiger Öffnung handelt, kann anhand der Aufnahmen nur spekuliert werden und bedarf der genauen Betrachtung der Bax-Oligomere entlang der z-Ebene.

In früheren Arbeiten wurde anhand konfokaler Aufnahmen über die Anzahl aktivierter Bax-Moleküle pro Oligomer spekuliert (Zhou and Chang 2008). Der Vergleich einzelner punktförmiger Proteincluster zwischen konfokaler und hochauflösender Aufnahme zeigt allerdings bereits den unterschiedlichen Durchmesser der Oligomere aufgrund der beugungsbeschränkten Auflösung konventioneller bildgebender Verfahren (Abbildung 3.27) und deutet darauf hin, dass Angaben die auf konfokalen Aufnahmen beruhen, die Anzahl aktivierter Bax-Moleküle pro Komplex nicht widerspiegeln.

Um die Interpretation der beobachteten übergeordneten Strukturen zu erleichtern, wurden mehrere Ebenen der Bax-Oligomere aufgenommen. Abbildung 3.28 zeigt eine solche Aufnahme und demonstriert, dass auch scheinbar lineare Strukturen (Abbildung 3.27 A) Ringe repräsentieren können. Der Vergleich zwischen der Maximalprojektion von 30 Ebenen (Abbildung 3.28 B) und dem STED-Bild einer Fokusebene (Abbildung 3.28 A) gibt einen weiteren Anhaltspunkt, dass aufgrund der Dreidimensionalität der Bax-Oligomere eine Interpretation dieser komplexen Strukturen anhand einer Fokusebene nur begrenzt möglich ist.

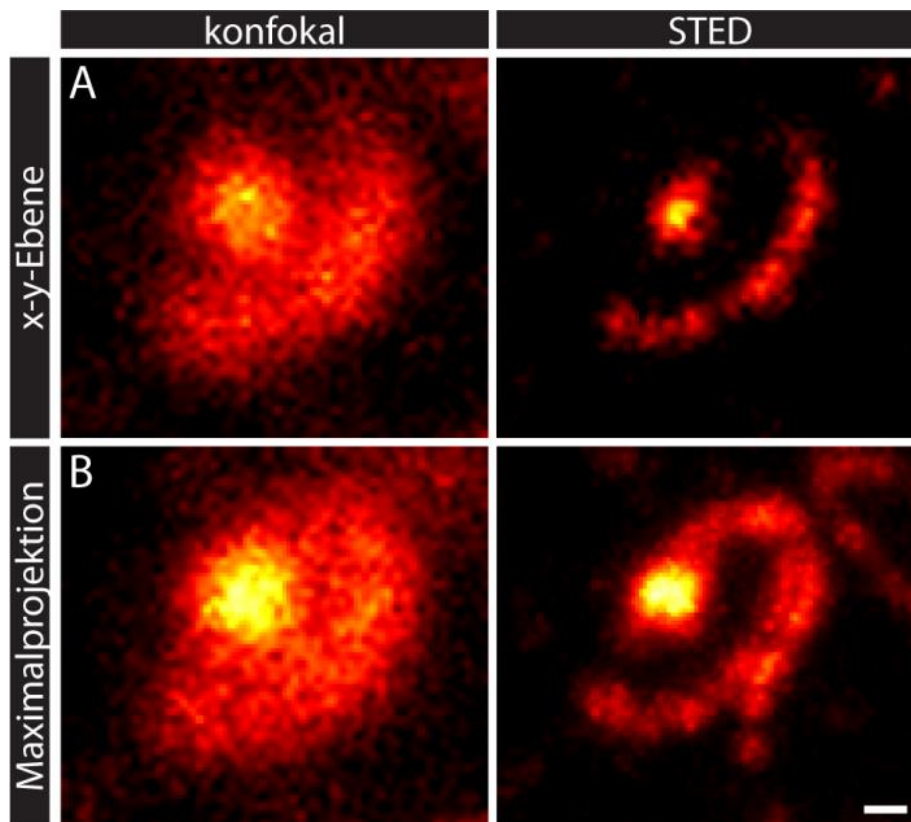


Abbildung 3.28: Maximalprojektion eines Bax-Oligomers über mehrere Ebenen. Nach Induktion von Apoptose durch Actinomycin D und z-vad-fmk wurden die Bax-Cluster der U2OS Wildtyp Zellen mit Immunfluoreszenz visualisiert. Dabei zeigt sich bei der Aufnahme einer Ebene (A) eine halbkeisförmige Struktur. Durch Maximalprojektion von 30 Ebenen (B; Pixelgröße(z): 50 nm) schließt sich die Linie (A) zu einem fast geschlossenen Bax-Ring. (Größenbalken: 0,1 μm)

Aufgrund dessen wurden die postulierten Bax-Ringe mittels kommerziellem 3D-STED der Firma Abberior Instruments mit anschließender 3D-Rekonstruktion detailliert untersucht. Durch die verbesserte Auflösung entlang der z-Ebene lassen sich die Ringe mit zentraler, durchgehender Öffnung sowohl für Bax (Abbildung 3.29 A) als auch für Bak (Abbildung 3.29 B) darstellen.

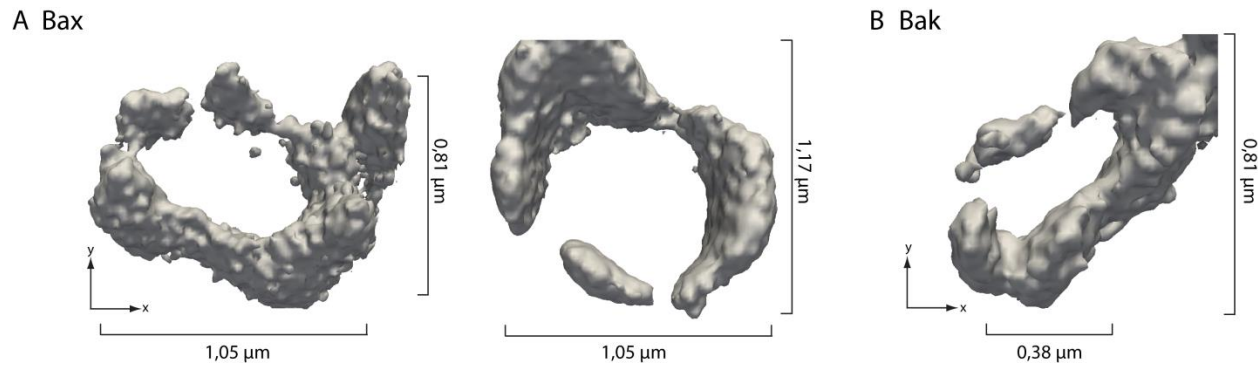


Abbildung 3.29: Rekonstruktion hochauflöser 3D-Aufnahmen für Bax und Bak. Nach Induktion von Apoptose wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen aktiviertes Bax (A) und Bak (B) in U2OS Wildtyp Zellen durchgeführt. Die Aufnahmen mit anschließender 3D Rekonstruktion zeigen für beide Proteine Ringe mit durchgehender Öffnung.

Als weitere Beobachtung lässt sich sowohl anhand der Abbildung 3.27 als auch durch Abbildung 3.28 feststellen, dass sich große, sehr helle Proteincuster oftmals in nächster Nähe zu den komplexeren Anordnungen der Bax-Moleküle zeigen. In wieweit es sich hierbei um einen Ausgangspunkt der Bax-Ringe handelt, kann in fixierten Zellen nicht adressiert werden und bedarf einer detaillierten Betrachtung apoptotischer Zellen *in vivo*. Die Helligkeit der punktförmigen Bax-Cluster gibt allerdings einen Hinweis darauf, warum die deutlich filigraneren Strukturen in der Literatur bislang nicht beschrieben wurden. Insbesondere in konfokalen Aufnahmen werden fluoreszenzschwächere Formen der Bax-Oligomere überstrahlt.

3.3.1.2 Bax-Ringe auf fragmentierten Mitochondrien

Um die beobachteten Bax-Ringe in einem Kontext mit apoptotischen Mitochondrien zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen dieses Protein zusammen mit Cytochrom *c* auf U2OS Drp1 Knockdown Zellen durchgeführt und diese mittels STED-Mikroskopie visualisiert. Die Färbung von Cytochrom *c* diente in diesem Zusammenhang zur Darstellung der Mitochondrien, um die Lokalisierung der Bax-Moleküle besser verstehen zu können (Abbildung 3.30).

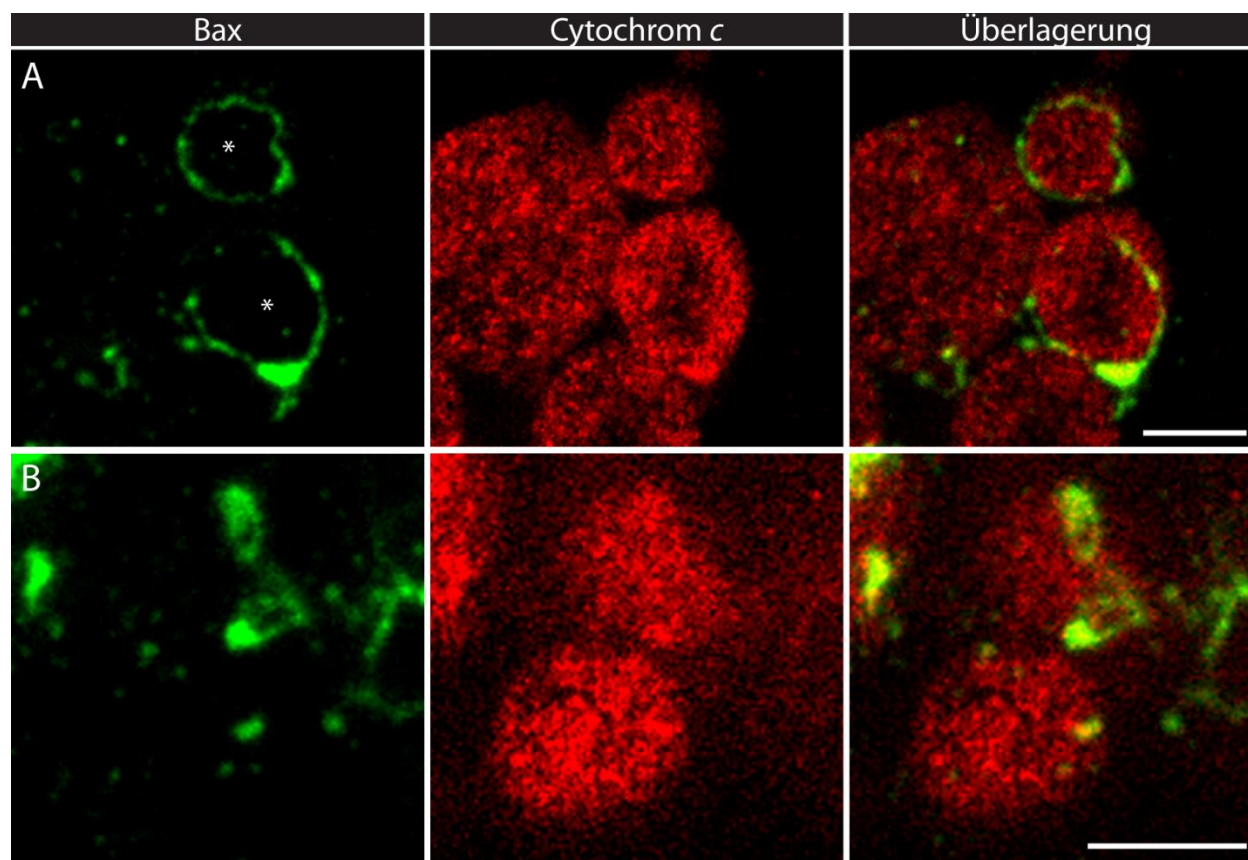


Abbildung 3.30: Bax-Ringe auf fragmentierten Mitochondrien nach Induktion von Apoptose. U2OS Drp1 Knockdown Zellen wurden nach Induktion von Apoptose mit Antikörpern gegen Cytochrom *c* und aktiviertes Bax dekoriert und durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. STED-mikroskopische Aufnahmen apoptotischer Zellen zeigen, dass die Bax-Ringe in direkter Nähe zu fragmentierten Mitochondrien lokalisieren. (Größenbalken 1 μm)

Dargestellt sind ausschließlich fragmentierte Mitochondrien, da sich lediglich zu diesem Zeitpunkt der Apoptose die komplexe Form von Bax als ringförmige Strukturen beobachten ließ. Eine Überlagerung mit dem Fluoreszenzsignal der Cytochrom *c* -Färbung zeigt, dass die Ringe in unmittelbarer Nähe fragmentierter Mitochondrien auftreten und erweckt an einigen Stellen den Eindruck, dass der Durchmesser der Bax-Oligomere dem Umfang der abgerundeten Organellen angepasst ist (Abbildung 3.30; Stern). Des Weiteren lassen sich auch erkennbar kleinere Bax-Ringe darstellen, wodurch die Variabilität der Oligomere deutlich wird (Anhang 5.7).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es während der Apoptose zu massiven Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung kommt. Diese Veränderung konnte für alle untersuchten Proteine gezeigt werden und deutet auf ein bedeutendes Ereignis im Verlauf des programmierten Zelltods hin. Die Untersuchung des MICOS Komplexes zeigte zudem, dass eine erhöhte homogene Proteinverteilung bereits vor der Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem Intermembranraum der

Mitochondrien beobachtet werden kann. Da eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran für die Freisetzung von Cytochrom *c* entscheidend ist, wurden auch Prozesse die zu MOMP führen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich Bax-Moleküle nach ihrer Aktivierung zu ringförmigen Strukturen oligomerisieren, die in unmittelbarer Nähe von fragmentierten Mitochondrien auftreten. Diese neuen Erkenntnisse geben einen Einblick auf Veränderungen der Mitochondrien im Allgemeinen sowie der sub-mitochondrialen Proteinverteilung im Speziellen und tragen dazu bei, die zentrale Rolle dieser Organellen während der Apoptose besser zu verstehen.

4 Diskussion

4.1 Veränderungen der neuromuskulären Synapse nach erhöhter physischer Aktivität

Die neuromuskuläre Synapse stellt die Verbindung zwischen dem Motoneuron auf der einen Seite und dem Skelettmuskel auf der anderen Seite dar. Sobald ein Aktionspotenzial die motorische Endplatte erreicht, werden spannungsgesteuerte Kalziumkanäle geöffnet und Ca^{2+} -Ionen gelangen in die Nervenenden. Durch den Anstieg der intrazellulären Konzentration dieses Ions kommt es zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran, zur Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt und anschließend zur Bindung der Transmitter an die Rezeptoren der Muskelzellen. Der Zyklus aus Freisetzung und Recycling der Vesikel ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozess. Während bei milder Stimulation die Energieversorgung hauptsächlich über die Glykolyse stattfindet, gewinnt ATP aus den Mitochondrien bei erhöhter physischer Aktivität des innervierten Muskels zunehmend an Bedeutung (Verstreken et al. 2005). Um einen Einblick in etwaige Anpassungen der Mitochondrien als Antwort auf einen gesteigerten Energiebedarf zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Untersuchung neuromuskulärer Synapsen vor und nach physischer Reizung der Muskulatur durchgeführt.

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass das Verhältnis von äußerer mitochondrialer Membran zur Membran der Cristae als Kapazität für die Regenerierung von ATP interpretiert werden kann (Perkins et al. 2003). Strukturgebend für die Einstülpungen der inneren mitochondrialen Membran ist die Ausbildung der Cristae junctions durch den Multiproteinkomplex MICOS. Eine der Kernkomponenten und damit essentiell für die Aufrechterhaltung dieser Engstellen ist Mic60. Der Vergleich der sub-mitochondrialen Proteinverteilung dieses Proteins vor und nach erhöhter physischer Aktivität eignet sich daher, um etwaige strukturelle Anpassungen der Mitochondrien an einen veränderten Energiebedarf zu verstehen.

Neben der Analyse der Proteinverteilung von Mic60 mittels hochauflösender Mikroskopie, wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, inwieweit eine Steigerung des Energiebedarfs in Veränderungen der Gesamtfläche motorischer Endplatten und der Konzentration von Mitochondrien innerhalb der Synapsen resultiert. Die Betrachtung der Nervenenden als Ganzes ist wichtig, um einen Überblick über potenzielle Umstrukturierungen motorischer Endplatten zu erlangen und diente im Rahmen dieser Arbeit dazu, die

Ergebnisse sub-mitochondrialer Proteinverteilung in einen Kontext mit Veränderungen der gesamten Struktur setzen zu können.

4.1.1 Morphologie der neuromuskulären Synapse

Um eine potenzielle Veränderung der Morphologie motorischer Endplatten visualisieren zu können, wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit eine Färbung der Acetylcholin-Rezeptoren der post-synaptischen Membran mittels Alexa Fluor 555-gekoppeltem α -Bungarotoxin durchgeführt. Die Verwendung des Zellgiftes ist aus zwei Gründen für eine Darstellung der motorischen Endplatte in Muskelpräparaten geeignet. Zum einen zeigt α -Bungarotoxin eine hohe Spezifität zu seinem Zielprotein, was sich anhand des geringen Fluoreszenzhintergrundes und der detaillierten Darstellung der Motoneuronen zeigen lässt (Abbildung 3.1), zum anderen konnte in früheren Arbeiten für die Verteilung der Acetylcholin-Rezeptoren gezeigt werden, dass sie sich nicht über die gesamte Oberfläche der Einstülpungen post-synaptischer Membranen verteilen, sondern konzentriert an Stellen lokalisiert sind, an denen die prä- und postsynaptische Membran in engem Kontakt stehen (Fertuck and Salpeter 1974). Die indirekte Darstellung der präsynaptischen Membran durch eine Färbung der Acetylcholin-Rezeptoren ist somit durch den engen Kontakt beider Membranen an den potenziellen Bindungsstellen des Toxins eine valide Methode zur Untersuchung motorischer Endplatten.

Der Vergleich der Zeichnungen, die in den späten 80iger Jahre mit Hilfe einer *Camera lucida* (einer Vorrichtung am Mikroskop durch die Strukturen nachgezeichnet werden konnten) (Abbildung 4.1 A) (Andonian and Fahim 1988) erstellt wurden, mit den generierten Masken dieser Arbeit (Abbildung 4.1 B) bestätigt, dass eine Färbung der post-synaptischen Membran mittels α -Bungarotoxin zur Analyse neuromuskulärer Synapsen geeignet ist.

Sowohl die motorischen Endplatten in Ratten (Abbildung 4.1 A) als auch die Synapsen von Mäusen (Abbildung 4.1 B) zeigen die charakteristische Morphologie der Motoneuronen mit ausgeprägten Verästelungen.

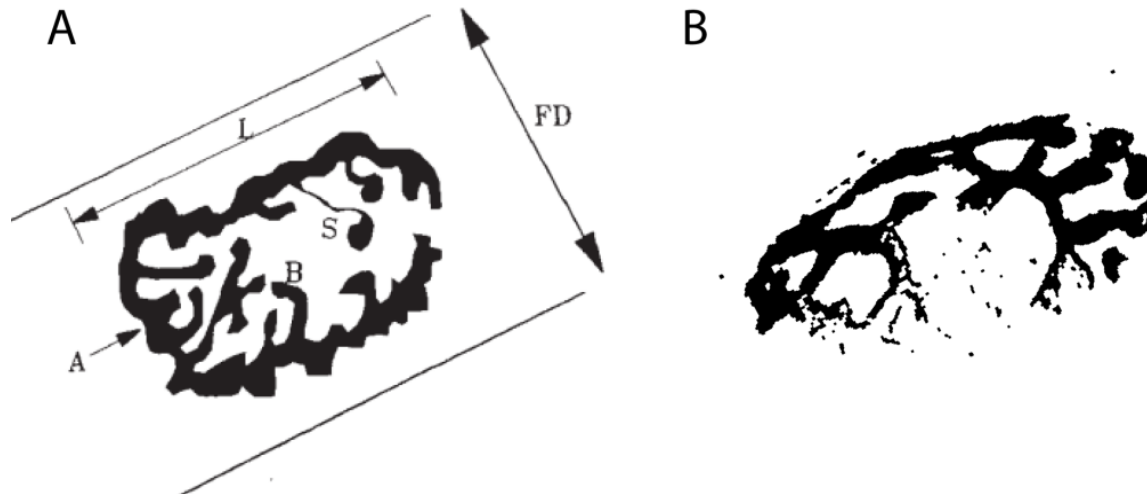


Abbildung 4.1: Morphologie neuromuskulärer Synapsen. Der Vergleich der motorischen Endplatte von Ratten, erstellt mit einer *Camera lucida* (A), zeigt eine ähnliche Morphologie wie die Synapsen in Mäusen, visualisiert durch fluorophor-gekoppeltes α -Bungarotoxin (B). (A aus (Andonian and Fahim 1988))

Um einer Veränderung motorischer Endplatten vor und nach erhöhter physischer Aktivität des Muskels nachgehen zu können, wurden aus den aufgenommenen Synapsen binäre Masken generiert und deren Fläche berechnet. Der Vergleich der Endplatten im Tibialis anterior von trainierten mit denen von bewegungsarmen Tieren zeigte keine Änderung in Folge einer erhöhten physischen Aktivität (Abbildung 3.4). Dementgegen konnte im Soleus eine signifikante Vergrößerung der Flächen neuromuskulärer Synapsen von 18% ermittelt werden (Abbildung 3.3) (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,05$). Dies steht im Einklang mit der Veröffentlichung von Waerhaug und Kollegen, die ebenfalls eine Vergrößerung der Fläche im Soleus zeigen konnten. Aufgrund der hohen Stichprobenanzahl von 150 (trainierte Tiere) beziehungsweise 182 (Kontrollgruppe), konnte in dieser Publikation bereits bei einer Vergrößerung um 8,2% von einer signifikanten Veränderung ausgegangen werden. Waerhaug und Kollegen demonstrierten zudem marginale Unterschiede von 2,3% in den Endplatten von *M. extensor digitorum longus*, einem schnell reagierenden Muskel (Waerhaug et al. 1992). Die Veränderung neuromuskulärer Synapsen von trainierten Ratten konnte ebenfalls von Andonian und Kollegen gezeigt werden. Die Vergrößerung der Fläche motorischer Endplatten war im Soleus (Unterschied zwischen trainierten und bewegungsarmen Mäusen: 21%) allerdings weniger stark ausgeprägt als in *M. extensor digitorum longus* (Unterschied: 31,8%) (Andonian and Fahim 1988). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des Tibialis anterior in der vorliegenden Arbeit und den Beobachtungen schnell reagierender Muskelgruppen früherer Studien (Waerhaug et al. 1992, Andonian and Fahim 1988) könnte einerseits eine Folge der verschiedenen Trainingsreize darstellen, zum anderen auf die unterschiedliche Auswertung der Endplatten zurückzuführen sein.

Während in der vorliegenden Arbeit die Flächen aller generierten Masken ausgewertet wurden (Tabelle 3.1 A), fand in früheren Veröffentlichungen eine Vorauswahl der Endplatten statt, die sich vermeintlich in der richtigen Lage zur Fokusebene des Mikroskops befanden (Andonian and Fahim 1988, Waerhaug et al. 1992). Aufgrund der komplexen Morphologie motorischer Endplatten ist eine Beurteilung der Lage im Muskelpräparat nicht eindeutig möglich. Des Weiteren vermindert eine stringente Selektion die Stichprobenanzahl erheblich. Dementgegen kann durch die Auswertung ohne Selektion in vielen Fällen nicht die Gesamtfläche der Endplatten beurteilt werden. Um eine verlässliche Beurteilung der Flächen zu gewährleisten, stellt die Kombination der Ergebnisse mit und ohne Vorauswahl die geeignetste Methode dar. Der Vergleich beider Auswertungen zeigt jeweils eine Vergrößerung der Flächen neuromuskulärer Synapsen im Soleus nach Training (Unterschied ohne Selektion: 18%; Unterschied mit vorhergehender Selektion: 19%). Dementgegen weist der Tibialis anterior ohne Auswahl der Endplatten mit richtiger Lage zur Fokusebene keine Veränderung auf (Unterschied: 1,7%), mit vorheriger Selektion jedoch eine Tendenz zur Vergrößerung (Unterschied: 14%). Es kann vermutet werden, dass eine leichte Veränderung der Synapsen nach Training stattfindet. Die Ergebnisse sind für den Tibialis anterior jedoch nicht eindeutig.

Eine Gemeinsamkeit der Trainingsprotokolle früherer Veröffentlichungen ist die graduelle Erhöhung des physischen Reizes der trainierten Tiere, durch Steigerung der Laufgeschwindigkeiten beziehungsweise der erhöhten Neigung des Laufbands (Andonian and Fahim 1988, Waerhaug et al. 1992, Deschenes et al. 1993). Dies steht im Gegensatz zu der Vorgehensweise innerhalb dieser Arbeit. Die trainierten Mäuse hatten während der 12wöchigen Trainingsphase freien Zugang zu einem individuellen Laufrad. Eine Steigerung des Trainingsreizes fand innerhalb des freiwilligen Lauftrainings nicht statt. Da die Ergebnisse für den Tibialis anterior keine signifikante Vergrößerung der motorischen Endplatte ergaben, kann dies darauf hindeuten, dass eine Steigerung der physischen Belastung während des Trainings für eine Vergrößerung der motorischen Endplatte dieses Muskels notwendig ist.

Bei dem Soleus handelt es sich um einen Muskel bestehend aus langsam reagierenden Myosinisoformen. Während der Gehbewegung ist dieser Muskel für die Plantarflexion zuständig (Kirtley 2006), das heißt die Vergrößerung des Winkels zwischen Fußrücken und Tibia, und wird beim Lauftraining in Ratten beansprucht (Deschenes et al. 1993, Gillespie et al. 1982). Da eine Vergrößerung der Fläche neuromuskulärer Synapsen in dieser Muskelgruppe gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass diese Anpassung wichtig ist, um die schnelle Reaktion der Muskelfasern des Soleus auf die Laufbewegung zu ermöglichen.

Ob Anpassungen in Bezug auf die Mitochondrien bereits bei moderatem Training beobachtet werden können, sollte durch eine Untersuchung der Konzentration von Mitochondrien in der motorischen Endplatte sowie der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 getestet werden.

4.1.2 Konzentration von Mitochondrien in der neuromuskulären Synapse

Da die Diffusion von ATP aus dem Soma der Neuronen in die Nervenenden für eine effektive Versorgung mit dem universellen Energieträger zu langsam wäre, findet der aktive Transport von Mitochondrien zu Stellen mit einem hohem Energiebedarf entlang des Zytoskeletts statt (Kuiper et al. 2008). Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Energieversorgung der motorischen Endplatten bei milder Stimulation auch ohne die Anwesenheit von Mitochondrien gewährleistet werden kann (Verstreken et al. 2005). Diese Situation ändert sich unter hoher physischer Belastung. Ohne die Regenerierung von ATP durch die Mitochondrien ist eine Rekrutierung der Reserve-Vesikel an die präsynaptische Membran nicht möglich (Verstreken et al. 2005). Des Weiteren nehmen Mitochondrien durch ihre Kapazität zur Pufferung von Kalziumionen Einfluss auf die Reizweiterleitung von Neuronen zum innervierten Muskel (Vos et al. 2010). Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle im Stoffwechsel neuromuskulärer Synapsen wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die Menge an Mitochondrien pro Endplatte nach erhöhter physischer Belastung im Soleus beziehungsweise Tibialis anterior verändert.

Die automatisch generierten Mitochondrienmasken wurden mit den binären Masken der motorischen Endplatte (erstellt durch die Färbung mit α -Bungarotoxin) ins Verhältnis gesetzt, sodass der Anteil der Mitochondrien pro Synapse errechnet werden konnte. Die mitochondrialen Masken entstammen der Auswertung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60. Für die Berechnung der Varianz der Fluoreszenzintensität wurden die Masken am Übergang des Mitochondriums zum Zytoplasma um wenige Pixel verkleinert, damit etwaige Randeffekte der Varianzberechnung verhindert werden konnten. Daher spiegeln die mitochondrialen Masken nicht die komplette Fläche der Mitochondrien wider. Bei den berechneten Werten handelt es sich nicht um den absoluten Anteil der Mitochondrien pro Synapse. Es kann lediglich der Unterschied zwischen trainierten und bewegungsarmen Tieren beurteilt werden. Für die motorischen Endplatten des Soleus lässt sich kein Unterschied der anteiligen Fläche von Mitochondrien pro Synapse zwischen Kontrolltieren und Läufern beobachten (Abbildung 3.5 A). Dem entgegen zeigt sich im Tibialis anterior ein Anstieg von 11%. Der Anteil der mitochondrialen Fläche zur Gesamtfläche vergrößert sich dementsprechend signifikant (Abbildung 3.5 B) (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,05$).

Diese Ergebnisse müssen im Kontext der Gesamtfläche neuromuskulärer Synapsen betrachtet werden. Da sich die Fläche motorischer Endplatten im Soleus vergrößert, könnte die gleichbleibende Menge an Mitochondrien pro Synapse zwischen trainierten und bewegungsarmen Tieren bedeuten, dass während der Trainingsphase mehr Mitochondrien in die Endplatten der Läufergruppe rekrutiert werden. Dementgegen kann im Tibialis anterior ein Anstieg der Menge an Mitochondrien pro Synapse beobachtet werden. Da nur eine Tendenz zur Vergrößerung motorischer Endplatten nach Training zu beobachten ist, deutet dies ebenfalls auf eine vermehrte Rekrutierung der Mitochondrien in die Synapsen hin. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die synaptische Aktivität positiv mit der Konzentration der Mitochondrien an den Nervenenden korreliert (Perkins et al. 2010).

Ob es ebenfalls zu einer Anpassung der sub-mitochondrialen Proteinverteilungen aufgrund des veränderten Energiebedarfs kommt, wurde mittels hochauflösender Mikroskopie getestet.

4.1.3 Sub-mitochondriale Proteinverteilung von Mic60

Um einer Veränderung der Proteinverteilung innerhalb der Mitochondrien nachzugehen, wurde Mic60 mittels STED-Mikroskopie im Soleus und Tibialis anterior von trainierten und bewegungsarmen Tieren visualisiert. Aufgrund der heterogenen Proteinverteilung dieser Komponenten von MICOS (Abbildung 3.9), wurde die Varianz der Fluoreszenzintensität für alle Präparate berechnet. Dieser Wert eignet sich für die Beurteilung der Proteincluster von Mic60 aus zwei Gründen. Zum einen können subtile Unterschiede in der Verteilung mitochondrialer Proteine detektiert werden, zum anderen stellt die Varianz der Fluoreszenzintensität ein objektives Maß zur Beurteilung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung dar. Die Varianz der Fluoreszenzintensität ergab keine signifikante Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 im Tibialis anterior vor beziehungsweise nach erhöhter physischer Aktivität (Unterschied zwischen trainierten und bewegungsarmen Tieren: 0,7%) (Abbildung 3.11). Dementgegen konnte im Soleus für diese MICOS Komponente ein signifikanter Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität von trainierten Tieren zur Kontrollgruppe (Unterschied: 17,1%) gezeigt werden (Abbildung 3.10) (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,05$).

Die sub-mitochondriale Proteinverteilung von Mic60 wies eine hohe Heterogenität in den untersuchten Muskelpräparaten auf. Dies könnte sich zum einen aus der Zusammensetzung der Mausgruppen ergeben haben. Sowohl den Kontrolltieren als auch der Läufergruppe waren weibliche (Kontrollgruppe: 4; Läufer:

5) und männliche Tiere (Kontrollgruppe: 8; Läufer: 8) zugeordnet. Des Weiteren konnten Perkins und Kollegen anhand elektronentomographischer Studien zeigen, dass die Dichte der Cristae junctions von Mitochondrien aus unterschiedlichen Geweben je nach Energiebedarf der Zellen variiert (Perkins et al. 2010). Diese Unterschiede lassen sich auch innerhalb einer Zelle beobachten. Die detaillierte Untersuchung der Held'schen Calyx, einer großen Synapse des zentralen Nervensystems, zeigte, dass die Dichte der Cristae junctions von Mitochondrien in der Nähe der präsynaptischen Membran höher liegt als von weiter entfernten Organellen (Perkins et al. 2010). Die hohe Heterogenität der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 könnte sich dementsprechend auch in den Motoneuronen aufgrund der Position der Mitochondrien innerhalb der Synapse ergeben.

Die Varianz der Fluoreszenzintensität im Tibialis anterior zeigte keine Veränderung aufgrund der erhöhten physischen Aktivität. Perkins und Kollegen postulierten, dass das Verhältnis von äußerer mitochondrialer Membran zu der Membran der Cristae als Kapazität der Mitochondrien für die Regenerierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat interpretiert werden kann (Perkins et al. 2003). Da elektronenmikroskopische Studien zeigen konnten, dass es sich bei den Mitochondrien des Nervensystems um Cristae-reiche Organellen handelt (Perkins et al. 2010), liegt die Vermutung nahe, dass die Mitochondrien in den Endplatten des Tibialis anterior bereits auf einen hohen Energiebedarf angepasst sind.

Der signifikante Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität für Mic60 von trainierten zu bewegungsarmen Mäusen im Soleus (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,05$) ist Ausdruck für eine homogenere Proteinverteilung der MICOS Komponenten in Kontrolltieren. Frühere Studien demonstrierten sowohl in kultivierten Zellen als auch in der Held'schen Calyx, dass Cristae junctions in Mitochondrien nicht gleichmäßig verteilt angeordnet sind (Perkins et al. 2010, Jans et al. 2013). Während in Zellkultur gezeigt werden konnte, dass Mic60 eine starke Tendenz zur Ausrichtung parallel zur Zelloberfläche hat (Jans et al. 2013), lässt sich diese Ausrichtung der Cristae junctions in den motorischen Endplatten nicht demonstrieren. Die Ausrichtung der Mitochondrien zur Fokusebene des Mikroskops könnte Einfluss auf die Anzahl visualisierter Cristae junctions haben. Eine Veränderung der Varianz der Fluoreszenzintensität von Mic60 lässt aufgrund der Dreidimensionalität der Muskelpräparate nur bedingt Aussagen über die Cristae als solche zu. Sowohl eine Umstrukturierung der mitochondrialen Innenarchitektur als auch eine Veränderung der Orientierung der Mitochondrien könnte einen Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität im Soleus zur Folge haben.

Um Anpassungen des MICOS Komplexes auf einen veränderten Energiebedarf verstehen zu können, müssen auch andere Parameter als die sub-mitochondriale Proteinverteilung von Mic60 berücksichtigt werden. Eine Veränderung der zellulären Situation resultiert oftmals in einer Anpassung der Interaktionen von Proteinen. Um zu untersuchen, ob ein erhöhter Energiebedarf eine Veränderung der Interaktionen von MICOS mit weiteren mitochondrialen Proteinen zur Folge hat, eignet sich eine detaillierte Betrachtung von Mic60. In Hefen konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Protein mit Komponenten des TOM Komplexes interagiert, um den Import mitochondrialer Proteine zu gewährleisten (von der Malsburg et al. 2011). Die Interaktion von Mic60 mit Komponenten von MICOS beziehungsweise von TOM, lässt sich in Hefe bestimmten Proteindomänen zuordnen (Zerbes et al. 2012). Eine Untersuchung von Mic60 im Zusammenhang mit Komponenten des TOM Komplexes könnte zeigen, ob ein erhöhter Energiebedarf in einer vermehrten Interaktion von Mic60 mit der Translokase resultiert. Da ein erhöhter Energiebedarf in trainierten Ratten eine schnellere Assemblierung des TOM Komplexes zur Folge hat (Joseph and Hood 2012) kann darauf geschlossen werden, dass ein vermehrten Import mitochondrialer Proteine unter gesteigerter physischer Aktivität stattfindet. Eine Untersuchung der Komponenten des TOM Komplexes per se beziehungsweise in Kombination mit Mic60 würde sich daher eignen, um Veränderungen mitochondrialer Proteine als solches sowie etwaiger Anpassungen des MICOS Komplexes im Speziellen zu adressieren.

4.1.3.1 TOM Komplex in Motoneuronen der Maus

Frühere Studien in Ratten demonstrierten, dass eine Stimulierung der Skelettmuskulatur positiv mit der Expression mitochondrialer Proteine und deren Import korreliert. Muskuläre Mitochondrien zeigten nach physischer Reizung neben einer erhöhten Konzentration importierter Proteine eine gesteigerte Expression von Komponenten, die für den Importprozess benötigt werden (Takahashi et al. 1998). Die Assemblierung des TOM Komplexes verläuft über zwei Intermediate unterschiedlicher Größe (Model et al. 2001). Durch Untersuchungen in isolierten Mitochondrien aus stimulierten Ratten konnte gezeigt werden, dass die Integrierung von Tom40, einer Komponenten des TOM Komplexes, in diese Intermediate nach Stimulierung der Muskulatur schneller verläuft als unter Kontrollbedingungen (Joseph and Hood 2012).

Während sich eine Vielzahl an Studien mit unterschiedlichen Expressions- und Importniveaus mitochondrialer Proteine innerhalb des Muskelgewebes vor und nach erhöhter physischer Aktivität beschäftigen, ist wenig über die Situation in neuromuskulären Synapsen bekannt. Eine Untersuchung des

TOM Komplexes, eignet sich aus zwei Gründen. Zum einen könnte der Frage nachgegangen werden, ob eine vermehrte Expression von Importproteinen auch in der motorischen Endplatte beobachtet werden kann, zum anderen könnte dadurch untersucht werden, ob sich eine Anpassung des MICOS Komplexes in einer veränderten Interaktion von Mic60 äußert.

Um diese Fragestellungen in Zukunft adressieren zu können, wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit erste Voruntersuchungen durchgeführt. Die Visualisierung von Tom20, einer Komponenten des TOM Komplexes, die als Importrezeptor dient, zeigt distinkte Proteincluster, wie sie bereits für Mic60 beobachtet werden konnten (Abbildung 3.7 und Abbildung 4.2). Die Färbung gegen die Acetylcholintransferase (dargestellt ist der Umriss des Motoneurons anhand der Färbung) diente zur Identifizierung der Motoneuronen innerhalb des Rückenmarks.

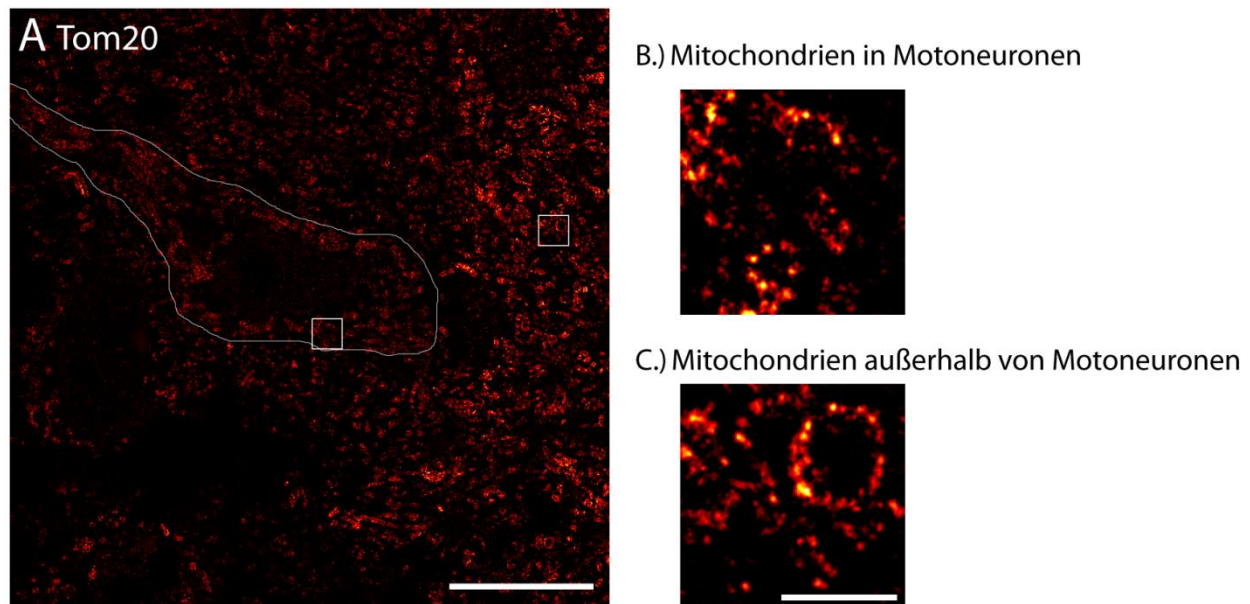


Abbildung 4.2: Tom20 in Motoneuronen des murinen Rückenmarks. Durch indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Tom20, lässt sich die Proteinverteilung dieser Komponenten des TOM Komplexes hochauflösend sowohl innerhalb (B) als auch außerhalb (C) von Motoneuronen darstellen. (Größenbalken: 10 μm (A); 0,5 μm (B und C))

Vergleichbar mit den Aufnahmen von Mic60 lassen sich sowohl in (Abbildung 4.2 B) als auch außerhalb der Motoneuronen (Abbildung 4.2 C) einzelne Proteincluster darstellen. Der Vergleich der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Tom20 innerhalb der Motoneuronen beziehungsweise außerhalb dieser Zellen, könnte Aufschluss darüber geben, ob ein erhöhter Energiebedarf in Anpassungen des TOM Komplexes resultiert.

Neben einer generellen Anpassung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Tom20, könnte sich die Interaktion dieses Proteins mit Mic60 vor oder nach erhöhter physischer Aktivität verändern. Als Voruntersuchung für zukünftige Experimente wurde die Kolokalisierung beider Proteine zunächst in Zellkultur mittels STED-Mikroskopie analysiert.

4.1.3.2 Interaktion von Mic60 und Tom20

Um der Frage nach einer Veränderung in der Interaktion von Mic60 mit Tom20 nach erhöhter physischer Aktivität nachgehen zu können, wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit verschiedene Komponenten des MICOS Komplexes sowie Tom20 in Kombination mit Mic60 durch indirekte Immunfluoreszenz in humanen Zellen gefärbt und durch anschließende Aufnahme mittels STED-Mikroskopie visualisiert (Abbildung 4.3).

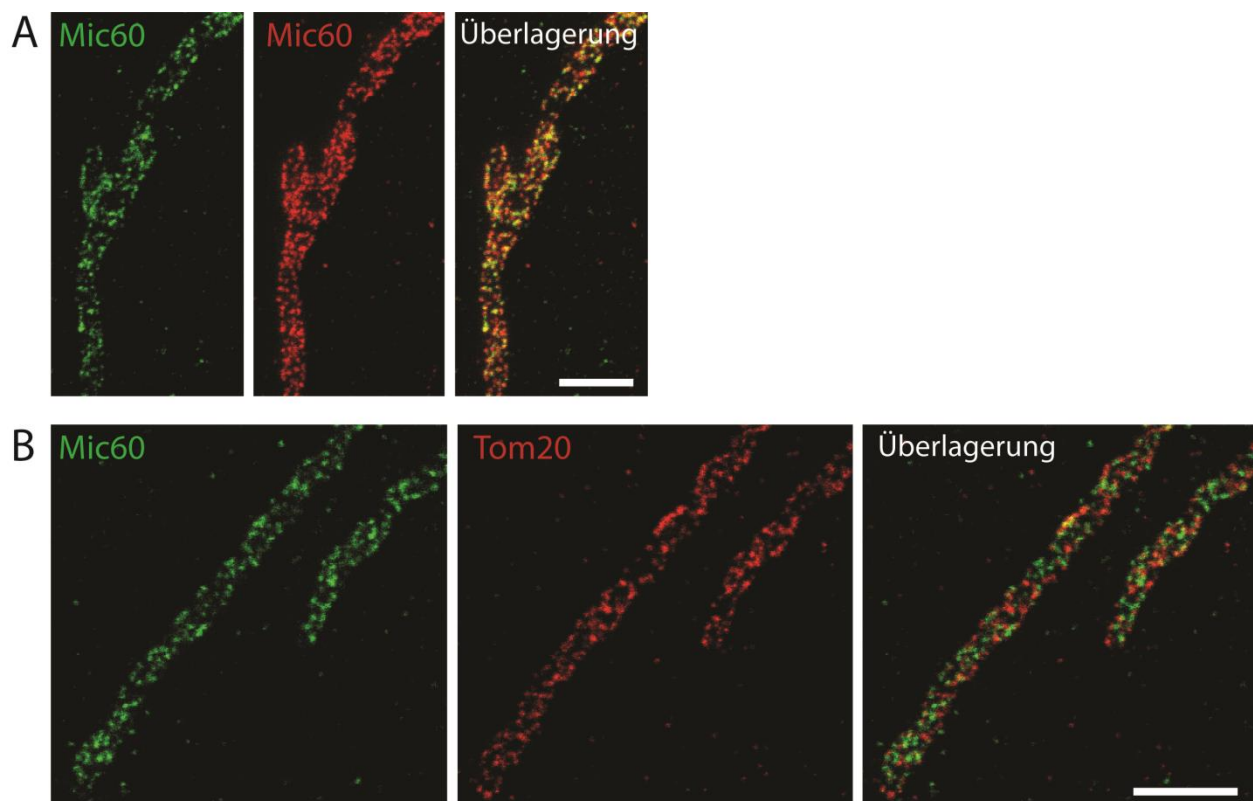


Abbildung 4.3: Kolokalisierung von Mic60 mit Tom20. Als positive Kontrolle wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Mic60 in neonatalen Fibroblasten durchgeführt (A). Die Färbung zeigt deutlich mehr gelbe Proteincluster, als Zeichen für eine Überlappung des Fluoreszenzsignals, als die Zweifarben STED-Aufnahme von Mic60 mit Tom20 (B). (Größenbalken: 1 µm)

Als Positivkontrolle, um eine Annäherung an die größtmögliche Kolokalisierung darzustellen, diente die Immunfluoreszenzfärbung mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Mic60 (Abbildung 4.3 A). Bereits der qualitative Vergleich der hochauflösenden Bilder der Positivkontrolle mit der indirekten

Immunfluoreszenz gegen Mic60 und Tom20 (Abbildung 4.3 B) zeigt den Unterschied beider Färbungen. Während in der Aufnahme mit zwei Antikörpern gegen Mic60 viele gelbe Proteincluster, die eine Überlappung der Fluoreszenzsignale bedeuten, erkennbar sind, kann eine derartige Überschneidung der Signale in der Immunfluoreszenz von Mic60 und Tom20 kaum detektiert werden.

Des Weiteren wurde die Interaktion der untersuchten MICOS Komponenten untereinander beziehungsweise von Mic60 in Kombination mit Tom20 auf ihre Korrelation überprüft. Als Maß für die Kolo-kalisierung zweier Proteine diente die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Der Koeffizient gibt die Kovarianz zweier Fluoreszenzsignale an, indem die relative Intensität beider Kanäle in Korrelation gesetzt wird. Ein Wert von +1 bedeutet eine perfekte Korrelation während bei 0 von keiner Korrelation beziehungsweise bei -1 von einer perfekten negativen Korrelation ausgegangen werden kann (Adler and Parmryd 2010).

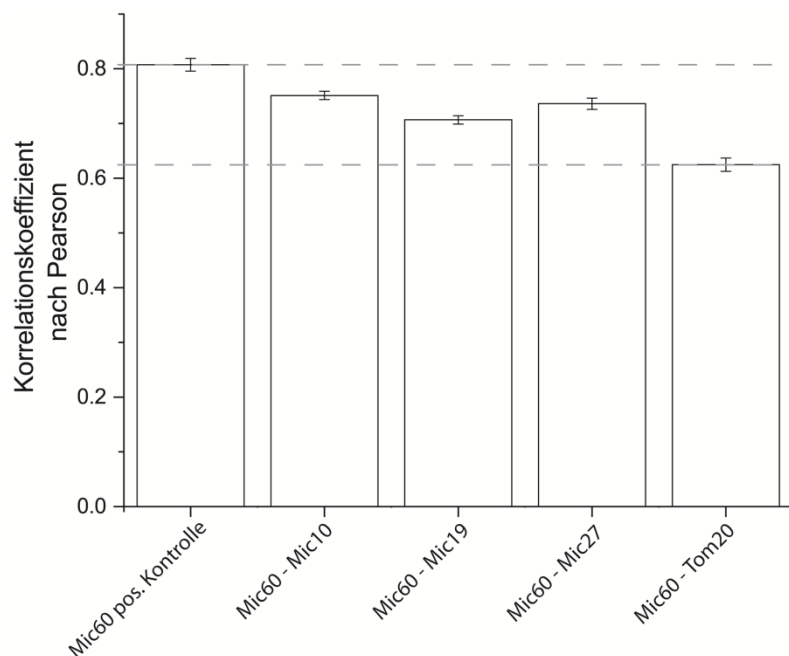


Abbildung 4.4: Quantitative Darstellung der Kolo-kalisierung. Durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson kann die Kolo-kalisierung von Mic60 mit verschiedenen Komponenten des MICOS Komplexes sowie mit Tom20 in neonatalen Fibroblasten quantifiziert werden. (Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler)

Der Korrelationskoeffizient der Kontrolle mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Mic60 liegt bei 0.8, während der Wert in den STED-Aufnahmen von Mic60 und Tom20 auf etwa 0.6 sinkt. Die Koeffizienten der untersuchten Komponenten des MICOS Komplexes mit Mic60 liegen zwischen diesen beiden Extremen (Abbildung 4.4). Auch bei der positiven Kontrolle mit zwei Antikörpern gegen dasselbe Protein konnte eine perfekte Korrelation nicht ermittelt werden. Unterschiede in den Bindungsaffinitäten

der verwendeten Antikörper könnten einen Grund für den niedrigen Wert darstellen. Des Weiteren vergrößert die Interaktion von Primär- und Sekundärantikörper die Struktur um etwa 40 nm (Harris et al. 1997). Aufgrund der Auflösung des Mikroskops von 40–50 nm könnte eine Darstellung der perfekten Kolo-kalisierung unter Verwendung indirekter Immunfluoreszenz mittels STED-Mikroskopie problematisch sein. Um zu testen ob eine erhöhte physischer Belastung in einer Veränderung der Korrelationskoeffizienten von Mic60 in Kombination mit Tom20 resultiert, müssten diese Experimente in Muskelpräparaten wiederholt werden.

Die Untersuchung der Interaktion von Mic60 und Tom20 könnte Aufschluss geben, ob eine Veränderung des Energiebedarfs neuromuskulärer Synapsen eine Anpassung des MICOS Komplexes in Bezug auf seine Interaktionspartner hat. Durch die Verbesserungen im Bereich der Zweifarben STED-Mikroskopie könnte der Frage nach einer Umstrukturierung von MICOS nachgegangen werden, die nicht auf einem vermehrten Abbau beziehungsweise einer gesteigerten Integration seiner Komponenten in die innere mitochondriale Membran beruht.

4.1.4 Ausblick

Die Ergebnisse der Untersuchung neuromuskulärer Synapsen zeigen, dass sich im Tibialis anterior keine signifikante Veränderung der Gesamtfläche motorischer Endplatten im Allgemeinen und der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 im Speziellen als Reaktion auf erhöhte physische Aktivität ergeben. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte der angesetzte Trainingsreiz für eine Umstrukturierung der neuromuskulären Synapse beziehungsweise der mitochondrialen Innenarchitektur im Tibialis anterior unterschwellig sein. Ein Vergleich der Daten dieser Arbeit mit einer Wiederholung der Experimente unter Verwendung eines graduell erhöhten Trainingsreizes, könnte Aufschluss darüber geben, ob die Art der Aktivität Auswirkungen auf etwaige Umstrukturierungen innerhalb der beiden Muskelgruppen hat. Die Berechnung der Flächen motorischer Endplatten im Soleus zeigte eine signifikante Vergrößerung nach erhöhter physischer Aktivität. Ob sich bei starker Beanspruchung eine größere Differenz der Werte ergibt, könnte ebenfalls durch diesen Versuchsansatz geklärt werden.

Da die Auswertung der Gesamtfläche vorselektierter Synapsen keine signifikanten Daten ergaben, könnte durch eine Ausweitung der Experimente auf eine größere Stichprobenanzahl getestet werden, ob es sich bei dieser Tendenz um signifikante Unterschiede handelt. In dieser Arbeit wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 µm verwendet, um den Fluoreszenzhintergrund der Färbungen möglichst klein zu halten.

Aufgrund der hohen Spezifität von α -Bungarotoxin könnten weiterführende Experimente auch mit dickeren Präparaten erfolgen, um die Anzahl motorischer Endplatten, die sich in der richtigen Lage zur Fokusebene des Mikroskops befinden, zu erhöhen.

Aufgrund der dualen Funktion von Mic60 als strukturgebendes Protein für die Aufrechterhaltung der Cristae junctions, beziehungsweise als Kontaktstelle zur äußeren mitochondrialen Membran, ergeben sich eine Reihe weiterführender Experimente. Durch die Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 in Kombination mit Tom20, könnte analysiert werden, ob sich eine Veränderung der Interaktion nach erhöhter physischer Aktivität zeigt.

Elektronentomographische Studien konnten bereits demonstrieren, dass es sich bei Mitochondrien innerhalb des Nervensystems um Cristae-reiche Organellen handelt (Perkins et al. 2010). Da Ergebnisse der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 im Tibialis anterior keine Veränderung der Varianz der Fluoreszenzintensität ergaben, kann darauf geschlossen werden, dass der angesetzte Trainingsreiz für eine Anpassung des MICOS Komplexes unterschwellig war. Im Soleus zeigte sich ein signifikanter Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität von trainierten Mäusen zu den Kontrolltieren. Dies könnte auf eine erhöhte Proteindichte für Mic60 in bewegungsarmen Tieren hindeuten. Ob eine Veränderung der mitochondrialen Innenarchitektur vorliegt oder ob dies ein Effekt der Orientierung der Mitochondrien innerhalb neuromuskulärer Synapsen ist, könnte anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen geklärt werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass die Anpassung der motorischen Endplatten des Soleus und Tibialis anterior auf den angesetzten Trainingsreiz unterschiedlich ausfallen. Im Soleus zeigten sich eine signifikante Vergrößerung der Fläche motorischer Endplatten sowie eine heterogenere Proteinverteilung von Mic60 in trainierten Tieren. Dementgegen konnte keine signifikante Veränderung der Gesamtflächen motorischer Endplatten des Tibialis anterior demonstriert werden. Auch die sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60 ergab in diesem Muskel keine Veränderung. Ob eine graduelle Erhöhung des Trainingsreizes zu einer Veränderung der Proteinverteilung im Tibialis anterior führt, müssen zukünftige Experimente klären.

4.2 Apoptose

Mitochondrien nehmen eine zentrale Position bei der Durchführung des programmierten Zelltods ein. Durch die Proteine der Bcl-2 Familie kommt es zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und damit einhergehend zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, darunter Cytochrom *c*. Eine genaue Betrachtung der Mitochondrien ist aufgrund ihrer Schlüsselposition für ein detailliertes Verständnis der zellulären Prozesse während der Apoptose entscheidend. In der vorliegenden Arbeit konnten mittels hochauflösender Mikroskopieverfahren signifikante Veränderungen sub-mitochondrialer Proteinverteilung während des programmierten Zelltods beobachtet werden. Durch die differenzierte Untersuchung dieser Umstrukturierungen lassen sich die Veränderungen in einen zeitlichen Kontext im Verlauf der Apoptose bringen und zeigen, dass der Verlust distinkter Proteincluster bereits vor der Freisetzung von Cytochrom *c* stattfindet.

4.2.1 Proteinverteilung vor und nach Induktion von Apoptose

Ein Großteil mitochondrialer Proteine weist eine Verteilung in distinkten Proteinclustern auf, die aufgrund der von Abbé berechneten Auflösungsgrenze nicht mittels konfokaler Mikroskopie dargestellt werden können. Durch die Verbesserung der Auflösung mikroskopischer Systeme, konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es im Verlauf der Apoptose zu signifikanten Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung kommt. Nach wie vor wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob eine vollständige Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Cristae in das Zytoplasma der Zelle eine Umstrukturierung der Cristae junctions voraussetzt (Tam et al. 2010, Scorrano et al. 2002, Yamaguchi et al. 2008). Eine Öffnung dieser Engstellen könnte notwendig sein, um Cytochrom *c* unmittelbar nach der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran in das Zytoplasma freizusetzen und somit den Fortgang der Apoptose zu beschleunigen. Da der Multiproteinkomplex MICOS für die Aufrechterhaltung der Cristae junctions essentiell ist, wurde der Fokus dieser Arbeit auf Komponenten dieses Komplexes gerichtet. Die Untersuchung weiterer mitochondrialer Proteine (Abbildung 3.19) ermöglichte einerseits eine bessere Einordnung der Ergebnisse und bot andererseits einen tieferen Einblick in allgemeine Umstrukturierungen innerhalb der Mitochondrien.

4.2.1.1 *Vergleich der Proteinverteilung von Drp1 Knockdown und U2OS Wildtyp Zellen*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Knockdown von Drp1 verwendet, um ein größeres Zeitfenster zwischen Bax-Aktivierung und Freisetzung von Cytochrom *c* zu erreichen (Suen et al. 2008). Des Weiteren konnten durch die Herunterregulierung der mitochondrialen Spaltung apoptotische Mitochondrien in ihrer ursprünglich länglichen Form untersucht werden. Vergleicht man den Abfall der Varianzwerte während der Apoptose in Drp1 Knockdown beziehungsweise U2OS Wildtyp Zellen, zeigen sich für einige Proteine Unterschiede. Während die Varianz der Fluoreszenzintensität von apoptotischen zu nicht-apoptotischen Mitochondrien bei Mic60 und Tom20 gleichermaßen fällt, vermindert sich der Wert für die restlichen Proteine in U2OS Wildtyp Zellen in etwa doppelt so stark wie nach Knockdown von Drp1 (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.25). Da der Verlust distinkter Proteincluster sowohl bei physiologischer als auch bei herunterregulierter Proteinexpression von Drp1 gezeigt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung weder ein Artefakt des Knockdowns noch der fragmentierten Mitochondrien darstellt.

4.2.1.2 *Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung*

Für die Untersuchung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung wurden U2OS Zellen ausgewählt. Die Krebszelllinie eignete sich aufgrund ihres stark vernetzten mitochondrialen Netzwerks zur Darstellung potenzieller Veränderungen der Mitochondrien nach Induktion von Apoptose. Der Verlust distinkter Proteincluster ließ sich sowohl in Drp1 Knockdown als auch in Wildtyp Zellen für Tom20, Mic19, Mic27 und Mic60 bereits visuell beobachten (Abbildung 3.20; Abbildung 3.21; Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Um subtilere Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung analysieren zu können, wurde die Varianz der Fluoreszenzintensität für alle Proteine berechnet. Dabei handelt es sich um ein Maß für die Heterogenität der Proteinverteilung (Wurm et al. 2011). Der Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität nach Induktion von Apoptose war in allen mitochondrialen Proteinen hoch signifikant (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.25) (Zweistichproben-t-Test; $p \leq 0,001$). Dies lässt darauf schließen, dass Veränderungen der Proteinverteilung nicht auf spezifische mitochondriale Subkompartimente beschränkt sind. Bereits Neumann konnte Umstrukturierungen der Proteincluster demonstrieren. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit ging Neumann aufgrund der unzureichenden Auflösung des verwendeten mikroskopischen Systems allerdings von subtilen Veränderungen der Proteinverteilung aus (Neumann 2010).

Die Induktion von Apoptose führt zur Aktivierung von cystein-abhängigen Proteasen. Diese Caspasen sind für den Abbau zellulärer Proteine während des programmierten Zelltods verantwortlich, indem sie ihre Substrate am Carboxylende von Aspartat spalten (Nicholson 1999). Ein Verlust mitochondrialer Proteine durch einen proteolytischen Abbau, könnte in einer Verkleinerung bestehender Proteincluster beziehungsweise einer verminderten Anzahl dieser Cluster resultieren (Abbildung 4.5 A). Dies hätte eine gesteigerte Heterogenität der Proteinverteilung zur Folge und ließe sich nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang bringen. Der proteolytische Abbau der untersuchten Proteine scheint demnach nicht ausschlaggebend für die gesteigerte homogene Proteinverteilung während der Apoptose zu sein.

Wie es zu einer solchen Veränderung kommt, kann anhand der Daten nur spekuliert werden. Es ergeben sich zwei Szenarien, die einen Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität zur Folge haben könnten (Abbildung 4.5 B und C).

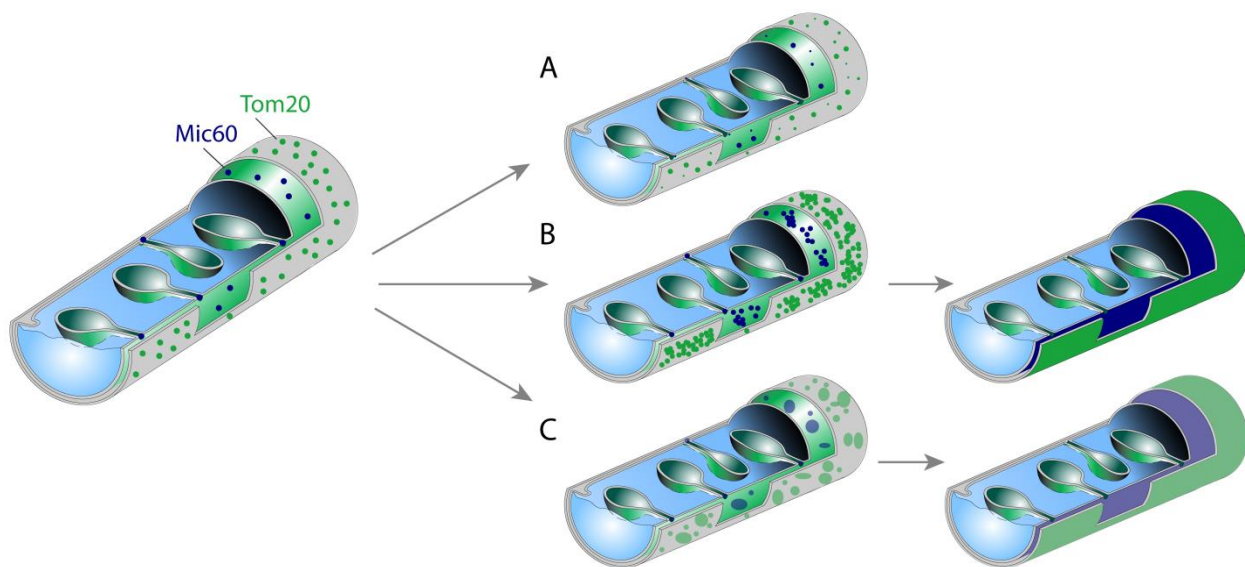


Abbildung 4.5: Modell zur Erklärung möglicher Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung während der Apoptose. Während in nicht-apoptotischen Zellen mitochondriale Proteine in distinkten Clustern auftreten, zeigt sich nach Induktion von Apoptose eine zunehmend homogene Proteinverteilung. Ein Abbau von Proteinen (A) würde eine erhöhte Heterogenität verursachen und steht somit im Gegensatz zu den Berechnungen der Varianz der Fluoreszenzintensität. Durch vermehrte Produktion und Einlagerung mitochondrialer Proteine (C) wäre ein Abfall der Varianz zwar erklärbar, ist allerdings durch die Aktivierung der Caspasen nicht wahrscheinlich. Eine Auflösung der Proteincuster (C) würde eine zunehmend homogene Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose erklären und steht im Einklang mit dem beobachteten Abfall der Fluoreszenzintensität.

Eine vermehrte Expression beziehungsweise der gesteigerter Import mitochondrialer Proteine könnte durch ihre Einlagerung in bestehende Proteincluster zum einen in einer erhöhten Konzentration der Proteine pro Cluster resultieren, zum anderen eine Vergrößerung der Proteincluster zur Folge haben. Des

Weiteren könnte sich die Anzahl an Proteincluster als Reaktion auf eine gesteigerte Konzentration mitochondrialer Proteine erhöhen (Abbildung 4.5 B). Sowohl die Vergrößerung bestehender Proteincluster als auch eine vermehrte Anzahl könnte in sich einer Verschmelzung der Fluoreszenzsignale äußern, da aufgrund der Auflösung des STED-Mikroskops distinkte Proteincluster nicht mehr voneinander getrennt werden können. Das Resultat wäre ein Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität durch eine homogenere Proteinverteilung. Dieses Szenario erklärt die Veränderung der Varianz, lässt sich allerdings nicht mit der qualitativen Beurteilung der STED-Aufnahmen vereinbaren. Die mikroskopischen Bilder zeigen kein erhöhtes Fluoreszenzintensität nach Induktion von Apoptose, wodurch eine Steigerung der Proteinmenge unwahrscheinlich wird. Die Aktivierung von Caspasen während des apoptotischen Signalwegs macht zudem eine Einlagerung neu-synthetisierter Proteine unwahrscheinlich.

Des Weiteren könnte sich der Verlust distinkter Proteincluster in Folge einer gesteigerten Diffusion einzelner Komponenten der Proteinkomplexe ergeben. Dies ließe sich sowohl mit der qualitativen Beurteilung der STED-Aufnahmen als auch mit dem signifikanten Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität vereinbaren (Abbildung 4.5 C). Durch die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs verlieren die Funktionen der Mitochondrien im Stoffwechsel an Bedeutung. In den Vordergrund treten ihre Aufgaben innerhalb der apoptotischen Signaltransduktionskaskade. Die Aufrechterhaltung der hochgeordneten Proteincluster als Funktionseinheit der jeweiligen Proteine wäre somit obsolet. Durch Diffusion könnte es zum Verlust klar abgegrenzter Proteincluster kommen, was eine gesteigerte Homogenität und damit einhergehend ein Abfall der Varianz der Fluoreszenzintensität zur Folge hätte.

4.2.1.3 Veränderungen des MICOS Komplexes nach Induktion von Apoptose

Die homogene Proteinverteilung der Komponenten von MICOS deutet auf einen Verlust der funktionellen Interaktion innerhalb des Komplexes hin. Frühere Publikationen belegen, dass eine Herunterregulierung beziehungsweise ein Verlust von Mic60, Mic27 oder Mic19 zu einer signifikanten Umstrukturierung der mitochondrialen Innenarchitektur führt (John et al. 2005, Darshi et al. 2011, Harner et al. 2011). Eine Veränderung der Integrität des Komplexes als solches könnte somit ebenfalls mit einer Veränderung der Cristae junctions einhergehen.

Zusammenfassend konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es zu massiven Veränderungen der sub-mitochondrialen Proteinverteilung während der Apoptose kommt, die vermutlich nicht auf dem Abbau zellulärer Bestandteile durch aktivierte Caspasen beruhen. Zudem ergänzt die direkte Darstellung der Komponenten von MICOS die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

früherer Arbeitsgruppen. Die signifikante Veränderung der sub-mitochondrialen Proteinverteilung von Mic60, Mic27 und Mic19 deutet auf eine Umstrukturierung der mitochondrialen Innenarchitektur während der Apoptose hin.

4.2.2 Oligomerisierung von Bax

Die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, kurz MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*), ist der Zeitpunkt im Verlauf der Apoptose, ab dem die Durchführung des programmierten Zelltods in der Regel irreversibel ist (Tait and Green 2010). Entscheidend für dieses Ereignis ist die Oligomerisierung der pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie, Bax und Bak, und im Falle von Bax dessen stabile Integration in die äußere Membran der Mitochondrien (Eskes et al. 2000).

Während der Mechanismus der Integration von Bax in die mitochondriale Membran aufgeklärt werden konnte (Lalier et al. 2007), besteht weiterhin Unklarheit über den genauen Prozess der Permeabilisierung sowie der molekularen Zusammensetzung der Poren (Muchmore et al. 1996, Martinez-Caballero et al. 2009, Basanez et al. 2002). Eine detaillierte Betrachtung der Bax Komplexe eignet sich, um den Prozess von MOMP und der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien besser zu verstehen.

4.2.2.1 Struktur und Größe der Bax-Oligomere

Ein zentraler Aspekt innerhalb der anhaltenden Kontroverse ist die Frage nach der Anzahl an Bax-Molekülen pro Komplex und der damit einhergehenden Größe der Poren. Die bestehenden Spekulationen rangieren zwischen vier (Saito et al. 2000) bis zu etwa 150 Bax-Proteine (Zhou and Chang 2008) innerhalb eines Komplexes. Untersuchungen künstlicher Lipiddoppelschichten konnten darüber hinaus zeigen, dass scheinbar bereits monomeres Bax Membranporen bildet, deren Öffnung bei $\sim 3,5$ nm liegt (Xu et al. 2013). Um den Prozess der Freisetzung von Cytochrom *c* besser verstehen zu können, wurden Bax-Oligomere nach Induktion von Apoptose durch Actinomycin D mittels 3D STED-Mikroskopie und anschließender 3D-Rekonstruktion genauer untersucht (Abbildung 3.29). Anhand der STED-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass Bax zu Ringen oligomerisiert, die eine durchgehende, zentrale Öffnung aufweisen. Während in der Literatur lediglich Bax Komplexe mit einer mittlere Größe von etwa 250 nm dargestellt wurden (Zhou and Chang 2008), konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit neben diesen Oligomeren auch Ringe aus aktivierten Bax-Molekülen mit einem Durchmesser von etwa 1 μ m nachgewiesen werden.

In Abschnitt (Abbildung 3.30) konnten bereits Ringen mit variablem Durchmesser beobachtet werden. Bereits bei der Ausmessung von 25 dieser Bax-Oligomere bestätigt diese Variabilität. Die beobachteten Ringgrößen variieren zwischen $0,21 \mu\text{m}$ (Abbildung 4.6 B) und $1,15 \mu\text{m}$ (Abbildung 4.6) um einen Faktor von fünf. Da es sich bei den Bax-Ringen um dreidimensionale Strukturen handelt, wurden die Durchmesser jeweils an der weitesten Öffnung gemessen (Abbildung 1.7 A). Dadurch wurde sichergestellt, dass der Winkel dieser Ringe in Bezug auf die Fokusebene des Mikroskops die Messung nicht beeinflusst.

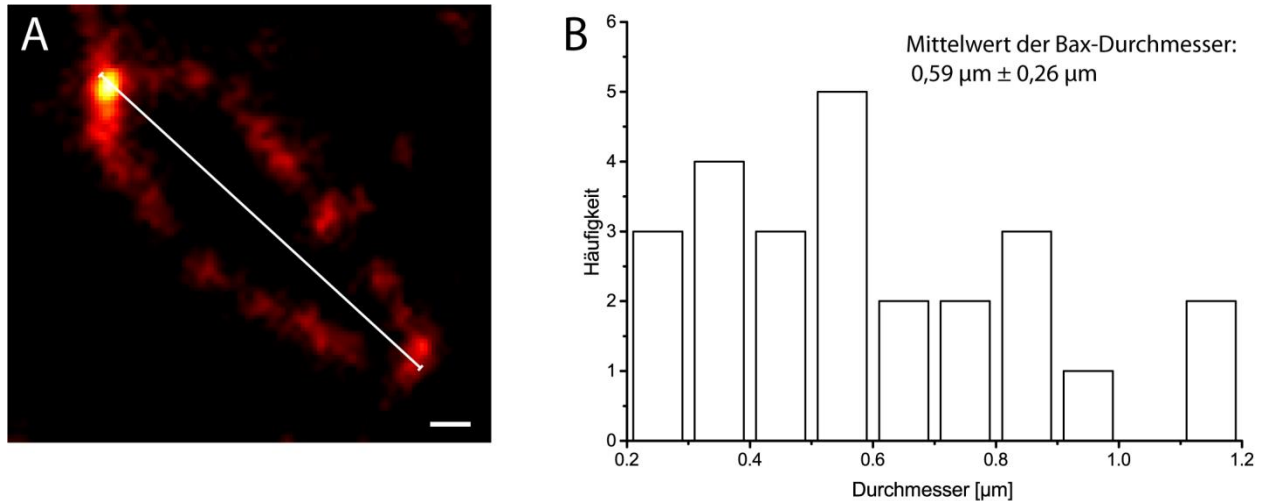


Abbildung 4.6: Heterogenität der Bax-Ringe. Durch die indirekte Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen aktiviertes Bax lässt sich anhand der gemessenen Durchmesser (A) die hohe Heterogenität der Größe verschiedener Bax-Ringe (B) darstellen. Um keine Artefakte aufgrund von etwaig gekippten Ringen zu messen, wurden die Durchmesser an der längsten Achse der Strukturen ermittelt (A). (Größenbalken: $0,1 \mu\text{m}$)

Eine Berechnung der Anzahl aktivierter Bax-Moleküle pro Ring kann dementsprechend nur als Abschätzung der Größenordnung angesehen werden. Ausgehend von einem mittleren Durchmesser der Bax-Ringe von etwa $0,59 \mu\text{m}$ (Abbildung 1.7 B), kann anhand kristallographischer Daten, die eine Größenabschätzung von etwa 4 nm pro Molekül zulassen (Czabotar et al. 2013, Suzuki et al. 2000), die Anzahl der Einzelmoleküle pro Ring angenähert werden. Es ist zu beachten, dass es bei indirekter Immunfluoreszenz durch die Interaktionen von Primär- und Sekundärantikörper zu einer Vergrößerung der Struktur um etwa 40 nm kommt (Harris et al. 1997). Unter diesen Annahmen würde ein durchschnittlich großer Bax-Ring aus mehreren hundert Bax-Proteinen bestehen, was deutlich über den bislang in der Literatur angenommenen Werten liegt (Saito et al. 2000, Zhou and Chang 2008).

Die Diskrepanz der gemessenen Größe postulierter Bax Komplexe in früheren Veröffentlichungen und innerhalb der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Herangehensweise nachvollziehbar. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von Zhou und Kollegen (Zhou and

Chang 2008) (Abbildung 4.7) unterliegen den Grenzen beugungsbeschränkter Mikroskopieverfahren. Es handelt sich laut dieser Publikation bei den Bax Komplexen (Abbildung 4.7 B; Stern) um Strukturen von 0,25 μm , welche sehr nahe an der Auflösungsgrenze konfokaler Mikroskopie liegen. In dieser Veröffentlichung wurde auf lichtschwächere Strukturen nicht eingegangen (Abbildung 1.8 B; Pfeil).

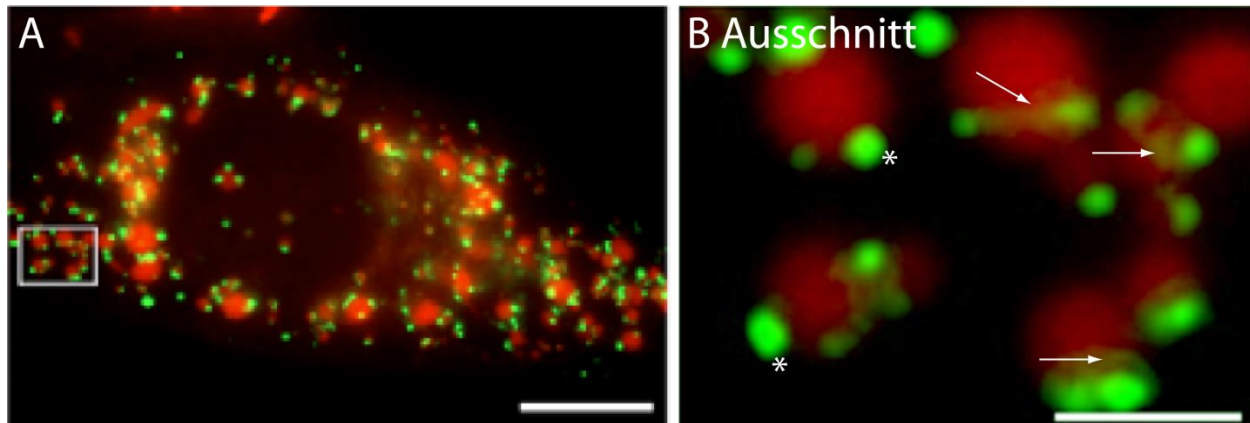


Abbildung 4.7: Bax-Oligomere aus früheren Arbeiten. Zhou und Kollegen ermittelten die Anzahl einzelner Bax-Moleküle pro Oligomer (B; Stern) mittels konfokaler Mikroskopie. Auf filigrane Strukturen (B; Pfeil) wurde in der Publikation nicht eingegangen. (Größenbalken: 10 μm (A); 2 μm (B)) (bearbeitet aus (Zhou and Chang 2008))

Die Präsenz von großen, punktförmigen Bax-Oligomeren erschwert zudem die Visualisierung filigraner Strukturen insbesondere unter Verwendung beugungsbeschränkter Mikroskopieverfahren.

Die Bandbreite der Durchmesser dieser Ringe steht im Einklang mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen in OMVs (*outer membrane vesicles*). Anhand dieser artifiziellen Membranen konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Bax positiv mit der Größe der Membranrupturen korreliert (Gillies et al. 2014). Die unterschiedlichen Durchmesser der Bax-Ringe scheinen demnach von der Größe fragmentierter Mitochondrien beziehungsweise der Konzentration aktivierter Bax-Moleküle abzuhängen.

Die Funktion der Bax-Ringe bleibt innerhalb der vorliegenden Arbeit weiter offen und muss durch zukünftige Experimente geklärt werden. Anhand der hochauflösenden Aufnahmen, insbesondere der 3D-Rekonstruktion, liegt die Vermutung nahe, dass Bax nach Aktivierung zu Ringen oligomerisiert. Des Weiteren bestätigen die Daten dieser Arbeit die hohe Heterogenität der Bax-Oligomere früherer elektronenmikroskopischer Studien. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die direkte Visualisierung aktivierter Bax-Moleküle durch Immunfluoreszenz und anschließender Aufnahme mittels STED-Mikroskopie einen detaillierten Einblick in den Prozess der Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran erlaubt. Da dieses Ereignis essentiell für die Freisetzung von Cytochrom *c* ist,

ergänzt die Analyse der Oligomerisierung von Bax, die Beobachtungen der sub-mitochondrialen Proteinveränderungen während der Apoptose.

4.2.3 Ausblick

4.2.3.1 *Zusammensetzung und Funktion der Bax-Ringe*

Durch die mikroskopische Untersuchung der Bax Komplexe zeigt sich, dass diese sowohl in großen Proteinclustern als auch in höher organisierten Bax-Ringen vorliegen (Abbildung 3.27). Ob diese Cluster bereits für die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran ausreichend sind, oder ob große ringförmige Bax Komplexe benötigt werden, um die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren zu gewährleisten, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Des Weiteren zeigte sich in artifiziellen Membranen, dass bereits monomeres Bax zur Permeabilisierung der Lipidschicht führen kann (Xu et al. 2013). Es kann demnach auch vermutet werden, dass weder Bax-Komplexe noch Bax-Ringe für die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren notwendig sind. Somit stellt sich die Frage, welche der gezeigten Bax-Strukturen für MOMP essentiell ist.

Anhand der Untersuchung von Drp1 herunterregulierten U2OS Zellen, konnte gezeigt werden, dass Bax-Ringe auch bei verminderten Proteinexpression von Drp1 in der Nähe fragmentierter Mitochondrien beobachtet werden können (Abbildung 3.30). Aus früheren Arbeiten ist bereits bekannt, dass Drp1 indirekt an der Freisetzung von Cytochrom *c* beteiligt ist, die Freisetzung weiterer Proteine wie Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 allerdings nicht beeinflusst (Estaquier and Arnoult 2007, Parone et al. 2006). Durch die differenzierte Betrachtung der Freisetzung von Cytochrom *c*, Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 in Drp1 Knockdown Zellen nach Induktion von Apoptose, könnte untersucht werden, ob große Bax-Ringe für die Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren benötigt werden, oder ob die Freisetzung bereits vor dem Auftreten kleinerer Bax Komplexe zu beobachten ist.

4.2.3.2 *Dynamik des MICOS Komplexes*

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu massiven Veränderungen sub-mitochondrialer Proteinverteilung nach Induktion von Apoptose kommt. Diese Umstrukturierungen zeigen sich sowohl in fragmentierten als auch länglichen Mitochondrien nach Aktivierung des apoptotischen Signalwegs und beginnen bereits vor der Freisetzung von Cytochrom *c*. Der Verlust distinkter Proteincluster ist besonders in Bezug auf Proteine des MICOS Komplexes von großem Interesse,

um die Frage nach einer etwaigen Veränderung der mitochondrialer Innenarchitektur zu adressieren. Ob eine massive Umgestaltung der Cristae für die Freisetzung von Cytochrom *c* benötigt wird, oder ob die Veränderung der mitochondrialen Innenarchitektur während der Apoptose subtiler verläuft, wird nach wie vor debattiert (Tam et al. 2010, Yang et al. 2012, Yamaguchi and Perkins 2009, Scorrano et al. 2002, Scorrano 2009). Dass es zu einer Veränderung der mitochondrialen Innenarchitektur kommt, wird durch die signifikante Umstrukturierung der Proteincluster von Mic60, Mic27 und Mic19 denkbar. Ob die gesteigerte Homogenität der Proteinverteilung auf einer Erweiterung oder Verengung der Cristae beruht, kann anhand der STED-Daten nicht geklärt werden. Untersuchungen der Ultrastruktur apoptotischer Mitochondrien wurden bislang durch elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt, um die komplexe Innenarchitektur der Organellen zu erfassen. In Kombination mit einer Immuno-Gold-Färbung gegen aktiviertes Bax, um apoptotische Mitochondrien zu markieren, könnte die Frage nach einer Veränderung der Cristae junctions mittels Elektronenmikroskopie in Drp1 Knockdown und U2OS Wildtyp Zellen adressiert werden.

Abkürzungsverzeichnis

Act. D	Actinomycin D
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Caspase	<i>cysteine-dependent aspartate-specific protease</i> (Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease)
Cyt. c	Cytochrom c
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleinacid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
Drp1	<i>dynamin-related protein 1</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
G	Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
K	Kilo
Kb	Kilobasen
Km	Kilometer
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
Mic	Komponente des MICOS Komplexes
MICOS	<i>mitochondrial contact site and cristae organizing system</i> (mitochondriale Kontaktstellen und Cristae organisierendes System)
Min	Minute

MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran)
NA	numerische Apertur
N-Terminus	Amino-Terminus
OMV	<i>mitochondrial outer membrane vesicles</i>
OPA1	<i>optic atrophy 1</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Stärke des Wasserstoffs)
RNA	<i>ribonucleinacid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	<i>ribonucleinacid-interference</i> (Ribonukleinsäure-Interferenz)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
shRNA	<i>small hairpin RNA</i> (RNA mit kleiner Haarnadelstruktur)
Soleus	Musculus soleus
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
Tibialis anterior	Musculus tibialis anterior
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i> (Translokase der äußeren mitochondrialen Membran)
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- ADLER J AND PARMRYD I. 2010. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77: 733-742.
- ALKHAJA AK ET AL. 2012. MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Molecular biology of the cell* 23: 247-257.
- AMARAL JD, XAVIER JM, STEER CJ AND RODRIGUES CM. 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine* 9: 145-152.
- AN J, SHI J, HE Q, LUI K, LIU Y, HUANG Y AND SHEIKH MS. 2012. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *The Journal of biological chemistry* 287: 7411-7426.
- ANDONIAN MH AND FAHIM MA. 1988. Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. *International journal of sports medicine* 9: 218-223.
- BASANEZ G, SHARPE JC, GALANIS J, BRANDT TB, HARDWICK JM AND ZIMMERBERG J. 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *The Journal of biological chemistry* 277: 49360-49365.
- BECKER T, GEBERT M, PFANNER N AND VAN DER LAAN M. 2009. Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Current opinion in cell biology* 21: 484-493.
- BELENGUER P AND PELLEGRINI L. 2013. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochimica et biophysica acta* 1833: 176-183.
- BETZIG E, PATTERSON GH, SOUGRAT R, LINDWASSER OW, OLENYCH S, BONIFACINO JS, DAVIDSON MW, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J AND HESS HF. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313: 1642-1645.
- BILLEN LP, SHAMAS-DIN A AND ANDREWS DW. 2008. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27 Suppl 1: S93-104.
- BLEICKEN S, CLASSEN M, PADMAVATHI PV, ISHIKAWA T, ZETH K, STEINHOFF HJ AND BORDIGNON E. 2010. Molecular details of Bax activation, oligomerization, and membrane insertion. *The Journal of biological chemistry* 285: 6636-6647.
- BRICKLEY K AND STEPHENSON FA. 2011. Trafficking kinesin protein (TRAK)-mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry* 286: 18079-18092.
- CALLAWAY E. 2013. Deal done over HeLa cell line. *Nature* 500: 132-133.
- CAMPELLO S AND SCORRANO L. 2010. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO reports* 11: 678-684.
- CARTRON PF, PRIAULT M, OLIVER L, MEFLAH K, MANON S AND VALLETTE FM. 2003. The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *The Journal of biological chemistry* 278: 11633-11641.
- CHAN DC. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* 22: 79-99.
- CHEN LB. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual review of cell biology* 4: 155-181.
- CHEN Y AND SHENG ZH. 2013. Kinesin-1-syntaphilin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *The Journal of cell biology* 202: 351-364.
- CZABOTAR PE ET AL. 2013. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* 152: 519-531.

- DARSHI M, MENDIOLA VL, MACKEY MR, MURPHY AN, KOLLER A, PERKINS GA, ELLISMAN MH AND TAYLOR SS. 2011. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry* 286: 2918-2932.
- DARSHI M, TRINH KN, MURPHY AN AND TAYLOR SS. 2012. Targeting and import mechanism of coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 (ChChd3) into the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of biological chemistry* 287: 39480-39491.
- DAVIES KM, ANSEMI C, WITTIG I, FARALDO-GOMEZ JD AND KUHLBRANDT W. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 13602-13607.
- DAVIS RE AND WILLIAMS M. 2012. Mitochondrial function and dysfunction: an update. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 342: 598-607.
- DENG Y, MARKO M, BUTTLE KF, LEITH A, MIECZKOWSKI M AND MANNELLA CA. 1999. Cubic membrane structure in amoeba (*Chaos carolinensis*) mitochondria determined by electron microscopic tomography. *Journal of structural biology* 127: 231-239.
- DESCHENES MR, MARESH CM, CRIVELLO JF, ARMSTRONG LE, KRAEMER WJ AND COVAULT J. 1993. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *Journal of neurocytology* 22: 603-615.
- ELMORE S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35: 495-516.
- ESKES R, DESAGHER S, ANTONSSON B AND MARTINOUC J. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology* 20: 929-935.
- ESPOSTI MD. 2014. Bioenergetic Evolution in Proteobacteria and Mitochondria. *Genome Biol Evol*.
- ESTAQUIER J AND ARNOULT D. 2007. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell death and differentiation* 14: 1086-1094.
- FAVALORO B, ALLOCATI N, GRAZIANO V, DI ILIO C AND DE LAURENZI V. 2012. Role of apoptosis in disease. *Aging* 4: 330-349.
- FERTUCK HC AND SALPETER MM. 1974. Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 1376-1378.
- FOLLING J, BOSSI M, BOCK H, MEDDA R, WURM CA, HEIN B, JAKOBS S, EGGELING C AND HELL SW. 2008. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature methods* 5: 943-945.
- FREY TG AND MANNELLA CA. 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* 25: 319-324.
- FRIEDMAN JR, LACKNER LL, WEST M, DIBENEDETTO JR, NUNNARI J AND VOELTZ GK. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334: 358-362.
- FRONTERA WR AND OCHALA J. 2014. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified tissue international*.
- GILLESPIE AC, FOX EL AND MEROLA AJ. 1982. Enzyme adaptations in rat skeletal muscle after two intensities of treadmill training. *Medicine and science in sports and exercise* 14: 461-466.
- GILLIES LA, DU H, PETERS B, KNUDSON CM, NEWMAYER DD AND KUWANA T. 2014. Visual and Functional Demonstration of Growing Bax-induced pores in Mitochondrial Outer Membranes. *Molecular biology of the cell*.
- GIORGIO V, SORIANO ME, BASSO E, BISETTO E, LIPPE G, FORTE MA AND BERNARDI P. 2010. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta* 1797: 1113-1118.
- GLATER EE, MEGEATH LJ, STOWERS RS AND SCHWARZ TL. 2006. Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *The Journal of cell biology* 173: 545-557.

- GOTTFERT F, WURM CA, MUELLER V, BERNING S, CORDES VC, HONIGMANN A AND HELL SW. 2013. Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution. *Biophysical journal* 105: L01-03.
- GREEN DR AND KROEMER G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.
- GROSS J AND BHATTACHARYA D. 2011. Endosymbiont or host: who drove mitochondrial and plastid evolution? *Biology direct* 6: 12.
- 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. *The Journal of cell biology* 30: 269-297.
- HACKER G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research* 301: 5-17.
- HARKE B, KELLER J, ULLAL CK, WESTPHAL V, SCHONLE A AND HELL SW. 2008. Resolution scaling in STED microscopy. *Optics express* 16: 4154-4162.
- HARNER M, KORNER C, WALTHER D, MOKRANJAC D, KAESMACHER J, WELSCH U, GRIFFITH J, MANN M, REGGIORI F AND NEUPERT W. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *The EMBO journal* 30: 4356-4370.
- HARRIS LJ, LARSON SB, HASEL KW AND MCPHERSON A. 1997. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36: 1581-1597.
- HELL SW. 2003. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature biotechnology* 21: 1347-1355.
- HELL SW. 2007. Far-field optical nanoscopy. *Science* 316: 1153-1158.
- HELL SW. 2009. Microscopy and its focal switch. *Nature methods* 6: 24-32.
- HELL SW AND WICHMANN J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters* 19: 780-782.
- HIROKAWA N, NODA Y, TANAKA Y AND NIWA S. 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature reviews Molecular cell biology* 10: 682-696.
- HOPPINS S, COLLINS SR, CASSIDY-STONE A, HUMMEL E, DEVAY RM, LACKNER LL, WESTERMANN B, SCHULDINER M, WEISSMAN JS AND NUNNARI J. 2011. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *The Journal of cell biology* 195: 323-340.
- HORVATH SE AND DAUM G. 2013. Lipids of mitochondria. *Progress in lipid research* 52: 590-614.
- JAKOBS S, STOLDT S AND NEUMANN D. 2011. Light microscopic analysis of mitochondrial heterogeneity in cell populations and within single cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 124: 1-19.
- JAKOBS S AND WURM CA. 2014. Super-resolution microscopy of mitochondria. *Current opinion in chemical biology* 20: 9-15.
- JANS DC, WURM CA, RIEDEL D, WENZEL D, STAGGE F, DECKERS M, REHLING P AND JAKOBS S. 2013. STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 8936-8941.
- JOHN GB, SHANG Y, LI L, RENKEN C, MANNELLA CA, SELKER JM, RANGELL L, BENNETT MJ AND ZHA J. 2005. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Molecular biology of the cell* 16: 1543-1554.
- JOSEPH AM AND HOOD DA. 2012. Plasticity of TOM complex assembly in skeletal muscle mitochondria in response to chronic contractile activity. *Mitochondrion* 12: 305-312.
- JOURDAIN A AND MARTINOUC. 2009. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1884-1889.
- KAGEYAMA Y, ZHANG Z AND SESAKI H. 2011. Mitochondrial division: molecular machinery and physiological functions. *Current opinion in cell biology* 23: 427-434.

- KARBOWSKI M, NORRIS KL, CLELAND MM, JEONG SY AND YOULE RJ. 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443: 658-662.
- KAUFMANN SH AND HENGARTNER MO. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in cell biology* 11: 526-534.
- KERR JF, WYLLIE AH AND CURRIE AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26: 239-257.
- KIRTLEY C 2006. *Clinical gait analysis: theory and practice*. Elsevier Health Sciences.
- KLAR TA, JAKOBS S, DYBA M, EGNER A AND HELL SW. 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8206-8210.
- KORNER C, BARRERA M, DUKANOVIC J, EYDT K, HARNER M, RABL R, VOGEL F, RAPAPORT D, NEUPERT W AND REICHERT AS. 2012. The C-terminal domain of Fcj1 is required for formation of crista junctions and interacts with the TOB/SAM complex in mitochondria. *Molecular biology of the cell* 23: 2143-2155.
- KORNMAN B, CURRIE E, COLLINS SR, SCHULDINER M, NUNNARI J, WEISSMAN JS AND WALTER P. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325: 477-481.
- KUIPER JW, OERLEMANS FT, FRANSEN JA AND WIERINGA B. 2008. Creatine kinase B deficient neurons exhibit an increased fraction of motile mitochondria. *BMC neuroscience* 9: 73.
- KUSHNAREVA Y, ANDREYEV AY, KUWANA T AND NEWMAYER DD. 2012. Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes. *PLoS biology* 10: e1001394.
- KUWANA T, MACKAY MR, PERKINS G, ELLISMAN MH, LATTERICH M, SCHNEITER R, GREEN DR AND NEWMAYER DD. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111: 331-342.
- LACKNER LL. 2014. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC biology* 12: 35.
- LAHIRI S, CHAO JT, TAVASSOLI S, WONG AK, CHOUDHARY V, YOUNG BP, LOEWEN CJ AND PRINZ WA. 2014. A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS biology* 12: e1001969.
- LALIER L, CARTRON PF, JUIN P, NEDELKINA S, MANON S, BECHINGER B AND VALLETTE FM. 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12: 887-896.
- LEE YJ, JEONG SY, KARBOWSKI M, SMITH CL AND YOULE RJ. 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Molecular biology of the cell* 15: 5001-5011.
- LENAERS G, HAMEL C, DELETTRE C, AMATI-BONNEAU P, PROCACCIO V, BONNEAU D, REYNIER P AND MILEA D. 2012. Dominant optic atrophy. *Orphanet journal of rare diseases* 7: 46.
- LI CH AND LEE CK. 1993. Minimum Cross Entropy Thresholding. *Pattern Recognition* 26: 617-625.
- LI CH AND TAM PKS. 1998. An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters* 19: 771-776.
- LILL R, FEKETE Z, SIPOS K AND ROTTE C. 2005. Is there an answer? Why are mitochondria essential for life? *IUBMB life* 57: 701-703.
- LY CV AND VERSTREKEN P. 2006. Mitochondria at the synapse. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 12: 291-299.
- MAJNO G AND JORIS I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 146: 3-15.
- MANNELLA CA. 2000. Introduction: our changing views of mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 32: 1-4.

- MANNELLA CA. 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et biophysica acta* 1763: 542-548.
- MARTINEZ-CABALLERO S, DEJEAN LM, KINNALLY MS, OH KJ, MANNELLA CA AND KINNALLY KW. 2009. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *The Journal of biological chemistry* 284: 12235-12245.
- MCBRIDE HM, NEUSPIEL M AND WASIAK S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology* : CB 16: R551-560.
- MICHEL AH AND KORNMANN B. 2012. The ERMES complex and ER-mitochondria connections. *Biochemical Society transactions* 40: 445-450.
- MILNER DJ, MAVROIDIS M, WEISLEDER N AND CAPETANAKI Y. 2000. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *The Journal of cell biology* 150: 1283-1298.
- MODEL K, MEISINGER C, PRINZ T, WIEDEMANN N, TRUSCOTT KN, PFANNER N AND RYAN MT. 2001. Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nature structural biology* 8: 361-370.
- MONTESSUIT S ET AL. 2010. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 142: 889-901.
- MORRIS RL AND HOLLENBECK PJ. 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *The Journal of cell biology* 131: 1315-1326.
- MUCHMORE SW ET AL. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381: 335-341.
- NEUMANN D. 2010. Untersuchung sub-mitochondrialer Proteinverteilungen in unbehandelten und apoptotischen humanen Zellen mittels STED-Mikroskopie. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- NICHOLSON DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 6: 1028-1042.
- NIFOROU KM, ANAGNOSTOPOULOS AK, VOUGAS K, KITTAS C, GORGOULIS VG AND TSANGARIS GT. 2008. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. *Cancer genomics & proteomics* 5: 63-78.
- OSELLAME LD, BLACKER TS AND DUCHEN MR. 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 26: 711-723.
- PALADE GE. 1952. The fine structure of mitochondria. *The Anatomical record* 114: 427-451.
- PARONE PA, JAMES DI, DA CRUZ S, MATTENBERGER Y, DONZE O, BARJA F AND MARTINOUC JC. 2006. Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Molecular and cellular biology* 26: 7397-7408.
- PERALTA S, WANG X AND MORAES CT. 2012. Mitochondrial transcription: lessons from mouse models. *Biochimica et biophysica acta* 1819: 961-969.
- PERKINS G, RENKEN C, MARTONE ME, YOUNG SJ, ELLISMAN M AND FREY T. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *Journal of structural biology* 119: 260-272.
- PERKINS GA AND ELLISMAN MH. 2011. Mitochondrial configurations in peripheral nerve suggest differential ATP production. *Journal of structural biology* 173: 117-127.
- PERKINS GA, ELLISMAN MH AND FOX DA. 2003. Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications. *Molecular vision* 9: 60-73.
- PERKINS GA, TJONG J, BROWN JM, POQUIZ PH, SCOTT RT, KOLSON DR, ELLISMAN MH AND SPIROU GA. 2010. The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 1015-1026.

- PERRY AJ, RIMMER KA, MERTENS HD, WALLER RF, MULHERN TD, LITHGOW T AND GOOLEY PR. 2008. Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 46: 265-274.
- PETTE D AND STARON RS. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and technique* 50: 500-509.
- PFANNER N ET AL. 2014. Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *The Journal of cell biology* 204: 1083-1086.
- PRETE M, FATONE MC, FAVOINO E AND PEROSA F. 2014. Raynaud's phenomenon: from molecular pathogenesis to therapy. *Autoimmunity reviews* 13: 655-667.
- RABL R ET AL. 2009. Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *The Journal of cell biology* 185: 1047-1063.
- REDDY PH, REDDY TP, MANCZAK M, CALKINS MJ, SHIRENDEB U AND MAO P. 2011. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* 67: 103-118.
- RODRIGUEZ-ENFEDAQUE A, DELMAS E, GUILLAUME A, GAUMER S, MIGNOTTE B, VAYSSIERE JL AND RENAUD F. 2012. zVAD-fmk upregulates caspase-9 cleavage and activity in etoposide-induced cell death of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1823: 1343-1352.
- ROLLAND SG AND CONRADT B. 2010. New role of the BCL-2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Current opinion in cell biology* 22: 852-858.
- SAITO M, KORSMEYER SJ AND SCHLESINGER PH. 2000. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nature cell biology* 2: 553-555.
- SAKAMAKI K AND SATOU Y. 2009. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of fish biology* 74: 727-753.
- SCHINZEL AC, TAKEUCHI O, HUANG Z, FISHER JK, ZHOU Z, RUBENS J, HETZ C, DANIAL NN, MOSKOWITZ MA AND KORSMEYER SJ. 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12005-12010.
- SCHLAME M AND REN M. 2009. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1788: 2080-2083.
- SCORRANO L. 2009. Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1875-1883.
- SCORRANO L, ASHIYA M, BUTTLE K, WEILER S, OAKES SA, MANNELLA CA AND KORSMEYER SJ. 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell* 2: 55-67.
- SHENG ZH. 2014. Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *The Journal of cell biology* 204: 1087-1098.
- SOBELL HM. 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 5328-5331.
- STAGGE F, MITRONOVA GY, BELOV VN, WURM CA AND JAKOBS S. 2013. SNAP-, CLIP- and Halo-tag labelling of budding yeast cells. *PloS one* 8: e78745.
- STOWERS RS, MEGEATH LJ, GORSKA-ANDRZEJAK J, MEINERTZHAGEN IA AND SCHWARZ TL. 2002. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. *Neuron* 36: 1063-1077.
- SUDHOF TC AND RIZO J. 2011. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
- SUEN DF, NORRIS KL AND YOULE RJ. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development* 22: 1577-1590.
- SUZUKI M, YOULE RJ AND TJANDRA N. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103: 645-654.

- TAIT SW AND GREEN DR. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 11: 621-632.
- TAKAHASHI M, CHESLEY A, FREYSSINET D AND HOOD DA. 1998. Contractile activity-induced adaptations in the mitochondrial protein import system. *The American journal of physiology* 274: C1380-1387.
- TAM ZY, CAI YH AND GUNAWAN R. 2010. Elucidating cytochrome C release from mitochondria: insights from an in silico three-dimensional model. *Biophysical journal* 99: 3155-3163.
- THORNBERRY NA AND LAZEBNIK Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- TOBABEN S, THAKUR P, FERNANDEZ-CHACON R, SUDHOF TC, RETTIG J AND STAHL B. 2001. A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* 31: 987-999.
- UTKIN YN. 2013. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom--milestones of discovery. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 62: 50-55.
- VAN NOORDEN CJ. 2001. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta histochemica* 103: 241-251.
- VERSTREKEN P, LY CV, VENKEN KJ, KOH TW, ZHOU Y AND BELLEN HJ. 2005. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47: 365-378.
- VON DER MALSBERG K ET AL. 2011. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Developmental cell* 21: 694-707.
- VOS M, LAUWERS E AND VERSTREKEN P. 2010. Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Frontiers in synaptic neuroscience* 2: 139.
- WAERHAUG O, DAHL HA AND KARDEL K. 1992. Different effects of physical training on the morphology of motor nerve terminals in the rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *Anatomy and embryology* 186: 125-128.
- WALTHER DM AND RAPAPORT D. 2009. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 42-51.
- WANG C AND YOULE RJ. 2009. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics* 43: 95-118.
- WASIAK S, ZUNINO R AND MCBRIDE HM. 2007. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *The Journal of cell biology* 177: 439-450.
- WEBER TA, KOOB S, HEIDE H, WITTIG I, HEAD B, VAN DER BLIEK A, BRANDT U, MITTELBRONN M AND REICHERT AS. 2013. APOOL is a cardiolipin-binding constituent of the Mitofilin/MINOS protein complex determining cristae morphology in mammalian mitochondria. *PLoS one* 8: e63683.
- WEI MC, LINDSTEN T, MOOTHA VK, WEILER S, GROSS A, ASHIYA M, THOMPSON CB AND KORSMEYER SJ. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development* 14: 2060-2071.
- WELLS L, EDWARDS KA AND BERNSTEIN SI. 1996. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *The EMBO journal* 15: 4454-4459.
- WESTERMANN B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology* 11: 872-884.
- WILLIG KI, RIZZOLI SO, WESTPHAL V, JAHN R AND HELL SW. 2006. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440: 935-939.
- WITZEMANN V, CHEVESSIER F, PACIFICI PG AND YAMPOLSKY P. 2013. The neuromuscular junction: selective remodeling of synaptic regulators at the nerve/muscle interface. *Mechanisms of development* 130: 402-411.
- WOOD W, TURMAINE M, WEBER R, CAMP V, MAKI RA, MCKERCHER SR AND MARTIN P. 2000. Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development* 127: 5245-5252.

- WURM CA, NEUMANN D, LAUTERBACH MA, HARKE B, EGNER A, HELL SW AND JAKOBS S. 2011. Nanoscale distribution of mitochondrial import receptor Tom20 is adjusted to cellular conditions and exhibits an inner-cellular gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 13546-13551.
- XIE J, MARUSICH MF, SOUDA P, WHITELEGGE J AND CAPALDI RA. 2007. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS letters* 581: 3545-3549.
- XU XP, ZHAI D, KIM E, SWIFT M, REED JC, VOLKMANN N AND HANEIN D. 2013. Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell death & disease* 4: e683.
- YAMAGUCHI R, LARTIGUE L, PERKINS G, SCOTT RT, DIXIT A, KUSHNAREVA Y, KUWANA T, ELLISMAN MH AND NEWMAYER DD. 2008. Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Molecular cell* 31: 557-569.
- YAMAGUCHI R AND PERKINS G. 2009. Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. *Biochimica et biophysica acta* 1787: 963-972.
- YANG RF, ZHAO GW, LIANG ST, ZHANG Y, SUN LH, CHEN HZ AND LIU DP. 2012. Mitofilin regulates cytochrome c release during apoptosis by controlling mitochondrial cristae remodeling. *Biochemical and biophysical research communications* 428: 93-98.
- YOULE RJ AND VAN DER BLIEK AM. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337: 1062-1065.
- YUAN S AND AKEY CW. 2013. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 21: 501-515.
- ZENISEK D AND MATTHEWS G. 2000. The role of mitochondria in presynaptic calcium handling at a ribbon synapse. *Neuron* 25: 229-237.
- ZERBES RM, VAN DER KLEI IJ, VEENHUIS M, PFANNER N, VAN DER LAAN M AND BOHNERT M. 2012. Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biological chemistry* 393: 1247-1261.
- ZHOU L AND CHANG DC. 2008. Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *Journal of cell science* 121: 2186-2196.
- ZICK M, RABL R AND REICHERT AS. 2009. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 5-19.

5 Anhang

5.1 Verwendete Farbtabellen

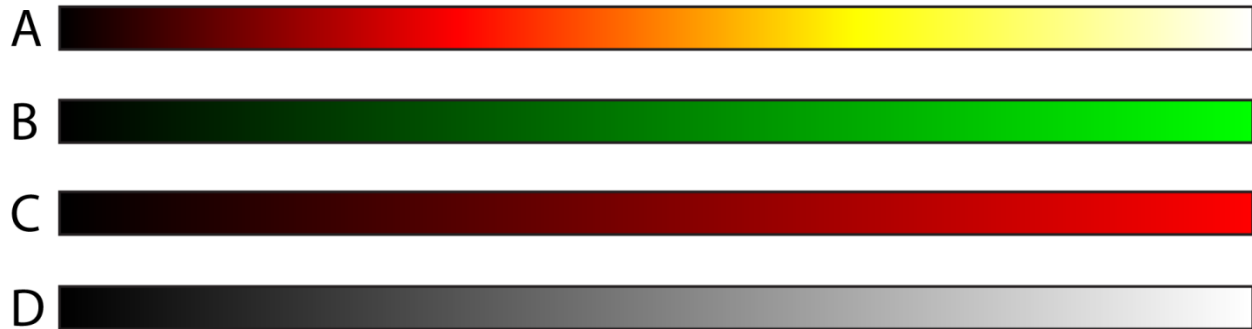


Abbildung 5.1: Verwendete Farbtabellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in linearen und nichtlinearen Farbtabellen abgebildet. Folgende Farbverläufe wurden für Ein- und Mehrfarben Bilder verwendet: *fire* (A), grün (B), rot (C), Graustufen (D).

5.2 Verwendeter Proteingrößenstandard

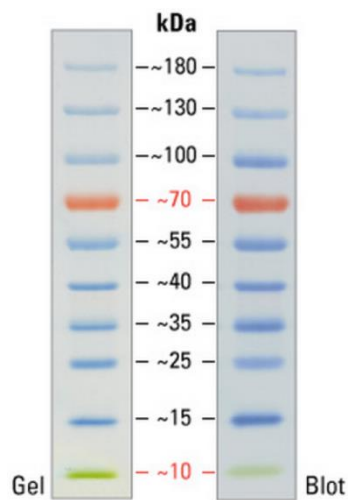


Abbildung 5.2: Verwendeter Proteingrößenstandard. Im Rahmen der Western Blot Experimente wurde die Größe der detektierten Proteine anhand des PageRuler Prestained Protein Ladder bestimmt. Abbildung aus: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/26616>

5.3 Verwendete Plasmide

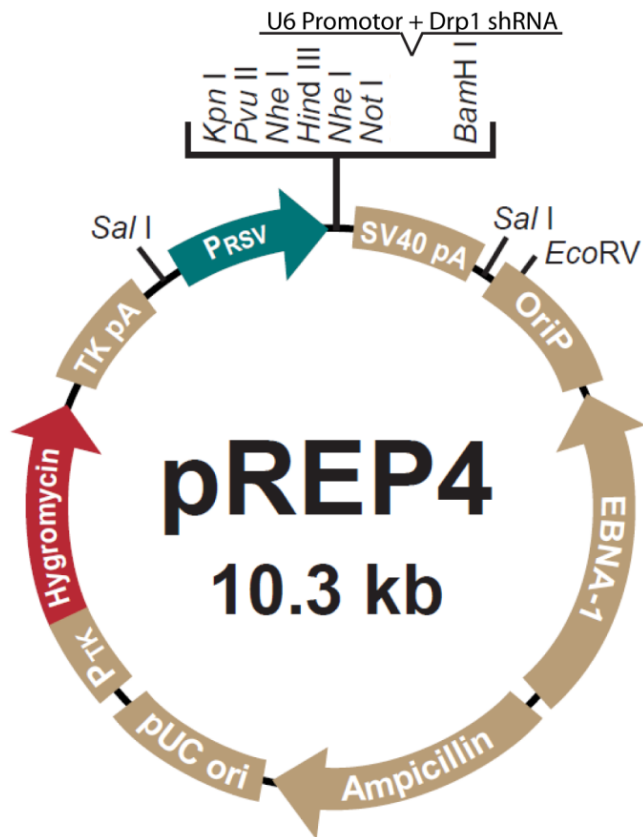


Abbildung 5.3: Plasmidkarte von pREP4-U6-Drp1-shRNA. Die Herunterregulierung von Drp1 wurde durch Transfektion des pREP4-U5-Drp1-shRNA Vektors und anschließender Selektion mit Hygromycin B erreicht. Die spezifische shRNA gegen Drp1 wurde unter dem U6-Promotor exprimiert. Plasmid aus (Lee et al. 2004). Abbildung bearbeitet von: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/rep4_man.pdf

5.4 Heterogene Morphologie neuromuskulärer Synapsen

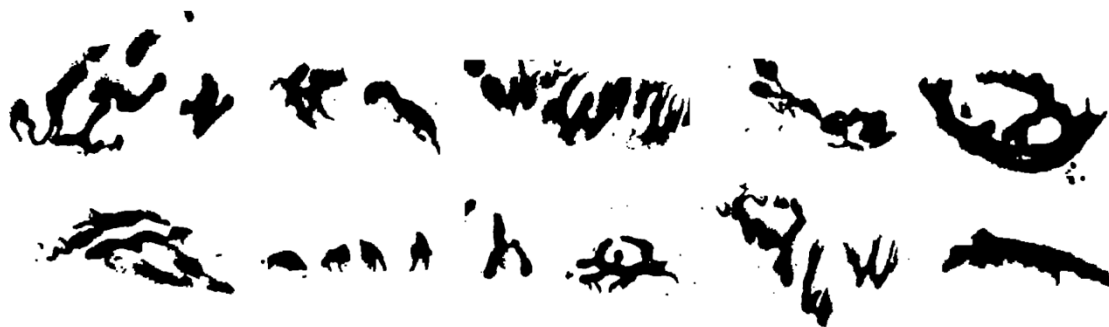
A.) schnelle Läufer



B.) mittlere Läufer



C.) langsame Läufer



D.) Kontrollgruppe

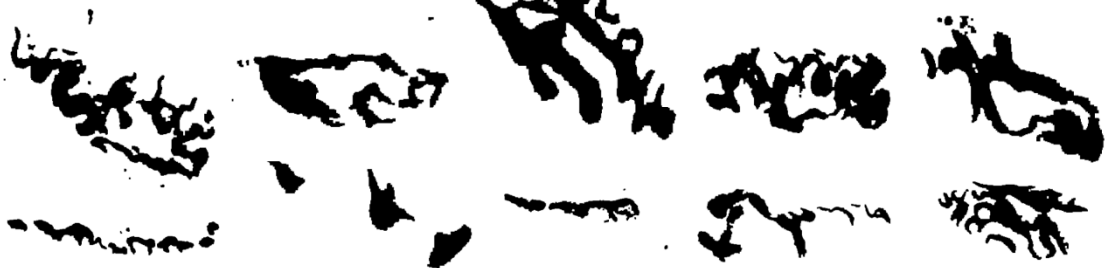
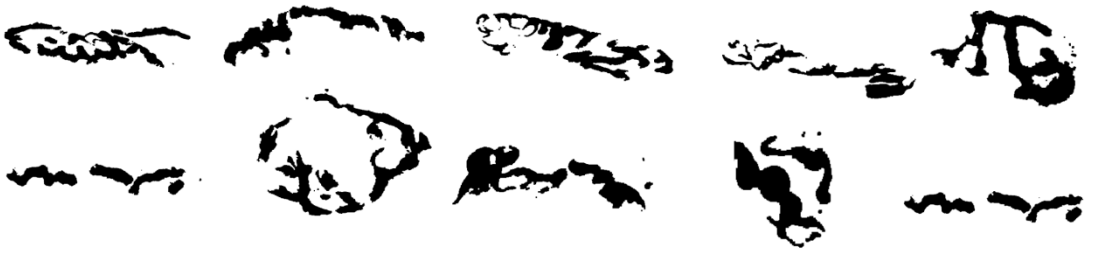


Abbildung 5.4: Heterogenität neuromuskulärer Synapsen in Soleus. Anhand der Maximalprojektion der α -Bungarotoxin Färbung wurden automatisch Masken generiert. Dargestellt ist die hohe Heterogenität der Flächen des Soleus.

A.) schnelle Läufer



B.) mittlere Läufer



C.) langsame Läufer



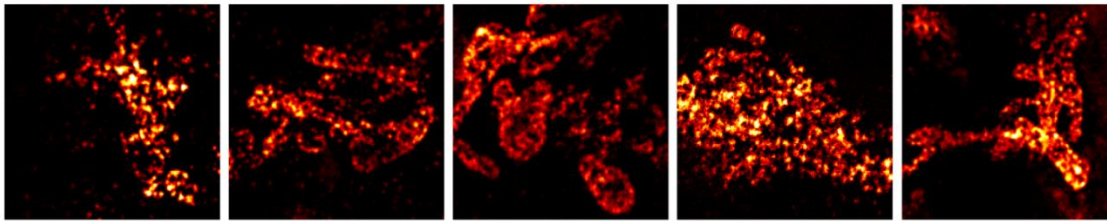
D.) Kontrollgruppe



Abbildung 5.5: Heterogenität neuromuskulärer Synapsen im Tibialis anterior. Die Masken wurden automatisch anhand des α -Bungarotoxin Signals erstellt. Zu sehen ist die hohe Heterogenität der Flächen des Tibialis anterior

5.5 Heterogene Proteinverteilung von Mic60

A.) Mic60 in Soleus



B.) Mic60 in Tibialis anterior

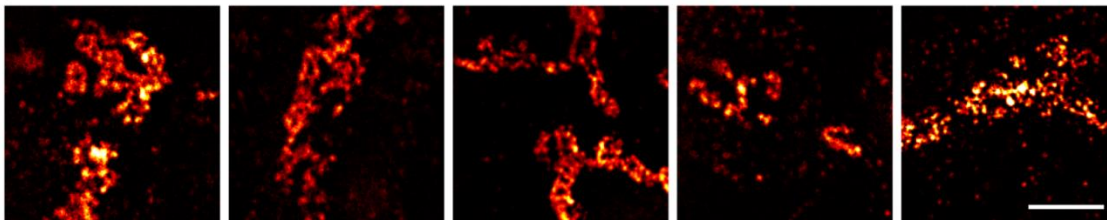


Abbildung 5.6: Mic60 im Soleus und Tibialis anterior. STED-mikroskopische Aufnahmen von Mic60 im Soleus (A) und Tibialis anterior (B) der Kontrollgruppe. Zu sehen sind die unterschiedlich dichten Proteincluster beider Muskelgruppen. (Größenbalken: 1 μm)

5.6 Kontrollfärbung mit α -Bungarotoxin

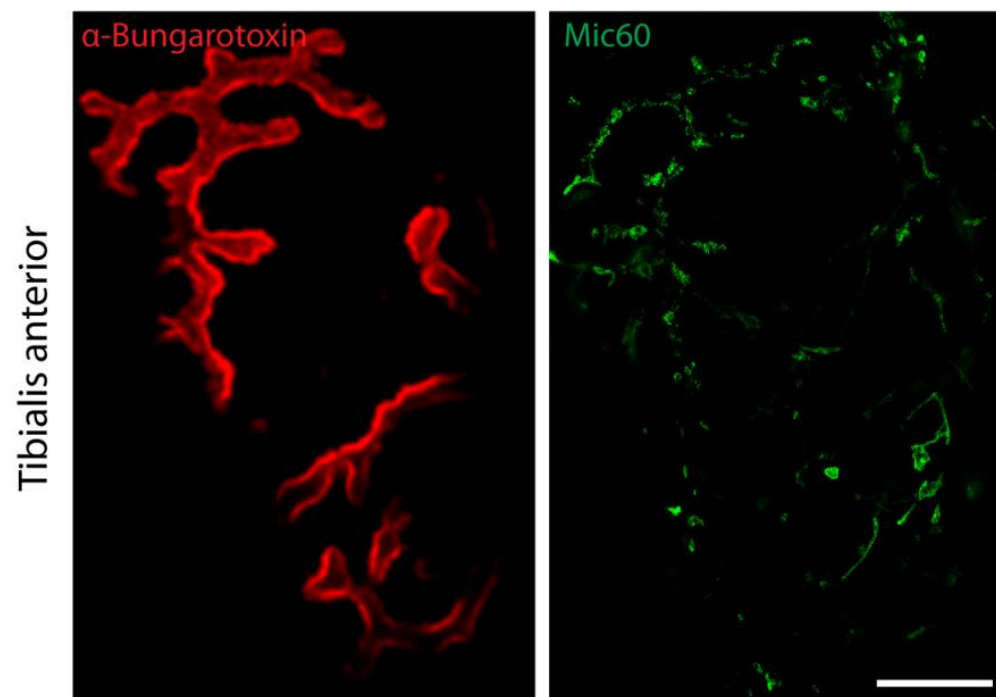


Abbildung 5.7: Kontrollfärbung mit α -Bungarotoxin. Die Zuordnung der Mitochondrien zur neuromuskulären Synapse wurde anhand der konfokalen Aufnahme von Alexa Fluor 555-gekoppeltem α -Bungarotoxin über mehrere Ebenen mit anschließender Maximalprojektion durchgeführt. (Größenbalken: 10 μm)

5.7 Heterogenität der Bax-Ringe

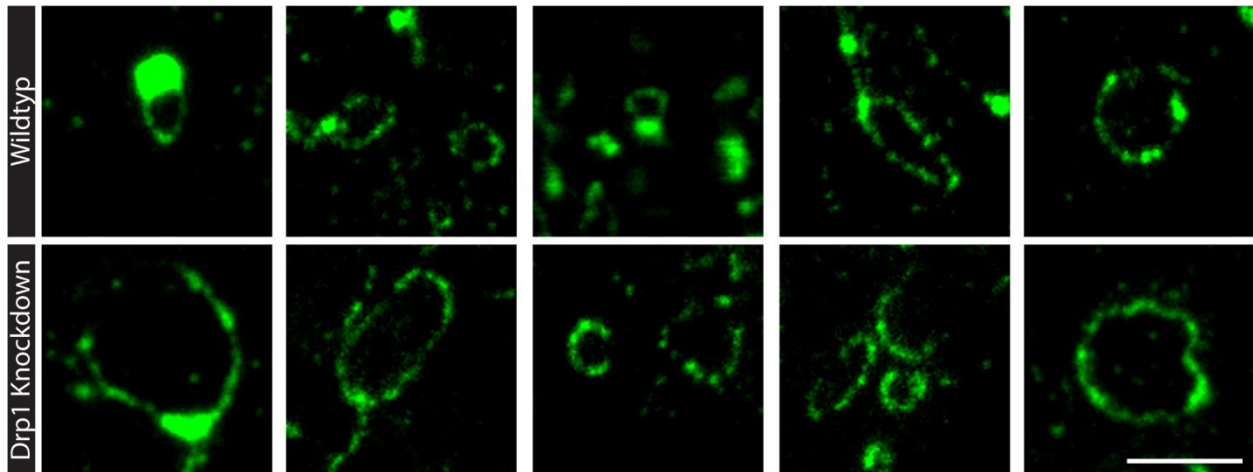


Abbildung 5.8: Heterogenität der Bax-Ringe. Apoptotische U2OS Zellen (Wildtyp und Drp1 Knockdown) wurden mit Antikörper gegen aktiviertes Bax dekoriert und mittels STED-Mikroskopie aufgenommen. Dargestellt ist die Vielzahl unterschiedlich großer Durchmesser der Bax-Ringe. (Größenbalken: 1 μm)

5.8 Kolokalisierung von Mic60 mit weiteren Komponenten des MICOS Komplexes

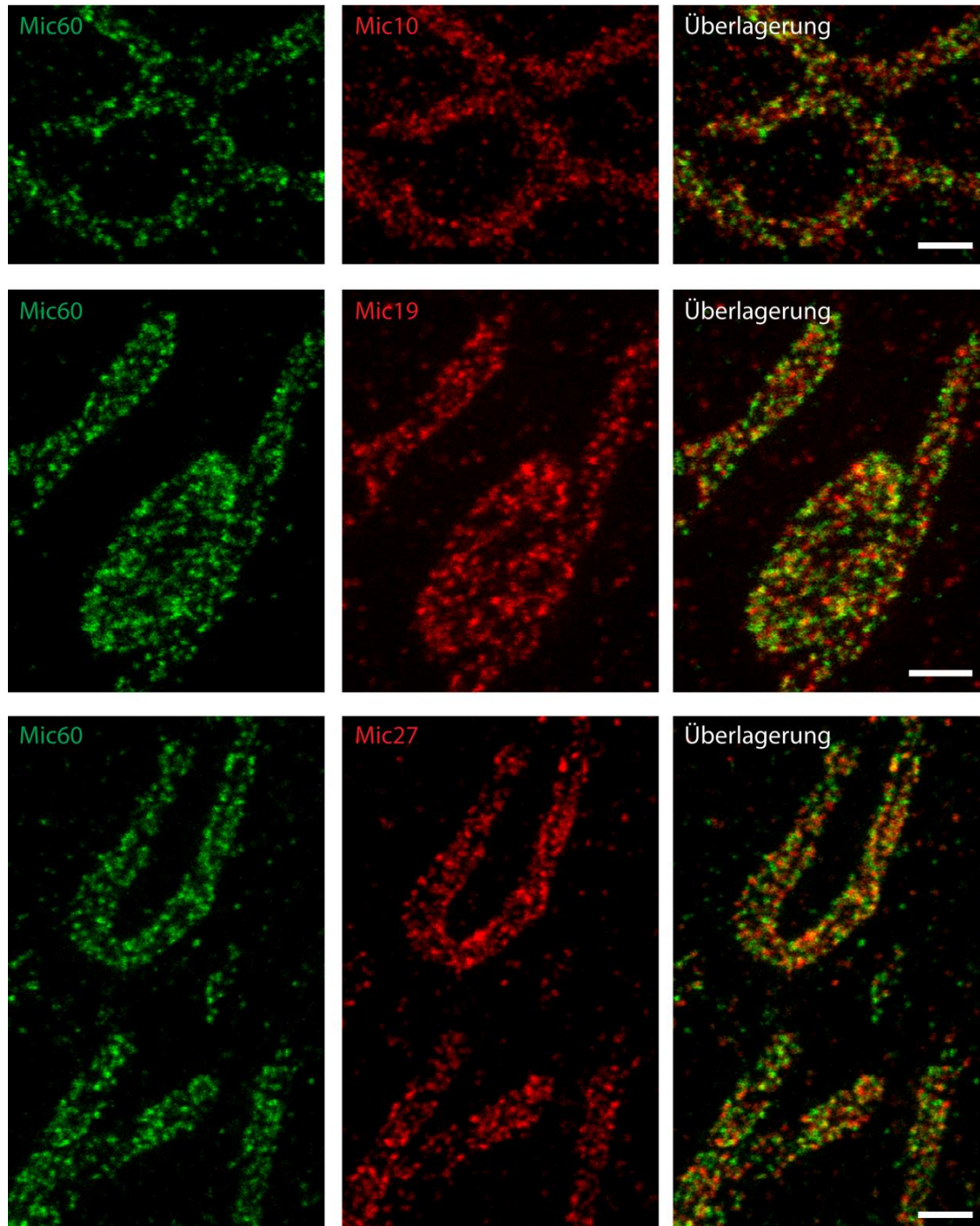


Abbildung 5.9: Zweifarbige STED-Aufnahmen von Mic10, Mic19 und Mic27 mit Mic60. Die Kolokalisierung der MICOS-Komponenten fand anhand indirekter Immunfluoreszenz gegen die Komponenten mit anschließender Aufnahme mittels STED-Mikroskopie statt. Eine rein qualitative Bewertung der Kolokalisierung ist anhand der Bilder nicht möglich. (Größenbalken: 0,5 μm)

5.9 Kontrollfärbung der Acetylcholin-Rezeptoren im murinen Rückenmark

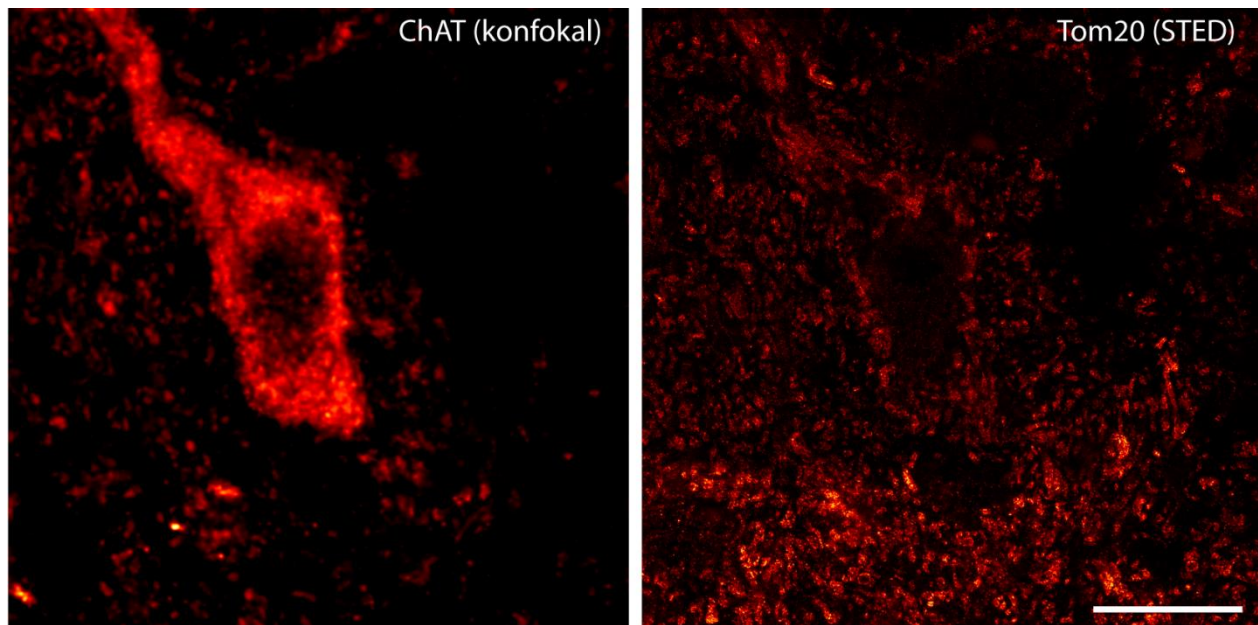


Abbildung 5.10: Tom20 in murinem Rückenmark. Eine Zuordnung der Mitochondrien zu den Motoneuronen des Rückenmarks fand anhand der indirekten Immunfluoreszenz gegen Choline Acetyltransferase (ChAT) und Tom20 statt. (Größenbalken: 10 μm)

6 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

6.1 Wissenschaftliche Publikationen

Zink, S., **Große L.**, Freikamp, A., Bänfer, S., Müksch F., Jacob, S. (2012) "Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells." J Cell Sci. 2012 Dec 15;125(Pt 24):5998-6008. doi: 10.1242/jcs.109470.

6.2 Konferenzbeiträge

Meeting of the "Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain Cluster of Excellence 171 – DFG Research Center 103", Bad Sooden-Allendorf 2013

Stagge, F., Jans, D.C., **Große, L.**, Grotjohann, T., Wurm, C.A., Brakemann, T., Marquardt, T., Hell S., Jakobs, S.

Focusing on mitochondria with STED and RESOLFT nanoscopy

„Labeling & Nanoscopy“ Konferenz, DKFZ Heidelberg 2014

Große, L., Wurm, C.A., Neumann, D., Jakobs, S.

Mitochondrial Protein Distributions during Apoptosis

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Jakobs für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit erstellen zu können und für die freundliche Übernahme des Referats. Seine fachlichen Ratschläge und viele Diskussionen während meiner Dissertation haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Schuh für die Übernahme des Korreferats und die freundliche Begleitung der gesamten Arbeit. Insbesondere für die vielen konstruktiven Diskussionen möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Prüfungskommission: Herrn Dr. Wilfried Kramer, Herrn Prof. Dr. Michael Kessel, Herrn Dr. Klopfenstein und Herrn Prof. Dr. Peter Rehling, für die Begutachtung der Arbeit und die freundliche Bereitschaft, der Verteidigung beizuwohnen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan W. Hell möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung NanoBiophotonik bedanken und für die Möglichkeit in einer internationalen und interdisziplinären Gruppe meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Ein sehr herzliches Dankeschön richtet sich an all meinen Kollegen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian A. Wurm für die gute Zusammenarbeit, die interessanten Diskussionen und seine fachlichen Hilfen bedanken. Auch Herrn Dr. Daniel Jans möchte ich danken. Ohne seine Hilfe wären einige Gedanken nicht gedacht worden.

Mein Dank geht auch Dr. Till Marquardt und Camille Lancelin vom European Neuroscience Institute in Göttingen für die Zusammenarbeit mit den trainierten Mäusen.

Ich danke besonders auch unseren guten Seelen in der Abteilung NanoBiophotonik: Rita Schmitz-Salue, Sylvia Löbermann, Tanja Gilat, Ellen Rothermel, Marco Roose, Jay Jethwa und dem gesamten Sekretariat für ihre Geduld mit mir und ihre Unterstützung, sowohl fachlich als auch menschlich.

Ein großer Dank geht natürlich auch an all meinen Mitstreitern, den Biologen der „Mitochondrial Structure and Dynamics“ Gruppe, den „RSFP“lern und auch meinen lieben Physikern, die meine Zeit in der Abteilung sowohl während den fachlichen Diskussionen als auch beim Bier danach besonders gemacht haben. Vielen Dank euch allen, die ich hier namentlich nicht einzeln aufzählen kann!

Ich bedanke mich bei Alexander Pappe, der mich mit seiner Ruhe und Zuversicht vor etlichen Nervenzusammenbrüchen bewahrt hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung bedanken. Ein großer Dank geht dabei an meine Eltern, meine Schwestern und natürlich an meine lieben Neffen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Lena Große
Adresse Geismar Landstraße 38
37083 Göttingen (Deutschland)
+49 176 32646836
E-Mail lena.grosse@googlemail.com
Geburtsdatum und -ort 21. Oktober 1985 in Oberndorf am Neckar (Deutschland)

Ausbildung

09/2011 – 07/2015 Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen (Deutschland)
Abteilung NanoBiophotonik (Prof. Stefan Hell)
Arbeitsgruppe „Mitochondrial Structure and Function“ (Prof. Stefan Jakobs)
Promotion in Biologie

2005 – 2012 Philipps-Universität Marburg (Deutschland)
Studium der Humanbiologie
- Hauptfach: Biochemie/Zellbiologie
- Nebenfach: Molekularbiologie

1995 – 2005 Gymnasium am Rosenberg, Oberndorf a.N. (Deutschland)

Auslandspraktika

02/2009 – 04/2009 University of Utah (USA)
„Pharmaceutics and Pharmaceutical Chemistry“
Arbeitsgruppe von Dr. Lim

09/2008 – 12/2008 IRCM, Montreal (Kanada)
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Möröy