

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. MARKUS TIEDGE

EIN ELONGIERTES MITOCHONDRIALES NETZWERK REDUZIERT DIE VIABILITÄT VON HELA-ZELLEN

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON
JONAS MICHAEL BODANOWITZ
GEB. AM 25.09.1996 IN CUXHAVEN

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005060

ROSTOCK | 2023

Gutachterinnen:

Prof. Dr. rer. nat. S. E. Baltrusch, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Zellbiologie

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Andrea Welling, Technische Universität München, Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	HELA-ZELLINIE	1
1.2	MITOCHONDRIEN.....	2
1.2.1	AUFBAU UND FUNKTION.....	2
1.2.2	MITOCHONDRIALES GENOM.....	3
1.3	MITOCHONDRIALE ENERGIEGEWINNUNG	4
1.4	WARBURG EFFEKT	8
1.5	MITOCHONDRIALES NETZWERK	9
1.5.1	MITOCHONDRIALE FUSION	9
1.5.2	MITOCHONDRIALE TEILUNG	12
1.5.3	DRP1.....	14
1.6	CHARAKTERISIERUNG MITOCHONDRIALER STRUKTUREN.....	15
1.6.1	IMAGEJ/FIJI UND MINA.....	16
1.6.2	IMARIS	17
1.7	MODELLIERUNG MITOCHONDRIALER ZELLABLÄUFE	18
1.8	ZIELSTELLUNG	19
II.	MATERIAL.....	20
2.1	ZELLINIE.....	20
2.2	ZELLKULTUR-MEDIUM	20
2.3	CHEMIKALIEN	20
2.4	TRANSFEKTIONSREAGENZ	21
2.5	KITS	22
2.6	FLUORESZENZFARBSTOFFE	22
2.7	TAQMAN® - SONDEN	22
2.8	ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER LÖSUNGEN.....	23
2.9	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	23
2.10	GERÄTE.....	24
2.11	SOFTWARE	24

III.	METHODEN	25
3.1	HELA-ZELLEN	25
3.1.1	ZELLKULTIVIERUNG	25
3.1.2	ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT TRYPTANBLAU	25
3.2	TRANSFEKTION	26
3.3	GENEXPRESSIONANALYSE	27
3.3.1	RNA ISOLATION	27
3.3.2	RNA-KONZENTRATION	27
3.3.3	CDNA SYNTHESE	27
3.3.4	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (QRT-PCR)	28
3.4	ZELLVIABILITÄT	31
3.5	FLUORESZENZFÄRBUNG	31
3.5.1	FLUORESZENZFÄRBUNG MITOTRACKER GREEN FM	31
3.5.2	FLUORESZENZFÄRBUNG TMRE	32
3.6	ATP- UND ADP-MESSUNG	32
3.7	ANALYSE DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS	33
3.8	AUSWERTUNG DER DATEN	34
IV.	ERGEBNISSE	35
4.1	HELA-ZELLEN	35
4.2	GENEXPRESSION NACH KNOCKDOWN VON DRP1 IN HELA-ZELLEN	35
4.3	ZELLVIABILITÄT	37
4.4	ANALYSE DER MITOCHONDRIALEN NETZWERKSTRUKTUR	38
4.5	BESTIMMUNG VON ATP UND ADP	44
4.6	BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIAL	47
4.7	SAUERSTOFFVERBRAUCH	50
V.	DISKUSSION	51
5.1	GENEXPRESSIONSANALYSE UND ZELLVIABILITÄT	51
5.2	MITOCHONDRIALE MORPHOLOGIE	52
5.3	MEMBRANPOTENTIAL, ATP-SYNTHESE UND SAUERSTOFFVERBRAUCH	54

5.4	SIMULATIONSMODELL UND AUSBLICK.....	55
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	57
VII.	THESEN	59
VIII.	ANHANG	60
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
X.	LEBENS LAUF	73
XI.	DANKSAGUNG.....	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
C ^t	cycle of threshold
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA, mtDNA	Desoxyribonukleinsäure, mitochondriale DNA
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Drp1	Dynamamin-related Protein 1
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCS	Fetales Kälberserum
Fiji	Fiji is just ImageJ
Fis1	Mitochondrial Fission Protein 1
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fzo1	Fuzzy Onions homolog 1
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Heptad-Repeat-Regionen
kDA	Kilo Dalton
l	Liter
K ⁺	Kalium
MD	mittlere Domäne

Mdivi-1	Mitochondrial division inhibitor 1
Mff	Mitochondrial Fission Factor
Mfn1, Mfn2	Mitofusine 1 und 2
MGB	minor groove binde
Mgm1	Mitochondrial Genome Maintenance 1
MID49, MID51	Mitochondrial Dynamics Protein 49 kDa und 51 kDa
min	Minute
MiNA	Mitochondrial Network Analysis
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol je Liter
MTG	MitoTracker Green
MTP18	Mitochondrial Fission Process Protein 18 kDa
Na	Natrium
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
ODE	ordinary differential equations
OPA1, S-OPA1, L-OPA1	Optic Atrophy Protein 1, short-, long-OPA1
OMA1	Overlapping with the m-AAA protease 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasechainreaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PINK1	PTEN induced kinase 1
PK	Pyruvatkinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA, mRNA, rRNA tRNA	Ribonukleinsäure, messenger-, ribosomale-, transfer RNA
rpm	Umdrehungen je Minute

RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR
S	Serin
SEM	Standardfehler, „standard error of the mean“
Taq	Thermus aquaticus
Tfam	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor
TM	Transmembrandomänen
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TPRs	Tetratricopeptide Repeats
YME1	Yeast Mitochondrial Escape 1
°C	Grad Celsius
Δ	delta (Differenz)
%	Prozent
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: STRUKTUR DER MITOCHONDRIEN	2
ABBILDUNG 2: MITOCHONDRIALES GENOM.	4
ABBILDUNG 3: MALAT-ASPARTAT-SHUTTLE	5
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER OXIDATIVEN PHOSPHORYLIERUNG	7
ABBILDUNG 5: WARBURG EFFEKT IN TUMORZELLEN.	8
ABBILDUNG 6: STRUKTUR DER FUSIONSPROTEINE MFN1, MFN2 UND OPA1	11
ABBILDUNG 7: MITOCHONDRIALER FUSIONSPROZESS.	11
ABBILDUNG 8: STRUKTUR DES TEILUNSPROTEINS FIS1	13
ABBILDUNG 9: MITOCHONDRIALER TEILUNGSPROZESS.	13
ABBILDUNG 10: STRUKTUR DES TEILUNSPROTEINS DRP1	15
ABBILDUNG 11: BILDANALYSE DES MINA TOOLS	17
ABBILDUNG 12: NEUBAUER ZÄHLKAMMER	26
ABBILDUNG 13: FUNKTIONSPRINZIP DER QRT-PCR	29
ABBILDUNG 14: MIRCOOPTODE UNISENSE SAUERSTOFFVERBRAUCH	34
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER RELATIVEN GENEXPRESSION/ZELLE	36
ABBILDUNG 16: ZELLVIABILITÄT.	37
ABBILDUNG 17: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER MITOCHONDRIALEN MORPHOLOGIE	38
ABBILDUNG 18: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER MITOCHONDRIALEN MORPHOLOGIE EINER HELA-KONTROLLZELLE	38

ABBILDUNG 19: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER MITOCHONDRIALEN MORPHOLOGIE EINER HELA-ZELLE NACH HERUNTERREGULATION VON DRP.	39
ABBILDUNG 20: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSE DES MITOCHONDRIALEN NETZWERKES MIT MINA.	40
ABBILDUNG 21: INDIVIDUALS MINA.	41
ABBILDUNG 22: NETZWERKE MINA	41
ABBILDUNG 23: FOOTPRINT MINA	41
ABBILDUNG 24: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER IMARIS ANALYSE DES MITOCHONDRIALEN NETZWERKES VON ZWEI HELA-KONTROLLZELLEN.	42
ABBILDUNG 25: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER IMARIS ANALYSE DES MITOCHONDRIALEN NETZWERKES VON ZWEI HELA-ZELLEN NACH HERUNTERREGULATION VON DRP1	42
ABBILDUNG 26: MITOCHONDRIALE FLÄCHE IMARIS.	43
ABBILDUNG 27: MITOCHONDRIALE FLÄCHE IMARIS.	43
ABBILDUNG 28: ATP- UND ADP-MESSUNG IN HELA-ZELLEN	44
ABBILDUNG 29: ATP/ADP RATIO IN HELA-ZELLEN	45
ABBILDUNG 30: ATP-PRODUKTION	46
ABBILDUNG 31: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER HELA-KONTROLLZELLE.	47
ABBILDUNG 32: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINER HELA-ZELLE NACH HERUNTERREGULATION VON DRP1	48
ABBILDUNG 33: MITOCHONDRIALES MEMBRANPOTENTIAL	49
ABBILDUNG 34: SAUERSTOFFVERBRAUCH	50

I. EINLEITUNG

1.1 HELA-ZELLINIE

Henrietta Lacks, eine afroamerikanische Frau und Mutter von fünf Kindern, starb 1951 im Alter von nur 31 Jahren an einem Zervixkarzinom [1]. Ihr Name und ihr Andenken lebt in einer einzigartigen Weise bis heute fort. Dem John Hopkins-Forscher Dr. George Gey gelang es aus einer Gewebeprobe Tumorzellen zu kultivieren [2]. HeLa-Zellen sind damit die erste dokumentierte menschliche Zelllinie, die sich leicht und unbegrenzt teilt und bis heute monumentale Beiträge zur Wissenschaft in der Medizin leistet [1]. Die Entstehung der Zelllinie gehört damit zu den wichtigsten wissenschaftlichen Entdeckungen des letzten Jahrhunderts. Die ersten Erfolge wurden bei der Entwicklung von Polio Impfstoffen erzielt. HeLa-Zellen ließen sich besser mit dem Polio-Virus infizieren und erwiesen sich als deutlich sensibler als bisher verwendete Primaten-Zellen [3]. Auch bei der Erforschung des humanen Papillomavirus (HPV) spielten die HeLa-Zellen eine wichtige Rolle. Harald zur Hausen konnte nachweisen, dass die Zellen von Henrietta Lacks aus der ursprünglichen Biopsie HPV-18 enthielten, das sich später als Ursache für den aggressiven Krebs herausstellte. Dessen Arbeit wurde als maßgeblich für die Entwicklung eines HPV-Impfstoffes angesehen und mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

HeLa-Zellen unterscheiden sich von normalen Zellen bereits im Karyotyp. Das fehlerhafte Genom führt dazu, dass die Tumorzelle 76 bis 80 Chromosomen enthält, während normale Zellen 46 Chromosomen aufweisen. HeLa-Zellen wachsen ungewöhnlich schnell und verdoppeln ihre Zellzahl innerhalb von nur 24 Stunden. Selbst nach mehreren Zyklen der Zellteilung bleiben die Zellen vital. Historisch führte dies unter anderem zu Kontaminationen anderer Zellkulturen [2]. Im Gegensatz zu Primärzellen oder spezialisierten Zelllinien weist der Stoffwechsel in Tumorzellen einen ausgeprägten Warburg-Effekt auf [4]. Warum diese Veränderung im Glukosestoffwechsel mit einem schnelleren Wachstum einhergeht, ist noch nicht vollständig geklärt [5].

Aktuelle Studien legen nahe, dass der mitochondriale Stoffwechsel bei der Proliferation von Tumorzellen eine wesentliche Rolle spielt [6-9]. Das Verständnis der Gründe für eine Umstellung des mitochondrialen Stoffwechsels könnte als Ansatzpunkt für eine Therapie von Tumorerkrankungen dienen [10]. Für die Krebstherapie ist die Unterdrückung und die Begrenzung des Wachstums von Primärtumoren und Metastasen ein zentrales Ziel [10]. Die mitochondriale Dynamik und Energieerzeugung in Tumorzellen sind daher in den Fokus wissenschaftlicher Studien gerückt.

1.2 MITOCHONDRIEN

1.2.1 AUFBAU UND FUNKTION

Mitochondrien sind dynamische Organellen, die bis auf wenige Ausnahmen in eukaryotischen Zellen vorkommen und eine Doppelmembran aufweisen. Die Anzahl pro Zelle variiert zwischen verschiedenen Zellen. Ein Mitochondrium besteht aus einer äußeren Membran, einem Intermembranraum, einer inneren Membran und einer Matrix. Die innere Membran ist zu Cristae gefaltet und enthält für die oxidative Phosphorylierung verantwortliche Enzymkomplexe. Mitochondrien werden nach aktuellem Stand als Nachkommen eines Prokaryoten angesehen, der in einem endosymbiotischen Ereignis mit einem Eukaryoten fusionierte [11]. Neben der Energiegewinnung erfüllen die Mitochondrien noch zahlreiche weitere Aufgaben. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Apoptose, der Stressregulation, der Produktion von Lipiden und Kohlenhydraten, der angeborene Immunität und bei der Aufrechterhaltung des Kalziumstoffwechsels [7, 12].

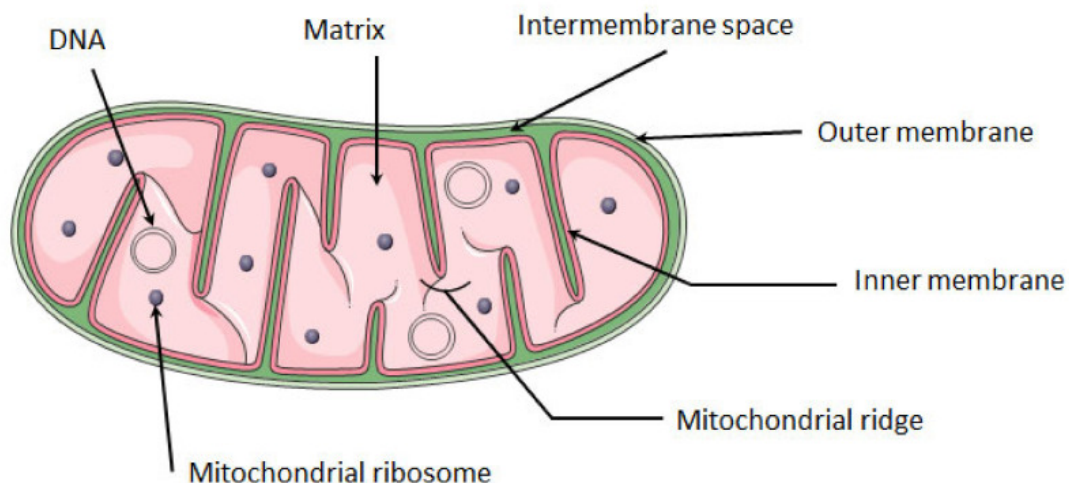


Abbildung 1: Struktur der Mitochondrien [13]: Das Mitochondrium besteht aus einer inneren Membran und der äußeren Membran. Zwischen dieser Doppelmembran befindet sich der Intermembranraum. Die innere Membran bildet die Cristae (Mitochondrial ridge). Die mitochondriale Matrix enthält neben der zirkulären mitochondrialen DNA auch Ribosomen.

1.2.2 MITOCHONDRIALES GENOM

In der mitochondrialen Matrix ist das mitochondriale Genom als eine doppelsträngige, geschlossene, zirkuläre DNA (mtDNA) enthalten. Mitochondrien werden daher als semiautonom bezeichnet. Das menschliche mitochondriale Genom besteht aus 37 Genen mit einer Länge von 16.569 Basenpaaren und wurde erstmals 1981 vollständig sequenziert [14]. Die Gene exprimieren 13 mRNAs, die für Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren, 22 tRNAs und zwei rRNAs (12S und 16S rRNA) [15]. Die meisten mitochondrialen Proteine werden jedoch von Kerngenen kodiert und nach ihrer Synthese aus dem Zytosol in die Mitochondrien importiert. Bei der mitochondrialen Teilung wird das Genom an die nächste Generation weitergegeben. Die mtDNA wird bei der menschlichen Fortpflanzung fast vollständig maternal vererbt. Das liegt unter anderem daran, dass die Mitochondrien der Spermien während der Befruchtung abgebaut werden [16]. In einigen Fällen kann auch mtDNA vom Vater vererbt werden. Diese väterliche mitochondriale Vererbung ist jedoch umstritten und Gegenstand aktueller Forschung [17, 18]. Aufgrund fehlender schützender Histone und Reparaturmechanismen ist das mitochondriale Genom deutlich anfälliger für Mutationen als die DNA des Zellkerns [19]. Durch das Fehlen von Introns wirkt sich eine Mutation dabei zwangsläufig auf ein Gen aus. Mutationen des mitochondrialen Genoms, die die Funktion der oxidativen Phosphorylierung modulieren, werden im klinischen Alltag mit menschlichen Krebserkrankung in Verbindung gebracht. Erste Veröffentlichungen gab es in den 1980er Jahren beim Nierenonkozytom [20]. In weiteren Studien werden Punktmutationen der mtDNA in Zusammenhang mit verschiedenen Tumorarten erwähnt, unter anderem großflächige Deletionen bei Brustkrebs [21] sowie Mutationen bei gastrointestinalen Tumoren [22]. Auch neurologische Erkrankungen [23] und der Diabetes mellitus [24, 25] werden mit Schädigungen des mitochondrialen Genoms in Verbindung gebracht.

Ein wichtiger Aktivator der mitochondrialen Transkription ist der Transkriptionsfaktor Tfam, der für die Erhaltung der mtDNA unerlässlich ist [26]. Das Tfam Protein hält die Anzahl der mtDNA Kopien aufrecht, indem es die mtDNA-Replikation reguliert [27]. Dabei korreliert die Kopienzahl der mtDNA mit der mitochondrialen Genexpression und dadurch mit der mitochondrialen Aktivität der oxidativen Phosphorylierung [28]. Ebenfalls umhüllt Tfam zum Schutz die mtDNA und bildet eine nukleoid Struktur [29, 30]. Veränderungen des Verhältnisses zwischen mtDNA und Tfam können die Replikation beeinträchtigen [31]. Eine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors hat direkt Auswirkungen auf die Anzahl und Maße der Mitochondrien [32, 33].

Die freiwerdenden Elektronen werden auf Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) übertragen, welches zu FADH_2 reduziert wird. Studien zeigen, dass in Tumorzellen vor allem das Malat-Aspartat-Shuttle-System genutzt wird, welches insgesamt aus vier verschiedenen Enzymen sowie zwei Antiport-Carriern besteht und letztlich die größere Menge ATP liefert [35-37]. Oxalacetat wird NADH abhängig über die zytosolische Malatdehydrogenase zu Malat reduziert. Durch den Antiport mit α -Ketoglutarat über den α -Ketoglutarat-Malat-Carrier wird Malat in die Matrix des Mitochondriums transportiert. Die mitochondriale Malatdehydrogenase oxidiert Malat erneut zu Oxalacetat. Dabei erfolgt die Reduktion von NAD^+ zu NADH. Die Aufrechterhaltung des Zyklus erfolgt über die eine mitochondriale Aspartat-Aminotransferase. Diese aminiert Oxalacetat Glutamat-abhängig zu Aspartat. Glutamat wird dabei zu α -Ketoglutarat. Im Austausch mit Glutamat gelangt Aspartat in das Zytosol und wird dort über die zytosolische Aspartat-Aminotransferase zum Ausgangsstoff Oxalacetat. Dabei wird α -Ketoglutarat in Glutamat umgewandelt.

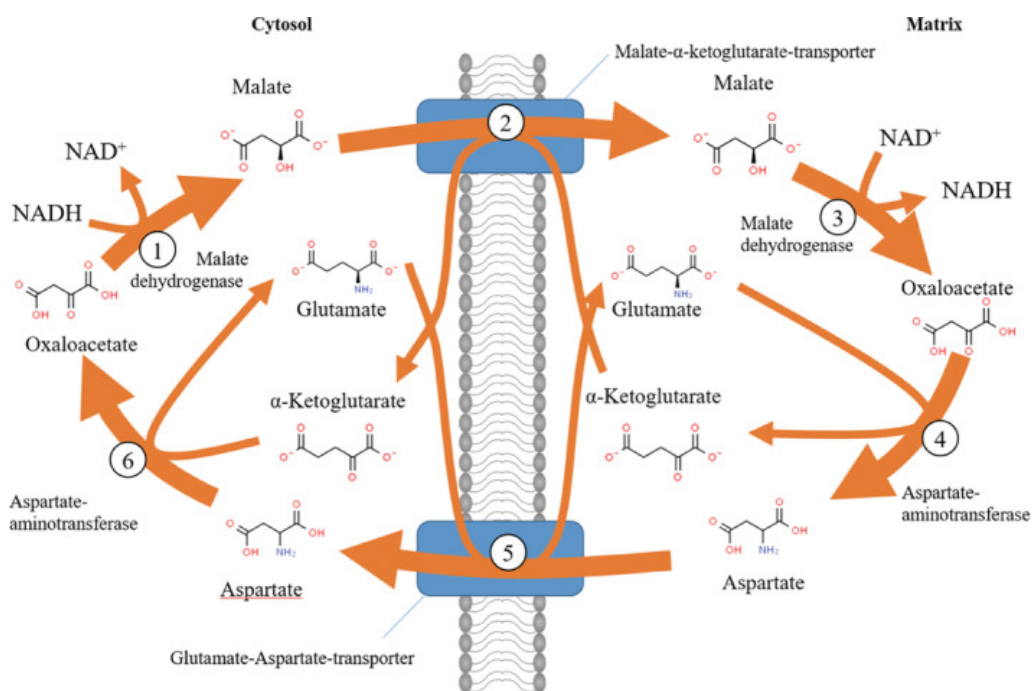


Abbildung 3: Malat-Aspartat-Shuttle [37]: Der Malat-Aspartat Shuttle besteht aus vier verschiedenen Enzymen (1,3,4,6) sowie zwei Antiport-Carriern (2,5).

In den Mitochondrien werden die Elektronen von NADH und FADH₂ in der Elektronentransportkette schrittweise auf molekularen Sauerstoff übertragen. Diese oxidative Phosphorylierung geht mit der Bildung von weiteren 32 bis 34 ATP-Molekülen einher und dient somit als Hauptenergiequelle der Zellen. Mitochondrien werden daher auch als die „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet. Als Modellorganismus für die Untersuchung der Biogenese mitochondrialer Komplexe diente die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die sich für eine Vielzahl molekulargenetischer Methoden eignet [38, 39]. Die Elektronen aus NADH gelangen in die Elektronentransportkette, diese besteht aus vier Komplexen und befindet sich innerhalb der inneren Mitochondrienmembran. In Komplex I werden die Elektronen auf den mobilen Carrier Ubichinon und damit durch die Membran auf Komplex III übertragen. Folgend werden in Komplex III Elektronen von Cytochrom b auf Cytochrom c abgegeben. Cytochrom c ist dabei peripher an der Außenseite der inneren Membran gelegen und transportiert die Elektronen zu Komplex IV. Unter Bildung von H₂O werden die Elektronen in Komplex IV auf O₂ übertragen. Der Proteinkomplex II nimmt Elektronen von FADH₂ auf und gibt diese über Ubichinon ebenfalls an Komplex III ab. Der Elektronentransport durch die Komplexe I, III und IV ist an den Transport von Protonen aus dem Inneren des Mitochondriums gekoppelt. Der Transfer von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum erzeugt einen Protonengradienten über die innere Membran. Die in diesem Gradienten gespeicherte elektrochemische Energie wird über einen weiteren Proteinkomplex, die ATP-Synthase, genutzt, um ATP zu erzeugen. Die auch als Komplex V beschriebene Synthase besteht aus zwei Komponenten, FO und F1. Der FO-Teil bildet einen Kanal durch die innere Membran, durch die Protonen über den Gradienten in die Matrix gelangen können. Über die F1-Untereinheit wird dabei die Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphationen katalysiert. F1 fungiert dabei als eine Art Rotationsmotor. Die Oxidation eines NADH-Moleküls führt somit zur Synthese von drei ATP-Molekülen, während die Oxidation von FADH₂ zwei ATP-Moleküle ergibt. Das innerhalb der Mitochondrien gebildete ATP wird über den Adenin-Nukleotid-Translokator durch die innere Membran transportiert. Ein Molekül ADP wird dabei im Austausch von einem Molekül ATP übertragen. Über einen elektrochemischen Gradienten gelangt ATP schließlich ins Zytosol. Reguliert wird die oxidative Phosphorylierung durch den Verbrauch von O₂, die intrazelluläre Konzentration von ADP und die Verfügbarkeit von Phosphat. Die oxidative Phosphorylierung ist daneben auch für die Reoxidation von NADH zu NAD⁺ erforderlich. Eine Anhäufung von NADH würde den Glukosestoffwechsel zum Erliegen bringen. Die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat reduziert NADH zu NAD⁺ und erfolgt bei primären Zellen bei Sauerstoffmangel, während in Tumorzellen dieser Weg dauerhaft genutzt wird [5, 10]. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass trotz der Laktatdehydrogenase Aktivität der Import von NADH in die Mitochondrien für die Aufrechterhaltung der Glykolyse-Rate auch in Tumorzellen unerlässlich ist [36, 37, 40].

Ein Großteil des Wissens über die einzelnen Komplexe der Elektronentransportkette stammen aus Studien über Hemmstoffe. Oligomycin ist ein von Streptomyces produziertes Antibiotikum, welches den Transport von Protonen durch Komplex V hemmt. Die Ansammlung von Protonen im Intermembranraum hemmt rückwirkend die Elektronentransportkette. Durch die Zugabe eines chemischen Entkopplers wie Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) wird der Wiedereintritt von Protonen in den Matrix Raum induziert. Der Verlust des Protonengradienten geht folglich mit einem Verlust der ATP-Synthese einher.

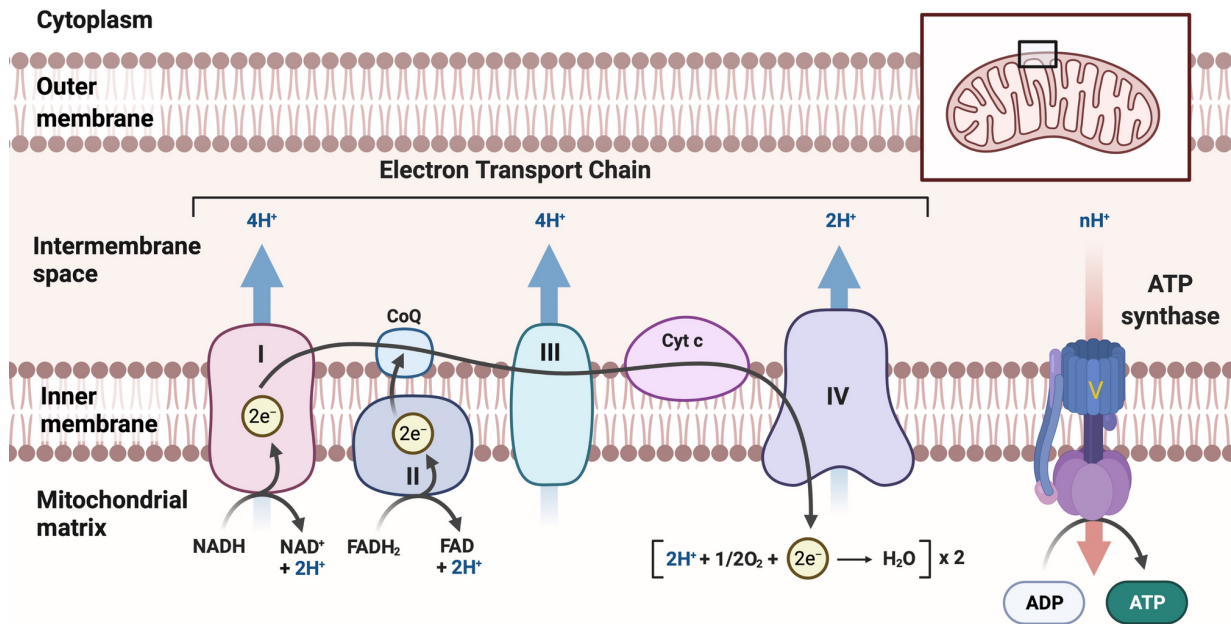


Abbildung 4: Schematische Übersicht der oxidativen Phosphorylierung [41]: Schematische Darstellung der inneren Mitochondrienmembran mit den Komplexen I-IV der Elektronentransportkette und der ATP-Synthase.

1.4 WARBURG EFFEKT

Im Gegensatz zu Primärzellen oder spezialisierten Zelllinien weist der Stoffwechsel von Tumorzellen einen ausgeprägten Warburg Effekt auf [4, 42]. Während die Glykolyse deutlich erhöht ist, erfolgt nur ein kleiner Teil der ATP-Produktion durch die mitochondriale Phosphorylierung [43]. Bei vielen Krebsarten konnte die Verstärkung der Glykolyse festgestellt werden [44-46]. Ursprünglich stellte Warburg die Hypothese auf, dass die oxidative Phosphorylierung in Krebszellen geschädigt sei. Einige Studien weisen jedoch darauf hin, dass keine mitochondrialen Defekte vorliegen und die ATP-Produktion in den Mitochondrien funktionstüchtig bleibt [43, 47]. Wiederrum andere Studien zeigen auf, dass in Tumorzellen Mutationen in der mtDNA vorliegen, die Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren [48, 49]. Tatsache ist, dass der Prozess der anaeroben Glykolyse schneller abläuft und nachgeschaltete Biomakromoleküle erzeugt, die für die Zellproliferation erforderlich sind [50, 51]. Unter anderem führt die schnelle Glykolyse auch dazu, dass Tumorzellen mehr Glucose aufnehmen als normale Zellen [51]. In der Diagnostik macht man sich dies zur Grundlage für den Tumornachweis bei einem Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Scan, bei dem ein radioaktives Glukoseanalogon injiziert wird [52]. Zusammenfassend bleibt jedoch unklar, warum die ineffiziente Methode der anaeroben Glykolyse zur Erzeugung von ATP mit Proliferation in Verbindung gebracht wird und wieso einige Tumorzellen diese Methode bevorzugt nutzen [5, 53, 54].

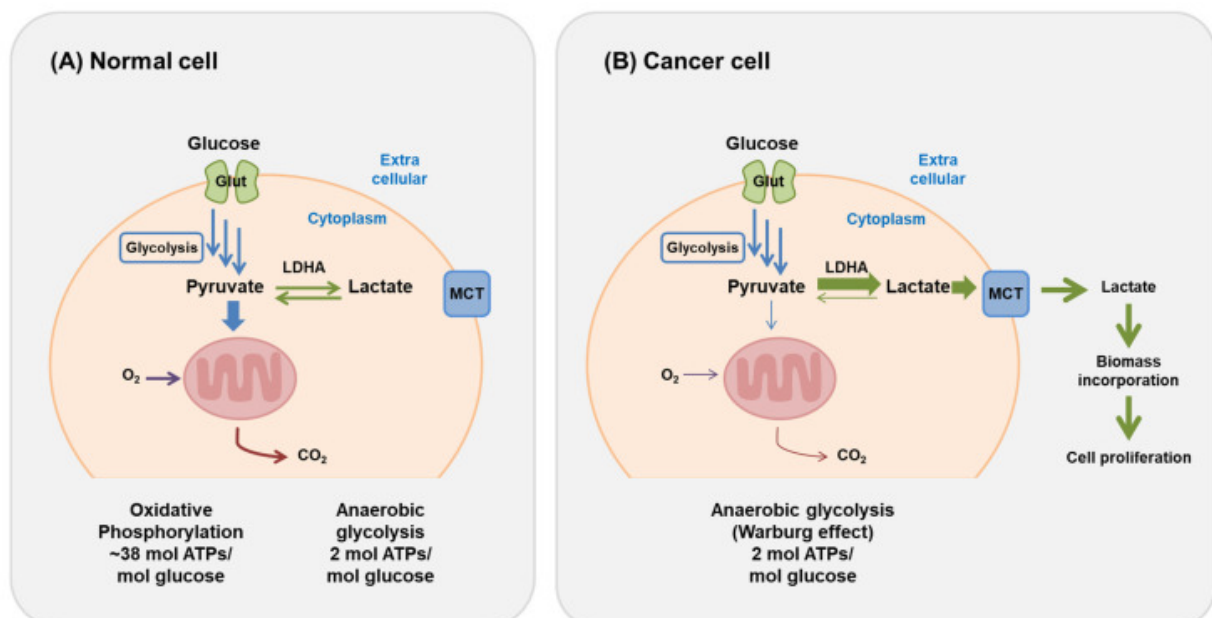


Abbildung 5: Warburg Effekt in Tumorzellen [54]: Während sich bei normalen Zellen zur Energiegewinnung nach der Glykolyse die oxidative Phosphorylierung anschließt, überwiegt bei Tumorzellen die anaerobe Glykolyse.

1.5 MITOCHONDRIALES NETZWERK

Mitochondrien bilden innerhalb der Zelle eine Netzwerkstruktur aus, die einer stetigen Veränderung unterliegt. Sie können als isolierte Organellen vorkommen oder zu größeren Netzwerken verbunden sein. Diese Umbauvorgänge werden als Fusions- und Teilungsprozesse bezeichnet und sind eng an die metabolischen Bedürfnisse der Zelle angepasst [55, 56]. Durch den mitochondrialen Lebenszyklus aus ständigen Fusions- und Spaltungsprozessen wird auch der Abbau gealterter Organellen durch Mitophagie aufrechterhalten [56, 57]. Bei der mitochondrialen Spaltung entstehen kleine einzelne Mitochondrien, während bei der Fusion große zusammenhängende Netzwerke von Mitochondrien entstehen. Für die mitochondriale Homöostase ist ein Gleichgewicht zwischen beiden Vorgängen entscheidend. Defekte in der mitochondrialen Dynamik werden mit vielen pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht, darunter Krebs, neurodegenerative und kardiovaskuläre Erkrankungen [58, 59]. An der mitochondrialen Fusion und der Teilung von Netzwerkstrukturen sind unterschiedliche kerncodierte Proteine beteiligt. Zu diesen Proteinen gehören das Dynamin-related Protein (Drp1), das Fission Protein 1 (Fis1), der Mitochondrial Fission Factor (Mff), die Mitochondrial Dynamics Proteine 49 und 51 kDa (MID49 und MID51), sowie die Mitofusine Mfn1, Mfn2 und das Optic Atrophy Protein 1 (OPA1).

Während die mitochondrialen Spaltungsprozesse indirekt durch Fis1, Mff, MID51 und direkt durch Drp1 vermittelt werden, sind an den Fusionsprozessen das Mfn1, Mfn2 und das OPA1 beteiligt. Entdeckt wurden die meisten Proteine an dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) [60]. Aufgrund von homologen Genen lassen sich viele entdeckte Mechanismen auf den Menschen übertragen.

1.5.1 MITOCHONDRIALE FUSION

Die Fusion mitochondrialer Netzwerkstrukturen erfolgt über die GTPasen Mfn1, Mfn2 sowie das OPA1. Die mitochondriale Fusion ermöglicht eine Umverteilung der mtDNA zwischen geschädigten und gesunden Mitochondrien [56]. Von Bedeutung ist die mitochondriale Fusion ebenfalls für die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung [61]. Die Fusion der inneren und äußeren Mitochondrienmembran verläuft getrennt voneinander und lässt sich in einen zweistufigen Prozess unterteilen [62]. Während die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran durch das Mitofusin Fzo1 in Hefen und durch das Mfn 1 und 2 in Säugetieren vermittelt wird, fusioniert die innere mitochondriale Membran durch das Mitochondrial genome maintenance Protein 1 (Mgm1) in Hefen und durch das OPA1 in Säugetieren [63, 64]. Mfn1 und Mfn2 sowie OPA1 gehören zur Dynamin-Superfamilie von Multidomänen-GTPasen, die an verschiedenen Membranumbauvorgängen in eukaryontischen Zellen beteiligt sind [65]. Abhängig ist der Vorgang von dem mitochondrialen Membranpotential sowie der Verfügbarkeit

von GTP [66]. Eine gestörte Fusion der Mitochondrien führt zu einer vermehrten Fragmentierung.

Die GTPase Mfn ist an der Fusion der äußeren mitochondrialen Membran beteiligt und wurde vor etwa 20 Jahren entdeckt [67]. In Säugetieren spielen das Mfn1 und Mfn2 eine wichtige Rolle [68]. Diese zeigen eine unterschiedliche mitochondriale Bindungsfähigkeit und GTPase-Aktivität [69]. Beide werden mit unabhängigen Funktionen in Verbindung gebracht, die ihre unterschiedliche Gewebeexpressionsmuster erklären könnten [70]. Mfn2 ist unter anderem an der Interaktion zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien beteiligt, die für die Ca²⁺-Signalübertragung wesentlich ist [71]. Die Überexpression in einer Zelllinie geht mit morphologischen Veränderungen der Mitochondrien einher [72]. Eine Mutation von MFN2 verursacht in etwa 20% der Fälle eine periphere Neuropathie vom Charcot-Marie-Tooth Typ 2 [73]. Der Verlust beider Mitofusine führt durch eine vermehrte Fragmentierung zur Störung des mitochondrialen Netzwerkes sowie dessen Funktion und damit zur Minderung des Zellwachstums. [74]. Mfn1 und Mfn2 sitzen der Zellmembran von außen auf und besitzen eine N-terminale GTPase [67]. Die transmembrane Domäne ist bei den Mitofusinen U-förmig verankert, das C- und N-terminale Ende endet daher im Zytosol [75]. Zur Initiierung der Fusion formen Mfn1 und Mfn2 Proteinkomplexe, die homo- oder heterooligomerisch auftreten können [67]. Dabei interagieren die antiparallelen C-terminalen HR2 Domänen zweier Mitochondrien miteinander [76].

Im gleichen Zeitraum der Entdeckung des Mfn wurde das OPA1 als membrangebundene GTPase charakterisiert [77]. Der Name entstand nachdem nachgewiesen wurde, dass eine genetische Mutation die Hauptursache für die autosomal dominante Optikusatrophie ist [77]. Heterozygote Mutation manifestieren unter anderem mit Taubheit und Demenz [78]. OPA1 ist an der Fusion der inneren mitochondrialen Membran beteiligt [64]. Neben seiner Rolle bei der mitochondrialen Fusion reguliert das OPA1 die Apoptose, indem es an der Bildung der Cristae beteiligt ist [79]. Ebenfalls stabilisiert OPA1 die Komplexe der Atmungskette und kontrolliert somit die Zellproliferation [80]. Das OPA1 befindet sich mit seiner HR-Domäne innerhalb des mitochondrialen Intermembranraum in verschiedenen Geweben. Es wird dabei vor allem im Pankreas exprimiert [81]. Verankert ist die GTPase mit der Transmembrandomäne in der inneren Mitochondrienmembran [82]. Neben der Transmembrandomäne lassen sich die C-terminalen GTP-Bindungsdomäne und die N-terminale Mitochondrien Zielsequenz abgrenzen. Es lassen sich acht ubiquitäre OPA1 Isoformen unterscheiden, die durch verschiedene Spleißvarianten entstehen und je nach Gewebe in unterschiedlichen Mengen vorkommen [83]. Voneinander abgrenzen lassen sich die langen (L-) und kurzen (S-) Isoformen, die verschiedene Rollen spielen [84]. Allgemein wird der L-Isoform eine Rolle bei der Elongations-/Fusionsaktivität zugeschrieben, während die kürzere Isoform eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Aufrechterhaltung der Cristae spielt [85, 86]. Die L-Isoform kann über die

Proteasen OMA1 und YME1 in die S-Isoform verarbeitet werden, dessen Aktivität bei mitochondrialer Dysfunktion zur Netzwerkstabilisierung zunimmt [87].

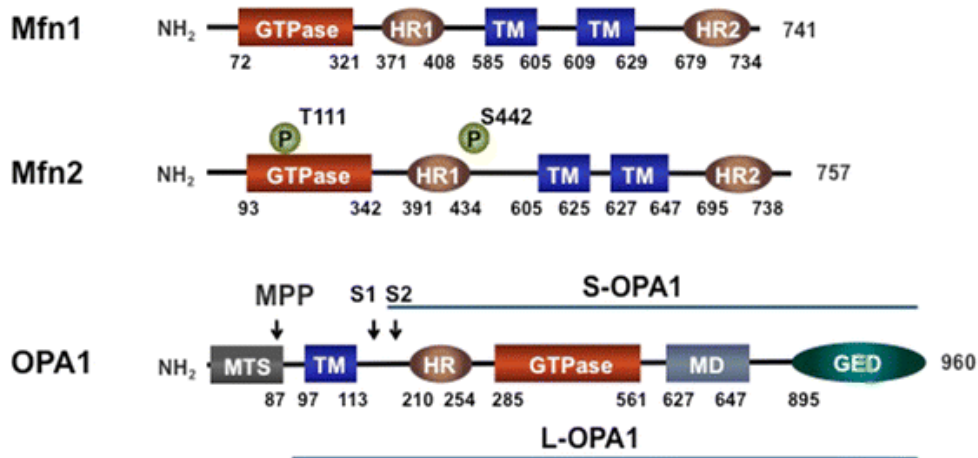


Abbildung 6: Struktur der Fusionsproteine Mfn1, Mfn2 und OPA1 [88]: Die Mitofusine Mfn1 und Mfn2, enthalten eine GTPase-Domäne (GTPase), zwei Heptad-Repeat-Regionen (HR1 und HR2) und zwei Transmembrandomänen (TM). Die Phosphorylierungsstellen von Mfn2 sind ebenfalls dargestellt. OPA1 enthält eine mitochondriale Zielsequenz (MTS), eine TM-Domäne, eine Heptad-Repeat-Region (HR), eine GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne (MD) und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Proteolytische Spaltungen erzeugen die lange OPA1-Isoform (L-OPA1) und die kurze OPA1-Isoform (S-OPA1).

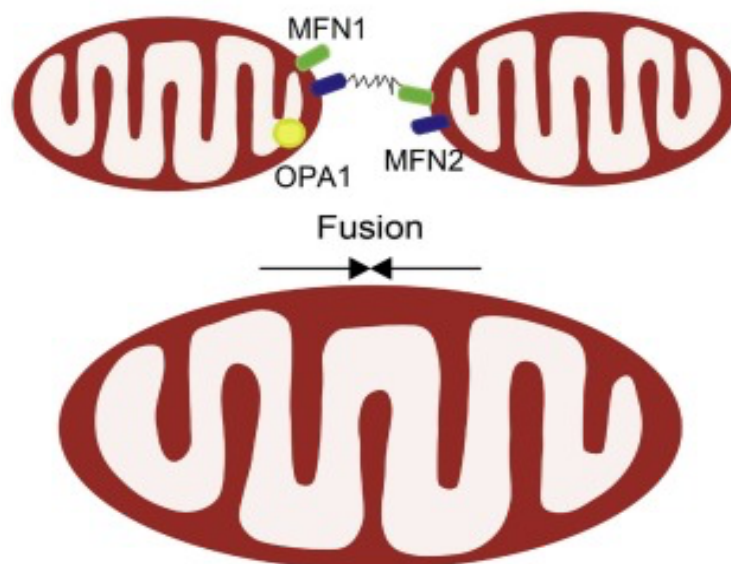


Abbildung 7: Mitochondrialer Fusionsprozess [89]: Mfn1 und Mfn2 sind für die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran verantwortlich. Für die Fusion der inneren mitochondrialen Membran ist das OPA1 essentiell.

1.5.2 MITOCHONDRIALE TEILUNG

Die Teilung mitochondrialer Netzwerkstrukturen erfolgt über die Proteine Fis1 und Drp1 sowie über Mff und MID49/51. Die Spaltung beginnt mit der Markierung von Spaltstellen an Kontaktstellen der Nukleotidmarker mit der mitochondrialen Matrix, des endoplasmatischen Retikulums und der Lysosomen [89, 90]. Die Tubuli des endoplasmatischen Retikulums sind dabei mögliche Teilungsstellen [91]. Die Proteine Fis1, Mff, MID49 und MID51 rekrutieren nachfolgend Drp1 aus dem Zytoplasma an den Ort der Teilung. Fis1 beeinflusst die Teilungshäufigkeit der Mitochondrien, während nur Drp1 im weiteren Schritt tatsächlich zur Abschnürung der Mitochondrien führt. Unterscheiden lassen sich nach aktuellen Studien verschiedene Arten der Spaltung. Die Mff vermittelte Drp1 Rekrutierung führt dabei zu einer Aufteilung in zwei gleich große Mitochondrien [92]. Während der Reaktionsmechanismus über Fis1 zu einer asymmetrischen Spaltung führt. Dabei scheint die Bildung des kleineren Mitochondriums mit der Mitophagie gekoppelt zu sein [92]. Die mitochondriale Fusion wird bei Nährstoffmangel in den Zellen gefördert, die Spaltung von Mitochondrien tritt wiederum bei einem Nährstoffüberschuss in den Vordergrund [93, 94]. Weiterhin ist die mitochondriale Teilung von entscheidender Bedeutung für die Mitophagie geschädigter Mitochondrien Bestandteile [95]. Die Aufrechterhaltung gesunder Mitochondrien ist dabei für das Zellüberleben entscheidend. Eine gestörte Spaltung der Netzwerkstrukturen führt in den Zellen zur Elongation und Clusterbildung der Mitochondrien [96]. Eine übermäßige Spaltung und die Hochregulation von Drp1 und Fis1 ist nachweislich mit der Tumorentstehung und Metastasierung assoziiert, den zugrunde liegenden Pathomechanismus gilt es allerdings noch aufzuklären [97, 98]. Gegenstand aktueller Forschung ist, ob die Drp1 vermittelte Verengung für die Spaltung der inneren Mitochondrienmembran ausreichend ist oder ob dort ein zusätzlicher Mechanismus erforderlich ist. Die Proteine MTP18 und die kurze Isoform des OPA1 (S-OPA1) könnten dabei eine Rolle spielen [7, 87, 99].

Das Rezeptorprotein Fis1 ist ein 17kDA großes Protein, welches an der äußeren mitochondrialen Membran verankert ist [100]. Das aus 152 Aminosäuren bestehende Protein bestimmt die Teilungshäufigkeit der Mitochondrien [96, 101]. Das Rezeptorprotein besteht aus fünf Regionen. Dabei ist zu erwähnen, dass es im Gegensatz zum Drp1 keine GTPase Domäne aufweist. Während das C-terminale Ende an der äußeren Membran verankert ist, reicht ein großer Teil des Fis1 ins Zytosol hinein [102]. Dieser zytosolische Abschnitt ist für Teilungsprozesse essentiell und besteht aus antiparallelen alpha-Helices sowie den Tandem Tetratricopeptide Repeats (TPRs) [103-105]. Diese TPRs zeigen sich für den mitochondrialen und peroximalen Proteintransport bedeutend [106]. Des Weiteren regulieren sie die Protein-Protein Interaktion und sind damit direkt an den Teilungsprozessen beteiligt [101, 107].

Neben dem Fis1 spielen die Proteine Mff, MID49 und MID51 eine Rolle als Rezeptoren für Teilungsprozesse an den Mitochondrien [108, 109]. Die Ausschaltung von Mff führt zu einer

mitochondrialen Elongation und reduziert die Menge an Drp1, die bei der Spaltung rekrutiert wird [110]. Die doppelte Eliminierung von MID49 und MID51 führt zu einer mitochondrialen Elongation und die Drp1 Rekrutierung nahm ab [109]. Interessanterweise zeigt eine Überexpression ebenfalls eine mitochondriale Elongation [109]. Hingegen erreichte die alleinige Ausschaltung von MID51 eine mitochondriale Fragmentierung [111]. Auch in Abwesenheit von Fis1 und Mff können MID49 und MID51 die Spaltung über die Rekrutierung von Drp1 vermitteln [112]. Die genauen Abläufe bei der Teilung bleiben weiter Ziel aktueller Forschungen.



Abbildung 8: Struktur des Teilungsproteins Fis1 [88]: Das Spaltprotein 1 (Fis1) ist durch die Transmembran-Domäne (TM) verankert. Darüber hinaus enthält Fis1 die Tetratricopeptide Repeats (TPRs)

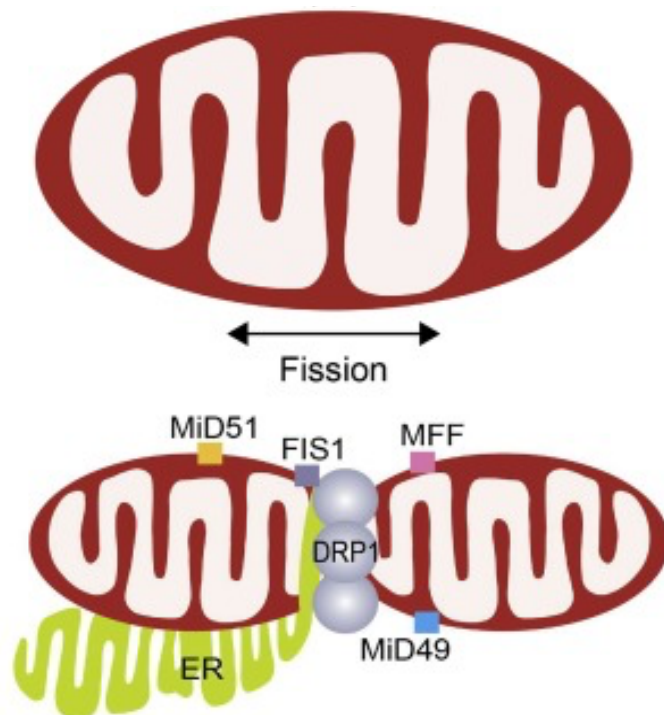


Abbildung 9: Mitochondrialer Teilungsprozess [89]: Nach der Markierung von Spaltstellen rekrutieren die Proteine Fis1, Mff, MID49 und MID51 das Drp1 aus dem Zytoplasma an den Ort der Teilung.

1.5.3 DRP1

Drp1 ist eine 80kDa große GTPase aus der Dynamin-Superfamilie [113]. Es ist vorwiegend im Zytosol lokalisiert und wird über die Interaktion mit Rezeptoren an der äußeren mitochondrialen Membran verankert [114]. Zu diesen Rezeptoren gehören das Fis1, Mff und die mitochondrialen Dynamikproteine MID 49 und MID51. Ein weiterer kleiner Teil des Drp1 befindet sich an der mitochondrialen Membran und weist auf vorherige Teilungsprozesse hin [114]. Sobald Drp1 an der äußeren Mitochondrienmembran bindet, bildet es einen oligomeren Ring, der die Mitochondrien als scharnierartige Struktur einschnürt und die Spaltung vorantreibt [115]. Dabei führen GTP-Bindung und Hydrolyse zu einer Konformationsänderung von Drp1 [116]. GTP induziert dabei eine Strukturumlagerung, die eine Kraft erzeugt, die letztlich zur Membranverengung führt [117]. Äußere und innere mitochondriale Membran werden dabei gleichzeitig getrennt [115]. Neue Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Spaltung der inneren Mitochondrienmembran unabhängig stattfindet. Eine Akkumulation der kurzen Isoform des OPA1 (S-OPA1) sowie des Mitochondrial Proteins 18kDa (MTP18) könnten die Spaltung vermitteln [87, 99]. Die Struktur des Drp1 setzt sich aus einer N-terminalen GTPase Domäne, einer zentralen Dynamin-like Domäne, einer variablen Domäne und einer C-terminalen GTPase Effektor Domäne (GED) zusammen [118, 119]. Auf dieser Grundlage wird Drp1 als T- oder tetramerförmige Struktur angesehen [120, 121]. Wechselwirkungen zwischen der N-terminalen GTPase Domäne und der C-terminalen GED-Domäne spielen für die Selbstorganisation eine funktionelle Rolle [122, 123]. Die Phosphorylierung von Drp1 spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der mitochondrialen Teilung [124]. An der Aminosäure Serin 616 (S616) fördert eine Phosphorylierung die Spaltung während der Mitose und bei oxidativem Stress [125, 126]. Im Gegensatz dazu führt eine Phosphorylierung über die Proteinkinase A an der Stelle S637 zu einer Fusion bei Nährstoffmangel [127]. Studien zeigen, dass die Überexpression der Kinase PINK1 die mitochondriale Teilung fördert, während die Inaktivierung mit einer Fusion einhergeht [128]. Darüber hinaus wird die Funktion von Drp1 durch weitere posttranslationale Modifikationen reguliert, darunter Ubiquitinierung, Nitrosylierung und Sumoylierung, von denen viele mit verschiedenen Krebsarten sowie Entwicklungs- und Stoffwechselstörungen in Verbindung gebracht werden [72, 124, 129]. Bei einem Mangel von Drp1 verlängert sich das mitochondriale Netzwerk durch ausbleibende Teilung [114, 130]. Ein vollständiges Fehlen von Drp1 in Mäusen geht mit einem Absterben im frühen Embryonalstadium einher [131]. Aktuelle Forschung zum Drp1 untersuchen die Rolle bei der Sensibilisierung von Tumoren auf Chemo- und Strahlentherapie [132]. Ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk wird mit einer übermäßigen Glykolyse in Tumorzellen in Verbindung gebracht. Eine Dehnung der Mitochondrien könnte das Zellwachstum durch Energiebeschränkung verringern [133, 134]. Studien, in denen Mdivi-1, ein mutmaßlicher Inhibitor von Drp1, verwendet wurde, waren

jedoch unterschiedlicher Meinung in Bezug auf den Mechanismus, der die Proliferation verringert [135, 136]. Eine direkte Auswirkung auf die oxidative Phosphorylierung wurde für wahrscheinlicher gehalten [135]. Drp1 bleibt daher als mögliche therapeutische Zielsequenz Basis aktueller Studien.

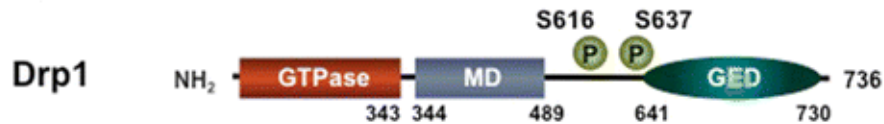


Abbildung 10: Struktur des Teilungsproteins Drp1 [88]: Das Drp1 enthält eine GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne (MD), eine GTPase-Effektor-Domäne (GED) und eine Heptad-Repeat-Region (HR). Die Phosphorylierungsstellen von Drp1 sind ebenfalls abgebildet.

1.6 CHARAKTERISIERUNG MITOCHONDRIALER STRUKTUREN

Die Bewegung einzelner Mitochondrien wurde erstmals vor 100 Jahren mit Hilfe der Lichtmikroskopie beobachtet [137]. Die Beobachtungen wurden lange Zeit als Kuriosität angesehen und gerieten in den Hintergrund der Forschung. Mitochondrien galten als schlauchförmige Organellen, die von Zytoplasma umgeben sind. Die Wertschätzung der mitochondrialen Netzwerkdynamik kam erst mit dem zunehmenden technologischen Fortschritt vor ungefähr 30 Jahren auf. Beobachtungen an lebenden Zellen erfolgten zunächst mit der Phasenkontrastmikroskopie, mit vitalen Farbstoffen und schließlich mit gezielten fluoreszierenden Farbstoffen. Die Zeitraffermikroskopie lebender Zellen erbrachte den Nachweis, dass in ruhenden Zellen Mitochondrien eine stets veränderte Struktur aufweisen, die sich als Fusions- und Teilungsprozess herauskristallisierten [138, 139]. Mit zunehmend besserem Bildmaterial entwickelten sich parallel bildbasierte Analysewerkzeuge und Machine-Learning-Techniken zur Phänotypisierung der mitochondrialen Morphologie von fluoreszenzmarkierten Mitochondrien in Mikroskopie Bildern.

Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigen die Form der einzelnen Mitochondrien sowie die Verteilung der markierten Organellen in der Zelle. Bei der Aufnahme von Zellbildern gilt es zwischen flachen und räumlichen (2D- oder 3D-Bilder) sowie einzelnen und seriell aufgenommenen (Schnappschussbilder oder Zeitrafferbilder) Bildern zu unterscheiden. Während zweidimensionale Aufnahmen nur eine einzige Schicht (xy- Ebene) erfassen, kann mit Aufnahme mehrerer z-Stapel ein dreidimensionales Bild rekonstruiert werden. Da Mitochondrien nicht flach in einer Ebene liegen liefert das 3D-Bild die realere Information über die Netzwerkstruktur. Die Erzeugung solcher Bilder erfordert jedoch eine höhere Rechenleistung zur Verarbeitung und birgt das Risiko, dass die verstärkt einfallenden Photonen phototoxische Effekte hervorrufen. Auch bei der Aufnahme von Zeitrafferbildern sind

die mitochondrialen Strukturen anfälliger für Schäden. Durch die intensivere Anregungsbelichtung nehmen die erhaltenen Fluoreszenzsignale mit der Zeit ab (Bleaching). Zur Analyse der Aufnahmen und der morphologischen Informationen ist die manuelle Klassifizierung nicht nur mühsam, sondern auch unpräzise, da quantitative Kriterien fehlen. Derzeit sind daher mehrere Bildanalysetools bzw. Softwarepakete verfügbar oder werden als Open-Source Software veröffentlicht. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Programme sollen nachfolgend vorgestellt werden.

1.6.1 IMAGEJ/FIJI UND MiNA

ImageJ [140, 141] ist ein auf der Programmiersprache Java beruhendes Softwareprogramm zur Bilderverarbeitung und -analyse mikroskopischer Bilder. Es handelt sich um ein plattformübergreifendes Tool, das für Linux, Mac OS und Windows verfügbar ist. Aufgrund des Open-Source Charakters gibt es viele Plugins, Macros und Erweiterung, die für ImageJ entwickelt wurden. Die Anwendung von ImageJ bietet die Möglichkeit der wissenschaftlichen Bildbearbeitung/-analyse von 8-Bit, 16-Bit und 32-Bit Grafiken und unterstützt dabei die wichtigsten Bildformate (TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS und RAW). Neben vielerlei Funktionen bietet ImageJ die Möglichkeit der Berechnung von Flächen und Pixelwerten. Eine sich durch ständige Aktualisierungen und bereits vorinstallierten Plugins und Macros kennzeichnende Version ist Fiji (Fiji is just ImageJ), welche für die Analyse der Zellaufnahmen in dieser Arbeit genutzt wurde. Ein Fiji erweiterndes Macro-Tool zur Analyse mitochondrialer Netzwerkstrukturen ist MiNA, welches sich zur Untersuchung der mitochondrialen Morphologie eignet [142]. MiNA bietet eine benutzerfreundliche und kostenlose Analysemethode für die 2D Morphologie von Mitochondrien. Mit dem Schwellenwertverfahren (Thresholding) wird aus dem Fluoreszenzbild zunächst ein Binärbild erstellt. Jeder Bildpixel kann danach nur noch die Farben weiß oder schwarz annehmen und damit mit nur einem Bit gespeichert werden. Nach der Bildung eines virtuellen Skeletts der Netzwerkstruktur werden die Bildparameter vom Tool berechnet. Dabei wird zwischen mitochondrialen Netzwerkstrukturen „Networks“ und einzelnen mitochondrialen Strukturen den „Individuals“ unterschieden. Die „Individuals“ sind punktförmige oder strangförmige einzelne Pixel im erstellten skelettierten Bild. Wohingegen „Networks“ mitochondriale Strukturen umfasst, die mindestens einen Knotenpunkt und drei Verzweigungen besitzt. Die Fläche des Bildes, die vom mitochondrialen Signal eingenommen wird bezeichnet das MiNA Tool als „Footprint“.

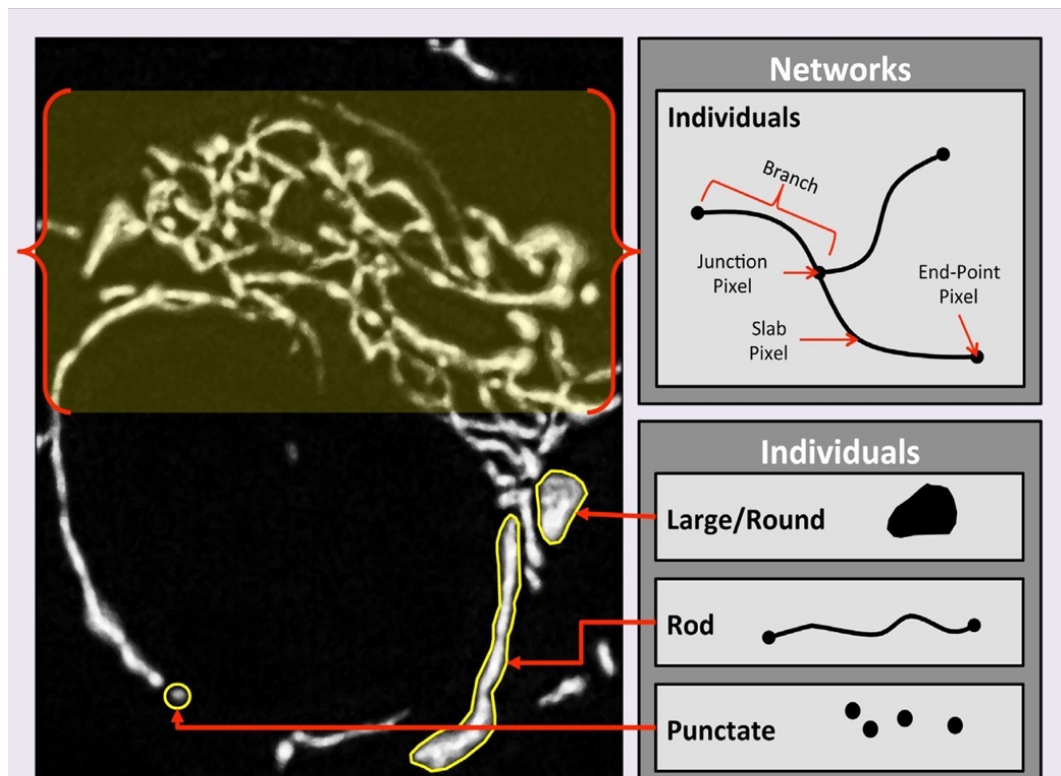


Abbildung 11: Bildanalyse des MiNA Tools [142]: Während punktförmige oder strangförmige einzelne Pixel im erstellen skelettiertem Bild als Individuals angegeben werden, sind Networks mitochondriale Strukturen mit mindestens einem Knotenpunkt und drei Verzweigungen.

1.6.2 IMARIS

Imaris ist ein weltweit führendes und etabliertes kostenpflichtiges Bildanalyseprogramm. Die Software erlaubt die komplexe Bildanalyse mit dem Fokus auf 4 Dimensionen (x, y, z und Zeit). Dabei bietet die Analysesoftware auch für große Datensätze eine fortschrittliches Volumen- und Oberflächenrendering und eine intelligente Oberflächenberechnung zur Generierung quantitativer Informationen aus den Mikroskopie Aufnahmen. Die Algorithmen können auch zur Auswertung von 2D-Bildern genutzt werden. Dabei wird ähnlich zu MiNA mit dem Schwellenwertverfahren (Thresholding) anhand der Fluoreszenzmarkierung eine Oberfläche erstellt. Hierbei kommen allerdings Algorithmen zum Einsatz, die die Intensität zur lokalen Umgebung berücksichtigen. Nachfolgend wird jedes als solches detektierte Objekt einzeln erfasst, mit einer ID Nummer klassifiziert und seine Eigenschaften bestimmt, die in Form einer Excel-Tabelle ausgelesen werden. Bei Serienaufnahmen ist darüber die Nachverfolgung von Objekten wie Mitochondrien möglich.

1.7 MODELLIERUNG MITOCHONDRIALER ZELLABLÄUFE

Studien zur Modellierung von Zellvorgängen erweitern das experimentelle Wissen. Sie haben sich auch bereits als leistungsfähig erwiesen, um verschiedene Hypothesen über die Dynamik mitochondrialer Netzwerke zu testen [143]. Dabei lassen sich Einblicke in die zelluläre Dynamik gewinnen, die in Zellexperimenten im Labor nur schwer oder gar nicht zu beobachten sind [144]. Dementsprechend sind verschiedene Simulationsmodelle entwickelt worden, um verschiedene Aspekte des mitochondrialen Verhaltens zu verstehen. Bestehende Simulationsmodelle zu Mitochondrien konzentrieren sich auf einzelne Stoffwechselprozesse [145], wie die ATP-Synthese in verschiedenen Zellphasen [146, 147] oder den Energiebedarf der Zellen [148, 149]. Bei vorhandenen Simulationsmodellen über Spaltungs- und Fusionsvorgänge von Netzwerkstrukturen lassen sich Modelle mit einer räumlichen [150, 151] von Modellen mit einer nicht-räumlichen Auflösung unterscheiden [152-154]. Modelle über Stoffwechselprozesse erfassen entscheidende Schritte der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung. Der Detailgrad reicht von der Implementierung aller an der Glykolyse und oxidativen Phosphorylierung beteiligten Enzyme mit ihren Reaktionen [149, 155] bis zu minimalistischen Modellen, die die Glykolyse in drei Reaktionen abbilden [156]. Spezifische Forschungsfragen, wie die Bestimmung der Steady-State-Konzentration aller Glykolyse-Zwischenprodukte oder die Veränderung von Zwischenprodukten wird in den Modellen nachgegangen [156, 157]. Aufgrund der großen Anzahl von Metaboliten und ihrer homogenen Verteilung in der Zelle werden üblicherweise gewöhnliche Differentialgleichungen zur Modellierung von Stoffwechselprozessen verwendet. Die enzymatische Natur der Stoffwechselreaktionen führt oft zu recht komplexen kinetischen Vorgängen mit vielen Parametern [158]. Sowohl experimentelle Studien als auch Modellierungsansätze haben sich bereits mit der mitochondrialen Morphologie oder dem Metabolismus befasst. Die Beziehung zwischen der Bedarfsanpassung der ATP-Synthese und der Struktur des mitochondrialen Netzwerks ist jedoch nur unzureichend bekannt.

1.8 ZIELSTELLUNG

Die mitochondriale Netzwerkstruktur unterliegt stetigen Fusions- und Teilungsprozessen, die eng an die metabolischen Bedürfnisse der Zelle angepasst sind [55, 56]. Veränderung von Stoffwechsel und Morphologie von Mitochondrien werden in aktuellen Studien mit der Proliferation von Tumorzellen in Verbindung gebracht [6-8]. Da eine mitochondriale Fragmentierung das Tumorwachstum zu begünstigen scheint, könnte die Aufklärung des Pathomechanismus auch neue pharmakotherapeutische Ansätze der Tumorthherapie fördern. Ziel dieser Arbeit war es, die mitochondriale Elongation in einer etablierten Tumorzelle zu erreichen. Dafür sollten HeLa-Zellen mit einer humanen Drp1 siRNA behandelt und

- die Genexpression von Fis1, Drp1, Mfn1, Mfn2, OPA1 und Tfam im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen analysiert werden.
- die Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt werden.
- das mitochondriale Netzwerk mikroskopisch nach Fluoreszenzmarkierung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen visualisiert und mittels Auswerterroutinen charakterisiert werden.
- die ATP-Produktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt werden.
- das mitochondriale Membranpotential im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert werden.
- der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen gemessen werden.

Weiterführend sollten die erhobenen Daten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Adelinde Uhrmacher (Visual and Analytic Computing, IEF, Universität Rostock) für ein Simulationsmodell genutzt werden.

MATERIAL

II. MATERIAL

2.1 ZELLINIE

Bezeichnung	Spezies	Gewebeherkunft
HeLa	Human	Zervixkarzinom

2.2 ZELLKULTUR-MEDIUM

Medium	Komponenten	Konzentration	Firma
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)	Glucose	4,5 g/l	Sigma-Aldrich
	Natriumpyruvat	0,1 g/l	Chemie HmbH
	L-Glutamin	2 mM	Gibco™
	hitzeinaktiviertes FCS	10 %	Gibco™
	Penicillin/Streptomycin	1 %	Gibco™

2.3 CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
DMEM, high glucose (4,5g/l), L-Glutamin, Natriumpyruvat fetales Kälberserum (FCS)	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA Gibco™ (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

MATERIAL

Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Trypanblau (C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Wasser, Nuklease-frei	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

2.4 TRANSFEKTIONSREAGENZ

Reagenz	Hersteller
Silencer® Selected Validated siRNA DRP1	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
INTERFERin®	Polyplus, Illkirch-Graffenstadey, Frankreich
GW1CMV-Perceval Plasmid 21737	Addgene, Watertown, Massachusetts, USA
jetPEI®	Polyplus, Illkirch-Graffenstadey, Frankreich

MATERIAL

2.5 KITS

Kits	Hersteller
ATPlite Kit	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
RNeasy Mini Kit®	Qiagen, Venio, Niederlande
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Venio, Niederlande
Maxima® First Strand cDNA Synthesis	Fermentas (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Zellviabilitätsreagenz AlamarBlue®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.6 FLUORESCENZFARBSTOFFE

Farbstoffe	Hersteller
MitoTracker® Green FM	Molecular Probes® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TMRE	Molecular Probes® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.7 TAQMAN® - SONDEN

Gen/Sonde	Spezies	Hersteller
DRP1	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
FIS1	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
OPA1	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
MID51	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
MFN1	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
MFN2	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
MFF	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
TFAM	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
GAPDH	Human	Applied Biosystems, Foster City, California, USA

2.8 ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER LÖSUNGEN

Lösung	Komponenten	Konzentration/Menge
Krebs Ringer Gebrauchslösung	NaCl	123,4 mM
	KCl	4,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,9 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM
	HEPES	10,1 mM
	NaHCO ₃	20 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,56 mM
Stimulationslösung	Krebs Ringer Gebrauchslösung	
	Glucose	25 mM
PBS Puffer	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄	12 mM

2.9 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Materialien	Hersteller
6-well Kulturplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Einwegpipetten, steril	Greiner Bio-One, Essen, Deutschland
PCR-Gefäße und PCR-Platten	NerbePlus, Winsen/Luhe, Deutschland
Pipetten (1-1000 µl)	Gilson International, Limburg, Deutschland
Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
x-well Zellkulturkammer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer „Neubauer Improved“	Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.10 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
FluoView FV10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CW2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Magnetrührer	Omnilab, Bremen, Deutschland
Mikroskopsystem Olympus IX81	Olympus, Hamburg, Deutschland
PCR-Cycler	SensoQuest, Göttingen, Deutschland
Real-Time PCR System 7900HT	Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA
Spektralphotometer NanoDrop 2000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Unisense MicroOptode	Unisense, Aarhus, Dänemark
UPLSAPO 60x1,35 Ölimmersionsobjektiv	Olympus, Hamburg, Deutschland
VICTOR3™ Multilabel Counter	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

2.11 SOFTWARE

Name	Hersteller
Fiji	Entwickler: Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Albert Cardona, Mark Longair, Benjamin Schmid, et al.
MiNA	Valente et al. [142]
GraphPad Prism	GraphPad, San Diego, USA
Imaris Cell Imaging Software	Oxford Instruments, Abingdon, England
Xcellece rt Olympus	Olympus, Hamburg, Deutschland

III. **METHODEN**

3.1 HELA-ZELLEN

Für alle Zellexperimente wurde die HeLa-Zelllinie genutzt. Es handelt sich dabei um humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Namensgebend ist die afroamerikanische Patientin Henrietta Lacks, der im Jahr 1951 einige Zellen des Karzinoms zur Untersuchung auf Malignität entnommen wurden. Es entwickelte sich die erste humane Zelllinie auf der bis heute zahlreiche wissenschaftliche Erkenntnisse beruhen.

3.1.1 ZELLKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C mit 60 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank. Das Passagieren der Zellen mit frischem Medium wurde nach lichtmikroskopischer Kontrolle bei einer Zelldichte von circa 80 % zweimal wöchentlich durchgeführt. Das Pipettieren erfolgte dabei stets unter der Sterilbank. Nach Absaugen des alten Mediums und durch Zugabe von Trypsin-Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) sowie kurzer Inkubationszeit, wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1.200 Rotationen pro Minute (rpm). Es folgte das erneute Absaugen des Überstandes und die Resuspension des Zellpellets mit vorgewärmten, frischen Zellmedium. Die Weiterkultivierung erfolgte je nach vorheriger Zelldichte aufgeteilt in einer neuen Zellkulturflasche. Zur Versuchsvorbereitung wurden entsprechende Kulturschalen ausgesät.

3.1.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT TRYPTANBLAU

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die „Neubauer improved“ Zählkammer verwendet. Diese besteht aus neun großen Quadranten, von denen nur die 4 Eckquadrate mit je 16 kleinen Quadranten ausgezählt wurden. Mit einer Kantenlänge von 1mm, resultiert eine Fläche von 1 mm². Für die Zellzahlbestimmung erfolgte eine 1:2 Verdünnung von Zellsuspension und Tryptanblau. Nach der mäanderförmigen Zellzählung eines Eckquadrats ergibt sich die Zellzahl aus folgender Berechnung:

Zellzahl/ μ l= Mittelwert der gezählten Zellen x Verdünnungsfaktor x Schichtdickenfaktor

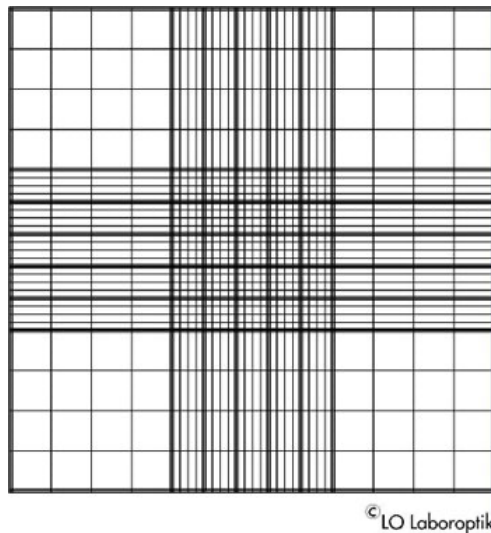


Abbildung 12: Neubauer Zählkammer [http://zaehlkammer.de/gfx/neubauer_improved.jpg]

3.2 TRANSFEKTION

Das Einbringen fremder DNA über Vektoren in Zellen wird Transfektion genannt. Für die Zellexperimente erfolgte eine Transfektion mit siRNA zur Herunterregulation des Drp1 Proteins. Dafür wurden zunächst Zellen im frischem Zellmedium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mittels siRNA. Dazu wurden pro Well 200 μ l Serumfreies Medium mit 0,5 μ l siRNA gemischt. Für die Transfektion erfolgte die Zugabe von 4 μ l des Transfektionsreagenz siINTERFERin®. Nach dem erneuten Mischen mit Hilfe des Vortex und einer Inkubation von zehn Minuten wurde die siRNA auf die Zellen gegeben. Die Versuchsdurchführung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion.

3.3 GENEXPRESSIONANALYSE

3.3.1 RNA ISOLATION

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Mini Kit®. Hierfür wurden die Zellpellets mit 500 µl RLT-Puffer resuspendiert und damit eine komplette Disruption der Zellwand und Plasmamembran herbeigeführt. Zur Reduzierung der Viskosität der Probe erfolgte die Homogenisierung für 2 min bei 12.000 rpm einer QIA Shredder Spin Säule. Mit der Zugabe von 500 µl 70% RNase-freiem Ethanol wurde die RNA ausgefällt und die selektive Bindung von RNA an der RNeasy Membran verbessert. Folgend wurde die Probe auf die RNeasy Spin Säule transferiert und für 15 s bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die RNA ist danach an die RNeasy Membran gebunden und wurde mit 500 µl RW 1 Puffer gewaschen. Danach erfolgte die erneute Zentrifugation für 15 s bei 12.000 rpm. Mit Hilfe des QIAGEN RNase-FreeDNase-Set wurde die DNA hydrolysiert. Dafür wurden 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer auf die RNeasy Membran gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurden 3 Waschschriffe durchgeführt, jeweils 500 µl RW1-Puffer und 2-mal RPE-Puffer. Durch Zentrifugation mit 20-50 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 12.000 rpm erfolgte die Eluierung der RNA. Abschließend wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

3.3.2 RNA-KONZENTRATION

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenz diente Nuklease-freies Wasser.

3.3.3 cDNA SYNTHESE

Die Reverse-Transkription, der erste Schritt der RT-qPCR, erfolgte mit dem Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit, zu Herstellung der cDNA mittels einer Reversen Transkriptase.

Dafür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

4 µl Reaction Mix (reaction buffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), oligo(dT)18 und random hexamer primer),

2 µl Maxima Enzyme Mix (Maxima Reverse Transkriptase, RiboLock RNase Inhibitor) und
1 µg RNA

Ein Gesamtvolumen von 20 µl wurde durch das Hinzufügen von Nuclease-freiem Wasser erreicht. Durch den Polymerasekettenreaktion (PCR)-Cycler erfolgte die cDNA-Synthese nach folgendem Programm:

Schritt	Dauer	Temperatur
1.	10 min	25 °C
2.	15 min	50 °C
3.	5 min	85 °C
4.	5 min	4 °C

3.3.4 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (QRT-PCR)

Die Vervielfältigung und Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte durch die quantitative Real-Time PCR. Das verwendete TaqMan®-Prinzip beruht auf dem Nutzen spezifischer TaqMan®-Sonden. Sequenzspezifische Oligonukleotide tragen am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff sowie am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) und einen minor groove binder (MGB). Der Primer und die TaqMan®-Sonde hybridisieren an die Zielsequenz (Annealing) zwischen Forward und Reverse Primern. Der MGB dient der Stabilisierung der hybridisierten Sonde. Durch die enge Beziehung zwischen Reporter und NFQ wird das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Dieser Vorgang wird auch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq) besitzt eine 5'-Exonukleaseaktivität. Dadurch wird während der Amplifikation die TaqMan®-Sonde gespalten und bewirkt die Trennung des Reporter-Fluorophors vom NFQ. Die steigende Reporter-Fluoreszenz wird anschließend detektiert. Die Messung erfolgt in jedem Zyklus in der exponentiellen Phase am Ende der Elongation. Dabei korreliert der Fluoreszenzanstieg direkt proportional zur Amplifikation der Zielsequenz.

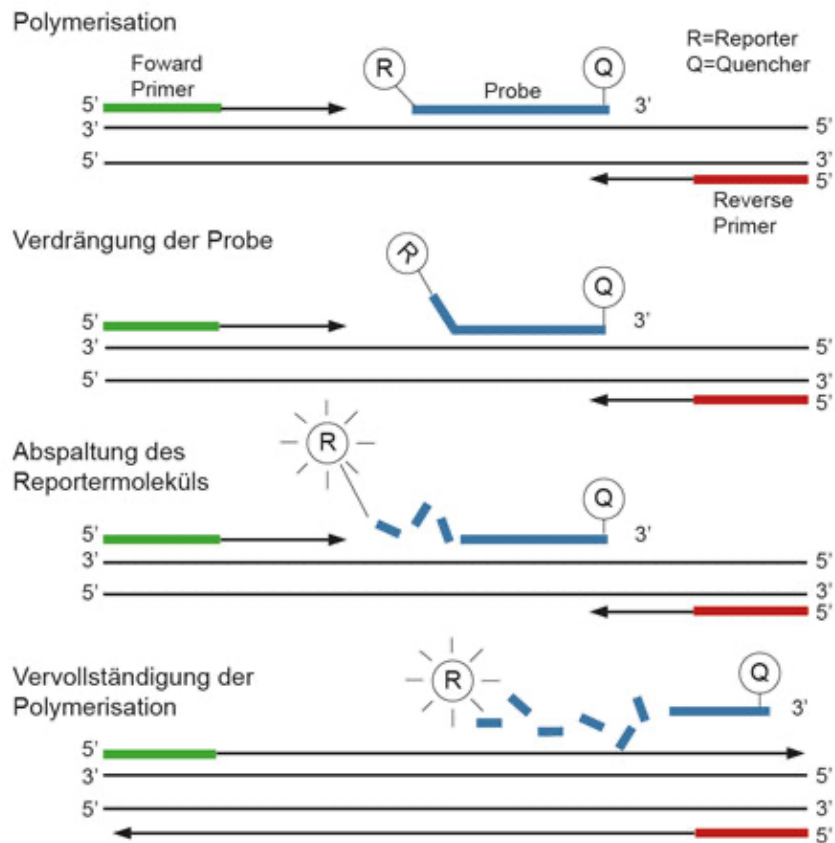


Abbildung 13: Funktionsprinzip der qRT-PCR

(<https://www.medizinische-genetik.de/diagnostik/allgemeine-informationen/methoden/real-time-pcr>)

Für die Expressionsanalyse der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsproteine wurden sequenzspezifische TaqMan®-Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet. Als Housekeeping Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Als Reporter-Fluoreszenzenzfarbstoff wurde FAM™ genutzt.

Für die qRT-PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

cDNA	1 µl
TaqMan®-Universal PCR Master Mix	5 µl
20xTaqMan®-Sonde	0,5 µl
Aqua dest.	6 µl

Mit dem Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR Cycler erfolgte die quantitative Real-Time PCR nach folgendem Programm:

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur
Hold	2 min	50 °C
Hold	10 min	95 °C
	15 s	95 °C
45 Zyklen	1 min	60 °C

Mit dem SDS 2.3 Programm wurde der PCR-Lauf erstellt und im RQ-Manager 1.2 die Messwerte abgelesen. Diese wurden quantitativ nach der Delta-Delta-C_t Methode ausgewertet. Der Cycle of threshold (C_t) –Wert entspricht den Zyklen, in denen sich die gemessene Fluoreszenz erstmals signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheidet. Durch die interne Kontrolle mittels des Referenzgens GAPDH konnte die Normierung von Varianten der untersuchten mRNA-Menge (Delta-C_t) erreicht werden. Mit der Ratio konnte der mRNA-Expressionsunterschied zwischen der untersuchten mRNA und der Referenzkontrolle bestimmt werden.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\begin{aligned}\Delta C_t &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

3.4 ZELLVIABILITÄT

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit der Zellviabilitätsreagenz AlamarBlue™. Die auf Resazurin basierende zellpermeable Lösung wird dabei als Indikator genutzt. Sobald Resazurin in eine lebende Zelle gelangt, wird es zu Resorufin reduziert und zeigt bei 530-590 nm Anregung eine Fluoreszenz. Werden die Zellen mit einer proliferationshemmenden Substanz behandelt, lassen sich über die Veränderung der Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Zellviabilität ziehen. Für die Messung wurden die Zellen auf 6-Well Kulturplatten ausgesät und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Einem Teil der Zellen wurden 10 mmol/l H₂O₂ hinzugefügt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das gebrauchsfertige AlamarBlue® Reagenz wird dem Kulturmedium im Verhältnis 1 zu 10 ohne Waschvorgang zugegeben und anschließend die Eigenfluoreszenz gemessen. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die erneute Messung der resultierenden Fluoreszenz am VICTOR3™ Multilabel Counter.

3.5 FLUORESZENZFÄRBUNG

Durch Fluorochrome können Strukturen sichtbar gemacht werden. Nach Anregung der spezifisch akkumulierten Fluorochrome mit Licht einer spezifischen Wellenlänge kann das emittierte länger-wellige Licht detektiert werden.

3.5.1 FLUORESZENZFÄRBUNG MITOTRACKER GREEN FM

Die Analyse der Mitochondrienstruktur in HeLa-Zellen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM. Das Carbocyanin gekoppelte MitoTracker Green FM kann passiv durch die Plasmamembran diffundieren. Dort akkumuliert der Farbstoff durch seine Chloromethyl-Gruppe in den Mitochondrien. Die Färbung erfolgte nach einer Kultivierung der HeLa-Zellen in einer MatTek Zellkulturschale für 48 Stunden. Das genutzte Zellmedium wurde entfernt, das MitoTracker Green in einer Konzentration von 50 nM auf die Zellen gegeben und nachfolgend für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit vorgewärmten Zellmedium gewaschen und im Anschluss mit frischem Zellmedium versorgt. Nach Anregung mit dem LD-Laser bei 490 nm erfolgte die Analyse am konfokalen Lasermikroskop FluoView 10i. Dabei erfolgte jeweils eine Zellaufnahme zum Zeitpunkt 0 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min. Die Aufnahmen wurden mittels ImageJ/Fiji-MiNA und Imaris ausgewertet.

3.5.2 FLUORESCENZFÄRBUNG TMRE

Die Analyse der mitochondrialen Membranpotentials erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodaminethylester (TMRE). TMRE ist ein rot-orange fluoreszierender Farbstoff. Durch die kationischen Eigenschaften ist der Farbstoff gut zelldurchlässig. Die HeLa-Zellen wurden in einer MatTek Zellkulturschale kultiviert. Das Zellmedium wurde abgesaugt und TMRE in einer Konzentration von 6 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit Krebs-Ringer Lösung gewaschen und 1 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 25 mmol/l Glucose und Anregung des Farbstoffs bei 559 nm erfolgte die Fluoreszenzmessung. Diese erfolgte über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 20 s. Nach Hinzugabe von 1 μM Oligomycin und Hemmung der ATP-Synthase wurde der Messvorgang erneut gestartet. Durch die Zugabe von 5 μM FCCP wurde die Atmungskette der Zellen entkoppelt und der Messvorgang für weitere 10 Minuten wiederholt. Verglichen wurden jeweils die HeLa-Zellen ohne und mit Transfektion. Für die Analyse des mitochondrialen Membranpotentials wurde ein inverses Mikroskopsystem IX81 (Olympus) verwendet, das mit einem UPLSAPO 60x1,35 Ölimmersionsobjektiv (Olympus) und einem Zellinkubator ausgestattet war. Die Bilderfassung und -analyse erfolgte mit der Software xcellence rt (Olympus).

3.6 ATP- UND ADP-MESSUNG

Die ATP- und ADP-Messung in HeLa-Zellen erfolgte mit dem „ATPlite Kit“ der Firma PerkinElmer®. Nach dem Prinzip der Biolumineszenz wird bei dem ATPlite Assay System in eine ATP-haltige Lösung ein Substrat mit D-Luciferin und das Enzym Luciferase gegeben. Die Luciferase katalysiert die Reaktion von ATP, D-Luciferin und O_2 zu AMP, CO_2 , Oxyluciferin und Licht. Bei den Wellenlängen 560-562 nm wird Licht im angeregten Zustand emittiert. Dieses ist proportional zur ATP-Ausgangskonzentration der untersuchten Lösung. Für die Messung wurden die Zellen auf 6-Well Kulturplatten ausgesät und für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimalig mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 200 μl Lysepuffer inkubiert. Von dem Zelllysats wurden 70 μl zu 630 μl Puffer A (20mM HEPES, 3MM MgCl_2 , pH 7,75) gegeben, gemischt und folgend auf zwei Ansätze geteilt. Dem Ansatz der ADP-Messung wurde 19,5 μl Phosphoenolpyruvat (PEP) und 0,5 μl Pyruvatkinase (PK) zugegeben. Die PK katalysiert ADP und PEP zu ATP und Pyruvat. In einem Dreifachansatz wurde 105,7 μl pro Well der zu untersuchenden Probe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μl Substrat des „ATPlite-Kit“. Dem Ansatz der ATP-Messung wurde im Dreifachansatz 100 μl Probe in die Mikrotiterplatte zugegeben und mit 50 μl Substrat des „ATPlite-Kit“ versetzt. Beide Ansätze wurden 2 Minuten im Dunkeln durchmischt und für weitere 8 Minuten in einer lichtundurchlässigen Kammer aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Messung der

entstandenen Lumineszenz bei 562 nm im Photometer (Victor3). Als Referenz diente eine erstellte Eichgerade, in der die gemessene Lumineszenzintensität bezogen auf die bekannten ATP-Konzentrationen aufgetragen wurde.

Die Messung des ATP/ADP Ratio erfolgte mit dem fluoreszierenden Biosensor Perceval. In seinem Anregungsspektrum hat der Perceval Fluoreszenzsensor zwei Maxima, die je nach Nukleotidbindung reagieren. Bei der Bindung von ATP steigt die Anregung im Bereich von 500 nm, bei ADP-Bindung steigt dahingehend die Anregung im Bereich von 420 nm. Das Verhältnis dieser beiden Anregungswellenlängen ergibt durch die Konkurrenz beider Substrate um die Bindungsstelle einen Hinweis auf das ATP/ADP Verhältnis.

Für die Transfektion mit dem Biosensor Perceval erfolgte das Aussähen von 2×10^5 Zellen in einer Zellkulturschale mit anschließender Inkubationszeit von 24 Stunden. Danach wurden die Zellen mit dem 1 µg Perceval und 2 µl jetPEI® transfiziert und weitere 24 Stunden inkubiert. Vor dem Experiment hungerten die Zellen 1 Stunde lang in Krebs-Ringer-Lösung ohne Glucose. In einem Zeitverlaufsexperiment erfolgte zunächst über 3 Minuten Zellaufnahmen unter Hungerbedingungen. Anschließend wurde die glukoseabhängige ATP-Produktion über 15 Minuten nach Zugabe von 25 mmol/l Glucose gemessen. Schließlich wurde die oxidative ATP-Produktion über 5 Minuten nach der Zugabe von 5 µM FCCP gemessen. Es wurde ein inverses Mikroskopsystem IX81 (Olympus) verwendet, das mit einem UPLSAPO 60x1,35 Ölimmersionsobjektiv (Olympus) und einem Zellinkubator ausgestattet war. Die Bilderfassung und -analyse erfolgte mit der Software xcellence rt (Olympus).

3.7 ANALYSE DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS

Der Sauerstoffverbrauch der HeLa-Zellen wurde mittels eines optischen Sensors (Unisense MicroOptode) gemessen. Die MicroOptode nutzt Nahinfrarot-Farbstoffe für eine verbesserte Leistung mit hoher Präzision und Zuverlässigkeit mit geringer Kreuzungsinterferenz. Die Spitze der optischen Faser ist mit einem speziellen Farbstoff beschichtet, der mit rotem Licht in Bereich 610-630 nm angeregt werden kann und eine sauerstoffabhängige Fluoreszenz im nahen Infrarot (760-790 nm) zeigt. Die Sauerstoffkonzentration kann aus der Abschwächung des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. Die Kalibrierung der Messküvetten erfolgte mit begastem Aqua dest für 100 % und mit O₂ freiem Aqua dest für 0 %. Für den Versuch wurden 2×10^6 Zellen mit 25 mmol/l Glucose versorgt und die Messung des Sauerstoffverbrauchs über 10 Minuten durchgeführt. Nach Hinzugabe von 1 µM Oligomycin und Hemmung der ATP-Synthase wurde der Messvorgang erneut gestartet. Durch die Zugabe von 5 µM FCCP wurde die Atmungskette der Zellen entkoppelt und der Messvorgang für weitere 10 Minuten wiederholt.

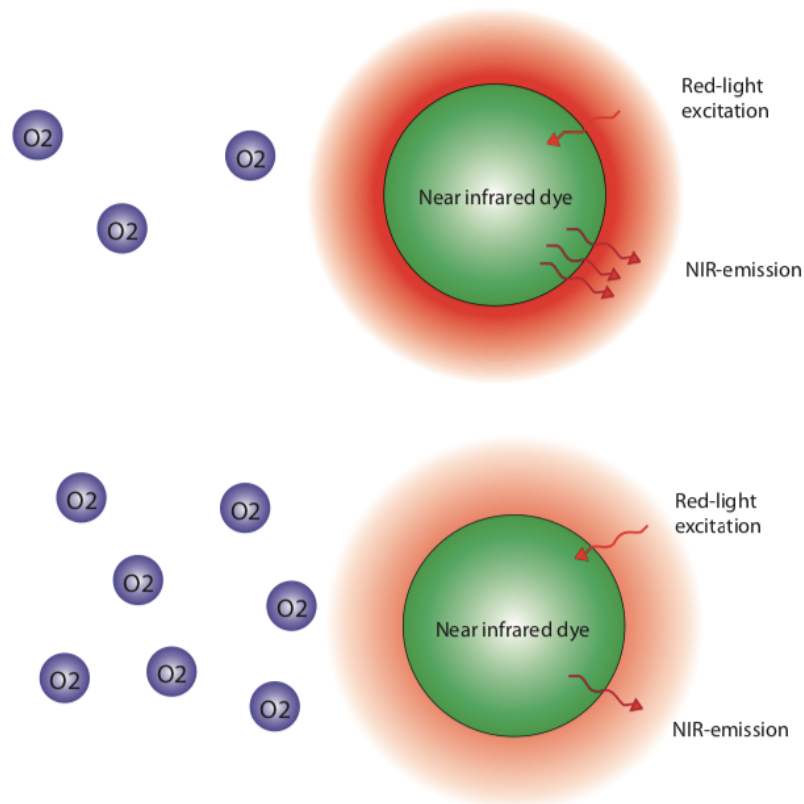


Abbildung 14: MircoOptode Unisense Sauerstoffverbrauch: Der spezielle Farbstoff zeigt bei Anregung im Bereich von 610-630 nm eine sauerstoffabhängige Fluoreszenz. Die Sauerstoffkonzentration kann aus der Abschwächung des Fluoreszenzsignals bestimmt werden.

(<https://unisense.com/wp-content/uploads/2021/09/MircoOptode-Manual-Opto-Series.pdf>)

3.8 AUSWERTUNG DER DATEN

Die statistische Auswertung der durchgeführten Studie erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM; „standard error of the mean“) erfasst. Der Student's t-Test diente der Analyse von Unterschieden zweier Merkmalsgruppen. Mit dem einfaktoriellem ANOVA Test für unabhängige Variablen sowie der Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte die Auswertung der Unterschiede von Mittelwerten bei mehr als zwei verschiedenen Merkmalsgruppen. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % (p-Wert < 0,05) angesehen.

IV. ERGEBNISSE

4.1 HELA-ZELLEN

Untersucht wurde in dieser Studie der Einfluss von Drp1 auf die mitochondriale Morphologie und den Stoffwechsel. Betrachtet wurden dazu die Auswirkungen einer Herunterregulation von Drp1 auf die mitochondriale Dynamik, die Zellviabilität, die ATP-Produktion, das mitochondriale Membranpotential und den Sauerstoffverbrauch in HeLa-Zellen. Die Verminderung von Drp1 wurde durch Transfektion der Zellen mit einer spezifischen siRNA erreicht. Der Nachweis der erfolgreichen Drp1 Herunterregulation erfolgte mittels Genexpressionsanalyse. Die Ergebnisse der HeLa siDrp1 Zellen sind in den nachfolgenden Abbildungen mit schwarzen Balken und die der Kontrollzellen mit offenen Balken dargestellt.

4.2 GENEXPRESSION NACH KNOCKDOWN VON DRP1 IN HELA-ZELLEN

Mit der quantitativen Real-Time PCR erfolgte die Genexpressionsanalyse bekannter Teilungs- und Fusionsproteine in HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown sowie in den HeLa-Kontrollzellen. Analysiert wurden die Teilungsproteine Drp1, Fis1, MID51 und Mff sowie die Fusionsproteine OPA1, Mfn1, Mfn2 und der mitochondriale Transkriptionsfaktor Tfam. Als Referenzgen diente das GAPDH.

Die spezifische siRNA Behandlung in HeLa-Zellen resultiert in einer signifikant verminderten Drp1 Genexpression im Vergleich zu den HeLa-Kontrollzellen. Die mRNA-Expression von Fis1 zeigte sich in den HeLa siDrp1 Zellen ebenfalls signifikant vermindert. Die Genexpression der anderen untersuchten Teilungsproteine MID51 und Mff war nur leicht reduziert. Nach dem Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen war die Expression des Fusionsproteins OPA1 leicht vermindert. Die weiteren Proteine der mitochondrialen Fusion zeigten sich in der mRNA-Genexpression in geringem Maße erhöht. Der mitochondriale Transkriptionsfaktor Tfam war nach Transfektion mit der siRNA in der Proteinexpression ebenfalls leicht erhöht. Die Genexpression ist pro Zelle dargestellt, damit das Expressionsverhältnis zwischen den einzelnen Genen betrachtet werden kann.

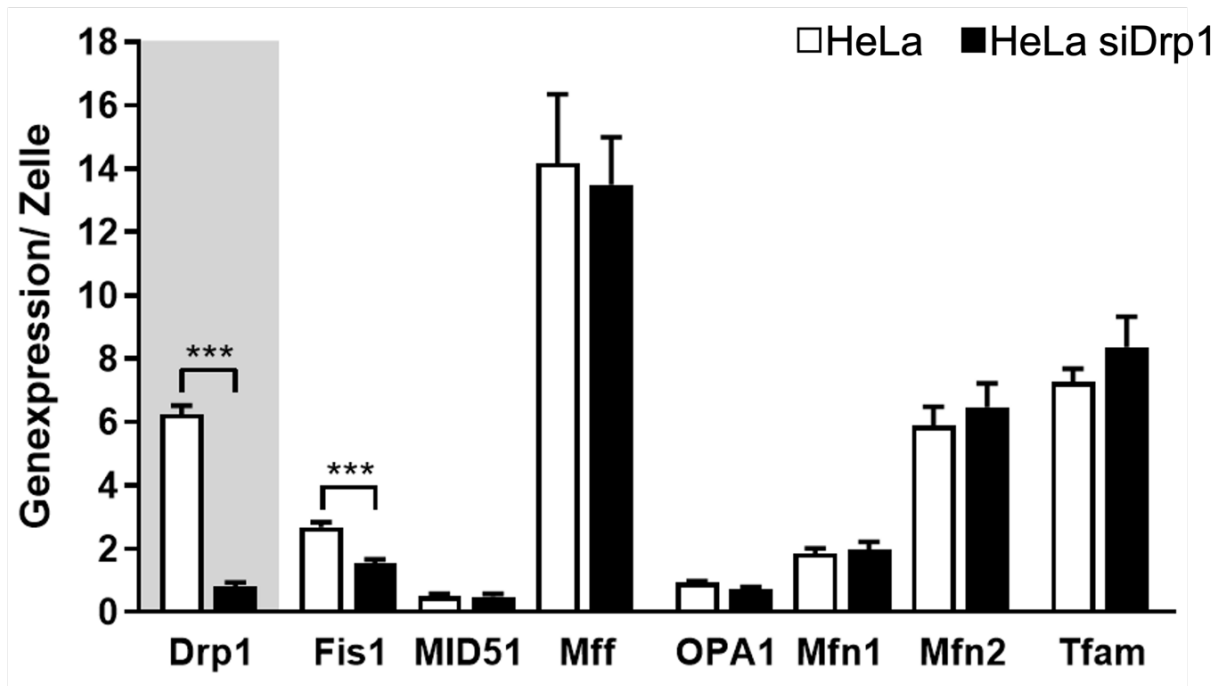


Abbildung 15: Vergleich der relativen Genexpression/Zelle: Vergleichend HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=6, dargestellt sind die Werte \pm SEM, ***p < 0.001 (Student's t test).

4.3 ZELLVIABILITÄT

Das AlamarBlue® Reagenz wurde für die Bestimmung der Zellviabilität genutzt. Nach dem Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen zeigt sich eine signifikant verminderte Zellviabilität um 15%. Nach Inkubation der Zellen mit 10 mmol/l H_2O_2 verminderte sich die Zellviabilität in den HeLa-Kontrollzellen um 20%. Im Vergleich führte die Zugabe von H_2O_2 in HeLa siDrp1 Zellen zu einem Viabilitätsverlust von 30%. Die Suszeptibilität der HeLa siDrp1 Zellen gegenüber H_2O_2 war somit höher als die der Kontrollzellen.

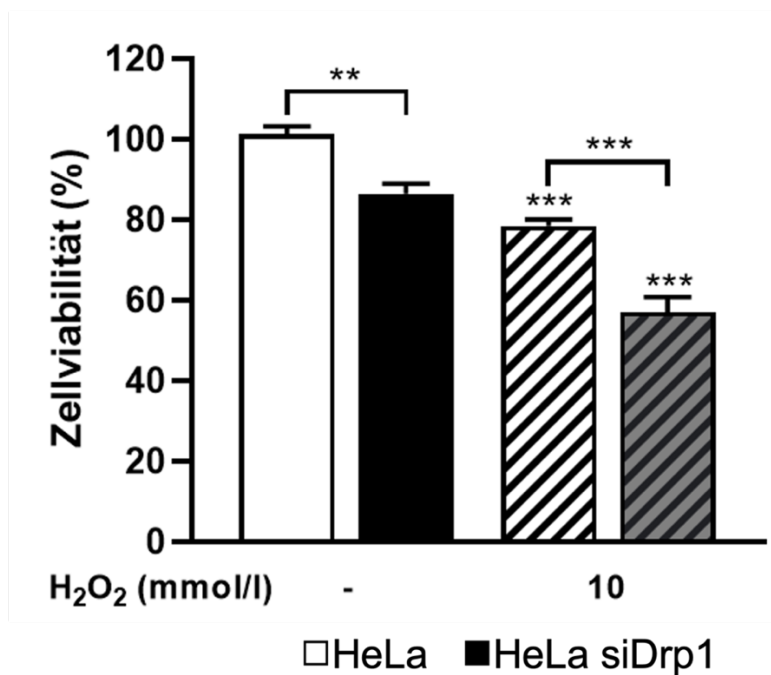


Abbildung 16: Zellviabilität: Vergleichend HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, jeweils mit und ohne Zugabe von H_2O_2 , $n=6$, dargestellt sind die Werte \pm SEM, *** $p < 0.001$ (ANOVA/Bonferroni's test).

4.4 ANALYSE DER MITOCHONDRIALEN NETZWERKSTRUKTUR

Die Darstellung der Mitochondrien erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM (MTG). Für die Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden Zellaufnahmen alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 20 Minuten durchgeführt, um Veränderungen des mitochondrialen Netzwerkes zu erfassen bzw. eine reduzierte mitochondriale Dynamik detektieren zu können.

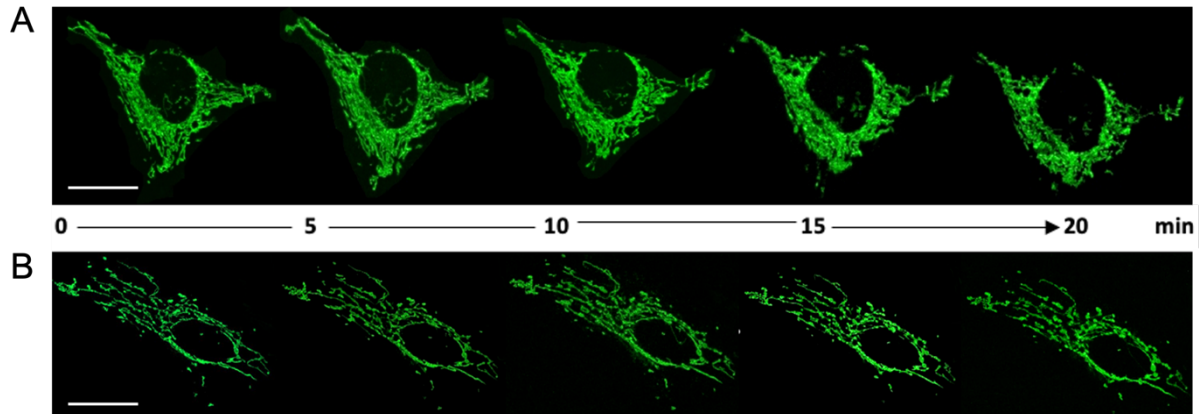


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der mitochondrialen Morphologie: HeLa-Kontrollzelle (A) und HeLa-Zelle nach Drp1 Knockdown (B), Zellaufnahmen alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 20 Minuten, Maßstab 50 µm.

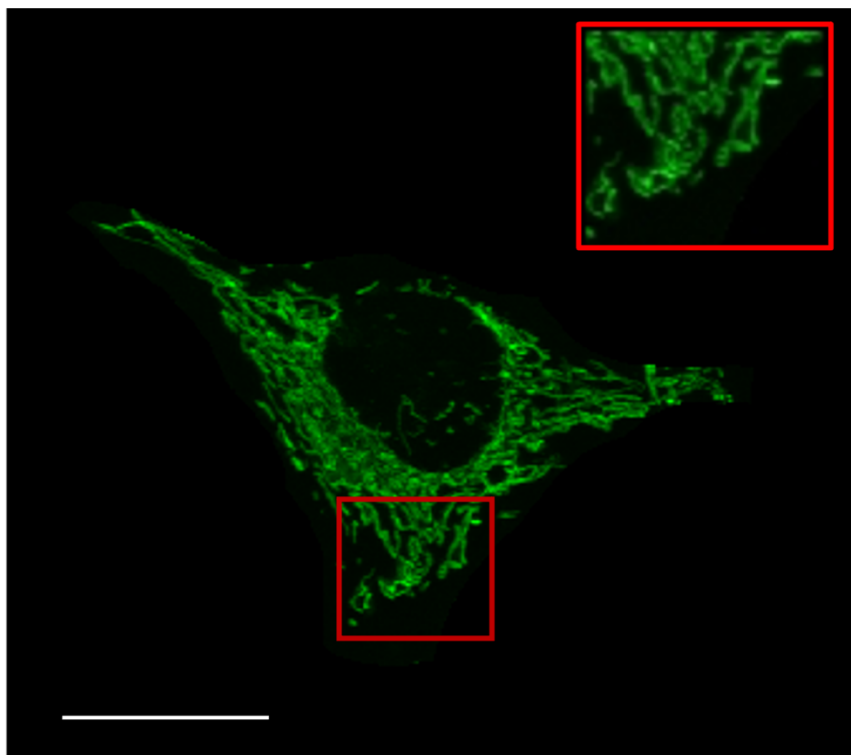


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung der mitochondrialen Morphologie einer HeLa-Kontrollzelle: Die Anfärbung des mitochondrialen Netzwerkes erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM. Der rot markierte Bereich ist vergrößert dargestellt, um die Netzwerkstruktur erkenntlich zu machen, Maßstab 50 µm.

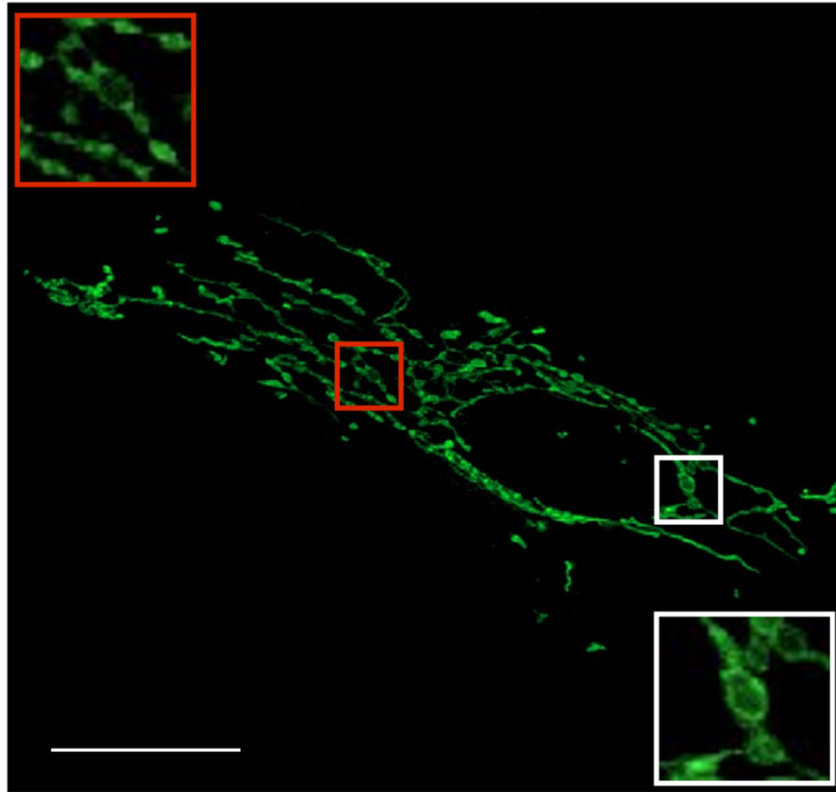


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der mitochondrialen Morphologie einer HeLa-Zelle nach Herunterregulation von Drp1: Die Anfärbung des mitochondrialen Netzwerkes erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM. Die weiß und rot markierten Bereiche sind vergrößert dargestellt, um Loop Strukturen erkenntlich zu machen, Maßstab 50 μm .

Die Analyse der mitochondrialen Netzwerkstruktur wurde mit dem Tool MiNA (Mitochondrial Network Analysis), für das Programm Fiji/ImageJ durchgeführt. MiNA kann in der Bildanalyse zwischen unterschiedlichen Strukturen unterscheiden. Die Anzahl der Netzwerke wurde durch das Tool als die Anzahl der Objekte im Bild gezählt, die mindestens einen Kreuzungspixel enthalten und somit aus drei einzelnen Zweigen bestehen. Als „Individuals“ erkennt das Programm punktförmig oder strangförmig angeordnete Pixel, die nicht die Kriterien eines Netzwerkes entsprechen. Verglichen wurden dabei Einzelzellaufnahmen von HeLa-Kontrollzellen sowie HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown.

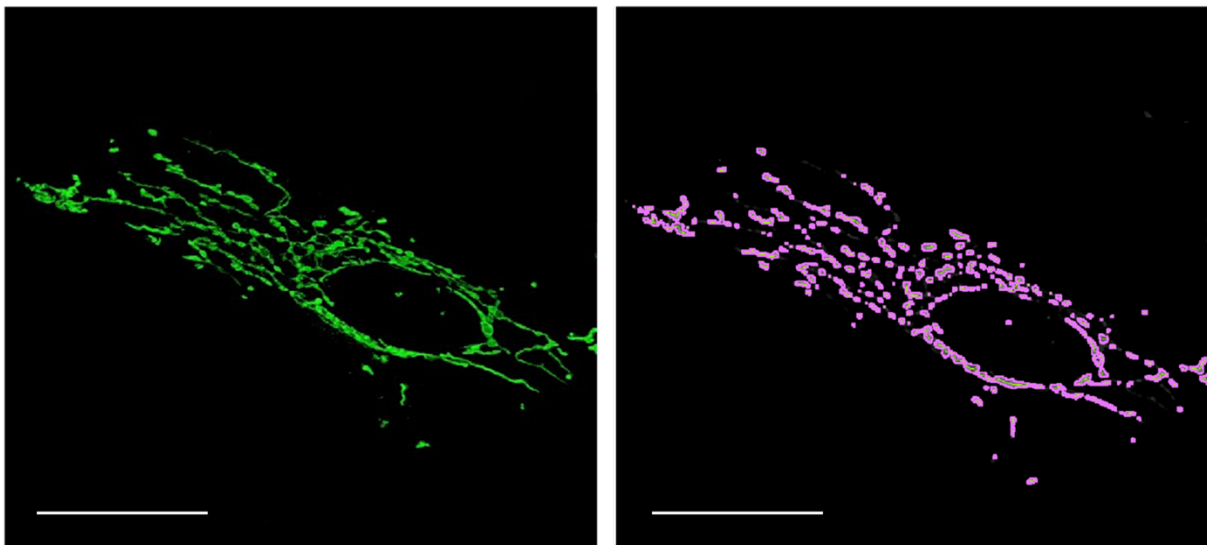


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung der Analyse des mitochondrialen Netzwerkes mit MiNA: Exemplarische Fluoreszenzaufnahme des mitochondrialen Netzwerkes einer HeLa-Zelle nach Drp1 Knockdown und die Strukturerkennung des MiNA-Tools, Maßstab 50 μm .

Nach dem Herunterregulieren von Drp1 in HeLa-Zellen zeigt sich in der MiNA-Auswertung eine leicht erhöhte Anzahl an gemessenen „Individuals“. Die vom Tool erkannten Netzwerkstrukturen zeigen sich über einen gemessenen Zeitraum von 20 Minuten nach dem Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen fluktuierend erhöht. Die Unterschiede zum Zeitpunkt 0 Minuten sowie zu den Zeitpunkten 15 und 20 Minuten sind signifikant. Aus der Fläche des Bildes, die vom mitochondrialen Signal eingenommen wird, erstellt das MiNA-Tool den Footprint. Nach dem Herunterregulieren von Drp1 in HeLa-Zellen zeigt sich die Footprint Fläche im Vergleich mit den HeLa-Kontrollzellen signifikant vergrößert.

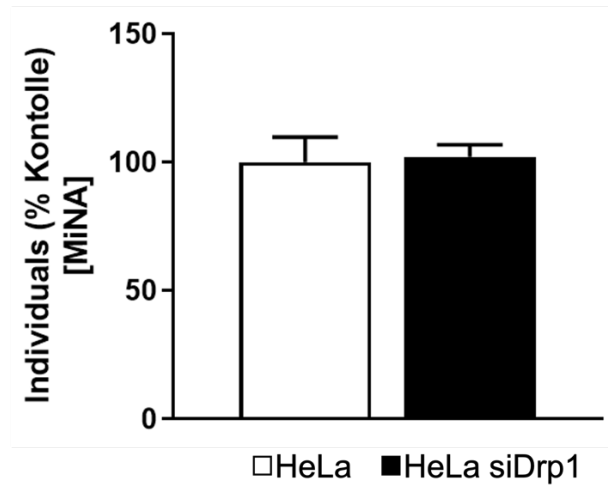


Abbildung 21: Individuals MiNA: Im Vergleich die Analyse des MiNA-Tools von HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=50/25, dargestellt sind die Werte \pm SEM, (Student's t test).

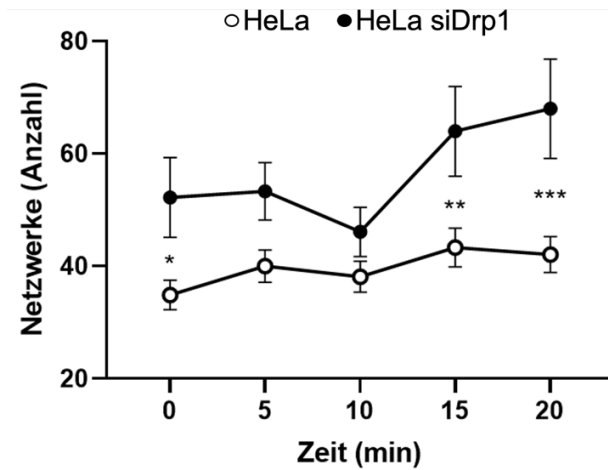


Abbildung 22: Netzwerke MiNA: Im Vergleich die Analyse des MiNA-Tools von HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=50/25, dargestellt sind die Werte \pm SEM *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Two-way ANOVA/Bonferroni's test).

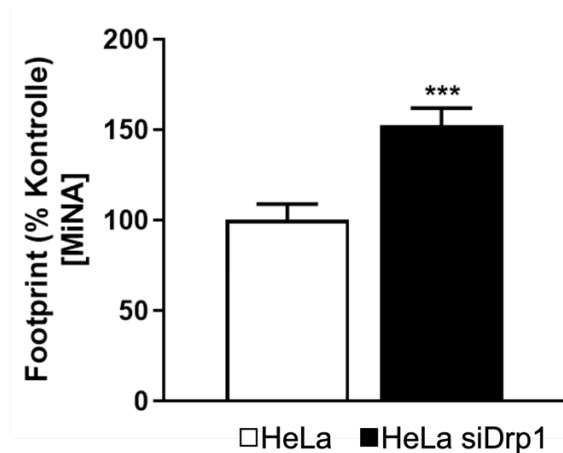


Abbildung 23: Footprint MiNA: Im Vergleich die Analyse des MiNA-Tools von HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=50/25, dargestellt sind die Werte \pm SEM, ***p < 0.001 (Student's t test).

Die Betrachtung einzelner mitochondrialer Netzwerkstrukturen erfolgte zusätzlich mit der Software Imaris. Jedes Mitochondrium wird dabei als einzelnes Objekt erkannt und in verschiedenen Farben dargestellt. Beispielhaft ist die Fläche in mit einem Sternchen markierten Mitochondrien in μm^2 angegeben.

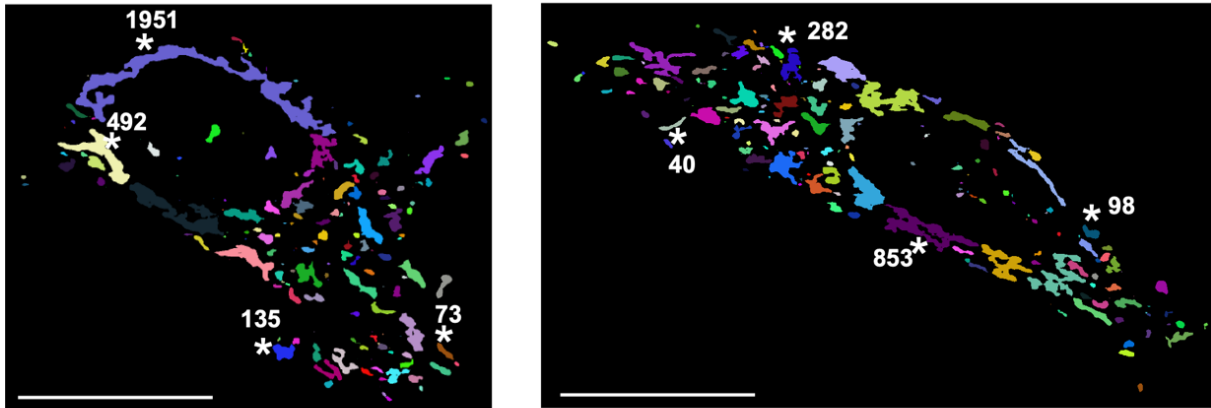


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der Imaris Analyse des mitochondrialen Netzwerkes von zwei HeLa-Kontrollzellen: Mit Sternchen markierte Beispielflächen in μm^2 , Maßstab 50 μm .

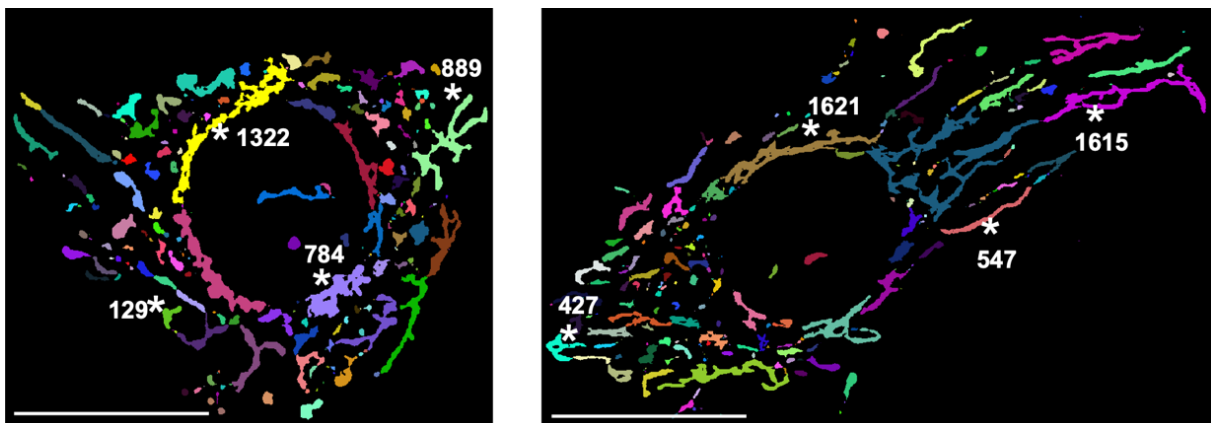


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der Imaris Analyse des mitochondrialen Netzwerkes von zwei HeLa-Zellen nach Herunterregulation von Drp1: Mit Sternchen markierte Beispielflächen in μm^2 , Maßstab 50 μm .

Der Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen zeigte nach dieser Auswertung eine signifikante Steigerung der mittleren mitochondrialen Fläche. Die maximale mitochondriale Fläche war in HeLa-Zellen mit herabgesetzten Drp1 signifikant erhöht. Die prozentuale Anzahl an großen Mitochondrien mit einer Fläche $>800 \mu\text{m}^2$ zeigte sich ebenfalls signifikant erhöht. Vereinzelt waren allerdings auch in den Kontrollzellen große Mitochondrien mit einer Fläche $>800 \mu\text{m}^2$ zu erkennen.

Mittels beider Auswertungen konnte eine Elongation des mitochondrialen Netzwerkes in siDrp1 behandelten HeLa-Zellen quantitativ nachgewiesen werden.

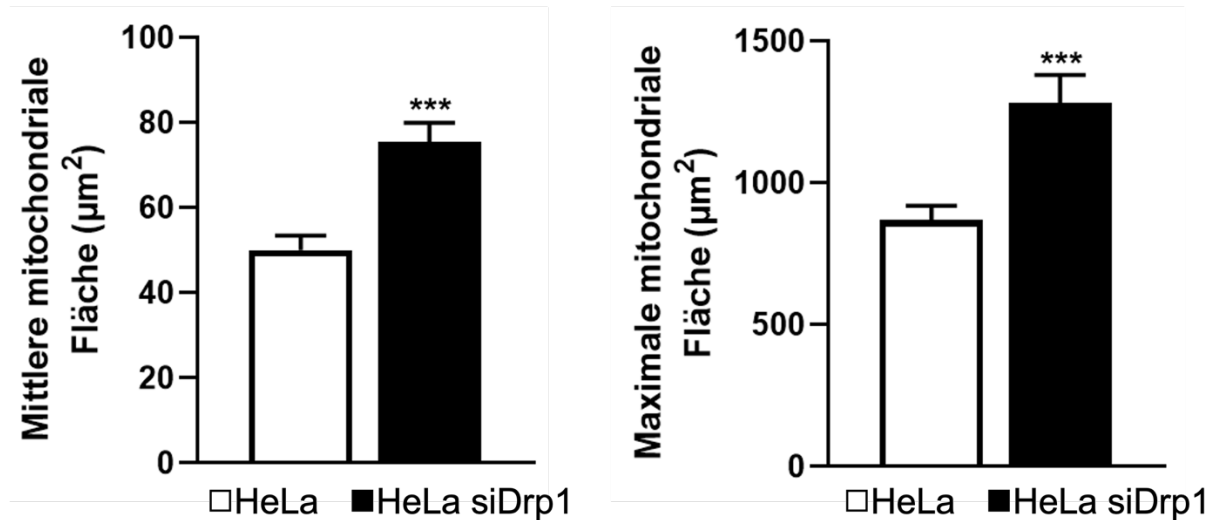


Abbildung 26: Mitochondriale Fläche Imaris: Vergleich der mittleren und maximalen mitochondrialen Fläche in HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=50/25, dargestellt sind die Werte \pm SEM, ***p < 0.001 (Student's t test).

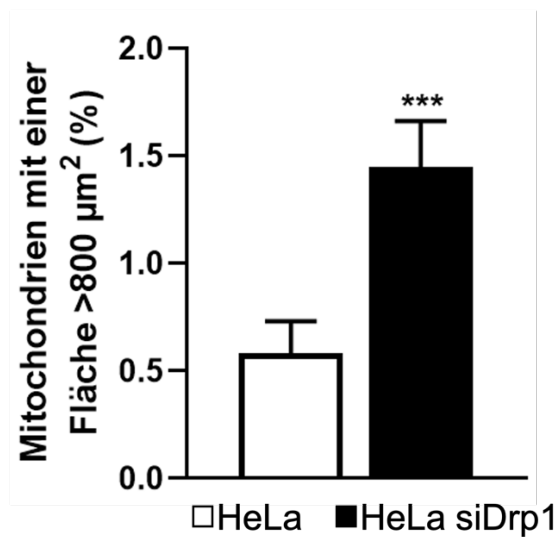


Abbildung 27: Mitochondriale Fläche Imaris: Vergleich der Mitochondrien mit einer Fläche >800 µm² in HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=50/25, dargestellt sind die Werte \pm SEM, ***p < 0.001 (Student's t test).

4.5 BESTIMMUNG VON ATP UND ADP

Die Bestimmung von ATP und ADP in HeLa-Zellen erfolgte mit dem „ATP-lite Kit“ der Firma PerkinElmer®. Der Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen resultierte in einer signifikant verringerten ATP-Konzentration pro Zelle verglichen mit den HeLa Kontrollzellen. Dagegen zeigte sich die ADP-Konzentration in HeLa-Zellen nach dem Herunterregulieren von Drp1 gegenüber den HeLa-Kontrollzellen deutlich erhöht.

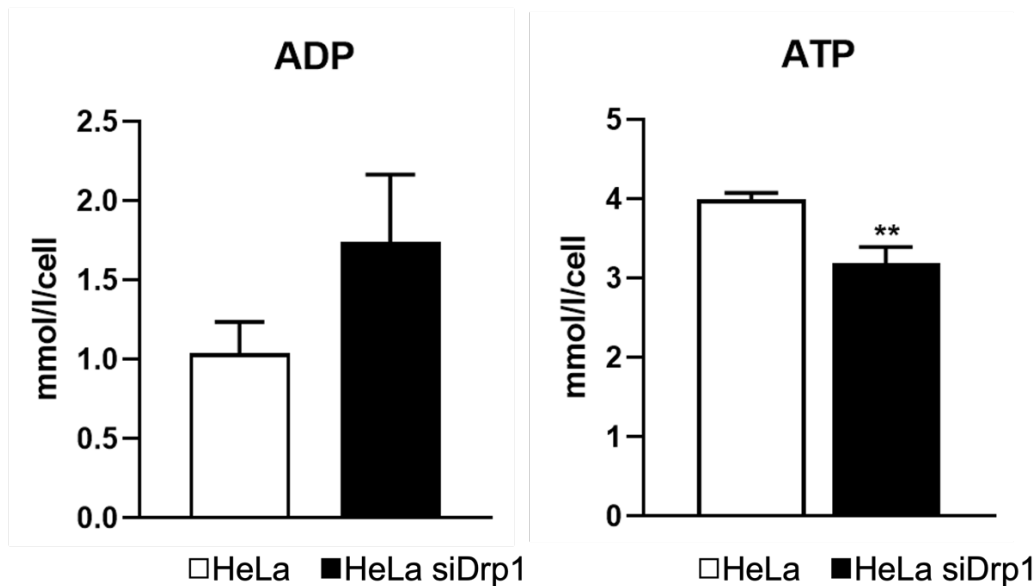


Abbildung 28: ATP- und ADP-Messung in HeLa-Zellen: Im Vergleich die Messungen mit HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach DRP1 Knockdown, n=5, dargestellt sind die Werte \pm SEM, (Student's t test), **p < 0.01

Die Bestimmung der zytosolischen ATP/ADP Ratio erfolgte durch Messung mit dem fluoreszierenden Marker Perceval. Nach Bildserienaufnahme im hungernden Zustand der Zellen erfolgte die Zugabe von Glucose nach 4 Minuten. Nach 18 Minuten erfolgte das Entkoppeln der Atmungskette mit FCCP.

Im hungernden Zustand zeigten HeLa-Zellen mit herabgesetztem Drp1 und HeLa-Kontrollzellen eine über die Zeit leicht abnehmende ATP-Produktion. Die Gabe von Glucose resultierte in den HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown in einem stärkeren Anstieg der ATP/ADP Ratio. Anschließend fiel über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten die ATP-Produktion in HeLa Zellen ohne und mit Drp1 Knockdown ab. Der kontinuierliche Abfall zeigte nach etwa 10 Minuten eine kurze Verlaufsunterbrechung. Während die HeLa-Kontrollzellen einen kurzen Anstieg der ATP/ADP Ratio aufwiesen, zeigte sich die ATP/ADP Ratio in HeLa-Zellen mit Knockdown von Drp1 stärker abnehmend. Das Hinzufügen von FCCP resultierte in HeLa-Zellen mit herabgesetzten Drp1 nur in einem Abfall der ATP-Produktion bis auf das Ausgangsniveau. Die ATP/ADP Ratio der HeLa-Kontrollzellen zeigte einen Abfall unter die anfänglich gemessene ATP-Produktion.

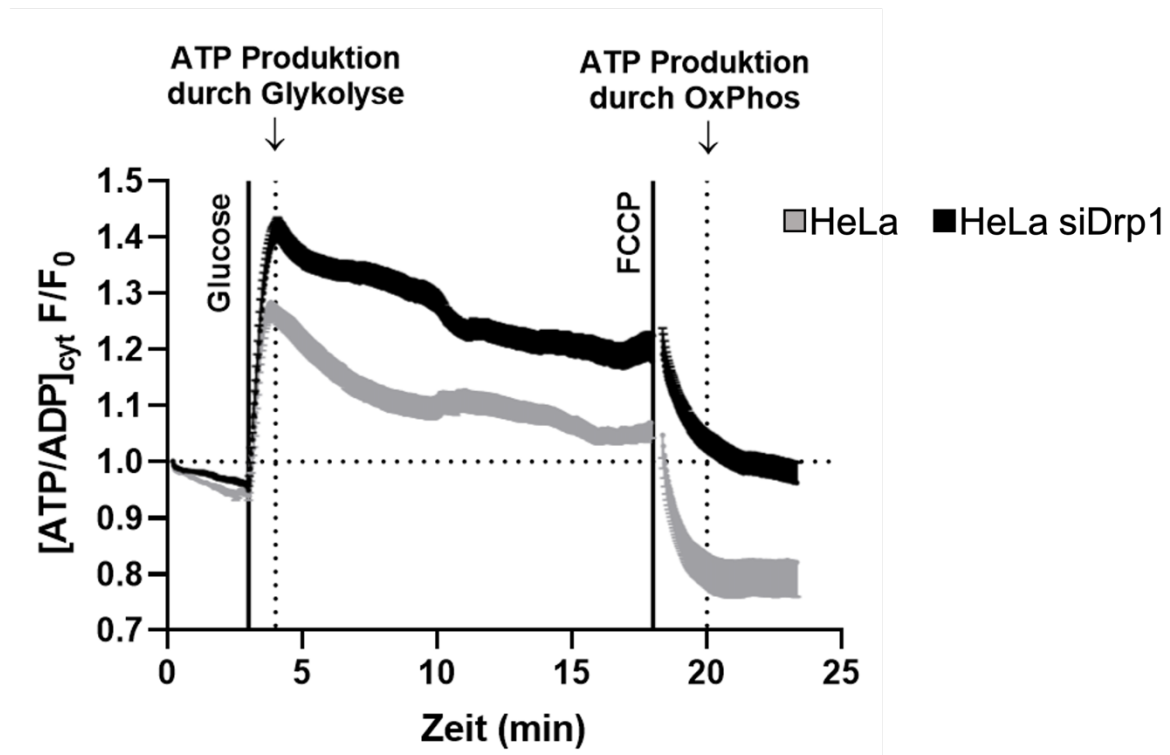


Abbildung 29: ATP/ADP Ratio in HeLa-Zellen: Im Vergleich HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, Glucose Zufuhr nach 4 Minuten, FCCP-Gabe nach 18 Minuten, n=18/18, dargestellt sind die Werte \pm SEM.

Aus den Ergebnissen lässt sich berechnen, dass die HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikant erhöhte ATP-Produktion über die Glykolyse aufwiesen. Die ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung zeigte sich dagegen in HeLa-Zellen mit herabgesetztem Drp1 signifikant verringert. Somit konnte gezeigt werden, dass es insgesamt infolge des Knockdowns von Drp1 zu einer reduzierten ATP-Produktion in HeLa-Zellen kommt.

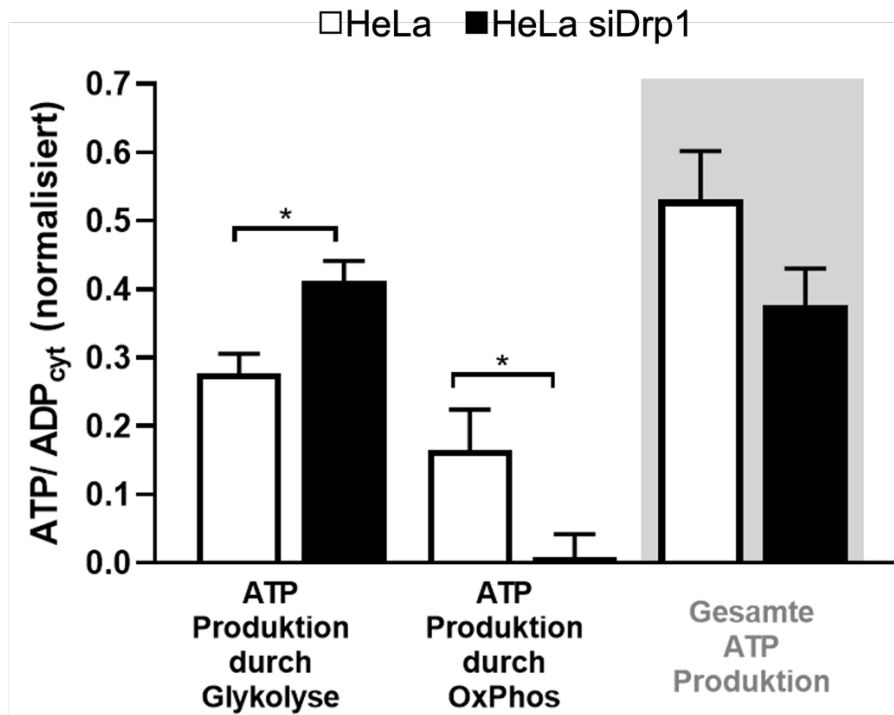


Abbildung 30: ATP-Produktion: ATP-Produktion durch Glykolyse, durch Oxidative Phosphorylierung und gesamte ATP-Produktion: Vergleichend HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=18/18, dargestellt sind die Werte \pm SEM, *p < 0.05 (Student's t test).

4.6 BESTIMMUNG DES MITOCHONDRIALEN MEMBRANPOTENTIAL

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde unter Verwendung von TMRE durchgeführt. Durch Co-Färbung mit MTG und der Bildung einer Ratio aus beiden Fluoreszenzfarbstoffen konnte eine quantitative Aussage über das gesamte Mitochondrien Netzwerk einer Zelle getroffen werden. Verglichen wurden wiederum HeLa-Kontrollzellen mit HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown. Die Serienbildaufnahme ausgewählter Zellen erfolgte jeweils nach Zugabe von Glucose, Oligomycin und FCCP.

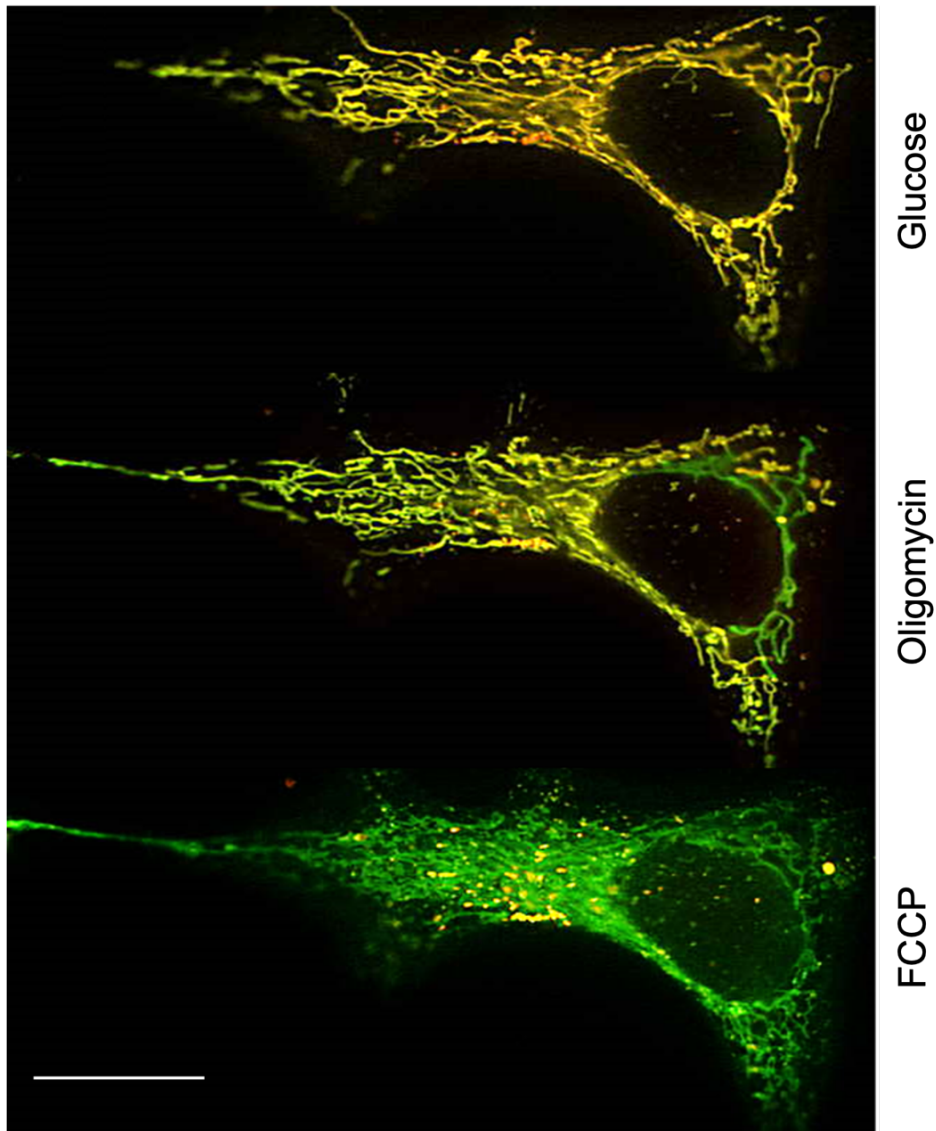


Abbildung 31: Exemplarische Darstellung einer HeLa-Kontrollzelle: Die Zelle wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen TMRE und MTG behandelt, exemplarisch sind aus der Serienaufnahme Bilder nach Zugabe von Glucose, Oligomycin und FCCP dargestellt, Maßstab 50 μm .

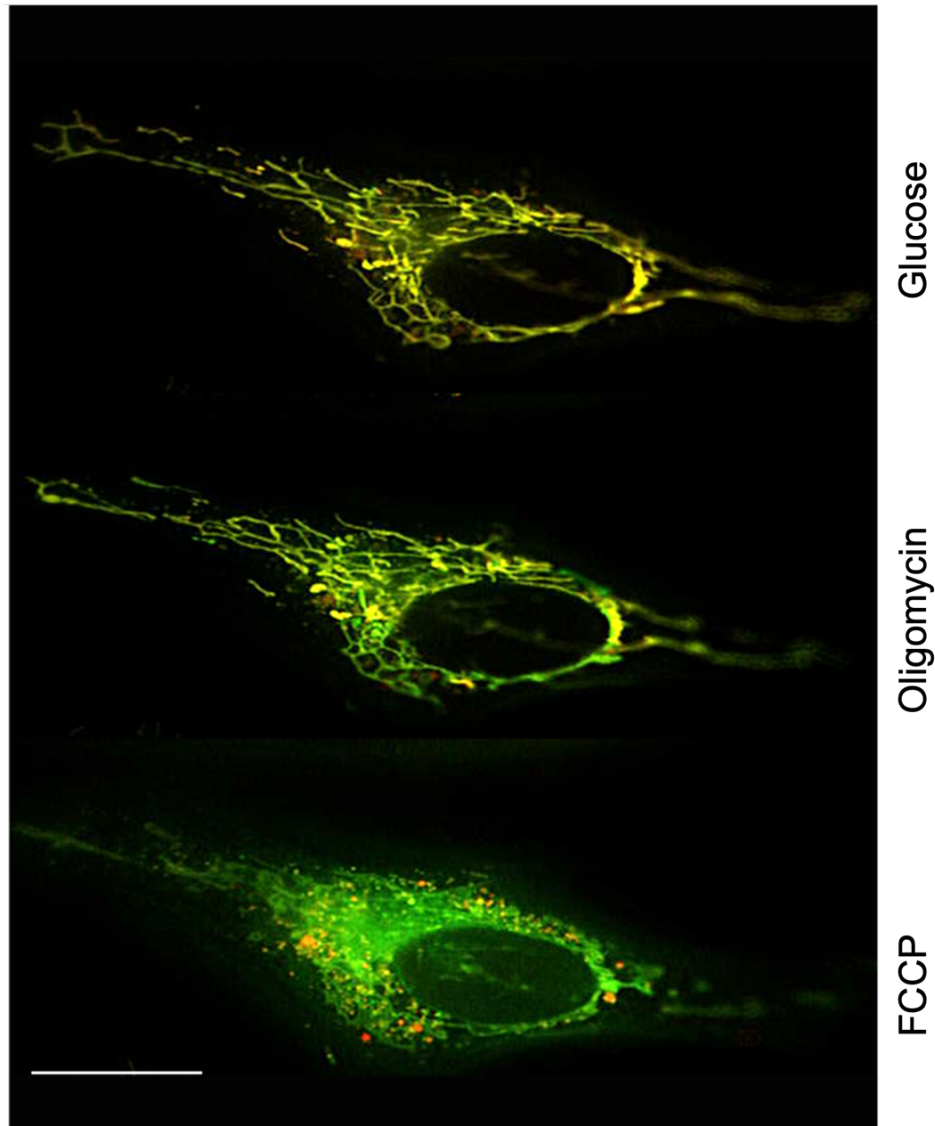


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung einer HeLa-Zelle nach Herunterregulation von Drp1: Die Zelle wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen TMRE und MTG behandelt, exemplarisch sind aus der Serienaufnahme Bilder nach Zugabe von Glucose, Oligomycin und FCCP dargestellt, Maßstab 50 μm .

In Gegenwart von Glucose zeigten HeLa-Zellen mit Drp1 Knockdown ein signifikant verringertes Membranpotential im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Hemmung der ATP-Synthase durch das Zuführen von Oligomycin führte in den HeLa-Kontrollzellen zu einer signifikanten Reduktion des Membranpotential. Im Vergleich zu HeLa-Zellen mit herabgesetztem Drp1 war das Membranpotential weiterhin signifikant höher. Das Entkoppeln der Atmungskette durch das Hinzufügen von FCCP resultierte in einem signifikant stärker verminderten Membranpotential in den HeLa-Kontrollzellen. Der Wert zeigte sich jedoch weiterhin signifikant höher als in den HeLa-Zellen mit herunterreguliertem Drp1. Dort ging der Wert gegen Null und war signifikant niedriger als in Gegenwart von Glucose.

Der Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen führte somit unter allen Bedingungen zu einem signifikant verringerten Membranpotential im Vergleich zu den HeLa-Kontrollzellen.

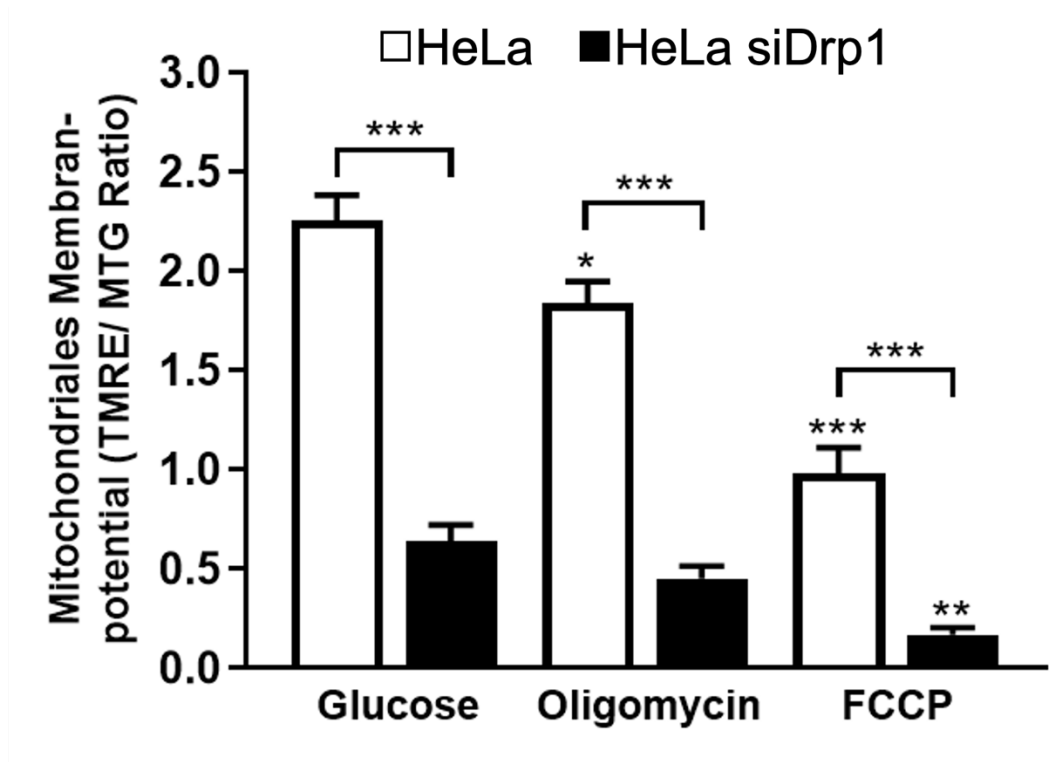


Abbildung 33: Mitochondriales Membranpotential: Vergleichend HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, nach Zugabe von Glucose, Oligomycin und FCCP, n=25/25, dargestellt sind die Werte \pm SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (ANOVA/Bonferroni's test).

4.7 SAUERSTOFFVERBRAUCH

Der Sauerstoffverbrauch in HeLa-Zellen wurde über eine Messküvette mit einem optischen Sensor bestimmt. Der Verbrauch wird als Abnahme des Sauerstoffgehalts pro Stunde dargestellt. Verglichen wurden HeLa-Zellen mit einem Drp1 Knockdown und HeLa-Kontrollzellen jeweils nach Zugabe von Glucose, Oligomycin und FCCP.

Das Herunterregulieren von Drp1 in HeLa-Zellen führte nach Zugabe von Glucose zu einem signifikant reduzierten O₂ Verbrauch im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das Hinzufügen von Oligomycin resultierte in einem vergleichbar geringeren Sauerstoffverbrauch in den HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown als auch in den Kontrollzellen, jeweils signifikant reduziert im Vergleich zum jeweiligen Zustand nach Glucose Zugabe. FCCP führte dagegen in den HeLa-Kontrollzellen zu einer weniger starken Verminderung des Sauerstoffverbrauchs als Oligomycin. In Zellen mit Knockdown von Drp1 führte die FCCP-Behandlung dagegen zum geringsten Sauerstoffverbrauch, so dass sich im Vergleich zu den Kontrollzellen ein signifikanter Unterschied ergab.

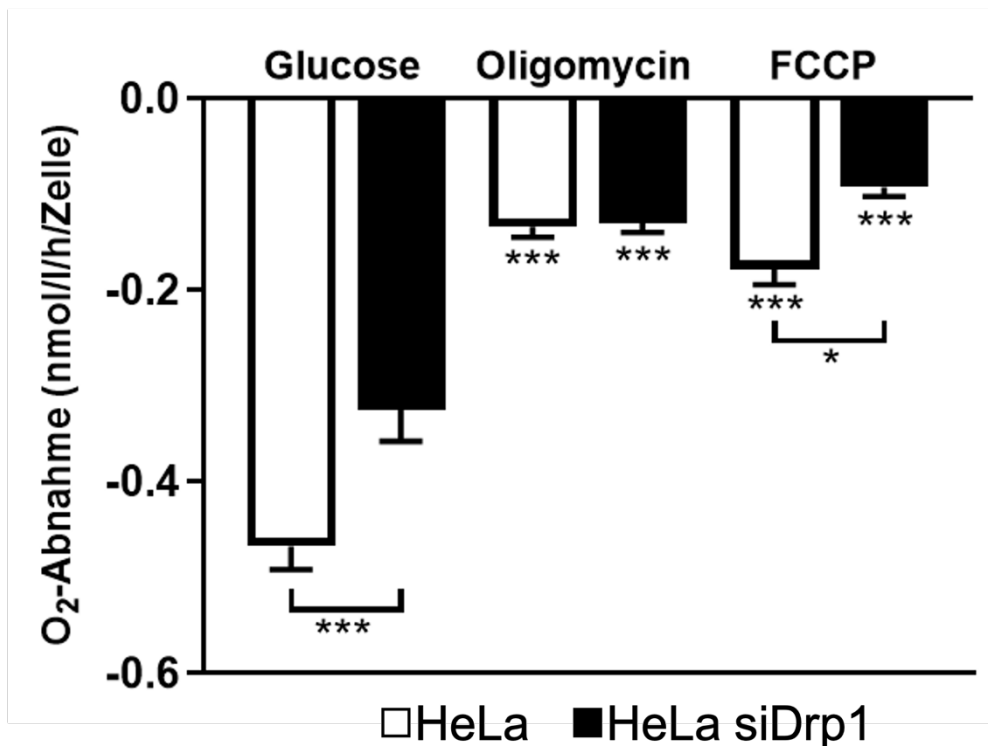


Abbildung 34: Sauerstoffverbrauch: Vergleichend HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown, n=16/8, dargestellt sind die Werte ± SEM, p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (ANOVA/Bonferroni's test).

V. DISKUSSION

Das mitochondriale Netzwerk unterliegt einer stetigen Dynamik durch Fusions- und Teilungsprozesse und passt sich den metabolischen Bedürfnissen der Zelle an. Die genauen Regulationsmechanismen und dessen Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel sind jedoch derzeit weitgehend unbekannt. Störungen in der Regulation werden neben der Proliferation von Tumorzellen auch mit anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht [58, 59].

Der Stoffwechsel von HeLa-Zellen weist im Gegensatz zu Primärzellen einen ausgeprägten Warburg Effekt auf. Die anaerobe Glykolyse zeigt sich in Tumorzellen deutlich erhöht, während nur ein kleiner Teil der ATP-Produktion auf die mitochondriale oxidative Phosphorylierung zurückzuführen ist [4, 10]. Die Mitochondrien in HeLa-Zellen bleiben dennoch für die Vitalität und die hohe Proliferationsrate unerlässlich. Die Optimierung der mitochondrialen Netzwerkstruktur zur Deckung des metabolischen Bedarfs ist daher auch in Tumorzellen wichtig [9, 159].

In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Drp1 auf die mitochondriale Struktur und den Stoffwechsel in HeLa-Zellen, einer etablierten Tumorzelllinie, untersucht. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Adelinde Uhrmacher (Visual and Analytic Computing, IEF, Universität Rostock) zur Erstellung eines Simulationsmodell genutzt.

5.1 GENEXPRESSIONSANALYSE UND ZELLVIABILITÄT

Die mitochondriale Netzwerkstruktur wird durch die kernkodierte Fusions- und Teilungsproteine Mfn1, Mfn2, OPA1, Fis1, Drp1, Mff und MID49/51 reguliert. Im physiologischen Zustand unterliegen Fusion und Teilung von Mitochondrien einem Gleichgewicht. Störungen der Genexpression einzelner Proteine gehen mit einer veränderten mitochondrialen Dynamik und damit einer Dysfunktion der Mitochondrien einher. Eine übermäßige Spaltung durch die Hochregulation von Drp1 und Fis1 wird mit der Tumorentstehung und Metastasierung in Verbindung gebracht [97, 98]. In den Zellen eines Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wurde eine Wachstumsförderung bei Drp1 Überexpression nachgewiesen [160].

Dagegen führt der Mangel an Drp1 in Zellen, durch eine ausbleibende Teilung, zu einer Verlängerung des mitochondrialen Netzwerkes und zur Clusterbildung [96]. Das vollständige Fehlen von Drp1 führt in Mäusen zu einem Absterben im frühen Embryonalstadium [131].

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung eines Drp1 Knockdowns in HeLa-Zellen untersucht. Das Herunterregulieren von Drp1 erfolgte durch Transfektion einer siRNA. Die durchgeführte Genexpressionsanalyse durch die Real-Time PCR zeigte in den HeLa-Zellen nach Transfektion eine signifikant verminderte Expression des Drp1 im Vergleich zur unbehandelten

Kontrollzelllinie. Neben dem Drp1 zeigte sich auch das Fis1 signifikant in den behandelten Zellen reduziert. Die weiteren untersuchten Fusions- und Teilungsproteine zeigten auf die Transfektion keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression. Die Ergebnisse bestätigen, dass Fis1 in HeLa-Zellen eine aktive Rolle im Spaltungsprozess besitzt [112]. Als Bindeprotein für Drp1 auf der äußeren Mitochondrienmembran scheint es auch über einen Feedback reguliert zu werden. In Studien wurden eine verminderte Drp1 Expression mit einem Verlust der mtDNA in Verbindung gebracht. Dies ging mit einer verminderten Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe und gesteigertem oxidativen Stress einher [161]. Die unveränderte Expression von Tfam deutet darauf hin, dass die mitochondriale Masse, bei den Experimenten dieser Studie jedoch unbeeinflusst bleibt [26, 162]. Das Herunterregulieren von Drp1 geht mit einer Verlangsamung des mitochondrialen Lebenszyklus einher. Dysfunktionale Mitochondrien werden schlechter aus den Zellen transportiert. Der Knockdown von Drp1 geht in der Zellviabilitätsmessung dieser Studie mit einer verminderten Lebensfähigkeit der HeLa-Zellen und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress einher. Dies steht im Einklang mit früheren Studien an HeLa-Zellen [162-164].

Die Verwendung von Mdivi als Inhibitor von Drp1 stellt einen interessanten Ansatz zur Verringerung der mitochondrialen Teilung und damit der Lebensfähigkeit von Tumorzellen dar [134-136]. Studien zeigen jedoch, dass Mdivi auch direkte Auswirkungen auf die oxidative Phosphorylierung hat und Drp1 damit nicht selektiv gehemmt werden kann [135]. Die in dieser Studie durchgeführte Herunterregulierung des Drp1 mit einer spezifischen Drp1-siRNA führte zu einer verminderten Proliferation. Bislang ist es nicht gelungen einen spezifischen Drp1-Inhibitor zu entwickeln. Der GTPase Inhibitor Dynasore hemmt Drp1 zwar ebenfalls, zeigt sich in seiner Wirkung jedoch noch unspezifischer als Mdivi, da er eine Vielzahl von GTPasen in der Zelle beeinflusst [165].

5.2 MITOCHONDRIALE MORPHOLOGIE

Das mitochondriale Netzwerk zeichnet sich durch ein Gleichgewicht zwischen ständig ablaufenden Fusions- und Teilungsprozesse aus. In Studien konnte gezeigt werden, dass Veränderungen der mitochondrialen Morphologie mit Funktionseinschränkungen in Zellen einhergehen [58, 59]. Kommt es zu einem Ungleichgewicht von Fusions- und Teilungsvorgängen führt dies zu einer Veränderung der mitochondrialen Morphologie. Eine verminderte Expression von Drp1 geht in Studien mit einer verminderten Teilung und einer verstärkten Fusion der Mitochondrien einher [96]. In dieser Studie wurde die mitochondriale Morphologie nach Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beurteilt. Die mitochondriale Netzwerkstruktur wurde dafür mit dem fluoreszierenden Mito Tracker Green gefärbt. Um objektive und quantifizierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, valide Bildanalysetechniken zu nutzen. In dieser Studie wurde das ImageJ erweiternde

MiNA-Tool und die Software Imaris verwendet. Während sich die lizenzierte Imaris Software zur Analyse von Fluoreszenzmikroskopiebildern weltweit etabliert hat, besticht das für ImageJ entwickelte MiNA-Tool insbesondere durch seinen Open-Source-Charakter. Die benutzerfreundlich gehaltene automatisierte Bildanalyse von MiNA eignet sich dabei für die in dieser Studie untersuchten Zellserienaufnahmen. Das Tool erkennt zuverlässig die mitochondrialen Strukturen und unterscheidet zwischen verzweigten Netzwerkstrukturen und einzeln auftretenden Punkten und Strängen. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen zu einer vermehrten mitochondrialen Verzweigung und Clusterbildung führt [166]. Die steigende Anzahl an mitochondrialen Netzwerken in HeLa-Zellen nach Drp1 Herunterregulation konnte durch das MiNA-Tool bestätigt werden. Die Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie zeigte darüber hinaus, dass der mitochondriale Lebenszyklus nicht vollständig unterbrochen ist. Die mitochondrialen Strukturen präsentierten sich, in der Zeitserienaufnahme von 20 Minuten, als nicht konstante Strukturen, sondern variierten im Laufe der Zeit. Fusion und Spaltungsvorgänge passen sich damit scheinbar dem Drp1 Knockdown Zustand an. Vereinzelt waren jedoch auch hyperfusionierte Mitochondrien zu finden. Zu erwähnen ist, dass sich das MiNA-Tool auf die Analyse von zweidimensionalen Bildern spezialisiert. Durch die lange Belichtungszeit während der Zellserienaufnahmen sind die Mitochondrien anfällig für Schäden und die Intensität des Fluoreszenzsignals nimmt ab. Das MiNA-Tool hat bei abnehmender Fluoreszenzintensität Schwierigkeiten die mitochondrialen Strukturen zutreffend einzuordnen. Für die Analyse der mitochondrialen Flächen wurde daher neben dem mitochondrialen „Footprint“ des MiNA-Tools die Software Imaris herangezogen. Hiermit konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass der Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Größenzunahme der Mitochondrien führt und es zu einer Clusterbildung von Mitochondrien kommt.

Ein mäßig, jedoch nicht stark fragmentiertes Netzwerk bietet die Möglichkeit, den notwendigen Funktionsraum für die im Zytoplasma und in den Mitochondrien ablaufenden Reaktionen zu schaffen [143, 159]. Ebenfalls können defekte Strukturen und Proteine durch Mitophagie schneller abgebaut werden. Eine stärkere mitochondriale Elongation, wie sie in den meisten Primärzellen zu finden ist und mit einem sehr effizienten oxidativen Stoffwechsel einhergeht, scheint für die Bedürfnisse einer schnell proliferierenden Tumorzelle weniger geeignet. Dies könnte auch damit in Verbindung stehen, dass der Fettsäureabbau, welcher in den Mitochondrien lokalisiert ist, nur vermindert stattfindet [164].

5.3 MEMBRANPOTENTIAL, ATP-SYNTHESE UND SAUERSTOFFVERBRAUCH

Das mitochondriale Membranpotential ist für die Stoffwechselprozesse in Zellen essentiell. Unter anderem reguliert es die Enzymaktivität in den Komplexen der Atmungskette und somit die ATP-Synthese. Auch die mitochondriale Fusion und die Mitophagie werden durch Potentialveränderungen kontrolliert [166]. Eine Störung des mitochondrialen Membranpotentials zeigt darüber hinaus Auswirkungen auf die Drp1 Rekrutierung bei Teilungsprozessen. Ist das mitochondriale Membranpotential verringert führt dies zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Die Aktivierung von Calcineurin führt zur Rekrutierung von Drp1 an die mitochondriale Oberfläche durch Dephosphorylierung [167, 168]. Depolarisierte Mitochondrien können nach Repolarisation erneut mit dem mitochondrialen Netzwerk fusionieren. Ein vermindertes Membranpotential kann über gesteigerten oxidativen Stress und mtDNA Mutationen zu einer Funktionseinschränkung der Mitochondrien führen. In dieser Studie erfolgte die Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRE. Das mitochondriale Membranpotential zeigte sich nach dem Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen signifikant reduziert. Es ist davon auszugehen, dass das verringerte mitochondriale Membranpotential wesentlich zur Einbuße der mitochondrialen Vitalität und des Stoffwechsels in HeLa-Zellen nach Drp1 Knockdown beiträgt.

Die Bestimmung der ATP- und ADP-Konzentration in den untersuchten HeLa-Zellen erfolgte mit dem „ATPlite Kit“ der Firma PerkinElmer®. In HeLa-Zellen zeigt sich nach dem Knockdown von Drp1 eine signifikant verminderte ATP-Konzentration. Dies steht in Einklang mit bestehenden Studien. Die Gesamtmenge des produzierten ATP nimmt durch das Herunterregulieren von Drp1 ab [9, 169]. In dieser Studie konnte weiterführend, durch die Verwendung des Sensorproteins Perceval und dem Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie, gezeigt werden, dass die reduzierte ATP-Gesamtkonzentration auf eine fast vollständige Abnahme der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen ist. HeLa-Zellen nach einem Knockdown von Drp1 konnten den Abfall der Gesamtmenge an ATP nur teilweise durch einen Anstieg der zytosolischen ATP-Synthese kompensieren. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, die eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Fettsäurespeicherung und -verwendung und eine Verringerung der Fettsäureoxidation in HeLa-Zellen durch siDrp1 Behandlung zeigte [164]. Es bleibt jedoch umstritten, welche metabolischen Veränderungen hinter der Umstellung der ATP-Erzeugung stehen.

Der Sauerstoffverbrauch der HeLa-Zellen wurde mit Hilfe des optischen Sensors MicroOptode der Firma Unisense gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen zu einem signifikant reduzierten Sauerstoffverbrauch nach Glucose Zuführung führt. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien, die ebenfalls einen reduzierten Sauerstoffverbrauch aufzeigten [9]. Durch das Entkoppeln der Atmungskette mit FCCP konnte

in dieser Arbeit weiterführend aufgezeigt werden, dass nicht nur das Membranpotential zusammenbricht, sondern auch der Sauerstoffverbrauch in siDrp1 behandelten HeLa-Zellen signifikant gegenüber den Kontrollzellen reduziert wird.

5.4 SIMULATIONSMODELL UND AUSBLICK

In Kooperation mit Philipp Henning aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Adelinde Uhrmacher (Visual and Analytic Computing, IEF, Universität Rostock) entstand ein Simulationsmodell (siehe Anhang) für die Modellierung der Glykolyse und des mitochondrialen Stoffwechsels von HeLa-Kontrollzellen und HeLa-Zellen nach Herunterregulieren von Drp1 unter Verwendung der in dieser Studie erhobenen Echtzeit ATP/ADP Messungen. Das Modell wurde in die drei Hauptabschnitte der Glykolyse, ATP-Investition, Oxidation und ATP-Gewinn unterteilt. Die Simulation und anschließende Sensitivitätsanalyse der gefitteten Parameter zeigte auf, dass ein schneller ATP-Umsatz ein wesentliches Kriterium für die Aufrechterhaltung der Tumorzellproliferation zu sein scheint. Darüber hinaus war es mittels des Modells möglich, die Entwicklungen von oxidiertem NAD und seiner reduzierten Form NADH über die Zeit zu betrachten, was experimentell nur schwer zu erreichen ist. Die Entstehung eines Gleichgewichts von NAD/NADH wird in der Literatur zunehmend als entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Proliferationsrate in Krebszellen diskutiert [10, 36, 40]. Der schnelle Austausch von NADH zu NAD führt zu einem Anstieg der glykolytischen Oxidation, verhindert die Anhäufung von Glycerinaldehyd-3-phosphat und hält letztlich die glykolytische Gesamtrate aufrecht. Mit dem Simulationsmodell lässt sich nachweisen, dass sich nach der Glukoseverabreichung in HeLa-Kontrollzellen ein Gleichgewicht von Glycerinaldehyd-3-phosphat einstellt. Die siDrp1 Behandlung und ein stärker fusioniertes Netzwerk führen im Modell zu einer Akkumulation von Glycerinaldehyd-3-phosphat. Dies könnte eine weitere Zunahme der glykolytischen ATP-Bildung begrenzen.

In der Literatur sind die Hauptreaktionen, die das NAD/NADH Verhältnis in Tumorzellen bestimmen, umstritten. Zum einen wird eine hohe Kapazität des Malat-Aspartat Shuttles postuliert [36, 170]. Durch den Aufbau des Malat-Aspartat Shuttles aus insgesamt vier verschiedenen Enzymen und zwei Antiport-Carriern scheint ein Einfluss dieser Struktur durch Veränderung des mitochondrialen Netzwerkes wahrscheinlich. In fusionierten Mitochondrien könnte es im Vergleich zu fragmentierten Mitochondrien zu einer verlängerten Shuttle-Zeit oder zur Einschränkung der lokalen Verfügbarkeit von Metaboliten und Enzymen kommen [134]. Darüber hinaus sind die Reaktionen des Malat-Aspartat Shuttles für mehrere andere Stoffwechselwege notwendig, so dass nicht unbedingt die gesamte Reaktionsfolge ablaufen muss, was zu einem Efflux von NAD/NADH in das Mitochondrium führt. Andererseits wird die Rolle des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes auf das zytosolische und mitochondriale NAD/NADH Verhältnis diskutiert [40, 171, 172]. Im kohlenhydratbasierten Stoffwechsel ist der

Pyruvatdehydrogenase-Komplex für die Nutzung von Pyruvat als Acetyl-CoA im Tricarbonsäurezyklus unerlässlich. Mit dem Simulationsmodell lässt sich aufzeigen, dass auch der Stoffwechsel von siDrp1 behandelten HeLa-Zellen von diesem Prozess abhängig ist. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass NADH für die oxidative Phosphorylierung nicht genutzt wird. Es ist denkbar, dass der Reaktionsweg mit der Bildung von Citrat endet, welches dann möglicherweise ins Zytosol transportiert wird. Die Aktivierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes könnte, wie bereits postuliert, zu einer Hemmung der Proliferation von Tumorzellen wie den HeLa-Zellen führen [40, 171]. In HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Thiamin Antimetabolit Oxythiamin eine zytotoxische Wirkung aufweist [173]. Es bleibt jedoch weiterhin experimentell nicht eindeutig geklärt, ob der Tricarbonsäurezyklus vollständig abläuft und wie die primäre Verwertung von mitochondrialem NADH erfolgt. In diesem Zusammenhang wäre eine Aktivierung einer oder mehrere der folgenden mitochondrialen Enzyme denkbar: Laktat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase oder Pyruvat-Carboxylase [36, 133, 164, 172]. Die vorliegende Arbeit liefert weitere Ansatzpunkte, die es sinnvoll erscheinen lassen, diese Aspekte in weiteren Studien genauer zu betrachten.

Die Modellierung von Zellvorgängen zeigt sich als eine interessante Möglichkeit, um verschiedene Hypothesen zu testen. Gewisse Einblicke in die zelluläre Dynamik, lassen sich nur schwer oder gar nicht im Labor beobachten. Die Weiterentwicklung und Ergänzung des Simulationsmodells um den Aspekt der mitochondrialen Fusions- und Teilungsprozesse, könnte in Zukunft weitere Erkenntnisse bringen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und das entstandene Simulationsmodell bestätigen Otto Warburgs Aussage, dass die Energiegewinnung in Tumorzellen trotz des verfügbaren Sauerstoffs hauptsächlich über die Glykolyse erfolgt. Sie stützen zudem wesentlich die vorherrschende Ansicht, dass die Meinung Otto Warburgs dahingehend zu korrigieren ist, dass diese Umstellung nicht auf eine irreversible Schädigung der Mitochondrien zurückzuführen ist. Diese Studie belegt, dass die Mitochondrien und ihre Netzwerkstruktur für die Lebensfähigkeit in HeLa-Zellen essentiell sind. Ein stärker fusioniertes Netzwerk, wie es durch die Hemmung von Drp1 in HeLa-Zellen erreicht wurde, kann die Proliferation der Zellen verringern. Die Entwicklung eines selektiven Drp1 Inhibitor, der mit Mdivi1 noch nicht zur Verfügung steht, scheint auf Basis der vorgelegten Ergebnisse für den Einsatz in der Krebstherapie von Interesse sein.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

HeLa-Zellen sind eine gut etablierte Tumorzelllinie, die bereits erfolgreich zur Erforschung des mitochondrialen Lebenszyklus verwendet wurde. Im Gegensatz zu Primärzellen oder spezialisierten Zelllinien weist der Stoffwechsel einen ausgeprägten Warburg-Effekt auf. Während die anaerobe Glykolyse deutlich erhöht ist, erfolgt nur ein kleiner Teil der ATP-Produktion durch mitochondriale oxidative Phosphorylierung [4, 10]. Obwohl die anaerobe Glykolyse eine ineffiziente Methode zur Erzeugung von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) ist, bleibt unklar, warum diese die Proliferation in Tumorzellen begünstigt und wodurch es zu dieser Form der Stoffwechseladaptation kommt, bei der der Fettsäureabbau eine untergeordnete Rolle spielt. [5, 53, 54].

Mitochondrien befinden sich in einem Netzwerk, welches sich dynamisch regeneriert und an die metabolischen Bedürfnisse der Zelle anpasst. Diese koordinierten Vorgänge werden Fusions- und Teilungsprozesse genannt. Die Proteine Mfn1/2 und Opa1 vermitteln die mitochondriale Fusion, während der Spaltungsprozess hauptsächlich durch das Dynamin-verwandte Protein (Drp1) gesteuert wird. Fis1, MID51 und Mff sind weitere für das Andocken an die Membran, erforderliche Proteine der Teilung. Eine Veränderung der Expression einzelner Proteine stört die mitochondriale Dynamik und wird mit unterschiedlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Stoffwechselkrankheiten, Krebs und neurodegenerative Erkrankungen [58, 59].

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Drp1 auf die mitochondriale Struktur und den Stoffwechsel in HeLa-Zellen zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass der siRNA Knockdown von Drp1 in HeLa-Zellen zu einer weiterhin dynamischen, jedoch verzweigten mitochondrialen Netzwerkstruktur mit verstärkter Clusterbildung führt. Das Herunterregulieren von Drp1 beeinflusste den mitochondrialen Stoffwechsel der HeLa-Zellen durch ein reduziertes Membranpotential und eine Abnahme der ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung. Es resultierte in den mit Drp1 siRNA behandelten HeLa-Zellen ein reduzierter Sauerstoffverbrauch. Dieser Effekt konnte nicht durch eine weitere Steigerung der Glykolyse kompensiert werden. Die durchgeführte Studie ergänzt bestehende Forschungsergebnisse, die darauf hindeuten, dass ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk in Tumorzellen die Proliferation begünstigt. Diese war in siDrp1 behandelten HeLa-Zellen mit elongierten Mitochondrien signifikant reduziert. Mittels des Fluoreszenzensors Perceval erfolgte in dieser Studie erstmals eine Echtzeitanalyse des ATP/ADP Verlaufs in HeLa-Zellen vor und nach siDrp1 Behandlung. Diese Ergebnisse konnten in einem Simulationsmodell genutzt werden, um auch den NAD/NADH Verlauf in den Zellen vorherzusagen. Hierdurch zeigte sich, dass der Drp1 Knockdown zu einer Verarmung der HeLa-Zellen an NAD führt. Dies erklärt die fehlende Steigerungsrate der anaeroben Glykolyse. Anders als von Otto Warburg postuliert, sind die Adaptationsvorgänge des

Kohlenhydratstoffwechsels somit in Tumorzellen nicht auf eine irreversible Schädigung der Mitochondrien zurückzuführen. Vielmehr spielen mitochondriale Adaptationsvorgänge eine wichtige Rolle. Damit steht die vorgelegte Arbeit in Einklang mit der sich aktuell bildenden Meinung. Die Untersuchungen zeigen weiterführend auf, dass die Entwicklung eines selektiven Drp1 Inhibitor für den Einsatz in der antiproliferativen Therapie von Krebserkrankungen in Frage kommen könnte. Hierzu könnten auch die Ergänzung und Weiterentwicklung des bestehenden Simulationsmodells beitragen.

VII. THESEN

1. Otto Warburgs Hypothese, dass die Umstellung auf eine Energiegewinnung über die Glykolyse in Tumorzellen auf eine irreversible Schädigung von Mitochondrien zurückzuführen ist, muss in Frage gestellt werden.
2. Die Tumorzelllinie HeLa eignet sich zur Analyse der mitochondrialen Netzwerkstruktur.
3. Das mitochondriale Netzwerk in HeLa-Zellen ist im Vergleich zu vielen Primärzellen tendenziell fragmentiert, so dass Teilungsprozesse, die wesentlich über die GTPase Drp1 vermittelt werden, im Vordergrund stehen.
4. Eine Herunterregulation von Drp1 in HeLa-Zellen führt zu einem elongierten mitochondrialen Netzwerk mit einer Tendenz zur Clusterbildung.
5. Eine quantitative Bilddatenauswertung von fluoreszenzmikroskopischen Serienaufnahmen belegt, dass das mitochondriale Netzwerk auch in HeLa-Zellen und nach siDrp1 Behandlung dynamisch ist.
6. Die mitochondriale Elongation durch Drp1 Knockdown korreliert mit einer reduzierten Viabilität in HeLa-Zellen.
7. Der Knockdown von Drp1 resultiert in HeLa-Zellen in einem verminderten mitochondrialen Membranpotential, einer reduzierten mitochondrialen ATP-Synthese und einem verminderten Sauerstoffverbrauch.
8. HeLa-Zellen mit einer Herunterregulation von Drp1 können ihre ATP-Synthese über die Glykolyse nur tendenziell steigern und den Verlust der mitochondrialen Bildung darüber nicht kompensieren.
9. Mittels des Fluoreszenzsensors Perceval kann der ATP/ADP Verlaufs in HeLa-Zellen und solchen nach siDrp1 Behandlung beurteilt werden. Die Verwendung der Ergebnisse in einem Simulationsmodell ermöglicht die Beschreibung des NAD/NADH Verlaufs in den Zellen.
10. Der Knockdown von Drp1 beeinflusst die Glykolyse in HeLa-Zellen durch die Abnahme von NAD und die Akkumulation von Glycerinaldehyd-3-phosphat.
11. Störungen der mitochondrialen Dynamik und Veränderungen in der Drp1 Expression spielen eine entscheidende Rolle in Tumorzellen und könnten zukünftig als therapeutische Zielstruktur fungieren.

VIII. ANHANG

Pronounced mitochondrial elongation in a human cancer cell line evoked reduced viability by NADH accumulation

Reaktionen und entsprechende Ratenkoeffizienten des Modells:

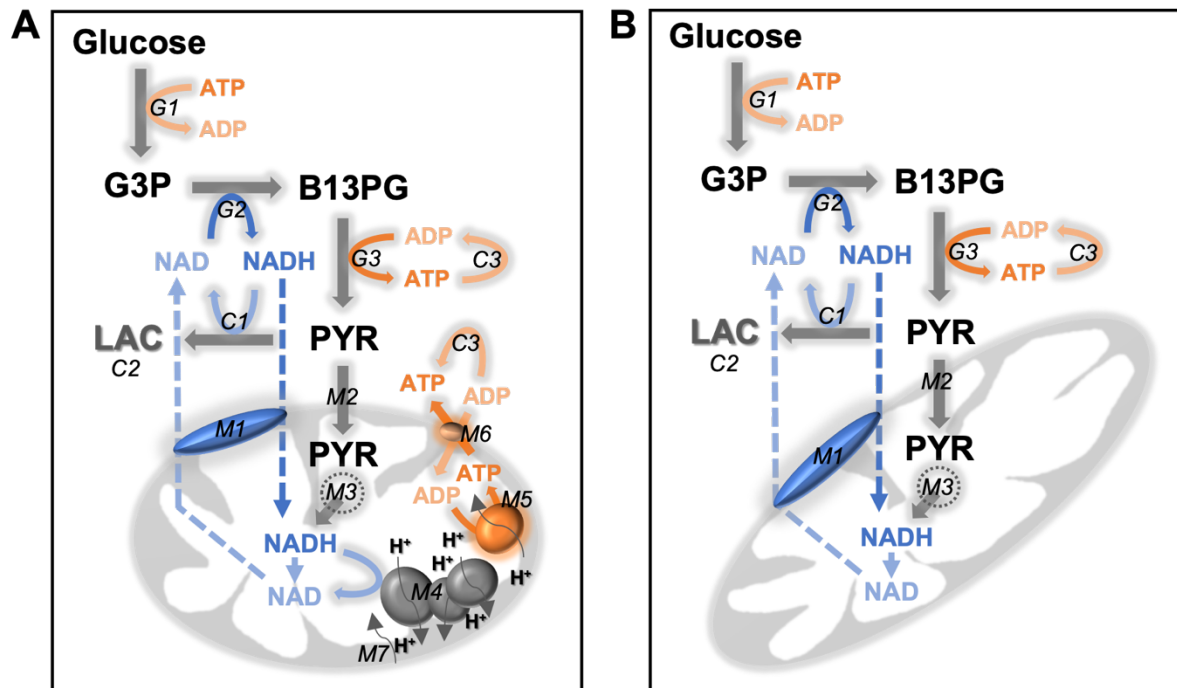
G1: GLC + 2 ATP_c -> 2 G3P + 2 ADP_c			M1: NADH_c+NAD_m+k*NADH_c <-> NAD_c+NADH_m+k*NAD_c		
k _{g1}	4.78314 mmol/l*s	fit	$k = \frac{k_{m1.2} \cdot \left(\frac{NADH_c}{NAD_c}\right)}{k_{m1.1} \cdot \left(\frac{NADH_c}{NAD_c} - \frac{NADH_m}{NAD_m}\right)}$		
K _{glc}	0.1 mmol/l	[155]			
K _{atp}	60.2437 mmol/l	fit	k _{m1.1}	10 ³ mmol/l*s	set
K _{g3p}	0.51 mmol/l	[155]	k _{m1.2}	0.000242257 mmol/l*s	fit
K _{adp}	0.268809mmol/l	fit	M2: PYR_c -> PYR_m		
K _{i,atp}	0.536616 mmol/l	fit	k _{m2}	10 ⁻⁸ 1/s	set
G2: G3P + NAD_c <-> B13PG + NADH_c			M3: PYR_m + 3 NAD_m -> 3 NADH_m		
k _{g2f}	1.42918 mmol/l*s	fit	k _{m3}	0.157615 mmol/l*s	fit
k _{g2r}	0.536541 mmol/l*s	fit	k _{pyr}	0.0181845 mmol/l	fit
K _{g3p}	0.19 mmol/l	[155]	k _{nad}	8.89469 mmol/l	fit
K _{nad}	0.09 mmol/l	[155]	M4: NADH_m + 10 H⁺ -> NAD_m		
K _{b13pg}	0.022 mmol/l	[155]	k _{m4}	9.5675*10 ⁻⁶ mmol/l	fit
K _{nadh}	0.01 mmol/l	[155]	K _{res}	1.35*10 ¹⁸	[148]
G3: B13PG + 2 ADP_c -> PYR_c + 2 ATP_c			g	0.85	[148]
k _{g3}	425251 mmol/l*s	fit	dψ	0.05 V	[148]
K _{b13pg}	0.079 mmol/l	[155]	ra	6.394*10 ⁻¹⁰ 1/s	[148]
K _{adp}	0.455836 mmol/l	fit	rb	1.762*10 ⁻¹³ 1/s	[148]
K _{pyr}	10 mmol/l	[155]	r1	2.077*10 ⁻¹⁸	[148]
K _{atp}	8.88571 mmol/l	fit	r2	1.728*10 ⁻⁹	[148]
K _{i,atp}	21.8615 mmol/l	fit	r3	1.059*10 ⁻²⁶	[148]
C1: PYP_c + NADH_c -> LAC + NAD_c			M5: ADP_m + 3 H⁺ -> ATP_m		
k _{c1}	1.03596 mmol/l*s	fit	k _{m5}	0.169739 l/(s*mmol)	fit
K _{pyr}	0.3 mmol/l	[155]	G _{0,ATP}	36030 J/mol	[147]
K _{nadh}	0.002 mmol/l	[155]	n _A	3	[147]
K _{lac}	4.7 mmol/l	[155]	K _{MgADP}	0.347 mmol/l	[147]
K _{nad}	0.07 mmol/l	[155]	K _{MgATP}	0.024 mmol/l	[147]
C2: LAC -> 0			Pi	20 mmol/l	[148]
k _{c2}	0.0419039 1/s	fit	M6: ATP_m + ADP_c <-> ATP_c + ADP_m		
LAC ₀	33 mmol/l	[155]	k _{m6}	1.49104*10 ⁻⁶ mmol/s	fit
C3: ATP_c -> ADP_c			K _{mADP}	0.0035 mmol/l	[148]
k _{c3}	0.801586 mmol/l*s	fit	M7: H⁺ -> 0		
K _{atp}	5.93715 mmol/l	fit	k ₇	0.0001 mmol/(l*s)	fit
			k _{7,new}	0.009995982293 mmol/(l*s)	fit
			b _{leak}	1.05	[146]

Sensitivität der Anpassungsparameter:

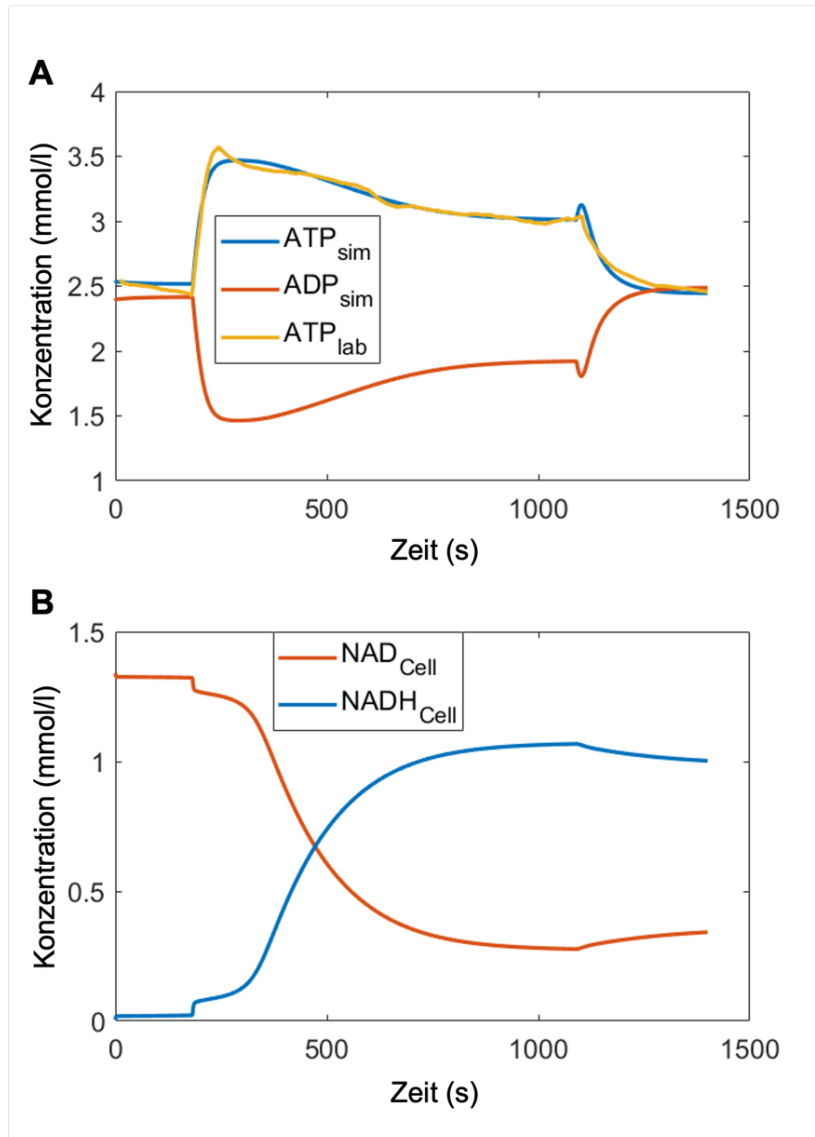
Sensitivität vor (t =1000 s) und nach (t =1400 s) Zugabe von FCCP im siDrp1- und Kontroll-HeLa-Zellmodell. Positive (grün) bzw. negative (rot) Werte, sowie Unterschiede zwischen den Modellen (Kasten) sind markiert. Sie zeigen Abhängigkeiten von den gefitteten Parametern auf.

Parameter	siDrp1		Control	
	t = 1000 s	t = 1400 s	t = 1000 s	t = 1400 s
G1: k_{g1}	0.0714741	0.173082	0.161024	0.160142
G1: K_{atp}	-0.0605346	-0.172832	-0.115026	-0.160403
G1: K_{adp}	0.0344361	0.0236162	0.00435826	0.000807681
G1: $K_{i,atp}$	0.0698509	0.027732	0.15776	0.0233454
G2: k_{g2f}	0.104719	0.0273472	0.00459964	0.000821312
G2: k_{g2r}	-0.000106295	-0.000186898	1.17E-08	-0.00016137
G3: k_{g3}	-2.92E-05	0.000652062	1.13E-07	0.000135861
G3: K_{adp}	-2.03E-05	-0.000257026	-7.98E-07	-0.000174451
G3: K_{atp}	0.000118705	-0.000162565	1.30E-07	-0.00016185
G3: $K_{i,atp}$	7.40E-06	-0.00025989	1.90E-08	-0.000161357
C1: k_{c1}	0.0352029	0.00932003	-0.033423	-0.0512785
C2: k_{c2}	0.000354469	-0.000223826	-0.00103011	-0.000494139
C3: k_{c3}	-0.211378	-0.215351	-0.238116	-0.214976
C3: K_{atp}	1.02313	1.06576	1.03973	1.04448
M1: k_{help}	0.0503467	0.0150708	-8.68E-06	-0.000174014
M3: k_{m3}	-0.0803338	-0.0114565	0.00737082	0.0409983
M3: K_{pyr}	0.0348123	0.00836241	-2.55E-05	-0.000290564
M3: K_{nad}	0.0779633	0.0123446	-0.00675586	-0.0375974
M4: k_{m4}			0.0988868	0.125897
M5: k_{m5}			0.00019419	0.0326802
M6: k_{m6}			-2.96E-09	-0.000156205
M7: k_7			-0.00057482	-0.000193785
M7: $k_{7,new}$			0	-0.09607099

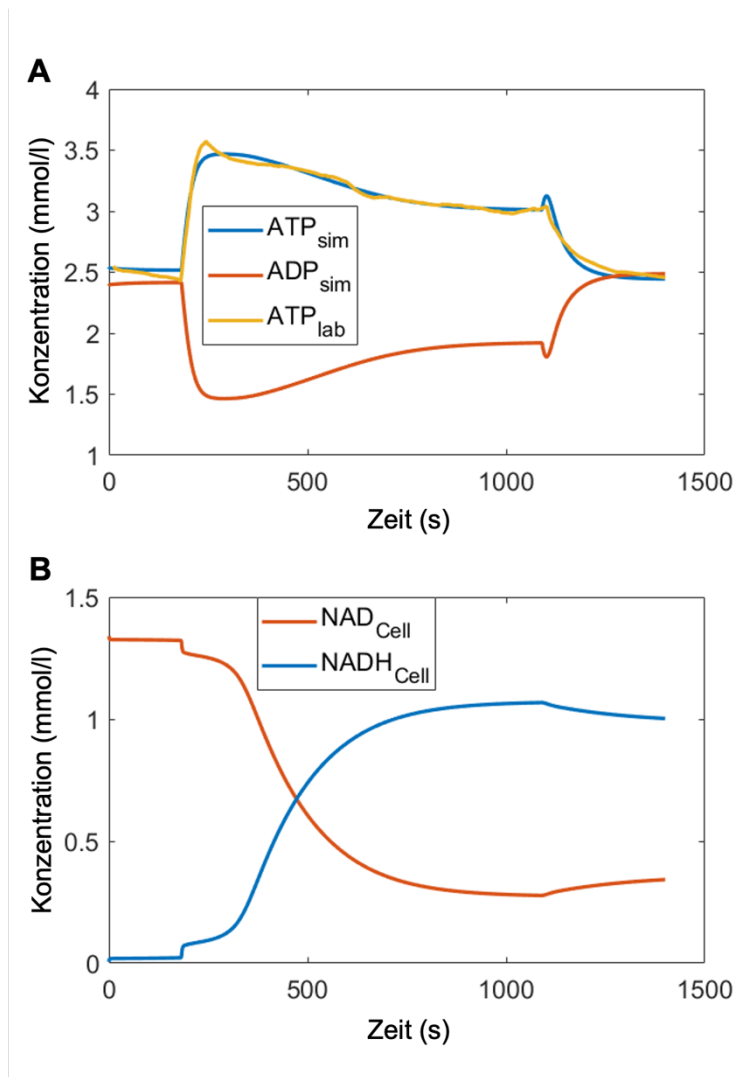
Schematische Darstellung des Simulationsmodells: Das Modell umfasst eine reduzierte Form der Glykolyse und die Stoffwechselprozesse in den Mitochondrien. Die linke Übersicht zeigt das Modell der HeLa-Kontrollzellen. Die rechte Übersicht zeigt das Modell der HeLa-Zellen nach Knockdown von Drp1. G3P=Glycerin-3-phosphat, B13PG=1,3-Bisphosphoglycerat, PYR=Pyruvat, LAC=Lactat



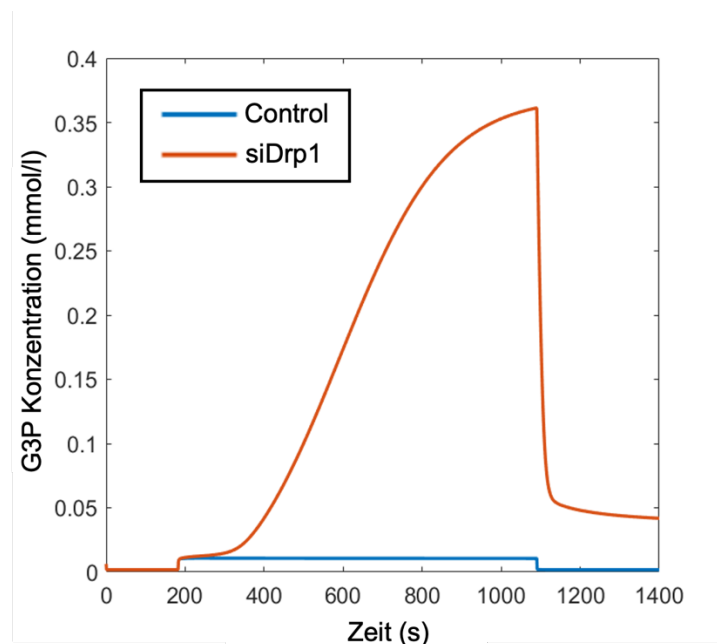
Simulationskurven der ATP/ADP- und NAD/NADH-Konzentration in HeLa-Kontrollzellen:



Simulationskurven der ATP/ADP- und NAD/NADH-Konzentration in HeLa-Zellen nach Herunterregulation von Drp1:



Simulationskurven der G3P Konzentration:



IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Skloot, R., *The immortal life of Henrietta Lacks*. 2017: Broadway Paperbacks.
2. Lucey, B.P., W.A. Nelson-Rees, and G.M. Hutchins, *Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination*. Archives of pathology & laboratory medicine, 2009. **133**(9): p. 1463-1467.
3. Brown, R.W. and J.H.M. Henderson, *The Mass Production and Distribution of HeLa Cells at Tuskegee Institute, 1953–55*. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 1983. **38**(4): p. 415-431.
4. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The metabolism of tumors in the body*. The Journal of general physiology, 1927. **8**(6): p. 519.
5. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends in Biochemical Sciences, 2016. **41**(3): p. 211-218.
6. Luo, Y., J. Ma, and W. Lu, *The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
7. Srinivasan, S., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2017. **1858**(8): p. 602-614.
8. Hsu, C.C., L.M. Tseng, and H.C. Lee, *Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(12): p. 1281-95.
9. Benard, G., et al., *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 838-48.
10. Kim, S.Y., *Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory*. Biomol Ther (Seoul), 2018. **26**(1): p. 39-44.
11. Archibald, J.M., *Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution*. Curr Biol, 2015. **25**(19): p. R911-21.
12. Galluzzi, L., et al., *Mitochondrial control of cellular life, stress, and death*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1198-207.
13. Andrieux, P., et al., *Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(21).
14. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-465.
15. Chen, X.J. and R.A. Butow, *The organization and inheritance of the mitochondrial genome*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(11): p. 815-25.
16. Sutovsky, P., et al., *Ubiquitin tag for sperm mitochondria*. Nature, 1999. **402**(6760): p. 371-2.
17. Luo, S., et al., *Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(51): p. 13039-13044.
18. Bandelt, H.J., et al., *More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA?* J Med Genet, 2005. **42**(12): p. 957-60.
19. Satoh, M. and T. Kuroiwa, *Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell*. Exp Cell Res, 1991. **196**(1): p. 137-40.
20. Welter, C., et al., *Alteration of mitochondrial DNA in human oncocyotomas*. Genes Chromosomes Cancer, 1989. **1**(1): p. 79-82.
21. Bianchi, M.S., N.O. Bianchi, and G. Bailliet, *Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients*. Cytogenet Cell Genet, 1995. **71**(1): p. 99-103.
22. Alonso, A., et al., *Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis*. Electrophoresis, 1997. **18**(5): p. 682-5.
23. Zuo, L., T. Zhou, and C.-C. Chuang, *The Consequences of Damaged Mitochondrial DNA*, in *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease*, L.M. Buhlman, Editor. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 49-61.

24. Ballinger, S.W., et al., *Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion*. Nature genetics, 1992. **1**(1): p. 11-15.
 25. Kadowaki, T., et al., *A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA*. New England Journal of Medicine, 1994. **330**(14): p. 962-968.
 26. Larsson, N.-G., et al., *Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice*. Nature genetics, 1998. **18**(3): p. 231-236.
 27. Campbell, C.T., J.E. Kolesar, and B.A. Kaufman, *Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1819**(9-10): p. 921-9.
 28. D'Erchia, A.M., et al., *Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity*. Mitochondrion, 2015. **20**: p. 13-21.
 29. Wang, Y.E., et al., *Genome-wide analysis reveals coating of the mitochondrial genome by TFAM*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e74513.
 30. Chakrabarty, S., et al., *Upregulation of TFAM and mitochondria copy number in human lymphoblastoid cells*. Mitochondrion, 2014. **15**: p. 52-8.
 31. Farge, G., et al., *In vitro-reconstituted nucleoids can block mitochondrial DNA replication and transcription*. Cell Rep, 2014. **8**(1): p. 66-74.
 32. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 113-118.
 33. Puigserver, P. and B.M. Spiegelman, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator*. Endocr Rev, 2003. **24**(1): p. 78-90.
 34. Smith, A.L.M., J.C. Whitehall, and L.C. Greaves, *Mitochondrial DNA mutations in ageing and cancer*. Mol Oncol, 2022. **16**(18): p. 3276-3294.
 35. Bastos, M.T., et al., *Methotrexate: studies on cellular metabolism. IV. Effect on the mitochondrial oxidation of cytosolic-reducing equivalents in HeLa cells*. Cell Biochem Funct, 1990. **8**(4): p. 199-203.
 36. Altinok, O., et al., *Malate-aspartate shuttle promotes l-lactate oxidation in mitochondria*. J Cell Physiol, 2020. **235**(3): p. 2569-2581.
 37. Borst, P., *The malate-aspartate shuttle (Borst cycle): How it started and developed into a major metabolic pathway*. IUBMB Life, 2020. **72**(11): p. 2241-2259.
 38. Bonnefoy, N. and T.D. Fox, *Genetic transformation of Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. Methods Enzymol, 2002. **350**: p. 97-111.
 39. Barrientos, A., et al., *Cytochrome oxidase in health and disease*. Gene, 2002. **286**(1): p. 53-63.
 40. Luengo, A., et al., *Increased demand for NAD(+) relative to ATP drives aerobic glycolysis*. Mol Cell, 2021. **81**(4): p. 691-707 e6.
 41. Wu, Z., W.S. Ho, and R. Lu, *Targeting Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Glioblastoma Therapy*. Neuromolecular Med, 2022. **24**(1): p. 18-22.
 42. Warburg, O., *On the Origin of Cancer Cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-314.
 43. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
 44. Enzo, E., et al., *Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity*. The EMBO journal, 2015. **34**(10): p. 1349-1370.
 45. Xiang, J., et al., *TCF7L2 positively regulates aerobic glycolysis via the EGLN2/HIF-1 α axis and indicates prognosis in pancreatic cancer*. Cell death & disease, 2018. **9**(3): p. 1-14.
 46. Yuan, L.-W., H. Yamashita, and Y. Seto, *Glucose metabolism in gastric cancer: The cutting-edge*. World Journal of Gastroenterology, 2016. **22**(6): p. 2046.
 47. Gwangwa, M.V., A.M. Joubert, and M.H. Visagie, *Crosstalk between the Warburg effect, redox regulation and autophagy induction in tumourigenesis*. Cellular & molecular biology letters, 2018. **23**(1): p. 1-19.
 48. Yin, P.-H., et al., *Somatic mutations of mitochondrial genome in hepatocellular carcinoma*. Mitochondrion, 2010. **10**(2): p. 174-182.
-

49. Hsu, C.C., H.C. Lee, and Y.H. Wei, *Mitochondrial DNA alterations and mitochondrial dysfunction in the progression of hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(47): p. 8880-6.
 50. Ganapathy-Kanniappan, S., *Linking tumor glycolysis and immune evasion in cancer: Emerging concepts and therapeutic opportunities*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2017. **1868**(1): p. 212-220.
 51. Yang, D.Q., et al., *Measuring relative utilization of aerobic glycolysis in breast cancer cells by positional isotopic discrimination*. FEBS letters, 2016. **590**(18): p. 3179-3187.
 52. Batra, S., et al., *Cancer metabolism as a therapeutic target*. Oncology (Williston Park), 2013. **27**(5): p. 460-7.
 53. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
 54. Kim, S.H. and K.H. Baek, *Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12).
 55. Ishihara, T., H. Kohno, and N. Ishihara, *Physiological roles of mitochondrial fission in cultured cells and mouse development*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1350**: p. 77-81.
 56. Youle, R.J. and A.M. Van Der Bliek, *Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-1065.
 57. Baltrusch, S., *Mitochondrial network regulation and its potential interference with inflammatory signals in pancreatic beta cells*. Diabetologia, 2016. **59**(4): p. 683-7.
 58. Chan, D.C., *Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease*. Annu Rev Pathol, 2020. **15**: p. 235-259.
 59. Vásquez-Trincado, C., et al., *Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease*. J Physiol, 2016. **594**(3): p. 509-25.
 60. Catlett, N.L. and L.S. Weisman, *Divide and multiply: organelle partitioning in yeast*. Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**(4): p. 509-516.
 61. Labbé, K., A. Murley, and J. Nunnari, *Determinants and functions of mitochondrial behavior*. Annual review of cell and developmental biology, 2014. **30**: p. 357-391.
 62. Malka, F., et al., *Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes*. EMBO Rep, 2005. **6**(9): p. 853-9.
 63. Cipolat, S., et al., *OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(45): p. 15927-15932.
 64. Song, Z., et al., *Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion*. Molecular biology of the cell, 2009. **20**(15): p. 3525-3532.
 65. Praefcke, G.J. and H.T. McMahon, *The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? Nature reviews Molecular cell biology*, 2004. **5**(2): p. 133-147.
 66. Meeusen, S., J.M. McCaffery, and J. Nunnari, *Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro*. Science, 2004. **305**(5691): p. 1747-52.
 67. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. The Journal of cell biology, 2003. **160**(2): p. 189-200.
 68. Eura, Y., et al., *Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion*. Journal of biochemistry, 2003. **134**(3): p. 333-344.
 69. Ishihara, N., Y. Eura, and K. Mihara, *Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity*. Journal of cell science, 2004. **117**(26): p. 6535-6546.
 70. Bertholet, A., et al., *Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity*. Neurobiology of disease, 2016. **90**: p. 3-19.
 71. De Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature, 2008. **456**(7222): p. 605-610.
 72. Santel, A. and M.T. Fuller, *Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin*. Journal of cell science, 2001. **114**(5): p. 867-874.
-

73. Verhoeven, K., et al., *MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot–Marie–Tooth type 2*. Brain, 2006. **129**(8): p. 2093-2102.
 74. Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan, *Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26185-92.
 75. Rojo, M., et al., *Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 8): p. 1663-74.
 76. Koshiba, T., et al., *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science, 2004. **305**(5685): p. 858-62.
 77. Alexander, C., et al., *OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28*. Nature genetics, 2000. **26**(2): p. 211-215.
 78. Carelli, V., et al., *Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA 1 missense mutations*. Annals of neurology, 2015. **78**(1): p. 21-38.
 79. Cipolat, S., et al., *Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling*. Cell, 2006. **126**(1): p. 163-75.
 80. Cogliati, S., et al., *Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency*. Cell, 2013. **155**(1): p. 160-71.
 81. Delettre, C., et al., *Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 207-10.
 82. Olichon, A., et al., *The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space*. FEBS Lett, 2002. **523**(1-3): p. 171-6.
 83. Olichon, A., et al., *OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis*. Cell Death & Differentiation, 2007. **14**(4): p. 682-692.
 84. Del Dotto, V., et al., *Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2018. **1859**(4): p. 263-269.
 85. Lee, H., S.B. Smith, and Y. Yoon, *The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(17): p. 7115-7130.
 86. MacVicar, T. and T. Langer, *OPA1 processing in cell death and disease—the long and short of it*. Journal of cell science, 2016. **129**(12): p. 2297-2306.
 87. Anand, R., et al., *The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission*. Journal of Cell Biology, 2014. **204**(6): p. 919-929.
 88. Marín-García, J. and A.T. Akhmedov, *Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure*. Heart Fail Rev, 2016. **21**(2): p. 123-36.
 89. Liu, Y.J., et al., *Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease*. Mechanisms of Ageing and Development, 2020. **186**: p. 111212.
 90. Sabouny, R. and T.E. Shutt, *Reciprocal regulation of mitochondrial fission and fusion*. Trends in biochemical sciences, 2020. **45**(7): p. 564-577.
 91. Friedman, J.R., et al., *ER tubules mark sites of mitochondrial division*. Science, 2011. **334**(6054): p. 358-362.
 92. Kleele, T., et al., *Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis*. Nature, 2021. **593**(7859): p. 435-439.
 93. Westermann, B., *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nature reviews Molecular cell biology, 2010. **11**(12): p. 872-884.
 94. Liesa, M. and O.S. Shirihai, *Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure*. Cell metabolism, 2013. **17**(4): p. 491-506.
 95. Wai, T. and T. Langer, *Mitochondrial dynamics and metabolic regulation*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2016. **27**(2): p. 105-117.
 96. Yoon, Y., et al., *The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5409-20.
-

97. Huang, Q., et al., *Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFKB and TP53 pathways*. *Autophagy*, 2016. **12**(6): p. 999-1014.
 98. Maycotte, P., et al., *Mitochondrial dynamics and cancer*. *Tumor Biology*, 2017. **39**(5): p. 1010428317698391.
 99. Tondera, D., et al., *The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells*. *Journal of cell science*, 2005. **118**(14): p. 3049-3059.
 100. Westermann, B., *Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(20): p. 13501-5.
 101. Liesa, M., M. Palacín, and A. Zorzano, *Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(3): p. 799-845.
 102. Chen, H. and D.C. Chan, *Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14 Spec No. 2**: p. R283-9.
 103. Jofuku, A., N. Ishihara, and K. Mihara, *Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(2): p. 650-9.
 104. Dohm, J.A., et al., *Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold*. *Proteins*, 2004. **54**(1): p. 153-6.
 105. Suzuki, M., et al., *The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle*. *J Mol Biol*, 2003. **334**(3): p. 445-58.
 106. D'Andrea, L.D. and L. Regan, *TPR proteins: the versatile helix*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(12): p. 655-62.
 107. Lamb, J.R., S. Tugendreich, and P. Hieter, *Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?* *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(7): p. 257-9.
 108. Gandre-Babbe, S. and A.M. van der Blik, *The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells*. *Molecular biology of the cell*, 2008. **19**(6): p. 2402-2412.
 109. Palmer, C.S., et al., *MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery*. *EMBO reports*, 2011. **12**(6): p. 565-573.
 110. Otera, H., et al., *Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells*. *Journal of Cell Biology*, 2010. **191**(6): p. 1141-1158.
 111. Zhao, J., et al., *Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission*. *The EMBO journal*, 2011. **30**(14): p. 2762-2778.
 112. Losón, O.C., et al., *Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(5): p. 659-67.
 113. Pitts, K.R., M.A. McNiven, and Y. Yoon, *Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(48): p. 50286-94.
 114. Smirnova, E., et al., *Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(8): p. 2245-56.
 115. Pernas, L. and L. Scorrano, *Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function*. *Annual review of physiology*, 2016. **78**: p. 505-531.
 116. Mears, J.A., et al., *Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(1): p. 20-6.
 117. Chappie, J.S., et al., *G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity*. *Nature*, 2010. **465**(7297): p. 435-440.
 118. Lee, S., et al., *Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(31): p. 22977-83.
 119. van der Blik, A.M., *Functional diversity in the dynamin family*. *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(3): p. 96-102.
 120. Zhang, P. and J.E. Hinshaw, *Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state*. *Nature cell biology*, 2001. **3**(10): p. 922-926.
-

121. Ford, M.G., S. Jenni, and J. Nunnari, *The crystal structure of dynamin*. *Nature*, 2011. **477**(7366): p. 561-566.
 122. Zhu, P.-P., et al., *Intra-and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(34): p. 35967-35974.
 123. Zhang, Y., X. Gao, and R.M. Garavito, *Biochemical characterization of human dynamin-like protein 1*. *The Journal of Biochemistry*, 2011. **150**(6): p. 627-633.
 124. Chang, C.R. and C. Blackstone, *Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1*. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 2010. **1201**(1): p. 34-39.
 125. Perdiz, D., et al., *Stress-induced hyperacetylation of microtubule enhances mitochondrial fission and modulates the phosphorylation of Drp1 at 616Ser*. *Cellular Signalling*, 2017. **39**: p. 32-43.
 126. Taguchi, N., et al., *Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(15): p. 11521-11529.
 127. Gomes, L.C., G.D. Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. *Nature cell biology*, 2011. **13**(5): p. 589-598.
 128. Yang, Y., et al., *Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(19): p. 7070-7075.
 129. Breitzig, M.T., et al., *A mitochondrial delicacy: dynamin-related protein 1 and mitochondrial dynamics*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2018. **315**(1): p. C80-C90.
 130. Lee, Y.J., et al., *Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(11): p. 5001-11.
 131. Ishihara, N., et al., *Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice*. *Nature cell biology*, 2009. **11**(8): p. 958-966.
 132. Xie, L.L., et al., *Mitochondrial network structure homeostasis and cell death*. *Cancer Sci*, 2018. **109**(12): p. 3686-3694.
 133. Chen, H. and D.C. Chan, *Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells*. *Cell Metab*, 2017. **26**(1): p. 39-48.
 134. Rodrigues, T. and L.S. Ferraz, *Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer*. *Biochem Pharmacol*, 2020. **182**: p. 114282.
 135. Dai, W., et al., *Mitochondrial division inhibitor (mdivi-1) decreases oxidative metabolism in cancer*. *Br J Cancer*, 2020. **122**(9): p. 1288-1297.
 136. Fang, C.T., et al., *Mdivi-1 induces spindle abnormalities and augments taxol cytotoxicity in MDA-MB-231 cells*. *Cell Death Discov*, 2021. **7**(1): p. 118.
 137. Lewis, M.R. and W.H. Lewis, *Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures*. *American Journal of Anatomy*, 1915. **17**(3): p. 339-401.
 138. Bereiter-Hahn, J. and M. Vöth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. *Microsc Res Tech*, 1994. **27**(3): p. 198-219.
 139. Rizzuto, R., et al., *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses*. *Science*, 1998. **280**(5370): p. 1763-6.
 140. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
 141. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
 142. Valente, A.J., et al., *A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture*. *Acta Histochemica*, 2017. **119**(3): p. 315-326.
-

143. Hoitzing, H., I.G. Johnston, and N.S. Jones, *What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research.* BioEssays, 2015. **37**(6): p. 687-700.
 144. Kitano, H., *Systems Biology: A Brief Overview.* Science, 2002. **295**(5560): p. 1662-1664.
 145. Osellame, L.D., T.S. Blacker, and M.R. Duchon, *Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function.* Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012. **26**(6): p. 711-723.
 146. Metelkin, E., et al., *Modeling of ATP-ADP steady-state exchange rate mediated by the adenine nucleotide translocase in isolated mitochondria.* FEBS Journal, 2009. **276**(23): p. 6942-6955.
 147. Beard, D.A., *A Biophysical Model of the Mitochondrial Respiratory System and Oxidative Phosphorylation.* PLoS Computational Biology, 2005. **1**(4): p. e36.
 148. Cortassa, S., et al., *An Integrated Model of Cardiac Mitochondrial Energy Metabolism and Calcium Dynamics.* Biophysical Journal, 2003. **84**(4): p. 2734-2755.
 149. Cortassa, S., S.J. Sollott, and M.A. Aon, *Mitochondrial respiration and ROS emission during β -oxidation in the heart: An experimental-computational study.* PLOS Computational Biology, 2017. **13**(6): p. e1005588.
 150. Bittig, A.T., et al., *Predictive Modelling of Mitochondrial Spatial Structure and Health,* in *Computational Methods in Systems Biology.* 2014, Springer International Publishing. p. 252-255.
 151. Dalmaso, G., et al., *Agent-Based Modeling of Mitochondria Links Sub-Cellular Dynamics to Cellular Homeostasis and Heterogeneity.* PLOS ONE, 2017. **12**(1): p. e0168198.
 152. Sukhorukov, V.M., et al., *Emergence of the Mitochondrial Reticulum from Fission and Fusion Dynamics.* PLoS Computational Biology, 2012. **8**(10): p. e1002745.
 153. Tam, Z.Y., et al., *Mathematical Modeling of the Role of Mitochondrial Fusion and Fission in Mitochondrial DNA Maintenance.* PLoS ONE, 2013. **8**(10): p. e76230.
 154. Zamponi, N., et al., *Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics.* Scientific Reports, 2018. **8**(1).
 155. Marín-Hernández, A., et al., *Modeling cancer glycolysis.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2011. **1807**(6): p. 755-767.
 156. Amemiya, T., et al., *Modeling studies of heterogeneities in glycolytic oscillations in HeLa cervical cancer cells.* Chaos, 2019. **29**(3): p. 033132.
 157. Marín-Hernández, A., et al., *Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase.* Febs j, 2006. **273**(9): p. 1975-88.
 158. Liebermeister, W. and E. Klipp, *Bringing metabolic networks to life: convenience rate law and thermodynamic constraints.* Theoretical Biology and Medical Modelling, 2006. **3**(1): p. 41.
 159. Glancy, B., et al., *The Functional Impact of Mitochondrial Structure Across Subcellular Scales.* Front Physiol, 2020. **11**: p. 541040.
 160. Li, Y., et al., *Increased Drp1 promotes autophagy and ESCC progression by mtDNA stress mediated cGAS-STING pathway.* J Exp Clin Cancer Res, 2022. **41**(1): p. 76.
 161. Parone, P.A., et al., *Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA.* PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3257.
 162. Ota, A., T. Ishihara, and N. Ishihara, *Mitochondrial nucleoid morphology and respiratory function are altered in Drp1-deficient HeLa cells.* J Biochem, 2020. **167**(3): p. 287-294.
 163. Xiong, W., et al., *Regulation of the cell cycle via mitochondrial gene expression and energy metabolism in HeLa cells.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(4): p. 347-58.
 164. Song, J.E., et al., *Mitochondrial Fission Governed by Drp1 Regulates Exogenous Fatty Acid Usage and Storage in Hela Cells.* Metabolites, 2021. **11**(5).
 165. Preta, G., J.G. Cronin, and I.M. Sheldon, *Dynasore - not just a dynamin inhibitor.* Cell Commun Signal, 2015. **13**: p. 24.
-

166. Nicholls, D.G., *Mitochondrial membrane potential and aging*. Aging Cell, 2004. **3**(1): p. 35-40.
167. Cribbs, J.T. and S. Strack, *Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death*. EMBO Rep, 2007. **8**(10): p. 939-44.
168. Cereghetti, G.M., et al., *Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 15803-8.
169. Vo, M.T., et al., *Developmentally regulated GTP-binding protein 2 depletion leads to mitochondrial dysfunction through downregulation of dynamin-related protein 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **486**(4): p. 1014-1020.
170. Wang, C., et al., *Malate-aspartate shuttle inhibitor aminooxyacetic acid leads to decreased intracellular ATP levels and altered cell cycle of C6 glioma cells by inhibiting glycolysis*. Cancer Lett, 2016. **378**(1): p. 1-7.
171. McFate, T., et al., *Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(33): p. 22700-8.
172. Moller, J., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase complex related to lactate switch in CHO cells*. Eng Life Sci, 2021. **21**(3-4): p. 100-114.
173. Grabowska, E., et al., *Differences in the efficiency of 3-deazathiamine and oxythiamine pyrophosphates as inhibitors of pyruvate dehydrogenase complex and growth of HeLa cells in vitro*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2021. **36**(1): p. 122-129.

X. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Jonas Michael Bodanowitz
Geburtsdatum: 25.09.1996
Geburtsort: Cuxhaven
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

2003-2007 Gorch-Fock-Grundschule, Cuxhaven
2007-2015 Amandus-Abendroth-Gymnasium, Cuxhaven
• Abitur 2015
2015-2022 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
• Approbation Dezember 2022

Beruflicher Werdegang

2023- Arzt in Weiterbildung an der Universitätsmedizin Rostock
(Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin)

Mitgliedschaft in Fachgesellschaft

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie

XI. DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die mich bei der Durchführung meiner Dissertation in jeglicher Art und Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Dr. rer. nat. Simone Baltrusch für die Vergabe des Themas, die hervorragende Betreuung sowie für ihre umfangreiche Unterstützung.

Bei Frau Dr. rer. nat. Julia Schultz und Rica Waterstradt möchte ich mich bedanken für jegliche Hilfestellung, Tipps, Ratschläge und Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ich danke auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität Rostock für eine stets hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. rer. nat. Adelinde Uhrmacher (Visual and Analytic Computing, IEF, Universität Rostock) und insbesondere Philipp Henning für die spannende Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie, meinen Freunden und allen weiteren Personen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation mit allen Kräften unterstützt haben.