

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE
PROF. DR. MED. RICHARD WARTH
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**BESTIMMUNG MITOCHONDRIALER UND LYSOSOMALER
PARAMETER IM ZUGE DER UNTERSUCHUNG EINES
HEREDITÄREN FANCONI-SYNDROMS**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

HANNES DÖLLERER

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE
PROF. DR. MED. RICHARD WARTH
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**BESTIMMUNG MITOCHONDRIALER UND LYSOSOMALER
PARAMETER IM ZUGE DER UNTERSUCHUNG EINES
HEREDITÄREN FANCONI-SYNDROMS**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

HANNES DÖLLERER

2020

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Markus Reichold
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Christian Wetzel
Tag der mündlichen Prüfung	28.08.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 3 -
Zusammenfassung.....	- 3 -
1 Einleitung.....	- 4 -
1.1 Vorarbeiten	- 4 -
1.1.1 Das Fanconi-Syndrom	- 4 -
1.1.2 GATM.....	- 6 -
1.2 Aufbau und Funktion von Mitochondrien.....	- 8 -
1.2.1 Allgemeiner Aufbau.....	- 8 -
1.2.2 Die Atmungskette.....	- 9 -
1.3 Produktion Reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) durch Mitochondrien.....	- 10 -
1.3.1 Orte der mROS-Entstehung.....	- 10 -
1.3.2 Eliminierung von mitochondrialen und intrazellulären ROS.....	- 12 -
1.4 Autophagie und Mitophagie.....	- 13 -
1.4.1 Allgemeines	- 13 -
1.4.2 Visualisierung von Mitophagie	- 14 -
1.5 Lysosomen und vakuoläre H⁺-ATPase	- 15 -
1.6 Einordnung der bisherigen Erkenntnisse in den Kontext der Erkrankung....	- 17 -
2 Zielsetzung	- 19 -
3 Material und Methoden	- 20 -
3.1 Material	- 20 -
3.1.1 Geräte	- 20 -
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	- 20 -
3.1.3 Chemikalien	- 21 -
3.1.4 Farbstoffe.....	- 22 -
3.1.5 Antikörper.....	- 22 -
3.1.6 Plasmid	- 22 -
3.1.7 Substanzen Zellkultur	- 22 -
3.1.8 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz	- 23 -
3.1.9 Substanzen BD Accuri™ C6 Flow Cytometer.....	- 23 -
3.1.10 LLC-PK1 Zellen.....	- 23 -
3.2 Methoden.....	- 24 -
3.2.1 Zellkultur	- 24 -
3.2.2 Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	- 24 -
3.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie	- 24 -
3.2.4 Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	- 27 -
3.2.5 Ablösevorgang für die durchflusszytometrischen Messungen.....	- 27 -
3.2.6 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoView™ 633 und MitoTracker® Green zur Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials und des mitochondrialen Gehalts.....	- 28 -
3.2.7 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoSox™ Red zur Quantifizierung der Menge an intramitochondrialen ROS.....	- 29 -
3.2.8 Färben von LLC-PK1-Zellen mit H2DCFDA zur Quantifizierung der Menge an intrazellulären ROS.....	- 31 -
3.2.9 Färben von LLC-PK1-Zellen mit LysoTracker® Green zur Quantifizierung des lysosomalen Gehalts.....	- 32 -
3.2.10 Visualisierung der durchflusszytometrischen Färbungen	- 33 -
3.2.11 Behandlung von LLC-PK1 _{T336A} -Zellen mit Chloroquin in aufsteigenden Konzentrationen.....	- 35 -
3.2.12 Transiente Transfektion LLC-PK1 _{WT} -Zellen mit humanem LC3B-GFP (hLC3B-GFP)	- 35 -

3.2.13 Färbung zur Detektion von Mitophagie	- 36 -
3.2.14 Durchflusszytometrie	- 36 -
3.2.15 Auswertung der Ergebnisse und Statistik	- 40 -
4 Ergebnisse	- 41 -
4.1 Autofluoreszenz	- 41 -
4.2 Mitochondrialer Gehalt und Membranpotential	- 42 -
4.2.1 Demonstration der MitoTracker® Green/MitoView™ 633 – Färbungen	- 42 -
4.2.2 Visualisierung des FCCP-Effekts	- 43 -
4.2.3 Mitochondrialer Gehalt und mitochondriales Membranpotential (Durchflusszytometrie)	- 44 -
4.3 Intramitochondriale ROS	- 47 -
4.3.1 Demonstration der MitoSox™ Red Färbung	- 47 -
4.3.2 Bestimmung der Menge an mROS mittels Durchflusszytometrie	- 48 -
4.4 Intrazelluläre ROS	- 49 -
4.4.1 Demonstration der H ₂ DCFDA-Färbung	- 49 -
4.4.2 Bestimmung intrazellulärer ROS	- 50 -
4.5 Bestimmung der lysosomalen Menge	- 52 -
4.5.1 Demonstration der LysoTracker® Green-Färbung	- 52 -
4.5.2 Bestimmung des lysosomalen Gehalts	- 54 -
4.5.3 Behandlung von LLC-PK1 _{T336A} -Zellen mit Chloroquin in aufsteigenden Konzentrationen	- 56 -
4.6 Mitophagie Vorversuche	- 58 -
5 Diskussion	- 60 -
5.1 Mitochondrialer Gehalt und mitochondriales Membranpotential	- 60 -
5.2 ROS-Produktion: Mitochondriale und zelluläre ROS	- 63 -
5.3 Lysosomaler Gehalt	- 65 -
5.4 Detektion von Mitophagie in LLC-PK1_{T336A}-Zellen	- 68 -
5.5 Einordnung der Ergebnisse in den klinischen Kontext	- 69 -
8. Literaturverzeichnis	- 71 -
9. Abbildungsverzeichnis	- 76 -
10. Tabellenverzeichnis	- 77 -
11. Abkürzungsverzeichnis	- 78 -
Danksagung	- 80 -

Zusammenfassung

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Analyse mitochondrialer und lysosomaler Parameter im Zuge der Untersuchung eines hereditären Fanconi-Syndroms, welches aufgrund einer Mutation im Gen der mitochondrialen Glycin-Amidino-transferase (GATM) entsteht. Aufbauend auf umfangreichen Vorarbeiten [1] wurde mit Hilfe eines bereits etablierten Zellmodells (stabil transfizierte, induzierbare LLC-PK1-Zellen) die Mutation p.T336A (LLC-PK1_{T336A}-Zellen), eine von vier identifizierten und krankheitsverursachenden Mutationen, weiterführend mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die GATM-Mutation führt in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zur Ausbildung elongierter, spindelförmiger Riesenmitochondrien, welche sich deutlich von der physiologischen Mitochondrienmorphologie unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass diese abnormen Mitochondrien in Summe dem mitochondrialen Gehalt in LLC-PK1_{WT}-Zellen entsprechen. Jedoch zeigte sich auch, dass die mutierten Mitochondrien tendenziell ein reduziertes mitochondriales Membranpotential aufwiesen, was einer Überalterung geschuldet sein könnte. Wie bereits vorab [1] beobachtet wurde, konnte erneut eine erhöhte Produktion mitochondrialer Reaktiver Sauerstoffspezies (mROS) in LLC-PK1_{T336A}-Zellen gemessen werden, wohingegen sich die Menge an intrazellulären ROS zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen nicht unterschied. Es ergaben sich Hinweise, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen womöglich die gesteigerte mROS-Produktion mit einer Erhöhung an intrazellulären Antioxidantien in Form des Proteins L-FABP kompensierten. Unklar bleibt, inwiefern die abnormen Mitochondrien autophagozytiert werden können. Eine vorab beobachtete erhöhte mRNA-Expression von Untereinheiten der lysosomalen V-ATPase ließ vermuten, dass der Gehalt an sauren Kompartimenten in LLC-PK1_{T336A}-Zellen erhöht sein könnte, was jedoch nicht gezeigt werden konnte. Der Grund der erhöhten mRNA-Expression der V-ATPase bleibt folglich bis dato ungeklärt. Interessant wäre, ob die V-ATPase als Kompensation auf einen erniedrigten intrazellulären pH vermehrt in die Zellmembran eingebaut wird. Wie bereits in den Vorarbeiten postuliert wurde, wird vermutet, dass die erhöhte ROS-Produktion durch eine Induktion von Entzündungsreaktionen und Apoptose ursächlich für die Erkrankung ist. In weiterführenden Untersuchungen könnte die Erprobung von ROS-reduzierenden „mitochondrial targeted antioxidants“ eine mögliche Therapieoption darstellen, um die progrediente Niereninsuffizienz zu verzögern.

1 Einleitung

1.1 Vorarbeiten

In Vorarbeiten [1] konnte neben der Identifikation des krankheitsverursachenden Proteins Glycin-Amidino-transferase (GATM) gezeigt werden, welche pathophysiologischen Auswirkungen eine Mutation in *GATM* hat. Schlussendlich konnte ein Pathomechanismus (1.1.2) postuliert werden, welcher vermutlich bei betroffenen Patienten für die Ausbildung eines renalen Fanconi-Syndroms verantwortlich ist. Hierbei führt der zunehmende Ausfall der proximal-tubulären Rückresorption zu einem massiven Verlust von lebenswichtigen Substraten (z.B. Elektrolyte, Proteine, Glucose) und in Folge zu einer Störung des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts.

Prof. Robert Kleita (London) konnte fünf Familien mit dieser Form des renalen Fanconi-Syndroms identifizieren, welches sich bereits im Kindesalter (ab 18 Monaten) manifestierte. Die betroffenen Patienten zeigten allesamt Anzeichen einer proximal-tubulären Resorptionsstörung in Form von Glucosurie, Hyperphosphaturie, Hyperaminoacidurie, „low-molecular-weight“ Proteinurie und metabolischer Azidose. Für das Fanconi-Syndrom klassische Knochendeformitäten, wie Rachitis und Osteomalazie [2, 3], welche einem chronischen Phosphat- und Calciummangel zugrunde liegen, konnten hingegen nicht beobachtet werden. Die Abnahme der proximal-tubulären Rückresorption sowie eine begleitende Fibrosierung der Niere (beobachtet in Patientenbiopsien und einer post mortem Patientenniere) führten im Verlauf der Erkrankung zu einer progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zu einem terminalen Nierenversagen. Im Endstadium der Erkrankung war eine Dialyse bzw. eine Nierentransplantation indiziert.

1.1.1 Das Fanconi-Syndrom

Eine generalisierte Störung der proximalen Resorptionsfähigkeit der Niere führt zu einem gravierenden Verlust für den menschlichen Organismus wichtiger Substrate. Der daraus folgende Symptomkomplex aus Glukosurie, Hypophosphatämie durch Hyperphosphaturie, Aminoacidurie, „low-molecular-weight“ Proteinurie, Hypouricaemie, Hypokaliämie, metabolischer Azidose und Polyurie wird als Fanconi-Syndrom bezeichnet.[4, 5]

Der genannte Symptomkomplex ergibt sich aufgrund der vielfältigen Aufgaben des proximalen Tubulus, der sich direkt dem Nierenkörperchen anschließt und für den Großteil der tubulären Rückresorption aus dem glomerulären Ultrafiltrat verantwortlich ist. Entlang des proximalen Tubulus werden physiologischerweise circa 60-70 % des filtrierte Natriumchlorids (NaCl) und Wassers (H₂O), 70-90% des Bicarbonats (HCO₃⁻), 99 % der Glucose, 65 % des Phosphats und >98 % der Aminosäuren rückresorbiert.[6] Als Triebkraft für diese Resorptionsprozesse dient ein durch die basolateral gelegene Na⁺/K⁺-ATPase erzeugter elektrochemischer Gradient. Hierbei werden unter Verbrauch von ATP drei Na⁺-Ionen im Austausch gegen zwei K⁺-Ionen aus der Zelle transportiert. Angetrieben durch den elektrochemischen Gradienten werden die zu resorbierenden Stoffe sekundär aktiv und Na⁺-gekoppelt transportiert - hierzu existieren eine Vielzahl spezifischer Transporter. Zudem sorgt in manchen Abschnitten ein transepitheliales Potential für zusätzliche Triebkräfte, die eine parazelluläre Resorption ermöglichen. Geladene Moleküle (Chlorid, Magnesium, etc.) und osmotisch folgend H₂O können hierbei durch die lockeren Zellverbindungen (sog. „tight-junctions“) der Tubulusepithelzellen resorbiert werden.[7, 8] Auch kleine Proteine (<Albumin, ca. 69 kDa) können die glomeruläre Filtrationsbarriere überwinden und erscheinen so im Primärharn. Entlang des proximalen Tubulus werden diese Proteine mittels luminaler Endozytose in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen und somit resorbiert.[9] Um diese massive Rückresorption bewerkstelligen zu können, bedarf es einer großen Menge an Energie, welche durch die Mitochondrien bereitgestellt wird. Im proximalen Tubulus zeigen sich zahlreiche Invaginationen der basolateralen Zellmembran, in welchen sich die Mitochondrien palisadenartig aufreihen.[7]

Die Auslöser einer Funktionsstörung des proximalen Tubulus können vielseitig sein. Man unterscheidet hereditäre Formen von erworbenen Formen. Zu den hereditären Formen zählen Erkrankungen wie die Zystinose, Mitochondriopathien, Tyrosinämie, Galactosämie, hereditäre Fructoseintoleranz, M. Wilson und Dent's disease. Erworbene Formen des Fanconi-Syndroms können unter anderem durch toxische Substanzen wie Medikamente oder Schwermetalle ausgelöst werden.[4, 5]

Bereits 2014 (*Klootwijk et al.*) konnte gezeigt werden, dass eine Mutation des peroxisomalen Enzyms EHHADH Auslöser einer Mitochondriopathie und daraus resultierend eines hereditären renalen Fanconi-Syndrom ist. Die Mutation verursacht hierbei fälschlicherweise einen Import des peroxisomalen Proteins EHHADH in Mitochondrien, wo es mitochondriale Proteine der β -Oxidation stört. Die dadurch gestörte und reduzierte Energieproduktion führt zu einer pathologischen Einschränkung der proximal-tubulären Rückresorption.[5]

1.1.2 GATM

In den vorausgehenden Arbeiten [1] der Arbeitsgruppe um Prof. Warth/PD Dr. Reichold in Kooperation mit Prof. Robert Kleta (London) konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, welches durch Mutation zu einer Mitochondriopathie und einem autosomal dominant vererbten Fanconi-Syndrom führt. Hierbei handelte es sich um das Gen der Glycin-Amidino-transferase (GATM). Die mitochondriale Glycin-Aminidino-transferase katalysiert den ersten Schritt der Kreatin-Biosynthese. Hierbei reagiert Arginin mit Glycin zu Guanidinoacetat, welches im Anschluss durch Methylierung der Amidinogruppe zu Kreatin umgewandelt wird.[10] Im Laufe der Untersuchungen konnten bei 28 Patienten aus fünf Familien vier Mutationen des *GATM* (p.T336A, p.T336I, p.P320S, p.P341L) identifiziert werden. Innerhalb einer Familie existierte jeweils nur eine der vier Mutationen, welche allesamt einem autosomal dominanten Erbgang mit voller Penetranz unterliegen und somit bei heterozygoten Trägern zur Ausbildung eines Fanconi-Syndroms führten.

Bei Überexpression von mutiertem *GATM* in porcinen proximalen Tubuluszellen (LLC-PK1) zeigte sich eine stark veränderte Mitochondrienmorphologie. In Zellen mit der überexprimierten Wildtyp-Form von *GATM* (LLC-PK1_{WT}) bildete sich ein physiologisches mitochondriales Netzwerk aus. Hingegen zeigten sich in Zellen, welche das mutierte *GATM* überexprimierten (LLC-PK1_{MUT}), neben Mitochondrien physiologischer Morphologie stark elongierte, spindelförmige Riesenmitochondrien (Abbildung 1). Innerhalb dieser veränderten Mitochondrien konnten elektronenmikroskopisch lange Filamente beobachtet werden, welche zumindest zum Teil aus mutiertem *GATM* aufgebaut waren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Mutationen in *GATM* zu einer Ausbildung neuer Protein-Protein-Interaktionsstellen führt. Dies ermöglicht eine kettenartige Verknüpfung des *GATM* mit sich selbst und

damit einhergehend die Ausbildung der beschriebenen intramitochondrialen GATM-Filamente.

Aufgrund dieser Beobachtungen und weiterführender Untersuchungen konnte ein Pathomechanismus postuliert werden, welcher vermutlich die Ursache des Funktionsverlustes der proximalen Tubuli und Auslöser des Fanconi-Syndroms ist.

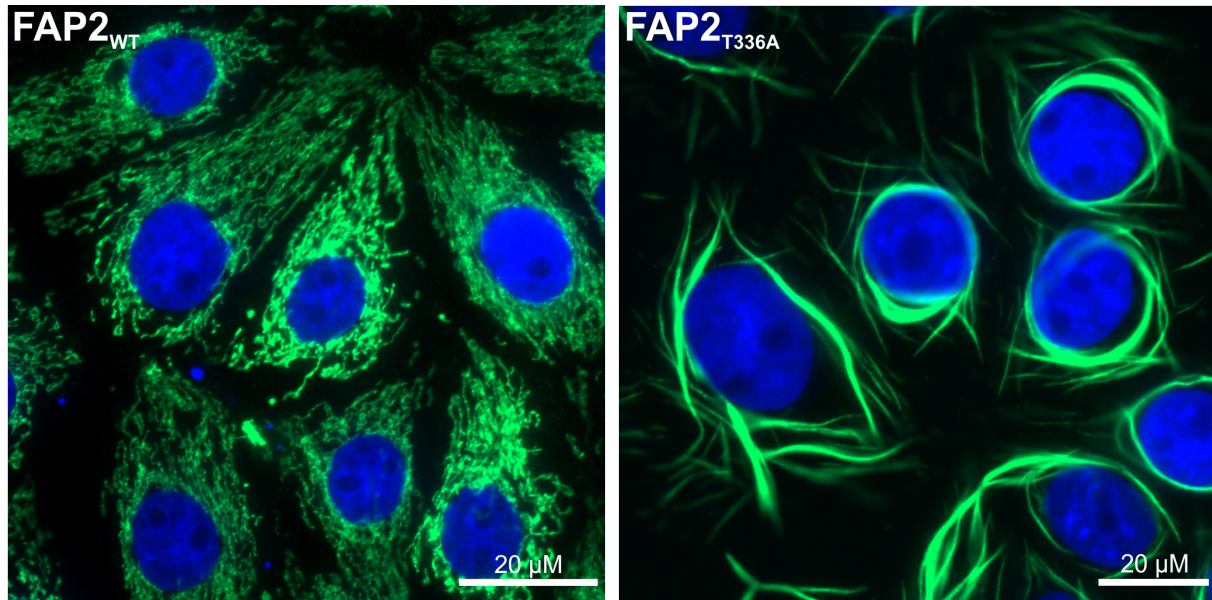


Abbildung 1: Vergleich zwischen LLC-PK1-Zellen, die *GATM*-Wildtyp und eine der *GATM*-Mutationen (T336A) überexprimieren

Zu sehen sind LLC-PK1-Zellen, welche entweder Wildtyp-*GATM* (*GATM_{WT}*) oder das mutierte *GATM* (hier *GATM_{T336A}*) überexprimieren. Innerhalb der Zellen konnte das mitochondrial lokalisierte *GATM* (grün) mittels Immunfluoreszenz angefärbt werden. Die Zellkerne sind blau dargestellt. Im Gegensatz zu LLC-PK1_{WT}-Zellen, welche ein physiologisches mitochondriales Netzwerk ausbauen, zeigen sich in LLC-PK1_{T336A}-Zellen elongierte, spindelförmige Riesenmitochondrien.

1.1.2.1 Vermuteter Pathomechanismus des *GATM*-induzierten Fanconi-Syndroms

In den Vorarbeiten [1, 11] konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien mit intramitochondrialen *GATM*-Filamenten in LLC-PK1_{MUT}-Zellen im Gegensatz zu Mitochondrien mit Wildtyp-*GATM* auch über mehrere Wochen nicht abgebaut werden konnten. Es wird deshalb vermutet, dass durch die intramitochondrialen *GATM*-Filamente eine Fission der Mitochondrien und damit eine Mitophagie behindert wurde (siehe hierzu 1.4). Infolgedessen kam es zu einer Überalterung der Mitochondrien, welche mit einer gesteigerten ROS-Produktion einhergeht. Vermutlich führen die Überalterung der Mitochondrien, die intramitochondrialen Filamente und die erhöhte ROS-Produktion zu Apoptose und einer Induktion des NLRP3-Inflammasoms. Der dadurch ausgelöste chronische Entzündungsprozess induziert vermutlich neben der Schädigung der betroffenen Zellen eine progrediente, die ganze Niere betreffende

Fibrosierung des Nierenparenchyms, was in Patienten-Biopsien beobachtet werden konnte. Die beschriebenen Schädigungen der proximalen Tubuluszellen sind wahrscheinlich Ursache des tubulären Funktionsverlusts, wodurch sich bei den Patienten klinisch ein Fanconi-Syndrom zeigt.

1.2 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Funktion von Mitochondrien liegt, werden diese im Folgenden in ihrem Aufbau und ihrer Funktion beschrieben.

1.2.1 Allgemeiner Aufbau

Mitochondrien, bekannt als „Kraftwerke der Zelle“, sind wichtige Organellen der Energieproduktion und stellen den Großteil der zellulären Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereit, welches auch als direktes Produkt aus der Glykolyse und dem Citratzyklus hervorgeht.[12] Physiologischerweise bilden Mitochondrien ein dreidimensionales Netzwerk aus, welches durch Fusion und Fission einer ständigen Dynamik unterliegt. Diese Dynamik ermöglicht es ihnen, sich an die aktuellen Bedingungen anzupassen und zum Beispiel beschädigte oder überalterte Mitochondrien durch Abspaltung bzw. Fragmentierung zu entfernen.[13, 14]

Mitochondrien besitzen eine äußere und eine innere Membran. Im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran (OMM), welche für kleine, ungeladene Moleküle und Ionen frei passierbar ist, stellt die innere Mitochondrienmembran (IMM) eine dichte Barriere dar. Aufgrund dieser Barriere und der Tatsache, dass Moleküle und Ionen nur mit spezifischen Transportern (TIM – *translocases of the inner membrane*) die innere Mitochondrienmembran passieren können, ist die Ausbildung eines Protonengradienten und damit einhergehend eines mitochondrialen Membranpotentials von ca. -180 mV über die innere Mitochondrienmembran möglich.[15]

1.2.2 Die Atmungskette

Die Atmungskette (ETC – *electron transport chain*) besteht aus fünf Komplexen (I-V), welche sich in der inneren Mitochondrienmembran befinden, wobei Komplex V der ATP-Synthase entspricht. Elektronen, welche aus dem Citratzyklus stammen, gelangen über verschiedenen Wege zur Atmungskette. Einerseits werden Elektronen mittels NADH zur Atmungskette transportiert und auf den Komplex I übertragen. Dabei reagiert NADH zu NAD^+ und H^+ . Andererseits entspricht der Atmungskettenkomplex II der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus. Somit können im Zuge des Citratzyklus freiwerdende Elektronen direkt auf die folgenden Komplexe weiterübertragen werden. Die bei der Elektronenübertragung freiwerdende Energie ermöglicht an den Komplexen I, III und IV einen Protonentransport (H^+) aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum. Dadurch entsteht ein Protonengradient (H^+ -Konzentrationsgefälle) und damit verbunden ein mitochondriales Membranpotential zwischen Intermembranraum (bzw. Zytosol) und mitochondrialer Matrix. Der gebildete elektrochemische Gradient ist in Folge die Triebkraft für die ATP-Synthese durch den Komplex V (= ATP-Synthase). Hierbei fließen die H^+ -Ionen aus dem Intermembranraum durch den F_0 -Teil der ATP-Synthase zurück in die mitochondriale Matrix. Ein dadurch in Bewegung versetzter Rotor überträgt währenddessen die Energie auf die katalytischen Bereiche, an welchen ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat synthetisiert wird.[15]

Entkopplung der Oxidativen Phosphorylierung durch FCCP

FCCP (Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) ist ein Stoff aus der Gruppe der Protonophore. Es ermöglicht eine direkte Passage von Protonen (H^+) über die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix unter Umgehung der ATP-Synthase. Dies führt zu einem raschen Einbruch des mitochondrialen Membranpotentials und damit zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Synthese.[16, 17]

1.3 Produktion Reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) durch Mitochondrien

Mitochondrien gelten als wichtige Produzenten [18] bzw. als Hauptproduzenten [19, 20] Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS - *Reactive Oxygen Species*). ROS stehen aufgrund des ROS-induzierten oxidativen Stresses im Fokus zahlreicher Untersuchungen in Bezug auf zelluläre Schädigungen und deren Folgen (z.B. neurodegenerative Erkrankungen oder Tumorerkrankungen).[21-23] Innerhalb von Mitochondrien entstehen die sogenannten mitochondrialen ROS (mROS), welche Superoxidionen (O_2^-) entsprechen. Neben Superoxidionen existieren noch weitere Moleküle, welche unter dem Sammelbegriff „Reaktive Sauerstoffspezies“ zusammengefasst werden. Unter anderem zählen hierzu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches das zelluläre Äquivalent der mROS darstellt und das Hydroxylradikal ($OH\cdot$).[18, 23]

1.3.1 Orte der mROS-Entstehung

Die Atmungskettenkomplexe I und III werden als wichtige Entstehungsorte mitochondrialer ROS angesehen. Die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff (O_2) führt zur Bildung von Superoxidionen (O_2^-).[24] Im Folgenden soll, basierend auf der Arbeit von *Murphy et al. (2009)* [18], kurz erläutert werden, wie es zur Bildung von O_2^- an den Komplexen I und III kommen kann:

Komplex I

Seitens des Citratzyklus werden Elektronen in Form von $NADH/H^+$ zu Komplex I transportiert. Die Elektronen werden dort anschließend auf Flavinmononukleotid (FMN) übertragen und gelangen von dort über Eisen-Schwefel-Zentren des Komplexes I zu Ubichinon (= Coenzym Q), welches dem Weitertransport der Elektronen dient. Hierbei kann es fälschlicherweise entgegen des eigentlichen Elektronenflusses in Richtung Ubichinon zu einer Elektronenübertragung von FMN auf in der Mitochondrienmatrix befindliches O_2 kommen, wodurch O_2^- gebildet wird. Dieser Vorgang kann durch einen gehemmten Weitertransport der Elektronen innerhalb der Atmungskette verstärkt werden. Ein derartiges Sistieren des Elektronentransports kann zum Beispiel dann eintreten, wenn die ATP-Synthese bei gleichzeitig hohem mitochondrialen Membranpotential reduziert ist. Ein Transport von H^+ -Ionen in den

Intermembranraum und der damit verbundene Elektronentransport ist somit wegen des hohen elektrochemischen Gradienten nicht mehr möglich. Unter diesen Umständen werden die aus dem Citratzyklus stammenden Elektronen nun von NADH/H^+ auf FMN übertragen, können jedoch nicht entlang der Atmungskette abfließen und gehen anschließend unter Bildung von O_2^- auf O_2 über (Abbildung 2 A). Unter gleichen Voraussetzungen kann es auch zu einem „reverse electron transport“ (RET) kommen. Hierbei werden Elektronen aufgrund des „Elektronenrückstaus“ entgegen der normalen Richtung der Atmungskette bis auf Komplex I zurückübertragen. Im Bereich des Komplexes I ist nun erneut eine Übertragung von Elektronen auf O_2 möglich (Abbildung 2 B).

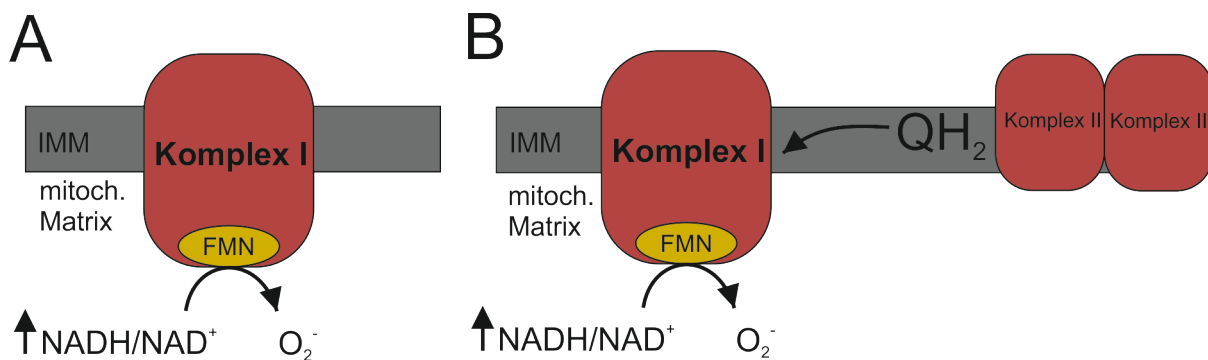


Abbildung 2: Entstehung von Superoxidionen an Komplex I

A Elektronen werden unter anderem aus dem Citratzyklus in Form von NADH/H^+ auf den Komplex I transferiert. Sind die nachgeschalteten Komplexe bereits mit Elektronen besetzt, ist dadurch kein Weitertransport von Elektronen mehr möglich, da z.B. die Funktion der ATP-Synthase bei gleichzeitig hohem mitochondrialem Membranpotential reduziert ist. Die zuvor auf FMN (Flavinmononukleotid) des Komplexes I übertragenen Elektronen können somit nicht entlang der Atmungskette weitertransportiert werden, sondern werden unter Bildung von Superoxidionen (O_2^-) auf in der mitochondrialen Matrix befindliches O_2 übertragen. **B** RET – reverse electron transport: Unter den in Abb. 2 A geschilderten Bedingungen kann es zu einem Rückstau des Elektronentransportes kommen. Hierdurch können von dem maximal reduzierten Ubichinol (QH_2) Elektronen entgegen der normalen Richtung der Atmungskette auf Komplex I rückübertragen werden. Im Bereich des Komplexes I kann es nun unter Bildung von O_2^- zu einer Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff kommen.

IMM = Innere Mitochondrienmembran; *Abbildung basierend auf Murphy et al. (2009)[18]*

Komplex III

Elektronen, welche von Komplex I und II auf Ubichinol übertragen wurden, gelangen in Form von voll reduziertem Ubichinol (QH_2) zu Komplex III. QH_2 überträgt dann die Elektronen an der Q_0 -Stelle (der dem Intermembranraum zugewandten Seite der IMM) auf Cytochrom c_1 , welches die Elektronen anschließend auf Komplex IV weiterleitet. QH_2 überträgt jedoch physiologischerweise nicht beide Elektronen gleichzeitig auf Cytochrom c_1 , sondern nur eines. Das dabei entstehende Ubisemichinol ($\text{Q}^{\cdot-}$) durchläuft anschließend den Q-Zyklus (Abbildung 3). Dadurch ist es an Komplex III

möglich pro Elektronenpaar vier H^+ -Ionen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu transportieren.[25] Würde QH_2 sofort beide Elektronen auf Cytochrom c_1 übertragen, so wäre lediglich ein Transport von zwei H^+ -Ionen möglich. Durch eine Hemmung der Q_i -Seite (der mitochondrialen Matrix zugewandten Seite der IMM) mit Antimycin A (AntA) kann Ubisemichinon ($Q^{\cdot-}$) nicht mehr zu Ubichinon reduziert werden und es entsteht eine große Menge an $Q^{\cdot-}$. Durch Übertragung eines Elektrons von $Q^{\cdot-}$ auf O_2 im Bereich der IMM kommt es zu einer gesteigerten Bildung von $O_2^{\cdot-}$. Die gebildeten Superoxidionen können ausgehend von Komplex III sowohl in die mitochondriale Matrix als auch in den Intermembranraum abgegeben werden. In Abwesenheit von Antimycin A und damit unter physiologischen Bedingungen wird die Produktion von $O_2^{\cdot-}$ seitens Komplex III als niedrig angesehen.

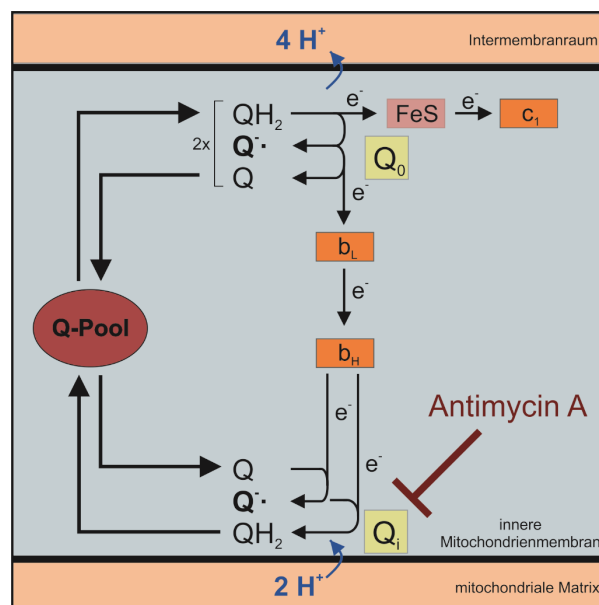


Abbildung 3: Q-Zyklus Komplex III

Voll reduziertes Ubichinol (QH_2) gibt an der Q_0 -Seite ein Elektron an Cytochrom c_1 ab und durchläuft anschließend den Q-Zyklus. Eine Hemmung der Q_i -Seite durch Antimycin A führt zu einer Blockade des Q-Zyklus und damit der Atmungskette. In Folge bildet sich eine große Menge an Ubisemichinon ($Q^{\cdot-}$), welches ein Elektron auf O_2 übertragen kann. Das dabei entstehende $O_2^{\cdot-}$ kann in die mitochondriale Matrix, aber auch in den Intermembranraum abgegeben werden.

Abbildung basierend auf Löffler/Petrides: *Biochemie und Pathobiochemie*; 9. Auflage, Springer-Verlag (2014) [26]

1.3.2 Eliminierung von mitochondrialen und intrazellulären ROS

Die entstandenen Superoxidionen ($O_2^{\cdot-}$) werden innerhalb des Mitochondriums, aber auch im Zytosol, durch die Superoxiddismutase (mitochondriale SOD: mSOD/SOD2; zytosolische SOD: SOD1) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt. Katalysiert durch die mitochondriale bzw. zytosolische Katalase reagieren zwei H_2O_2 zu zwei H_2O und O_2 . [24, 27-30] Ein Teil des mitochondrial entstandenen H_2O_2 kann aber auch die

mitochondriale Katalase umgehen und direkt in das Zytosol diffundieren.[31] Neben der Katalase existieren noch weitere Enzyme zur Elimination von H_2O_2 . Unter anderem wird hierzu die Glutathion-Peroxidase gezählt, welche die Reduktion von Glutathion durch H_2O_2 katalysiert. Dadurch entsteht H_2O . [18, 24, 32].

1.4 Autophagie und Mitophagie

1.4.1 Allgemeines

Die Autophagie dient dem zelleigenen Abbau zellulärer Bestandteile (z.B. Proteine, ganze Organellen). Hiermit lassen sich zum Beispiel fehlgefaltete Proteine, beschädigte Organellen oder Proteine während Nahrungskarenz zur Energiegewinnung abbauen. Man unterscheidet Makroautophagie (Einschluss in Autophagosomen), Mikroautophagie (direkte Aufnahme in Lysosomen) und Chaperon-vermittelte Autophagie (Chaperon-vermittelte Translokation über die Lysosomenmembran).[33] Autophagie von Mitochondrien wird als Mitophagie bezeichnet und dient dem Abbau beschädigter bzw. überalterter Mitochondrien, die u.a. erhöhte Mengen ROS produzieren können.[34] Das Mitochondrium wird hierbei zunächst von einer im Zuge der Makroautophagie gebildeten Doppelmembran umschlossen, wodurch sich ein Autophagosom bildet.[35, 36] Das Autophagosom fusioniert anschließend mit Lysosomen, welche katabole Enzyme zur Degradierung von Proteinen oder Lipiden enthalten.[37] Innerhalb des Autophagolysosoms (Autophagosom + Lysosom) wird das Mitochondrium abgebaut und wiederverwertbare Komponenten können in das Zytosol abgegeben werden.[35] Die Induktion von Mitophagie ist bis dato noch nicht vollständig verstanden und steht im Fokus zahlreicher Untersuchungen. Es werden aber diverse Auslöser diskutiert. Wie bereits in 1.2 erläutert, unterliegen Mitochondrien einer Dynamik aus Fusion und Fission, wodurch sie sich an physiologische Prozesse anpassen können.[13, 38] In der Literatur wird diskutiert, dass Fission eine Grundvoraussetzung für Mitophagie ist, da hierdurch funktionslose Mitochondrienanteile aus dem mitochondrialen Verbund ausgeschlossen werden können, um in Folge abgebaut zu werden.[39] In Hefen konnte beobachtet werden, dass eine Deletion des Pro-Fissions-Gens (*dnm1*) zu einer Hemmung mitochondrialer Fragmentierung und Mitophagie führte.[37] Zudem wird vermutet, dass eine Depolarisation mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zu einer Induktion der Mitophagie führt, da hierbei das

Mitochondrium funktionslos wird.[40] *Narendra et al.* (2008) konnten zeigen, dass eine Behandlung von Zellen mit CCCP, welches als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung eine Depolarisation von Mitochondrien bewirkt, zu einer Rekrutierung von Parkin führte, welches in den Prozess der selektiven Mitophagie eingebunden ist. In Folge wurde der Einschluss von Mitochondrien in Autophagosomen beobachtet. Eine Behandlung von Zellen mit Paraquat zur Induktion der mitochondrialen ROS-Produktion führte ebenfalls zu einer Depolarisation von Mitochondrien und einer Rekrutierung von Parkin.[41] Im Kontext dieser Arbeit spielen somit die vermutete behinderte Fission von Mitochondrien, ein eventuell verändertes mitochondriales Membranpotential und ROS eine Rolle in Hinblick auf Mitophagie der elongierten, spindelförmigen Riesenmitochondrien.

1.4.2 Visualisierung von Mitophagie

Mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen kann die Mitophagie bei lebenden Zellen beobachtet werden. Hierzu werden Zellen mit einem Mitochondrienmarker (MitoTracker®) und mit Markern zur Detektion von Autophagosomen gefärbt. Als Autophagosomenmarker eignet sich einerseits ein Farbstoff aus der Gruppe der LysoTracker®, welcher generell saure Kompartimente und somit unter anderem Autophagolysosomen anfärbt. Zudem lässt sich LC3B, ein Bestandteil der Autophagosomen-Doppelmembran, als Fusionsprotein mit GFP transient in Zellen transfizieren und anschließend detektieren. Für eine erfolgte Mitophagie würde zum Beispiel sprechen, wenn ein MitoTracker®-positives Mitochondrium von GFP-positivem LC3B umrahmt sichtbar wäre.[37] Gemäß *Sun et al.* (2015) lässt sich Mitophagie durch Behandlung von Zellen mit FCCP und Oligomycin (Inhibitor der ATP-Synthase) induzieren.[42] FCCP führt hierbei zu einer Depolarisation der Mitochondrien und Oligomycin zu einer Inhibition der ATP-Synthase, wodurch die Mitochondrien funktionslos werden.

1.5 Lysosomen und vakuoläre H⁺-ATPase

Die Auswertung eines im Zuge der Vorarbeiten [1] angefertigten Genchips von LLC-PK1_{T336A}⁻ und LLC-PK1_{WT}-Zellen zeigte, dass eine Überexpression von mutiertem *GATM* zu einer Erhöhung der mRNA-Expression von Untereinheiten der vakuolären H⁺-ATPase (=V-ATPase) führte (Abbildung 4). Hierbei handelte es sich um die nierenspezifischen [43] Untereinheiten *G3* (ATP6V1G3), *d2* (ATP6V0D2) und *a4* (ATP6V0A4). Die mRNA-Expression der Untereinheit *G3* (ATP6V1G3) war in LLC-PK1_{T336A}⁻-Zellen gegenüber LLC-PK1_{WT}-Zellen um das 40,19-fache ($p=4,6 \cdot 10^{-6}$), der Untereinheit *d2* (ATP6V0D2) um das 24,03-fache ($p=2,6 \cdot 10^{-6}$) und der Untereinheit *a4* (ATP6V0A4) um das 5,13-fache ($p=0,00011$) erhöht.

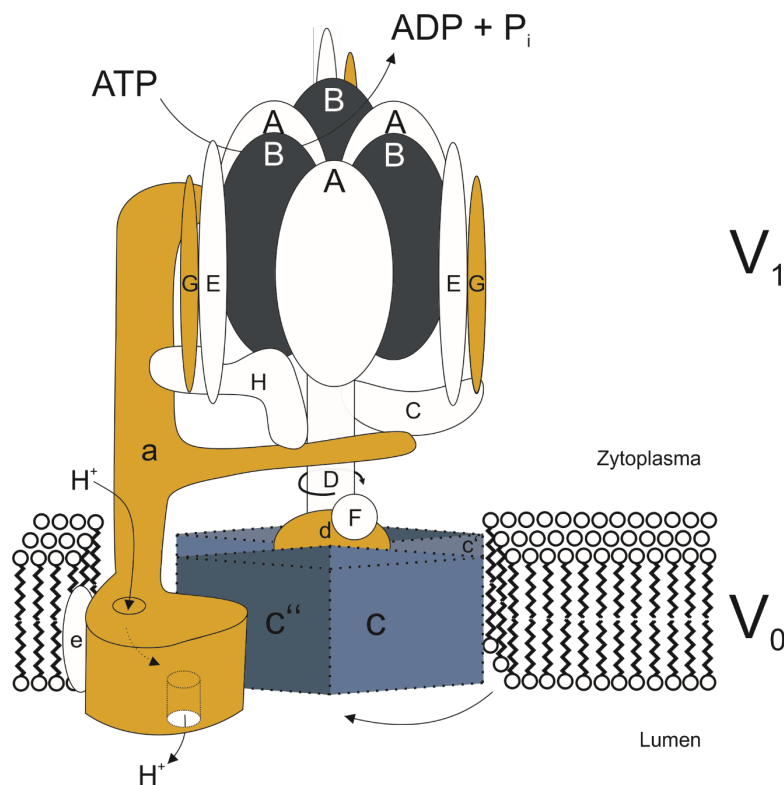


Abbildung 4: Vakuoläre H⁺-ATPase (=V-ATPase)

Die V-ATPase besteht aus einem zyttoplasmatischen V₁-Teil (beinhaltet die katalytischen Bereiche A und B) und einem transmembranösen V₀-Teil (dient dem H⁺-Transport). Die Analyse eines Genchips zeigte eine Erhöhung der mRNA-Expression der nierenspezifischen Untereinheiten *G3*, *d2* und *a4* (in Gelb markiert) in LLC-PK1_{T336A}⁻-Zellen gegenüber LLC-PK1_{WT}-Zellen.

Abbildung basierend auf Toei et al. (2010)[44]

Lysosomen sind saure Zellkompartimente und dienen dem Abbau zellulärer Bestandteile. Der niedrige pH ist essentiell für die Funktion lysosomaler Enzyme. Diese Enzyme ermöglichen nach Verschmelzung der Lysosomen mit Endosomen oder Autophagosomen die Degradierung und den Abbau enthaltener Proteine und anderer Makromoleküle.[44, 45] Für die Aufrechterhaltung des sauren pH ist eine H⁺-Protonenpumpe, die vakuoläre H⁺-ATPase (V-ATPase), zuständig. Sie besteht aus einem zytoplasmatischen V₁-Teil und einem transmembranösen V₀-Teil. Während der V₁-Teil unter anderem aus den katalytischen Bereichen (Untereinheiten A und B) besteht, ermöglicht der V₀-Teil den eigentlichen Protonen-Transport. Durch einen reinen H⁺-Transport würde ein elektrochemischer Gradient zwischen Zytosol und Lysosom entstehen. Aus diesem Grund werden neben H⁺-Ionen auch Cl⁻-Ionen durch einen Chloridtransporter in das Lysosom transportiert, welche die Elektroneutralität bewahren. Üblicherweise entspricht dieser Cl⁻-Transporter dem CIC5-Transporter.[43, 46] Zudem können auch weitere Transporter (z.B. AQP6) dem Chloridtransport dienen.[47] Die V-ATPase ist nicht nur in Lysosomen lokalisiert, sondern auch in Endosomen und in der Plasmamembran einiger Nierenzellen. Im Bereich des proximalen Tubulus findet man die V-ATPase in an der Basis des Bürstensaums befindlichen Endosomen, wodurch das endosomale Lumen azidifiziert wird und eine katalytische Spaltung aus dem Primärharn endozytierter Proteine ermöglicht wird. Zudem ist die V-ATPase entlang des proximalen Tubulus in die Plasmamembran integriert. An dieser Stelle werden Protonen aus den Zellen in das Tubuluslumen sekretiert, was der der Säure-Sekretion und der Bicarbonat-Rückresorption dient und somit im Dienst des Säure-Basen-Haushalts steht.[7, 43, 44, 48]

1.6 Einordnung der bisherigen Erkenntnisse in den Kontext der Erkrankung

Wie bereits in Vorarbeiten [1] beschrieben, ist die vorliegende Erkrankung auf einen Funktionsverlust der proximalen Tubuli zurückzuführen, welcher zu einem Fanconi-Syndrom und anschließend zu einer progredienten Niereninsuffizienz bis hin zu einem terminalen Nierenversagen führt. Ursächlich hierfür scheint die deutliche Überalterung der abnormen Mitochondrien zu sein, welche in Folge mit einer erhöhten Produktion von ROS einhergeht. ROS induzieren womöglich einerseits das Inflammasom und andererseits die Apoptose in den betroffenen Zellen. Das aktivierte Inflammasom führt zudem vermutlich zu einer fortschreitenden Fibrosierung des Nierenparenchyms. Der initiale Funktionsverlust der proximalen Tubuli ist vermutlich Folge der Apoptose proximaler Tubuluszellen, wie es bereits für die Fanconi-Syndrom verursachende Zystinose postuliert wurde.[49] Neben den strukturellen Veränderungen könnte auch eine gestörte Funktion der abnormen Mitochondrien zu einer Einschränkung der Resorptionsfähigkeit beitragen. Es konnte bereits für eine weitere Mitochondriopathie gezeigt werden, dass die Mutation in *EHHADH* fälschlicherweise zu einem Import des peroxisomalen Proteins EHHADH in die mitochondriale Matrix führt, wodurch es zu einer Störung der β -Oxidation mit folgender reduzierter Energiebereitstellung und konsekutiver Ausbildung eines Fanconi-Syndroms kommt.[5] Bezogen auf das GATM-assoziierte Fanconi-Syndrom könnte somit eine Abnahme des mitochondrialen Gehalts durch die Ausbildung der abnormen Riesenmitochondrien und eine etwaige Funktionsstörung der Mitochondrien zu einer verminderten proximal-tubulären Resorption führen. Dies sollte mithilfe der Bestimmung des mitochondrialen Gehalts und des mitochondrialen Membranpotentials unter Zuhilfenahme des LLC-PK1-Zellmodells getestet werden.

Bereits vorab konnte immunfluoreszenzmikroskopisch eine erhöhte Menge mROS in LLC-PK1_{T336A}-Zellen gemessen werden, wodurch ROS im postulierten Pathomechanismus eine zentrale Rolle zugeschrieben wurde.[1] Weiterführend zu diesen Experimenten sollten neben der durchflusszytometrischen Evaluation von mROS auch intrazelluläre ROS gemessen werden. Hierdurch wurde versucht zu untersuchen, welchen Einfluss die erhöhte mROS-Produktion auf die Gesamtmenge an ROS hat, um eventuell weitere Informationen über den Einfluss von ROS auf den krankheitsverursachenden Pathomechanismus ableiten zu können.

Wie bereits beschrieben, führt die Mutation in *GATM* vermutlich durch Ausbildung der abnormen Mitochondrien zu einer eingeschränkten Fähigkeit diese großen Mitochondrien mittels Mitophagie zu autophagieren. Es ergaben sich durch Auswertung des angefertigten Genchips Hinweise, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen möglicherweise einen erhöhten Gehalt an Lysosomen aufweisen, welche durch ihre katabolen Enzyme einen wesentlichen Bestandteil der Autophagie darstellen. Diese Erhöhung des lysosomalen Gehalts könnte Folge einer womöglich eingeschränkten Mitophagie sein, wodurch LLC-PK1_{T336A}-Zellen versuchen durch mehr Lysosomen dennoch eine Mitophagie zu ermöglichen. Hierzu wurde eine Bestimmung des lysosomalen Gehalts angestrebt, um Informationen über die Mitophagie dieser elongierten, spindelförmigen Riesenmitochondrien zu erhalten.

2 Zielsetzung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand ein durch die Mutation in *GATM* ausgelöstes Fanconi-Syndrom mit begleitender Niereninsuffizienz. Mit Hilfe eines Zellmodells mit LLC-PK1 Zellen sollten weitere Untersuchungen von Wildtyp-Zellen (LLC-PK1_{WT}-Zellen) und Zellen, welche das mutierte *GATM* exprimieren (LLC-PK1_{T336A}-Zellen), durchgeführt werden. Ziel war es hierbei, mehr über die Funktion und Pathophysiologie der abnormen Mitochondrien mittels Durchflusszytometrie herauszufinden.

Ein wesentlicher Faktor für die Funktion von Mitochondrien ist das mitochondriale Membranpotential, das die Generierung von ATP ermöglicht. Vorab durchgeführte respirometrische Untersuchungen [11] wiesen darauf hin, dass die Funktion von Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen womöglich eingeschränkt sei. Weiterführend sollte nun untersucht werden, ob bzw. inwiefern sich das mitochondriale Membranpotential in LLC-PK1_{T336A}-Zellen von dem in LLC-PK1_{WT}-Zellen unterscheidet. Unklar war auch, ob es durch die Ausbildung der abnormen Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zu einer Änderung des mitochondrialen Gehalts kommt, der ebenfalls Auswirkungen auf die Funktion der Zellen haben könnte.

Des Weiteren zeigten sich in Vorversuchen [1] mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in LLC-PK1_{T336A}-Zellen erhöhte Mengen an ROS. Hierzu sollte ergänzend vergleichend die Menge an mitochondrialen ROS und intrazellulären ROS zwischen den zwei Zellsystemen untersucht werden.

Im Fokus stand zudem die Mitophagie, da sich vorab zeigte, dass die mutierten Mitochondrien den physiologischen mitochondrialen Turnover überdauern und vermutet wurde, dass sie aufgrund ihrer Größe nur erschwert bzw. nicht mittels Mitophagie autophagozytiert werden können. Hierzu ergaben sich Hinweise, dass sich der lysosomale Gehalt zwischen Wildtyp-Zellen und mutierten Zellen unterscheiden könnte. Aus diesem Grund wurde vergleichend der lysosomale Gehalt bestimmt, da Lysosomen eine zentrale Rolle während der Autophagie bzw. Mitophagie einnehmen und somit Rückschlüsse auf die Mitophagie liefern könnten.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten weiterführende Rückschlüsse auf den vermuteten zugrundeliegenden Pathomechanismus ermöglichen, um in Zusammenschau aller Erkenntnisse einen möglichen therapeutischen Ansatz zu finden, welcher die gestörte tubuläre Rückresorption verbessern und die Progression der Nierenfunktionsverschlechterung verzögern könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage GR-120	A&D Instruments Ltd, Tokio, J
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedics GmbH, Gießen, D
Brutschrank CB-160	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Durchflusszytometer „BD Accuri™ C6 Flow Cytometer“	BD Biosciences, Heidelberg D
Invertmikroskop Axio Observer Z.1 (ImmunoFluoreszenz)	Zeiss, Jena, D
Invertmikroskop IMT-2 (Zellkultur)	Olympus, Hamburg, D
Konfokales Mikroskop LSM 710	Zeiss, Jena, D
Mikrozentrifuge Heraeus™ Fresco™21	ThermoFisher, Darmstadt, D
Milli-Q-Anlage (Biocel A10)	Millipore, Schwalbach/Ts., D
pH-Meter	Schott Geräte, Mainz, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim, D
Schüttelwasserbad Typ 1086	GFL, Burgwedel, D
Sterilbank (Holten LaminAir)	Heto-/Holten AS, Allerød, DK
Zentrifuge Heraeus™ Labofuge™ 400	ThermoFisher, Darmstadt, D

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Aufziehkanüle 18 G	BD Biosciences, Heidelberg, D
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Einwegspritzen (2 ml, 5ml, 10 ml, 20 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Eppendorf Tubes (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Glasplättchen für Zellfärbungen	Hartenstein, Würzburg, D
Glycergel mounting medium, fluoreszenzfrei	DakoCytomation, Dakato North America Inc., Carpinteria, USA
Kulturflaschen T-25, T-75	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Kulturschalen klein (35 x 10 mm)	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Millex-GP Filter 0,22 µm	Merck, Darmstadt, D
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Polysin Objektträger	Kindler, Freiburg, D
Vakuumfiltrationseinheit Filtropur V50 500 ml; 0,2 µM	Sarstedt, Nürnberg, D
Zellkultur Testplatten (6-Well)	TPP, Trasadingen, CH

Zentrifugenröhrchen (15/50 ml) - Tube	nerbe plus, Winsen/Luhe, D
---------------------------------------	----------------------------

3.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Accutase	Sigma, Taufkirchen, D
Antimycin A	Sigma, Taufkirchen, D
Chloroquin Diphosphat Salz	Sigma, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
DMEM (Dulbecco`s modified eagle Medium)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethanol (EtOH)	J. T. Baker, Deventer, NL
FCCP – Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (C ₁₀ H ₅ F ₃ N ₄ O)	Sigma, Taufkirchen, D
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
H ₂ O ₂	Sigma, Taufkirchen, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄ *3H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent	Thermofisher, Karlsruhe, D
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Na-Hexanoat	Sigma, Taufkirchen, D
NaOH	Merck, Darmstadt, D
Oligomycin	Sigma, Taufkirchen, D
OptiMEM	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Opti-MEM™ Reduced Serum Medium	Gibco Cell Culture Systems – Thermofisher, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PBS (1x)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung, flüssig - 10000 I.E./ml Pen G - 10000 µg/ml Strep.-Sulfat)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640 Medium, ohne Glucose	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck, Darmstadt, D
Seahorse XF Base Medium (without Phenol Red)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Tetrazyklinstock (12,5 mg/ml) in EtOH	Bioline, Luckenwalde, D
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x), flüssig	Gibco Cell Culture Systems – Thermofisher, Darmstadt, D

3.1.4 Farbstoffe

Bezeichnung	Stocklösung	Hersteller
H ₂ DCFDA	10 mM in DMSO	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
LysoTracker® Deep Red	1 mM in DMSO	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
LysoTracker® Green	1mM in DMSO	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
MitoSox™ Red	5 mM in DMSO	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
MitoTracker® Green	1 mM in DMSO	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
MitoTracker® Orange CMTM-ROS	1 mM in DMSO	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
MitoView™ 633	150 µM in DMSO	Biotum

3.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Art	Hersteller
Anti-GATM, rabbit polyclonal IgG (1:150)	Primär-Antikörper	Sigma-aldrich Co. LLC, Taufkirchen, D Proteintech Group Inc., Manchester, UK
Anti-LC3B (D11) XP®, rabbit monoclonal IgG	Primär-Antikörper	Cell Signalling Technology, Leiden, NL
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit (1:400)	Sekundär-Antikörper	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 555 donkey anti-rabbit	Sekundär-Antikörper	Invitrogen - Thermofisher, Karlsruhe, D
HOE33342 (Stock: 5x10 ⁻⁴ M) (1:1000)	Zellkernmarker	Invitrogen -Thermofischer, Karlsruhe, D

3.1.6 Plasmid

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
pSELECT-GFP-hLC3	1 µg/µl	Invivogen, Toulouse, F

3.1.7 Substanzen Zellkultur

		Menge/Konzentration
<u>Nährmedium LLC-PK1</u>	RPMI 1640 (+) L-glutamin, (-) Glucose	500 ml
	Fötales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert)	50 ml (10 %)
	Penicillin	50 U/ml
	Streptomycin	50 µg/ml
	Natrium-Hexanoat	345 mg (10 mM)
<u>Seahorse-Medium</u>	Agilent Seahorse XF Base Medium (without Phenol Red)	500 ml
	Glucose	5 mM

3.1.8 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Inhalt	Endkonzentration
PBS-Puffer, pH 7,4	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl In Aqua dest.	1,8 mM 10,3 mM 137 mM
Fixierlösung, pH 7,4 (IF)	EGTA K ₂ HPO ₄ MgCl ₂ NaCl Paraformaldehyd Saccharose In Aqua dest.	1 mM 15 mM 2 mM 90 mM 3 % 100 mM
Lösung zur Epitopdemaskierung, pH 7,4 (IF)	SDS In PBS	0,1 %
Antikörper-Verdünnungslösung (IF)	BSA Triton X-100 in Aqua dest.	0,5 % 0,04 %

3.1.9 Substanzen BD Accuri™ C6 Flow Cytometer

Bezeichnung	Hersteller
Bacteriostatic concentrate solution (PN 653156) – Sheath fluid	BD Biosciences, Heidelberg, D
Cleaning concentrate solution (PN 653157)	
Decontamination concentrate solution (PN 653154)	
Extended flow cell cleaning solution (PN 653159)	

3.1.10 LLC-PK1 Zellen

Für die Untersuchung mitochondrialer und lysosomaler Parameter wurden genetisch modifizierte porcine LLC-PK1-Zellen (Abstammung: Hausschwein) verwendet. Die Zellen wurden von Enriko Klootwijk (London) mit Wildtyp-GATM (GATM_{WT}) und mutiertem GATM (GATM_{T336A}) stabil transfiziert. Mit Hilfe des Tet-on Systems konnte durch Induktion mit Tetrazyklin eine gezielte Überexpression des GATM, sowohl GATM_{WT} als auch GATM_{T336A}, erzielt werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ in Nährmedium kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde dreimal pro Woche vollzogen. Sobald die Zellen eine ca. 90%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit Hilfe von Trypsin/EDTA innerhalb von 20 min abgelöst und anschließend nach Zentrifugation (1000 rpm, 3 min) und Resuspendierung in Nährmedium auf vorbereitete Zellkulturgefäße neu ausgesät.

3.2.2 Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Vorversuche zeigten, dass durchflusszytometrische Messungen nach Kultivierung der Zellen in 6-Wellns im Gegensatz zur Kultivierung in verschiedenen anderen Kulturschalen die besten Ergebnisse lieferten. Eine Filtration der Zellsuspensionen vor dem Vermessen, um störende Zellcluster zu vermeiden, lieferte messtechnisch keinen Vorteil, weshalb auf diesen Schritt verzichtet wurde.

Eine Überexpression von GATM wurde durch Induktion des Tet-on-Systems mit Tetrazyklin (1 µg/ml) erzielt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen für sieben Tage in Tetrazyklin-haltigem Nährmedium kultiviert, da dies gemäß Induktionsvorversuchen eine ausgeprägte Ausbildung der elongierten, spindelförmigen Mitochondrien erzielte. Zudem wurde in den vorausgehenden Untersuchungen in der Regel eine Induktionsdauer von sieben Tagen verwendet.

3.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Invertmikroskop „Axio Observer Z.1 (Zeiss)“ durchgeführt. Für die Untersuchung der Mitophagie wurde zudem das konfokale Mikroskop „LSM 710 (Zeiss)“ verwendet.

Position	Name im Mikroskop	Filter-Set (Zeiss)	Exzitation	Strahlteiler	Emission	Farbstoffe / Antikörper
1	Green Fluorescent Prot	38 HE	BP 470/40 (HE)	FT 495 (HE)	BP 525/50 (HE)	MitoTracker® Green LysoTracker® Green H ₂ DCFDA Alexa Fluor® 488 LC3B-GFP
2	DsRed	43 HE	BP 550/25 (HE)	FT 570 (HE)	BP 605/70 (HE)	MitoTracker® Orange MitoSox™ Red Alexa Fluor® 555
3	DAPI	49	G 365	FT 395	BP 445/50	HOE33342
4	Cy 5	50	BP 640/30	FT 660	BP 690/50	MitoView™ 633 LysoTracker® Deep Red
5	Analy. DIC Translight					

Tabelle 1: Filter-Sets Axio Observer Z.1 (Zeiss); Angaben gemäß Hersteller

3.2.3.1 Kontrollfärbung

In vorausgehenden Arbeiten zeigte sich, dass die Anzahl von LLC-PK1-Zellen, welche $GATM_{WT}$ bzw. $GATM_{T336A}$ trotz stabiler Transfektion exprimieren, im Laufe der Kultivierung abnahm. Um einen ausreichenden Grad an $GATM$ -Transfektion zu überprüfen, wurden mittels Immunfluoreszenz regelmäßige Kontrollfärbungen parallel zu den durchflusszytometrischen Experimenten durchgeführt.

Für die Kontrollfärbungen wurden LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen zunächst mit Tetrazyklin induziert (1 µg/ml; 3-4 d). Zwischen den folgenden Teilschritten erfolgte jeweils ein Waschschrift mit PBS. Nach Fixation mit 3 % Paraformaldehyd (in PBS, 15 min) wurden die Epitope mittels 0,1 % SDS in PBS (5 min) demaskiert. Als primärer Antikörper wurde rabbit anti-GATM in 0,04 % Triton X-100 (in PBS) verwendet und die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine weitere Stunde lichtgeschützt mit dem sekundären Antikörper donkey anti-rabbit Alexa-Fluor 488 in 0,04 % Triton X-100 (in PBS) sowie dem Kernfarbstoff HOE33342 inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellen mittels Dako-Mounting Medium eingedeckelt und bei 4° C gelagert.

3.2.4 Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Für die Analyse der beschriebenen Parameter wurden unterschiedliche Farbstoffe verwendet. In Tabelle 2 sind alle verwendeten Farbstoffe mit ihren Eigenschaften aufgelistet.

Name	Zielorganell	Verw. Konzentration	Ex./Em. (nm) gemäß Hersteller
MitoTracker® Green	Mitochondrium	133 nM	490/516
MitoTracker® Orange CMTMRos	Mitochondrium	200 nM	559/570
MitoView™ 633	Mitochondrium	60 nM	622/648
MitoSox™ Red	Mitochondrium	2,5 µM	510/580
H ₂ DCFDA	Zytosol	5 µM	492-495/517-527
LysoTracker® Green	Saure Kompartimente (z.B. Lysosom)	50 nM	504/511
LysoTracker® Deep Red	Saure Kompartimente (z.B. Lysosom)	100 nM	647/668

Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe und ihre Eigenschaften

3.2.5 Ablösevorgang für die durchflusszytometrischen Messungen

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 20 min mit Accutase (1 ml/Well) bei Raumtemperatur und im Dunkeln abgelöst. Der Ablösevorgang wurde mit Nährmedium (2 ml/Well) abgestoppt, jede Zellsuspension in ein 15 ml Tube überführt, zentrifugiert (3000 rpm, 5 min) und das entstandene Zellpellet in Seahorse-Medium (650 µl) resuspendiert und in ein 2 ml Tube überführt.

Sofern nicht anders angegeben, wurde dieser Ablösevorgang für die folgenden Versuche verwendet.

3.2.6 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoView™ 633 und MitoTracker® Green zur Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials und des mitochondrialen Gehalts

Für die Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotentials wurde ein Farbstoff aus der Gruppe der Membranpotential-abhängigen Farbstoffe gewählt. Diese Farbstoffe entsprechen lipophilen, kationischen Stoffen, die nach freier Diffusion über die Plasma- und Mitochondrienmembran in den Mitochondrien akkumulieren. Die Menge des aufgenommenen Farbstoffes ist hierbei vom mitochondrialen Membranpotential abhängig. Je negativer das mitochondriale Membranpotential und damit hyperpolarisierter das Mitochondrium ist, desto mehr kationischer Farbstoff akkumuliert im Inneren des Mitochondriums und desto mehr Fluoreszenzlicht wird emittiert.[50] Eine Behandlung der Zellen mit einem Protonophor (z.B. FCCP) führt zu einer raschen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials. In Folge kommt es zu einer Umverteilung des Farbstoffes. Dieser verlagert sich nun in das Zytosol bzw. in den Extrazellularraum.[51] Für diese Arbeit wurde der Farbstoff MitoView™ 633 verwendet.

Um den mitochondrialen Gehalt zu bestimmen und vergleichbare Aussagen über die mitochondriale Menge in den verwendeten Zellsystemen zu treffen, wurden die Zellen mit MitoTracker® Green gefärbt. Dieser Farbstoff kann ebenfalls frei über die Plasma- und Mitochondrienmembran diffundieren und reichert sich innerhalb der Mitochondrien an. Hier bindet er jedoch kovalent über reaktive Chlormethylgruppen an Thiol-Reste von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran. Ein Verlassen der Mitochondrien ist entgegen MitoView™ 633 somit nicht mehr möglich, weshalb er sich als membranpotentialunabhängiger Farbstoff für die Bestimmung des mitochondrialen Gehalts eignet.[52-55] Der bestimmte mitochondriale Gehalt in den beiden Zellsystemen sollte zusätzlich zur Standardisierung des bestimmten mitochondrialen Membranpotentials herangezogen werden. Hierdurch sollte ein Vergleich der Membranpotentiale pro Mitochondrium ermöglicht werden.

Die mit Tetrazyklin induzierten Zellen wurden gemäß Tabelle 3 gefärbt und für 20 min mit den Farbstoffen im Brutschrank inkubiert (37° C, 5 % CO₂).

Well-Nummer	Art	Färbung	Konzentration (in Nährmedium)	Behandlung
1	Kontrolle	---	---	---
2	Einfachfärbung	MitoView™ 633	60nM	---
3	Einfachfärbung	MitoTracker® Green	133 nM	---
4	Doppelfärbung	MitoView™ 633 MitoTracker® Green	60 nM 133 nM	---
5	Doppelfärbung	MitoView™ 633 MitoTracker® Green	60 nM 133 nM	---
6	Doppelfärbung	MitoView™ 633 MitoTracker® Green	60 nM 133 nM	FCCP (1 µM)

Tabelle 3: Färbeschema zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und des mitochondrialen Gehalts

Nach dem Ablösen (gem. 3.2.5.) wurde eine Zellsuspension der drei Doppelfärbungen vor dem Zentrifugieren mit FCCP (1 µM; 10 min; 37° C) inkubiert. Nach der Zentrifugation (3000 rpm, 5 min) wurde das entstandene Zellpellet in Seahorse-Medium (650 µl) resuspendiert, in ein 2 ml Tube überführt und bis zur Vermessung (direkt im Anschluss) auf Eis gestellt.

3.2.7 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoSox™ Red zur Quantifizierung der Menge an intramitochondrialen ROS

Die Bestimmung der Menge an intramitochondrialen ROS wurde mittels MitoSox™ Red, einem Indikator für Superoxidionen, durchgeführt. Dieser mitochondriale Farbstoff kann zunächst frei in das Mitochondrium diffundieren, in welchem er durch vorhandene Superoxidionen oxidiert wird und anschließend fluoresziert.[56-58]

Zur Steigerung der mROS-Produktion seitens des Komplexes III der Atmungskette (1.3.1) wurde ein Teil der Zellen als Positivkontrolle mit Antimycin A (AntA; 50 µM) behandelt.[57]

Zunächst wurden die mit Tetrazyklin (7 d) induzierten Zellen zweifach mit PBS gewaschen und anschließend vier Wells mit MitoSox™ Red (2,5 µM in Seahorse-Medium) und zwei Wells mit MitoTracker® Green (100 nM in Seahorse-Medium) für

20 min bei 37° C gefärbt. Eine Doppelfärbung mit MitoSox™ Red und MitoTracker® Green war nicht möglich, da sich deren Emissions- und Absorptionsspektren überschneiden.

Well-Nummer	Art	Färbung	Konzentration (in Seahorse-Medium)	Behandlung
1	Einfachfärbung	MitoSox™ Red	2,5 µM	---
2	Einfachfärbung	MitoSox™ Red	2,5 µM	---
3	Einfachfärbung	MitoSox™ Red	2,5 µM	Antimycin A (50 µM)
4	Einfachfärbung	MitoSox™ Red	2,5 µM	Antimycin A (50 µM)
5	Einfachfärbung	MitoTracker® Green	100 nM	---
6	Einfachfärbung	MitoTracker® Green	100 nM	Antimycin A (50 µM)

Tabelle 4: Färbeschema zur Bestimmung der Menge an mROS

Nach dem Ablösen (gem. 3.2.5) wurden zwei Tubes der MitoSox™ Red-Färbungen und ein Tube der MitoTracker® Green-Färbungen für 60 min bei 37° C mit Antimycin A (50 µM) behandelt. Die behandelten Zellsuspensionen wurden im Anschluss daran erneut zentrifugiert, das Pellet in Seahorse-Medium resuspendiert, in ein 2 ml Tube überführt, mit den unbehandelten Suspensionen auf Eis gestellt und im Anschluss direkt vermessen.

3.2.8 Färben von LLC-PK1-Zellen mit H₂DCFDA zur Quantifizierung der Menge an intrazellulären ROS

Die Menge an intrazellulären ROS wurde mittels des Farbstoffes H₂DCFDA bestimmt. Das detektierbare Signal liefert hierbei das Fluorophor 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF). Nach Diffusion durch die Zellmembran wird H₂DCFDA zunächst intrazellulär von spezifischen Esterasen decarboxyliert (H₂DCF) und im Anschluss durch ROS (H₂O₂) oxidiert (DCF).[59-62]

Als Positivkontrolle diene einerseits H₂O₂ in einer Konzentration von 200 µM. Andererseits sollte mit Antimycin A (50 µM) eine gesteigerte Produktion von mROS (1.3) induziert werden, welches nach Umwandlung durch Superoxiddismutasen (mitochondrial und intrazellulär) in Form von H₂O₂ in das Zytosol gelangt. Sowohl das von exogen zugeführte H₂O₂ als auch das von mROS stammende H₂O₂ können nun im Zytosol den Fluoreszenzfarbstoff H₂DCF zum fluoreszierenden DCF oxidieren und zu einer Erhöhung der basalen DCF-Fluoreszenz führen.

Zunächst wurden die mit Tetracyclin (7 Tage) induzierten Zellen zweifach mit PBS gewaschen und anschließend mittels H₂DCFDA (5 µM) in Seahorse-Medium für 20 min bei 37° C gefärbt. Zwei Wells dienten als weitere Kontrolle und blieben ungefärbt.

Well-Nummer	Art	Färbung	Konzentration (in Seahorse-Medium)	Behandlung
1	Kontrolle	---	---	---
2	Kontrolle	---	---	H ₂ O ₂ (200 µM)
3	Einfachfärbung	H ₂ DCFDA	5 µM	---
4	Einfachfärbung	H ₂ DCFDA	5 µM	---
5	Einfachfärbung	H ₂ DCFDA	5 µM	Antimycin A (50 µM)
6	Einfachfärbung	H ₂ DCFDA	5 µM	H ₂ O ₂ (200 µM)

Tabelle 5: Färbeschema zur Bestimmung der Menge an intrazellulären ROS

Nach dem Ablösen (gem. 3.2.5) wurden ein Tube mit Kontrollzellen sowie ein Tube mit gefärbten Zellen mit 200 µM H₂O₂ behandelt. Ein weiteres wurde mit 50 µM Antimycin A behandelt und mit den anderen Zellen für 60 min bei 37° C inkubiert.

Anschließend wurden die Zellsuspensionen erneut zentrifugiert (1000 rpm, 3 min), in Seahorse-Medium resuspendiert, in 2 ml Tubes überführt, auf Eis gestellt und im Anschluss direkt vermessen.

3.2.9 Färben von LLC-PK1-Zellen mit LysoTracker® Green zur Quantifizierung des lysosomalen Gehalts

Es wurde vermutet, dass die elongierten Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen aufgrund ihrer Größe nicht bzw. nur erschwert autophagozytiert werden können. Zudem zeigte sich in der Auswertung des Genchips (1.5), dass die mRNA-Expression von Untereinheiten der vakuolären V-ATPase in LLC-PK1_{T336A}-Zellen signifikant höher war als in LLC-PK1_{WT}-Zellen. Dies zusammen ließ vermuten, dass es aufgrund der Größe der Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zu einer Erhöhung des lysosomalen Gehalts kommt, um so eine Mitophagie zu ermöglichen.

Um den lysosomalen Gehalt durchflusszytometrisch zu bestimmen, wurde der Farbstoff LysoTracker® Green verwendet. Hierbei handelt es sich um ein an eine schwache Base gekoppeltes Fluorophor, welches sich weitgehend pH-unabhängig in sauren Kompartimenten (v.a. Lysosomen, späte Endosomen) anreichert, nachdem es frei durch Zellmembran und Membranen der Kompartimente diffundieren konnte. Es wird vermutet, dass sich der Farbstoff nach Protonierung in den Membranen der sauren Kompartimente einlagert und somit innerhalb dieser verbleibt.[63-65] Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch die Behandlung mit dem als Malaria-Medikament bekannten Chloroquin (CQ). Chloroquin induziert Autophagie, ist aber zugleich ein potenter Hemmstoff der Autophagie, indem es die Fusion von Lysosomen und Autophagosomen hemmt.[66-68] Die Induktion und Hemmung der Autophagie führt vermutlich zu einer Erhöhung der Menge an Lysosomen und Autophagosomen, was in der Durchflusszytometrie durch ein erhöhtes LysoTracker® Green bzw. ein erhöhtes LC3B-GFP-Signal (Teil der Autophagosomenmembran) gemessen werden kann.[66]

24 h vor Färbung der mit Tetrazyklin (7 d) induzierten Zellen wurden drei Wells mit Chloroquin (50 µM) behandelt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um das überschüssige Chloroquin zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit LysoTracker® Green gefärbt. Zwei Wells (ein unbehandeltes und ein behandeltes (CQ)) dienten als Negativ-Kontrolle und blieben

ungefärbt. Vier Wells (zwei unbehandelte und zwei behandelte) wurden mit 50 nM LysoTracker® Green in Nährmedium für 20 min bei 37° C gefärbt.

Well-Nummer	Art	Färbung	Konzentration (in Nährmedium)	Behandlung
1	Kontrolle	---	---	---
2	Kontrolle	---	---	Chloroquin (50 µM)
3	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	---
4	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	---
5	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	Chloroquin (50 µM)
6	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	Chloroquin (50 µM)

Tabelle 6: Färbeschema zur Bestimmung der lysosomalen Menge

Anschließend wurden die Zellen gemäß 3.2.5 abgelöst und bis zur direkt folgenden Vermessung auf Eis gestellt.

3.2.10 Visualisierung der durchflusszytometrischen Färbungen

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und mit Tetrazyklin induziert. Nach dem Färben wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.2.10.1 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoTracker® Green und MitoView™ 633

Die Zellen wurden gemäß 3.2.6 mit einer Doppelfärbung aus MitoTracker® Green (133 nM) und MitoView™ 633 (60 nM) gefärbt.

3.2.10.2 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoView™ 633 zur Visualisierung des FCCP-Effekts

Die Zellen wurden gemäß 3.2.6 mit MitoView™ 633 (133 nM) gefärbt. Nach Auswahl von geeigneten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde den Zellen FCCP (1 µM) zugegeben und alle 5 min beobachtet, wie sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes innerhalb der Mitochondrien verändert.

3.2.10.3 Färben von LLC-PK1-Zellen mit MitoSox™ Red und MitoView™ 633

Die Zellen wurden gemäß 3.2.7 mit MitoSox™ Red (2,5 µM) gefärbt. Um die mitochondriale Lokalisation des Farbstoffes zu demonstrieren, wurden die Zellen zusätzlich mit MitoView™ 633 (133 nM) gefärbt. Eine Färbung mit einem Farbstoff der Gruppe MitoTracker® war hierbei nicht möglich, da sich deren Emissions- und Absorptionsspektren mit denen von MitoSox™ Red überschneiden.

3.2.10.4 Färben von LLC-PK1-Zellen mit H₂DCFDA und MitTracker® Orange

Die Zellen wurden gemäß 3.2.8 mit H₂DCFDA (5 µM) gefärbt. Um die intrazelluläre Lage des Farbstoffes zu demonstrieren, wurden die Zellen zusätzlich mit MitoTracker® Orange (200nM) gefärbt.

3.2.10.5 Färben von LLC-PK1-Zellen mit LysoTracker® Green und MitoTracker® Orange

Ein Teil der Zellen wurde zuvor gemäß 3.2.9 mit Chloroquin (50 µM; 24 h) vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen gemäß Färbeprotokoll (3.2.9) mit LysoTracker® Green (50 nM) gefärbt. Um die Lage der Lysosomen im Verhältnis zu den Mitochondrien zu zeigen, wurden die Mitochondrien zusätzlich mit MitoTracker® Orange (200 nM) angefärbt.

3.2.11 Behandlung von LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit Chloroquin in aufsteigenden Konzentrationen

Mit Tetrazyklin (7 d) induzierte Zellen wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit Chloroquin (50 μ M; 75 μ M; 100 μ M) für 24 h behandelt. Ein Well diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gemäß 3.2.9 gefärbt und für die durchflusszytometrische Vermessung vorbereitet.

Well-Nummer	Art	Färbung	Konzentration (in Nährmedium)	Behandlung
1	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	---
2	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	CQ (50 μ M)
3	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	CQ (75 μ M)
4	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	CQ (75 μ M)
5	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	Chloroquin (100 μ M)
6	Einfachfärbung	LysoTracker® Green	50 nM	Chloroquin (100 μ M)

Tabelle 7: Färbeschema zur Behandlung von LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit Chloroquin (CQ) in aufsteigenden Konzentrationen

3.2.12 Transiente Transfektion LLC-PK1_{WT}-Zellen mit humanem LC3B-GFP (hLC3B-GFP)

LLC-PK1_{WT}-Zellen, ausgesät auf Glasplättchen, wurden nach Erreichen einer ca. 50%igen Konfluenz unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 3000 mit dem Plasmid hLC3B-GFP (1 μ g/ μ l) transient transfiziert. Hierzu wurden für die Transfektion von Zellen eines Glasplättchens 130 μ l OptiMem Medium mit 3,75 μ l des Lipofectamin™ 3000 Reagenz in einem 2 ml Tube vermischt. In einem weiteren Tube wurden 130 μ l OptiMem Medium mit 4 μ l P3000 Reagenz und 1 μ l des Plasmids hLC3B-GFP (= 1 μ g) vermischt. Nach kurzer Inkubationszeit wurden die Inhalte beider Tubes zusammengegeben, homogenisiert und auf die Zellen pipettiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Nach zwei bis drei Tagen der Exprimierung wurden die Zellen gemäß 3.2.13 gefärbt.

3.2.13 Färbung zur Detektion von Mitophagie

Mit hLC3B-GFP transient transfizierte LLC-PK1_{WT}-Zellen wurden zunächst zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit MitoTracker® Orange (200 nM) und MitoView™ 633 (60 nM) für 20 min bei 37° C gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde den Zellen Seahorse-Medium zugegeben, um sie im Anschluss mittels konfokaler Mikroskopie zu betrachten. Hierbei wurde den Zellen FCCP (5 µM) und Oligomycin (5 µM) zugegeben und beobachtet, ob sich im zeitlichen Verlauf Autophagosomen bilden, welche durch das transfizierte hLC3B-GFP visualisiert werden können.

3.2.14 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, ein optisches, überwiegend lasergestütztes Messverfahren, ermöglicht mittels Fluoreszenzfarbstoffen die quantitative Bestimmung diverser Parameter lebender, intakter Zellen. Die Zellen werden zunächst aus einem Probengefäß angesaugt und von einem Hüllstrom ummantelt, der eine Verdünnung und Zentrierung des Probestroms ermöglicht. Der Probestrom passiert anschließend einen Laserstrahl in einem Winkel von 90°. Durch Bestrahlung der Zellen mit dem Laserstrahl entstehen sowohl färbeunabhängige Streulichter, als auch Fluoreszenzsignale, welche auf den spezifischen Färbungen beruhen. Zum einen können zwei Arten von Streulicht detektiert werden, welche später in der Analyse eine Gruppierung von Zellpopulationen ermöglichen. Neben dem Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter; FSC), als ungefähres Maß für die Größe einer Zelle, kann zudem ein Seitwärtsstreulicht (Sideward-Scatter; SSC) registriert werden, welches Rückschlüsse auf die Granularität einer Zelle zulässt. Zum anderen können auch Fluoreszenzsignale, abhängig von den zuvor durchgeführten Färbungen, detektiert und quantifiziert werden. Hierzu dienen unterschiedliche Anregungs- und Emissionsfilter, welche es ermöglichen, das zu detektierende Fluoreszenzlicht einzugrenzen und die spezifischen Fluoreszenzsignale zu messen. Die detektierten Streu- und Fluoreszenzsignale werden durch einen Photomultiplier in elektrische Signale verwandelt, anschließend im Verarbeitungsprogramm des Gerätes gespeichert und können im Anschluss daran analysiert werden.[69, 70]

3.2.14.1 *BD Accuri™ C6 Flow Cytometer*

Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer „BD Accuri™ C6 Flow Cytometer“ verfügte über zwei Laser für die Anregung, nämlich 488nm und 640nm. Zur Detektion wurden folgende gerätespezifische Detektoren und Filter verwendet:

Fluoreszenzkanal	Abkürzung	Anregungswellenlänge	Emissionsfilter
1	FL-1	488 nm	533/30
2	FL-2	488 nm	585/40
4	FL-4	640 nm	675/25
Forward-Scatter	FSC	488/640 nm	---
Sideward-Scatter	SSC	488/640 nm	---

Tabelle 8: Filtersetups des verwendeten Durchflusszytometers „BD Accuri™ C6 Flow Cytometer“

3.2.14.2 *Auswertungsoptionen der detektierten Signale*

Neben der Auswahl des geeigneten Fluoreszenzkanals und des geeigneten Filters kann man zwischen zwei unterschiedlichen Auswertungsoptionen des Signals wählen. Zum einen lässt sich die Pulshöhe, die dem Fluoreszenzpeak entspricht, darstellen und zum anderen die Pulsfläche, welche die summierte Gesamtfluoreszenz repräsentiert. Zur Auswertung der Versuche dieser Arbeit wurde die Pulshöhe („-H“, z.B. FL-1-H) des Fluoreszenzsignals herangezogen, um somit fehlerhafte Ergebnisse durch Zelldoubletten zu vermeiden. Zelldoubletten können nach dem Ablösevorgang bzw. im Zuge der darauffolgenden Schritte entstehen, wenn die Zellen unzureichend voneinander getrennt wurden oder es zu einer erneuten Adhäsion der Zellen untereinander kommt. Passieren nun nicht Einzelzellen den Laserstrahl, sondern Zelldoubletten (-triplekten, etc.), so kommt es durch Aufsummierung der Fluoreszenzfläche („-A“, z.B. FL-1-A) fälschlicherweise zu einer zu hohen Pulsfläche bzw. Gesamtfluoreszenz (Abbildung 5).[71]

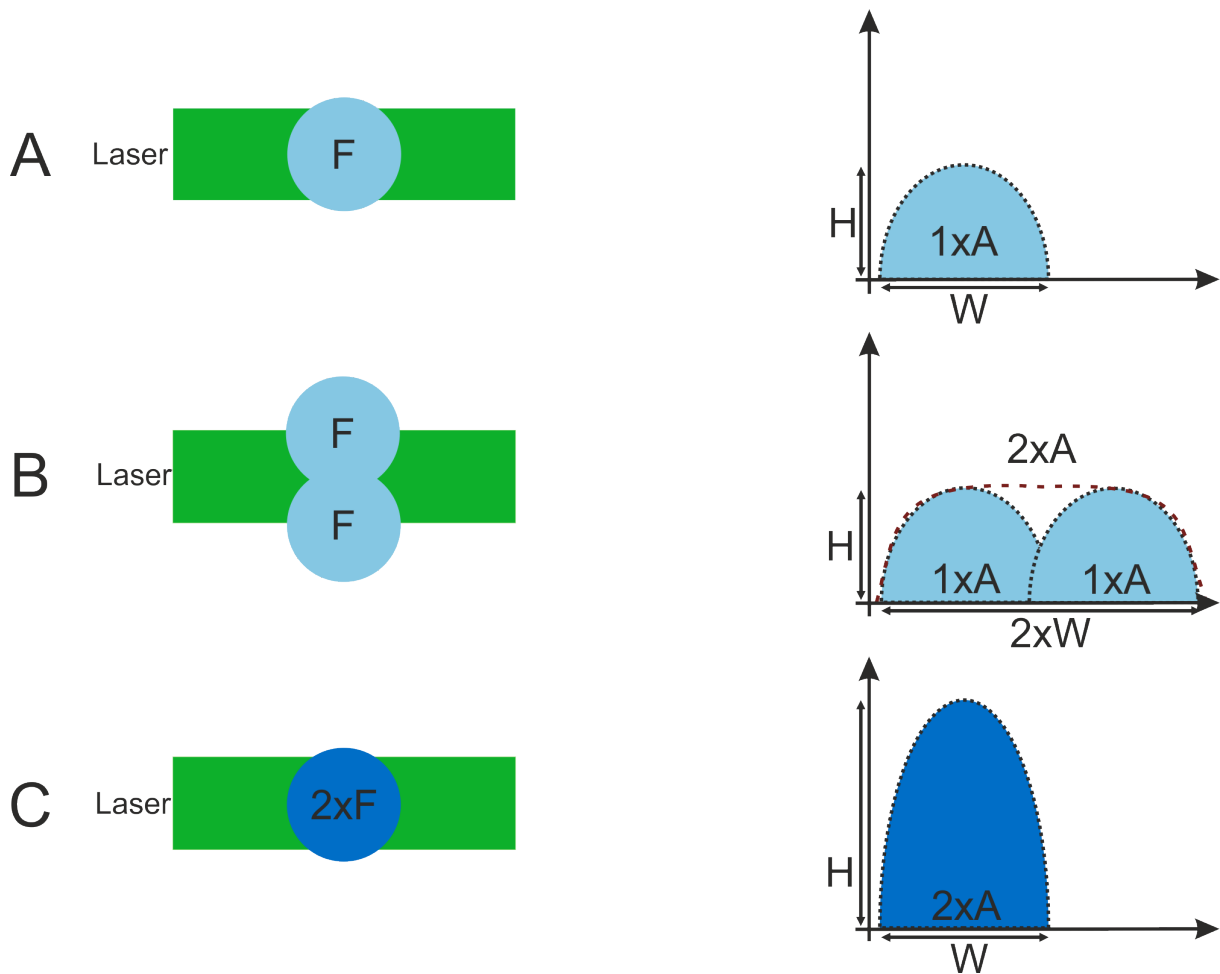


Abbildung 5: Doublettendiskriminierung

A Passiert eine Zelle mit einer bestimmten Fluoreszenz (F) den Laser, werden drei Signale detektiert. Die Breite (Width - W), welche proportional zur Größe der Zelle ist, die Höhe (Height - H), die dem Fluoreszenzpeak entspricht und die Fläche (Area - A), welche der aufsummierten Gesamtfluoreszenz entspricht. **B** Passieren nun zwei zusammenhängende Zellen mit gleicher Fluoreszenz (F) den Laser, wird bei der Auswertung der Fluoreszenzfläche fälschlicherweise eine doppelt so hohe Fluoreszenz registriert. Die Auswertung der Fluoreszenzhöhe ergibt nach wie vor den gleichen Wert, wie er für eine Einzelzelle mit der Fluoreszenz F ermittelt wird. **C** Eine Zelle, welche eine doppelt so große Fluoreszenz (2xF) aufweist, führt zu einer doppelt so großen Fluoreszenzfläche und Fluoreszenzhöhe bei gleicher Breite (W).

3.2.14.3 Gate zur Auswahl der gesuchten Zellpopulation

Die Auswertung mehrerer Vorexperimente ermöglichte die Identifikation der zu untersuchenden Zellpopulation im FSC-A/SSC-A- bzw. FSC-H/SSC-H-Diagramm. Die ermittelte Zellpopulation wurde durch ein „Gate“ eingeschlossen. Dieses Gate ermöglichte die spezifische Auswertung der gesuchten Zellpopulation und wurde anschließend für alle Versuche mit LLC-PK1-Zellen verwendet.

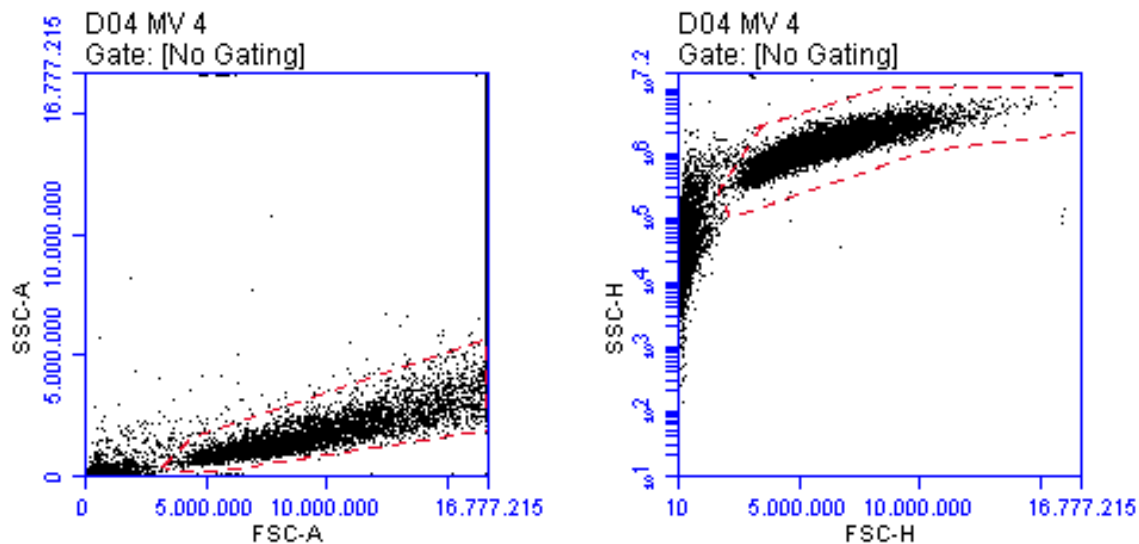


Abbildung 6: Gate zur Auswahl der gesuchten Zellpopulation

Basierend auf den durchgeführten Vorexperimenten konnte innerhalb des FSC-A/SSC-A-Diagramms die zu untersuchende Zellpopulation identifiziert werden. Um diese Population enger einzugrenzen, eignete sich eher die Darstellung im FSC-H/SSC-H-Diagramm. Durch die Auswertung mehrerer Messungen konnte das in Rot markierte Gate erstellt werden, welches als Template für alle durchflusszytometrischen Untersuchungen mit LLC-PK1-Zellen verwendet wurde. Die außerhalb (links) des Gates liegenden Zellen entsprechen überwiegend Zellfragmenten oder Verunreinigungen.

3.2.14.4 Programm zur Aufzeichnung und Analyse der gewonnenen Daten

Zur Aufzeichnung und Analyse der gewonnenen Daten wurde das Programm „BD Accuri™ C6 Software“ verwendet. Dieses Programm ermöglichte neben der Aufzeichnung der generierten Daten auch die Analyse und graphische Darstellung der Ergebnisse.

3.2.14.5 Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen

Die Probengefäße mit den Zellsuspensionen (2 ml Tube) wurden vor Vermessung durch Überkopf-Drehen gut durchmischt und anschließend im Gerät positioniert. Durch Starten der Analyse wurde der Probestrom mit mittlerer Flussrate (35 $\mu\text{l}/\text{min}$) angesogen. Die Analyse wurde beendet, sobald 10.000 Zellen innerhalb des Gates registriert wurden.

Aus den Einzelwerten jeder vermessenen Zelle innerhalb des definierten Gates wurde durch das Programm ein Mittelwert der Fluoreszenzsignale gebildet, welcher für die Auswertung herangezogen wurde. Jedes Tube wurde viermal vermessen. Die drei Messungen mit den prozentual gesehen meisten Zellen innerhalb des Gates wurden für die Auswertung herangezogen (3.2.15).

3.2.15 Auswertung der Ergebnisse und Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe von Microsoft® Excel Office 2016 und Origin® 2017 durchgeführt.

Aus den drei zuvor (s. 3.2.12) ausgewählten Mittelwerten der Pulsfläche je eines Tubes wurde erneut ein Mittelwert inklusive Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) berechnet, welcher in die Endauswertung einging.

Die Daten von LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden anschließend unter zu Hilfenahme des Student's unpaired t-test verglichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde hierbei als signifikant angesehen. Signifikante Ergebnisse wurden mit (*) gekennzeichnet, p-Werte sowie die Anzahl der Experimente pro Messserie (n) wurden in den Legenden der Abbildungen bzw. in den Abbildungen direkt angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Autofluoreszenz

Die Auswertung aller ungefärbten Zellen über alle Teilprojekte hinweg ergab, dass sich die Autofluoreszenzen von LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen in allen vier Fluoreszenzkanälen unterschieden. In FL-1-H war das Signal der LLC-PK1_{T336A}-Zellen signifikant um 17,6 % ($p=0,031$) höher als das von LLC-PK1_{WT}-Zellen. In FL-2-H und FL-4-H waren die Fluoreszenzsignale von LLC-PK1_{T336A}-Zellen um 16,7 % ($p=0,038$) bzw. 15,5 % ($p=0,022$) höher gegenüber LLC-PK1_{WT}-Zellen. In FL-3-H bestand eine Tendenz von 13,7 % ($p=0,057$) zugunsten der LLC-PK1_{T336A}-Zellen, jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant.

Um einen Fehler durch Nichtbeachtung der unterschiedlichen Autofluoreszenzen auszuschließen, wurde in den folgenden Experimenten die Autofluoreszenz berücksichtigt, indem von jeder Messung das Signal der jeweils zugeordneten ungefärbten Zellen abgezogen wurde.

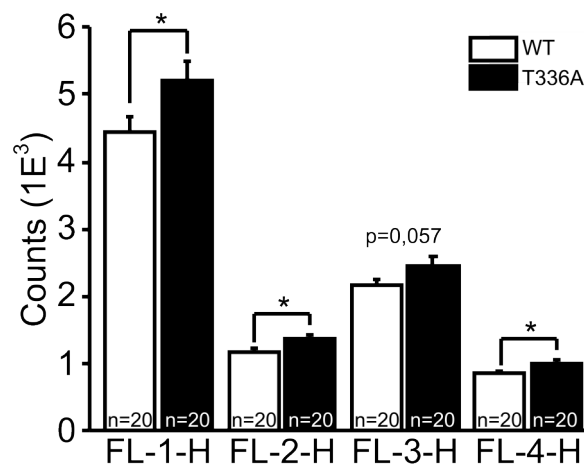


Abbildung 7: Autofluoreszenz von LLC-PK1_{WT}- und LLC-PK1_{T336A}-Zellen

Zur Bestimmung der Autofluoreszenz wurden alle ungefärbten Zellen über die Teilprojekte hinweg in allen vier Fluoreszenzkanälen vermessen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzkanälen FL-1-H, FL-2-H und FL-4-H. In FL-3-H zeichnete sich lediglich die Tendenz eines Unterschieds ab. FL-1-H (Ex./Em.: 488/533/30): T336A > WT (17,6 %, $n=20$, $p=0,031$); FL-2-H (Ex./Em.: 488/585/40): T336A > WT (16,7 %, $n=20$, $p=0,038$); FL-3-H (Ex./Em.: 488/610/20): T336A > WT (13,7 %, $n=20$, $p=0,057$); FL-4-H (Ex./Em.: 640/675/25): T336A > WT (15,5 %, $n=20$, $p=0,022$)

4.2 Mitochondrialer Gehalt und Membranpotential

4.2.1 Demonstration der MitoTracker® Green/MitoView™ 633 – Färbungen

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden gemäß 3.2.10.1 mit MitoTracker® Green (grün) und MitoView™ 633 (rot) gefärbt. Neben der Co-Lokalisation (gelb) der beiden Farbstoffe erkennt man in LLC-PK1_{T336A}-Zellen elongierte, spindelförmige Mitochondrien, welche sich um den Zellkern anordnen. In LLC-PK1_{WT}-Zellen lässt sich ein mitochondriales Netzwerk mit physiologischer Mitochondrienmorphologie erkennen.

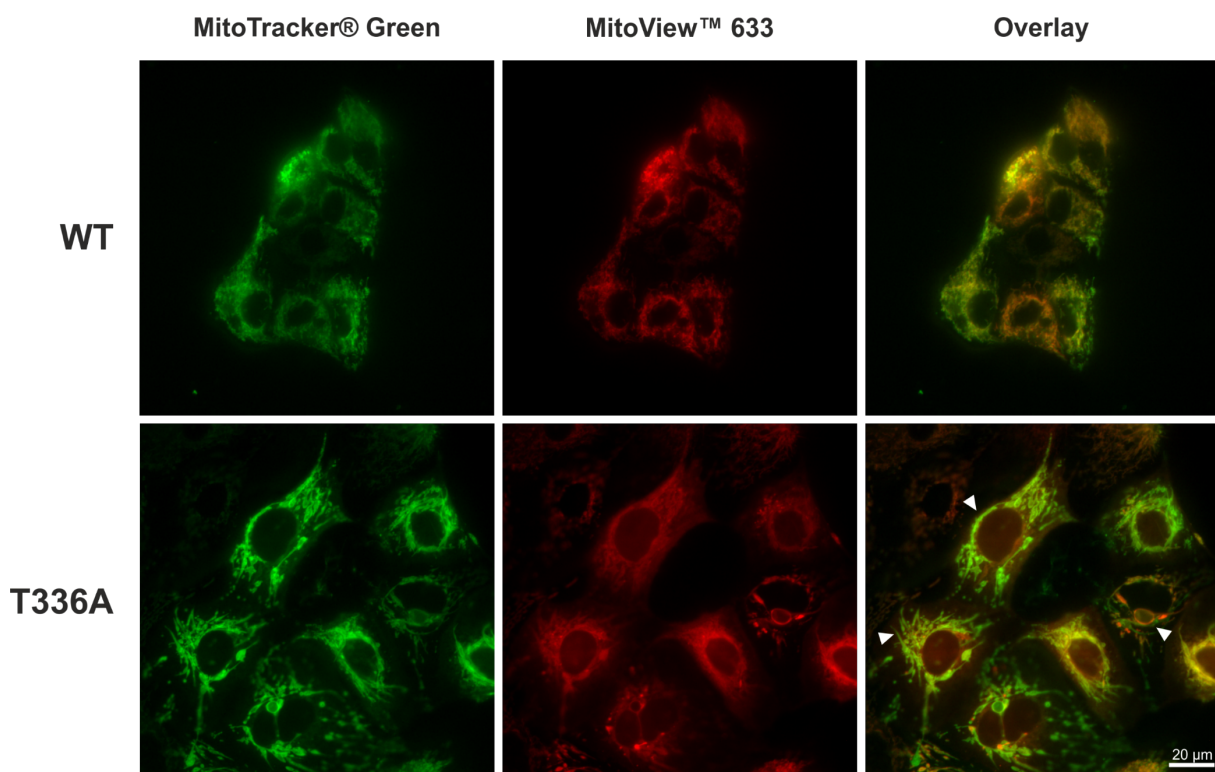


Abbildung 8: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit MitoTracker® Green und MitoView™ 633

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit MitoTracker® Green und MitoView™ 633. Zu erkennen ist die Co-Lokalisation (gelb) der beiden Farbstoffe in den Mitochondrien im Overlay-Bild. Im Vergleich zu LLC-PK1_{WT}-Zellen erkennt man die veränderte Mitochondrienmorphologie in LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Zu sehen sind elongierte Mitochondrien (▶), welche um den Zellkern angeordnet sind.

4.2.2 Visualisierung des FCCP-Effekts

Die mit MitoView™ 633 gefärbten LLC-PK1_{T336A}-Zellen (3.2.10.2), wurden nach Auswahl geeigneter Zellen mit FCCP behandelt. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine rasche Abnahme der MitoView™ 633-Intensität. Nach 15 min bzw. 25 min war lediglich eine diffuse intrazelluläre Farbstoffanreicherung erkennbar, welche vermutlich auf der Verteilung des Farbstoffs aus der mitochondrialen Matrix in den Intrazellularraum bzw. in das Interstitium beruht.[51]

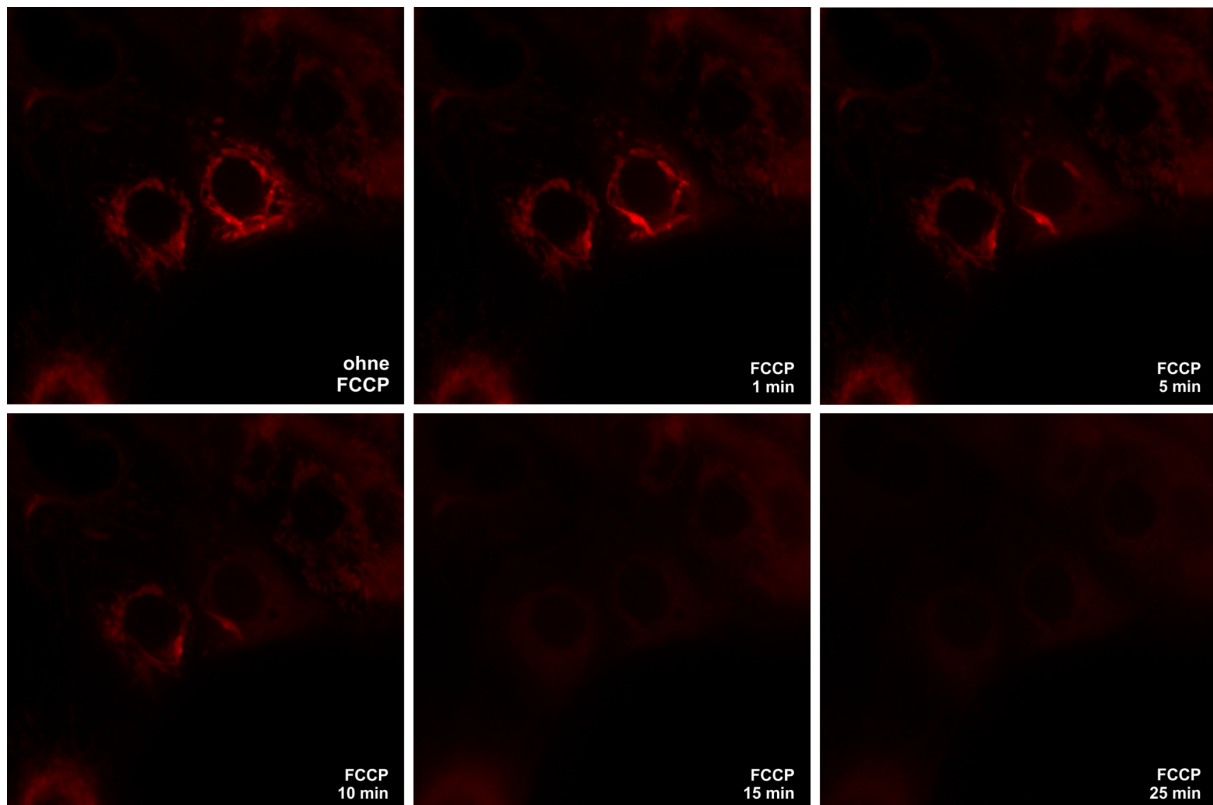


Abbildung 9: Visualisierung des FCCP-Effekts

LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit MitoView™ 633. Eine Behandlung mit FCCP (1 μ M) führte zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, woraufhin die Fluoreszenz des Farbstoffs MitoView™ 633 zunehmend abnahm.

4.2.3 Mitochondrialer Gehalt und mitochondriales Membranpotential (Durchflusszytometrie)

Zur Bestimmung des mitochondrialen Gehalts und des mitochondrialen Membranpotentials wurden LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit MitoTracker® Green und Mitoview™ 633 gefärbt (3.2.6). Mittels MitoTracker® Green wurde eine Standardisierung auf den mitochondrialen Gehalt durchgeführt, um somit vergleichbare Aussagen über das Membranpotential pro Mitochondrium treffen zu können.

In unbehandelten Zellen (ohne Zugabe von FCCP) (Abbildung 10 A) konnte kein Unterschied in der MitoTracker® Green-Intensität und somit kein Unterschied des mitochondrialen Gehalts zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen beobachtet werden. Ein Vergleich der MitoView™ 633-Intensitäten und damit des mitochondrialen Membranpotentials zeigte für LLC-PK1_{WT}-Zellen tendenziell höhere Werte, jedoch war dies nicht signifikant ($p=0,084$).

Auch in mit FCCP behandelten Zellen zeigte sich kein Unterschied des mitochondrialen Gehalts. Es war lediglich eine Tendenz zu höheren MitoTracker® Green-Signalen nach FCCP-Behandlung gegenüber den unbehandelten Zellen erkennbar (LLC-PK1_{WT/FCCP} > LLC-PK1_{WT}: 3,4 % ($p=0,70$); LLC-PK1_{T336A/FCCP} > LLC-PK1_{T336A}: 18,7 % ($p=0,14$)). Dies würde bedeuten, dass es durch Behandlung mit FCCP zu einer Erhöhung der mitochondrialen Menge kam. Die Auswertung der mitochondrialen Membranpotentiale zeigte nach Behandlung mit FCCP keine Tendenz des Unterschiedes zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen mehr. Durch die Zugabe von FCCP (Abbildung 10 B) kam es jedoch wie erwartet zu einer signifikanten Reduktion der MitoView™ 633-Intensität, welche mit einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials einhergeht. In LLC-PK1_{WT}-Zellen betrug der prozentuale Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Zellen 38,3 % ($p=0,0026$) und in LLC-PK1_{T336A}-Zellen 27,7 % ($p=0,013$).

Die Behandlung der Zellen mit FCCP zeigte eine Angleichung des mitochondrialen Membranpotentials von LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Die messbare Restfluoreszenz beruht vermutlich auf der Umverteilung des Farbstoffes in das Zytosol und den Extrazellularraum.[51] Diese im Folgenden als „unspezifisch“ deklarierten MitoView™ 633-Signale wurden in weiteren Auswertungen von den MitoView™ 633-Signalen vor Zugabe von FCCP abgezogen (Abbildung 10 C), um so genauere Aussagen über die „spezifischen“ Färbungen und somit die mitochondrialen

Membranpotentiale zu treffen. Die Standardisierung (Abbildung 10 D) der spezifischen Färbung auf den mitochondrialen Gehalt, die erfolgte, um vergleichbare Aussagen über das Membranpotential pro Mitochondrium treffen zu können, zeigte ein reduziertes Membranpotential pro Mitochondrium in LLC-PK1_{T336A}-Zellen im Gegensatz zu LLC-PK1_{WT}-Zellen.

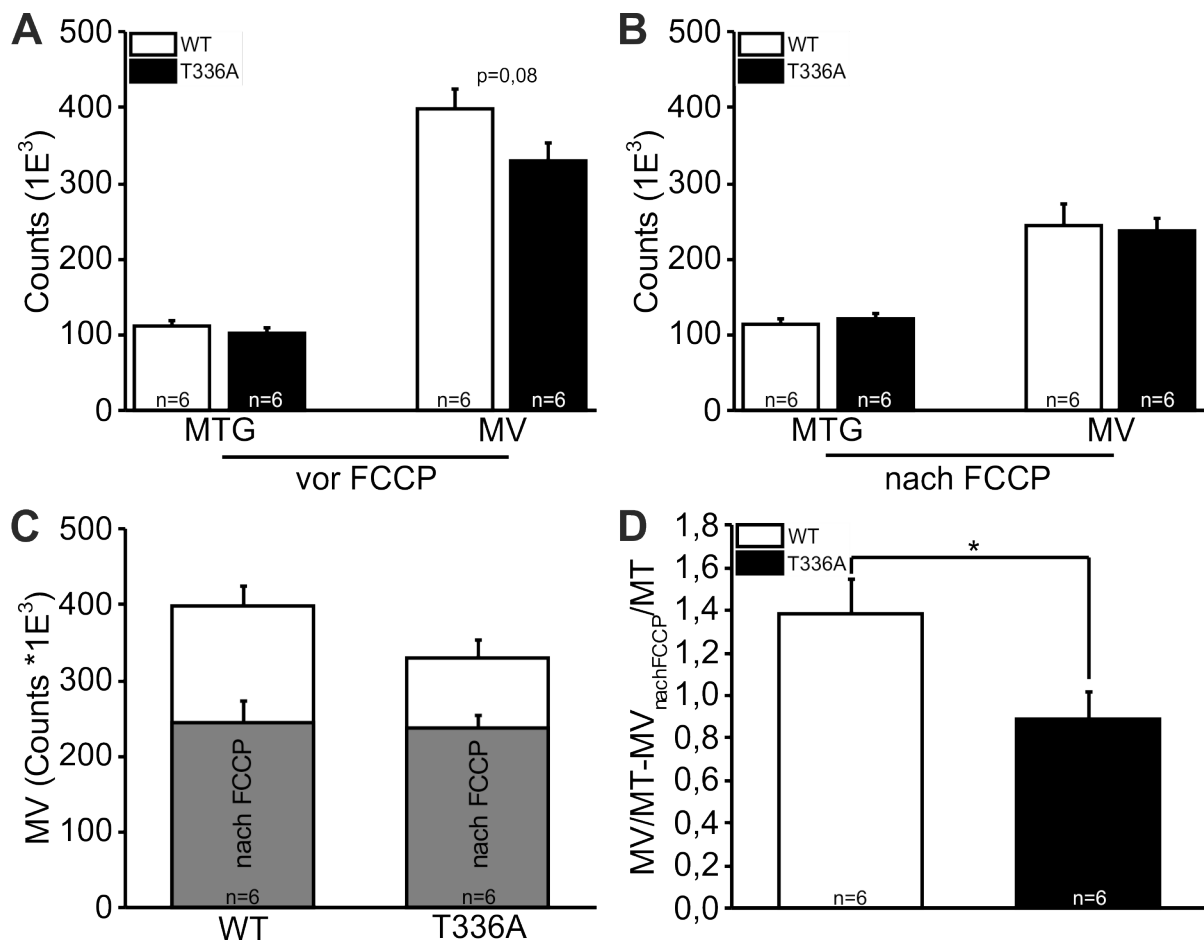


Abbildung 10: Mitochondrialer Gehalt und mitochondriales Membranpotential

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit MitoTracker® Green (mitochondrialer Gehalt) und MitoView™ 633 (mitochondriales Membranpotential) **A MitoTracker® Green:** kein Unterschied bzgl. des mitochondrialen Gehalts zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,37$). **MitoView™ 633:** tendenziell höheres mitochondriales Membranpotential in LLC-PK1_{WT}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{T336A}-Zellen, jedoch nicht signifikant ($p=0,084$). **B Nach Behandlung mit FCCP:** **MitoTracker® Green:** kein signifikanter Unterschied des mitochondrialen Gehalts zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,64$). Die MitoTracker® Green-Intensität nahm in LLC-PK1_{WT}-Zellen nach Behandlung mit FCCP im Vergleich zu unbehandelten Zellen tendenziell um 3,4 % ($p=0,70$) zu. In LLC-PK1_{T336A}-Zellen kam es zu einem tendenziellen Anstieg der MitoTracker® Green-Intensität von 18,7 % ($p=0,14$). **MitoView™ 633:** kein signifikanter Unterschied des mitochondrialen Membranpotentials zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Gegenüber unbehandelten Zellen reduzierte sich das mitochondriale Membranpotential in LLC-PK1_{WT}-Zellen um 38,3 % ($p=0,0026$), in LLC-PK1_{T336A}-Zellen um 27,7 % ($p=0,013$). **C Darstellung der MitoView™ 633-Intensitäten vor und nach Behandlung mit FCCP (Abb. 11 A und 11 B) als gestapelte Säulen:** Der graue Bereich entspricht jeweils der MitoView™ 633-Intensität nach Behandlung mit FCCP und somit der „unspezifischen“ Farbstoffanreicherung im Zytosol und dem Extrazellularraum. [51] Der weiße Bereich entspricht der „spezifischen“ Färbung und somit dem spezifischen mitochondrialen Membranpotential. **D** Nach Standardisierung des „spezifischen“ mitochondrialen Membranpotentials

(Abb. 11C) auf den mitochondrialen Gehalt vor FCCP-Behandlung, die erfolgte, um Aussagen über das Membranpotential pro Mitochondrium treffen zu können, zeigte sich ein signifikant höheres mitochondriales Membranpotential in LLC-PK1_{WT}-Zellen gegenüber LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,034$).

Bezieht man das MitoView™ 633-Signal jeweils auf das MitoView™ 633-Signal von LLC-PK1_{WT}-Zellen, so setzt man das MitoView™ 633-Signal von LLC-PK1_{WT}-Zellen jeweils auf „1“. Es zeigt sich eine signifikant höhere mittlere MitoView™ 633-Intensität von LLC-PK1_{WT}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Dies ist vereinbar mit einem signifikant höheren mittleren mitochondrialen Membranpotential von LLC-PK1_{WT}-Zellen gegenüber LLC-PK1_{T336A}-Zellen.

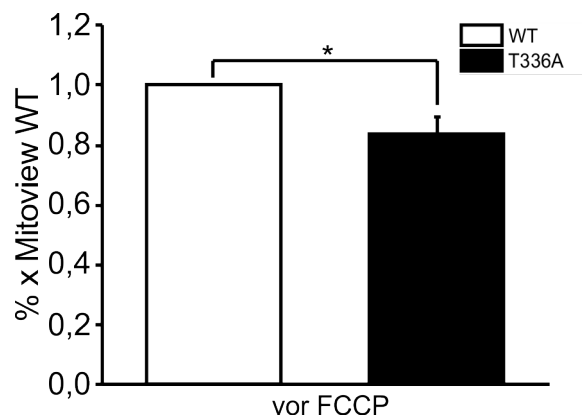


Abbildung 11: MitoView™ 633 bezogen auf LLC-PK1_{WT}-Zellen

Bezieht man das MitoView™ 633-Signal jeweils auf das MitoView™ 633-Signal von LLC-PK1_{WT}-Zellen, so zeigt sich ein signifikant höheres mitochondriales Membranpotential in LLC-PK1_{WT}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Das mitochondriale Membranpotential von LLC-PK1_{WT}-Zellen entspricht als jeweiliger Referenzwert dem Wert 1.

4.3 Intramitochondriale ROS

4.3.1 Demonstration der MitoSox™ Red Färbung

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden gemäß 3.2.10.3 mit MitoSox™ Red (grün) und MitoView™ 633 (rot) gefärbt. Neben der veränderten Mitochondrienmorphologie in LLC-PK1_{T336A}-Zellen ist eine klare intramitochondriale Anreicherung von MitoSox™ Red zu sehen, was sich im Overlay-Bild mit der MitoView™ 633-Färbung als starke Co-Lokalisation zeigt. Dies bestätigt die intramitochondriale Lokalisation von MitoSox™ Red und damit den spezifischen Nachweis von mROS.

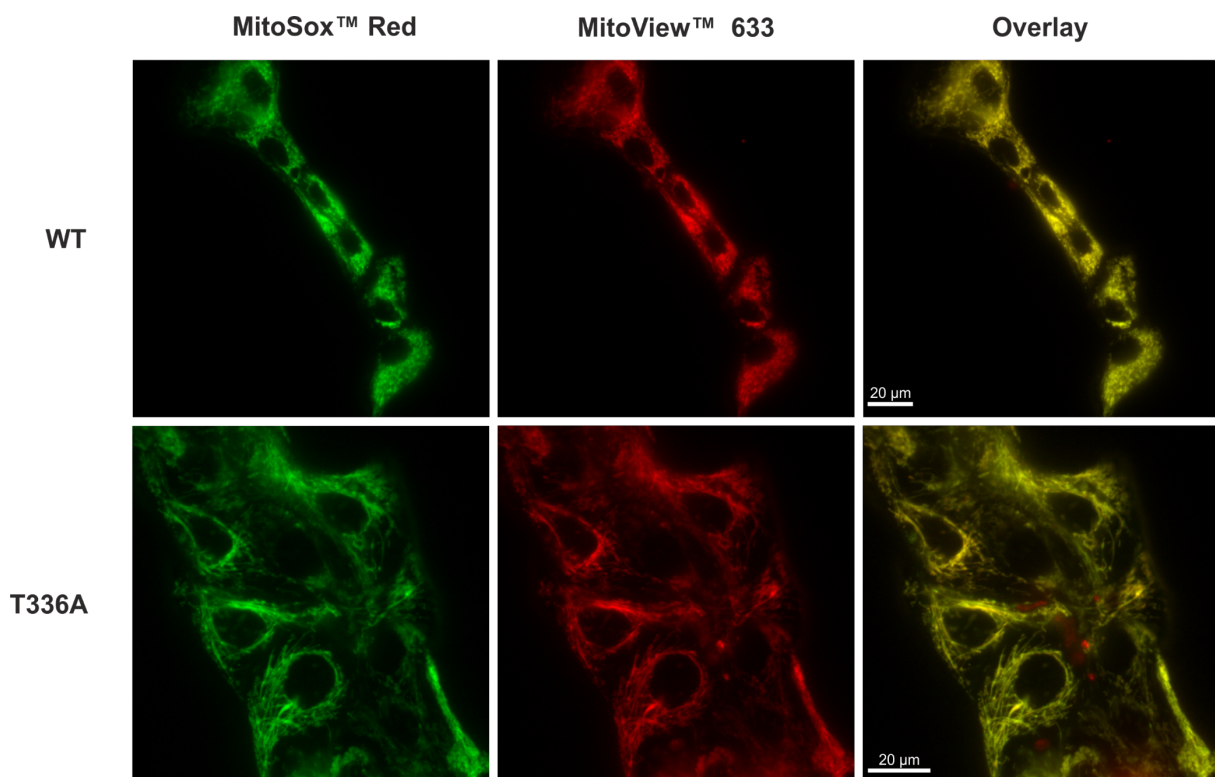


Abbildung 12: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit MitoSox™ Red und MitoView™ 633

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden mit MitoSox™ Red und MitoView™ 633 gefärbt. MitoView™ 633 wurde hierbei gewählt, um die Lokalisation von MitoSox™ Red in den Mitochondrien zu demonstrieren. MitoTracker® Green konnte hierbei nicht verwendet werden, da sich dessen Absorptions-/Emissionsspektrum mit dem von MitoSox™ Red überschneidet. Es zeigt sich eine klare Co-Lokalisation von MitoSox™ Red und MitoView™ 633, was die intramitochondriale Messung reaktiver Sauerstoffspezies durch MitoSox™ Red bestätigt.

4.3.2 Bestimmung der Menge an mROS mittels Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung der produzierten Menge intramitochondriale ROS wurde der Farbstoff MitoSox® Red verwendet (3.2.7). Zudem wurden Zellen weiterer Wells mit MitoTracker® Green gefärbt, was für eine Standardisierung auf die mitochondriale Menge verwendet wurde und damit einen Vergleich zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen ermöglichte. Eine Co-Färbung von MitoSox™ Red und MitoTracker® Green war aufgrund der Überschneidung der Emissions- und Absorptionsspektren nicht möglich.

Standardisiert auf die mitochondriale Menge (MitoTracker® Green) zeigte sich, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen ein signifikant höheres MitoSox® Red-Signal aufwiesen als LLC-PK1_{WT}-Zellen ($p=0,035$). Eine Hemmung des Komplexes III der Atmungskette mittels Antimycin A (50 μM ; 1h) führte in LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen zu einem erwarteten Anstieg des MitoSox® Red-Signals. In LLC-PK1_{WT}-Zellen führte die Behandlung mit Antimycin A zu einer Steigerung des MitoSox™ Red-Signals von 512 % ($p=0,0059$) und in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zu einer Steigerung des MitoSox™ Red-Signals von 422 % ($p=0,0062$). Auch nach Behandlung mit Antimycin A ergab sich für LLC-PK1_{T336A}-Zellen eine signifikant höhere MitoSox™ Red-Intensität ($p=0,024$). Vergleicht man jedoch die prozentuellen Anstiege nach Antimycin A-Behandlung, so zeigt sich, dass Antimycin A in LLC-PK1_{WT}-Zellen vermutlich zu einer stärkeren Steigerung der mROS-Produktion führt.

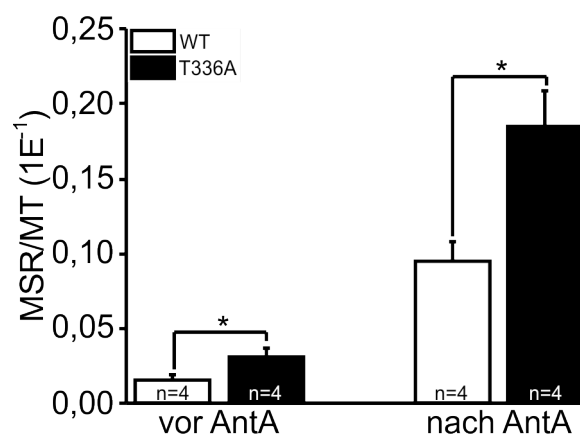


Abbildung 13: Intramitochondriale ROS

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit MitoSox®Red [MSR] und MitoTracker® Green [MT]. Sowohl vor Behandlung mit Antimycin A ($p=0,035$), als auch nach Behandlung mit Antimycin A ($p=0,024$) weisen LLC-PK1_{T336A}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{WT}-Zellen ein erhöhtes MitoSox® Red-Signal auf.

4.4 Intrazelluläre ROS

4.4.1 Demonstration der H₂DCFDA-Färbung

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden gemäß 3.2.10.4 mit H₂DCFDA und MitoTracker® Orange gefärbt, um die Lokalisation von H₂DCFDA zu demonstrieren. Es zeigte sich wie erwartet eine überwiegend zytosolische Färbung von H₂DCFDA. Durch die Co-Färbung mit MitoTracker® Orange zeigte sich jedoch auch eine Anfärbung von Mitochondrien mit H₂DCFDA, was vor allem in LLC-PK1_{T336A}-Zellen anhand der elongierten Mitochondrien sichtbar war.

H₂DCFDA dient dem Nachweis zytosolischer ROS in Form von H₂O₂. [59, 72] Mitochondrien sollten sich deshalb eigentlich nicht anfärben lassen, da mROS Superoxidionen (O₂⁻) entsprechen, welche mit H₂DCFDA nicht interagieren. Wie jedoch in 1.3 beschrieben, werden Superoxidionen bereits intramitochondrial durch die mitochondriale Superoxiddismutase in H₂O₂ umgesetzt. Hieraus ergibt sich, dass sich mit H₂DCFDA vermutlich sowohl zytosolische ROS als auch ein Teil der mROS nachweisen lassen, was es bei Interpretation der durchflusszytometrischen Messungen zu berücksichtigen gilt.

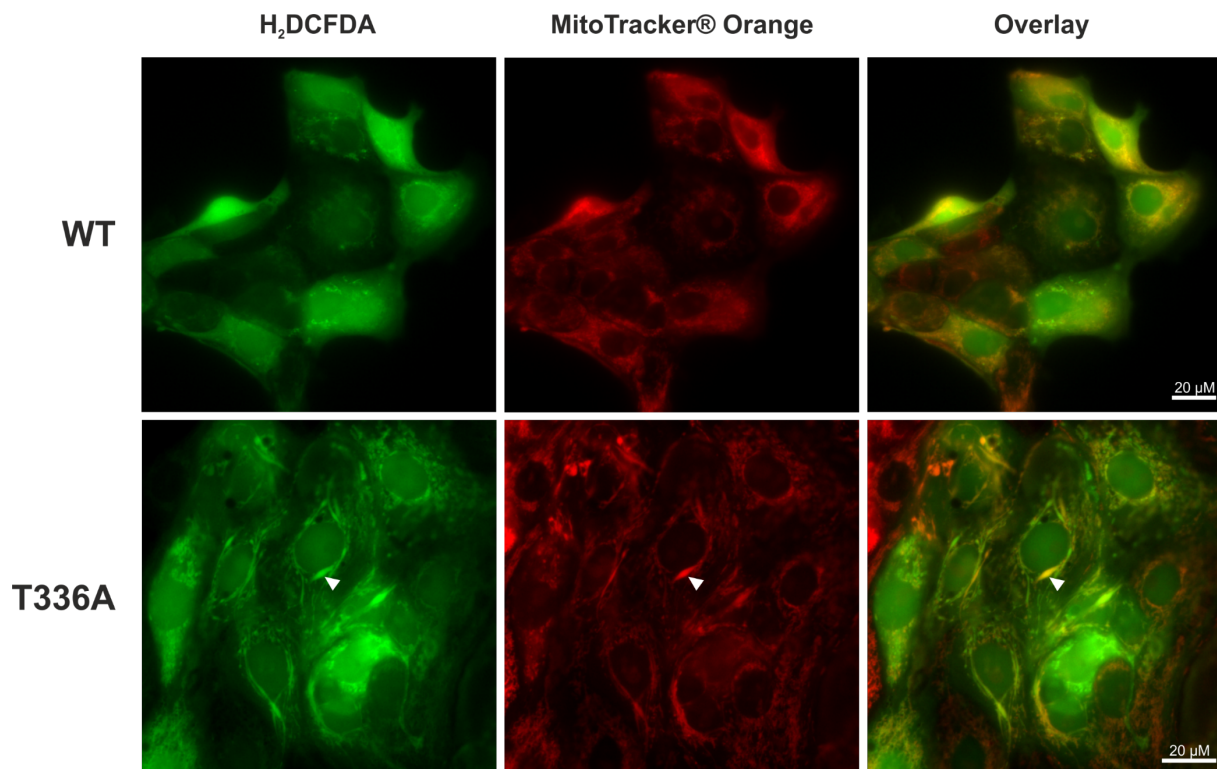


Abbildung 14: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit H₂DCFDA und MitoTracker® Orange

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden mit H₂DCFDA und MitoTracker® Orange gefärbt. Zu erkennen ist die zytosolische Färbung von H₂DCFDA, während MitoTracker® Orange spezifisch die Mitochondrien anfärbt. In LLC-PK1_{T336A}-Zellen, aber auch in LLC-PK1_{WT}-Zellen, sind auch H₂DCFDA-positive Mitochondrien (▶) zu erkennen. Dies beruht vermutlich darauf, dass O₂⁻ bereits zum Teil in den Mitochondrien durch die mitochondriale Superoxiddismutase (mSOD) in H₂O₂ umgesetzt wird und somit bereits innerhalb der Mitochondrien mit dem Farbstoff reagieren kann.

4.4.2 Bestimmung intrazellulärer ROS

Mittels H₂DCFDA (3.2.8), welches nach Oxidation durch ROS im Zytoplasma als DCF fluoresziert, wurde die Menge an intrazellulären ROS bei LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen bestimmt.

In unbehandelten Zellen (nur H₂DCFDA gefärbt) war kein signifikanter Unterschied der Menge an intrazellulären ROS zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen erkennbar. Nach Behandlung mit Antimycin A (50 µM; 1 h) zeigten LLC-PK1_{WT}-Zellen ein signifikant höheres DCF-Signal als LLC-PK1_{T336A}-Zellen und somit einen höheren Gehalt an intrazellulären ROS. Auch nach Behandlung mit H₂O₂ (200 µM; 1 h), welches in das Zytoplasma gelangt, dort mit dem Farbstoff reagiert und somit als Positivkontrolle dient, zeigte sich in LLC-PK1_{WT}-Zellen tendenziell eine höhere DCF-Intensität, diese war jedoch nicht signifikant.

Eine Betrachtung der mittleren Zunahme des DCF-Signals (in %) nach Behandlung mit Antimycin A oder H_2O_2 ergab, dass sowohl eine Behandlung der Zellen mit Antimycin A (50 μM) als auch mit H_2O_2 (200 μM) in LLC-PK1_{WT}-Zellen zu einem signifikant höheren prozentualen Anstieg führte als in LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Dies bedeutet, dass die gleiche Menge an zugegebenem H_2O_2 in LLC-PK1_{WT}-Zellen entgegen der Erwartungen zu einem höheren Umsatz von H_2DCFDA zu fluoreszierendem DCF führte.

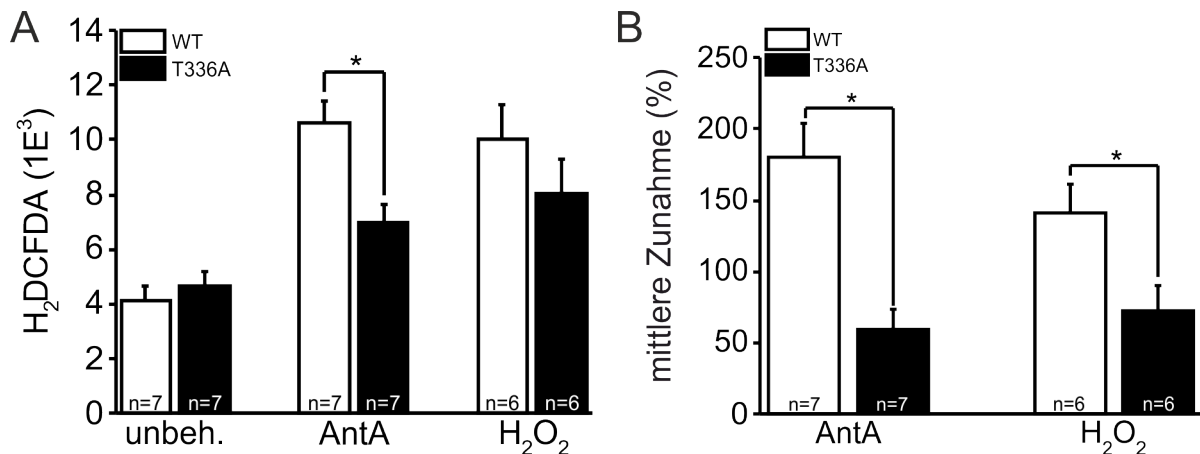


Abbildung 15: Intrazelluläre ROS

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit MitoSox™ Red zur Bestimmung der Menge an intrazellulären ROS. Ein Teil der Zellen wurde zur Steigerung der ROS-Produktion mit Antimycin A behandelt. Ein weiterer Teil wurde mit H_2O_2 behandelt, welches in das Zytosol gelangt und dort mit dem Farbstoff reagieren kann, was hier als Positivkontrolle verwendet wurde. **A** Für unbehandelte Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied des H_2DCFDA -Signals zw. LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,49$), somit ist die Menge an intrazellulären ROS als gleich anzusehen. Nach Behandlung mit Antimycin A (AntA; 50 μM) zeigte sich ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal in LLC-PK1_{WT}-Zellen gegenüber LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,0049$). Nach Behandlung mit H_2O_2 (200 μM) zeigte sich ein in der Tendenz höheres Fluoreszenzsignal in LLC-PK1_{WT}-Zellen, jedoch nicht signifikant ($p=0,29$). **B** Die Betrachtung der mittleren Zunahme (%) nach Behandlung mit AntA und H_2O_2 zeigte sowohl für AntA ($p=0,0019$) als auch für H_2O_2 ($p=0,028$) eine signifikant höhere Steigerung der H_2DCFDA -Fluoreszenz in LLC-PK1_{WT}-Zellen

4.5 Bestimmung der lysosomalen Menge

4.5.1 Demonstration der LysoTracker® Green-Färbung

LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden mit LysoTracker® Green und MitoTracker® Orange gefärbt (3.2.10.5). Zuvor wurde ein Teil der LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen für 24h mit Chloroquin behandelt (3.2.9), weshalb eine Erhöhung der lysosomalen Menge erwartet wurde. Wie sich in Abbildung 16 zeigt, konnten mit LysoTracker® Green scharf umschriebene vesikuläre Strukturen angefärbt werden. Diese Strukturen entsprechen sauren Kompartimenten und somit u.a. Lysosomen und späten Endosomen. Es zeigte sich außerdem eine starke Erhöhung der Menge an vesikulären Strukturen durch Vorbehandlung der Zellen mit Chloroquin. Die Co-Färbung mit MitoTracker® Orange zeigt die Lage der sauren Kompartimente in Relation zu den Vesikeln.

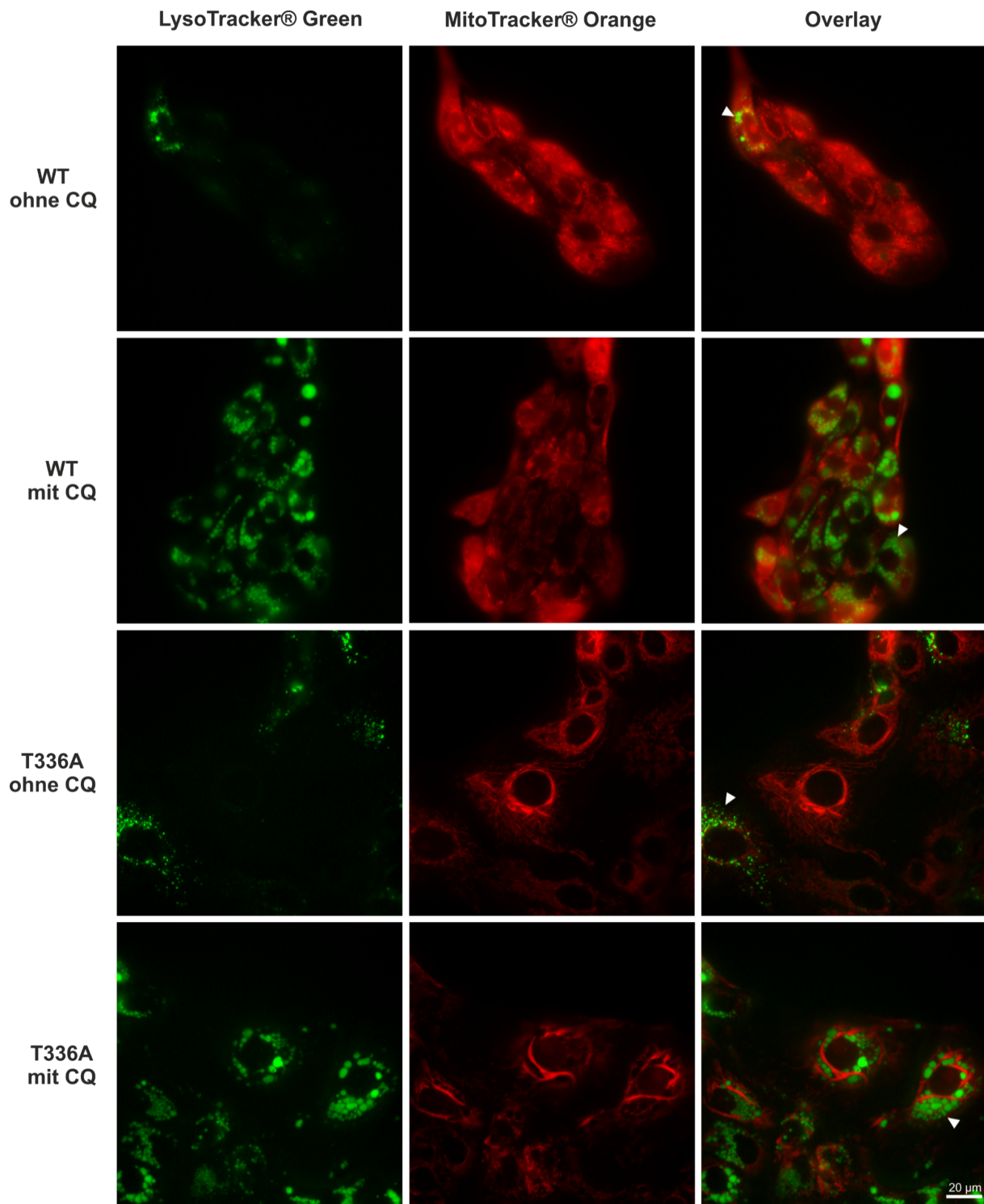


Abbildung 16: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit LysoTracker® Green und MitoTracker® Orange. LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit LysoTracker® Green und MitoTracker® Orange. Weitere Zellen wurden vor der Färbung für 24 h mit Chloroquin (CQ) behandelt. Durch die Behandlung mit CQ erkennt man eine deutliche Erhöhung des lysosomalen Gehalts (▶), da CQ zu einer Hemmung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen führt.

4.5.2 Bestimmung des lysosomalen Gehalts

Saure Organellen wie Lysosomen oder späte Endosomen lassen sich mit Farbstoffen der Gruppe LysoTracker® anfärben. LysoTracker®-Farbstoffe sind einerseits als lysosomenspezifisch [73] beschrieben, andererseits werden ihre Spezifikationen weiter gefasst und auf saure Organellen festgelegt [64-66]. Da sich daraus resultierend die Färbung nicht ausschließlich auf Lysosomen beschränkt, wird in Folge von der Bestimmung des Gehalts an sauren Kompartimenten gesprochen.

Für die Bestimmung des Gehalts an sauren Kompartimenten wurden LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen mittels LysoTracker® Green gefärbt (3.2.9). Eine Vorbehandlung mit Chloroquin wurde zur Erhöhung der lysosomalen Menge verwendet und diente als Positivkontrolle. Das Funktionsprinzip hierzu ist noch nicht vollständig verstanden. Einerseits wird beschrieben, dass Chloroquin Autophagie induziert, gleichzeitig als schwache Base die Azidifizierung von Lysosomen hemmt [74] und in Folge die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen blockiert.[66, 68] Neuere Erkenntnisse [67] zeigen andererseits, dass die Blockade der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen nicht auf der Hemmung der Azidifizierung der Lysosomen beruht.

Wir vermuteten vorab, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen einen höheren Gehalt an sauren Kompartimenten aufweisen, um die elongierten und überalterten Mitochondrien mittels Mitophagie zu beseitigen. Diese Vermutung basierte auf den Ergebnissen des in Vorarbeiten angefertigten Gen-Chips (1.5) von LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen, welche zeigten, dass die mRNA-Expression von Bestandteilen der vakuolären V-ATPase in LLC-PK1_{T336A}-Zellen erhöht war. In den Experimenten zeigten unbehandelte Zellen (d.h. ohne Chloroquin) jedoch keinen Unterschied in ihrer LysoTracker® Green-Intensität und damit keinen Unterschied in ihrem Gehalt an sauren Kompartimenten. Nach Vorbehandlung mit Chloroquin (50 µM; 24 h) zeigte sich für LLC-PK1_{WT}-Zellen eine signifikant höhere LysoTracker® Green-Intensität im Vergleich zu LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Die mittlere prozentuale Zunahme der LysoTracker® Green-Intensität durch Behandlung mit Chloroquin war in LLC-PK1_{WT}-Zellen ebenfalls signifikant höher als in LLC-PK1_{T336A}-Zellen. Schlussfolgernd würde dies wider Erwarten bedeuten, dass eine Induktion der Autophagie mit Chloroquin in LLC-PK1_{WT}-Zellen einen potenteren Effekt erzielte als in LLC-PK1_{T336A}-Zellen und

somit in LLC-PK1_{WT}-Zellen zu einem höheren Gehalt an sauren Kompartimenten führte.

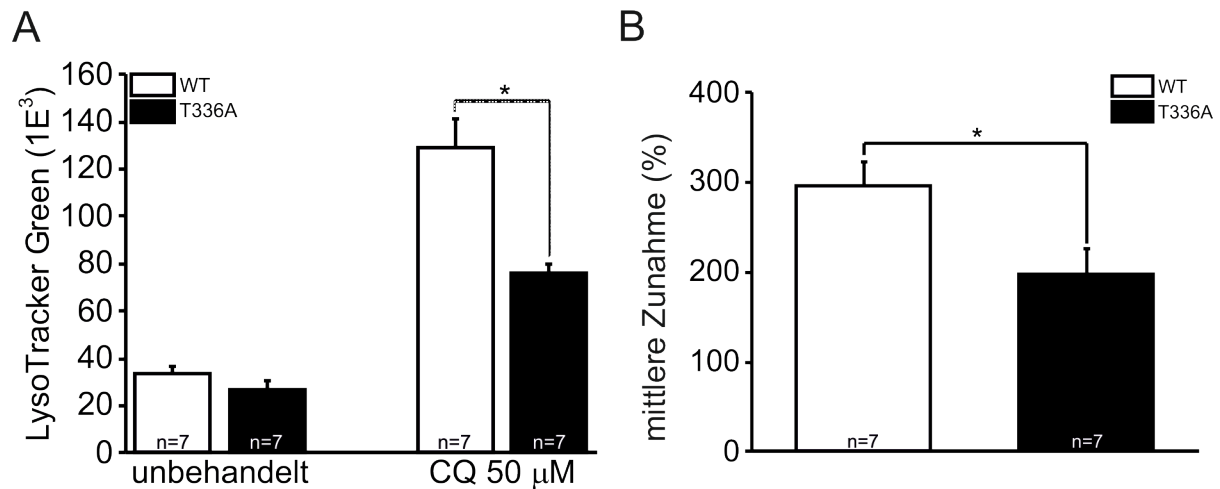


Abbildung 17: Lysosomen

A LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen gefärbt mit LysoTracker® Green. Unbehandelte Zellen zeigten keinen Unterschied ($p=0,18$) und wiesen demnach einen gleichen Gehalt an sauren Kompartimenten auf. Mit Chloroquin (50 µM; 24 h) vorbehandelte Zellen zeigten eine signifikant höhere LysoTracker® Green-Intensität in LLC-PK1_{WT}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,0029$), was für eine potentere Reaktion von LLC-PK1_{WT}-Zellen auf die Induktion der Autophagie spricht. **B** Die prozentuale Zunahme der LysoTracker® Green-Intensität durch die Behandlung mit Chloroquin (50 µM; 24 h) war in LLC-PK1_{WT}-Zellen signifikant höher als in LLC-PK1_{T336A}-Zellen ($p=0,028$).

4.5.3 Behandlung von LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit Chloroquin in aufsteigenden Konzentrationen

Im vorausgehenden Versuch (4.5.2) zeigte sich entgegen unsere Vermutung, dass sich unbehandelte Zellen in ihrem Gehalt an sauren Kompartimenten nicht unterschieden und die Behandlung von LLC-PK1_{WT}-Zellen mit Chloroquin ein höheres LysoTracker® -Green-Signal lieferte und somit zu einem höheren Gehalt an sauren Kompartimenten führte. Die Analyse des Gen-Chips (1.5) ergab, dass die mRNA-Expression von Bestandteilen der V-ATPase, welche u.a. in den Membranen von Lysosomen und Endosomen lokalisiert und für die Azidifizierung der Organellen verantwortlich ist, erhöht war. Eine erhöhte V-ATPase bei gleicher Menge an sauren Kompartimenten könnte bedeuten, dass in LLC-PK1_{T336A}-Zellen pro Lysosom bzw. spätem Endosom mehr V-ATPase in der Membran der Organellen vorhanden ist und mit dem Chloroquin um die Azidifizierung konkurriert. Denn Chloroquin ist eine schwache Base und führt wie in 4.5.2 beschrieben eventuell über die Hemmung der Azidifizierung zu einer Blockade der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen. Dementsprechend könnte die erhöhte Menge an V-ATPase in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zu einer Abschwächung des Chloroquin-Effekts geführt haben, da die Azidifizierung durch das basische Chloroquin nicht so effektiv gehemmt werden konnte.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit LysoTracker® Green (50 nM; 20 min) gefärbt und mit Chloroquin in steigenden Konzentrationen (50 µM, 75 µM, 100 µM; 24 h) vorbehandelt. Hiermit sollte gezeigt werden, ob eine Erhöhung der Chloroquin-Konzentration zu einem potenteren Effekt der Erhöhung des Gehalts an sauren Kompartimenten und damit zu höheren LysoTracker® Green-Signalen führt.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des LysoTracker® Green-Signals nach Behandlung mit 50 µM bzw. 75 µM Chloroquin. Jedoch zeigte sich wider Erwarten, dass eine Behandlung mit Chloroquin in einer Konzentration von über 50 µM zu niedrigeren LysoTracker® Green-Signalen führte. Somit ließ sich kein stärkerer Effekt der Erhöhung des Gehalts an sauren Kompartimenten durch Chloroquin in höheren Konzentrationen zeigen.

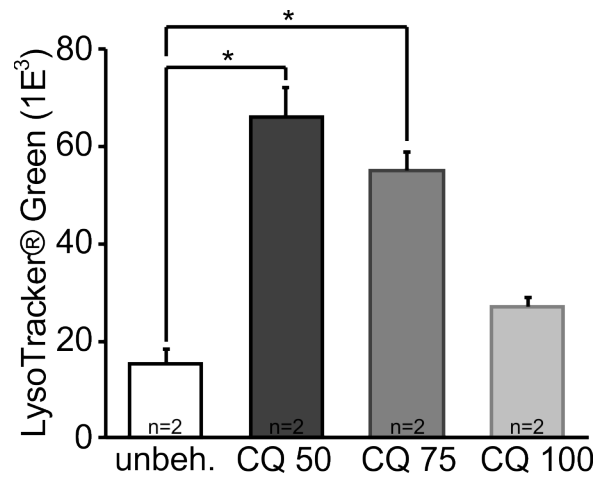


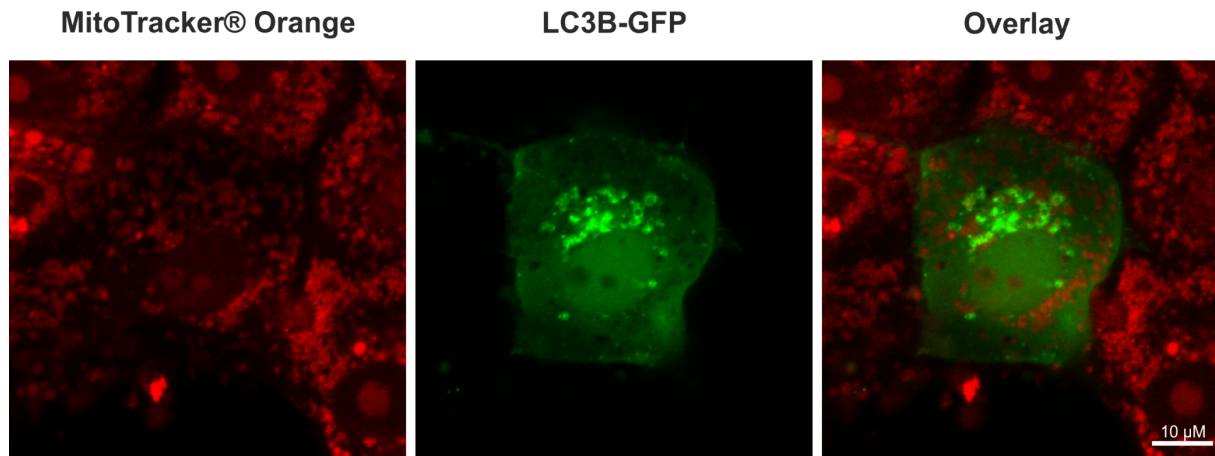
Abbildung 18: Behandlung von LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit Chloroquin (CQ) in aufsteigenden Konzentrationen

Mit LysoTracker® Green gefärbte LLC-PK1_{T336A}-Zellen wurden mit Chloroquin in aufsteigenden Konzentrationen (50 μ M, 75 μ M, 100 μ M; 24 h) vorbehandelt. Es zeigte sich, dass die Intensität von LysoTracker® Green mit aufsteigenden Konzentrationen an Chloroquin abnahm. Der Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und mit 50 μ M bzw. 75 μ M Chloroquin vorbehandelten Zellen war signifikant unterschiedlich (p [CQ_50 μ M]=0,037; p [CQ_75 μ M]=0,019). Eine Behandlung mit 100 μ M Chloroquin zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber unbehandelten Zellen (p =0,10).

4.6 Mitophagie Vorversuche

Wie sich in Vorarbeiten [1] zeigte, konnte das mutierte GATM und damit die Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen entgegen des normalen mitochondrialen Turnovers von zwei bis vier Wochen [75] auch nach acht Wochen nicht abgebaut werden. Aus diesem Grund sollte ein Versuchsaufbau generiert werden, der es ermöglicht zu untersuchen, ob die abnormen Mitochondrien aufgrund ihrer Größe mittels Mitophagie beseitigt werden können.

Hierzu wurden Zellen mit GFP gekoppeltem LC3B (LC3B-GFP), einem Bestandteil der Autophagosomen-Doppelmembran, transient transfiziert (3.2.12) und mit MitoTracker® Orange und MitoView™ 633 gefärbt (3.2.13). Nach Auswahl geeigneter Zellen wurden diese mit FCCP (bewirkt Depolarisation der Mitochondrien) und Oligomycin (Hemmung der ATP-Synthase) behandelt, was die Funktion der Mitochondrien zum Erliegen brachte und somit vermutlich Mitophagie induzierte [41, 42]. Dementsprechend wurde erwartet, dass sich LC3B-GFP-positive vesikelartige Strukturen ausbilden, welche Autophagosomen entsprechen würden. Es konnte jedoch auch nach 90 min keine Bildung von Autophagosomen beobachtet werden. Eine anschließende Betrachtung weiterer, bis dato nicht belichteter Zellen zeigte hingegen eine deutliche Ausbildung von LC3B-GFP-positiven Vesikeln und bestätigte somit die Möglichkeit der Induktion und Visualisierung von Autophagosomen. Eine zeitliche Betrachtung ausgewählter Zellen war jedoch nicht möglich, da die Bildung von Autophagosomen eventuell durch Phototoxizität während der Betrachtung behindert wurde.

**Abbildung 19: Induktion von Mitophagie mit FCCP und Oligomycin**

LLC-PK1_{WT}-Zellen, die mit LC3B-GFP transfiziert und mit MitoTracker® Orange gefärbt wurden, wurden mit FCCP (5 μM) und Oligomycin (5 μM) behandelt. Nach ca. 90 min zeigte sich eine deutliche Bildung von Autophagosomen (LC3B-GFP positiv; grün). Jedoch konnte dies nur in zuvor nicht belichteten Zellen beobachtet werden. Eventuell führte eine vorangehende Belichtung durch Phototoxizität zu einer Hemmung der Autophagosomenbildung in den belichteten Zellen.

5 Diskussion

5.1 Mitochondrialer Gehalt und mitochondriales Membranpotential

Aufgrund der veränderten Mitochondrienmorphologie in LLC-PK1_{T336A}-Zellen, welche das mutierte GATM überexprimierten, sollte untersucht werden, inwiefern sich der mitochondriale Gehalt der elongierten, spindelförmigen Riesenmitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen von dem in LLC-PK1_{WT}-Zellen unterscheidet. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die mitochondrialen Membranpotentiale zwischen den zwei Zellpopulationen unterscheiden, um hierdurch eine Aussage über die Funktion der veränderten Mitochondrien zu treffen.

Gemäß dem in Vorarbeiten postulierten Pathomechanismus (1.1.2) wird vermutet, dass durch die intramitochondrial liegenden GATM-Filamente eine Fission der Mitochondrien verhindert wird, wodurch die elongierten Riesenmitochondrien entstehen. Gemäß dieser Annahme sollte sich der mitochondriale Gehalt in LLC-PK1_{T336A}-Zellen lediglich auf den Gehalt der Riesenmitochondrien komprimieren und sich nicht vom mitochondrialen Gehalt in LLC-PK1_{WT}-Zellen unterscheiden. In der Durchflusszytometrie konnte mittels MitoTracker® Green gezeigt werden, dass sich der mitochondriale Gehalt der beiden Zellpopulationen nicht unterschied, was den postulierten Pathomechanismus stützt. Die Behandlung der Zellen mit FCCP, was für die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials verwendet wurde, zeigte einen tendenziellen Anstieg der MitoTracker® Green-Intensität gegenüber unbehandelten Zellen (4.2.3). Dies wäre gleichzusetzen mit einem Anstieg des mitochondrialen Gehalts in Folge der Behandlung mit FCCP, was jedoch nur scheinbar der Fall ist. Eine Untersuchung von *Buckman et al.* (2001) konnte zeigen, dass die Zugabe von FCCP zu einer Erhöhung der MitoTracker® Green-Intensität in Neuronen und Astrozyten führt.[76] Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass der mitochondriale Gehalt durch Zugabe von FCCP nicht zunahm und eine Standardisierung des mitochondrialen Membranpotentials auf den mitochondrialen Gehalt, welcher in FCCP-unbehandelten Zellen bestimmt wurde, gerechtfertigt war.

Mittels MitoView™ 633 wurde das mitochondriale Membranpotential semiquantifiziert, um so vergleichbare Aussagen über die Funktion der Mitochondrien in LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen treffen zu können. Ein verringertes mitochondriales Membranpotential stellt eine geringere Triebkraft für die ATP-Synthese dar und

entspricht einer Einschränkung der Mitochondrienfunktion. Diverse Arbeiten konnten zeigen, dass ein Einbruch des mitochondrialen Membranpotentials zu einer Aktivierung der Apoptose führen kann.[13, 77] Es wird vermutet, dass es zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommt. Cytochrom c bildet anschließend mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) das Apoptosom, welches die für die Apoptose verantwortlichen Caspasen aktiviert.[13, 78] Bezugnehmend auf die vorliegende Erkrankung könnte es sein, dass ein womöglich reduziertes mitochondriales Membranpotential mutierter Mitochondrien die Apoptose von proximalen Tubuluszellen induziert, was in Folge zu einem Funktionsverlust des proximalen Tubulus führen kann und somit zur Ausbildung des Fanconi-Syndroms beiträgt. Bei der Zystinose, die ebenfalls zu einem Fanconi-Syndrom führt, wird dieser Mechanismus beschrieben. Hier wird postuliert, dass die Ablagerung von Cystin in Lysosomen über mehrere Mechanismen zu einer Induktion der Apoptose proximaler Tubuluszellen führt.[49]

Die Behandlung der Zellen mit FCCP bewirkt eine Depolarisation des Membranpotentials. FCCP, ein Protonophor und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, ermöglicht eine H^+ -Passage durch die innere Mitochondrienmembran mit Umgehen der ATP-Synthase. In Folge kommt es zu einem raschen Einbruch des mitochondrialen Membranpotentials [16, 17] sowie zu einer Umverteilung des Farbstoffs MitoView™ 633 in das Zytosol bzw. den Extrazellularraum, wodurch man die nach FCCP-Zugabe bestimmte Fluoreszenz auf eine unspezifische Farbstoffanreicherung zurückführen kann.[51] Die Untersuchung unbehandelter Zellen (ohne FCCP) zeigte lediglich tendenziell depolarisiertere Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen, was aber nicht signifikant war. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Abzug der unspezifischen Farbstoffanreicherung (MitoView™ 633-Signal nach FCCP) und Standardisierung auf den mitochondrialen Gehalt (MitoTracker® Green) das mitochondriale Membranpotential in LLC-PK1_{T336A}-Zellen signifikant depolarisierter war als in LLC-PK1_{WT}-Zellen. Im direkten Vergleich (Abbildung 11) des MitoView™ 633-Signals von LLC-PK1_{T336A}-Zellen und LLC-PK1_{WT}-Zellen, wobei der Wert von LLC-PK1_{WT}-Zellen jeweils als „1“ festgelegt wurde, zeigte sich im Mittel ein signifikant niedrigeres MitoView™ 633-Signal in LLC-PK1_{T336A}-Zellen, das mit einem depolarisierten mitochondrialen Membranpotential einhergeht. Wenn auch die Unterschiede sehr gering sind und diese erst nach den oben geschilderten Standardisierungen aussagekräftig sind, könnte womöglich bereits eine

geringe Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials Auswirkung auf die Resorptionsfähigkeit des proximalen Tubulus haben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mutation in *GATM* (T336A) in LLC-PK1 Zellen bei gleichbleibendem mitochondrialem Gehalt zu einem depolarisierteren mitochondrialen Membranpotential führt, wodurch die Triebkraft der ATP-Synthase und damit die Mitochondrienfunktion womöglich eingeschränkt ist. Da die massenhafte Resorption lebenswichtiger Substrate durch den proximalen Tubulus einen hohen Bedarf an Energie in Form von ATP beansprucht und das mitochondriale Membranpotential die Triebkraft der ATP-Produktion durch die Mitochondrien darstellt, könnte das depolarisierte Membranpotential in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zur Ausbildung des Fanconi-Syndroms beitragen. Dies wurde bereits für eine Fanconi-Syndrom auslösende Mitochondriopathie, welcher einer Mutation des *EHHADH* zugrunde liegt, postuliert. Hier wird vermutet, dass es fälschlicherweise zu einem Import des peroxisomalen Proteins EHHADH in Mitochondrien kommt, was zu einer Störung der β -Oxidation mit folgender reduzierter Energiebereitstellung führt.[5]

5.2 ROS-Produktion: Mitochondriale und zelluläre ROS

Die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist mit zellulärem Stress, wie zum Beispiel Hypoxie, Hungern und pathogenen Infektionen, verknüpft.[21, 22] Neben der Tatsache, dass ROS in erhöhten Konzentrationen zu zellulären Schäden führen können [21, 23], werden sie aber auch als Alarm-Systeme angesehen, welche die Zelle auf „Stress“ aufmerksam machen. Eine zentrale Stelle der ROS-Produktion stellen Mitochondrien dar (1.3) [18-20], wodurch ROS eine Kommunikation zwischen Mitochondrien und anderen Zellorganellen ermöglichen, um Abwehrmechanismen aktivieren zu können.[22]

Bereits in Vorarbeiten [1] konnte mittels Immunfluoreszenz und Verwendung des ROS-Farbstoffs „CellROX Deep Red (Invitrogen™)“ gezeigt werden, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen signifikant mehr ROS produzierten als LLC-PK1_{WT}-Zellen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte nun durchflusszytometrisch die Menge an mROS und intrazellulären ROS gemessen werden. Wir konnten zeigen, dass Mitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen eine signifikant größere Menge an Superoxid-Ionen ($O_2^- \triangleq$ mROS) produzierten. Eine Induktion der mROS-Produktion durch Antimycin A (Hemmung des Komplexes III der Atmungskette) führte ebenfalls zu einer signifikant höheren Menge an Superoxid-Ionen in LLC-PK1_{T336A}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{WT}-Zellen. Jedoch führte die Behandlung mit Antimycin A nicht zu einer weiter ausgeprägten Steigerung der mROS-Produktion in LLC-PK1_{T336A}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{WT}-Zellen. mROS können einerseits innerhalb des Mitochondriums durch die mitochondriale Katalase eliminiert werden, nachdem sie, katalysiert durch die mitochondriale Superoxiddismutase (mSOD), in H_2O_2 umgewandelt wurden. Andererseits können sie auch als Superoxidionen oder H_2O_2 in das Zytosol gelangen, wo sie durch die zytosolische SOD und Katalase eliminiert werden (1.3.2).[24, 27-31] Es wurde deshalb vermutet, dass die erhöhte mROS-Produktion in LLC-PK1_{T336A}-Zellen ebenfalls zu einem erhöhten Fluss von O_2^- bzw. H_2O_2 aus dem Mitochondrium führt, was zu einer Erhöhung der Menge an zytosolischen ROS führen würde. Entgegen der Erwartungen bot sich kein Unterschied in der Menge an intrazellulären ROS zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen. „Intrazelluläre ROS“ beschreibt in diesem Zusammenhang sowohl zytosolische als auch mitochondriale ROS in Form von H_2O_2 , da sich zeigte (4.4.1), dass sich auch Mitochondrien mit H_2DCFDA , welches theoretisch spezifisch zytosolische ROS in Form von H_2O_2 nachweisen sollte, anfärbten. Eine Stimulation der mROS-Produktion mit Antimycin A

ergab jedoch unerwarteterweise einen signifikant höheren Anstieg an intrazellulären ROS in LLC-PK1_{WT}-Zellen. Auch eine Behandlung mit H₂O₂ als Positivkontrolle zeigte einen größeren Anstieg der H₂DCFDA-Intensität in LLC-PK1_{WT}-Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen zwar mehr mROS produzierten, LLC-PK1_{WT}-Zellen jedoch höhere Werte an intrazellulären ROS aufwiesen und auch eine exogene Zugabe von H₂O₂, welches den Farbstoff H₂DCFDA in das fluoreszierende DCF umwandelt, in LLC-PK1_{WT}-Zellen ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal bewirkte. Auch die Zugabe von Antimycin A führte in LLC-PK1_{WT}-Zellen bei Messung der mROS zu einer prozentual potenteren Steigerung der mROS-Produktion. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde vermutet, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen eine erhöhte antioxidative Kapazität und somit gesteigerte Schutzmechanismen gegenüber intrazellulären ROS in Form von H₂O₂ aufwiesen. Eine Betrachtung des in Vorarbeiten von LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen angefertigten Genchips zeigte zwischen den beiden Zellpopulationen keine Unterschiede in der mRNA Expression von mitochondrialer Superoxiddismutase (SOD2), Katalase, Peroxiredoxin (PRX1, PRX2, PRX5, PRX6) und Glutathion-Peroxidase (GPX2, GPX3, GPX5, GPX6), welche allesamt Enzyme zur Abwehr von zellulären ROS [22] und somit Schutzmechanismen darstellen. Die zytosolische Superoxiddismutase (SOD1) war im Genchip nicht enthalten. Jedoch zeigte sich eine 5,49-fache (p=0,00001) erhöhte mRNA-Expression des L-FABP1 (fatty acid binding protein 1 – liver type). L-FABP ist in der Leber, aber auch im proximalen Tubulus lokalisiert [79, 80]. Neben seinen Aufgaben im Transport langkettiger Fettsäuren [79] gilt L-FABP als zelluläres Antioxidans [81]. *Yan et al. (2010)* konnten zeigen, dass eine Erhöhung der Expression von L-FABP zu einem verringerten DCF (2',7'-dichlorofluorescein)-Signal führt und somit die Menge an zytosolischen ROS signifikant reduziert. [80] Daraus schließen wir, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen womöglich durch Steigerung der L-FABP1-Expression einer erhöhten Produktion mitochondrialen ROS und einer damit verbundenen Zellschädigung entgegenwirken. Unklar ist, ob auch proximale Tubuluszellen in Nieren betroffener Patienten mit einer Steigerung der L-FABP1-Expression den erhöhten ROS entgegenwirken bzw. andere antioxidative Abwehrmechanismen exprimieren. Durch eine derartige Verstärkung der antioxidativen Kapazität könnten ROS, welche als wesentlicher Faktor zellulären Schadens gelten, reduziert und der Krankheitsverlauf eventuell verzögert werden. Auch ein therapeutischer Ansatz an dieser Stelle wäre denkbar.

5.3 Lysosomaler Gehalt

In vorangehenden Arbeiten [1] zeigte sich, dass überexprimiertes mutiertes GATM und damit die Riesenmitochondrien von LLC-PK1_{T336A}-Zellen auch über acht Wochen nach Unterbrechung der Induktion mit Tetrazyklin nicht abgebaut werden konnten. In LLC-PK1_{WT}-Zellen hingegen konnte bereits vier Wochen nach Unterbrechung der Induktion kaum und nach sechs Wochen kein Wildtyp-GATM mehr nachgewiesen werden, was dem regulären mitochondrialen Turnover von zwei bis vier Wochen [75] entspricht. Es wird vermutet, dass durch die intramitochondrialen Filamente eine Fission von Mitochondrien behindert wird. Da Fission eine wesentliche Rolle in der Beseitigung von überalterten bzw. beschädigten Mitochondrien einnimmt [82, 83], wird zudem vermutet, dass die elongierten, spindelförmigen Riesenmitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen nicht mehr mittels Autophagie bzw. Mitophagie abgebaut werden können. Im Zuge der Mitophagie (1.4) werden Mitochondrien zunächst in Autophagosomen eingeschlossen, welche anschließend mit Lysosomen, die katabole Enzyme beinhalten, zu Autophagolysosomen fusionieren, um die Mitochondrien abzubauen.[34-37] Die Auswertung des angefertigten Genchips zeigte für LLC-PK1_{T336A}-Zellen eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von Untereinheiten der lysosomalen V-ATPase. Die Zusammenschau der beschriebenen Ergebnisse ließ vermuten, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen versuchen, durch Erhöhung der lysosomalen Menge eine Mitophagie der vergrößerten Mitochondrien zu erreichen. Zur Überprüfung dieser These wurden in LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit Lyotracker® Green spezifisch saure Kompartimente und somit hauptsächlich Lysosomen angefärbt. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied des Gehalts an sauren Kompartimenten zwischen den beiden Zellpopulationen. Weitere Zellen wurden mit Chloroquin vorbehandelt, um eine Steigerung des lysosomalen Gehalts zu erzielen, was als Positivkontrolle diente.[37, 66] Es stellte sich unerwarteterweise heraus, dass in LLC-PK1_{WT}-Zellen durch Chloroquin eine signifikant höhere Steigerung des Gehalts an sauren Kompartimente erreicht werden konnte. Das Funktionsprinzip von Chloroquin, welches schwach basisch ist und sich so in sauren Kompartimenten anreichert, ist noch nicht vollständig verstanden. Einerseits wird beschrieben, dass Chloroquin Autophagie induziert, gleichzeitig als schwache Base die Azidifizierung von Lysosomen hemmt [74] und in Folge die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen blockiert.[66, 68]. Neuere Erkenntnisse zeigen andererseits, dass die Blockade der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen

nicht auf der Hemmung der Azidifizierung der Lysosomen beruht, sondern möglicherweise hemmend mit den Fusionsproteinen des SNARE-Komplexes interagiert.[67] Aufgrund dessen, dass Chloroquin eventuell über die Hemmung der Azidifizierung von Lysosomen wirkt, wurde vermutet, dass die Anzahl an lysosomaler V-ATPase in LLC-PK1_{T336A}-Zellen pro Lysosom größer war als in LLC-PK1_{WT}-Zellen. Die erhöhte Anzahl an V-ATPasen könnte somit eine potentere Azidifizierung ermöglicht haben, was zu einem reduzierten Effekt des basischen Chloroquins und deshalb zu einem geringeren Anstieg der lysosomalen Menge in LLC-PK1_{T336A}-Zellen führte. Um diese Vermutung zu testen, wurden LLC-PK1_{T336A}-Zellen mit Chloroquin in steigenden Konzentrationen behandelt. Es zeigte sich jedoch, dass eine Erhöhung der Chloroquin-Konzentration über 50 µM zu einer Reduktion des LysoTracker® Green-Signals und somit zu einer Abschwächung des Chloroquin-Effekts führte. Die Vermutung, dass in LLC-PK1_{T336A}-Zellen die Anzahl der lysosomalen V-ATPase höher war, konnte somit nicht erfolgreich getestet werden.

Für einen vermehrten Einbau der V-ATPase in saure Kompartimente in LLC-PK1_{T336A}-Zellen würde weiterhin sprechen, dass sich im Genchip eine erhöhte mRNA-Expression von Aquaporin 6 (AQP6) zeigte („fold change“ LLC-PK1_{T336A}-Zellen vs. LLC-PK1_{WT}-Zellen: 2,38; $p=9 \cdot 10^{-5}$). AQP6 ist ein transmembranöser Kanal, der wie der Chloridkanal CLC5 Anionen zum Ladungsausgleich in die sauren Kompartimente bzw. über die Zellmembran transportiert.[47] Da AQP6 zu über 98 % in Membranen intrazellulärer Vesikel lokalisiert ist, könnte dies bedeuten, dass die Erhöhung von AQP6 eine ausgleichende Reaktion auf die vermehrte Anzahl an V-ATPase pro saurem Kompartiment darstellt, um so die Elektroneutralität zu gewährleisten.[43, 47, 84]

Man muss jedoch beachten, dass die V-ATPase nicht nur in Membranen von Lysosomen lokalisiert ist, sondern auch apikal in der Zellmembran oder in subapikal gelegenen Endosomen.[43] Somit wäre es möglich, dass die erhöhte mRNA-Expression der beschriebenen Untereinheiten auf einer erhöhten Expression der V-ATPase in der Zellmembran beruht. Dort dient die V-ATPase in proximalen Tubuluszellen der Na⁺-unabhängigen Bicarbonat-Resorption (HCO₃⁻). Um die Funktion der erhöhten mRNA-Expression der V-ATPase Untereinheiten zu verstehen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Der Fokus sollte hierbei auf der Lokalisation der V-ATPase und möglichen Unterschieden zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen liegen. Einen weiteren Anhaltspunkt könnte auch die

Messung des intrazellulären bzw. des lysosomalen pH-Werts liefern. Patienten mit Fanconi-Syndrom zeigen unter anderem das Symptom der renal tubulären Azidose, da es aufgrund des Funktionsverlustes des proximalen Tubulus zu einer reduzierten H^+ -Exkretion und damit verbundenen verminderten Bicarbonat-Rückresorption kommt. Es könnte also sein, dass eine Reduktion des intrazellulären pH zu einer reflektorischen Erhöhung der V-ATPase in der Zellmembran führt, um hiermit eine intrazelluläre Azidose zum Teil zu kompensieren. Hierbei ist vor allem die Isoform *a4*, welche sich u.a. im Genchip als erhöht in LLC-PK1_{T336A}-Zellen zeigte, spezifisch für die zellmembranständige Lage in proximalen Tubuluszellen und steht somit im Dienst des Säure-Basen-Haushalts. Zudem konnte für Tumorzellen eine vermehrte Expression zellmembranständiger V-ATPase beschrieben werden, was den Tumorzellen die Ausbildung eines alkalischen Zytosols ermöglicht. Umgekehrt führt eine Mutation der Untereinheit *a4* der V-ATPase im Bereich des proximalen Tubulus zu einer renal-tubulären Azidose.[44] Diese beschriebenen Erkenntnisse wiederum implizieren eher eine zellmembranständige Lage der V-ATPase. Wenn auch eine direkte Übertragung von proximalen Tubuluszellen auf LLC-PK1-Zellen nicht zulässig ist, könnten weiterführende Untersuchungen neben der Bestimmung des intrazellulären pH auch beinhalten, inwiefern die V-ATPase als Kompensationsmechanismus der möglichen intrazellulären Azidose wirkt und eventuell therapeutisch moduliert werden kann. Hieraus gewonnene Erkenntnisse könnten somit genutzt werden, um Therapieoptionen zu entwickeln, welche die Erkrankung eventuell verzögern bzw. Symptome lindern.

5.4 Detektion von Mitophagie in LLC-PK1_{T336A}-Zellen

In den beschriebenen Absetzversuchen (5.3) konnte, wie bereits beschrieben, gezeigt werden, dass das mutierte GATM und damit die Mitochondrien im Gegensatz zum Wildtyp-GATM auch über acht Wochen, entgegen des normalem mitochondrialen Turnover von zwei bis vier Wochen[75], nicht abgebaut werden konnten. Es wurde deshalb vermutet, dass die abnormen Mitochondrien mittels Mitophagie erschwert bzw. gar nicht abgebaut werden können. Im Zuge dieser Arbeit wurden deshalb Vorexperimente durchgeführt, welche eine Induktion der Autophagie und deren Quantifizierung ermöglichen sollten.

In den durchgeführten Versuchen wurden Zellen mit LC3B-GFP, einem Bestandteil der Autophagosomen-Doppelmembran, transient transfiziert und anschließend wurde Mitophagie mit FCCP und Oligomycin induziert.[41, 42] Durch die Depolarisation der Mitochondrien durch FCCP und die Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin resultiert vermutlich eine Blockade der Mitochondrienfunktion, was zur Mitophagie führt. Es zeigten sich in der konfokalen Mikroskopie nach einer gewissen Zeit Autophagosomen, jedoch nicht in Zellen, welche über die Zeitserie hinweg betrachtet wurden. Hierbei ist unklar, ob die Bildung von Autophagosomen durch Phototoxizität verhindert wurde oder ob lediglich die falschen Zellen betrachtet wurden, welche zum Beispiel ineffektiv transfiziert wurden.

Um zu beobachten, ob und wie sich Autophagosomen um die abnormen Mitochondrien bilden, müssten weiterführende Experimente durchgeführt werden. Aufgrund der möglichen Phototoxizität könnte man ein Live-Cell-Imaging mit Zellen, welche für unterschiedliche Zeitspannen mit FCCP und Oligomycin behandelt wurden, durchführen. Eine Verwendung von fixierten Zellen ist nicht möglich, da sich in weiteren Versuchen zeigte, dass die Fixation vermutlich zu einer Auslöschung des LC3B-GFP-Signals führt.

Inwiefern die elongierten, spindelförmigen Riesenmitochondrien in LLC-PK1_{T336A}-Zellen mittels Mitophagie autophagozytiert werden können, bleibt bis dato unklar. In der Literatur lassen sich jedoch Hinweise finden, dass Autophagie großer Mitochondrien nicht möglich ist und demnach diese Mitochondrien nicht abgebaut werden können und überaltern.[75]

5.5 Einordnung der Ergebnisse in den klinischen Kontext

Gemäß dem in Vorarbeiten postulierten Pathomechanismus (1.1.2) wird vermutet, dass es durch die Mutation in *GATM* zu einer Aggregation des GATM mit sich selbst und damit zu einer Ausbildung intramitochondrial gelegener GATM-Filamente kommt. Vermutlich führen diese GATM-Filamente zu einer Blockade der Fission von Mitochondrien, wodurch die Dynamik des mitochondrialen Netzwerkes gestört wird. Wie sich zeigte, entwickeln sich durch Überexpression von mutiertem GATM elongierte Mitochondrien, welche vermutlich nur erschwert bzw. überhaupt nicht mittels Mitophagie abgebaut werden können [75] und somit überaltern. Eine damit einhergehende gesteigerte ROS-Produktion[85] führt vermutlich einerseits zu einer Induktion des Inflammasoms [86] mit einem begleitenden fibrotischen Umbau des Nierenparenchyms, was in Patienten-Biopsien beobachtet werden konnte, und andererseits zu einer Induktion von Apoptose.[87, 88] Resultierend aus diesen pathologischen Prozessen kommt es bei betroffenen Patienten vermutlich zu einer Schädigung der proximalen Tubuli, was sich in Folge als Fanconi-Syndrom manifestiert und präsentiert.

Wie nun ergänzend gezeigt werden konnte, produzieren LLC-PK1_{T336A}-Zellen signifikant größere Mengen mitochondrialer ROS, wohingegen die Menge an intrazellulären ROS keinen Unterschied zwischen LLC-PK1_{WT}-Zellen und LLC-PK1_{T336A}-Zellen zeigte. Anhand der Ergebnisse aus 4.4 vermuten wir, dass LLC-PK1_{T336A}-Zellen im Vergleich zu LLC-PK1_{WT}-Zellen bereits eine größere Menge zellulärer Antioxidantien zur Reduktion intrazellulärer ROS generiert haben. ROS können zellulären Schaden (Modifikation von Lipiden, Schädigung von Proteinen und DNA) auslösen, können aber auch in Mitochondrien, am Ort ihrer Produktion, zu einer intensiven Schädigung von Proteinen und der mitochondrialen DNA (mtDNA) führen. [89] mtDNA kodiert unter anderem 13 Polypeptide, die alle Bestandteile der Atmungskette sind. [90] Eine Schädigung der mtDNA würde somit zu einer Schädigung bzw. Beeinträchtigung der Atmungskette führen, was die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt. Dies könnte erklären, dass sich in unseren Experimenten in LLC-PK1_{T336A}-Zellen eine tendenzielle Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials zeigte. ROS können aber auch zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen [91], was eine wichtige Rolle im Zuge des Zelltodes spielt.[89]

Im Fokus neuer Therapieoptionen könnte somit die Reduktion der mitochondrialen ROS bei den Patienten stehen. Hierzu existieren bereits sogenannte „*mitochondrial-targeted antioxidants*“, Antioxidantien, deren Zielstruktur Mitochondrien sind. In mehreren Studien konnte ein organprotektiver Benefit (Leber, Herz, Niere) durch Reduktion der Superoxid-Produktion nach Behandlung mit diesen Antioxidantien beobachtet werden.[92-95] Zunächst wäre es notwendig zu verifizieren, inwiefern „*mitochondrial-targeted*“-Antioxidantien zu einer Reduktion der mROS-Produktion in LLC-PK1_{T336A}-Zellen beitragen und inwiefern GATM_{MUT}-Mäuse von einer Behandlung mit „*mitochondrial-targeted*“-Antioxidantien in Hinblick auf eine Reduktion der renalen Schädigung profitieren. Basierend auf den erarbeiteten Ergebnissen könnte man so eine mögliche Therapie für Patienten erarbeiten.

8. Literaturverzeichnis

1. Reichold, M., et al., *Glycine Amidinotransferase (GATM), Renal Fanconi Syndrome, and Kidney Failure*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(7): p. 1849-1858.
2. Rodriguez Soriano, J., *Renal tubular acidosis: the clinical entity*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(8): p. 2160-70.
3. Ansermet, C., et al., *Renal Fanconi Syndrome and Hypophosphatemic Rickets in the Absence of Xenotropic and Polytopic Retroviral Receptor in the Nephron*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(4): p. 1073-1078.
4. Hall, A.M., P. Bass, and R.J. Unwin, *Drug-induced renal Fanconi syndrome*. QJM, 2014. **107**(4): p. 261-9.
5. Klootwijk, E.D., et al., *Mistargeting of peroxisomal EHHADH and inherited renal Fanconi's syndrome*. N Engl J Med, 2014. **370**(2): p. 129-38.
6. Curthoys, N.P. and O.W. Moe, *Proximal tubule function and response to acidosis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(9): p. 1627-38.
7. Kriz, W. and B. Kaissling, *Structural Organization of the Mammalian Kidney*. 2013: p. 595-691.
8. Denker, B.M. and E. Sabath, *The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(4): p. 622-5.
9. Dickson, L.E., et al., *The proximal tubule and albuminuria: really!* J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(3): p. 443-53.
10. Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk, *Creatine and creatinine metabolism*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 1107-213.
11. Wiesner, J., *Mutationen des Fanconi-assoziierten Proteins 2 (FAP2) als Ursache einer erblichen renalen Tubulopathie*. 2017.
12. Bonora, M., et al., *ATP synthesis and storage*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 343-57.
13. Karbowski, M. and R.J. Youle, *Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis*. Cell Death Differ, 2003. **10**(8): p. 870-80.
14. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(3): p. 198-219.
15. Kuhlbrandt, W., *Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes*. BMC Biol, 2015. **13**: p. 89.
16. Park, K.S., et al., *FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na⁺ currents in bovine aortic endothelial cells*. Pflugers Arch, 2002. **443**(3): p. 344-52.
17. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environ Health Perspect, 1990. **87**: p. 213-8.
18. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
19. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
20. Orrenius, S., *Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death*. Drug Metab Rev, 2007. **39**(2-3): p. 443-55.
21. Kuznetsov, A.V., et al., *Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods*. Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(8): p. 2383-90.

22. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
23. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
24. Brand, M.D., *The sites and topology of mitochondrial superoxide production*. Exp Gerontol, 2010. **45**(7-8): p. 466-72.
25. Brandt, U. and B. Trumpower, *The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1994. **29**(3): p. 165-97.
26. Heinrich, P.C.M., M; Graeve, L, *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 2014(9. Auflage).
27. Imlay, J.A., *Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 755-76.
28. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
29. Weisiger, R.A. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. Organelle specificity*. J Biol Chem, 1973. **248**(10): p. 3582-92.
30. Panieri, E. and M.M. Santoro, *ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells*. Cell Death Dis, 2016. **7**(6): p. e2253.
31. Bienert, G.P., J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn, *Membrane transport of hydrogen peroxide*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(8): p. 994-1003.
32. Raha, S. and B.H. Robinson, *Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis*. Am J Med Genet, 2001. **106**(1): p. 62-70.
33. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
34. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
35. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
36. Nakatogawa, H., et al., *Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 458-67.
37. Ding, W.X. and X.M. Yin, *Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis*. Biol Chem, 2012. **393**(7): p. 547-64.
38. Westermann, B., *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 872-84.
39. Saito, T. and J. Sadoshima, *Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart*. Circ Res, 2015. **116**(8): p. 1477-90.
40. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000298.
41. Narendra, D., et al., *Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy*. J Cell Biol, 2008. **183**(5): p. 795-803.
42. Sun, N., et al., *Measuring In Vivo Mitophagy*. Mol Cell, 2015. **60**(4): p. 685-96.
43. Wagner, C.A., et al., *Renal vacuolar H⁺-ATPase*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1263-314.
44. Toei, M., R. Saum, and M. Forgac, *Regulation and isoform function of the V-ATPases*. Biochemistry, 2010. **49**(23): p. 4715-23.
45. Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright, *Lysosomes: fusion and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 622-32.
46. Lippiat, J.D. and A.J. Smith, *The CLC-5 2Cl(-)/H(+) exchange transporter in endosomal function and Dent's disease*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 449.

47. Yasui, M., et al., *Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 184-7.
48. Finbow, M.E. and M.A. Harrison, *The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes*. Biochem J, 1997. **324 (Pt 3)**: p. 697-712.
49. Cherqui, S. and P.J. Courtoy, *The renal Fanconi syndrome in cystinosis: pathogenic insights and therapeutic perspectives*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(2): p. 115-131.
50. Lemasters, J.J. and V.K. Ramshesh, *Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores*. Methods Cell Biol, 2007. **80**: p. 283-95.
51. Johnson, L.V., et al., *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*. J Cell Biol, 1981. **88**(3): p. 526-35.
52. Kholmukhamedov, A., J.M. Schwartz, and J.J. Lemasters, *Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats: mitotracker probes and mitochondrial membrane potential*. Shock, 2013. **39**(6): p. 543.
53. Agnello, M., G. Morici, and A.M. Rinaldi, *A method for measuring mitochondrial mass and activity*. Cytotechnology, 2008. **56**(3): p. 145-9.
54. Mitra, K. and J. Lippincott-Schwartz, *Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches*. Curr Protoc Cell Biol, 2010. **Chapter 4**: p. Unit 4 25 1-21.
55. molecular probes[®], T., *MitoTracker[®] Mitochondrion-Selective Probes*. 2008.
56. Kalghatgi, S., et al., *Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells*. Sci Transl Med, 2013. **5**(192): p. 192ra85.
57. Mukhopadhyay, P., et al., *Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(1): p. 203-8.
58. molecular probes[®], T., *MitoSOX[™] Red mitochondrial superoxide indicator* 2005.
59. Bass, D.A., et al., *Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation*. J Immunol, 1983. **130**(4): p. 1910-7.
60. Oksvold, M.P., et al., *Fluorescent histochemical techniques for analysis of intracellular signaling*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(3): p. 289-303.
61. Kristiansen, K.A., et al., *Monitoring reactive oxygen species formation and localisation in living cells by use of the fluorescent probe CM-H(2)DCFDA and confocal laser microscopy*. Physiol Plant, 2009. **136**(4): p. 369-83.
62. molecular probes[®], T., *Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents*. 2006.
63. Chazotte, B., *Labeling lysosomes in live cells with LysoTracker*. Cold Spring Harb Protoc, 2011. **2011**(2): p. pdb prot5571.
64. Raben, N., et al., *Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders*. Methods Enzymol, 2009. **453**: p. 417-49.
65. molecular probes[®], T., *LysoTracker[®] and LysoSensor[™] Probes*. 2013. **2.0**.
66. Chikte, S., N. Panchal, and G. Warnes, *Use of LysoTracker dyes: a flow cytometric study of autophagy*. Cytometry A, 2014. **85**(2): p. 169-78.
67. Mauthe, M., et al., *Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion*. Autophagy, 2018. **14**(8): p. 1435-1455.
68. Ye, H., et al., *Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis*. BMC Neurol, 2016. **16**(1): p. 178.
69. Kumar, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., *Cell Separation*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2007. **106**.
70. Sack, U.T., A.; Rothe, G., *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007.

71. Wersto, R.P., et al., *Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis*. Cytometry, 2001. **46**(5): p. 296-306.
72. Wilhelm, J., et al., *Oxidative Stress in the Developing Rat Brain due to Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 5057610.
73. Chen, X., et al., *Lysosomal targeting with stable and sensitive fluorescent probes (Superior LysoProbes): applications for lysosome labeling and tracking during apoptosis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 9004.
74. Al-Bari, M.A.A., *Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases*. Pharmacol Res Perspect, 2017. **5**(1): p. e00293.
75. Terman, A., et al., *Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(4): p. 503-35.
76. Buckman, J.F., et al., *MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants*. J Neurosci Methods, 2001. **104**(2): p. 165-76.
77. Zamzami, N., et al., *Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis*. FEBS Lett, 1996. **384**(1): p. 53-7.
78. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
79. Pelsers, M.M., *Fatty acid-binding protein as marker for renal injury*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2008. **241**: p. 73-7.
80. Yan, J., et al., *Regulation of liver fatty acid binding protein expression by clofibrate in hepatoma cells*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(6): p. 957-67.
81. Wang, G., et al., *Antioxidative function of L-FABP in L-FABP stably transfected Chang liver cells*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 871-9.
82. Twig, G., B. Hyde, and O.S. Shirihai, *Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(9): p. 1092-7.
83. Iglewski, M., et al., *Mitochondrial fission and autophagy in the normal and diseased heart*. Curr Hypertens Rep, 2010. **12**(6): p. 418-25.
84. Yasui, M., et al., *Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5808-13.
85. Fougeray, S. and N. Pallet, *Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(1): p. 34-45.
86. Abais, J.M., et al., *Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?* Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(13): p. 1111-29.
87. Redza-Dutordoir, M. and D.A. Averill-Bates, *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(12): p. 2977-2992.
88. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. **5**(5): p. 415-8.
89. Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 143-83.
90. Taanman, J.W., *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1410**(2): p. 103-23.

91. Kowaltowski, A.J., R.F. Castilho, and A.E. Vercesi, *Mitochondrial permeability transition and oxidative stress*. FEBS Lett, 2001. **495**(1-2): p. 12-5.
92. Patil, N.K., et al., *Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **306**(7): p. F734-43.
93. Ni, R., et al., *Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy*. Free Radic Biol Med, 2016. **90**: p. 12-23.
94. Mukhopadhyay, P., et al., *Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(2): p. 497-506.
95. Du, K., A. Farhood, and H. Jaeschke, *Mitochondria-targeted antioxidant Mito-Tempo protects against acetaminophen hepatotoxicity*. Arch Toxicol, 2017. **91**(2): p. 761-773.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich zwischen LLC-PK1-Zellen, die <i>GATM</i> -Wildtyp und eine der <i>GATM</i> -Mutationen (T336A) überexprimieren	- 7 -
Abbildung 2: Entstehung von Superoxidionen an Komplex I	- 11 -
Abbildung 3: Q-Zyklus Komplex III	- 12 -
Abbildung 4: Vakuoläre H ⁺ -ATPase (=V-ATPase)	- 15 -
Abbildung 5: Doublettendiskriminierung	- 38 -
Abbildung 6: Gate zur Auswahl der gesuchten Zellpopulation	- 39 -
Abbildung 7: Autofluoreszenz von LLC-PK1 _{WT} - und LLC-PK1 _{T336A} -Zellen.....	- 41 -
Abbildung 8: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit MitoTracker® Green und MitoView™ 633	- 42 -
Abbildung 9: Visualisierung des FCCP-Effekts	- 43 -
Abbildung 10: Mitochondrialer Gehalt und mitochondriales Membranpotential	- 45 -
Abbildung 11: MitoView™ 633 bezogen auf LLC-PK1 _{WT} -Zellen	- 46 -
Abbildung 12: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit MitoSox™ Red und MitoView™ 633	- 47 -
Abbildung 13: Intramitochondriale ROS	- 48 -
Abbildung 14: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit H ₂ DCFDA und MitoTracker® Orange	- 50 -
Abbildung 15: Intrazelluläre ROS	- 51 -
Abbildung 16: Färbung von LLC-PK1-Zellen mit LysoTracker® Green und MitoTracker® Orange	- 53 -
Abbildung 17: Lysosomen	- 55 -
Abbildung 18: Behandlung von LLC-PK1 _{T336A} -Zellen mit Chloroquin (CQ) in aufsteigenden Konzentrationen	- 57 -
Abbildung 19: Induktion von Mitophagie mit FCCP und Oligomycin	- 59 -

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Filter-Sets Axio Observer Z.1 (Zeiss); Angaben gemäß Hersteller	- 25 -
Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe und ihre Eigenschaften	- 27 -
Tabelle 3: Färbeschema zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials und des mitochondrialen Gehalts	- 29 -
Tabelle 4: Färbeschema zur Bestimmung der Menge an mROS	- 30 -
Tabelle 5: Färbeschema zur Bestimmung der Menge an intrazellulären ROS	- 31 -
Tabelle 6: Färbeschema zur Bestimmung der lysosomalen Menge	- 33 -
Tabelle 7: Färbeschema zur Behandlung von LLC-PK1 _{T336A} -Zellen mit Chloroquin (CQ) in aufsteigenden Konzentrationen	- 35 -
Tabelle 8: Filtersetups des verwendeten Durchflusszytometers „BD Accuri™ C6 Flow Cytometer“	- 37 -

11. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AntA	Antimycin A
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
AQP6	Aquaporin 6
ATP	Adenosintriphosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CQ	Chloroquin
DCF	Dichlorfluorescein
EHHADH	Enoyl-CoA Hydratase And 3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase
ETC	elctron transport chain
FCCP	Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FMN	Flavinmononukleotid
FSC	Forward-Scatter
GATM	Glycin-Amidino-transferase
GFP	green fluorescent protein
H2DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
IMM	inner mitochondrial membrane
kDa	Kilodalton (Maßeinheit)
L-FABP	liver fatty acid binding protein
mRNA	messenger RNA
mROS	mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
mSOD	mitochondriale Superoxiddismutase
MSR	MitoSox Red
MT	MitoTracker Green
mtDNA	mitochondriale DNA
MV	MitoView™ 633
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NLRP3	auch: Cryopyrin
O ₂ ⁻	Superoxidion
OH·	Hydroxylradikal
OMM	outer mitochondrial membrane
PBS	phosphate-buffered saline
Q·	Ubisemichinon
QH ₂	Ubichinon
RET	reverse electron transport
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

SEM	standard error (of the mean) - Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Sideward-Scatter
TIM	translocases of the inner membrane
V-ATPase	Vakuoläre ATPase
WT	Wildtyp

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle sei hier PD Dr. Markus Reichold genannt, bei dem ich mich für die Bereitstellung des spannenden Themas und die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken möchte.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Julia Wiesner und der gesamten Arbeitsgruppe des Lehrstuhls für Medizinische Zellbiologie um Prof. Warth für die stetige Betreuung und Unterstützung bedanken. Die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die regenerierenden Kicker-Turniere sorgten stets für viel Freude während der Arbeit.

Auch Herrn Prof. Kunzelmann und Frau Dr. rer. nat. Jiraporn Ousingsawat sei herzlichst für die Bereitstellung des Durchflusszytometers gedankt, welche erst die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium ermöglichte und mich die gesamte Zeit stets unterstützte.

Vielen herzlichen Dank!