

***Charakterisierung der
mitochondrialen Oxygenasen***

AlkBh1 und AlkBh7

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades
Dr. rer. nat.**

**der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



von

Anita Wagner

Dissertation eingereicht am 29.11.2016
1. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Conradt
2. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger
Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2017

Diese Arbeit wurde am Helmholtz Zentrum München (in Neuherberg), im Institut für Toxikologie und Pharmakologie in der Arbeitsgruppe von Dr. Alexander Wolf von 2013 bis 2016 angefertigt.

***Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden
geformt, sondern durch Arbeit und eigene Leistung.
(Albert Einstein)***

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Eisen (Fell)- & 2-Oxoglutarat abhängige Oxygenasen (2-OG-Oxygenasen)	2
2.2 AlkB (Alpha-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase).....	3
2.3 Humane AlkB Homologe in der Übersicht (AlkBh1-8, FTO).....	4
2.3.1 AlkBh1	7
2.3.2 AlkBh7	9
3. Ziel der Arbeit	11
4. Ergebnisse	12
4.1 AlkBh1.....	12
4.1.1 AlkBh1 – Homologie.....	12
4.1.2 Lokalisationsbestimmung von AlkBh1.....	14
4.1.3 α -AlkBh1 – Immunpräzipitation (IP) mit massenspektrometrischer Analyse zum Identifizieren von möglichen Interaktionspartnern	22
4.1.4 Mögliche Interaktionspartner von AlkBh1.....	24
4.1.5 Intra-Mitochondriale Lokalisation von AlkBh1	30
4.1.5.1 TFAM	32
4.1.5.2 mtSSBP	34
4.1.5.3 mtDNA	36
4.1.5.4 Hsp60	39
4.1.5.5 FASTKD2	40
4.1.6 Funktion von AlkBh1 und AlkBh7 in <i>Caenorhabditis elegans</i>	43
4.1.7 AlkBh1 Knockdown und Überexpression in humanen Zellen	45
4.1.8 Einfluss der Proteinexpression von AlkBh1 auf die Proliferationsrate	47
4.1.9 Einfluss von unterschiedlichen Inhibitoren auf die oxidative Phosphorylierung unter unterschiedlichen AlkBh1 Proteinmengen.....	49
4.1.10 Mögliche Funktion von AlkBh1 bei der tRNA Modifikation in den Mitochondrien.....	55
4.1.11 Wirkung der Stressbehandlung durch Schädigung der mitochondrialen DNA... ..	56
4.1.11.1 Ethidiumbromid (EtBr)	57
4.1.11.2 Doxorubicin	62
4.1.11.3 Bleomycin	76
4.2 AlkBh7	83
4.2.1 AlkBh7 – Homologie.....	83
4.2.2 Lokalisationsbestimmung von AlkBh7 in Zellen	85
4.2.3 α -AlkBh7 – Immunpräzipitation (IP) mit massenspektrometrischer Analyse.....	91
4.2.4 Intra-mitochondriale Lokalisation von AlkBh7 mit Blick auf TFAM und mtDNA..	93
4.2.5 Wirkung von Knockdown und Überexpression von AlkBh7 auf unterschiedliche Zelllinien unter diversen Stressbedingungen.....	95
4.2.6 Stressbehandlung der mtDNA → Auswertung mittels IF für AlkBh7	96
4.3 Drei dimensionale Zellkultur, Sphäroide (3D).....	101
4.3.1 Morphologie der Mitochondrien unter Normoxie und Hypoxie mit Blick auf Monolayer und 3D Zellkultur	103
5. Diskussion	109
5.1 AlkBh1 & AlkBh7.....	109

5.2	3D Zellkultur.....	119
6.	Material & Methoden.....	120
6.1	Material.....	120
6.1.1	Chemikalien und Bezugsquellen.....	120
6.1.2	Restriktionsenzyme und Puffer.....	123
6.1.3	Kits.....	124
6.1.4	Marker → DNA- und Proteingrößenstandards.....	124
6.1.5	Beads.....	124
6.1.6	Antikörper.....	125
6.1.7	Sonstige verwendete Materialien.....	127
6.1.8	Verwendete Geräte.....	129
6.1.9	Programme, Software und Websites.....	130
6.1.10	Plasmide und Vektoren.....	132
6.1.11	Zelllinien.....	133
6.1.12	Bakterien- und Phagenstämme.....	133
6.1.13	Primer.....	134
6.2	Lösungen und Puffer.....	136
6.2.1	Minipräparation.....	136
6.2.2	Polyacrylamid (SDS)-Gelelektrophorese und Western Blot.....	136
6.2.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	137
6.2.4	Bakterien.....	138
6.2.5	Zellkultur, Immunfluoreszenz, Proliferationstest und 3D.....	138
6.2.6	Metabolismusassay.....	139
6.2.7	Mitochondrienisolierung.....	139
6.2.8	Proteincharakterisierung und Immunpräzipitation.....	139
6.3	Molekularbiologische Standardmethoden.....	140
6.3.1	Primer erstellen.....	140
6.3.2	Standard-PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	140
6.3.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	141
6.3.4	Gelextraktion.....	142
6.3.5	Klonierung.....	142
6.3.6	Präparation von Plasmid-DNA.....	143
6.3.7	Protein-, DNA und RNA Konzentrationsbestimmung.....	144
6.3.8	Protein-SDS-Gelelektrophorese.....	144
6.3.9	Wet Western Blot.....	145
6.4	Standardmethoden für Bakterienkultur.....	146
6.4.1	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	146
6.4.2	Transformation hitzeschockkompetenter Bakterien.....	147
6.4.3	Herstellung von elektrokompenten Bakterien.....	148

6.5	Standardmethoden für Zellkultur	149
6.5.1	Passagieren der Zellen.....	149
6.5.2	Transfektion von humanen Zellen.....	149
6.5.3	Ernten der Zellen.....	150
6.5.4	Fixieren von humanen Monolayer und 3D dimensionale Zellkultur	150
6.5.5	Immunfluoreszenzfärbung von humanen Zelllinien	151
6.5.6	Hypoxie und Normoxie	153
6.5.7	qPCR	153
6.5.8	Stressbehandlung von humanen Zellen.....	154
6.6	Herstellung eines humanen AlkBh7 Antikörpers.....	155
6.7	Mitochondrienisolierung	156
6.8	Antikörper-Immunpräzipitation (AK-IP)	159
6.9	Stabiles induzierbares KrabRed System (KRS) durch Virusinfektion.....	160
6.10	Proliferation Assay	164
6.11	Metabolismus Assay	166
6.12	3D Zellkultur (Sphäroide)	168
6.13	AlkBh1 und AlkBh7 in <i>C. elegans</i>	171
6.14	Mitochondriale DNA-Immunpräzipitation (mtDNA-IP) nach (Lu et al., 2007; Picca et al., 2013)	172
7.	Abkürzungen	175
8.	Abbildungsnachweisverzeichnis	180
9.	Tabellenverzeichnis	184
10.	Literaturverzeichnis	185
11.	Anhang	193
	Danksagung	197
	Erklärung	198

1. Zusammenfassung

AlkBh1 und AlkBh7 sind zwei Eisen (FeII) und 2-Oxoglutarat abhängige Oxygenasen, die zur Familie der AlkB Homologen gehören. AlkB ist ein bakterielles Protein, das in die Stressantwort von *E. coli* involviert ist und durch Demethylierungen Schäden an der DNA repariert. Sowohl AlkBh1 als auch AlkBh7 sind in allen Modellorganismen (von der Pflanze bis Mensch) präsent und gut konserviert. Die Lokalisation für AlkBh7 konnte in den Mitochondrien gezeigt werden, für die Lokalisation von AlkBh1 gibt es jedoch kontroverse Aussagen. Welche Funktion AlkBh1 und AlkBh7 in Zellen haben, konnte bisher nicht geklärt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation und Funktion von AlkBh1 und AlkBh7 in humanen Zellen zu erforschen und mögliche Interaktionspartner für diese Proteine zu identifizieren. Des Weiteren wurde überprüft, ob diese beiden Proteine, wie das bakterielle Protein, eine Funktion bei der DNA Reparatur haben.

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AlkBh1 hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dies konnte mit unterschiedlichen Methoden verifiziert werden. Durch Immunpräzipitationen mit anschließender Massenspektrometrie (MS) konnte für AlkBh1 ATAD3A, ein mitochondriales Transmembranprotein mit ATPase Aktivität, und AlkBh7 als Interaktionspartner identifiziert werden. AlkBh7 konnte in den Mitochondrien aber auch im Zellkern detektiert werden. Auch für AlkBh7 konnten mittels Immunpräzipitation mit anschließender Massenspektrometrie potentielle Interaktionspartner wie z.B. p53 und Rad50 identifiziert werden. Diese beiden möglichen Interaktionspartner sprechen für eine mögliche Funktion von AlkBh7 bei der DNA Reparatur.

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Substanzen, z. B. Chemotherapeutika, wie Doxorubicin und Bleomycin, in der Lage sind, Schäden auch an der mitochondrialen DNA zu induzieren und möglicherweise dadurch eine Stressantwort in den Mitochondrien auslösen. Deshalb wurden im Laufe dieser Arbeit die Wirkung von Doxorubicin und Bleomycin auf die mitochondriale DNA und der Einfluss von AlkBh1 und AlkBh7 in diesem Prozess untersucht.

Durch Stress auf die Mitochondrien bzw. die mitochondriale DNA verändert sich die Morphologie der Mitochondrien und die mitochondriale DNA akkumuliert in große „Knötchen“. AlkBh1 und AlkBh7 sind auch in diesen „Knötchen“ lokalisiert und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine eine Rolle bei dieser induzierten Stressantwort spielen.

2. Einleitung

2.1 Eisen (FeII)- & 2-Oxoglutarat abhängige Oxygenasen (2-OG-Oxygenasen)

2-OG-Oxygenasen bilden eine Proteinfamilie, die Hydroxylierungsreaktionen oder oxidative Demethylierungsreaktionen katalysieren. Diese Familie umfasst ca. 60 Proteine im Menschen, die diverse Aufgaben in unterschiedlichen Kompartimenten in einem Organismus übernehmen (Loenarz & Schofield, 2011).

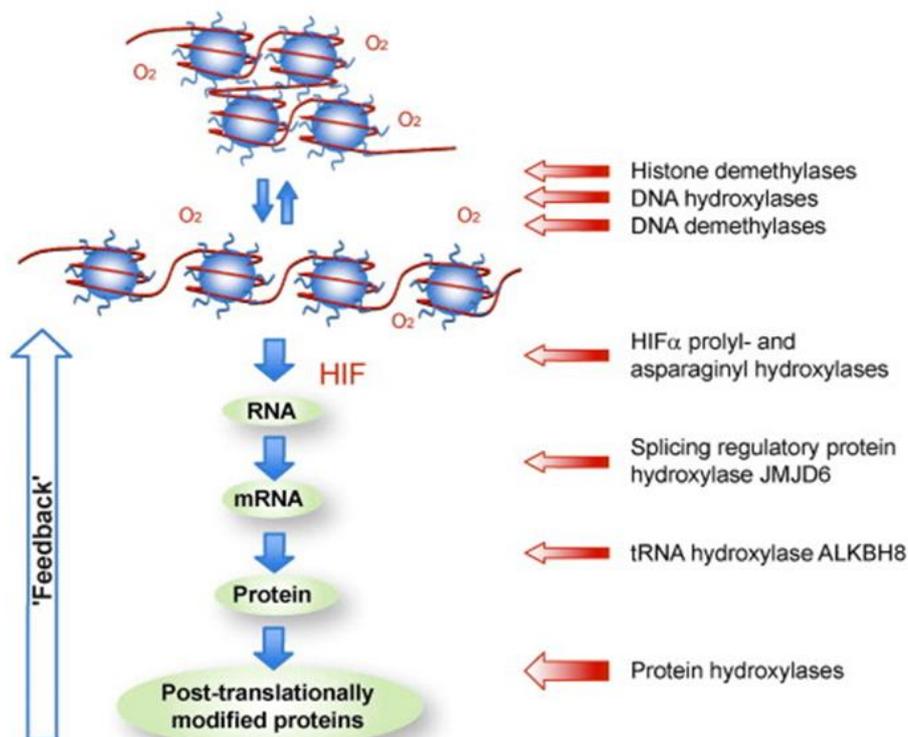


Abbildung 2-1 Die Mitglieder der Proteinfamilie der 2-OG-Oxygenasen beeinflussen die Regulation der Genexpression von der Transkription bis zur Proteinbiosynthese

Dabei spielt diese Proteinfamilie eine Rolle bei der Histondemethylierung, Katalyse von DNA Hydroxylierung und der Methylierung von DNA und RNA. Quelle: (Loenarz & Schofield, 2011)

Die 2-OG-Oxygenasen regulieren die Genexpression in vielen Bereichen. Sie beeinflussen z.B. die Histonmethylierung (KDM, Histone Lysine Demethylase), DNA Hydroxylierung und Demethylierung (TET, Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase), Splicingregulation (z.B. JMJD6, arginine demethylase and lysine hydroxylase), tRNA Hydroxylierung (AlkBH8), sowie die Regulierung der Angiogenese und Hypoxiefaktoren (PHD, Prolyl hydroxylases) und die Modifikation von RNA durch Demethylierung der N⁶-Methyl-Adenosine (m⁶A) durch FTO (fat mass and obesity-associated) und AlkBh5 [(Loenarz & Schofield, 2011; Niu et al., 2013), siehe auch Abbildung 2-1]. Die vielfältigen biologischen Funktionen der 2-OG-Oxygenasen führen bei Dysregulation dieser Enzymfamilie zu einer großen Vielfalt an Erkrankungen, zu denen z.B. Krebs (Adam, Yang, Soga, & Pollard, 2014),

neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer (Salminen et al., 2015) oder Diabetes (Yako et al., 2015) zählen.

Alle 2-OG-Oxygenasen sind durch eine doppelsträngige DSBH (*Double-stranded beta-helix*) Domäne charakterisiert, die die konservierte Eisenbindedomäne und die 2-Oxoglutarat (2-OG) Bindestelle enthält. Diese Proteinfamilie benötigt Fe^{2+} , als Kofaktor und Sauerstoff und 2-Oxoglutarat (2-OG) als Kosubstrat, damit die katalytische Reaktion ablaufen kann (McDonough, Loenarz, Chowdhury, Clifton, & Schofield, 2010).

Eine Unterfamilie dieser 2-OG-Oxygenasen sind die AlkB Homologe, die aus neun unterschiedlichen Mitgliedern bestehen (AlkBh1-8, FTO). Die Lokalisation und Funktionen dieser Proteine werden in Kapitel 2.3 genauer beschrieben.

2.2 AlkB (Alpha-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase)

AlkB ist eine bakterielle 2-OG-Oxygenase, die DNA Schäden durch Alkylierung repariert (Falnes, Johansen, & Seeberg, 2002). Wie in Abbildung 2-2 gezeigt, benötigt *E. coli* für diesen Schritt einen Kofaktor und mehrere Kosubstrate um die oxidative Demethylierung z. B. an einem 1-Methyladenin (1-meA) oder 3-Methylcytosin (3-mC) durchzuführen. Bei diesem Prozess wird die alkylierte DNA-Base in ihre Ursprungsform gebracht, wobei das 2-Oxoglutarat unter Verbrauch von O_2 zu Succinat und CO_2 umgesetzt und die oxidierte Methylgruppe als Formaldehyd freigesetzt wird (Falnes et al., 2002).

Der Signalweg, der dieses Enzym anschaltet, wird hauptsächlich durch Schäden an einzelsträngiger DNA (ssDNA) aktiviert. Reparatur von Schäden an der doppelsträngigen DNA (dsDNA) konnten auch vereinzelt *in vitro* nachgewiesen werden [(Falnes et al., 2002; Trewick, Henshaw, Hausinger, Lindahl, & Sedgwick, 2002)]. Wissenschaftler konnten zudem alkylierte RNA als weiteres AlkB Substrat *in vivo* in *E.coli* charakterisieren (Ougland et al., 2004).

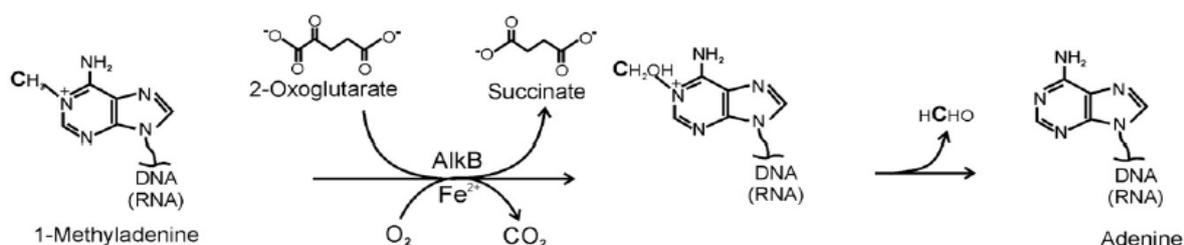


Abbildung 2-2 Oxidative Demethylierung von 1-meA (1-Methyladenin) durch AlkB

DNA Reparaturmechanismus des *E. coli* Proteins AlkB mit den nötigen Kosubstraten (2-Oxoglutarat, Sauerstoff) und Kofaktor (Fe^{2+}) und den Produkten (Succinat, CO_2 , Formaldehyd). Quelle: (Falnes, Klungland, & Alseth, 2007)

In Säugetieren gibt es bisher neun Homologe (AlkBh1-AlkBh8, FTO). Bis heute sind nicht alle Funktionen dieser AlkB Homologe in Säugetieren bzw. im Menschen charakterisiert (Falnes et al., 2007).

2.3 Humane AlkB Homologe in der Übersicht (AlkBh1-8, FTO)

In den Säugetieren konnten aufgrund von Sequenzanalysen neun unterschiedlichen AlkB Homologe identifiziert werden. Diese AlkB Homologe wurden als AlkBh1 bis AlkBh8 und FTO (*Fat mass and obesity-associated Protein*) bezeichnet (Ougland, Rognes, Klungland, & Larsen, 2015). Die Funktionen der einzelnen Proteine sind bis heute noch nicht ganz aufgeklärt. Eine Übersicht über die bisher bekannten Funktionen (Abbildung 2-3A) und die Lokalisation dieser Proteine sind in Abbildung 2-3B dargestellt (Ougland et al., 2015).

AlkB Homologe finden sich in Genomen von *D. melanogaster*, *C. elegans* und vielen weiteren Modellorganismen. Eine Ausnahme bilden AlkBh3, AlkBh5 und FTO, diese Proteine sind erst ab den Vertebraten nachweisbar [(Fedeles, Singh, Delaney, Li, & Essigmann, 2015) und Tabelle 2-1].

Tabelle 2-1 Übersicht über die Verteilung von AlkB Homologen in Eukaryoten

Daten wurden mittels NCBI Blast und http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/SpeciesTree ermittelt

AlkBh's	Homo sapiens	Mus musculus	Gallus gallus	Danio rerio	Caenorhabditis elegans	Drosophila melanogaster	Hydra magnipapillata	Arabidopsis thaliana
AlkBh1	+	+	+	+	+	+	+	+
AlkBh2	+	+	+	+	-	-	+	+
AlkBh3	+	+	+	+	-	-	-	-
AlkBh4	+	+	+	+	+	+	+	+
AlkBh5	+	+	+	+	-	-	-	-
AlkBh6	+	+	-	+	+	+	+	+
AlkBh7	+	+	-	+	+	+	+	+
AlkBh8	+	+	+	+	+	+	+	+
FTO	+	+	+	+	-	-	-	-

AlkBh1 hat die größte Sequenzhomologie zu dem bakteriellen AlkB. Jedoch sind nur AlkBh2 und AlkBh3 in der Lage, die DNA-Reparaturfunktion von AlkB in *E. coli* zu kompensieren (Aas et al., 2003). Für AlkBh2 und AlkBh3 konnte in Zelllinien und im Mausmodell nachgewiesen werden, dass sie nukleare DNA Demethylasen (1-meA, 3-meC) sind und eine DNA Reparaturfunktion haben. Dieser Mechanismus basiert auf einer direkten Umkehrung des DNA Schadens (Fedeles et al., 2015). AlkBh2 bevorzugt die doppelsträngige DNA als Substrat und ist im Nukleus und zeitweise in Nukleoli lokalisiert (Ougland et al., 2015).

Für AlkBh3 dagegen konnte neben der Lokalisation im Nukleus auch eine Lokalisation im Zytoplasma gezeigt werden, wo AlkBh3 neben einzelsträngiger DNA auch RNA als Substrat *in vitro* und *in vivo* umsetzen kann (Sundheim et al., 2006). Es konnte auch ein

Zusammenhang zwischen dem veränderten Expressionsmuster von AlkBh2 und AlkBh3 und der Aggressivität verschiedener Krebsarten festgestellt werden. Damit können AlkBh2 und AlkBh3 möglicherweise in Zukunft als neue Angriffspunkte für Anti-Krebstherapeutika in Betracht kommen (Ougland et al., 2015). Von den weiteren verbleibenden Familienmitgliedern konnte nur noch für AlkBh1 eine mögliche DNA Reparaturfähigkeit nachgewiesen werden (Westbye et al., 2008).

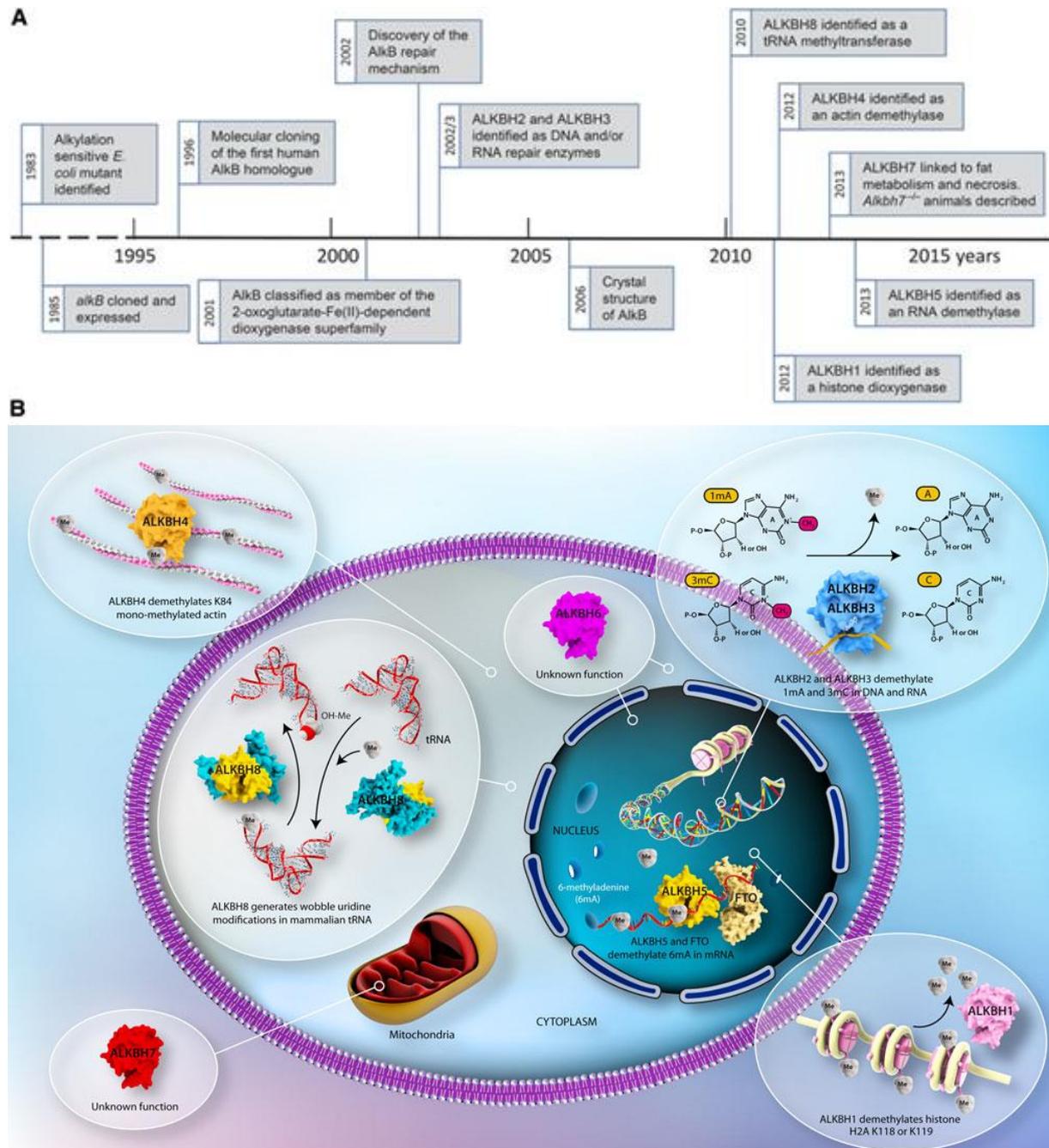


Abbildung 2-3 Übersicht über die Funktionen von unterschiedlichen AlkB Homologen (AlkBh)
 Bisher charakterisierte Funktionen von einzelnen humanen AlkB Homologen im zeitlichen Verlauf. B. Übersicht über Lokalisation und möglichen Funktionen der AlkB Homologen in den einzelnen Zellkompartimenten. Quelle: (Ougland et al., 2015)

Für AlkBh4 konnte sowohl eine Lokalisation im Nukleus als auch im Zytoplasma gezeigt werden (Abbildung 2-3) und hat eine demethylierende Funktion am Lysin Rest 84 des Aktins. Diese Demethylierung ist nötig damit die Zellteilung während der Mitose reibungslos ablaufen kann (M. M. Li et al., 2013). Des Weiteren führt die Abwesenheit von AlkBh4 zur Letalität während der Embryogenese und zur Beeinträchtigung der Spermatogenese in Mäusen (Nilsen, Fusser, Greggains, Fedorcsak, & Klungland, 2014).

AlkBH8 ist ein bifunktionales Enzym, das sowohl eine Methyltransferase ist als auch die Oxygenase-Aktivität besitzt. Des Weiteren kann es das 5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm5U) hydroxylieren (Songe-Moller et al., 2010; van den Born et al., 2011). Der Knockout von AlkBh8 in Mäusen führt zu keinen offensichtlichen Phänotypen, die Mäuse sind normal und zeigen keine Auffälligkeiten (Ougland et al., 2015).

FTO (Fat mass and obesity-associated Protein) ist eine mRNA Demethylase, die 6-Methyladenin (6mA) und 3-Methylthymin im Nukleus demethyliert. Unterschiede in der Expression von FTO *in vivo* werden mit Fettleibigkeit und Diabetes Typ II in Verbindung gebracht. Des Weiteren führt ein Verlust von FTO in Mäusen zu Wachstumsverlangsamung und zu Fehlbildungen (Ougland et al., 2015; Yako et al., 2015).

AlkBh5 ist wie FTO eine Hydroxylase, die in der Lage ist, 6-Methyladenin in RNA zu demethylieren. Wie FTO ist AlkBh5 in den nuklearen Speckles lokalisiert. AlkBh5 defiziente Mäuse zeigen einen eingeschränkten RNA Stoffwechsel, eine reduzierte Fertilität und führt zu Fehlern in der Meiose (Zheng et al., 2013). AlkBh5 wird durch Hypoxie aktiviert und ist ein direktes Transkriptionstarget von HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha), (Ougland et al., 2015).

Für AlkBh6 und AlkBh7 konnten bisher noch keine Funktionen bestimmt werden. Auf die Charakterisierung von AlkBh7 wird in Kapitel 2.3.2 genauer eingegangen. Für die Lokalisation von AlkBh6 gibt es Publikationen, die auf die Lokalisation im Nukleus oder Nukleoli hindeuten, aber das Protein konnte auch im Zytoplasma detektiert werden (Ougland et al., 2015).

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass die AlkB Homologe in Säugetieren bzw. im Menschen unterschiedliche Aufgaben übernommen haben. Nur AlkBh2 und AlkBh3 haben eine ähnliche Funktion wie das bakterielle AlkB im humanen Organismus beibehalten (Ougland et al., 2015). Alle anderen Proteine haben sowohl die Substrate als auch die subzelluläre Lokalisation an ihre neuen Funktionen angepasst (Abbildung 2-3).

2.3.1 AlkBh1

AlkBh1 ist das erste Protein aus Säugetieren, dass als AlkB Homolog identifiziert wurde (Wei, Carter, Wang, & Shell, 1996). Die Sequenz von AlkBh1 zeigt, im Vergleich zu allen anderen Familienmitgliedern aus Säugetieren, die größte Ähnlichkeit zu AlkB auf (Wei et al., 1996). AlkBh1 weist auch eine hohe Homologie zwischen den unterschiedlichen Organismen auf (siehe auch Abbildung 4-2).

Es gibt verschiedene wissenschaftliche Arbeiten mit Knockout Mäusen, die entweder Exon3 oder Exon6 von AlkBh1 aus dem Genom entfernt haben. Durch die Deletion von verschiedenen Exons sind unterschiedliche Phänotypen entstanden. Bei der Deletion von Exon3 sind die Knockout Mäuse vital, anatomisch normal und fertil. Jedoch sind diese Mäuse etwas kleiner als die Wildtypmäuse. Zusätzlich weisen die Mäuse mit dem fehlenden Exon3 Defekte in der Plazenta auf [Abbildung 2-4A, (Ougland et al., 2015; Pan et al., 2008)].

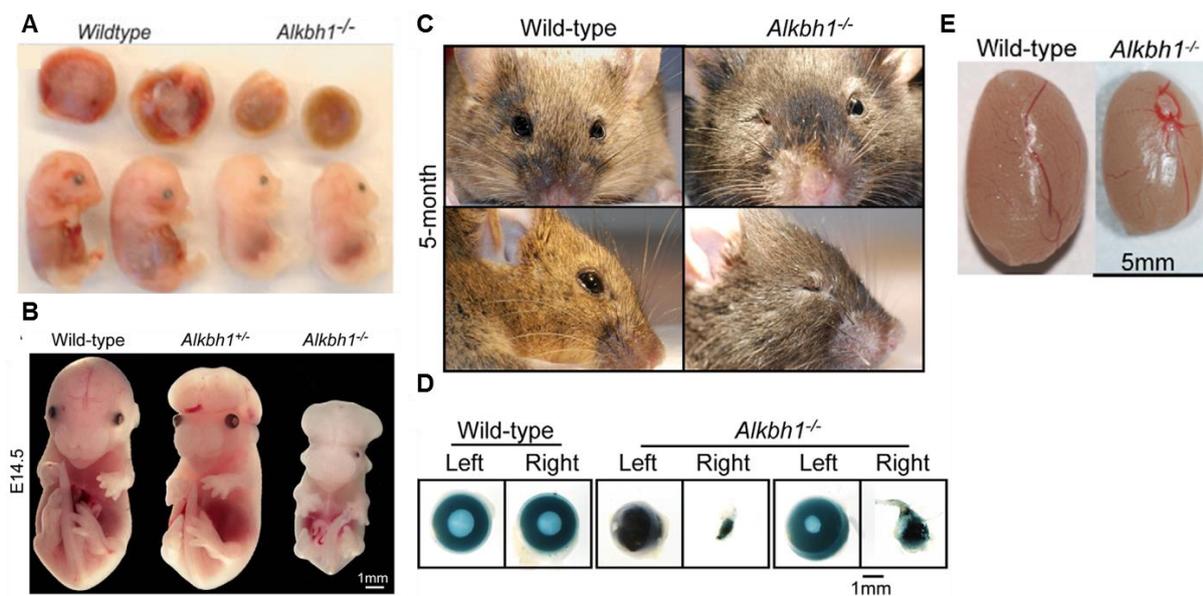


Abbildung 2-4 Phänotypen von AlkBh1 Knockout Mäusen

A. Plazenta aus Knockout (KO) Mäusen mit Exon3 Deletion im Vergleich zu Wildtypmäusen (WT). Quelle: (Pan et al., 2008). In B.-E. sind die unterschiedlichen Auswirkungen der Exon6 Deletion von AlkBh1 dargestellt. B. AlkBh1 Deletion zeigt einen deutlichen Phänotyp in der Morphologie. C. und D. zeigen die Augendeformierung der Knockout Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. In E. sind die Größenunterschiede der Hoden von WT und AlkBh1 KO Mäusen sichtbar. Quelle: (Nordstrand et al., 2010)

Die Knockout Mäuse mit der Deletion in Exon6 dagegen zeigen einen bedeutenden Phänotyp. Diese AlkBh1 Knockout Mäuse weisen starke Verformungen am Gehirn, Skelett und in der Augenmorphologie auf [Abbildung 2-4B-D, (Nordstrand et al., 2010)]. Die Sterblichkeit der Knockout Mäuse ist sehr hoch, nur 20% der Knockout Mäuse überleben im Vergleich zum Wildtyp (Nordstrand et al., 2010). Eine Veränderung bei den überlebenden

männlichen Knockout Mäusen sind kleinere Hoden [Abbildung 2-4E, (Nordstrand et al., 2010)].

Obwohl AlkBh1 scheinbar für den Organismus wichtig ist, konnte bisher noch keine spezifische Funktion beschrieben werden. Es gibt mehrere Publikationen über mögliche Funktionen für AlkBh1, die jedoch kontroverse Aussagen über die Lokalisation und Funktion von AlkBh1 zeigen (Ougland et al., 2015).

In embryonalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass SOX2 und Nanog, zwei Kerntranskriptionsfaktoren zuständig für die Pluripotenz, an den AlkBh1-Promoter binden und damit die Regulation der Pluripotenz und Differenzierung in der frühen Entwicklungsphase beeinflussen (Ougland et al., 2016). Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, dass AlkBh1 in embryonalen Mausstammzellen für die DNA-Demethylierung des N⁶-Adenins zuständig ist (Wu et al., 2016).

Des Weiteren konnte in verschiedenen *in vitro* Assays gezeigt werden, dass AlkBh1 eine Histon-H2A-Dioxygenase ist und eine Rolle in der neuronalen Differenzierung spielt (Ougland et al., 2012). Weitere *in vitro* Assays zeigten auch, dass AlkBh1 an das 5`Ende eines DNA Produktes bindet und eine AP (apurinic/apyrimidinic, Stelle in der DNA, die weder Purine noch Pyrimidine enthält) Lyase-Aktivität besitzt (Muller, Andrzejak, & Hausinger, 2013). Die Lokalisation von AlkBh1 wurde in embryonalen Stammzellen im Euchromatin des Nukleus bestimmt (Pan et al., 2008).

Im Gegensatz dazu haben Wissenschaftler auch gezeigt, dass AlkBh1 in den Mitochondrien lokalisiert ist. In den Mitochondrien soll AlkBh1 das 3-Mehtylcytosin in RNA und einzelsträngiger DNA demethylieren (Westbye et al., 2008). Diese Ergebnisse konnten durch *in vitro* Versuche bestätigt werden (Wollen Steen et al., 2012). Des Weiteren konnten diese Wissenschaftler auch zeigen, dass eine Vorinkubation von AlkBh1 mit mtSSBP (mitochondrial single strand binding protein) die Demethylierung des 3-Methylcytosins und die Lyase-Aktivität der ssDNA Region verhindert und damit den Reparaturprozess von AlkBh1 an der Einzelstrang-DNA *in vitro* inhibiert (Wollen Steen et al., 2012).

Trotz dieser vielen wissenschaftlichen Publikationen, bleibt die Antwort nach der Lokalisation und eigentlichen Funktion von AlkBh1 kontrovers.

2.3.2 AlkBh7

AlkBh7 ist in unterschiedlichen Organismen, z. B. Fliege, Wurm, Maus und Mensch, stark konserviert (siehe auch Abbildung 4-68).

AlkBh7 ist ein im Nukleus kodiertes Protein und besitzt eine mitochondriale Signalsequenz am N-Terminus. Aufgrund dessen wird AlkBh7 in die Mitochondrien importiert. Die Lokalisation von AlkBh7 in der mitochondrialen Matrix konnte von unterschiedlichen Wissenschaftlern bestätigt werden (Fu, Jordan, & Samson, 2013; Solberg et al., 2013).

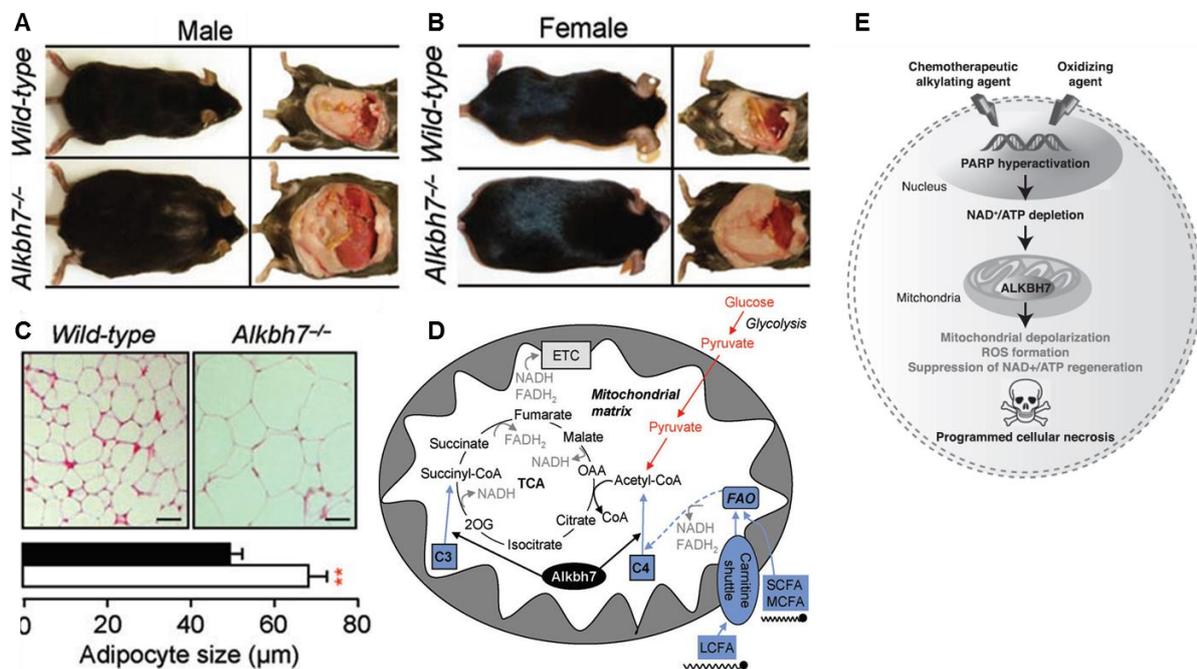


Abbildung 2-5 Lokalisation und Funktion von AlkBh7 aus unterschiedlichen Blickwinkeln

A.-D. Männliche und weibliche Knockout (KO) Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen (WT). A. Männliche WT Mäuse im Vergleich zu männlichen Knockout Mäusen nach Gabe von fettreicher Ernährung (HFD, High fat diet). B. Weibliche WT Mäuse im Vergleich zu weiblichen KO Mäusen nach HFD; C. Vergleich von Adipozyten des Wildtyp mit der der Knockout Maus; D. Modell über die Lokalisation und mögliche Funktion von AlkBh7 in den Mitochondrien [adaptiert von (Solberg et al., 2013)]; E. Übersicht über mögliche Funktion von AlkBh7 im Nekrosesignalweg [Quelle: (Fu et al., 2013)]

AlkBh7 wird in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert. Die höchste Expression auf RNA Ebene im Mausgewebe konnte in Herz, Hirn, braunem Fett, Hoden und Leber detektiert werden (Solberg et al., 2013).

Der Knockout von AlkBh7 führt nach Fütterung der Mäuse mit fettreicher Nahrung zu einem eingeschränkten Bewegungsdrang und zu einer gesteigerten Zunahme des Körpergewichtes sowie des Körperfettes [Abbildung 2-5, (Solberg et al., 2013)].

Die männlichen Mäuse (Abbildung 2-5A) sind davon etwas mehr betroffen als die weiblichen Mäuse (Abbildung 2-5B). Eine Erklärung für die Zunahme des Körpergewichts kann in der charakteristischen Vergrößerung der Adipozyten der Knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen liegen (Abbildung 2-5C). Des Weiteren führt der Verlust von AlkBh7 zu einer gesteigerten Fett- und Glykogen Einlagerung. AlkBh7 hat möglicherweise eine Funktion im Fettstoffwechsel oder bei der Verarbeitung von kurzkettigen Fettsäuren [siehe Abbildung 2-5D, (Solberg et al., 2013)].

In einer weiteren Arbeit konnte die Expression von AlkBh7 in direktem Zusammenhang zur programmierten Nekrose gebracht werden. Signalwege die durch AlkBh7 angeschaltet werden, spielen scheinbar eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Nekroptose, die durch DNA schädigende Agenzien oder oxidativem Stress aktiviert werden (Fu et al., 2013).

Der Verlust von AlkBh7 in Zellen führt zu einer Hemmung der Nekrose, die unter anderem durch alkylierende Agenzien induziert wird. Die DNA-Schäden, die durch ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) oder genotoxischem Stress entstehen, führen zur Depolarisation der Mitochondrien, was schlussendlich zum Verlust der zellulären Biogenese und zum induziertem Zelltod führt (Fu et al., 2013). Ein Modell über die Funktion von AlkBh7 in der programmierten Nekrose ist in Abbildung 2-5E dargestellt.

Wie genau AlkBh7 die programmierten Nekrose und den Fettstoffwechsel beeinflusst und welche weiteren Funktionen dieses Protein noch einnimmt, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

3. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der 2-OG-Oxygenasen AlkBh1 und AlkBh7 in den Mitochondrien. Zu Beginn dieser Arbeit, war die Lokalisation und Funktion dieser beiden 2-OG-Oxygenasen in den Mitochondrien noch nicht genau definiert. Deshalb wurde ein Augenmerk auf die Bestimmung der Lokalisation auf Proteinebene und durch Immunfluoreszenzfärbung (IF) mit anschließender Auswertung an unterschiedlich hochauflösenden Mikroskopen gelegt. Für diesen Schritt wurden AlkBh1 und AlkBh7 mit unterschiedlichen mitochondrialen Marker (Mito-GFP, Hsp60) und prominenten mitochondrialen Proteinen (TFAM, mtSSBP) kogefärbt.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit war die Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern dieser beiden Proteine aus ganzen Zellen und isolierten Mitochondrien mittels Immunpräzipitation (IP) und Massenspektrometrie (MS). Ein weiterer Baustein dieser Arbeit war das Anfertigen von stabil induzierbaren Knockdown Zelllinien (aus unterschiedlichen Gewebearten) für AlkBh1 und AlkBh7 mittels Virusinfektion. Diese Knockdown Zelllinien wurden dazu verwendet, um einen möglichen Einfluss von AlkBh1 und AlkBh7 auf die Proliferation oder den Stoffwechsel in einzelnen Zellen zu identifizieren.

Da das bakterielle Homolog AlkB bei der Stressantwort der Bakterien eine wichtige Rolle spielt, wurden auch unterschiedliche Stressfaktoren verwendet, um eine mögliche Funktion von AlkBh1 und AlkBh7 nach Stressinduktion zu identifizieren. Dabei wurde der Fokus auf die Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung mittels Inhibitoren wie z. B. Rotenon und Oligomycin gelegt. Des Weiteren wurden auch Agenzien, wie z.B. Ethidiumbromid, Doxorubicin und Bleomycin, verwendet, die Schäden an der mitochondrialen DNA (mtDNA) induzieren können.

4. Ergebnisse

4.1 AlkBh1

4.1.1 AlkBh1 – Homologie

AlkBh1 ist das am stärksten konservierte AlkB Homolog mit Blick auf die Sequenzgleichheit zum bakteriellen AlkB (Wei et al., 1996). Nach Abgleich des humanem AlkBh1 und AlkB sind ~23% (50 AS von 216 AS) aller Aminosäuren (AS) identisch und weitere ~23% AS ähnlich. Dabei ist die Eisenbindestelle und die 2-OG-Bindestelle besonders gut konserviert (Abbildung 4-1). Die Funktion von AlkBh1 ist im Vergleich zum bakteriellen AlkB nach bisherigen Erkenntnissen nicht konserviert (Wei et al., 1996).

```

AlkBh1_human      MGKMAAAVGSVATLATEPEGEDAFRKLFRFYRQSRPGTADLEGVIDFSAHAARGKPGAQ 60
AlkB              -----MLD----- 3
                  ::

AlkBh1_human      KVIKSQNLNVSSVSEQNAYRAGLQPVSKWQAYGLKGYPGFIFIPNPFLEPGYQWHWVKQCLK 120
AlkB              -----LFADAEFWQEPPLAAG---A-----VILRRFAFNAAEQLI- 34
                  : .. ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AlkBh1_human      LYSQKPNVCNLDKHSKEETQDLWEQSKEFLRYKEATKRRFRSLLLEKLRWVTVGYHYNWD 180
AlkB              -----RDINDVASQSPFRQMTVTPGGY---TMSVAMTNCGHLGWTTHRQGYLYS 79
                  : : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AlkBh1_human      SKK-Y SADHYTPFPSDLGFLSEQVAACGFEDFRAEAGILNYYRLDSTLGIHVD RSELDH 239
AlkB              PIDPQTNKPWPAMPQSFHNLQRAATAAGYPDFOPDACLINRYAPGAKLSLHODKDEPDL 139
                  . : . : : * : : * * : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AlkBh1_human      SKPLLSFSFGQSAIFLLGGLQRDEAPTAMFMHSGDIMIMSGFSRLLNHAVPRVLENPGE 299
AlkB              RAPIVSVSLGLPAIFQFGLKRNPLKRLLEHGDVVVWGGESRLFYHGIQPLKAGFHP 199
                  * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AlkBh1_human      GLPHCLEAPLPAVLPRDSMVEPCSMEDWQVCASYLKTARVNMTVRQVLATDQNFLEPIE 359
AlkB              ----TIDCR-----YNLTFRQAGKKE----- 216
                  : : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AlkBh1_human      DEKRDISTEGFCHLDDQNSEVKKRINPDS 389
AlkB              ----- 216
  
```

Abbildung 4-1 *Alignment* von humanem AlkBh1 (Q13686) und bakteriellem AlkB (P05050)

Bestimmung der Homologie zwischen AlkB und humanem AlkBh1 (*Alignment* durchgeführt mit www.uniprot.org). Eisenbindestellen 100%, 2-OG-Bindestelle 50% und DSBH (2-OG-Dioxygenase Domäne) ~19% konserviert; * → Gleiche Aminosäuren (AS), : → Ähnliche AS

AlkBh1 ist in unterschiedlichen Modellorganismen wie z.B. von Hydra über *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus* bis Mensch konserviert (Abbildung 4-2). Die für alle 2-OG-Oxygenasen typischen DSBH Domäne (DSBH-fold, *Double-stranded beta-helix*) am C-terminalen Ende weist die größte Sequenzhomologie auf. Wohingegen der N-terminus variabel in der Aminosäurezusammensetzung und Länge zu sein scheint. Die Hydra Sequenz ist wahrscheinlich nicht vollständig, der C-terminus ist nicht annotiert (Abbildung 4-2).

```

AlkBh1_Homo_sapiens      MGKMAAAV----- 8
AlkBh1_Mus_musculus     -----MGKMAAAV 8
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
-----M 1

AlkBh1_Homo_sapiens      GSVATLATEPEGEDAFRKLFRFYRQSRPGTADLEGVIDFSAHAARGKPG 58
AlkBh1_Mus_musculus     ASLATLAAEPREDAFRKLFRFYRQSRPGTADLGAVIDFSEAHLSRFPKG 58
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
-----MFKLVFQY-KCKSTSPDLTEVVKIDCVVKNDQEK 36
AGSSGEDSDDGNSLNFKA VFKYKRRKP-PFDVSDVIDVKS SLLQS---- 95
ISESCNKYDRTNLDLVFKEYKRYKRRKP-PDFSEVIDFHQAKEYIS---- 46
      . . . . .
      : : * : : . . * . * : . . .

AlkBh1_Homo_sapiens      AQKVIKSQLNVSSVSEQNAYRAGLQPVSKWQAYGLKGYPGFIFIPNFFLP 108
AlkBh1_Mus_musculus     VFQVVRFFLNSSVTERDAERVGLEPVSKWRAYGLEGYPGFIFIPNFFLP 108
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
SDNNIVQRLSISNVES-LQTMPGVKSPKDWRTYTLTNHPGIIVIRNPFSE 85
--KLVFSTDEITSETTSLAERLGLIAPSEWRVYWFDRIGLYLLPSLLRK 143
---LIKESYVDSTIPENVFCKVGLKHPKNWVYELLTCPFIVIQNFIC 93
      : . . . . .
      : : * : : . . * : : . . : :

AlkBh1_Homo_sapiens      -GYQWHVVKQCLKLYSQPNVCNLDKHMSTKEETQDLWEQSKFEFLRYKEAT 157
AlkBh1_Mus_musculus     -GCQRHWVKQCLKLYSQPNVCNLDKHMSTKEETQDLWEQSKFEVLSAKEYVT 157
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
-RGRRYWSARCLRDFFRTPFNIVNLNERLFDESVRSDWVKQLNLCSD----D 130
-EKSTMMWKRAFKA-YAEPFNITNLTLLHGKDVLT----- 174
YGAQSHWIKQALTEYTKKPYPCNLDALMALDKDKTIVWDISQE----- 135
      * : : : . . * **

AlkBh1_Homo_sapiens      KRRPRSLLLEKLRWVTGVYHYNWDSKKYSADHYTPFPSDLGFLSEQVAAAC 207
AlkBh1_Mus_musculus     KRRPRSLLERLRWVTGLYHYNWDSKKYSADHYTPFPSDLAFLESEQVATAC 207
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
GVFEQRKIKSAMRWTTFFGYHYNWDTKIYDEEMQSPFPEDLSLCLGFAQAL 180
--DPTLLTKGLRWTTLGVYDWNKSEYPPNGR-PVPEELYQLGNLISRSL 221
KSVENNFINQLRWTHMGYHFDYNIYDVKAEYGFPKDLAELTIVTIADV 185
      : : ** . * : : : * . . * : :

AlkBh1_Homo_sapiens      GFEDFRAEAGILNYYRLDSTLGIHVDRELDHSHKPLLSFSFGQSAIFLLG 257
AlkBh1_Mus_musculus     GFQGFQAEAGILNYYRLDSTLGIHVDRELDHSHKPLLSFSFGQSAIFLLG 257
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
GYADFKPEAAIVNYYYPVGSTLSGHTDHSEFNKSAPLFSFSFGQTAIFLLG 230
KLGDMKPDATILNYYPPKSALSPHVDKSERS-AAPLISMSLGQTAYLSG 270
KFONYIAETGILNYYPEGSSMGGHTDHYEELSOPLISYSFGQAAVFLIG 235
      . : : * : * * * : : . . * : : * : : * : * : * : * : *

AlkBh1_Homo_sapiens      GLQRD-EAPTAMFMHSGDIMIMSGFSRLLNHAVPRVLPNPEGEGLPHCLE 306
AlkBh1_Mus_musculus     GLKRD-EAPTAMFMHSGDIMVMSGFSRLLNHAVPRVLPHPDGECLPHCLE 306
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
GRSLE-EKPTAIYLSQGDVIMIMSGESRCLCYHAVPRIIKTQASATLSLIE 279
TIDLSSEPPPIPLWLRNGDFLIMHGDQRLVYHAIPCIIGSIKRRGRNGSMM 320
GPTRD-IKPE----- 244
      *

AlkBh1_Homo_sapiens      AP----LPAVLPRDSMVEPCSMEDWQVCASYLKTARVNMTVRQVLATDQ 351
AlkBh1_Mus_musculus     TP----LPAVLPSNSLVEPCSVEDWQVCATYLRARVNMTVRQVLATGQ 351
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
DVDNADIKTRTIDKDLFHDVGNPQFWEPPFSRYMDDSRININIRQVLNPGD 329
DED-----QEHFEPFRGNDVDVQSIIDYLNSSRVNFTIRQVNFN- 359

AlkBh1_Homo_sapiens      NFFLEPIEDEKRDISTEGFCHLDDQNSEVKRARINPDS 389
AlkBh1_Mus_musculus     DFFLEPVEETKRDIAADGLCHLHDENSFVKRKRINPNS 389
AlkBh1_Drosophila_melanogaster
AlkBh1_Caenorhabditis_elegans
AlkBh1_Hydra_magnipapillata
VKL----- 332

```

Abbildung 4-2 Alignment von unterschiedlichen AlkBh1 Proteinsequenzen von diversen Modellorganismen

Alignment von Mensch (NCBI: gi 12643239), Maus (NCBI: gi 156523265), Fruchtfliege (NCBI: gi 4555400), Wurm (NCBI: gi 392889121) und Hydra (NCBI: gi 449692216). Hydrasequenz von AlkBh1 ist noch nicht vollständig, die hier verwendete Sequenz ist nur teilweise verfügbar oder prognostiziert. Zusammenstellung der Sequenzen mit: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>, Eisenbindestellen (H.D...H), 2-OG-Bindestelle und DSBH (2-OG-Dioxygenase Domäne); * → Gleiche Aminosäuren (AS), : → Ähnliche AS

4.1.2 Lokalisationsbestimmung von AlkBh1

4.1.2.1 Bestimmung der Lokalisation auf Proteinebene mittels Western Blot

Um die Lokalisation von endogenem AlkBh1 zu bestimmen, wurden die Mitochondrien aus HEK293T, HeLa und A549 Zellen isoliert [siehe (Schmitt et al., 2013) und Kapitel 6.7]. Für jede Zelllinie und Zellart wurden individuelle Isolierungsparameter bestimmt (Details in Tabelle 6-26 und Kapitel 6.7). Dann wurden mittels Western Blot (WB) die unterschiedlichen Fraktionen Zelldebris (P), Zytoplasma (Ü) und Mitochondrienfraktion (M) auf den Proteingehalt von AlkBh1 und Hsp60, ein Mitochondrienmarker, überprüft.

Der Versuch zeigt, dass AlkBh1 in den getesteten Zelllinien hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert ist [siehe Mitochondrienfraktion (M) im Vergleich zum Zelldebris (P) und zur Zytoplasmafraktion (Ü) in Abbildung 4-3 HEK293T (A, B), HeLa (C) und A549 (D)].

Die Daten wurden auch mittels Densitometrie aus dem oben genannten Western Blot ermittelt. Dabei wurde die Mitochondrienfraktionen (M) ins Verhältnis zum Zelldebris (P) gesetzt (Abbildung 4-3 E). Die hier getesteten Zelllinien zeigen, dass sowohl Hsp60 als auch AlkBh1 in den Mitochondrien angereichert ist (Abbildung 4-3 E; $M/P > 1$, Auswertung mittels Densitometrie in ImageJ).

Die Überexpression von AlkBh1 im pEGFP Vektor führte in HEK293T (Abbildung 4-4 A) und HeLa Zellen (Abbildung 4-4 B) zu einer verringerten Anreicherung von endogenem und überexprimiertem AlkBh1 in den Mitochondrien (Abbildung 4-4 C).

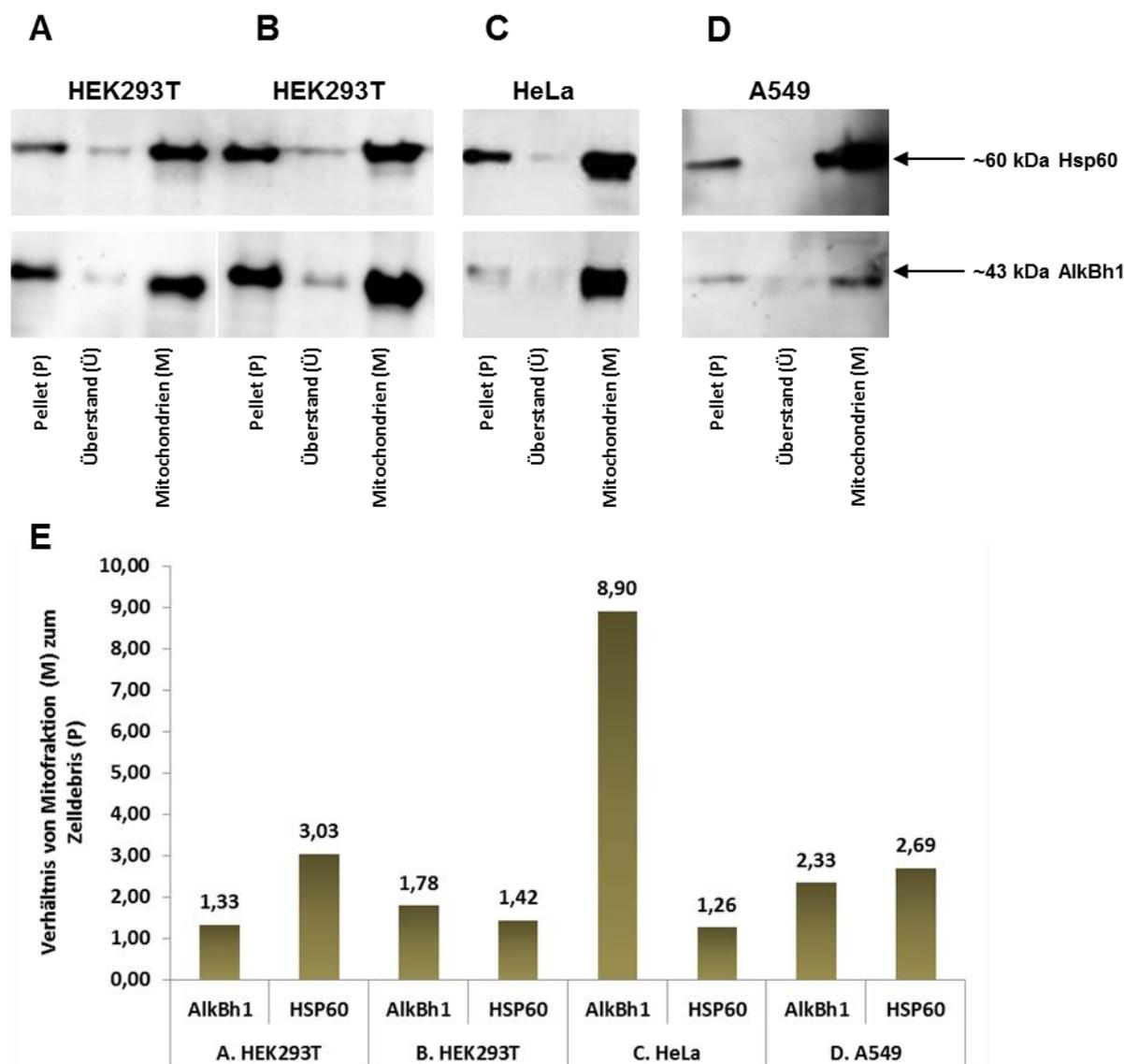


Abbildung 4-3 Lokalisationsbestimmung von endogenem AlkBh1 mittels Mitochondrienisolierung und Western Blot

A. Detektion von AlkBh1 und Hsp60 in HEK293T, Mitochondrienaufreinigung mit Hypes 3x, Clearance 8, Zellzahl 7×10^6 (Details dazu siehe in Kapitel 6.7), B. Detektion von AlkBh1 und Hsp60 in HEK293T, Hypes 6, Clearance 8, Zellzahl 7×10^6 , C. Detektion von AlkBh1 und Hsp60 in HeLa Zellen, Hypes 3, Clearance 4, Zellzahl 6×10^6 , D. Detektion von AlkBh1 und Hsp60 in A549 Zellen, Hypes 3, Clearance 8, Zellzahl 7×10^6 ; E. Verhältnis von Mitofraktion (M) zum Zelldebris (P), (M/P) nach Computer gestützter Auswertung mit Hilfe des Programms ImageJ. Methode: Mitochondrienisolierung; Aufgetragen auf den Western Blot wurden Pellet (P, Zelldebris), Überstand (Ü, Zytoplasmafraktion), isolierte Mitochondrien (M, Mitochondrienfraktion); gefärbt wurde mit α -Hsp60 & α -AlkBh1(EPR6176) Antikörper

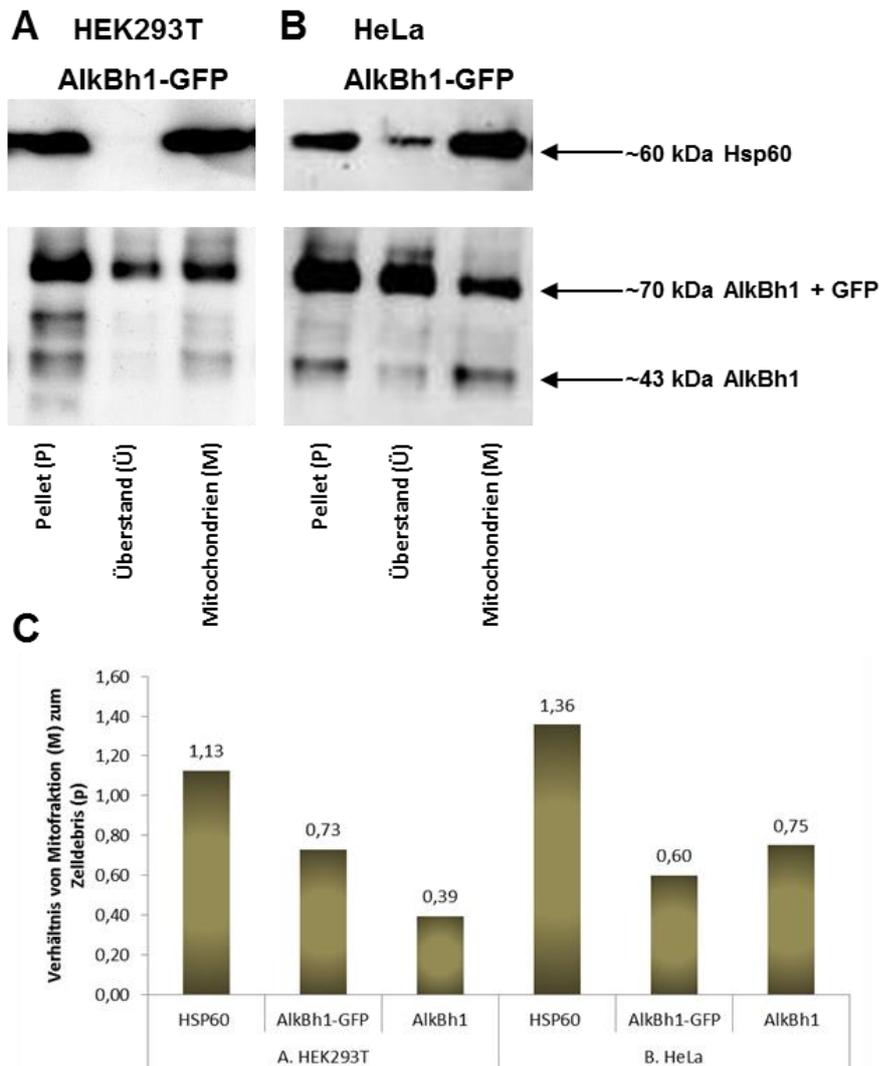


Abbildung 4-4 Lokalisationsbestimmung von AlkBh1 nach der Überexpression im pEGFP Vektor mittels Mitochondrienisolierung und Western Blot

A. Detektion von endogenem AlkBh1, AlkBh1 fusioniert mit pEGFP im Vergleich zu Hsp60 in HEK293T, (Hypes 6, Clearance 8, Zellzahl 7×10^6), B. Detektion von endogenem AlkBh1, AlkBh1 fusioniert mit pEGFP im Vergleich zu Hsp60 in HeLa, (Hypes 3, Clearance 6, Zellzahl 4×10^6), C. Verhältnis von Mitofraktion (M) zum Zelldebris (P), (M/P) aus A. und B.; Auswertung nach Computer gestützter Auswertung mit Hilfe des Programms ImageJ. Methode: Mitochondrienisolierung. α -AlkBh1₄₉ und α -Hsp60; Western Blot und Antikörperdetektion; Aufgetragen wurden Pellet (P, Zelldebris), Überstand (Ü, Zytoplasmafraktion), isolierte Mitochondrien (M, Mitochondrienfraktion)

4.1.2.2 Bestimmung der Lokalisation mittels Immunfluoreszenz (IF)

Die Lokalisation von AlkBh1 in verschiedenen Zelllinien wurde mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie an endogenem oder ungetagtem, überexprimiertem AlkBh1 Protein (pcDNA3_AlkBh1) analysiert. Mitochondrien wurden in diesen Zellen zusätzlich mit Mito-GFP kofärbt. Mito-GFP ist ein Konstrukt, das aus einer mitochondrialen Zielsequenz (ornithine transcarbamylase pOTC, *Rattus norvegicus*) und einer GFP Sequenz besteht (Dr. K. Müller-Rischart, AG Prof. Dr. Barbara Conradt, LMU). Nach dem Transport in die Mitochondrien, ist das Mito-GFP in der mitochondrialen Matrix detektierbar.

Für IF-Versuche wurde in verschiedenen Zelllinien endogenes AlkBh1 mit einem α -AlkBh1_EPR (EPR6176, Abcam ab126596) Antikörper gegengefärbt. In Abbildung 4-5 A'-B'''' sind HeLa Zellen zu sehen, die endogenes AlkBh1 zeigen. Der α -AlkBh1 Antikörper färbt bestimmte Strukturen im Zytoplasma und es ist eine leichte Färbung im Zellkern detektierbar. Die Kofärbung von Mito-GFP mit der AlkBh1 zeigt, dass die Anordnung von AlkBh1 mit der Expression von Mito-GFP gelegentlich überlagert (siehe Abbildung 4-5 C'-D'''). Gleiche Ergebnisse wurden in Panc-1 (Abbildung 4-6 A'-B'''), PC-3 (Abbildung 4-6 C'-D''') und HT-29 (Abbildung 4-6 E'-F''') beobachtet.

Die Überexpression von ungetagtem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) in HeLa Zellen führt zu einer ausschließlich zytoplasmatischen Färbung (Abbildung 4-7 A'', B''). Die transiente Koexpression von Mito-GFP zeigt eine Kolo-kalisation mit ungetagtem, überexprimiertem AlkBh1 (Abbildung 4-7 C'''; D'''). Dabei scheint die Überexpression von AlkBh1 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Mitochondrienstruktur zu haben (Abbildung 4-7 E'-F''').

Die transiente Überexpression von ungetagtem AlkBh1 führte auch in PC-3 Zellen (Abbildung 4-8 A''', B'''), A549 Zellen (Abbildung 4-8 C''', D''') und HT-29 Zellen (Abbildung 4-8 E''', F''') zur ausschließlich mitochondrialen Lokalisation.

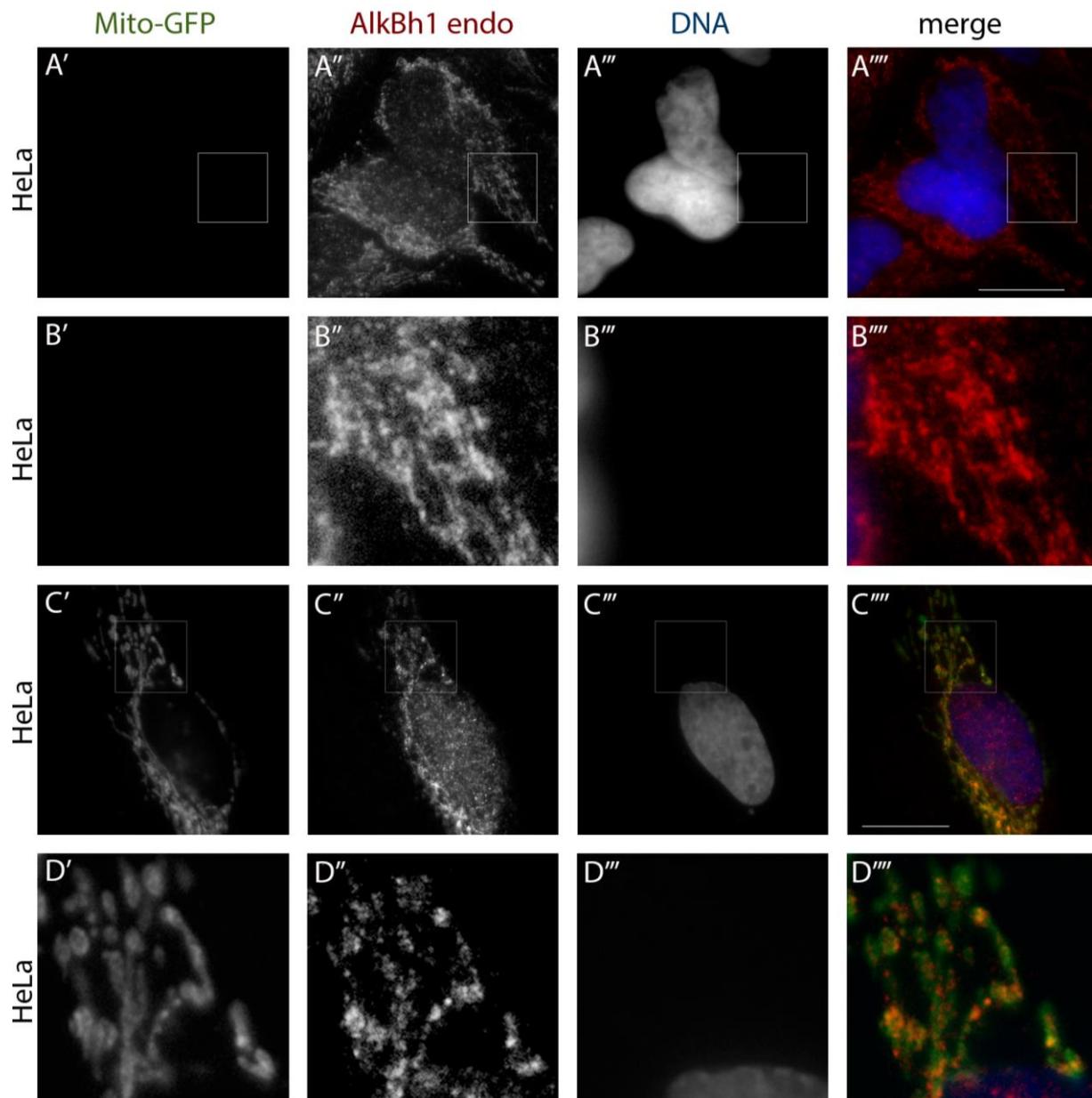


Abbildung 4-5 HeLa Zellen mit endogenem AlkBh1 allein oder kofärbt mit Mito-GFP

A.'- B.''' HeLa Zellen zeigen endogenes AlkBh1 (rot), C.'-D.''' HeLa Zellen, die transient Mito-GFP (grün) exprimierten, kofärbt mit α -AlkBh1_EPR (EPR6176, Abcam ab126596) Antikörper (rot); DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Fluoreszenzmikroskop; Maßstab 20 μ m

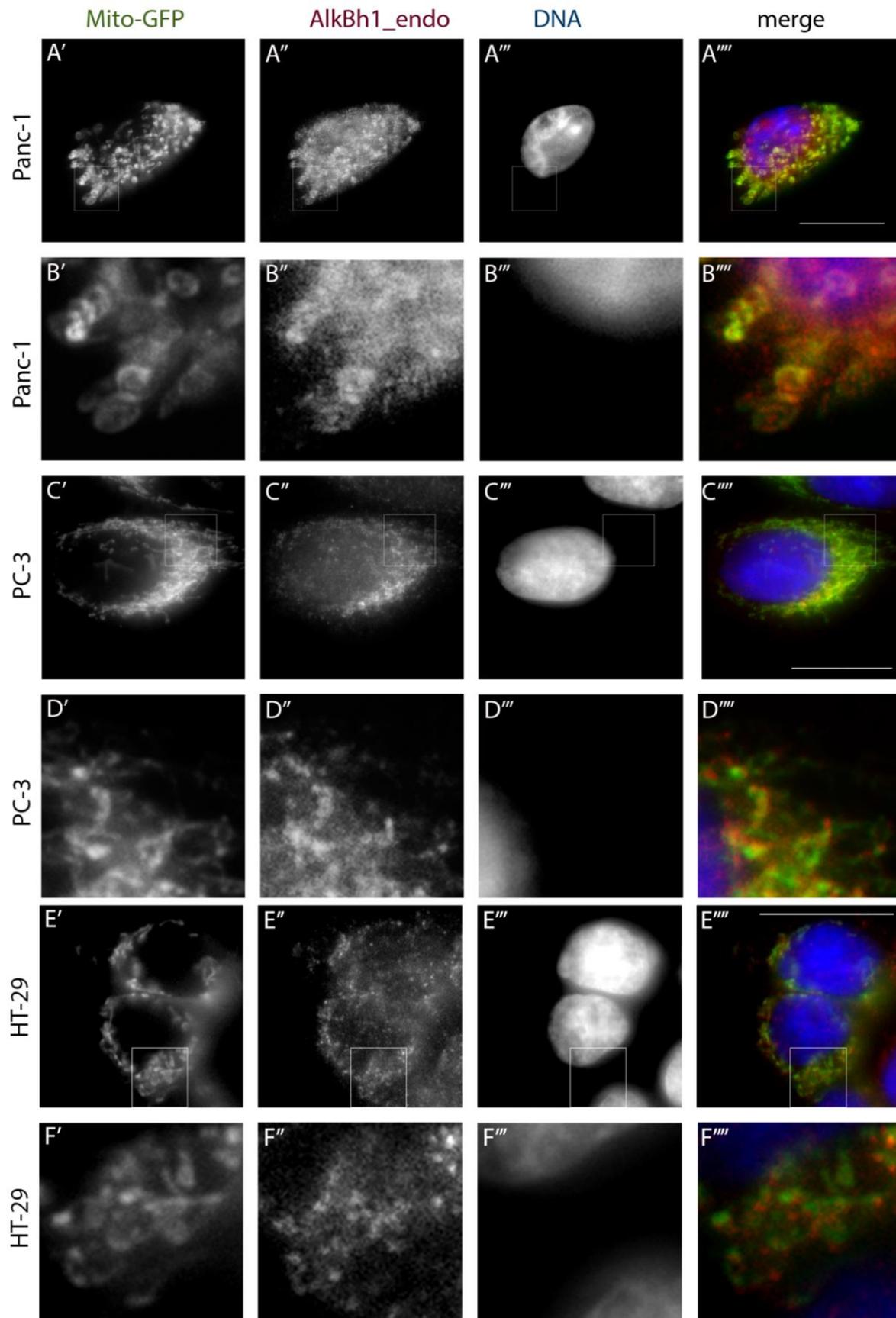


Abbildung 4-6 Panc-1, PC-3, HT-29 Zellen zeigen Expression von Mito-GFP kogefärbt mit endogenem AlkBh1

Transiente Expression von Mito-GFP, kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) in Panc-1 Zellen (A'- B'''), PC-3 Zellen (C'-D''') und HT-29 Zellen (E'-F'''). DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Fluoreszenzmikroskop; Maßstab 20 μ m

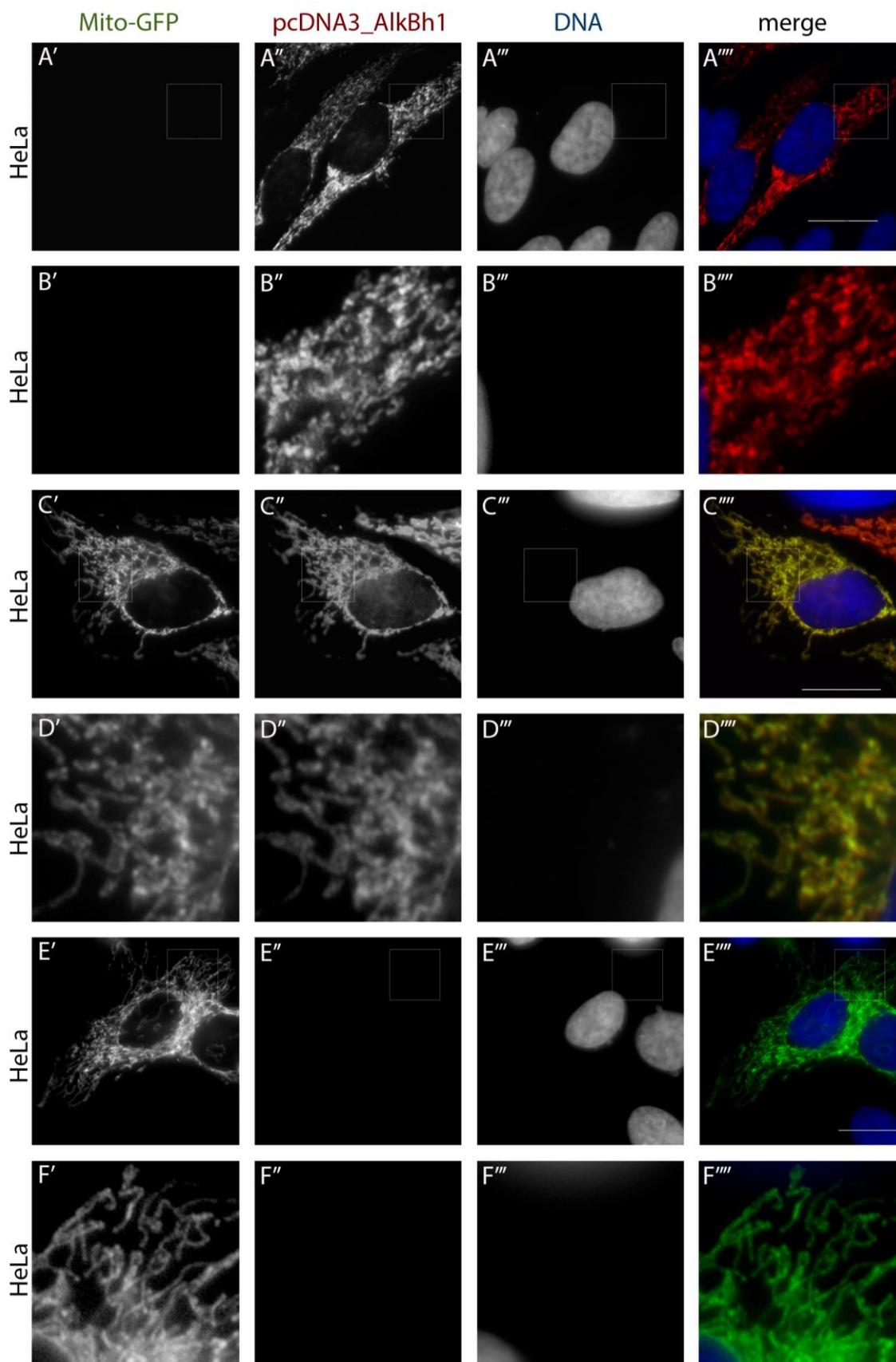


Abbildung 4-7 HeLa Zellen zeigen Koexpression von transientem Mito-GFP mit ungetaggttem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1)

Ungetaggttes AlkBh1 (pcDNA3), kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) in HeLa Zellen (A'- B'''), transiente Koexpression von Mito-GFP und ungetaggttem AlkBh1 (pcDNA3) in HeLa Zellen (C'-D''') und nur transiente Expression von Mito-GFP in HeLa Zellen (E'-F'''). DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Fluoreszenzmikroskop; Maßstab 20 μ m

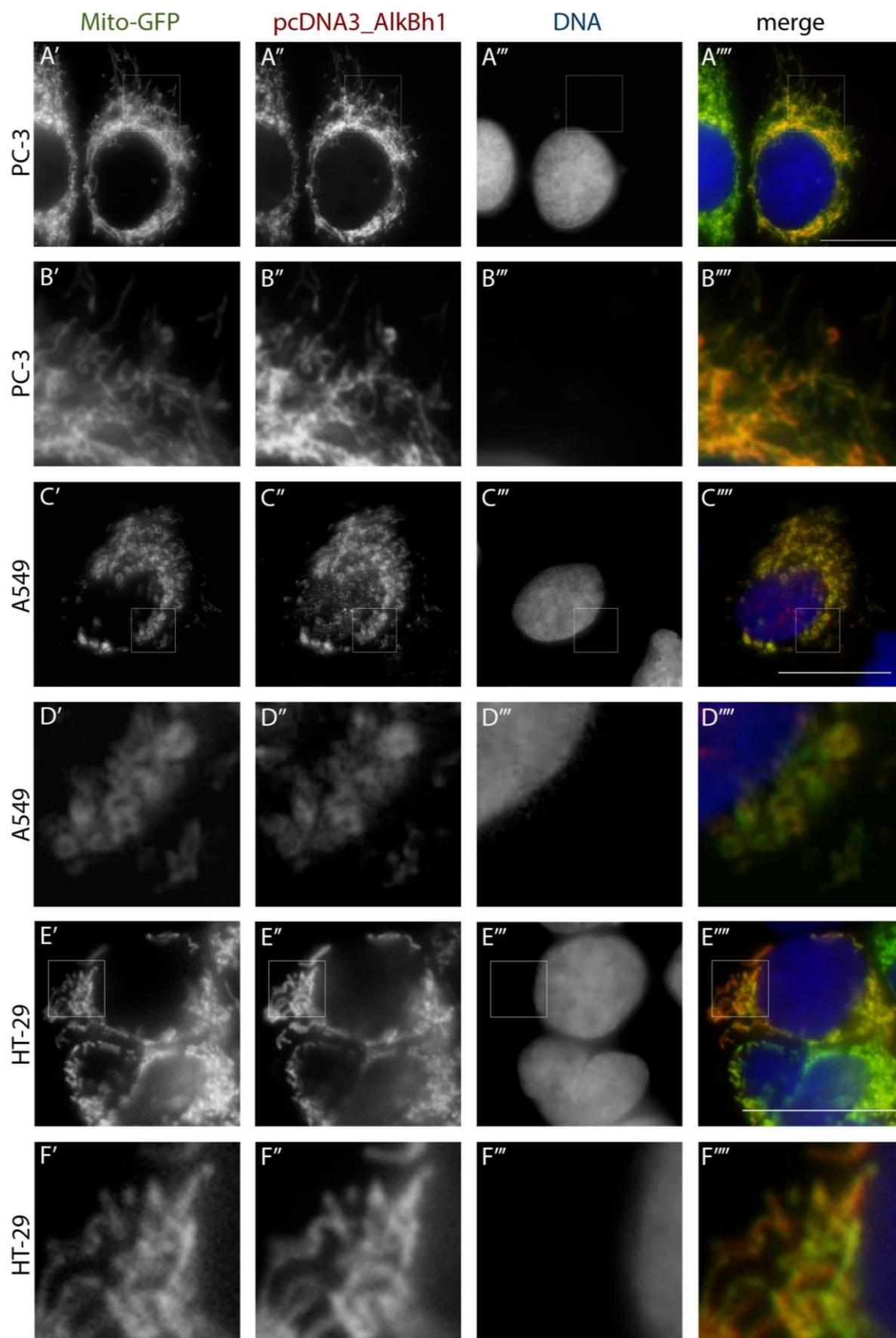


Abbildung 4-8 PC-3, A549 und HT-29 Zellen zeigen Koexpression von Mito-GFP mit ungetagtem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1)

Transiente Expression von Mito-GFP und ungetagtem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1), kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) in PC-3 Zellen (A'- B'''), A549 Zellen (C'-D''') und HT-29 Zellen (E'-F'''). DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Fluoreszenzmikroskop; Maßstab 20 μ m

4.1.3 α -AlkBh1 – Immunpräzipitation (IP) mit massenspektrometrischer Analyse zum Identifizieren von möglichen Interaktionspartnern

Wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt, ist AlkBh1 in diversen Zelllinien in den Mitochondrien lokalisiert. Deshalb wurden sowohl aus ganzem Zelllysate als auch aus isolierten Mitochondrien (HEK293T) mehrere Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Die Beadsfraktion (siehe Abbildung 6-7), die die potentiellen Interaktionspartner enthalten sollte, wurde an die Abteilung Proteomics am Helmholtz Zentrum zur Massenspektrometrie (MS) Analyse gegeben. Alle MS-Versuche in dieser Arbeit wurden in Kooperation mit Dr. Juliane Merl-Pham (Dr. Stefanie Hauck, Abteilung PROT) ausgelesen und vorab ausgewertet. Für diese Arbeit wurden die relevanten Hits für AlkBh1 in Tabelle 4-1 (ganzes Zelllysate) und Tabelle 4-2 (isolierte Mitochondrien) zusammengefasst.

Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 enthalten sechs Parameter. Eine Erkennungsnummer zur eindeutigen Zuordnung (<http://www.ensembl.org>) der möglichen Interaktionspartner, der gängige Kurzname der Proteine (Name) und die Häufigkeit der identifizierten Peptide (einzelne Peptide) in den analysierten Proben. Die Bewertungsziffer oder „*Confidence score*“ ist ein weiterer Indikator, um wirkliche von falschpositiven Interaktionspartnern zu unterscheiden. Diese Bewertungsziffer berechnet die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit des potentiellen Interaktionspartners in dem Pulldown Experiment (α -AlkBh1-IP) relativ zum Kontrollexperiment (α -Flag-IP = Kontroll-IP, Isotypkontrolle), (Dazard, Saha, & Ewing, 2012). Die zwei hinteren Spalten geben das Anreicherungsverhältnis der vorhandenen Proteine im Verhältnis zur Kontroll-IP an. Sortiert sind die Hits absteigend nach dem höchsten Anreicherungs Wert im Überexpressionsversuch.

4.1.3.1 Mögliche Interaktionspartner von AlkBh1 nach α -AlkBh1-IP aus HEK293T Zelllysate

Tabelle 4-1 zeigt einen Überblick über die potentiellen Interaktionspartner aus ganzem Zelllysate, die aus drei unterschiedlichen Experimenten zusammengefasst wurden. Die α -AlkBh1-IPs (ab49738) wurden aus HEK293T Lysaten mit endogenem oder ungetaggetes, überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) durchgeführt.

Neben AlkBh1 als „Baitprotein“ ist ATAD3A (ATPase family AAA domain-containing protein 3A) in beiden Proben sehr stark angereichert, die Anzahl der Peptide und die Bewertungsziffer sind hoch. Deshalb wurde diese potentielle Interaktion in der weiteren Arbeit genauer untersucht (siehe Kapitel 4.1.4).

Tabelle 4-1 Übersicht über möglichen Interaktionspartner von AlkBh1 nach α -AlkBh1-IP aus ganzen Zelllysaten

Verwendete Zellen HEK293T; Daten zusammengestellt von Dr. Juliane Merl-Pham, (Dr. Stephanie Hauck, PROT, Helmholtz Zentrum München); Vergleich von α -AlkBh1-IP (endogen) und α -AlkBh1-IP (pcDNA3_AlkBh1 Überexpression); Tabelle ist nach Anreicherungsverhältnis von (pcDNA3_AlkBh1; α -AlkBh1-IP) im Verhältnis zur Kontrolle absteigend sortiert

Erkennungsnummer	Einzelne Peptide	Bewertungsziffer	Name	ganzes Zelllysate	
				Anreicherungsverhältnis Überexpression/Kontrolle	Anreicherungsverhältnis Endogen/Kontrolle
ENSP00000216489	11	636	<i>ALKBH1</i>	3130,6	31,9
ENSP00000368031	8	363	ATAD3A	18,2	139,4
ENSP00000257192	2	112	DSG1	13,3	1,8
ENSP00000301653	11	1431	KRT16	7,4	9,1

4.1.3.2 Mögliche Interaktionspartner von AlkBh1 nach α -AlkBh1-IP aus isolierten Mitochondrien (HEK293T)

Um mögliche Interaktionspartner in den Mitochondrien für AlkBh1 zu identifizieren, wurden unabhängige α -AlkBh1-IP`s mit endogenem und ungetaggetem, überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) aus isolierten Mitochondrien durchgeführt (Tabelle 4-2). Die Mitochondrien wurden nach (Schmitt et al., 2013) und wie in Kapitel 6.7 beschrieben, isoliert.

Tabelle 4-2 zeigt, dass sowohl bei einer Überexpression als auch bei endogenem Level AlkBh1 in der Beadsfraktion (zu finden in der Spalte Anreicherungsverhältnis) angereichert werden konnte. Auch in der Mitochondrienfraktion ist ATAD3A als potentieller Interaktionspartner für das überexprimierte AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) detektierbar. Da das endogene AlkBh1 in einem sehr geringen Verhältnis angereichert ist, kann dies zu einer verringerten Anreicherung der potentiellen Interaktionspartner führen, siehe ATAD3A endogen (Tabelle 4-2).

Bei diesem Versuchsansatz konnte AlkBh7 als ein weiterer möglicher Interaktionspartner detektiert werden. AlkBh7 ist sowohl in der überexprimierten Fraktion (pcDNA3_AlkBh1, α -AlkBh1-IP) als auch in der endogenen Fraktion (endogen, α -AlkBh1-IP) in den isolierten Mitochondrien angereichert. Die mögliche Interaktion zwischen AlkBh1 und AlkBh7 sowie ATAD3A wird in Kapitel 4.1.4 mit diversen Experimenten verifiziert.

Tabelle 4-2 Übersicht über mögliche Interaktionspartner für AlkBh1 nach α -AlkBh1-IP aus isolierten Mitochondrien

Verwendete Zellen: HEK293T; Daten zusammengestellt von Dr. Juliane Merl-Pham, (Dr. Stephanie Hauck, PROT, Helmholtz Zentrum München). Tabelle ist nach Anreicherungsverhältnis von α -AlkBh1-IP (AlkBh1_pcDNA3) im Verhältnis zur Kontrolle absteigend sortiert

Erkennungsnummer	Einzelne Peptide	Bewertungsziffer	Name	Mitochondrien	
				Anreicherungsverhältnis Überexpression/Kontrolle	Anreicherungsverhältnis Endogen/Kontrolle
ENSP00000216121	2	106	NIPSNAP1	291,4	0,0
ENSP00000216489	7	344	<i>ALKBH1</i>	225,3	2,9
ENSP00000313050	3	111	GBAS	23,6	0,0
ENSP00000368030	9	417	ATAD3A	21,1	0,0
ENSP00000245812	4	186	ALKBH7	11,7	3,3
ENSP00000301071	2	93	TUBA1A	10,9	3,1

4.1.4 Mögliche Interaktionspartner von AlkBh1

4.1.4.1 ATAD3A

ATAD3A (ATPase family AAA domain-containing protein 3A) ist ein Mitglied der ATAD3 Familie, eine ATPase Proteinfamilie, die eine AAA Domäne enthält. ATAD3A ist ein mitochondriales Transmembranprotein, bei dem die ATPase-Domäne in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist [Abbildung 4-9, (S. Li & Rousseau, 2012)]. Im humanen Genom konnten sowohl ATAD3A als auch ATAD3B als Proteine identifiziert werden. Die endogene Funktion der ATAD3 Familienmitglieder konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass ATAD3A zeitweise an die mitochondriale DNA bindet (He et al., 2012). Des Weiteren wurde eine Funktion von ATAD3A bei der mitochondrialen Proteinsynthese beschrieben, dabei bindet ATAD3A auch an die mitochondrialen Ribosomen (He et al., 2012).

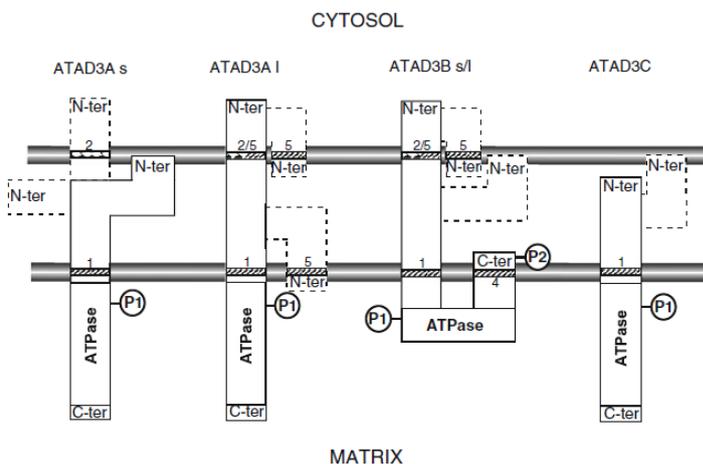


Abbildung 4-9 Lokalisation und Aktivität der ATAD3 Familie in den Mitochondrien

Die ATAD3 Familienmitglieder sind mitochondriale Transmembranproteine, die eine ATPase Domäne besitzen, die in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Diese Proteinfamilie ist zusätzlich in der äußeren und in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Quelle: (S. Li & Rousseau, 2012)

Um die Interaktion von ATAD3A und AlkBh1 genauer zu untersuchen, wurden weitere Ko-IP-Experimente mit α -ATAD3 Antikörper (AK) und α -AlkBh1 AK durchgeführt. Zusätzlich wurde die intra-mitochondriale Lokalisation der beiden Proteine mittels hochauflösenden Mikroskop (3D-SIM) untersucht.

Der von Frau Dr. Kremmer (IMI, Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellte Antikörper α -ATAD3A [FLJ 4D5, (Goller, Seibold, Kremmer, Voos, & Kolanus, 2013)] wurde auf die Spezifität für ATAD3A und ATAD3B im Western Blot getestet. Dazu wurden vier unterschiedliche HEK293T Zelllysate auf ein SDS-Gel aufgetragen (untransfizierte Zellen als endogenes Zelllysate, transfizierte Zellen mit transient exprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1), ATAD3A (ATAD3A_Flag) oder ATAD3B (ATAD3B_Flag), (Abbildung 4-10 A).

Auf dem Blot mit dem α -ATAD3 Antikörper ist erkennbar, dass in allen vier Fraktionen eine endogene Bande für ATAD3A zu sehen ist. Jedoch nur bei der Fraktion ATAD3A_Flag kann eine zusätzliche Bande detektiert werden, die dem ATAD3A + Flag-tag (~2kDa) entspricht (Abbildung 4-10 A, oranger Stern). Flag-getaggtetes ATAD3B scheint vom α -ATAD3A AK nicht erkannt zu werden, obwohl ein deutliches Signal mit dem Flag-Antikörper zu detektieren ist (Abbildung 4-10 A, B).

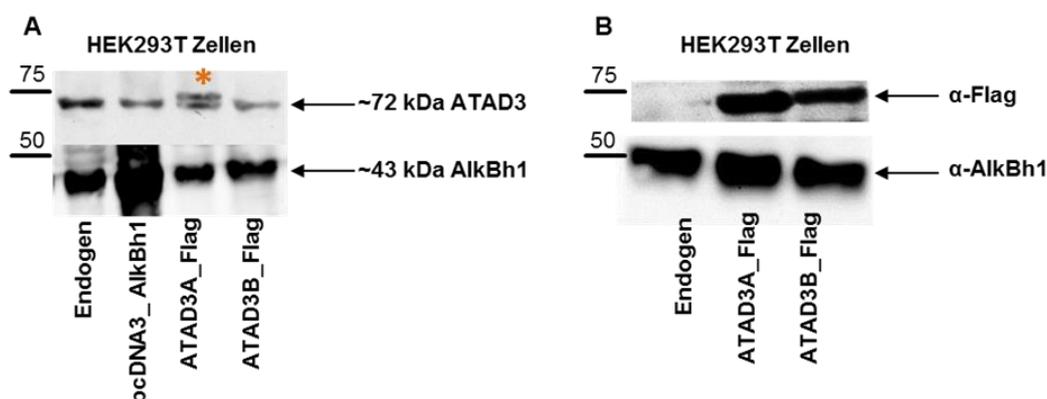


Abbildung 4-10 Antikörpervalidierung von α -AlkBh1 und α -ATAD3A AK in HEK293T mittels WB

A. Unterschiedliches Expressionslevel von AlkBh1 und ATAD3A bzw. ATAD3B in HEK293T gegengefärbt mit α -ATAD3A AK und α -AlkBh1 AK. B. HEK293T Zellen untransfiziert und transient transfiziert mit Flag getaggttem ATAD3A oder ATAD3B, gegengefärbt mit α -Flag und α -AlkBh1 AK. Es wurde für AlkBh1 der α -AlkBh1_EPR6176, für ATAD3A der FLJ 4D5 Antikörper und für den Flag-tag der α -Flag M2 AK zur Proteinbestimmung verwendet. Oranger Stern zeigt Doppelbanden für ATAD3A-Flag (endogenes und überexprimiertes Protein)

Dr. Gitta Heinz (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz Zentrum München) konnte die Interaktion von endogenem AlkBh1 mit ATAD3A in einer weiteren α -AlkBh1-IP aus isolierten Mitochondrien validieren (Abbildung 4-11).

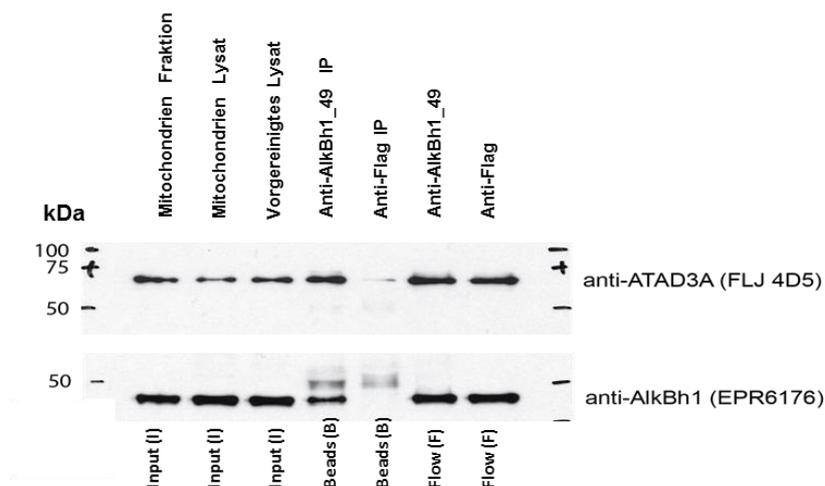


Abbildung 4-11 Validierung der Interaktion von AlkBh1 und ATAD3A in isolierten Mitochondrien aus HEK293T Zellen

α -AlkBh1 Immunpräzipitation aus isolierten Mitochondrien (HEK293T Zellen) mit α -AlkBh1 Antikörper und α -Flag-IP als Isotypkontrolle IgG. Western Blot gegengefärbt mit α -ATAD3A AK (FLJ 4D5 Antikörper) und α -AlkBh1 AK (EPR6176). Versuch durchgeführt von Dr. Gitta Heinz (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz Zentrum München)

Es wurden Kofärbungen mittels Immunfluoreszenz von endogenem AlkBh1 und ATAD3A in verschiedenen Zelllinien, die mit Hilfe des hochauflösenden „3D-structured Illumination microscopy“ (3D-SIM), (Schermelleh, Heintzmann, & Leonhardt, 2010) ausgewertet (in Kooperation mit Andreas Maiser, AG Prof. Dr. Leonhardt, LMU, München).

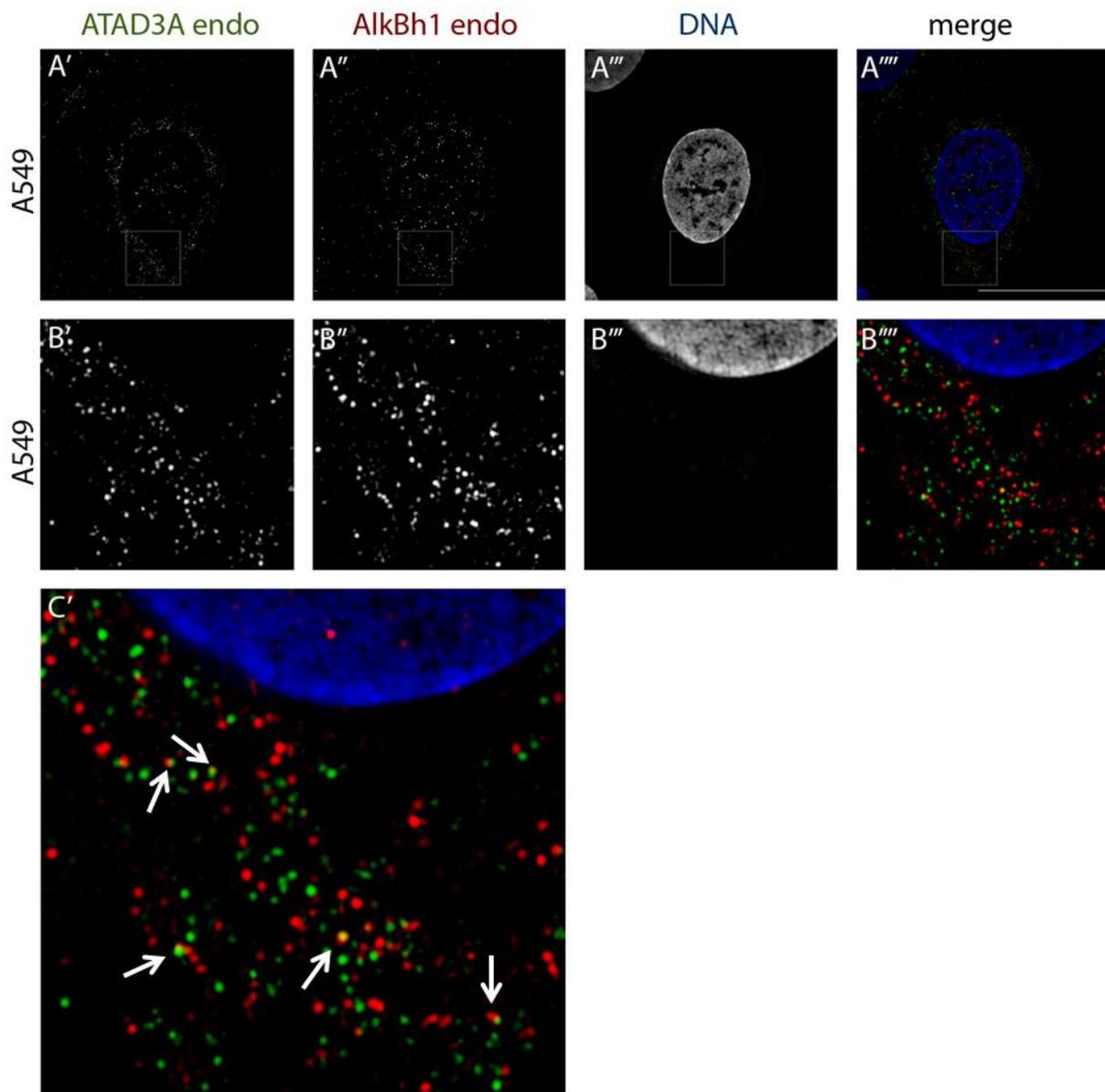


Abbildung 4-12 Bestimmung der Überlagerung von endogenem AlkBh1 mit ATAD3A in A549 Zellen mittels IF

A.'- B.''''' A549 Zellen zeigen endogenes AlkBh1 (rot) und endogenes ATAD3A (grün), C.' Überlagerung von AlkBh1 mit ATAD3A, weiße Pfeile. C.' ist die Vergrößerung von B.'''''; Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (EPR6176, rot) und α -ATAD3A AK (FLJ 4D5, grün) kogefärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). 3D-SIM, Maßstab 20 μ m

Abbildung 4-12 zeigt A549 Zellen, die endogenes AlkBh1 (α -AlkBh1_EPR6176 in rot) und ATAD3A (α -ATAD3A_FLJ4D5 in grün) kogefärbt haben. Eine gelegentliche Überlagerung von ATAD3A und AlkBh1 konnte detektiert werden (Abbildung 4-12 C', weiße Pfeile). Die gleichen Ergebnisse konnten auch in HeLa Zellen beobachtet werden (Abbildung 4-13).

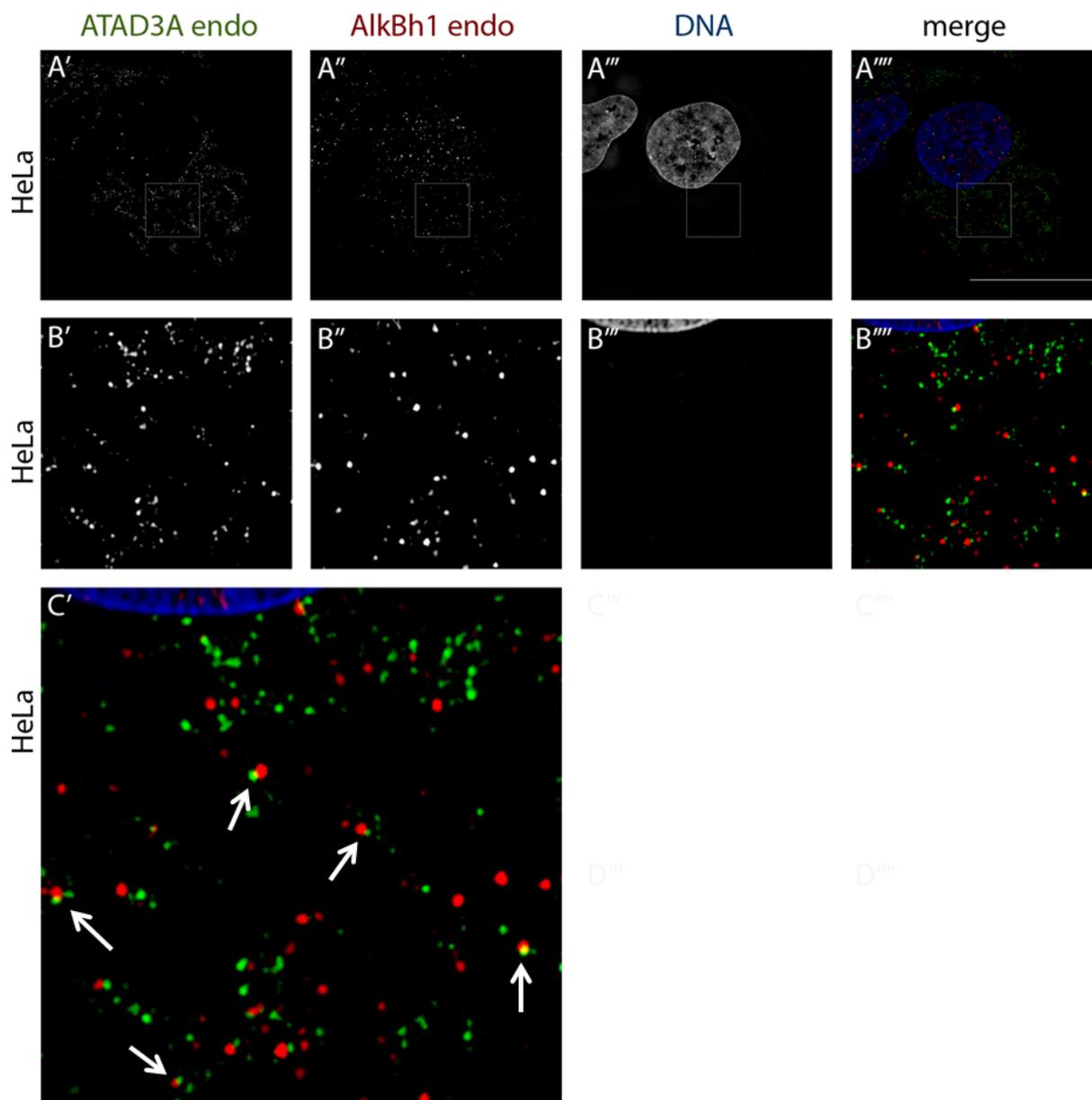


Abbildung 4-13 Bestimmung der Überlagerung von endogenem AlkBh1 mit ATAD3A in HeLa Zellen mittels IF

A.'- B.''''' HeLa Zellen zeigen endogenes AlkBh1 (rot) und endogenes ATAD3A (grün), C.' ist eine Vergrößerung von B.'''''; gelegentliche Überlagerung von AlkBh1 mit ATAD3A, weiße Pfeile. Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (EPR6176, rot) und α -ATAD3A AK (FLJ 4D5, grün) kofärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). 3D-SIM, Maßstab 20 μ m

4.1.4.2 AlkBh7

Bei der α -AlkBh1-IP (Antikörper-IP, siehe Kapitel 4.1.3) mit anschließender Auswertung mittels Massenspektrometrie wurde auch die 2-OG-Oxygenase AlkBh7 als potentieller Interaktionspartner in der mitochondrialen Fraktion ermittelt. Um diese Interaktion zu validieren, wurden unterschiedliche Experimente mit überexprimiertem, ungetaggttem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) und überexprimiertem, ungetaggttem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) durchgeführt.

Es wurde eine α -AlkBh7-IP (α -AlkBh7_38 Antikörper siehe Kapitel 6.6) aus ganzem Zelllysate (HEK293T) durchgeführt. Mittels WB konnte gezeigt werden, dass in der α -AlkBh7-IP-Beadsfraktion sowohl AlkBh7 als auch AlkBh1 angereichert werden konnte (Abbildung 4-14).

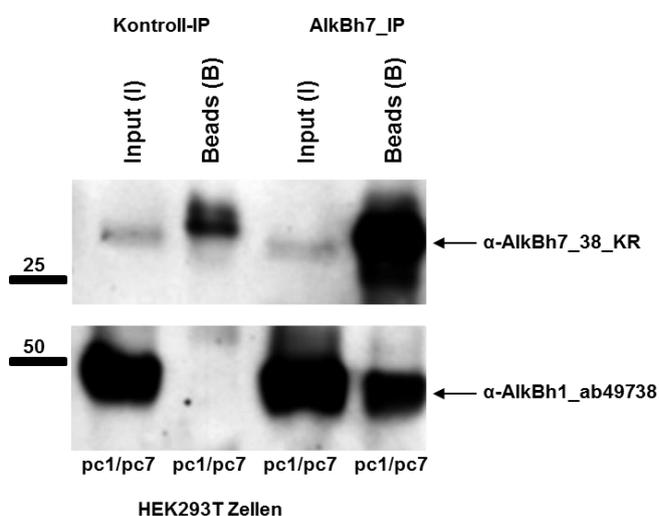


Abbildung 4-14 Validierung der Interaktion von überexprimiertem AlkBh1 und AlkBh7 aus ganzem Zelllysate (HEK293T Zellen) mittels Antikörper-IP

α -AlkBh7 (7_38; 12D10) Antikörper Pulldown aus ganzem Zelllysate (HEK293T) mit transient ungetaggttem, überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) und AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7). Western Blot gegengefärbt mit α -AlkBh7 AK (AlkBh7_38, 12D10) und α -AlkBh1 AK (EPR6176). I = Input, verwendetes Zelllysate; B = Beads, auf den Beads angereicherte Proteine

Die mögliche Überlagerung mittels Immunfluoreszenz von ungetaggttem, überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) und AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) wurde mit dem 3D-SIM analysiert (Abbildung 4-15 A'-D'''). Die beiden Proteine zeigen eine ähnliche Verteilung und sind häufig überlagert (Abbildung 4-15 E', weiße Pfeile). Es sind aber auch Bereiche erkennbar, in denen sowohl AlkBh1 als auch AlkBh7 unabhängig voneinander in der Zelle auftreten (Abbildung 4-15 B''', D''', E').

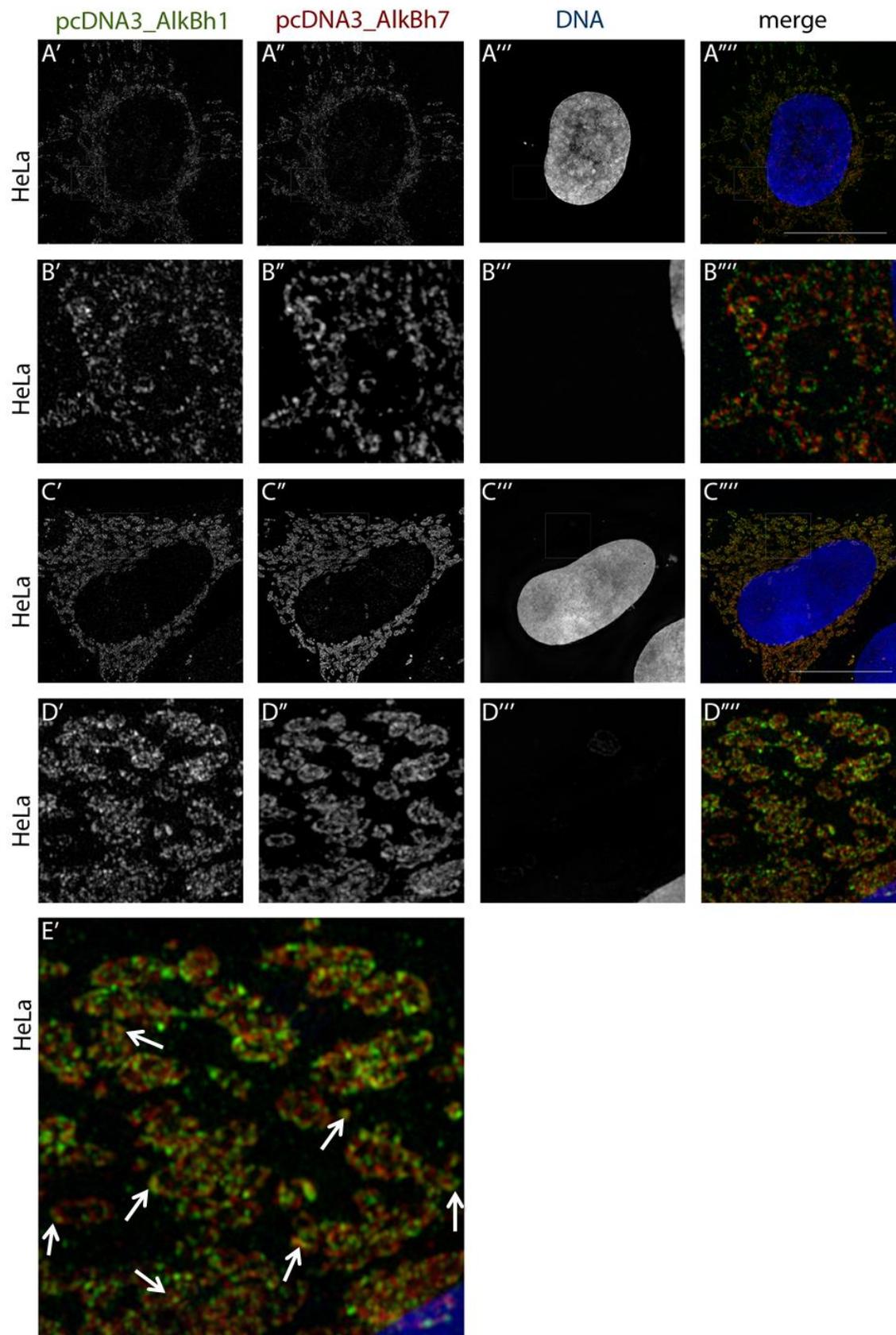


Abbildung 4-15 Kofärbung von ungetaggetem überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) mit AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) in HeLa Zellen mittels IF

A.- B., C.-D. HeLa Zellen zeigen transient überexprimiertes, ungetaggetes AlkBh1 (AlkBh1_pcDNA3, grün) und AlkBh7 (AlkBh7_pcDNA3, rot), E. ist eine Vergrößerung von D und zeigt Überlagerung von überexprimiertem AlkBh1 und AlkBh7, weiße Pfeile. Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (ab49738, grün) und α -AlkBh7 AK (7_KL, rot) kofärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). 3D-SIM, Maßstab 20 μ m

4.1.5 Intra-Mitochondriale Lokalisation von AlkBh1

Die Mitochondrien besitzen ihre eigene DNA. Dadurch findet in Mitochondrien auch Replikation, Transkription und Translation statt (St John, Facucho-Oliveira, Jiang, Kelly, & Salah, 2010). Da andere humane AlkB-Homologe in die Modifikation bzw. Reparatur der RNA/DNA im Zellkern involviert sind (Ougland et al., 2015), ist für AlkBh1 auch mitochondriale DNA oder RNA als Substrat denkbar.

Die mtDNA ist innerhalb der mitochondrialen Matrix in Nukleoiden (DNA-Protein-Komplex) verpackt, die durch Ankerproteine wie z.B. ATAD3 an der Innenmembran der Mitochondrien befestigt sind (St John et al., 2010). Im Nukleoid sind sowohl mtDNA Verpackungsproteine (TFAM, Twinkle) als auch Proteine die zur Aufrechterhaltung der Replikation und Transkription benötigt werden, enthalten (POLG = DNA *polymerase subunit gamma-1*; mtSSBP = *Single strand binding protein*) [siehe Abbildung 4-16 A, (St John et al., 2010)].

Das humane mitochondriale Genom ist ringförmig und ~16.6kb groß. Es kodiert 37 Gene, davon 13 Proteine, zwei ribosomale RNAs sowie 22 tRNAs (Abbildung 4-16 B), die für die Translation der 13 Proteine erforderlich sind. Diese Proteine werden für die OXPHOS (oxidative Phosphorylierung) benötigt, die auch als Atmungskette bezeichnet wird [siehe Abbildung 4-16 , Abbildung 4-34, (Schon, DiMauro, & Hirano, 2012)].

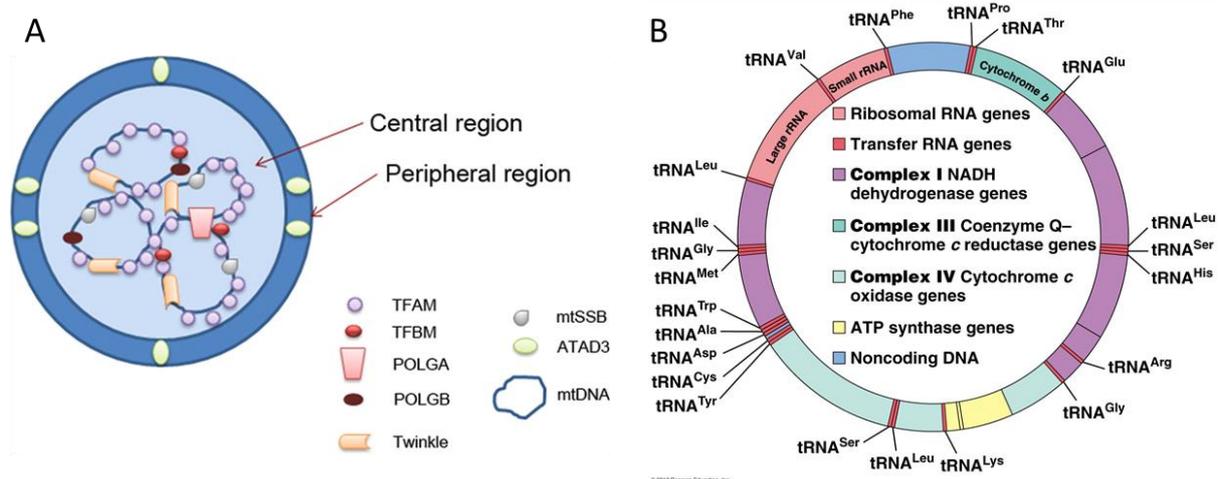


Abbildung 4-16 Strukturelles Modell eines mitochondrialen Nukleoids und detaillierter Aufbau der mitochondrialen DNA mit kodierbaren Genen

A. Die mitochondriale DNA bildet mit unterschiedlichen Proteinen einen DNA-Protein-Komplex, der als Nukleoid bezeichnet wird. Proteine, wie TFAM, mtSSBP und Twinkle werden zur Aufrechterhaltung der Transkription und Replikation benötigt. Die ATAD3 Proteinfamilie sitzt außerhalb in der Peripherie und hat scheinbar eine Funktion bei Transkription und Translation. Quelle: (St John et al., 2010); B. Zirkuläre mitochondriale DNA mit kodierbaren Genen in den Mitochondrien, 13 Proteine, 22 transfer RNA's und zwei ribosomale RNA's. Quelle: <http://jonlieffmd.com/wp-content/uploads/2014/01/mtDNA-.jpg>

Die Anzahl der beteiligten Proteine an der Transkription bzw. Replikation der mitochondrialen DNA wird auf rund 30 geschätzt. Die einzelnen Nukleotide variieren in Größe und Anzahl von Zelle zu Zelle (St John et al., 2010). Wie die mitochondriale DNA aufgebaut ist und welche Funktionen diese in den Mitochondrien einnimmt wird in Kapitel 4.1.9 und Abbildung 4-34 genauer beschrieben.

Abbildung 4-17 A zeigt, wie Transkription der mitochondrialen DNA in Nukleoiden und die anschließende Translation dieser Proteine in den Mitochondrien stattfindet (Aufbau der Nukleotide: Abbildung 4-16 A). Die mitochondriale Proteinbiosynthese findet in den RNA Granules statt, die räumlich an die Nukleotide angrenzen [(Antonicka & Shoubbridge, 2015; Tu & Barrientos, 2015), Abbildung 4-17 B].

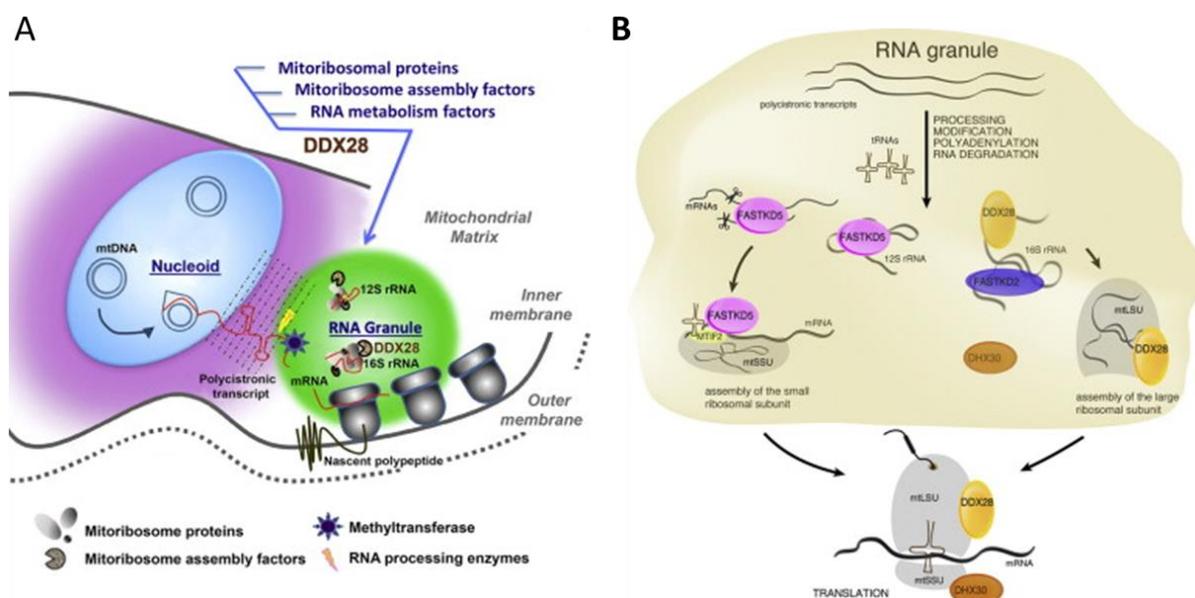


Abbildung 4-17 Überblick über den Aufbau der Nukleotide und mitochondriale RNA Granules

A. Schema über das Zusammenspiel von Nukleoid (mtDNA-Protein Komplex) und RNA Granula (Tu & Barrientos, 2015); B. Aufbau und Ablauf der mitochondrialen Proteinbiosynthese in Granules der Mitochondrien, mit Markerproteinen FASTKD2 (lila) und FASTKD5 (pink), (Antonicka & Shoubbridge, 2015)

Wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt wurde, interagiert AlkBh1 mit ATAD3A und AlkBh7 (Abbildung 4-18). ATAD3A hat eine mögliche Funktion bei der Replikation der mitochondrialen DNA (mtDNA) und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Proteinbiosynthese in den Mitochondrien (He et al., 2012). Deshalb wurden weitere Kolokalisationsstudien mit mitochondrialen Markerproteinen durchgeführt, die Aufschluss über die genaue Lokalisation und Funktion von AlkBh1 aufzeigen sollten.

Für die in den Mitochondrien ablaufende Replikation und Transkription wurden mtSSBP und TFAM als Marker verwendet. Zusätzlich wurde AlkBh1 in Zellen mit einem mtDNA Antikörper

gefärbt. FASTKD2 wurde als Markerprotein für die Lokalisation in den RNA Granules, verwendet. Schließlich wurde Hsp60 als Marker für die mitochondriale Matrix verwendet.

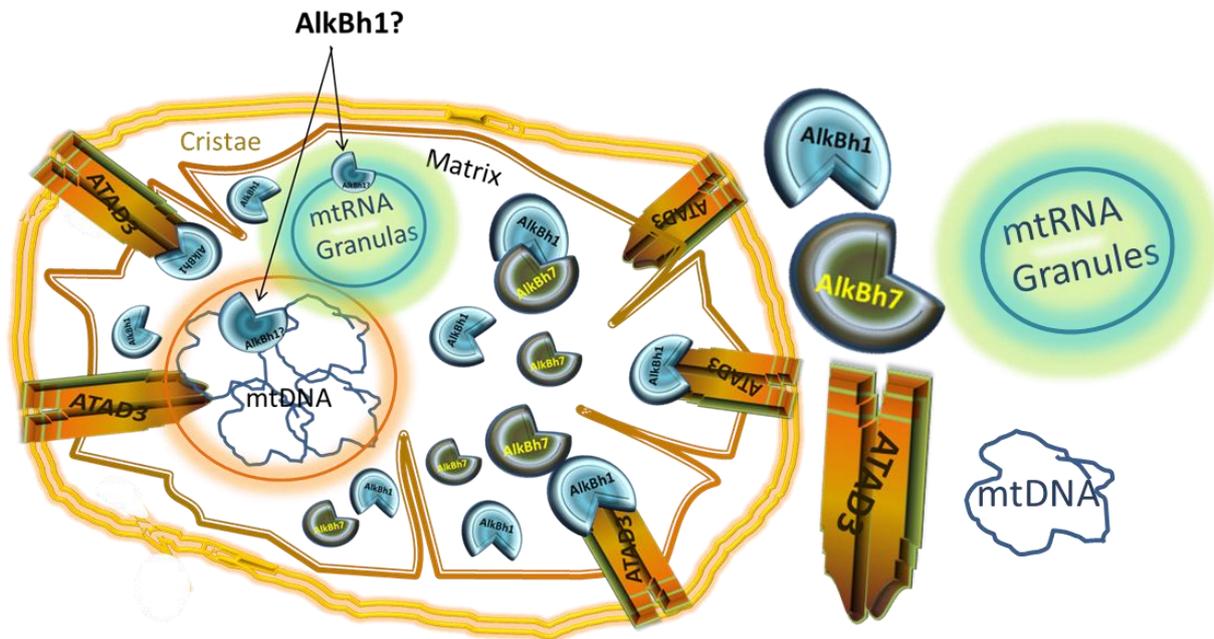


Abbildung 4-18 Mitochondrium mit möglicher Lokalisation von AlkBh1

Modell eines Mitochondriums mit den möglichen Interaktionspartnern von AlkBh1 (AlkBh7 und ATAD3A), und der möglichen Substratwahl (mitochondriale DNA oder RNA).

4.1.5.1 TFAM

TFAM (*Mitochondrial transcription factor A*) ist das Verpackungsprotein der mtDNA, mit der Funktion die mitochondriale DNA aufzuwinden und sie kompakt zu verpacken (Kanki et al., 2004; St John et al., 2010).

Abbildung 4-19 zeigt eine Kofärbung der beiden Proteine TFAM und AlkBh1 in A549 Zellen auf endogenem Level. AlkBh1 ist sowohl im Zellkern als auch punktiert im Zytoplasma detektierbar (Abbildung 4-19 A“, B“). TFAM ist im Zytoplasma lokalisiert und scheint teilweise in „Knötchen“ zu akkumulieren (Abbildung 4-19 A’, oranger Stern). Diese Ansammlung von TFAM führt wahrscheinlich zur Formung eines größeren mitochondrialen Nukleoids, das zur Replikation der mtDNA nötig ist (Kukat et al., 2015). AlkBh1 scheint darum herum angelagert zu sein (Abbildung 4-19, orange Sterne).

Gelegentlich überlagern sich TFAM und AlkBh1 (Abbildung 4-19 C’ weiße Pfeile). In vielen Bereichen ist jedoch ausschließlich AlkBh1 oder TFAM detektierbar (Abbildung 4-19 C’). Zusätzlich wurde unabhängig voneinander, eine α -AlkBh1-IP und α -TFAM-IP aus mitochondrialem Lysat (isolierten Mitochondrien) von Olga Swolski (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz

Zentrum München) durchgeführt. Es konnte in beiden IP's das jeweilige andere Protein in geringen Mengen angereichert werden (Abbildung 4-19 D, blaue Sterne). Als Antikörperkontrolle wurde eine spezifische Isotypkontrolle (IgG) verwendet, für die auch ein schwaches unspezifisches Signal für TFAM angereichert werden konnte, jedoch ist dieses Signal deutlich geringer als das Signal der spezifischen IP (Abbildung 4-19 D).

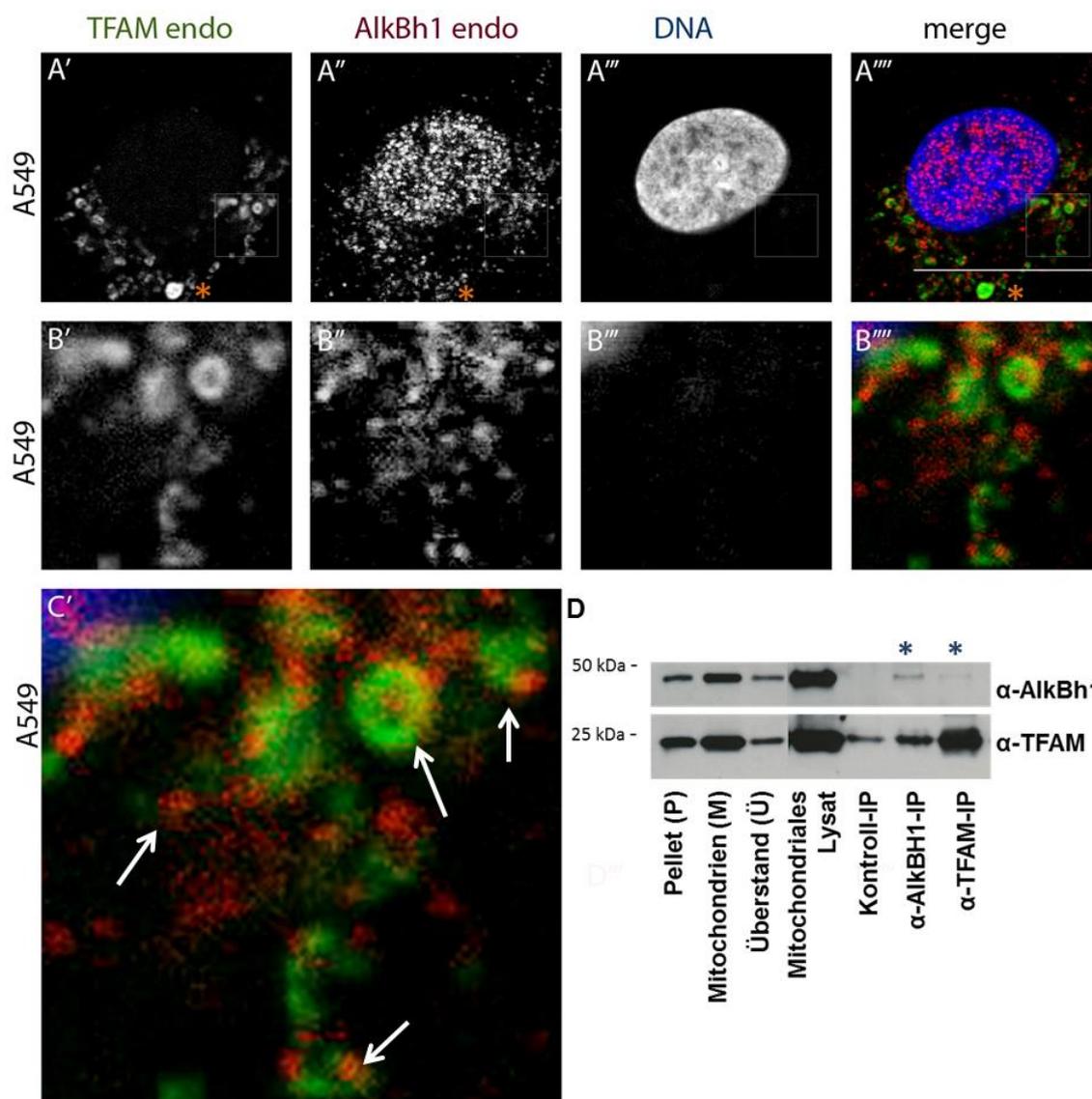


Abbildung 4-19 Bestimmung der Kolo-kalisation von endogenem AlkBh1 mit TFAM in A549 Zellen mittels IF und Überprüfung der direkten Interaktion mittels Ko-IP

A.'- B.''' A549 Zellen zeigen endogenes AlkBh1 (rot) und endogenes TFAM (grün), C.' Vergrößerung von B.''' und zeigt eine gelegentliche Überlagerung von AlkBh1 mit TFAM, weiße Pfeile; Orange Sterne zeigen Akkumulation von TFAM (grün) in „Knötchen“ im Vergleich zu AlkBh1 (rot). Die beiden Proteine wurden mit α-AlkBh1 AK (EPR6176, rot) und α-TFAM AK (grün) kogefärbt; DNA mit DAPI (1µg/ml, blau). Konfokale Schnitte, Maßstab 20µm. D. Ko-IP's: α-AlkBh1-IP (ab49738) und α-TFAM-IP (ab119684) aus mitochondrialem Lysat (isolierte Mitochondrien aus HEK293T). Western Blot mit α-AlkBh1 (EPR6176) und α-TFAM (ab119684) gegengefärbt im Vergleich zu Kontrollen (blaue Sterne zeigen Anreicherung von AlkBh1 und TFAM nach der jeweiligen IP). Versuch in D. wurde von Olga Swolski (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz Zentrum) durchgeführt.

Da TFAM ähnliche Aufgaben wie die eines Histons an der mitochondrialen DNA einnimmt (Kanki et al., 2004) und AlkBh1 scheinbar in bestimmten Zellen an H2A im Zellkern bindet [(Ougland et al., 2012) und Abbildung 4-20 A und B], wurden die Sequenzen der beiden humanen Proteine TFAM (Q00059) und H2A (Q96QV6) miteinander verglichen. Das Lysin der H2A Sequenz, das durch AlkBh1 modifiziert wird, ist in der Sequenz von TFAM konserviert (Abbildung 4-20 C, blaue Sterne).

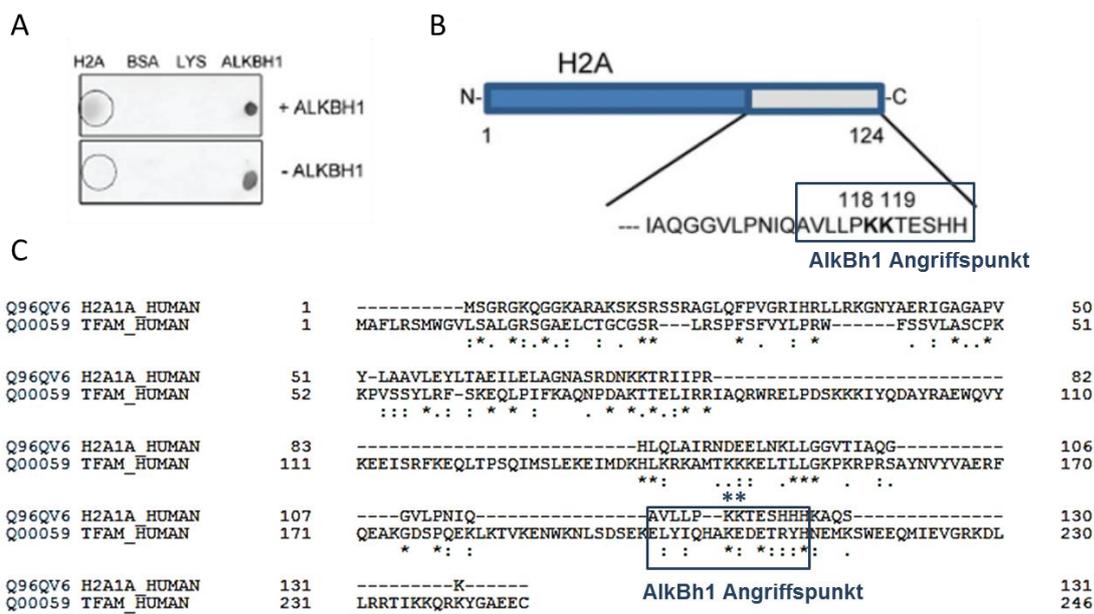


Abbildung 4-20 Mögliche Interaktion von AlkBh1 mit H2A und TFAM

A. Dot Blot zeigt potentielle Interaktion mit H2A mit AlkBh1 in embryonalen Mausfibroblasten (Ougland et al., 2012); B. Zeigt die Modifikationsstelle von AlkBh1 am Lysin des H2A Proteins, angepasst an (Ougland et al., 2012); C. zeigt ein *Alignment* von humanem H2A (Q96QV6) mit TFAM (Q00059), (*Alignment* mit www.uniprot.org durchgeführt), blaue Sterne zeigen den AlkBh1 Angriffspunkt

4.1.5.2 mtSSBP

Das Protein mtSSBP (mitochondriales *single strand binding Protein*, einzelsträngiges Bindeprotein) bindet während der Replikation an die einzelsträngige mtDNA und hilft beim Aufwickeln und bei der Stabilität [Abbildung 4-16, (St John et al., 2010)].

Die Färbung von endogenem mtSSBP zeigt knötchenartige Ansammlungen dieses Proteins (Abbildung 4-21 A“, B“, orange Sterne). AlkBh1 ist um diese Akkumulation angelagert (Abbildung 4-21 A’, A“, B’, B“, orange Sterne). Jedoch kann man vereinzelt Überlagerungen von mtSSB Protein und AlkBh1 auf endogenem Level in A549 Zellen erkennen (Abbildung 4-21C’ weiße Pfeile). Dieses Ergebnis unterstützt die mögliche Interaktion von AlkBh1 und mtSSBP, die bereits von (Wollen Steen et al., 2012) publiziert wurde.

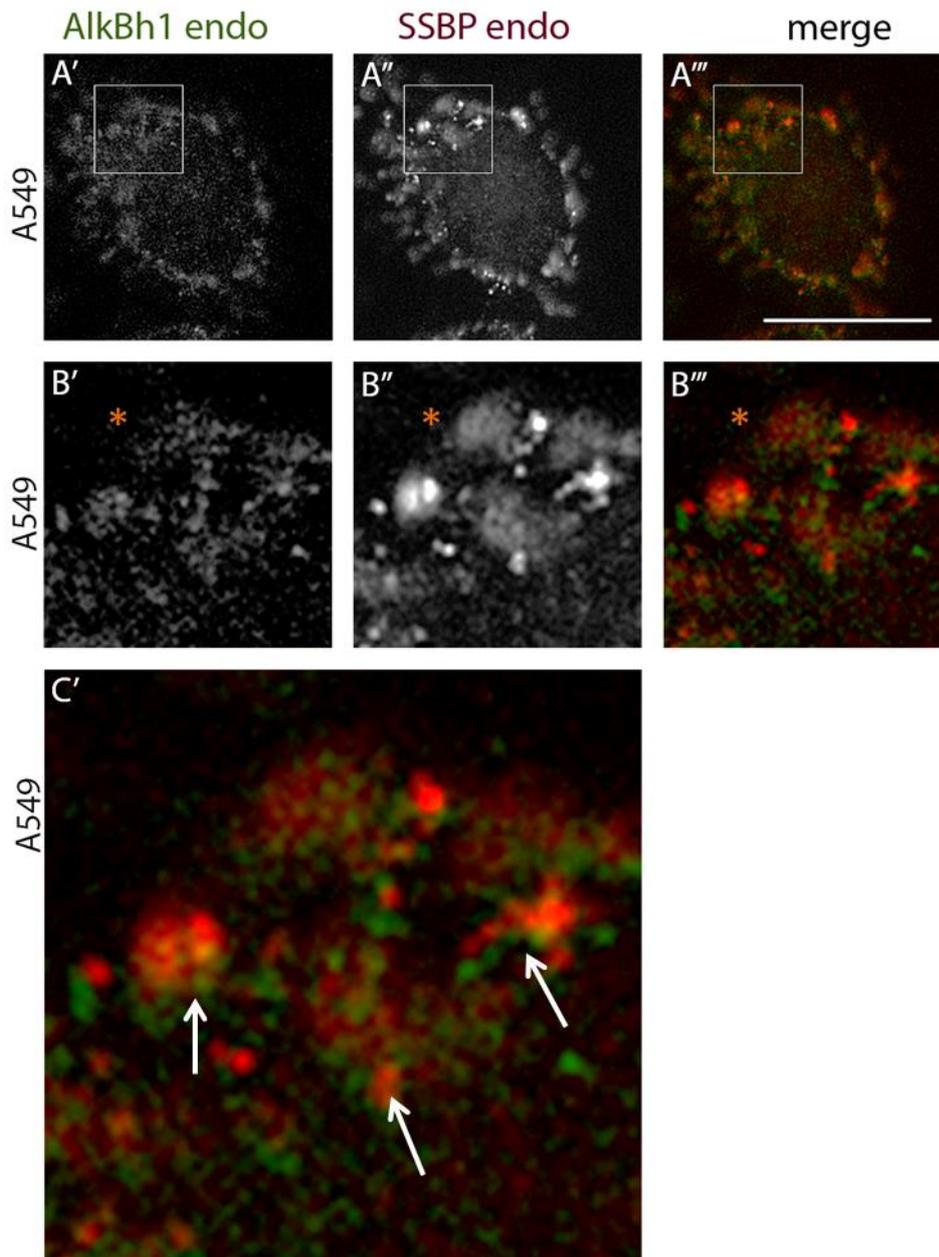


Abbildung 4-21 Bestimmung der Kolokalisation von endogenem AlkBh1 mit mtSSBP in A549 Zellen mittels IF

A.-B. A549 Zellen zeigen endogenes AlkBh1 (grün) und endogenes mtSSBP (rot), C. ist eine Vergrößerung von B. Überlagerung von AlkBh1 mit mtSSBP, weiße Pfeile; Orange Sterne zeigen Akkumulation von mtSSBP (rot) in „Knötchen“ im Vergleich zu AlkBh1 (grün). Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1₄₉ AK, grün) und α -mtSSBP AK (rot) kofärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Fluoreszenzmikroskop, Maßstab 20 μ m.

Die Überexpression von AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) in HeLa Zellen mit Kofärbung von endogenem mtSSB Protein, wurde mit dem hochauflösenden 3D-SIM analysiert (Abbildung 4-22). Wie in Abbildung 4-22 C (weiße Pfeile) gezeigt, scheinen überexprimiertes AlkBh1 mit endogenem mtSSB Protein relativ häufig zu überlagern (wenn man den Fokus auf das SSBP Signal festlegt).

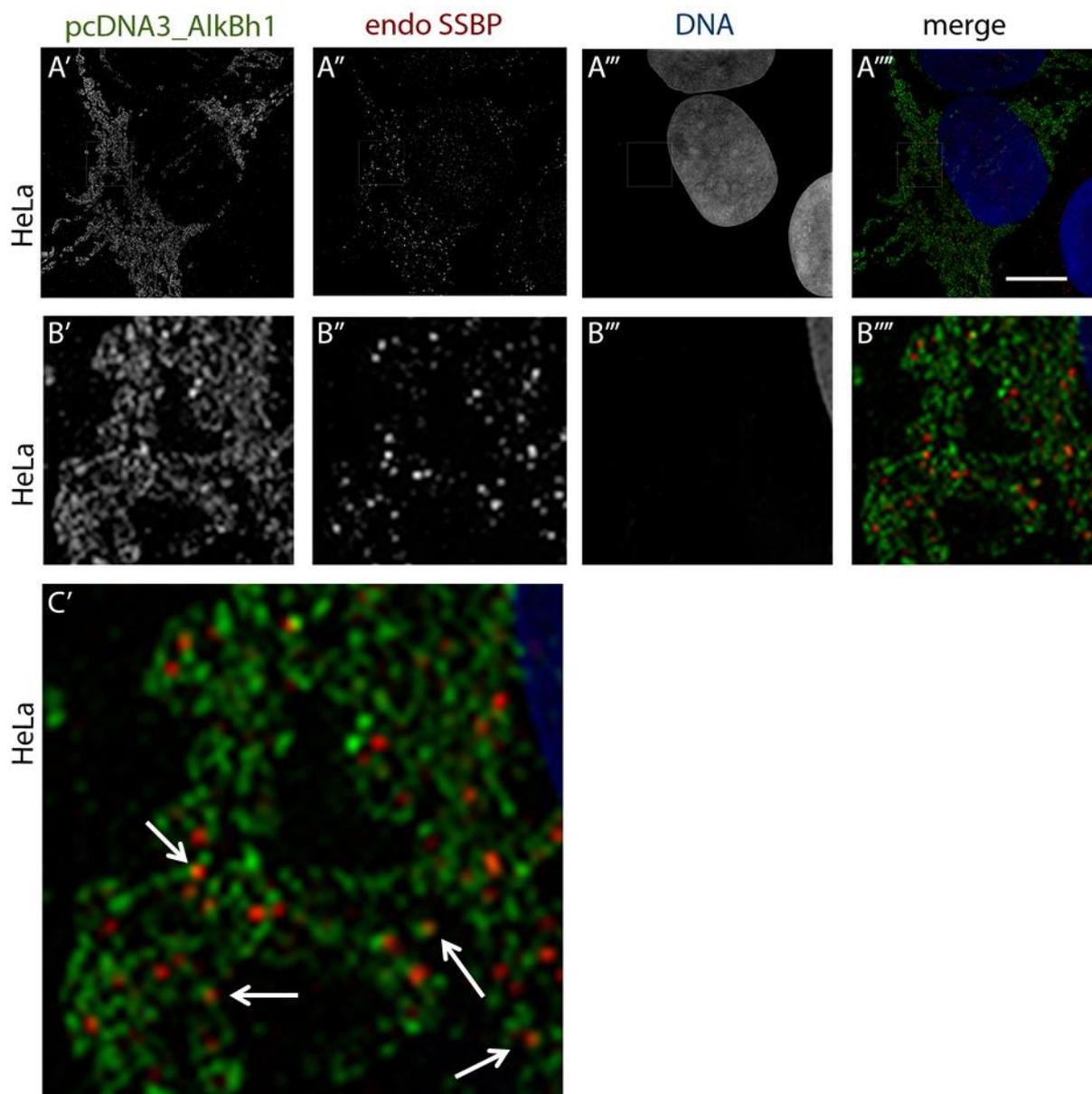


Abbildung 4-22 Kolokalisation von ungetaggttem überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) mit endogenem mtSSBP in HeLa Zellen mittels IF

A.'- B.'''', HeLa Zellen zeigen transient überexprimiertes ungetaggttes AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1, grün) und endogenes mtSSBP (rot). C.' ist eine Vergrößerung von B.''' und zeigt eine relativ häufige Überlagerung von überexprimiertem AlkBh1 und endogenem mtSSBP, weiße Pfeile. Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (ab49738, grün) und α -mtSSBP AK (rot) kogefärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). 3D-SIM, Maßstab 20 μ m

4.1.5.3 mtDNA

A549 Zellen wurden mit α -AlkBh1 AK (EPR6176) und α -mtDNA AK (α -DNA Antikörper Progen 61014) kogefärbt und mittels 3D-SIM ausgewertet. Der α -DNA-Antikörper zeigt eine punktuelle Färbung im Zytoplasma und vereinzelt Signal im Zellkern (Abbildung 4-23 A', B', C', D'). Für den α -AlkBh1 Antikörper ist ein ähnliches Signal in der Zelle detektierbar (Abbildung 4-23 A'', B'', C'', D''). AlkBh1 zeigt mit der mtDNA nur selten eine Überlagerung (Abbildung 4-23 A''', B''', C''', D''', E', weiße Pfeile).

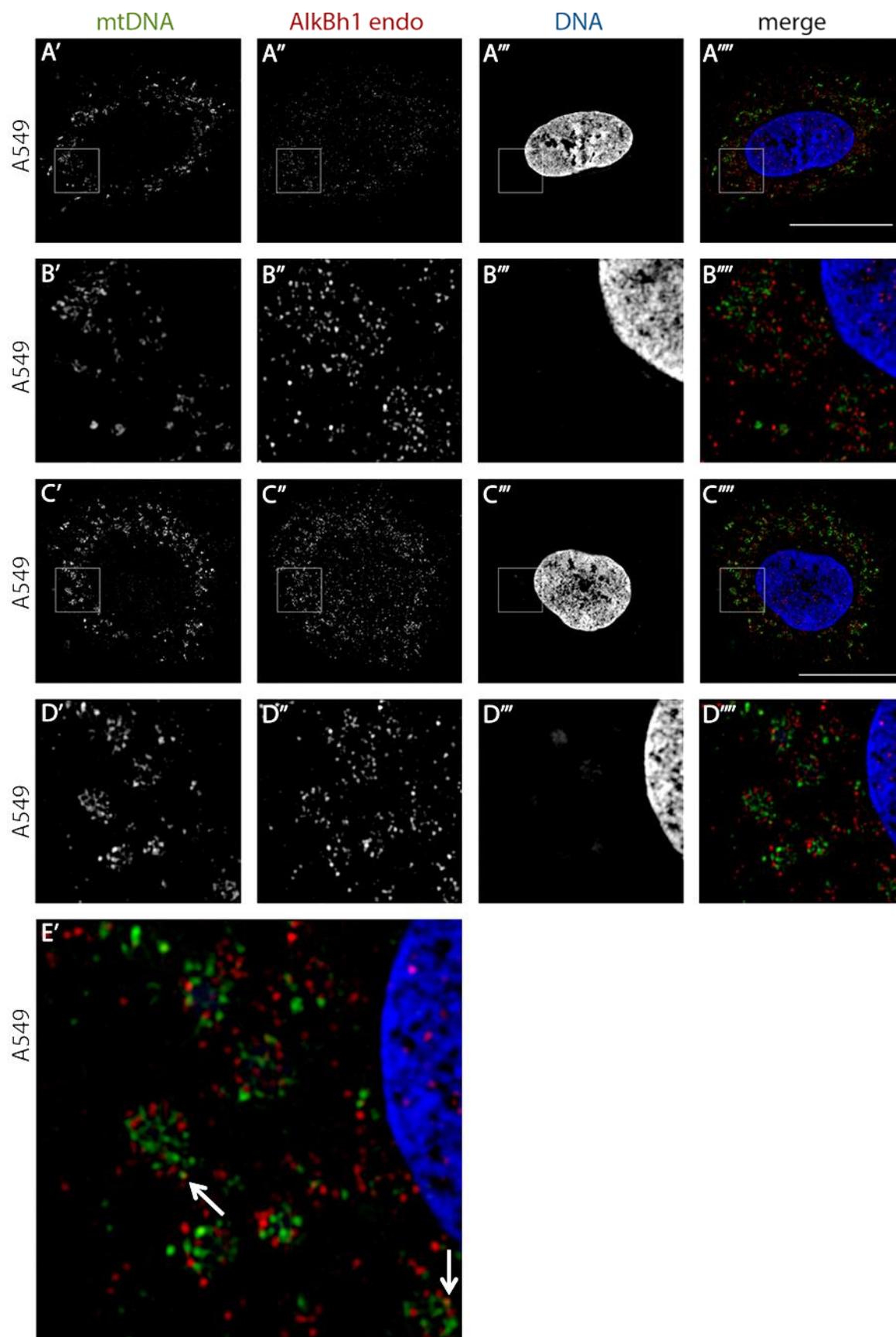


Abbildung 4-23 Bestimmung der Überlagerung von endogenem AlkBh1 mit mtDNA in A549 Zellen mittels IF

A.-B., C.-D. A549 Zellen zeigen keine Kofärbung von endogenem AlkBh1 (rot) und mtDNA (grün), E. ist eine Vergrößerung von D. und zeigt die Überlagerung von AlkBh1 mit mtDNA, weiße Pfeile. Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (EPR6176, rot) und α -mtDNA AK (Progen, grün) kogefärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). 3D-SIM, Maßstab 20 μ m

Nachweis von mtDNA Bindung mittels PCR und Dot Blot

Abbildung 4-24 A zeigt die Amplifikation von mtDNA mittels PCR (Primerpaar für DNA Nukleotide F1234-R1769) nach Crosslinking mit Formaldehyd (siehe Kapitel 6.14) und durchgeführter α -TFAM-IP, Kontroll-IP und eingesetztem Lysat (Input der IP). Wie erwartet ist für die Positivkontrolle α -TFAM-IP eine prominente Bande sichtbar, da TFAM an die mitochondriale DNA bindet. Das eingesetzte mitochondriale Lysat führt auch zu einer detektierbaren Bande. In der Kontroll-IP dagegen, ist nur ein geringes Signal zu erkennen (Abbildung 4-24 A, Versuch durchgeführt von Olga Swolski, AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz München).

Bei der α -AlkBh1-IP aus isolierten Mitochondrien (HEK293T) wurde der α -Flag Antikörper als Isotypkontrolle und als Negativkontrolle verwendet. Beide IP's führen nach der Amplifikation mittels PCR mit den Primern (F1234-R1769, siehe Kapitel 6.14) zu vergleichbaren schwachen Banden. AlkBh1 verhält sich in diesem Versuch mehr wie die Negativkontrolle. Die Bande aus dem verwendeten Input (isolierte Mitochondrien) zeigt dagegen eine Amplifikation der mtDNA (Abbildung 4-24 B, Versuche durchgeführt von Olga Swolski, AG Dr. Wolf, Helmholtz München durchgeführt).

Das verwendete Primerpaar (F1234-R1769) erfasst nicht alle Bindemöglichkeiten an die mtDNA. Deshalb wurde von Olga Swolski zusätzlich der Dot Blot als Nachweis der möglichen Interaktion von AlkBh1 und der mtDNA etabliert, durchgeführt und ausgewertet (siehe Kapitel 6.14). Für diese Methode wurden die gleichen IP Proben wie für die PCR Amplifikation verwendet.

Der Dot Blot mit der α -TFAM-IP im Vergleich zur Kontroll-IP wurde mit α -DNA-Antikörper gegengefärbt und zeigt eine prominente Bande für TFAM im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4-24 C). Für die α -AlkBh1_IP konnte keine signifikantes Signal im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 4-24 D).

Es konnte in drei unabhängigen Versuchen keine direkte Interaktion bzw. Kolokalisation von endogenem AlkBh1 mit mitochondrialer DNA in A549, HeLa und HEK293T Zellen gezeigt werden.

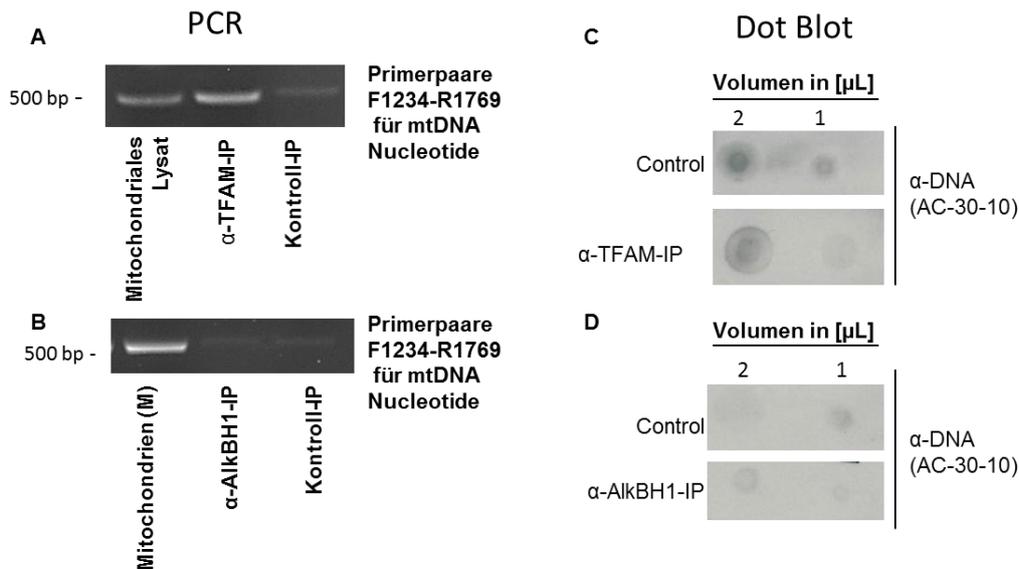


Abbildung 4-24 PCR Amplifikation und Dot Blot zur Überprüfung einer möglichen Interaktion von AlkBh1 und mtDNA

A. PCR Amplifikation von mtDNA Nucleotiden (Primerpaar F1234-R1769) aus mitochondrialem Lysat (=Input), α -TFAM-IP im Vergleich zur Kontroll-IP; B. PCR Amplifikation von mtDNA Nucleotiden (Primerpaar F1234-R1769) aus isolierten Mitochondrien (=Input), α -AlkBh1-IP (ab49738) im Vergleich zur Flag-IP (Isotypkontrolle); C. Dot Blot mit unterschiedlichen Volumina der Beadsfraktion von der α -TFAM-IP im Vergleich zur Kontroll-IP, gegengefärbt mit α -mtDNA AK; D. Dot Blot mit unterschiedlichen Volumina der Beadsfraktion von der α -AlkBh1-IP im Vergleich zur Flag-IP, gegengefärbt mit α -mtDNA AK; Alle verwendeten Proben wurden vor den IP's mit Formaldehyd (Crosslinking) behandelt, um die Protein-DNA-Bindung zu erhalten; Alle hier verwendeten Daten wurden von Olga Swolski, AG Dr. Alexander Wolf, Helmholtz Zentrum München, erhoben

4.1.5.4 Hsp60

Hsp60 (mitochondriales Hitze Schock Protein, 60kDa) ist ein Hitzeschockprotein, dass in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (Cheng, Hartl, & Norwich, 1990).

A549 Zellen wurden mit α -AlkBh1 und α -Hsp60 AK kofärbt und mittels konfokalen Mikroskops ausgewertet. Für Hsp60 (Abbildung 4-25 A'', B'', rot) und AlkBh1 (Abbildung 4-25 A', B', grün) ist im Zytoplasma ein punktuell Signal sichtbar. Zusätzlich ist auch ein schwaches Signal im Zellkern für AlkBh1 erkennbar (Abbildung 4-25 A', B'). AlkBh1 und Hsp60 weisen häufig Kollokalisierungen auf (Abbildung 4-25 C', weiße Pfeile) und zeigen im Zytoplasma ähnliche Strukturen auf (Abbildung 4-25 B', B'', B''', orange Sterne).

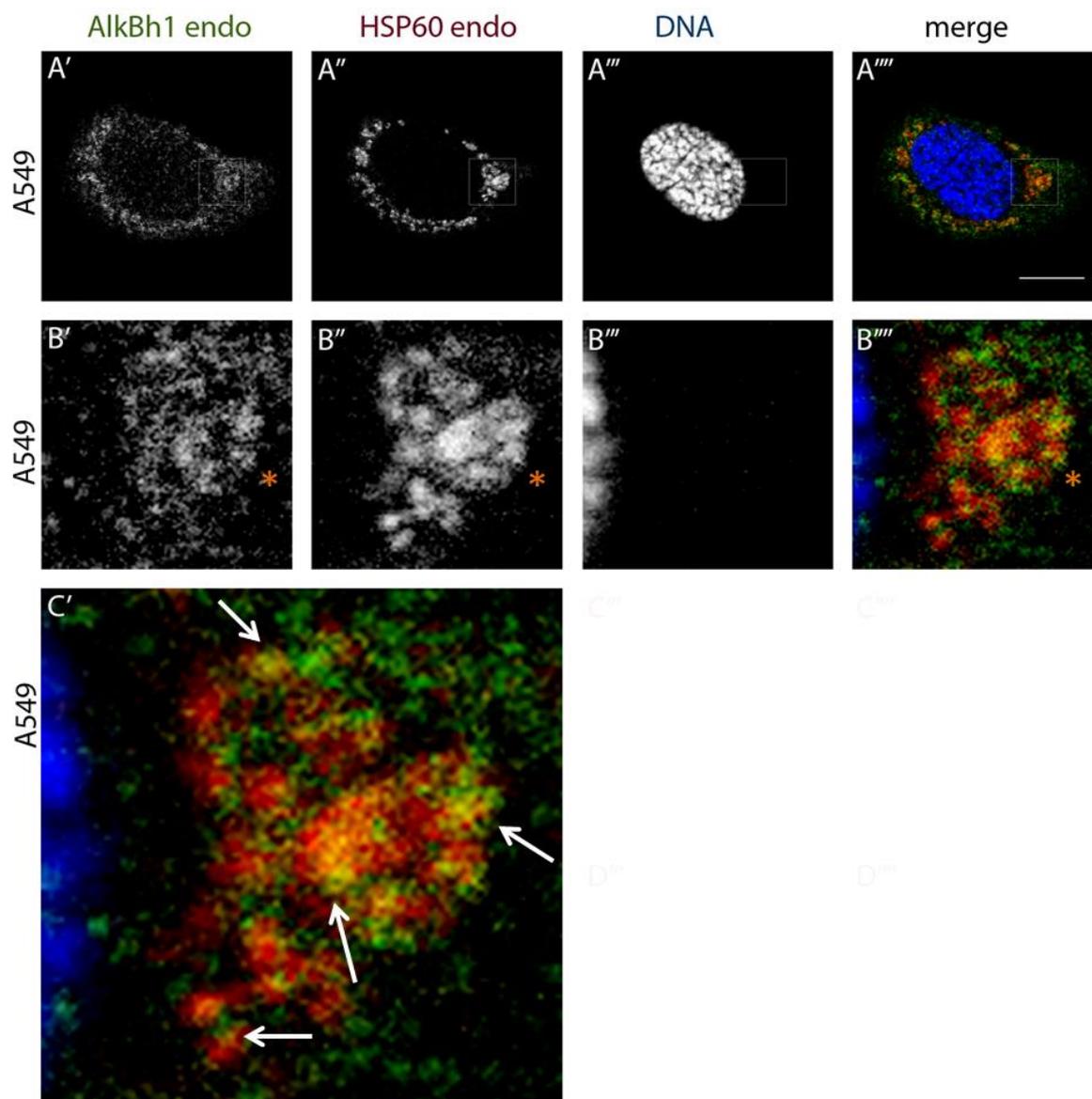


Abbildung 4-25 Bestimmung der Koloaliation von endogenem AlkBh1 und Hsp60 in A549 Zellen mittels IF

A.'- B.''''' A549 Zellen zeigen eine Kofärbung von endogenem AlkBh1 (grün) und Hsp60 (rot). C.' ist eine Vergrößerung von B.''''' Überlagerung von AlkBh1 und Hsp60, weiße Pfeile. Orange Sterne zeigen eine Knötchenartige Struktur. Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (49738, grün) und α -Hsp60 AK (rot) kofärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Konfokaler Schnitt; Maßstab 20 μ m

4.1.5.5 FASTKD2

Mit dem RNA Granula Markerprotein FASTKD2 (*FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial*), (Abbildung 4-17 B, dunkel Lila) wurde überprüft, ob AlkBh1 möglicherweise in den mitochondrialen RNA Granules lokalisiert ist. FASTKD2 ist in den mitochondrialen RNA Granules lokalisiert und ist dort für die Aktivität der mitochondrialen Ribosomen zuständig (Antonicka & Shoubridge, 2015). Die Kofärbung von endogenem AlkBh1 (Abbildung 4-26 A', B') und FASTKD2 (Abbildung 4-26 A'', B'') zeigt, dass beide Proteine eine ähnliche Morphologie außerhalb des Zellkerns aufweisen. Eine gelegentliche Überlappung der beiden Proteine konnte detektiert werden (Abbildung 4-26 C', weiße Pfeile).

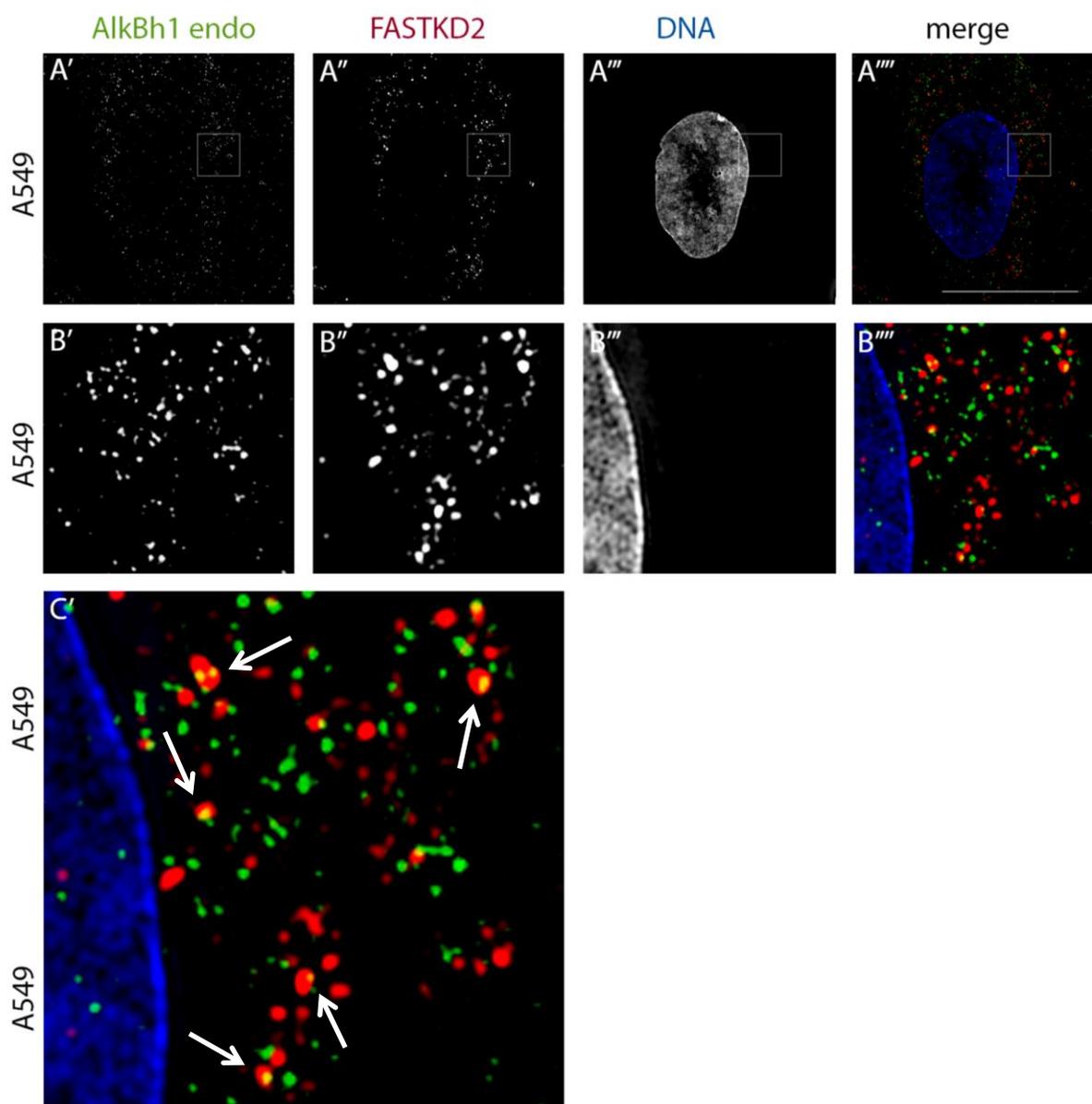


Abbildung 4-26 Bestimmung der Kolo-kalisation von endogenem AlkBh1 und FASTKD2 in A549 Zellen mittels IF

A.'- B.'''', A549 Zellen zeigen eine Kofärbung von endogenem AlkBh1 (grün) und FASTKD2 (rot), C.' ist eine Vergrößerung von B.''' und zeigt eine Überlagerung von AlkBh1 und FASTKD2, weiße Pfeile. Die beiden Proteine wurden mit α -AlkBh1 AK (49738, grün) und α -FASTKD2 AK (rot) kofärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). 3D-SIM, Maßstab 20 μ m

Zusammenfassend kann man sagen, dass AlkBh1 in der mitochondrialen Matrix wahrscheinlich an ATAD3A und AlkBh7 bindet. Weitere Interaktionen von AlkBh1 mit TFAM und mtSSBP sind möglich. Die direkte Kolokalisation von Hsp60 weist auf eine Lokalisation in der Matrix hin. Eine direkte Bindung an die mtDNA konnte nicht beobachtet werden. Dafür konnte eine gelegentliche Überlagerung mit mitochondriale RNA Granules Marker (FASTKD2) gezeigt werden.

Die bisherigen Erkenntnisse über die mögliche Lokalisation und Funktion von AlkBh1 sind in Abbildung 4-27 A, B zusammengefasst.

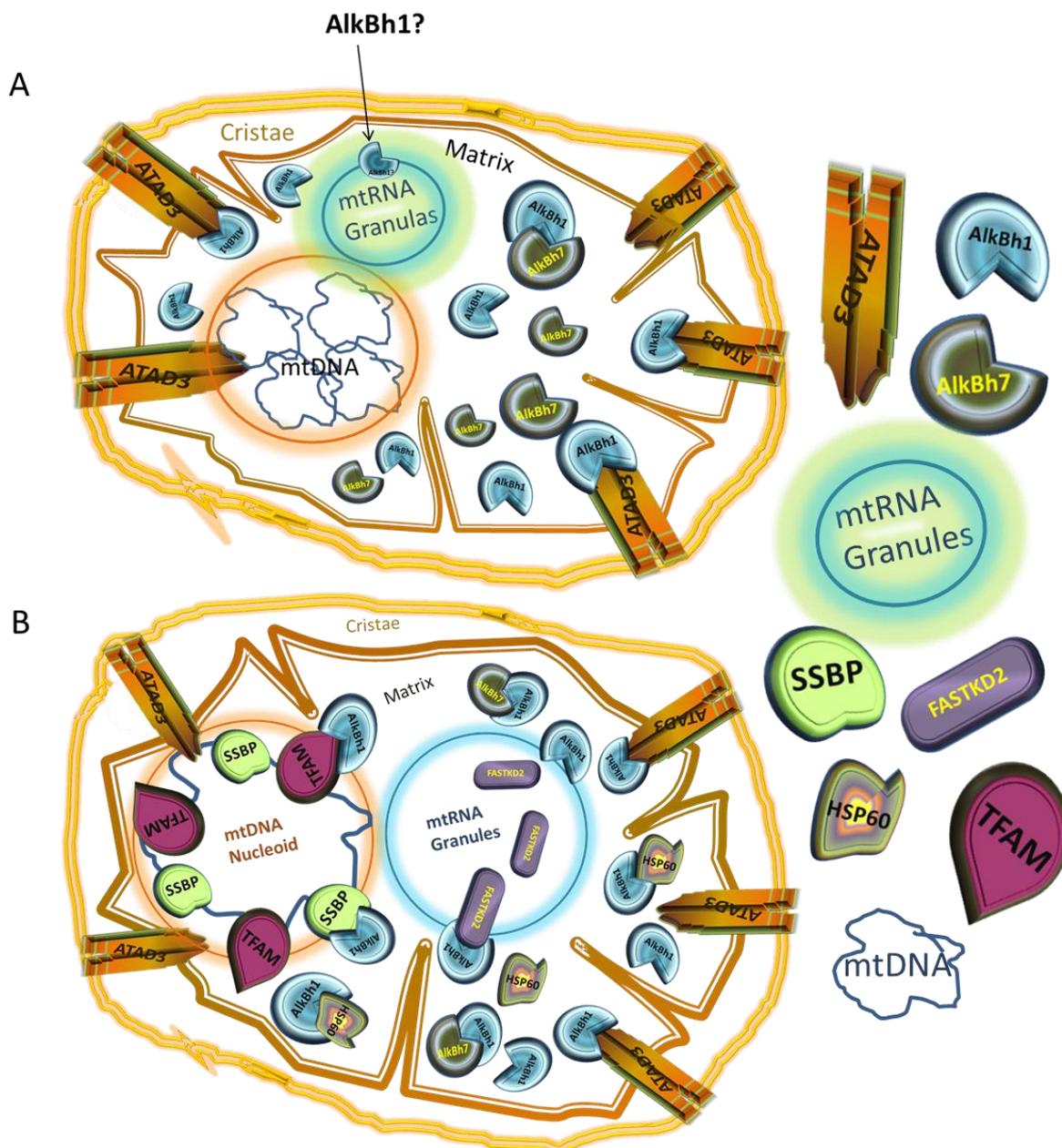


Abbildung 4-27 Modell über Funktion und mögliche Interaktionspartner von AlkBh1 in den Mitochondrien

A. Modell eines Mitochondriums, das die Lokalisation von AlkBh1 mit validierten Interaktionspartnern (AlkBh7, ATAD3A) zeigt; B. Modell eines Mitochondriums mit den weiteren möglichen Interaktionspartnern (mtSSBP, TFAM) und Lokalisation (Hsp60, Matrixprotein; FASTKD2, RNA Granula Marker; mtDNA) von AlkBh1 im normalen Zellablauf

4.1.6 Funktion von AlkBh1 und AlkBh7 in *Caenorhabditis elegans*

AlkBh1 und AlkBh7 sind in mehrzelligen Eukaryoten konserviert (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-68). AlkBh1 in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) weist zum humanen AlkBh1 eine 27% identische Aminosäuresequenz auf (Abbildung 4-28). AlkBh7 in *C. elegans* dagegen weist eine 37% Gleichheit im Vergleich zum humanen AlkBh7 auf (Abbildung 4-29).

Die „Wormbase Analyse“ (http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene) hatte für AlkBh1 und AlkBh7 in *C. elegans* noch keine Knockout Phänotypen beschrieben. In Kollaboration mit Dr. Stephane Rolland (AG Prof. Dr. Barbara Conrath, LMU) wurde ein siRNA vermittelter Knockdown in *C. elegans* induziert. Dazu wurden jeweils die ersten 495 Nukleotide der *C. elegans* Sequenz von AlkBh1 (E0DBL0) und AlkBh7 (Q7YWP5) in den L4440 Vektor kloniert.

```

Q13686|ALKB1_HUMAN  -----MGK----MA-----AAVGSVATLATEP  18
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  MLLSISGSLWKHTKPNWITENWNFCRNISAFMMKEVAREMEIKEKEIDQYAGSSGEDSDD  60
                                     * : *           . . :  :

Q13686|ALKB1_HUMAN  GEDAFRKLFRFYRQSRPGTADLEGVIDFSAAHAARGKGPQAQKVIKSQLNVSSVSEQNAY  78
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  GSNLFKAVFKKYYKRRKPPP-DVSDVIDVKSSSLQ-----SKLVFSTDEITSETTSLAE 113
*. : *: **: **: :*  *.  ***. : :           .*: *  **: * : . *

Q13686|ALKB1_HUMAN  RAGLQPVSKWQAYGLKGYPGFIFIPNPFPGYQWHWVKQCLKLYSQKPNVNCNLDKHSKE  138
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  RLGLIAPSEWRVYWFDRIGLYLLPSLLRKEKSTMWMKRAFK-YAEPNITNLTGHGK--  170
* **  *::.* :   * : :*. :   .  *:::* * *:: ** * * .

Q13686|ALKB1_HUMAN  ETQDLWEQSKEFLRYKEATKRRPRSLEKLRWVTVGYHYNWDSKKYSADHYTPFPSDLGF  198
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  -----DVLTDPTLLTKGLRWTTLGVEYDWNKEYPPNG-RPVEELYQ  212
.   * * : ***.* * .*: :*** * :   *.*:*

Q13686|ALKB1_HUMAN  LSEQVAAACGFEDFRAEAGILNYRLDSTLGIHVDRSELDHSPKLLSFSFGQSAIFLLGG  258
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  LGNLISRSRLKLGDMKPDATILNYPPKSALSPHVDKSER-SAAPLISMSLGQTAIYLSGT  271
*. : : : : *:: : * ***** .*: . ***:* : **:*:***:***:* *

Q13686|ALKB1_HUMAN  LQRD-EAPTAMFMHSGDIMIMSGFSRLLNHAVPRVLPNPEGEGLPHCLEAPLPAVLPRDS  317
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  IDLSSEPPPIPIWLRNGDFLIMHGQRLVYHAIPCIGSIPKRRGRNGSMMDEDQE----H  326
: : . * * : : : .***:*** * .** : **:* :   * : * .

Q13686|ALKB1_HUMAN  MVEPCSM-EDWQVCASYLKTARVNMVTRQVLATDQNFPLEPIEDEKRDISTEGFCHLDDQ  376
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  FEPPRGNDVDQSIIDYLNSSRVNFTIROVNP-----  359
: * . : * .***:***:*:*** .

Q13686|ALKB1_HUMAN  NSEVKRARINPDS  389
E0DBL0|E0DBL0_CAEEL  -----

```

Abbildung 4-28 Alignment von humanem AlkBh1 (Q13686) mit AlkBh1 Homolog aus *C. elegans* Y51H7C.5 (E0DBL0)

Vergleich der Aminosäuresequenz (AS) von AlkBh1 mit dem AlkBh1 Homolog aus *C. elegans* Y51H7C.5 (E0DBL0), (Alignment durchgeführt mit www.uniprot.org). Eisenbindestellen, 2-OG-Bindestelle und DSBH (2-OG-Dioxygenase Domäne); * → Gleiche Aminosäuren (AS), : → Ähnliche AS

AlkBh1 und AlkBh7 Knockdown Würmer wurden im Vergleich zur RNAi Kontrolle (im pBlueprint Vektor) nach 24 Stunden Inkubation für 4 Stunden auf Agar ausgesetzt. Die in diesen vier Stunden gelegten Eier konnten für 72 Stunden reifen und sich zu Würmern entwickeln. Die ursprünglichen Erwachsenen Würmer wurden nach diesen vier Stunden wieder entfernt.

Q9BT30 ALKB7_HUMAN	<u>—MAGTGLLAL</u> <u>RTLPGPSWVRGSGPSVLSRLQDAAVVRPGFLSTAAEETLSRELEPELR</u>	57
Q7YWP5 Q7YWP5_CAEEL	<u>MKITPRTLQHLIKFHNLELWPKD</u> ----LAETMKTCCYVKKDFITEAEKSLDVDVEPHMK	56
	: : * * : * : . : . : * : * : * : * : * : * : * :	
Q9BT30 ALKB7_HUMAN	<u>RRRYEYDHWDAAIHGFRETEKSRWSEASRAILQRVQAAAFGPGQTLLSSVHVLDLEARGY</u>	117
Q7YWP5 Q7YWP5_CAEEL	<u>RLRYEKSHWDDAIHLYREREQRKWRDENLEVISRIRSESGFANTEHLLTYVHILDLHKDGV</u>	116
	* * * * . * * * * * * * * : * * : * : . : . : * : * : * : * : * : * : * :	
Q9BT30 ALKB7_HUMAN	<u>IKPHVDSIKFCGATIAGLSLLSPVMRLVHTQEPGEW</u> -LELLLEPGSLYLRLRGSARYDFS	176
Q7YWP5 Q7YWP5_CAEEL	<u>IKPHIDAIRYCGDVITGVSLSDAIMRLRHKDQKDELIMDLLMPRRSLYRLGGPGRYDFT</u>	176
	* * * * * : * : * : * * * * * : * * * * * : * : * : * * * * * : * * * * * :	
Q9BT30 ALKB7_HUMAN	<u>HEILRDEESFFGERRIPRGR</u> ISVICRSLPEGMGPESGQP-----PPAC-	221
Q7YWP5 Q7YWP5_CAEEL	<u>HEVLGEQESVWNGEQVPRER</u> ISIIICRDLPKVANRQTAEIEIKLKIPIEEI	227
	* * * * : * * * . : * * * * * * * * * * * : * : * : * * * * * * * * * * * :	

Abbildung 4-29 Alignment von humanem AlkBh7 (Q3BT90) mit AlkBh7 Homolog aus *C. elegans* Y46G5A.35 (Q7YWP5)

Vergleich der Aminosäuresequenz (AS) von AlkBh7 mit dem AlkBh7 Homolog aus *C. elegans* Y46G5A.35 (Q7YWP5), (Alignment durchgeführt www.uniprot.org). Eisenbindestellen, 2-OG-Bindestelle, DSBH (2-OG-Dioxygenase Domäne) und Mitochondriales Signalpeptid;

* → Gleiche Aminosäuren (AS), : → Ähnliche Aminosäuren

AlkBh1 Knockdown Würmer (Abbildung 4-30 A', A'', rote Pfeile) sehen viel kleiner aus als die Wildtypwürmer (Abbildung 4-30 B', B'', rote Pfeile). Im Gegensatz dazu erkennt man keinen Unterschied von AlkBh7 Knockdown Würmer (Abbildung 4-30 C', C'') im Vergleich zum Wildtyp. Da jedoch sowohl für AlkBh1 als auch für AlkBh7 der Nachweis mittels qPCR für den vorhandenen Knockdown auf RNA Ebene fehlt, kann noch keine eindeutige Aussage über die Phänotypen der Knockdowns, vor allem für AlkBh7 gemacht werden.

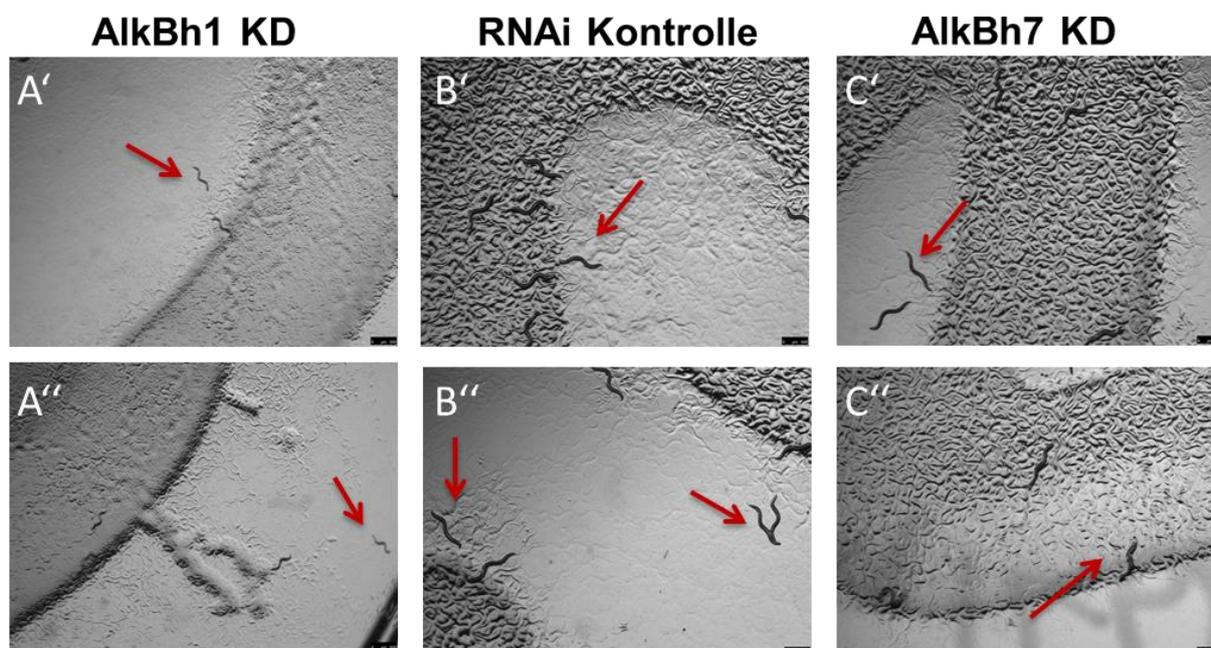


Abbildung 4-30 Knockdown von AlkBh1 und AlkBh7 in *C. elegans* im Vergleich zur Kontrolle

Daten wurden erhoben von Dr. Stephane Rolland, AG Prof. Dr. Barbara Conrath, LMU, München; Würmer wurden 72 Stunden nach Eiablage untersucht. A.', A.'' AlkBh1 Knockdown Würmer; B.', B.'' unbehandelte Kontrolle, C.' C.'' AlkBh7 Knockdown Würmer; rote Pfeile zeigen auf Würmer

4.1.7 AlkBh1 Knockdown und Überexpression in humanen Zellen

Es wurde ein stabiles Doxycyclin-induzierbares System für Überexpression und Knockdown von AlkBh1 und AlkBh7 etabliert. Die Vorgehensweise orientiert sich an (Wiznerowicz & Trono, 2003) und wurde mit Hilfe von Dr. Michelle Vincendeau (AG Prof. Dr. Krappmann, Helmholtz Zentrum) etabliert. Die Methode wird in Kapitel 6.9 ausführlich beschrieben.

Für AlkBh1 wurden jeweils drei Knockdowns, zwei Überexprimierer und drei Kontrollen generiert (siehe Tabelle 4-3). Diese wurden in HeLa, A549, HT-29 und HEK293T Zellen etabliert. Knockdown und Überexpression wurden im Western Blot getestet. Nach sechs Tagen Induktion mit Doxycyclin war der Knockdown (KD5017, KD5020, KD7996) und die Überexpression (ÜE_CD2_1, ÜE_GFP_1) in HeLa Zellen auf Proteinebene sichtbar (Abbildung 4-31 A: WB, B: Densitometrie zu WB). Dieser wurde auch auf mRNA Level mittels qPCR bestätigt (Abbildung 4-31, qPCR durchgeführt von Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz, München).

Die produzierten acht Zelllinien HeLa und A549 Zellen mit unterschiedlichen AlkBh1 Expressionslevel wurden sechs Tage nach Induktion mit Doxycyclin für Proliferationsassays (Kapitel 4.1.8) und Metabolismusassays (Kapitel 4.1.9) verwendet.

Tabelle 4-3 Erklärung der Kurzbezeichnungen für Knockdown, Überexprimierer und zugehörigen Kontrollen

(Alle Zelllinien exprimieren KrabRed, RFP als Induktionsmarker; zusätzlich exprimieren ns shRNA, Knockdown und Überexprimierer ÜE_GFP_1, GFP; Mito-GFP und der Überexprimierer ÜE_CD2_1 exprimieren zusätzlich einen roten Farbstoff (T2A) im FarRed Bereich)

Kontrollen			Knockdown			Überexprimierer	
Ko KR	ns shRNA	Mito-GFP	KD5017	KD5020	KD7996	ÜE_CD2_1	ÜE_GFP_1
Expression von Krab Red → Allgemeine Kontrolle	Expression von Krab Red und GFP → Kontrolle für KD's	Expression von Krab Red, CD2 und Mito-GFP → Kontrolle für Überexprimierer	Expression von Krab Red, GFP → Knockdown von AlkBh1	Expression von Krab Red, GFP → Knockdown von AlkBh1	Expression von Krab Red, GFP → Knockdown von AlkBh1	Expression von Krab Red, CD2 → Überexpression von AlkBh1	Expression von Krab Red, GFP → Überexpression von AlkBh1

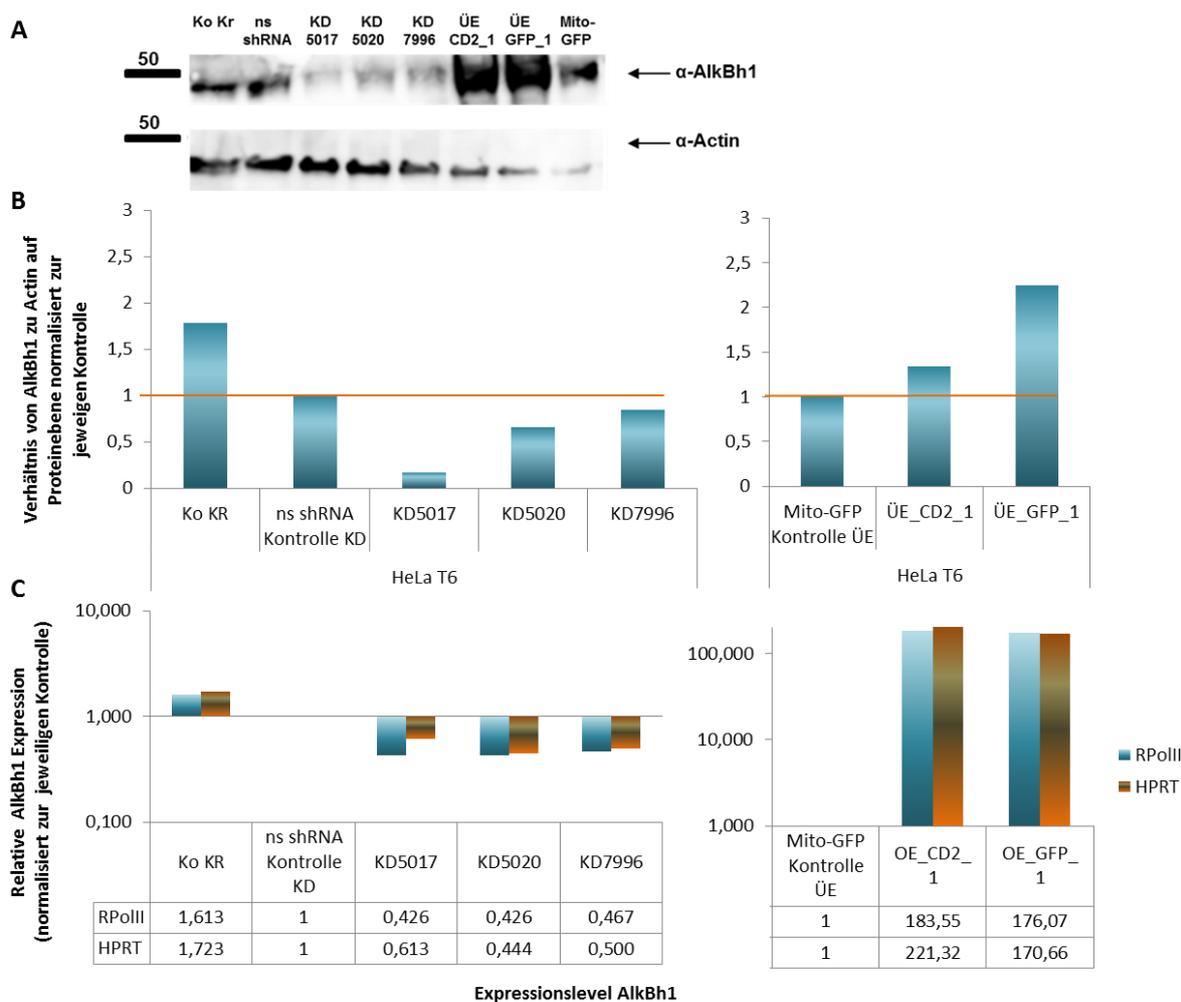


Abbildung 4-31 Nachweis von induziertem Knockdown und Überexpression für AlkBh1 in HeLa Zellen

Acht Zelllinien mit unterschiedlichen AlkBh1 Expressionslevel wurden für sechs Tage mit 250ng/ml Doxycyclin induziert, lysiert und mittels SDS Page/WB analysiert; A. Western Blot (WB) zeigt unterschiedliche AlkBh1 Level auf Proteinebene mit Aktin als Ladekontrolle. Färbung: α -AlkBh1 Antikörper (ab49738), α -Aktin; B. Densitometrische Auswertung des WB aus der darüber liegenden Grafik (A.) zeigt das Verhältnis von AlkBh1 zu Aktin auf Proteinebene; 1 = jeweilige Kontrolle, oranger Strich (ns shRNA Kontrolle für Knockdowns; Mito-GFP Kontrolle für Überexprimierer); C. Unterschiedliche Expressionslevels von AlkBh1 in HeLa Zellen auf RNA-Ebene mittels qPCR (qPCR wurde von Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz München durchgeführt); relative Expressionslevel von AlkBh1 wurde zur jeweiligen Kontrolle auf den Wert 1 normalisiert (ns shRNA Kontrolle für Knockdowns; Mito-GFP Kontrolle für Überexprimierer)

4.1.8 Einfluss der Proteinexpression von AlkBh1 auf die Proliferationsrate

Mittels der generierten Knockdowns und Übereprimierer aus Kapitel 4.1.7 und Tabelle 4-3 wurde das Wachstumsverhalten der Zelllinien mit unterschiedlichen AlkBh1 Level über sieben Tage nach Induktion untersucht.

Dieser Versuch wurde mittels eines Operetta *High-Content Imaging System* (PerkinElmer) ausgewertet (in Kooperation mit Dr. Kenji Schorpp, AG Dr. Hadian, Helmholtz Zentrum) und wie in Kapitel 6.10 beschrieben, durchgeführt.

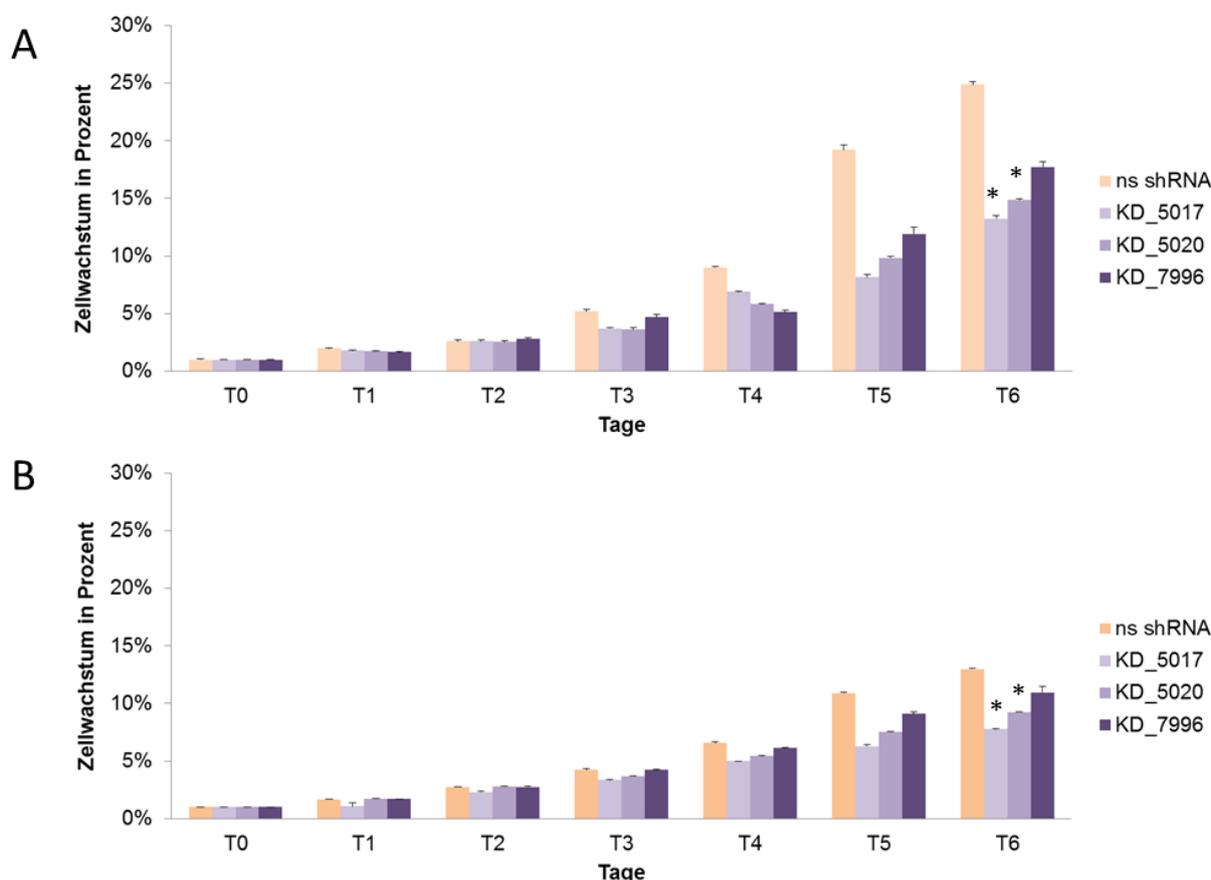


Abbildung 4-32 Proliferationsassay von AlkBh1 Knockdown Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle Wachstumsverhalten von stabil induzierbaren Knockdown HeLa Zelllinien (AlkBh1; KD5017, KD5020, KD7996) im Vergleich zur ns shRNA Kontrolle.). Zellzahl von Tag 0 wurde auf 1% festgelegt, die restlichen Tage wurden im Verhältnis zu Tag 0 normalisiert. Zellen wurden über sieben Tage hinweg nach Induktion beobachtet; (A. 1500 Zellsäzähl; B. 3500 Zellsäzähl; * = Signifikanz (Ausgewertet mit ttest); Read out: Operetta *High-Content Imaging System*; Zellzählung mittels Kernfärbung (DAPI 1µg/ml)

In Abbildung 4-32 A (Zellaussaatzahl 1500) und Abbildung 4-32 B (Zellaussaatzahl 3500) ist das Wachstumsverhalten (Einzelzellzahlbestimmung) von HeLa Zellen nach Knockdown (KD5017, KD5020, KD7996) von AlkBh1 im Vergleich zur Kontrolle (ns shRNA; siehe dazu Tabelle 4-3) abgebildet. Ab dem vierten Tag ist eine Wachstumsverzögerung für alle drei Knockdown Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Am Tag sechs nach Induktion, kann man für

beide Aussatzzahlen eine signifikante Reduktion der Zellzahl für die beiden Knockdownzelllinien KD5017 und KD5020 erkennen (Abbildung 4-32).

Wenn man das Wachstumsverhalten der Überexprimierer für AlkBh1 (ÜE_CD2_1 und ÜE_GFP_1) mit der Kontrolle (Mito-GFP) vergleicht, dann kann man nur bei einer Aussatzzahl von 3500 Zellen für den Überexprimierer ÜE_CD2_1 einen signifikanten Wachstumsvorteil gegenüber der Kontrolle detektieren (Abbildung 4-33 A, B).

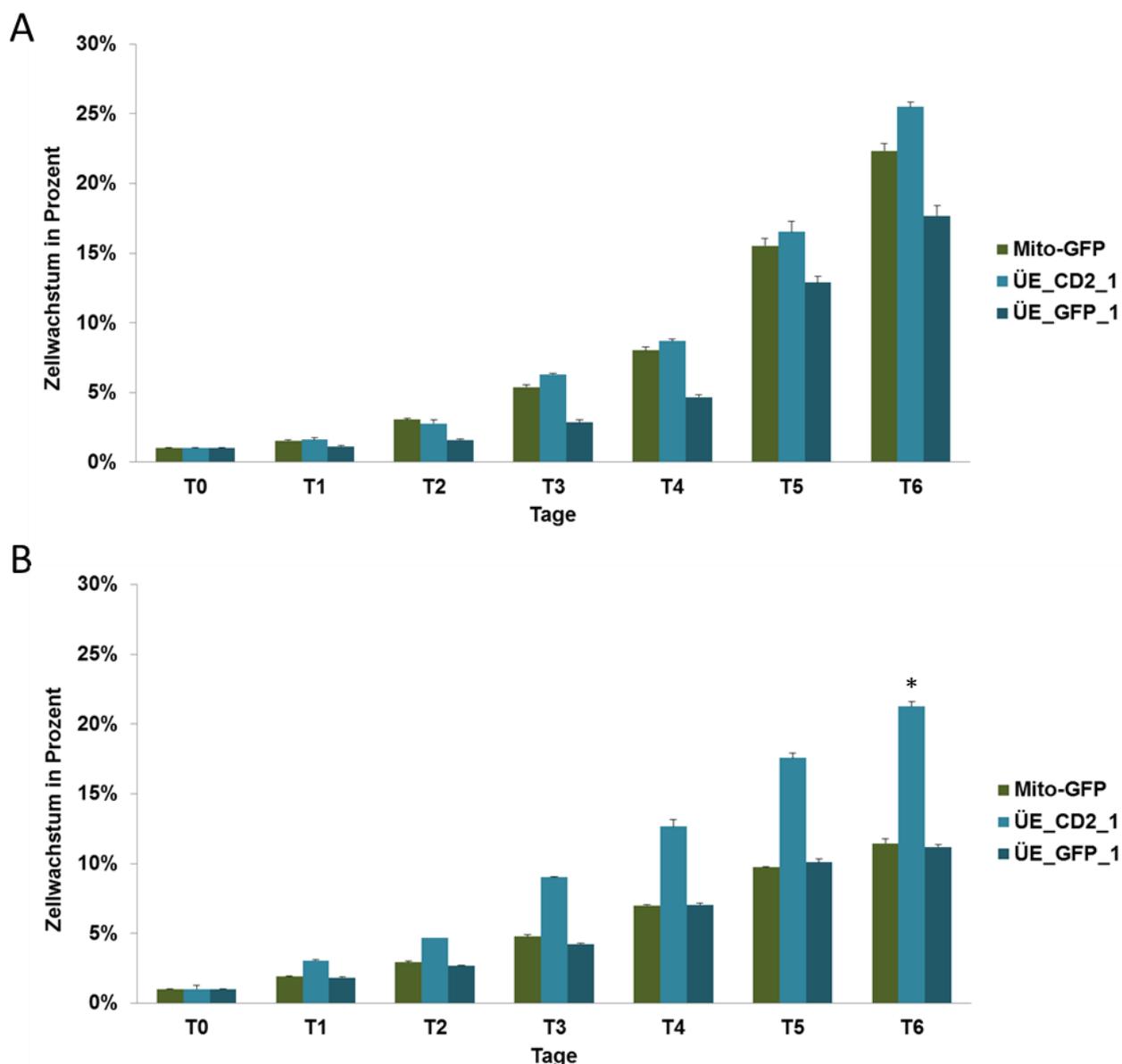


Abbildung 4-33 Proliferationsassay von AlkBh1 Überexpression im Vergleich zur Kontrolle
 Wachstumsverhalten von stabil induzierbaren Überexprimierern (HeLa Zelllinien für AlkBh1; ÜE_CD2_1, ÜE_GFP_1) im Vergleich zur Kontrolle (Mito-GFP). Zellzahl von Tag 0 wurde auf 1% festgelegt, die restlichen Tage wurden im Verhältnis zu Tag 0 normalisiert. Zellen wurden über sieben Tage hinweg nach Induktion beobachtet; A. 1500 Zellsäzhzahl; B. 3500 Zellsäzhzahl; * = Signifikanz; Read out: Operetta *High-Content Imaging System*; Zellzählung mittels Kernfärbung (DAPI 1µg/ml)

4.1.9 Einfluss von unterschiedlichen Inhibitoren auf die oxidative Phosphorylierung unter unterschiedlichen AlkBh1 Proteinmengen

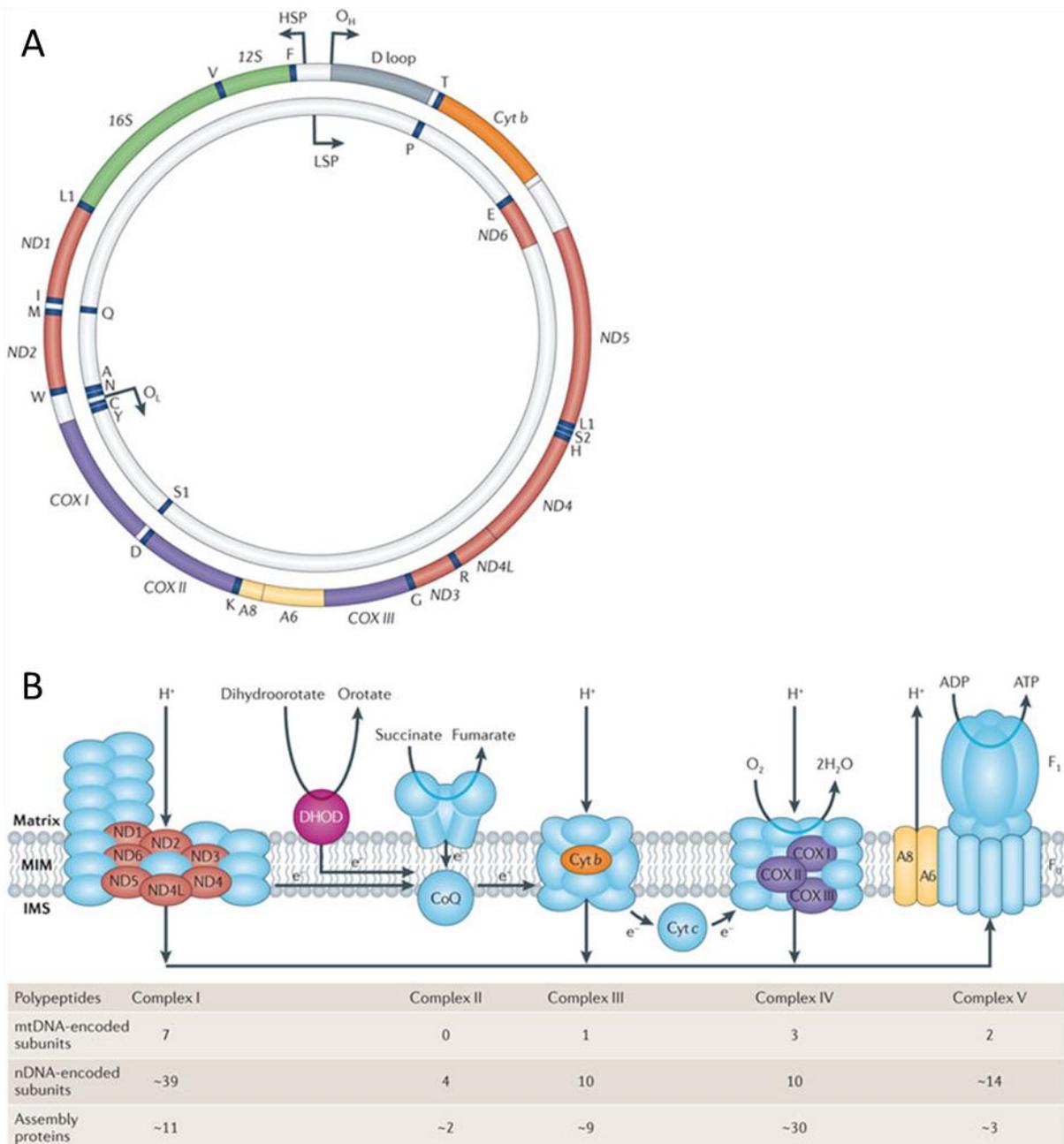
Mitochondrien sind durch die Endosymbiose vor ungefähr zwei Milliarden Jahren Teil der eukaryotischen Zelle geworden. Nach dieser Fusion haben die Mitochondrien viele Aufgaben an den Zellkern abgegeben und neue Aufgaben in der Zelle erworben. Zu diesen Aufgaben gehören z.B. die ATP-Produktion, Regelung der Apoptose und Nekrose, adaptive Thermogenese, Ca^{2+} - Regulation und Häm- und Steroidsynthese (Scheibye-Knudsen, Fang, Croteau, Wilson, & Bohr, 2015).

Da die Mitochondrien eine Doppelmembran besitzen [IM (Inneren Membran) und OM (äußeren Membran)], müssen alle kernkodierte Proteine, vom Zytoplasma in die Mitochondrien geschleust werden. Deshalb besitzen die meisten kernkodierte Mitoproteine ein mitochondriales Signalpeptid (Friedman & Nunnari, 2014; Scheibye-Knudsen et al., 2015).

Mitochondrien besitzen ihre eigene mitochondriale DNA (Schon et al., 2012). Wie die mitochondriale DNA verpackt ist und welche Proteine in ihre Biosynthese involviert sind, wird ausführlich in Kapitel 4.1.5 beschrieben.

Die Atmungskette besteht aus fünf unterschiedlichen Komplexen, die als Komplex I bis Komplex V bezeichnet werden. Dabei werden für den Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) alle Proteine ausschließlich vom Kern kodiert. Komplex I (NADH-Dehydrogenase), Komplex III (Ubiquinon-Cytochrom-C-Reduktase), Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase) und Komplex V (ATP-Synthase) enthalten sowohl Untereinheiten die im Zellkern als auch in den Mitochondrien kodiert werden [(Friedman & Nunnari, 2014), Abbildung 4-34B].

Um einen möglichen Einfluss von AlkBh1 auf die Transkription der mtDNA oder Translation in Mitochondrien zu ermitteln, wurde der Metabolismusassay mit Hilfe von Dr. Sabine Schmitt (AG PD Dr. Zischka, Helmholtz Zentrum München) etabliert. Diese Methode soll zeigen, ob unterschiedliche Expressionslevel von AlkBh1 einen Einfluss auf die Funktionalität der Komplexe der Atmungskette in den Mitochondrien haben.



Nature Reviews | Genetics

Abbildung 4-34 Kodierung der mtDNA und Übersicht über die oxidative Phosphorylierung

A. Zirkuläre mtDNA mit farbkodierten Proteinen, B. Übersicht über die einzelnen Proteine, die an der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) beteiligt sind. Übersicht über Kodierungsort der einzelnen Proteine; Quelle: (Schon et al., 2012)

Die Atmungskette kann durch unterschiedliche Agenzien inhibiert werden. Dazu gehören z. B. Rotenon und Piericidin, die Komplex I inhibieren, TTFA (Thenoyltrifluoroacetone) inhibiert Komplex II, Oligomycin ist ein Inhibitor der ATPase (Komplex V) und CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) führt zur Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch die Unterbrechung des Elektronenflusses [Abbildung 4-35; Tabelle 6-27], (Foster, Galeffi, Gerich, Turner, & Müller, 2006)].

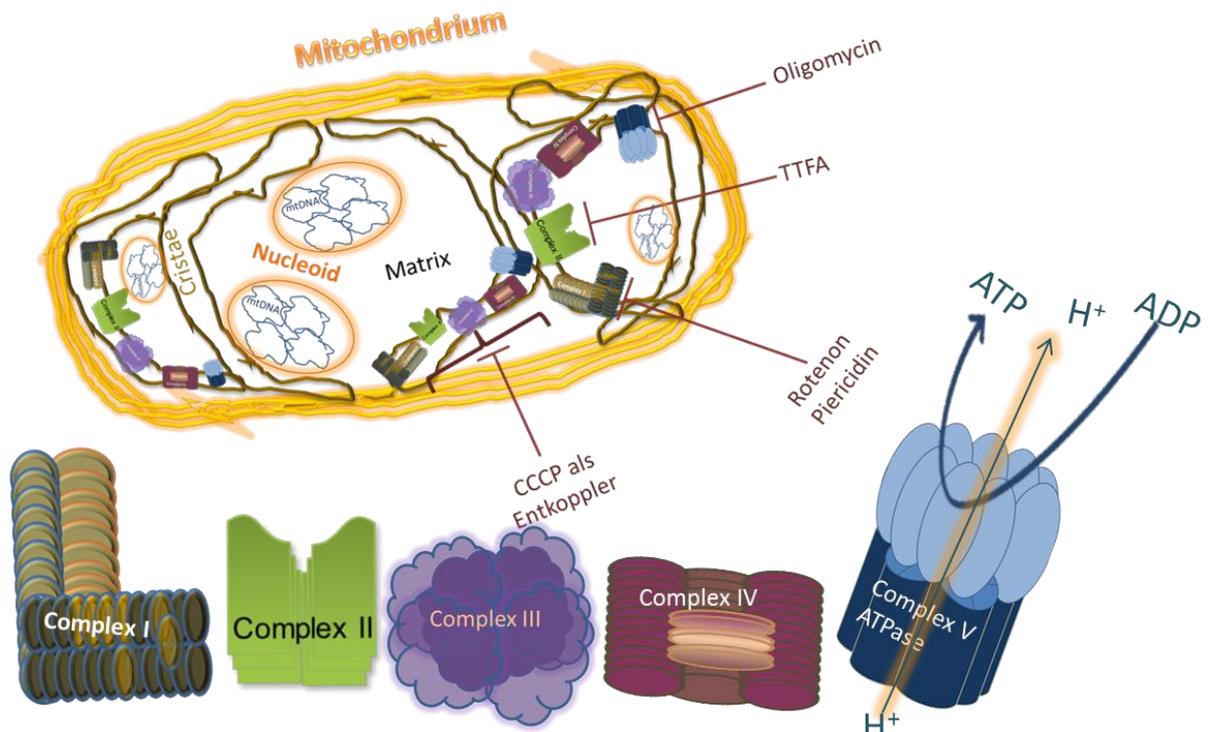


Abbildung 4-35 Schema eines Mitochondriums, das die Inhibitoren der einzelnen Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zeigt

Überblick über die unterschiedlichen Inhibitoren der Komplexe in den Mitochondrien: Rotenon und Piericidin inhibieren Komplex I, TTFA (Thenoyltrifluoroacetone) inhibiert Komplex II, Oligomycin ist ein Inhibitor der ATPase (Komplex V) und CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) führt zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung

Für dieses Experiment wurden acht HeLa Zelllinien mit unterschiedlichem Expressionslevel für AlkBh1 verwendet (drei Knockdowns, zwei Überexprimierer und die dazu gehörigen Kontrollen, Tabelle 4-3). Bei dem Metabolismusassay gibt es eine zusätzliche Kontrolle (Ko KR LSM), die zeigt, dass die Effekte nicht durch das Lösungsmittel (LSM) der einzelnen Inhibitoren verursacht wird. Um die Daten übersichtlich darzustellen, wurden die Ergebnisse in % (Prozent) zur jeweils unbehandelten Kontrolle (Ko KR LSM, 100%) gesetzt.

In Abbildung 4-36 sind die Ergebnisse für die Inhibierung von Komplex I der Atmungskette mit Rotenon und Piericidin in unterschiedlichen Konzentrationen in HeLa Zellen gezeigt. Unabhängig von dem Expressionslevel von AlkBh1 ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der Vitalität, verursacht durch den höheren Einsatz an Inhibitoren, sichtbar. Im Vergleich zur Kontrolle, sind keine bedeutenden Unterschiede nach Behandlung mit Rotenon (Abbildung 4-36A) und Piericidin (Abbildung 4-36 B) für die unterschiedlichen AlkBh1 Zelllinien (HeLa) zu erkennen.

Die Inhibierung des Komplex II mit TTFA (Abbildung 4-37A) und der ATPase (Abbildung 4-37B) mit Oligomycin führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellvitalität, jedoch ist dieser Effekt unabhängig von dem Knockdown bzw. Überexpression von AlkBh1.

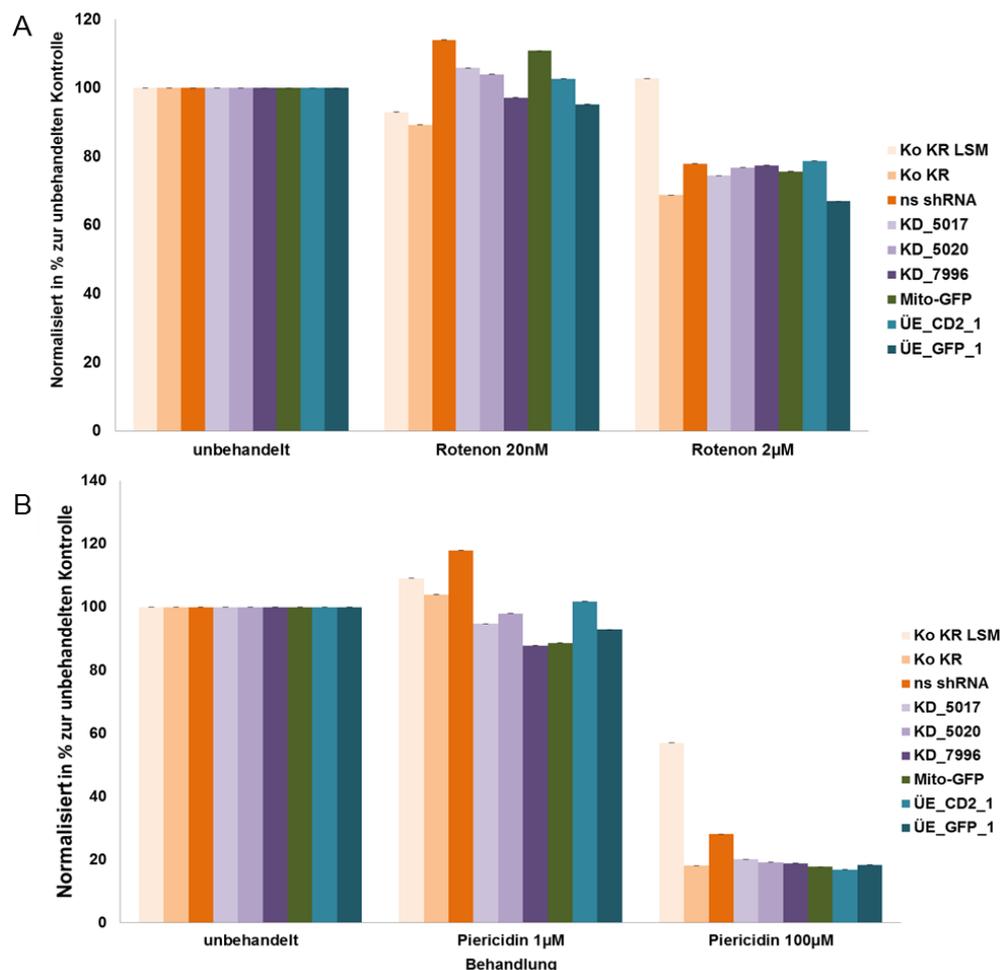


Abbildung 4-36 Inhibierung des Komplexes I der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS)

Stabil induzierbare HeLa Zellen mit acht verschiedenen Expressionslevel von AlkBh1 (siehe Tabelle 4-3) nach Inhibierung von Komplex I; A. Zellen behandelt mit unterschiedlichen Rotenon Konzentrationen (20nM, 2µM); B. Zellen behandelt mit unterschiedlichen Piericidinkonzentrationen (1µM, 100µM); Behandlung für 24 Stunden; LSM = Lösungsmittelkontrolle; 100% entspricht einer Vitalität von 100%, normalisiert zur unbehandelten Kontrolle; Read out: Neutralrot Aufnahme Assay

Die Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) führt nach der Verwendung von einer hohen Konzentration CCCP (50µM) zu keinem charakteristischen Unterschied zwischen den hier verwendeten Zelllinien (unterschiedlichen AlkBh1 Expressionslevel im Vergleich zu den Kontrollen, Abbildung 4-38).

Für die andere mitochondriale 2-OG-Oxygenase AlkBh7 wurden auch HeLa Zelllinien mit unterschiedlichen AlkBh7 Expressionsleveln (Tabelle 4-7) verwendet, um den Einfluss der Inhibitoren auf die Komplexe der Atmungskette (Abbildung 4-35) zu untersuchen. Es konnte auch für AlkBh7 kein deutlicher Effekt im Vergleich von AlkBh7 Knockdown oder Überexpression im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden.

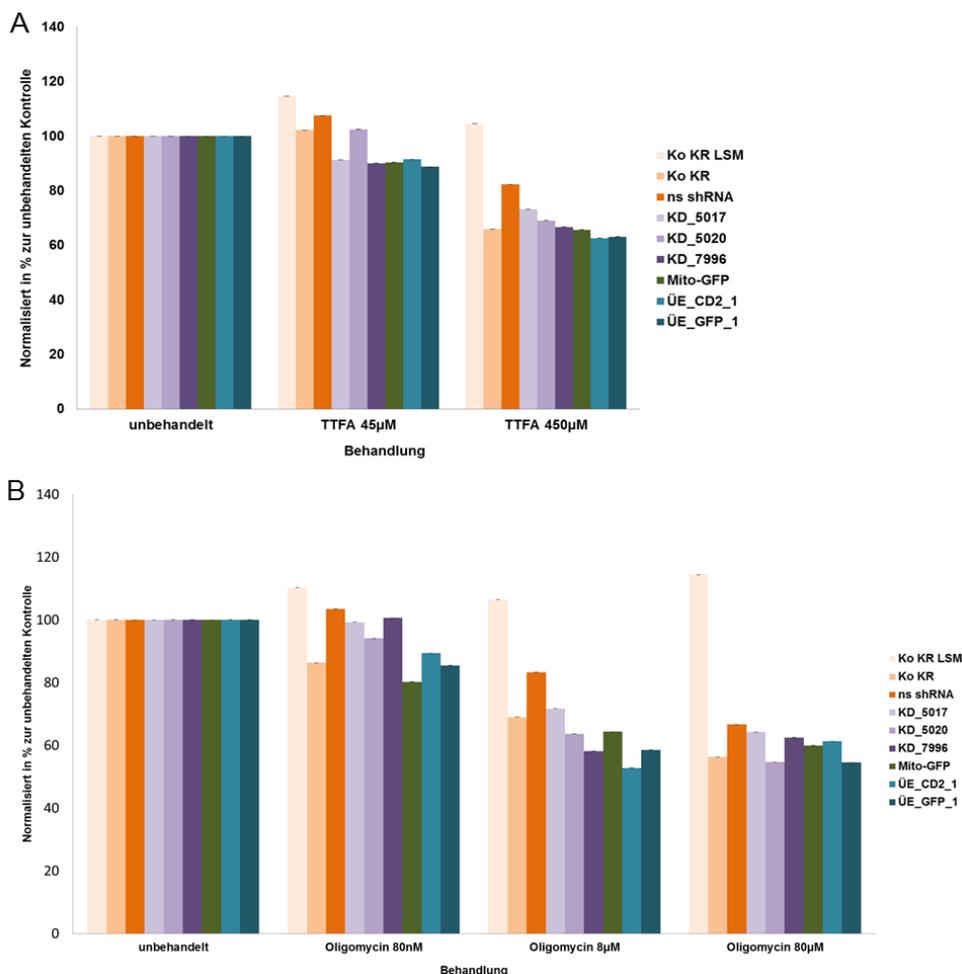


Abbildung 4-37 Inhibierung des Komplexes II und des Komplexes V der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS)

Stabil induzierbare HeLa Zellen mit acht verschiedenen Expressionslevel von AlkBh1 (siehe Tabelle 4-3) nach Inhibierung von Komplex II und der ATPase (Komplex V); A. Zellen behandelt mit unterschiedlichen TTFA (Thenoyltrifluoroacetone) Konzentrationen (45µM, 450µM); B. Zellen behandelt mit unterschiedlichen Oligomycinkonzentrationen (80nM, 8µM, 80µM); Behandlung für jeweils 24 Stunden; LSM = Lösungsmittelkontrolle, 100% entspricht einer Vitalität von 100%, normalisiert zur unbehandelten Kontrolle; Read out: Neutralrot Aufnahme Assay

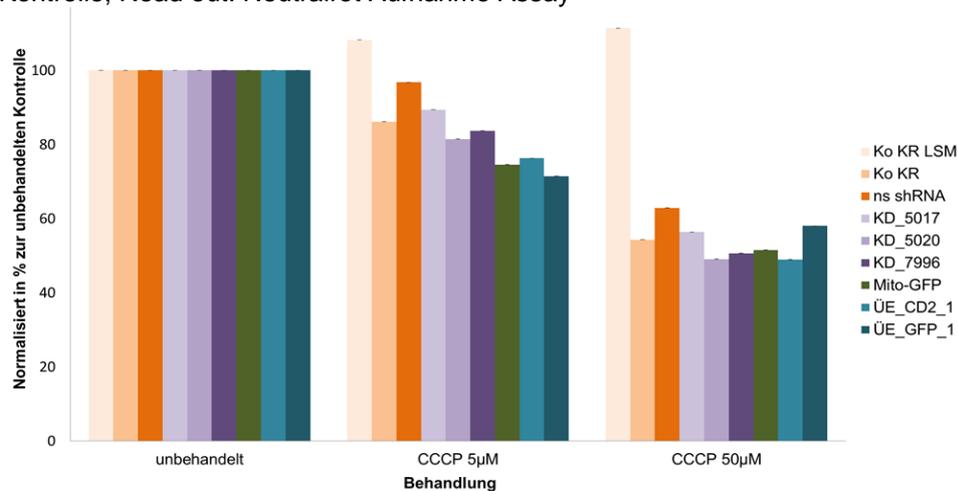


Abbildung 4-38 Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) mit CCCP

Stabil induzierbare HeLa Zellen mit acht verschiedenen Expressionslevel von AlkBh1 (siehe Tabelle 4-3) nach Entkoppelung mit CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone); Zellen behandelt mit unterschiedlichen CCCP Konzentrationen (45µM, 450µM); Behandlung für 24 Stunden; LSM = Lösungsmittelkontrolle, 100% entspricht einer Vitalität von 100%, normalisiert zur unbehandelten Kontrolle; Read out: Neutralrot Aufnahme Assay

Da mittels Vitalitätstest kein signifikanter Unterschied zwischen den acht Zelllinien für AlkBh1 (diverse AlkBh1 Expressionslevel, Tabelle 4-3) zu sehen waren, wurde ein spezieller Antikörper verwendet, der alle fünf Komplexe der Atmungskette (α -Oxphos Antikörper; #45-8099) auf Proteinebene anfärbt. Dieser Versuch sollte dabei helfen, herauszufinden, ob der Knockdown oder die Überexpression von AlkBh1 einen Einfluss auf die Translation der Komplexe hat.

Wenn man die fünf unterschiedlichen Komplexe sechs Tage nach induziertem Knockdown bzw. Überexpression in HeLa Zellen auf Proteinebene betrachtet (Abbildung 4-39), kann man zwischen den einzelnen Zelllinien keinen charakteristischen Unterschied im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erkennen. Eine Ausnahme bildet die AlkBh1 Knockdown Zelllinie KD5017 (Abbildung 4-39, oranger Stern), in diesem Fall sieht es aus, als ob der Komplex I weniger exprimiert wird im Vergleich zur Kontrolle (ns shRNA).

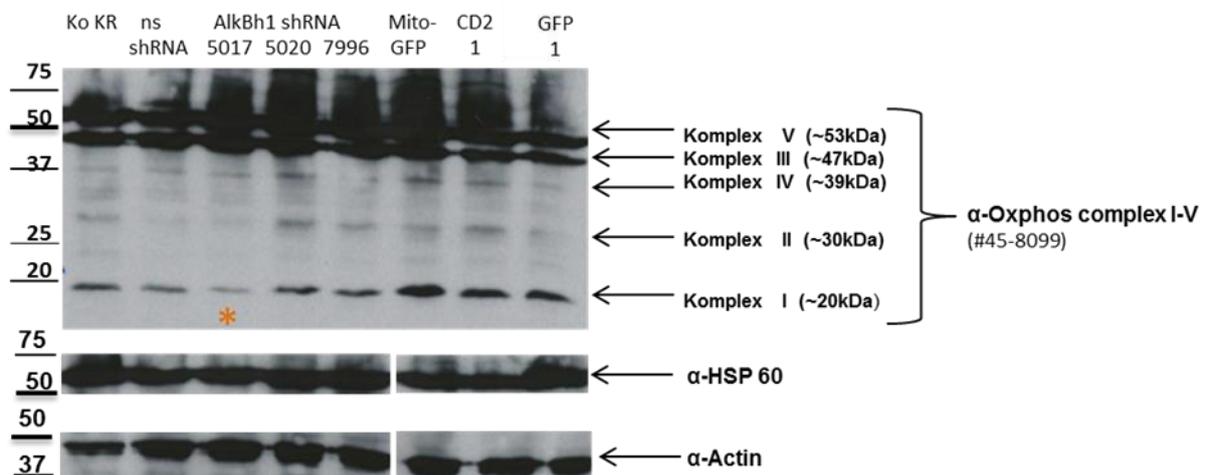


Abbildung 4-39 Wirkung von unterschiedlichen AlkBh1 Level auf die unterschiedlichen Komplexe der Atmungskette in HeLa Zellen auf Proteinebene mittels Western Blot

HeLa Zellen mit unterschiedlichen Expressionslevel von AlkBh1 wurden nach sechs Tagen Doxycylininduktion (250ng/ml) mit α -Oxphos Antikörper gegengefärbt. Alle fünf Komplexe der Atmungskette können mittels Western Blot detektiert werden. Hsp60 und Aktin wurden als Ladekontrolle verwendet; Oranger Stern zeigt eine Reduktion des Komplex I für die AlkBh1 Knockdown Zelllinie KD5017

Nach Auswertung der Daten aus dem Metabolismusassay und Western Blot (Abbildung 4-39) konnte kein bedeutender Unterschied zwischen den acht HeLa Zelllinien mit verschiedenen AlkBh1 Expressionslevel nach Inhibierung der einzelnen Komplexe detektiert werden. Jedoch ist eine leichte Reduzierung von Komplex I auf Proteinebene bei der AlkBh1 Knockdown Mutanten KD5017 sichtbar.

4.1.10 Mögliche Funktion von AlkBh1 bei der tRNA Modifikation in den Mitochondrien

Kürzlich haben Wissenschaftler unabhängig voneinander herausgefunden, dass NSUN3 (Putative Methyltransferase NSUN3), in der mitochondrialen Matrix sitzt und für die Methylierung der mitochondrialen tRNA an der *Wobble*-Base C34 verantwortlich ist [Abbildung 4-40 A, B; (Nakano et al., 2016; Van Haute et al., 2016)]. Zusätzlich wurde festgestellt, dass an der gleichen Wobble Base C34 auch eine Modifizierung von m⁵C (5-Methylcytosine) zu f⁵C (5-Formylcytosine) stattfindet (Van Haute et al., 2016). Jedoch konnte die dafür verantwortliche Hydroxylase bisher nicht identifiziert werden.

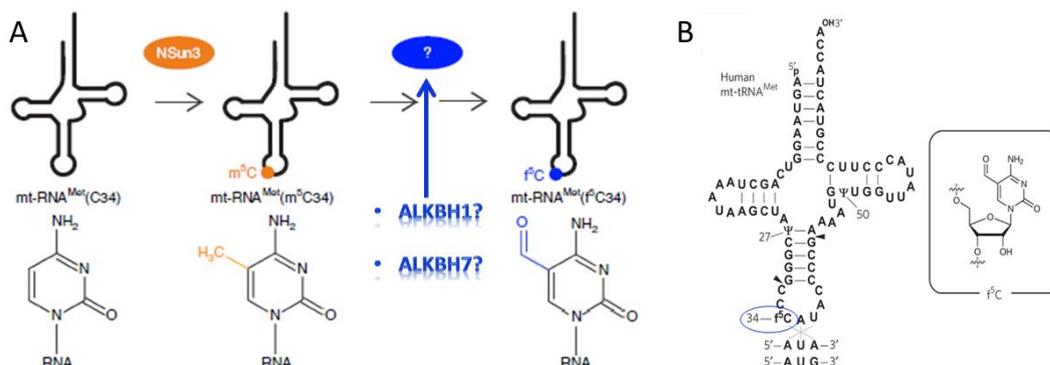


Abbildung 4-40 Überblick über die Modifikation von tRNA in den Mitochondrien

A. NSUN3 methyliert Cytosin zu 5-Methylcytosin (m⁵C) an der *Wobble* Base 34 der mitochondrialen tRNA für Methionin. Eine zusätzliche Modifizierung des m⁵C zu 5-Formylcytosine (f⁵C) wurde festgestellt, mögliche Proteine, die die Modifikation durchführen können AlkBh1 oder AlkBh7 sein. Angepasst an (Van Haute et al., 2016) B. Nukleotidsequenz der modifizierten mitochondrialen tRNA Angepasst an (Nakano et al., 2016)

Daraufhin wurde eine Kooperation mit Dr. Lindsey Van Haute (AG Dr. Michal Minczuk, MRC Cambridge, UK) veranlasst. Versuche daraus sollen zeigen, ob AlkBh1 oder AlkBh7 für die Hydroxylierung der C34 *Wobble* Base in der mitochondrialen Matrix verantwortlich sein könnten (Abbildung 4-40 A, B). Es wurden stabil induzierbare AlkBh1 und AlkBh7 Knockdown Zelllinien (HeLa) mit den passenden Kontrollen (Tabelle 4-4) der Arbeitsgruppe von Dr. Michal Minczuk zur Verfügung gestellt, um diese mittels mitochondrialen Transkriptanalysen zu untersuchen (Van Haute et al., 2016). Da in der zytoplasmatischen Biosynthese für AlkB Homolog AlkBh8 eine ähnliche tRNA Methyltransferase Funktion (+OH) nachgewiesen werden konnte (Songe-Moller et al., 2010), liegt die Vermutung nahe, dass AlkBh1 bzw. AlkBh7 die gleiche Funktion in den Mitochondrien ausführen könnten.

Tabelle 4-4 Überblick über die hier verwendeten HeLa Zelllinien

A. Zellen für AlkBh1 Knockdown; B. Zellen für AlkBh7 Knockdown

A	Kontrolle	Knock down AlkBh1		B	Kontrolle	Knock down AlkBh7	
	ns shRNA	KD5017	KD7996		ns shRNA	KD2763	KD9385
	Expression von Krab Red und GFP	Expression von Krab Red, GFP und Knockdown von AlkBh1	Expression von Krab Red, GFP und Knockdown von AlkBh1		Expression von Krab Red und GFP	Expression von Krab Red, GFP und Knockdown von AlkBh1	Expression von Krab Red, GFP und Knockdown von AlkBh1

Mittlerweile wurde AlkBh1 als das Protein identifiziert (Haag et al., 2016), das für die Hydroxylierung dieser methylierten *Wobble* Base C34 (Abbildung 4-40 A) verantwortlich ist.

4.1.11 Wirkung der Stressbehandlung durch Schädigung der mitochondrialen DNA

Da das ursprüngliche bakterielle Protein AlkB eine Funktion in der DNA-Reparatur hat (Wei et al., 1996) und auch schon für das humane AlkB Homolog AlkBh2 eine DNA-Reparaturfunktion im Zellkern beschrieben werden konnte (Ougland et al., 2015), stellt sich die Frage, ob AlkBh1 in den Mitochondrien auch eine Rolle in der DNA-Reparatur spielen könnte.

Wie im Zellkern gibt es auch in den Mitochondrien unterschiedliche Signalwege zur Qualitätskontrolle für die Replikation, Transkription und Translation (Scheibye-Knudsen et al., 2015). DNA Schäden können z. B. durch Entstehung von reaktivem Sauerstoffspezies (ROS) oder durch exogene Substanzen wie Chemotherapeutika (Doxorubicin, Bleomycin und Ethidiumbromid) induziert werden (Brar, Meyer, Bortner, Van Houten, & Martin, 2012; Scheibye-Knudsen et al., 2015).

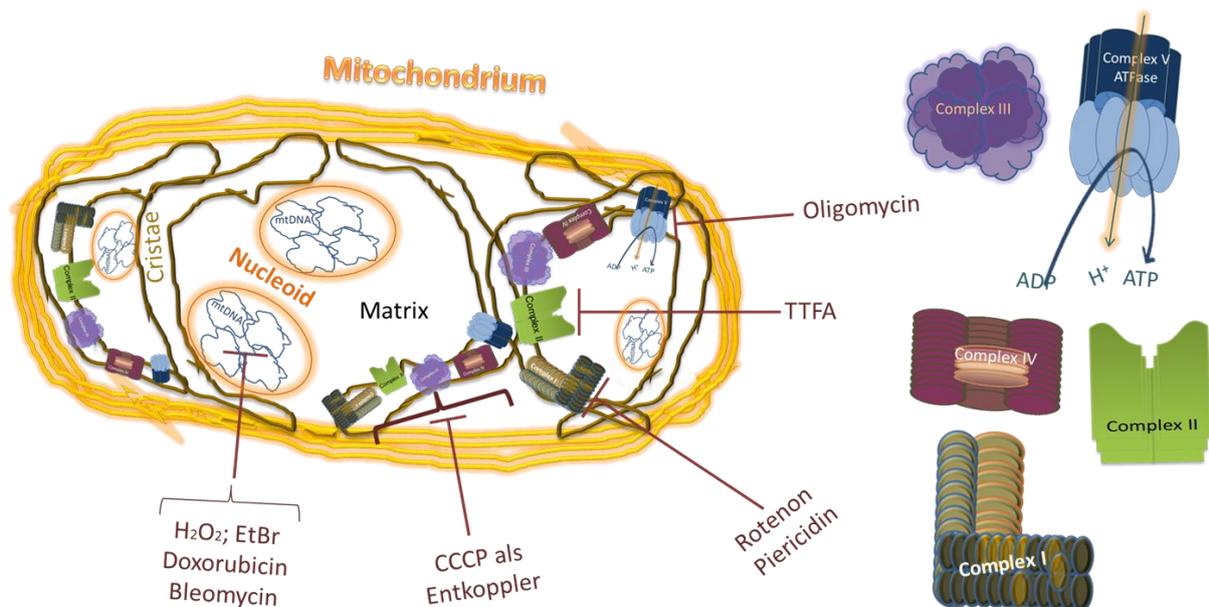


Abbildung 4-41 Schema eines Mitochondriums, das die Inhibitoren der mtDNA Synthese und mtDNA Schädigende Agenzien zeigt

Überblick über die unterschiedlichen Inhibitoren der Komplexe und schädigende Substanzen, die die DNA in den Mitochondrien angreift: H_2O_2 , Ethidiumbromid, Bleomycin und Doxorubicin

Die Mutationen der mtDNA, die unter anderem zur Dysfunktion der Atmungskette führen können, spielen bei der Entstehung von Krankheiten, wie Krebs, Alzheimer und Parkinson eine entscheidende Rolle (Brar, Meyer et al. 2012). Durch die häufige Fusion und Spaltung der Mitochondrien findet eine Ungleichverteilung der mtDNA statt, da die Replikation der mitochondrialen DNA nicht so reguliert wird, wie die der nukleare DNA. Dies kann wiederum zur Akkumulation von mutierter mtDNA und damit auch zu Krankheiten führen (Schon, DiMauro et al. 2012)(Friedman & Nunnari, 2014).

Es wurden unterschiedliche Reagenzien, wie z.B. Ethidiumbromid (EtBr), Doxorubicin (DOX) und Bleomycin (Bleo) verwendet, um die mitochondriale DNA zu schädigen und eine mögliche Stressantwort in den Mitochondrien zu induzieren (Abbildung 4-41). Diese unterschiedlichen Substanzen sollten dabei helfen, herauszufinden, ob AlkBh1 bei diesen induzierten Reparaturmechanismen eine Rolle spielt.

Ethidiumbromid (EtBr) ist in niedrigen Dosen in der Lage, die Menge an mitochondrialer DNA langfristig zu reduzieren (Ashley & Poulton, 2009). Doxorubicin dagegen, ist ein Chemotherapeutikum, dass sowohl in die nukleare als auch in die mitochondriale DNA interkalieren kann und dadurch Einzel- oder Doppelstrangbrüche an der DNA induziert (Ashley & Poulton, 2009). Bleomycin ist ein Glycopeptidantibiotikum mit Antitumoraktivität. Dadurch kann sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA geschädigt werden. Deshalb wird Bleomycin gegen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Tumoren eingesetzt (J. Chen & Stubbe, 2005). Diese drei Substanzen wurden verwendet, um eine mögliche Funktion von AlkBh1 an der mitochondrialen DNA zu identifizieren.

4.1.11.1 Ethidiumbromid (EtBr)

Ethidiumbromid (EtBr) ist eine DNA schädigende Substanz, die sowohl in die mitochondriale DNA als auch in die nukleare DNA interkaliert und diese dadurch schädigt (Ashley & Poulton, 2009). In Fibroblasten führt die Behandlung mit einer Konzentration von 0.5µg/ml Ethidiumbromid zur Akkumulation der mitochondrialen DNA und ändert die Verteilung der mtDNA assoziierten Proteine wie z. B. TFAM (Alan, Spacek, Pajuelo Reguera, Jaburek, & Jezek, 2016; Ashley & Poulton, 2009). Die Daten aus dieser Arbeit entstanden unabhängig und parallel zu (Alan et al., 2016).

Eine langfristige Behandlung der Zellen mit Ethidiumbromid in sehr niedrigen Konzentrationen (50ng/ml) wird dazu verwendet, mtDNA defiziente Zellen zu generieren (Yu et al., 2007).

HeLa und A549 Zellen wurden mit 0.5µg/ml EtBr für 24 Stunden behandelt und mit mtDNA Antikörper (Progen) und AlkBh1 Antikörper gegengefärbt. In HeLa Zellen konnte nach Behandlung mit EtBr keine Akkumulation für AlkBh1 (Abbildung 4-42 C“, D“) und der mitochondrialen DNA (Abbildung 4-42 C‘, D‘) beobachtet werden. Die Zellen verhielten sich mehr wie die unbehandelten Kontrollen (Abbildung 4-42A‘-B“““).

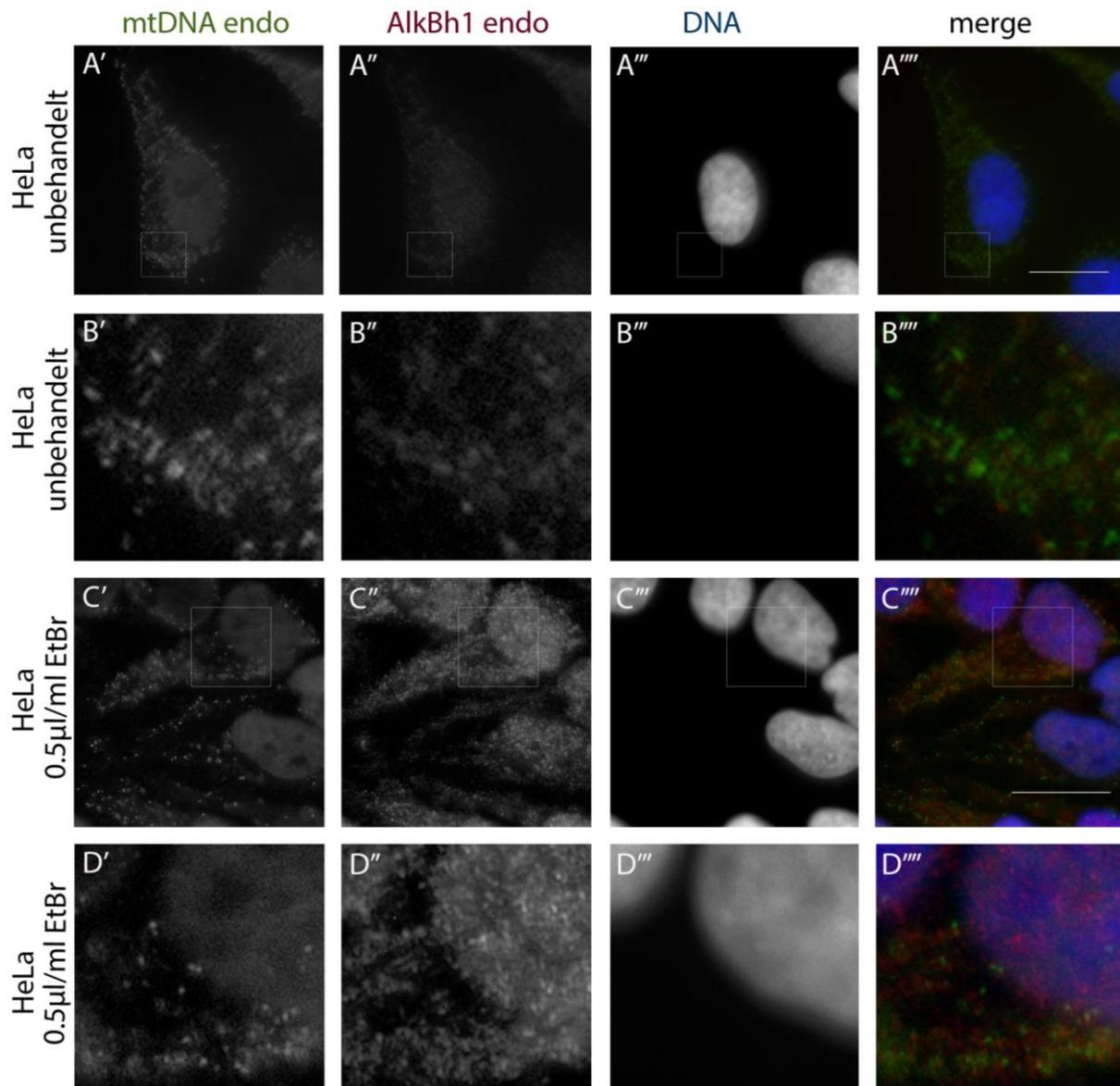


Abbildung 4-42 HeLa Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün) behandelt mit Ethidiumbromid

A.'-B'''''. Unbehandelte HeLa Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün) C.'-D.''''' HeLa Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün), behandelt mit Ethidiumbromid 0.5µg/ml für 24 Stunden; α -AlkBh1 (EPR6176) AK (rot) und α -mtDNA (grün) kogefärbt, DNA (DAPI 1µg/ml, blau); Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20µm

A549 Zellen wurden, wie die HeLa Zellen, für 24 Stunden mit 0.5µg/ml EtBr behandelt. Diese Behandlung führte in A549 Zellen zu Akkumulationen der mitochondrialen DNA von ca. sechs bis zehn „Knötchen“ innerhalb einer Zelle, die 2-4x so groß waren, wie die Mitochondrien aus der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4-43C'-D'), wie bereits von (Ashley & Poulton, 2009) beschrieben.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4-43A'-B''''') verhält sich AlkBh1 ähnlich wie die mtDNA nach Ethidiumbromidbehandlung und ist auch in „Knötchen“ akkumuliert (Abbildung 4-43C'', D''). Jedoch scheint AlkBh1 um die mtDNA Akkumulationen angelagert zu sein.

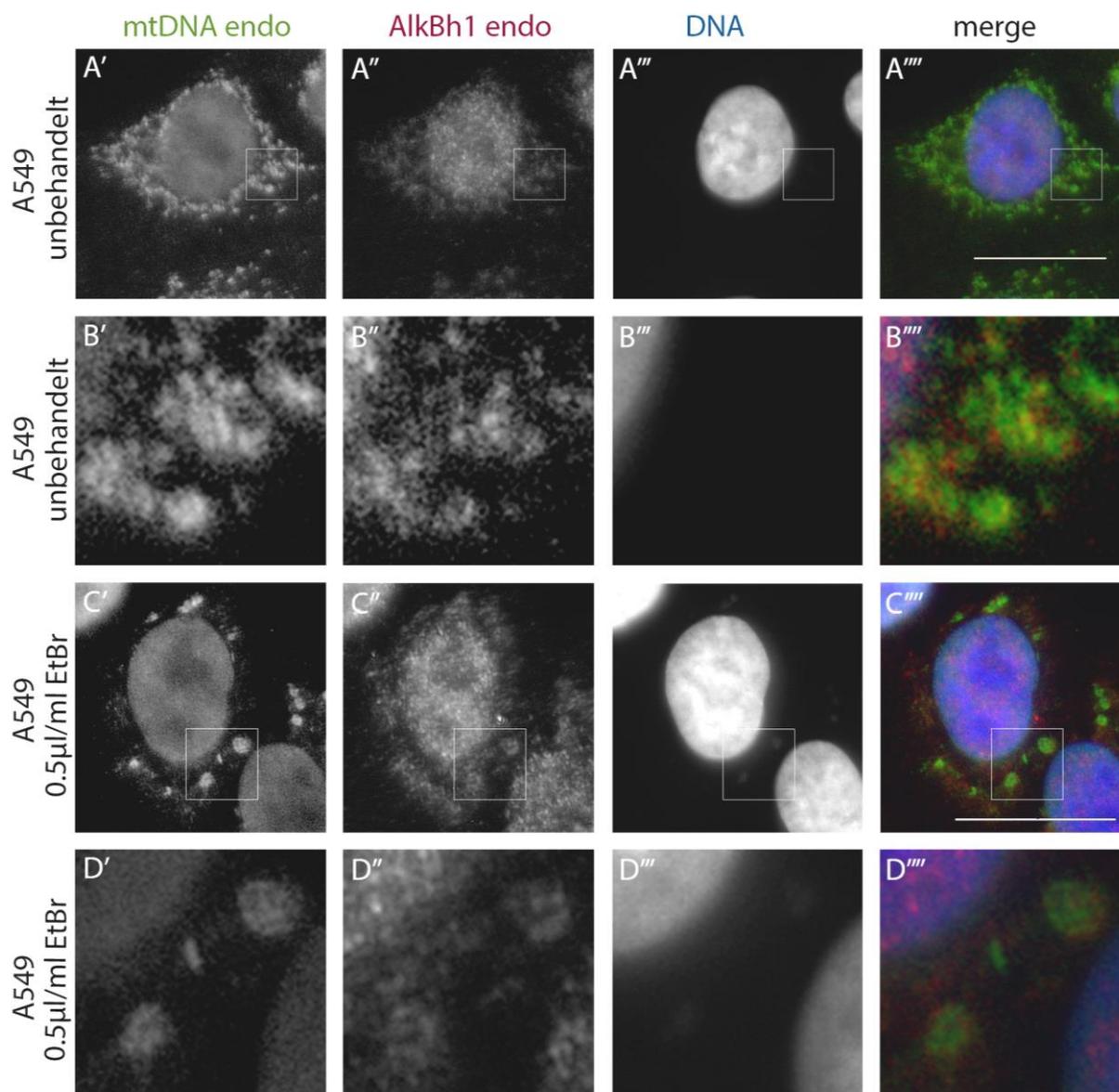


Abbildung 4-43 Ethidiumbromid behandelte A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün)

A.'-B'''''. Unbehandelte A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün) C.'-D.''''. A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün), behandelt mit Ethidiumbromid 0.5µg/ml für 24 Stunden; α -AlkBh1 (EPR6176) AK (rot) und α -mtDNA (grün) kogefärbt, DNA (DAPI 1µg/ml, blau); Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20µm

A549 Zellen wurden nach Behandlung mit 0.5µg/ml EtBr mit ATAD3A gegengefärbt. Da Ethidiumbromid ein organischer Farbstoff ist und in die DNA (nukleare und mitochondriale) interkaliert, ist Ethidiumbromid im RFP-Kanal eines Fluoreszenzmikroskops detektierbar [(Quelle: <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/ethidiumbromid/2068>), (Abbildung 4-44 C'', D'')]. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4-44 A'-B''''') kann man erkennen, das ATAD3A eher als größere, ringförmige Struktur detektierbar ist (Abbildung 4-44 C'-D'). Diese ringförmige Struktur scheint um die mtDNA (rotgefärbt durch das interkalierte EtBr) lokalisiert zu sein (Abbildung 4-44 C''', D''').

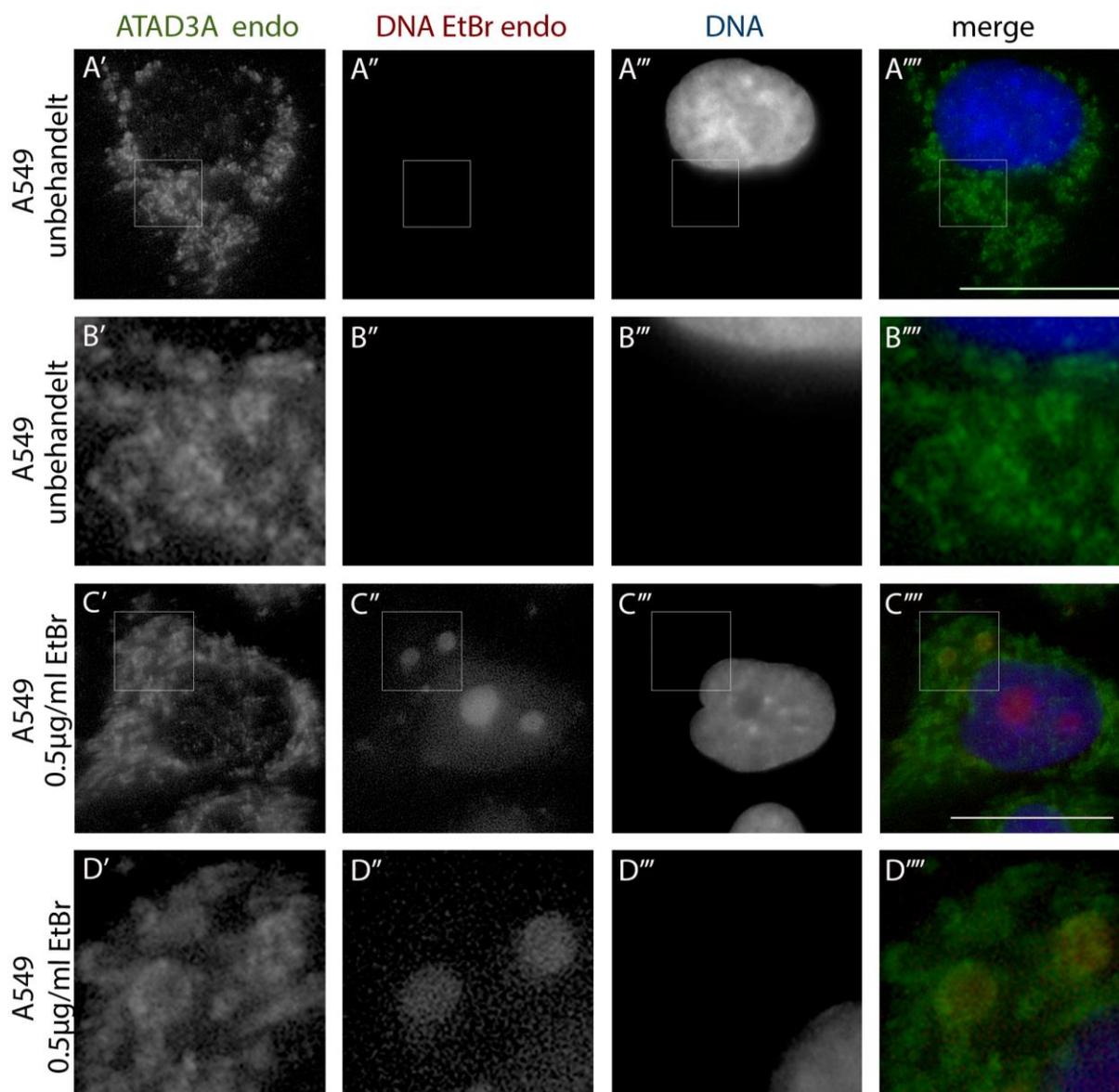


Abbildung 4-44 A549 Zellen kofärbt mit α -ATAD3A AK (grün) behandelt mit Ethidiumbromid A.'-B''''. Unbehandelte A549 Zellen gefärbt mit α -ATAD3A AK; C.'-D.''''' A549 Zellen gefärbt mit α -ATAD3A AK behandelt mit Ethidiumbromid 0.5 μ g/ml für 24 Stunden, in rot ist das interkalierende EtBr in die DNA sichtbar; α -ATAD3A (FLJ4D5) AK (grün) und DNA (EtBr, rot) kofärbt, DNA (DAPI 1 μ g/ml, blau); Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20 μ m

Die Kofärbung mit TFAM (Abbildung 4-45 C', D') und AlkBh1 (Abbildung 4-45 A'', B'') in A549 Zellen nach Ethidiumbromidbehandlung zeigt, dass TFAM in kleinen „Knötchen“ akkumuliert und AlkBh1 in einer ringförmigen Struktur darum herum lokalisiert ist. In der unbehandelten Kontrolle dagegen ist TFAM als normales Netzwerk in den Mitochondrien verteilt und scheint zeitweise mit AlkBh1 zu überlappen (Abbildung 4-45).

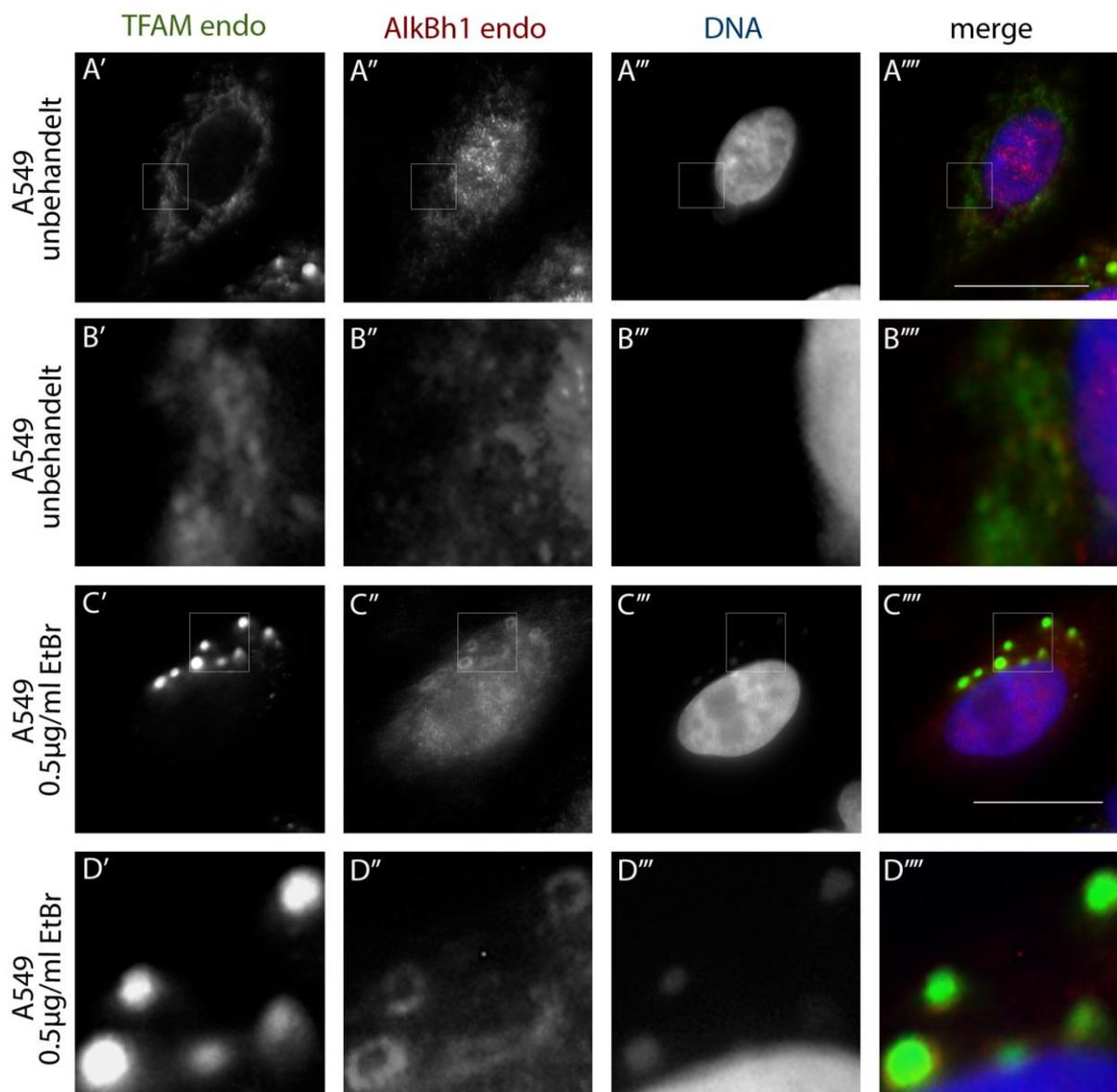


Abbildung 4-45 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -TFAM AK (grün) behandelt mit Ethidiumbromid

A.-D.''''. Unbehandelte A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -TFAM AK (grün) C.-D.''''. A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -TFAM AK (grün), behandelt mit Ethidiumbromid 0.5µg/ml für 24 Stunden; α -AlkBh1 (EPR6176) AK (rot) und α -TFAM (grün) kogefärbt, DNA (DAPI 1µg/ml, blau); Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20µm

Wenn man die IF-Bilder mit der Färbung von unterschiedlichen mitochondrialen Proteinen nach Ethidiumbromidbehandlung miteinander vergleicht, kann man feststellen, dass AlkBh1 sich in A549 Zellen ähnlich wie ATAD3A verhält. Endogenes AlkBh1 scheint ringförmige Strukturen zu bilden, die um die mitochondriale DNA bzw. TFAM angelagert sind.

Als nächster Schritt wurde das Chemotherapeutikum Doxorubicin verwendet, da dieses Arzneimittel ebenfalls für seine interkalierende Wirkung in die nukleare und mitochondriale DNA bekannt ist. Die Versuche mit Doxorubicin sollten zeigen, ob diese Substanz den gleichen Effekt wie Ethidiumbromid auf AlkBh1 hat.

4.1.11.2 Doxorubicin

Doxorubicin gehört zu den Anthracyclinen, einer Antibiotikagruppe, die in der Krebstherapie eine breite und wirkungsvolle Anwendung findet. Doxorubicin ist ein Topoisomerase II Inhibitor und wirkt durch die Interkalation in die DNA (Varga, Ferdinandy, Liaudet, & Pacher, 2015). Diese Schädigung findet sowohl im Nukleus als auch an der mitochondrialen DNA statt (Abbildung 4-41, Abbildung 4-46).

Jedoch führt die Therapie mit Doxorubicin zu Nebenwirkungen, wie z.B. die Kardiomyopathie oder zu anderen Herzleiden (Minotti, Menna, Salvatorelli, Cairo, & Gianni, 2004). Es wird vermutet, dass diese Nebenwirkungen durch die direkte Wirkung von Doxorubicin auf die Mitochondrien bzw. Hemmung der mitochondrialen DNA Synthese verursacht wird (Varga et al., 2015). Eine mögliche Ursache für die Nebenwirkungen von Doxorubicin kann eine Umstrukturierung der mitochondrialen Nukleoiden in größere „Knötchen“ sein (Alan et al., 2016; Ashley & Poulton, 2009). Die Ursachen dieser Nebenwirkungen konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden (Dimitrakis, Romay-Ogando, Timolati, Suter, and Zuppinger (2012).

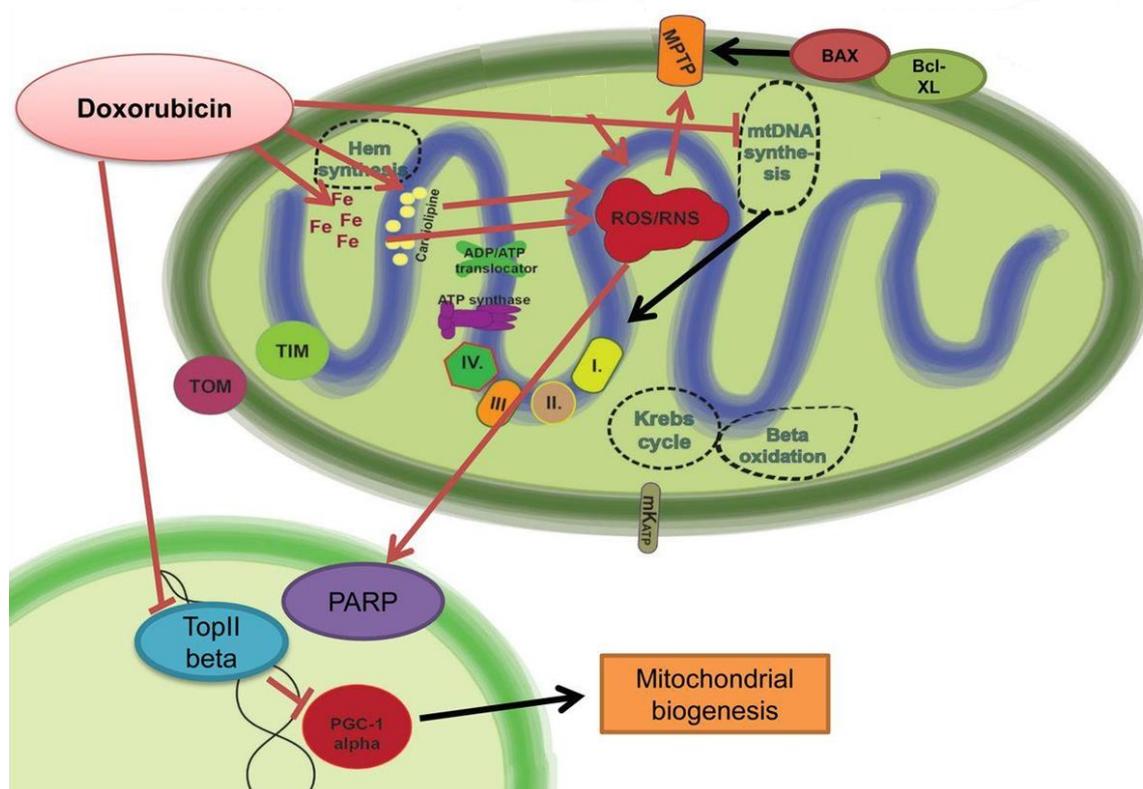


Abbildung 4-46 Funktion und Wirkungsweise von Doxorubicin in den Mitochondrien

Doxorubicin ist ein Chemotherapeutikum, das sowohl in den Mitochondrien als auch im Zellkern Einfluss auf die DNA hat. Im Zellkern interkaliert Doxorubicin in die DNA und inhibiert die Topoisomerase II, in den Mitochondrien werden unter anderem die mtDNA Synthese inhibiert [angepasst an (Varga et al., 2015)].

Doxorubicin schaltet in geringen Dosen, den ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)-DNA Reparaturweg im Zellkern ein (Kurz, Douglas, & Lees-Miller, 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass ATAD3A eventuell im Zellkern in diesen Reparaturweg involviert ist (You et al., 2013). Da ATADA3A und AlkBh1 miteinander interagieren (Kapitel 4.1.4) und AlkBh1 ein Homolog des AlkB DNA-Reparatur-Enzym ist, könnte AlkBh1 auch bei der DNA Reparatur eine Rolle spielen.

Konzentrationsabhängige Wirkung von Doxorubicin auf AlkBh1

(Ashley & Poulton, 2009) konnten zeigen, dass Doxorubicin in die mtDNA von Fibroblasten und A549 Zellen bei diversen Konzentration interkaliert und zur Akkumulation der mtDNA führt. Die Peak Plasma Konzentration (PPC) von Doxorubicin entspricht $0.02\mu\text{M}$ bis $2\mu\text{M}$ (Greene, Collins, Jenkins, Speyer, & Myers, 1983). A549 Zellen wurden mit Doxorubicin in niedrigen Konzentrationen behandelt, die eine Akkumulation der mtDNA zur Folge hatten (Ashley & Poulton, 2009) und noch der Peak Plasma Konzentration ($0.02\mu\text{M}$ bis $2\mu\text{M}$) in Patienten entsprechen (Greene et al., 1983).

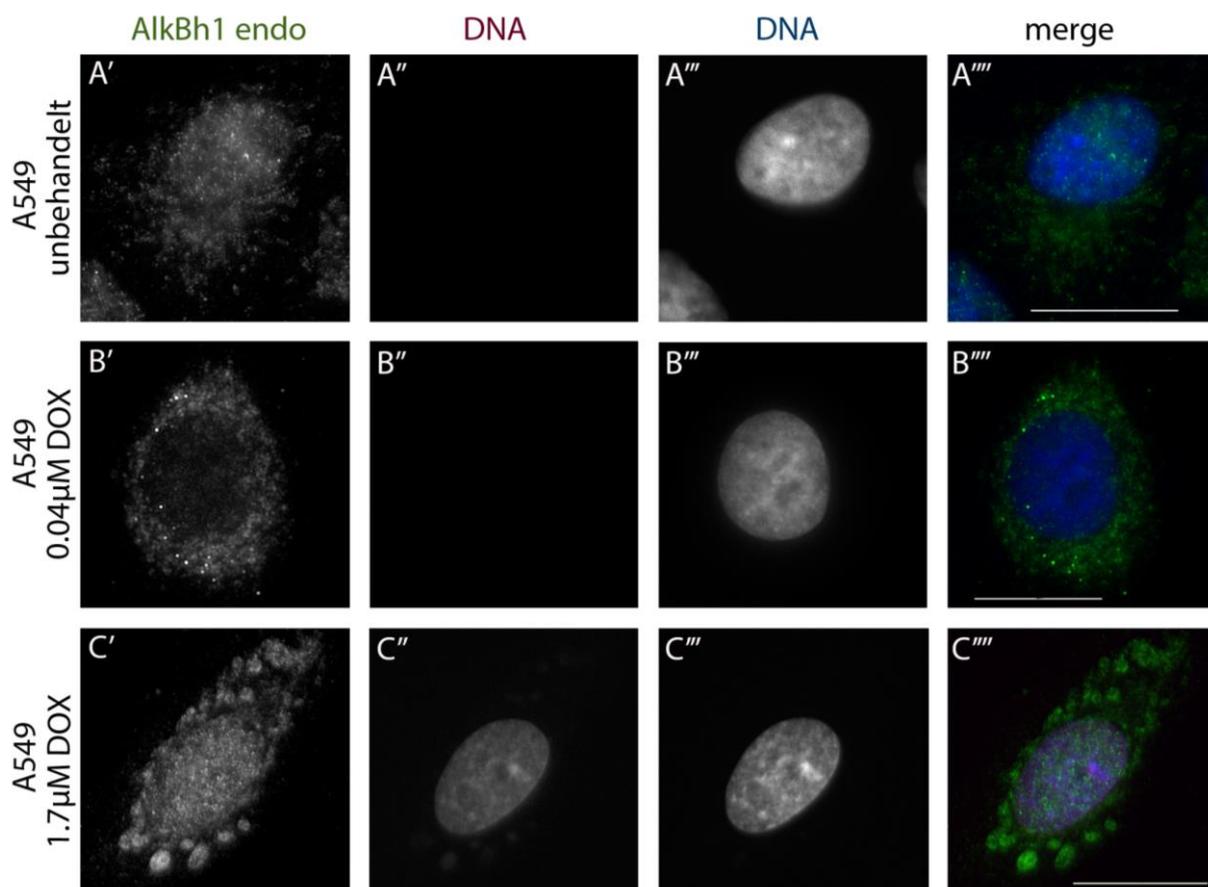


Abbildung 4-47 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh1 AK (grün), behandelt mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen für 24 Stunden

A549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. A.-A. A549 unbehandelt; B.-B. A549 behandelt mit $0,04\mu\text{M}$ Doxorubicin; C.-C. A549 Zellen behandelt mit $1,7\mu\text{M}$ Doxorubicin; Die Zellen wurden 24 Stunden behandelt. α -AlkBh1 AK (1_{EPR}), DNA gefärbt mit DAPI ($1\mu\text{g/ml}$); Fluoreszenzmikroskop. Maßstab: $20\mu\text{m}$

In Abbildung 4-47 (α -AlkBh1) und Abbildung 4-48 (α -mtSSBP) sind A549 Zellen gezeigt, die mit unterschiedlichen Dosen (0.04 μ M und 1.7 μ M) Doxorubicin für 24 Stunden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle behandelt wurden. Diese Zellen wurden nach 24 Stunden fixiert und entweder mit α -AlkBh1 Antikörper oder mit α -SSBP (mitochondrial) gegengefärbt.

Die Zellen, die mit dem α -AlkBh1 Antikörper gefärbt wurden, zeigen für AlkBh1 eine dosisabhängige Veränderung der Struktur, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4-47). Nach einer Behandlung der Zellen mit einer sehr geringen Dosis Doxorubicin (0.04 μ M, Abbildung 4-47B'-B''''') sind keine großen Unterschiede zur Kontrolle erkennbar. Die Behandlung mit 1.7 μ M Doxorubicin, führt in A549 Zellen zu einer Akkumulation von AlkBh1 in mehreren großen knötchenartigen Strukturen (Abbildung 4-47C'-C'''''), die 2-5x so groß sind wie die normalen Mitochondrien in der Kontrollzelle.

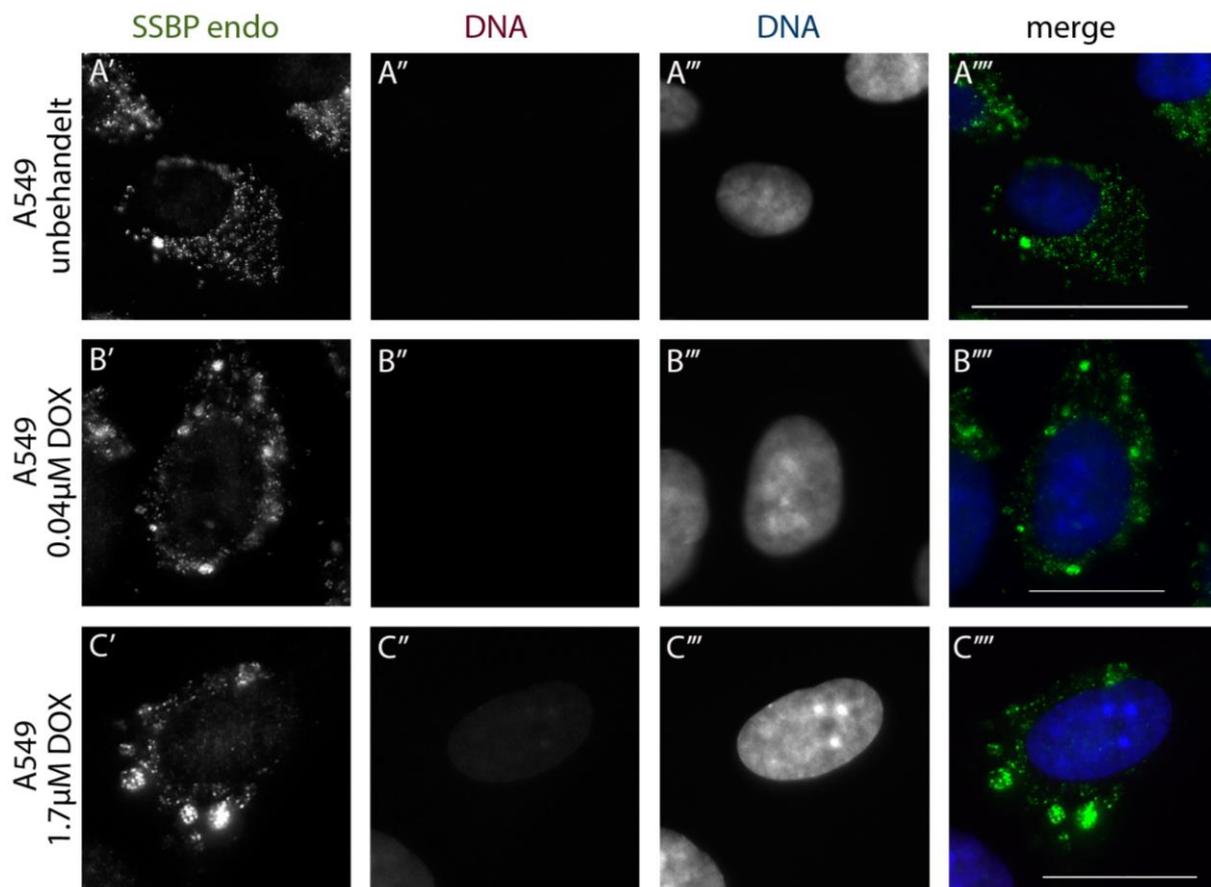


Abbildung 4-48 A549 Zellen kogefärbt mit α -SSBP AK (grün) behandelt mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen für 24 Stunden

A549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. A'-A'''' A549 unbehandelt; B'-B'''' A549 behandelt mit 0,04 μ M Doxorubicin; C'-C'''' A549 Zellen behandelt mit 1,7 μ M Doxorubicin. Die Zellen wurden 24 Stunden behandelt. α -SSBP AK, DNA gefärbt mit DAPI (1 μ g/ml); Fluoreszenzmikroskop. Maßstab:20 μ m

Der gleiche Versuch wurde mit dem Protein mtSSBP (mitochondriale Protein Single Strand Binding Protein) durchgeführt. Nach einer Doxorubicinbehandlung mit $1.7\mu\text{M}$ konnte auch eine Akkumulation von mtSSBP in größere „Knötchen“ beobachtet werden (Abbildung 4-48C'-C''').

Die weiteren Versuche wurden mit einer Therapiekonzentration von $1.7\mu\text{M}$ Doxorubicin durchgeführt.

Zeitabhängige Wirkung von Doxorubicin auf A549 Zellen

Eine Akkumulation der mitochondrialen Proteine nach Doxorubicinbehandlung ($1.7\mu\text{M}$) konnte in A549 Zellen beobachtet werden. Die Behandlung von weiteren getesteten Zelllinien wie z. B. HeLa, PC-3 und Panc-1 führte nicht zu einer Akkumulation der mtDNA und der mitochondrialen Proteine nach Doxorubicinbehandlung mit $1.7\mu\text{M}$ nach 24 Stunden.

Um herauszufinden, ob die Behandlung mit Doxorubicin ($1.7\mu\text{M}$) einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat, wurden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und mittels Neutralrotaufnahmeassay ausgewertet. Dabei ist zu erkennen, dass die Vitalität der Zellen nach 24 Stunden mit $1.7\mu\text{M}$ Doxorubicin noch hoch ist (~90%), jedoch sinkt diese nach 48 Stunden unter 40% und nach 72 Stunden unter 20% ab (Abbildung 4-49).

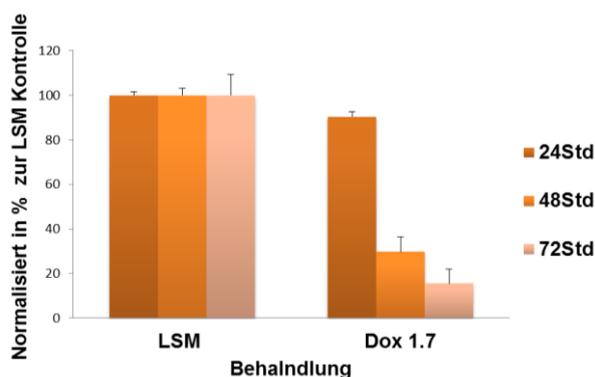


Abbildung 4-49 Doxorubicinbehandlung von A549 Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten

A549 Zellen behandelt mit $1.7\mu\text{M}$ Doxorubicin über drei unterschiedliche Zeitpunkte (24Std, 48Std, 72Std). Read out: Neutralrotaufnahmeassay. Die Werte wurden zur Lösungsmittelkontrolle normalisiert, 100% entspricht einer vollständigen Vitalität der Zellen

Wirkung von Doxorubicin auf zellulärer Ebene

Doxorubicin ($1.7\mu\text{M}$) führt zu wenigen großen Akkumulationen im Zytoplasma von AlkBh1 (Abbildung 4-47 C') und mtSSB Protein (Abbildung 4-48 C') in A549 Zellen. Mit einem transient exprimierten Mito-GFP wurde geklärt, ob diese „Knötchen“ noch in das mitochondriale Netzwerk integriert sind (Abbildung 4-51). Um eine genauere Aussage über die Lokalisation von Mito-GFP und AlkBh1 zu erhalten, wurden hochauflösende Bilder am 3D-SIM gemacht. Jedoch war

AlkBh1 durch die schwache Detektion des Antikörpersignals im Ultrarotbereichen (647nm) oder im ultravioletten Bereich (488nm) schwierig.

Darum wurde als nächster Schritt AlkBh1 mit mtSSBP kogefärbt, um herauszufinden, ob diese beiden Proteine in den „Knötchen“ überlappen. Eine Kofärbung von AlkBh1 (Abbildung 4-50 A', B') mit mtSSBP (Abbildung 4-50 A''', B''') zeigt ähnliche Strukturen. Jedoch kann keine direkte Kolo-kalisation beobachtet werden. Es scheint, als ob diese beiden Proteine direkt nebeneinander liegen und sich gegenseitig ergänzen (Abbildung 4-50 A''', B'''). Nachdem AlkBh1 und mtSSBP ähnliche Strukturen aufweisen (Abbildung 4-50), wurden weitere Versuche mit dem mtSSB Protein durchgeführt.

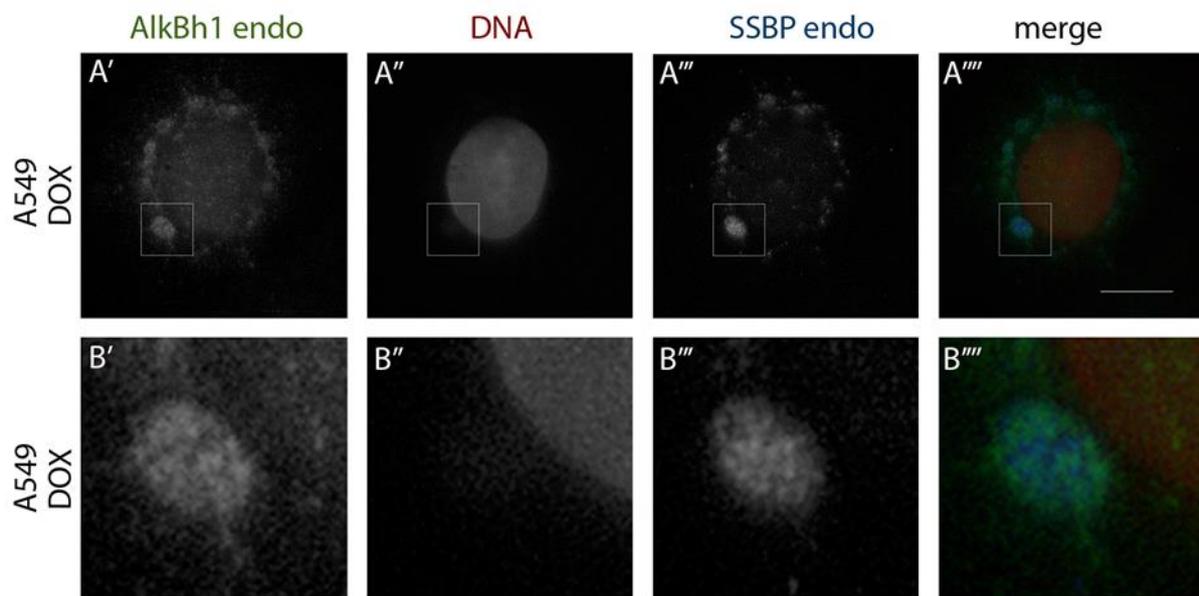


Abbildung 4-50 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 (grün) mit α -SSBP AK (blau) behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen behandelt mit Doxorubicin (1.7 μ M, 24 Stunden) kogefärbt mit A.', B.' α -AlkBh1 (grün) und A.'', B.'' α -SSBP (blau), A.', B.' RFP Kanal (Interkalation von Doxorubicin in die DNA); A''', B''' Überlagerung von AlkBh1 und SSBP Färbung; Fluoreszenzmikroskop, Maßstab: 20 μ m

Abbildung 4-51 zeigt A549 Zellen mit transient exprimiertem Mito-GFP. Diese Zellen wurden mit Doxorubicin (1.7 μ M, 24Std) behandelt und mit α -mtSSBP Antikörper gegengefärbt und mittels 3D-SIM ausgewertet. Wenn man die Mitochondrien vergrößert betrachtet (Abbildung 4-51 B'''), erkennt man, dass es sich um ein großes Mitochondrium handelt, dass im netzwerkartigen System noch mit anderen Mitochondrien verbunden ist. Es ist erkennbar, dass das mtSSBP relativ mittig in der mitochondrialen Matrix angelagert ist und Mito-GFP als Netzwerk darum herum (Abbildung 4-51 A''').

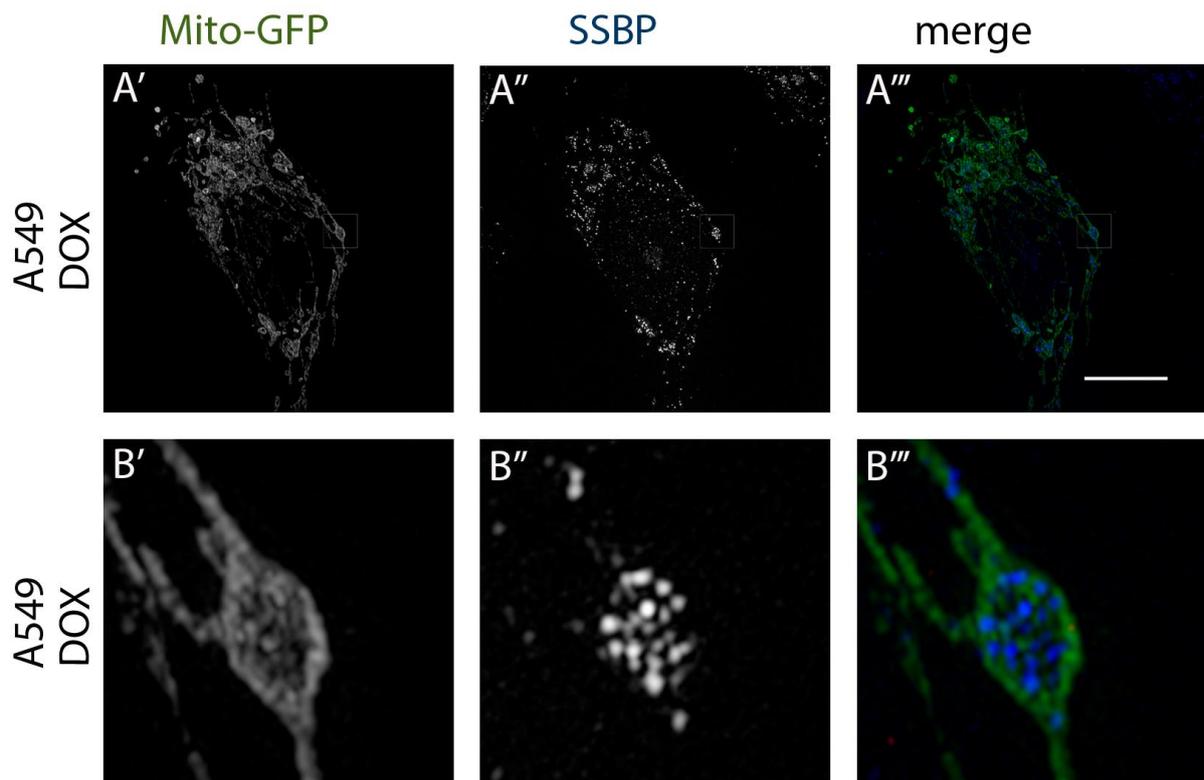


Abbildung 4-51 A549 Zellen mit transient exprimierten Mito-GFP (grün) kofärbt mit α -SSBP AK (blau) behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen die transient Mito-GFP exprimieren wurden mit α -SSBP (blau) kofärbt, (A'-B''') behandelt mit Doxorubicin $1.7\mu\text{M}$ für 24 Stunden. 3D SIM; Maßstab: $20\mu\text{m}$

Zusätzlich wurden A549 Zellen transient mit Mito-GFP transfiziert, für 24 Stunden mit Doxorubicin ($1.7\mu\text{M}$) behandelt und anschließend mit α -AlkBh1 Antikörper gegengefärbt. Die Doxorubicinbehandlung führt zur Bildung von riesigen Mitochondrien (Abbildung 4-52 E', F', weiße Pfeile), die zwei bis fünfmal so groß sind wie die Mitochondrien der Kontrollzellen (Abbildung 4-52 B', D').

Wie bereits für SSBP scheint AlkBh1 dagegen eher in der Mitte der riesigen Mitochondrien angelagert zu sein (Abbildung 4-52, orange Sterne). In den unbehandelten A549 Zellen (Abbildung 4-52 A''', B''') und der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 4-52 C''', D''') kann man erkennen, dass AlkBh1 die gleiche Strukturen und eine ähnliche Lokalisation wie Mito-GFP aufweist.

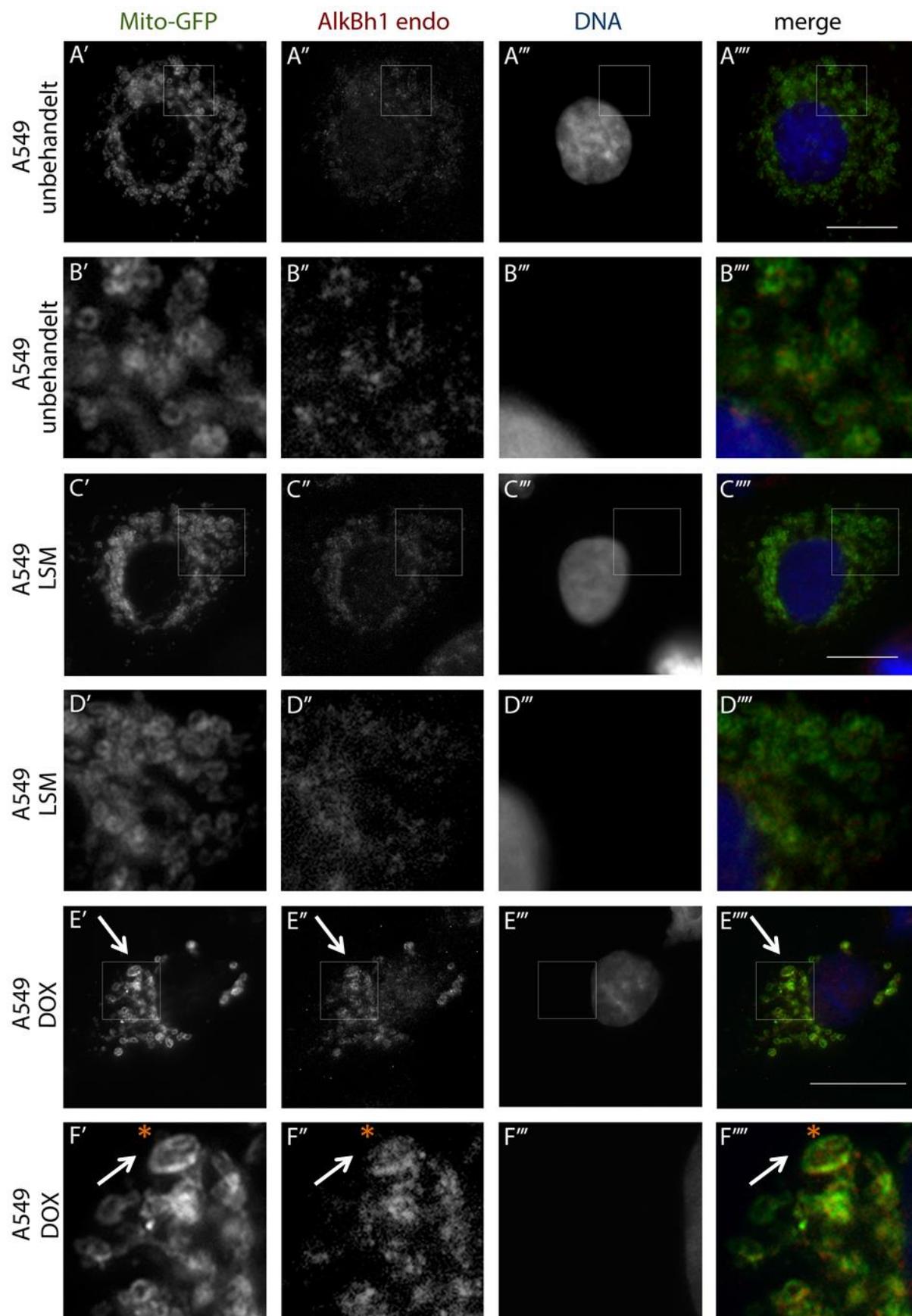


Abbildung 4-52 A549 Zellen mit transient exprimiertem Mito-GFP (grün) kofärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen im Vergleich mit . A.'-B.'''', unbehandelten Zellen; C.'-D.''''' Lösungsmittelkontrolle (LSM); und E.'-F.''''' Behandlung mit Doxorubicin (DOX) 1.7 μ M für 24 Stunden; Weiße Pfeile zeigen die „Knötchen“, die durch Doxorubicin verursacht werden; Orange Sterne zeigen Unterschiede von AlkBh1 und Mito-GFP in „Knötchen“; Fluoreszenzmikroskopie; Maßstab: 20 μ m

Um auszuschließen, dass die beobachtete Akkumulationen eine Vorstufe zur Mitophagie oder Autophagie sind, wurden die zwei Proteine p62 und LC3 [Abbildung 4-53, (Kubli & Gustafsson, 2012)] als Marker verwendet, und mit AlkBh1 oder TFAM gegengefärbt. Die Antikörper (p62 und LC3-B) zu diesem Versuch wurden von Dr. Gisela Schimmack (AG Prof. Krappmann, TOXI, Helmholtz Zentrum) zur Verfügung gestellt.

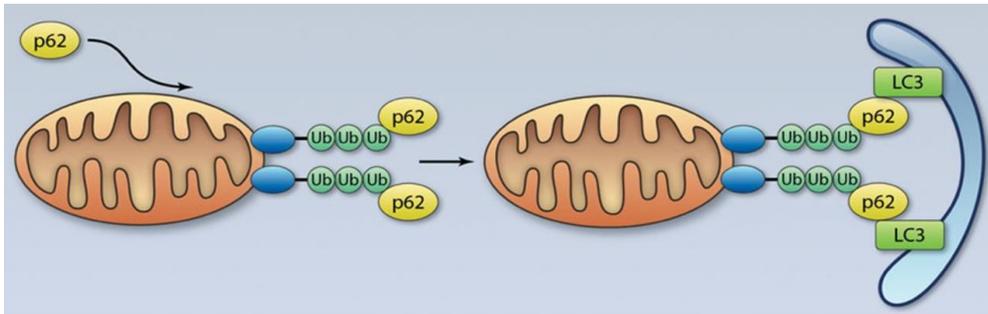


Abbildung 4-53 Modell wie Mitochondrien mittels Mitophagie und Autophagie ubiquitiniert werden
Ansicht einer induzierten Mitophagie mit p62 als Marker mit anschließender Autophagie mit LC3 als Marker. Quelle: (Kubli & Gustafsson, 2012)

A549 Zellen wurden mit dem Marker für Mitophagie (p62, Abbildung 4-53) zusammen mit TFAM kofärbt und ausgewertet. Die Behandlung von A549 Zellen mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle induziert keine Mitophagie und zeigt die gleiche Expression von p62 wie die unbehandelte Kontrolle (Abbildung 4-54 A'-D'''). Nach der Behandlung mit Doxorubicin (1.7µM, 24Std) kann man erkennen, dass TFAM wieder in einem großen „Knötchen“ akkumuliert ist und p62 als erhöhtes Signal in kleinen roten Punkten sichtbar wird (Abbildung 4-54 E'-F'''). Jedoch ist deutlich erkennbar, dass p62 nicht mit TFAM kolokalisiert (Abbildung 4-54 F'''). Da es sich bei diesen riesigen Mitochondrien nicht um Mitophagosomen handelt, wurden die knötchenartigen Strukturen mit einem Autophagiemarker LC3 gegengefärbt.

Abbildung 4-55 zeigt A549 Zellen mit AlkBh1 und LC3-B Antikörpern kofärbt. Die unbehandelte Kontrolle (Abbildung 4-55 A'-A''') und die Lösungsmittelkontrolle (DMSO, Abbildung 4-55 B'-B''') zeigen sowohl für die AlkBh1 als auch für LC3-B Färbung keinen Unterschied in der Struktur. DMSO als Lösungsmittel scheint keinen Einfluss auf die Expression von LC3-B zu haben. Nach Behandlung der A549 Zellen mit Doxorubicin (1.7µM, 24Std) akkumuliert AlkBh1 in „Knötchen“ (Abbildung 4-55 E', F'). Diese zeigen jedoch keine Kolokalisation mit den Autophagosomen, die durch den Marker LC-3B gezeigt werden (Abbildung 4-55 E''', F''').

Doxorubicinbehandlung (1.7µM, 24Std) in A549 Zellen führt zu einer Akkumulation von TFAM (Abbildung 4-56, grün) und AlkBh1 (Abbildung 4-56A“, rot) in riesigen Mitochondrien (Abbildung 4-56 weiße Pfeile), wo diese beiden Proteine miteinander gelegentlich überlagern (Abbildung 4-56 B'-B''', orange Sterne). Für AlkBh1 kann man zusätzlich eine leichte Färbung im Zellkern erkennen.

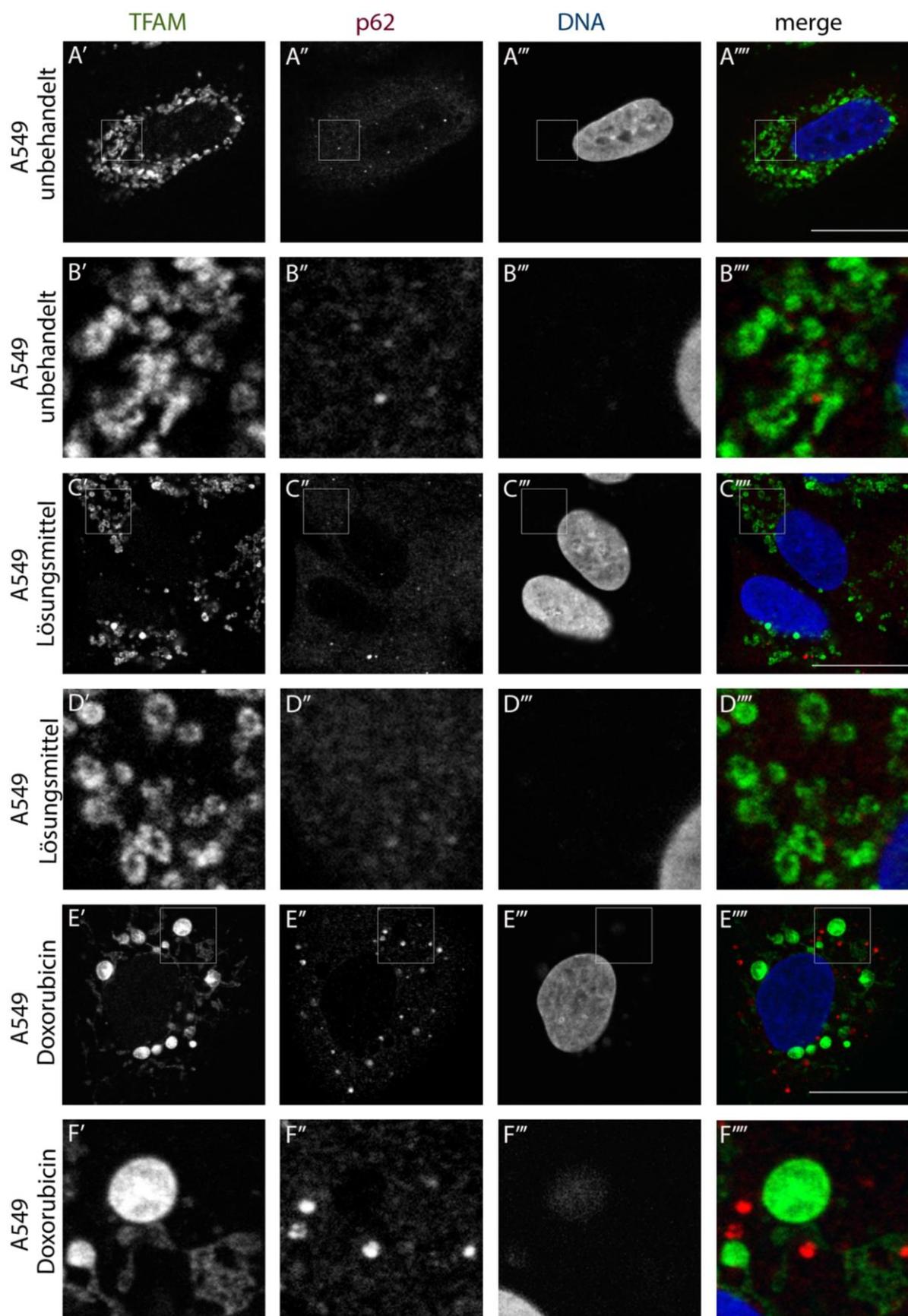


Abbildung 4-54 A549 Zellen gefärbt mit α -TFAM AK (grün) und α -p62 (rot), ein Mitophagiemarker, behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen im Vergleich von A.'-B.''''' unbehandelt, C.'-D.''''' Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und E.'-F.''''' behandelt mit Doxorubicin 1.7 μ M; α -TFAM AK, α -p62 (Mitophagiemarker), Konfokale Schnitte; Maßstab: 20 μ m

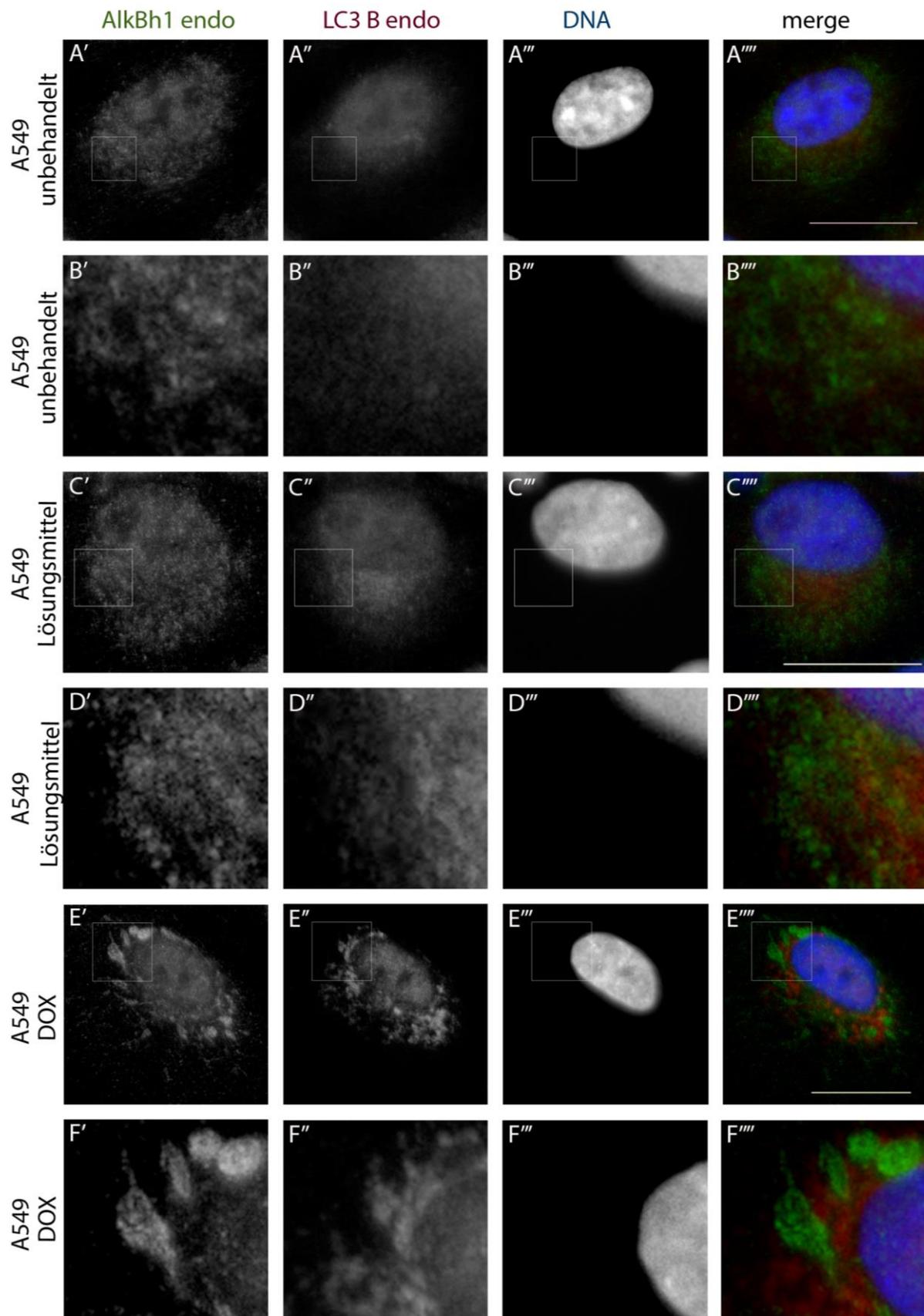


Abbildung 4-55 A549 Zellen gefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) mit α -LC3-B AK, ein Autophagiemarker behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen im Vergleich von A.'-B.''''' unbehandelt, C.'-D.''''' Lösungsmittelkontrolle und E.'-F.''''' Behandlung mit Doxorubicin 1.7 μ M; α -AlkBh1 AK, α -LC3-B AK, als Autophagiemarker; Fluoreszenzmikroskopie; Maßstab: 20 μ m

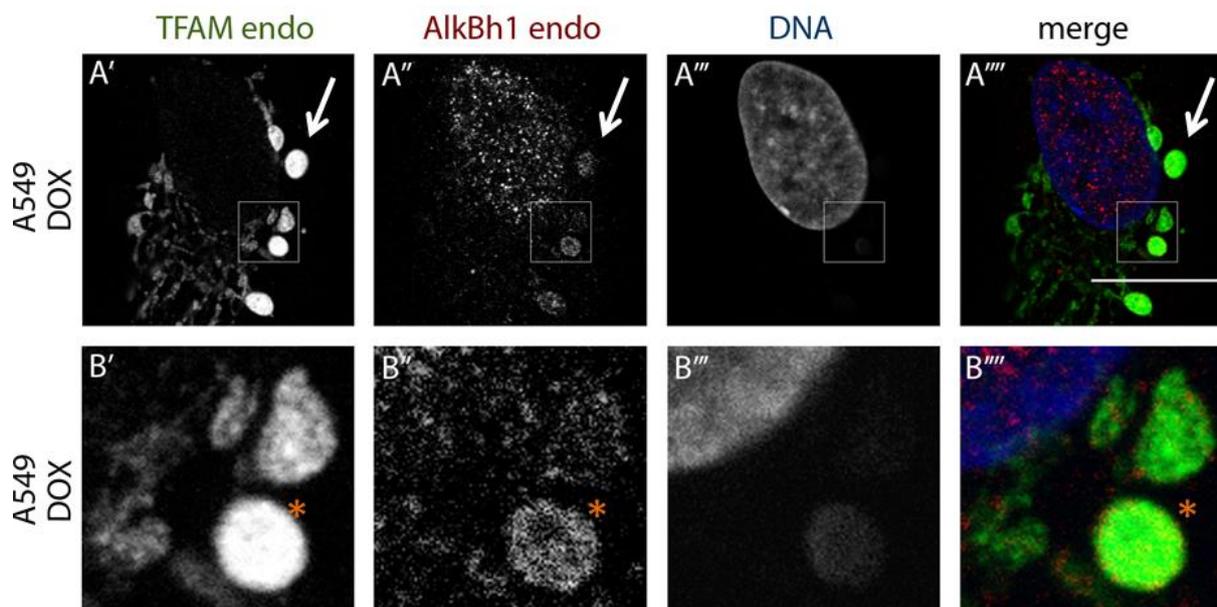


Abbildung 4-56 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -TFAM AK (grün), behandelt mit Doxorubicin

A.'-B.''' A549 Zellen behandelt mit Doxorubicin ($1.7\mu\text{M}$) für 24 Stunden. A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -TFAM (grün) kofärbt, DNA (DAPI $1\mu\text{g/ml}$); Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von TFAM und AlkBh1 in „Knötchen“; Orange Sterne zeigen eine Überlagerung dieser Proteine im „Knötchen“; Konfokale Schnitte; Maßstab: $20\mu\text{m}$

Die Kofärbung der mitochondrialen DNA mit AlkBh1 nach Doxorubicinbehandlung führt zu einer sichtbaren Überlagerung (Abbildung 4-57). Die Strukturen sehen ähnlich aus und scheinen auch manchmal übereinander zu liegen (Abbildung 4-57A''', B'''' weiße Pfeile).

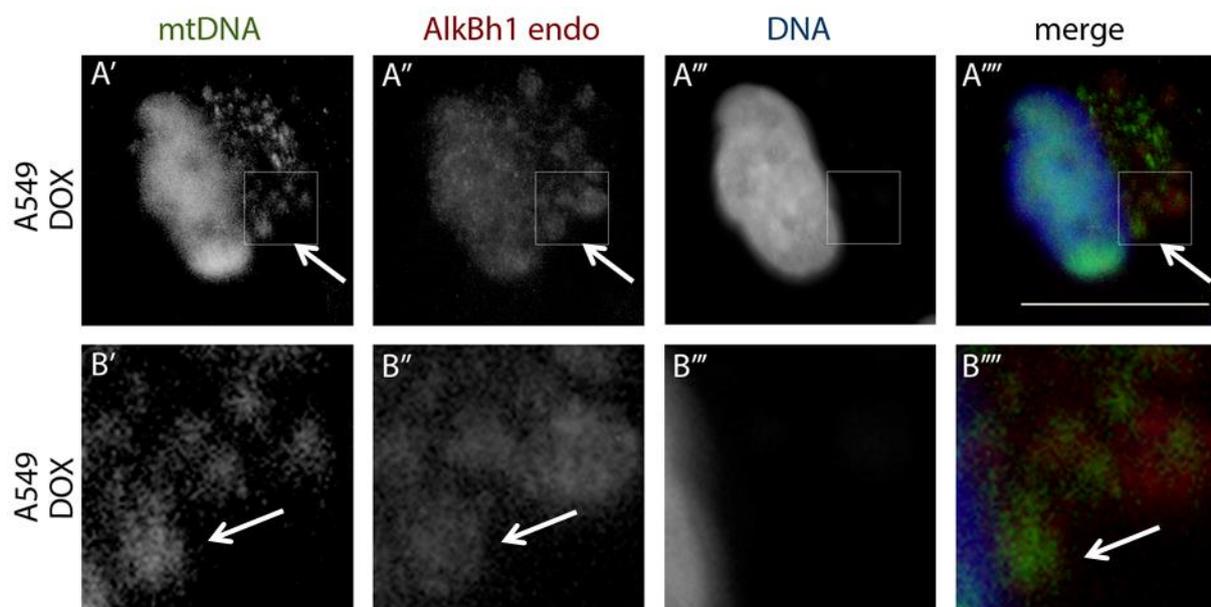


Abbildung 4-57 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün) behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA (grün) kofärbt, DNA (DAPI $1\mu\text{g/ml}$); A.'-B.''' behandelt mit Doxorubicin $1.7\mu\text{M}$ für 24 Stunden. Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von mtDNA und AlkBh1 in „Knötchen“; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: $20\mu\text{m}$

In Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 konnte ATAD3A als Interaktionspartner für AlkBh1 detektiert und validiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass AlkBh1 und ATAD3A in A549 Zellen unter normalen Bedingungen partiell überlagern (Abbildung 4-12 C').

Durch die Doxorubicinbehandlung (1.7 μ M, 24Std) scheint sich die Lokalisation von AlkBh1 und ATAD3A in den Mitochondrien zu verändern (Abbildung 4-58 B''', D'''). Es ist erkennbar, dass AlkBh1 (Abbildung 4-58 B'', D'', rot) und ATAD3A (Abbildung 4-58 B', D', grün) nach Doxorubicinbehandlung seltener überlagern. AlkBh1 ist mehr mittig akkumuliert und ATAD3A scheint sich an diese Akkumulationen anzulagern (Abbildung 4-58).

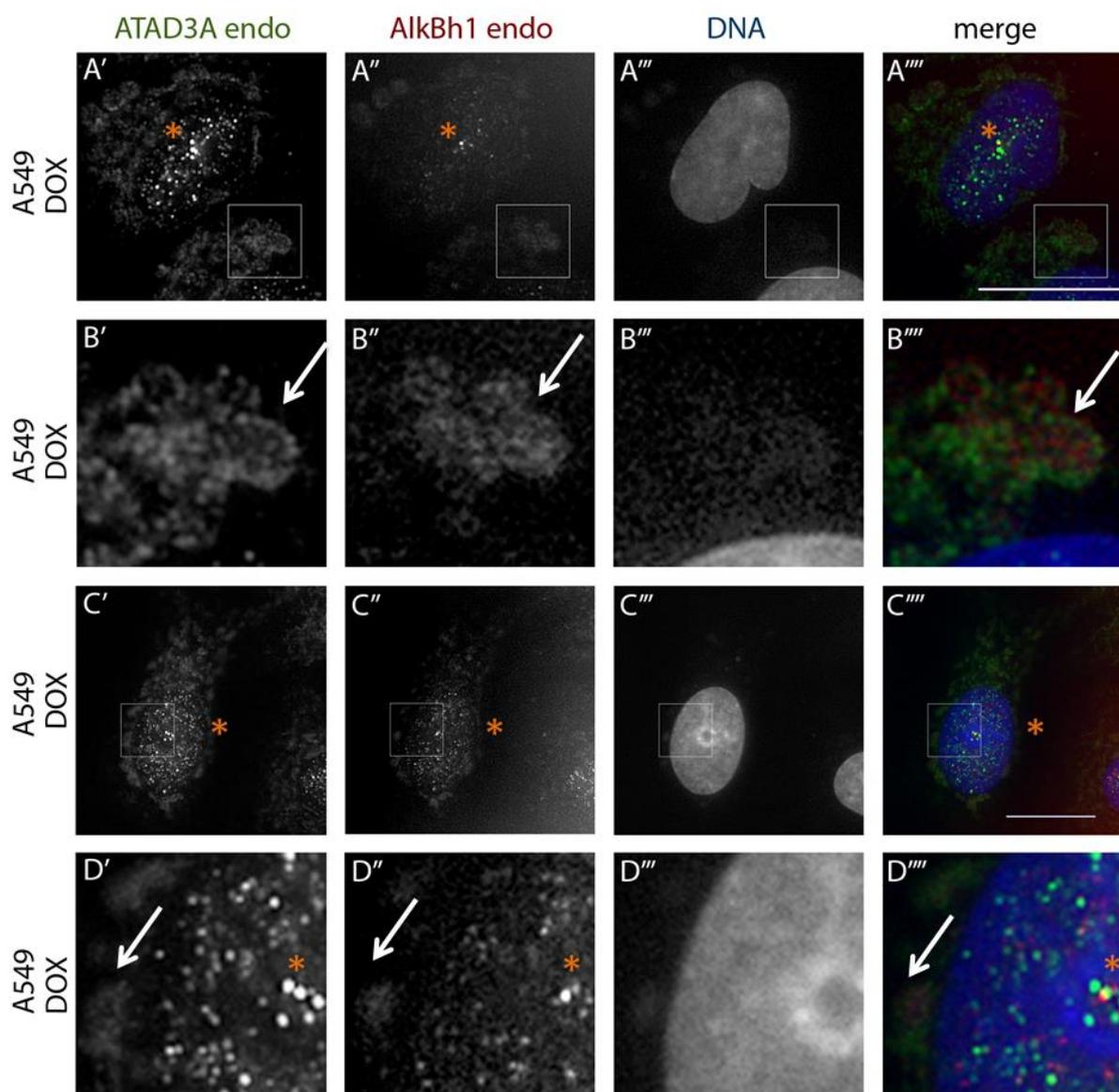


Abbildung 4-58 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -ATAD3A AK (grün), behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -ATAD3A AK (grün) kogefärbt, DNA (DAPI 1 μ g/ml); A.-B.'''', C.-D.''''' behandelt mit Doxorubicin (1.7 μ M) für 24 Stunden. Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von AlkBh1 und ATAD3A in „Knötchen“; Orange Sterne markieren die wahrscheinliche Akkumulation von ATAD3A und AlkBh1 im Nukleolus; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20 μ m

Scheinbar kommt es im Zellkern zur gelegentlichen Überlagerung von AlkBh1 mit ATAD3A (Abbildung 4-58 A^{''''}, C^{''''}, D^{''''}, orange Sterne). Nach Doxorubicinbehandlung ist ein erhöhtes Signal von ATAD3A A und AlkBh1 im Zellkern bzw. eine Akkumulation im Nukleus erkennbar (Abbildung 4-58 A^{''''}, C^{''''}, D^{''''}, orange Sterne).

ATAD3A wurde mit mtSSBP nach Doxorubicinbehandlung kogefärbt und mittels 3D SIM ausgewertet. Es ist zu sehen, dass ATAD3A (Abbildung 4-59 A', B', weiße Pfeile) mehr außen in einer kreisförmigen Struktur lokalisiert ist und mtSSBP (Abbildung 4-59 A'', B'', weiße Pfeile) mehr im Inneren angelagert (Abbildung 4-59 A^{''''} & B^{''''}). Auch hier ist eine Akkumulation von ATAD3A im Zellkern erkennbar (Abbildung 4-59 A' & A^{''''}, orange Sterne).

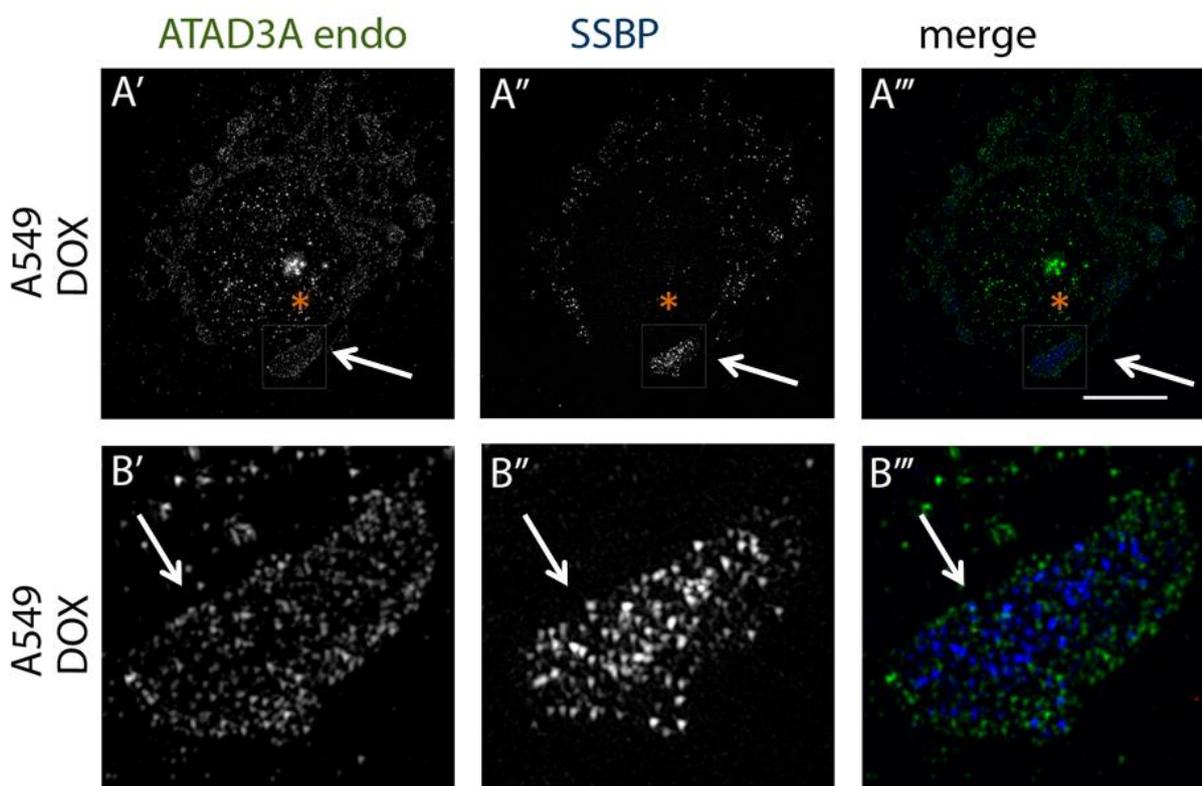


Abbildung 4-59 A549 Zellen kogefärbt mit α -SSBP AK (blau) und α -ATAD3A AK (grün), behandelt mit Doxorubicin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -SSBP AK (blau) und α -ATAD3A (grün) kogefärbt, A'-B^{''''} behandelt mit Doxorubicin (1.7 μ M) für 24 Stunden. Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von SSBP und ATAD3A in „Knötchen“; Orange Sterne markieren die wahrscheinliche Akkumulation von ATAD3A im Zellkern; 3D SIM; Maßstab: 20 μ m

Die Doxorubicinbehandlung in patientenrelevanter Konzentration (1.7 μ M) führt in A549 Zellen zu einer Akkumulation aller Mitochondrien zu wenigen riesigen Mitochondrien. Im Moment kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Strukturen um Mitophagosomen oder Autophagosomen handelt. Es scheint, dass innerhalb dieser Mitochondrien eine Verschiebung der Lokalisation von AlkBh1 nach innen hin stattfindet. AlkBh1 verhält sich mehr wie TFAM und SSBP (Abbildung 4-60).

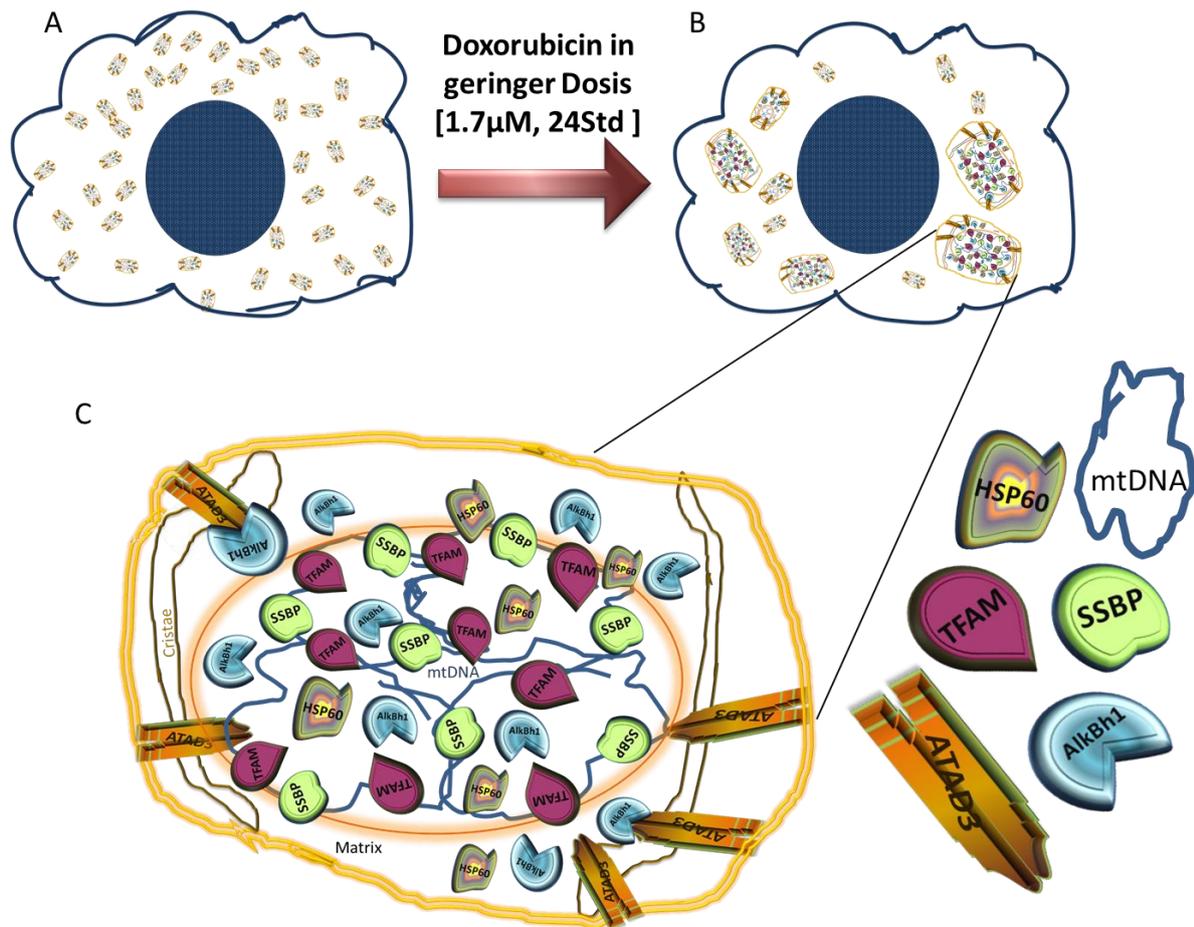


Abbildung 4-60 Skizze über die mögliche Lokalisation von AlkBh1 nach Doxorubicinbehandlung

A. Zelle vor Behandlung mit Doxorubicin mit kleinen Mitochondrien, B. Zelle nach Behandlung mit 1.7 μM Doxorubicin für 24 Stunden mit gigantischen Mitochondrien C. Modell, wie die Verteilung der Proteine in einem gigantischem Mitochondrium ausschauen könnte, in Anlehnung an die hier in dieser Arbeit erhobenen Daten und getesteten Proteinen. AlkBh1 verhält sich in einem durch Doxorubicin induzierten „Knötchen“ mehr wie TFAM, mtSSBP, Hsp60 und die mtDNA. ATAD3A scheint diese Akkumulationen zu umlagern.

4.1.11.3 Bleomycin

Bleomycin ist ein Chemotherapeutikum, das zur Antibiotikafamilie der Glykopeptide gehört. Es wird seit vielen Jahren als Antikrebsmittel gegen diverse Lymphome, Kopf-Hals-Karzinome und bei Keimzelltumoren angewendet (J. Chen & Stubbe, 2005).

Die Therapie kann zu Nebenwirkungen, wie z.B. einer Lungenfibrose führen. Bleomycin induziert Einzel- und Doppelstrangbrüche in die DNA, die vergleichbar mit einer ionisierenden Strahlung sind. Dies führt zu einer Stressantwort, die die Tumorzellen schädigen soll. Um DNA Strangbrüche zu induzieren, braucht Bleomycin Kofaktoren wie Eisen oder Kupfer und Sauerstoff (J. Chen & Stubbe, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Schäden an der mitochondrialen DNA, die durch Bleomycin induziert werden, in sehr kurzer Zeit repariert werden können (Shen, Wertelecki, Driggers, LeDoux, & Wilson, 1995). Der Mechanismus, der für die Reparatur der mitochondrialen DNA verantwortlich ist, wurde bis heute nicht entdeckt (Yeung et al., 2015).

Die Behandlung von Zellen mit Bleomycin (10µg/ml) induziert den DNA-Reparaturweg über ATM (Ataxia telangiectasia mutated) im Zellkern [Abbildung 4-61A & (J. Chen & Stubbe, 2005)].

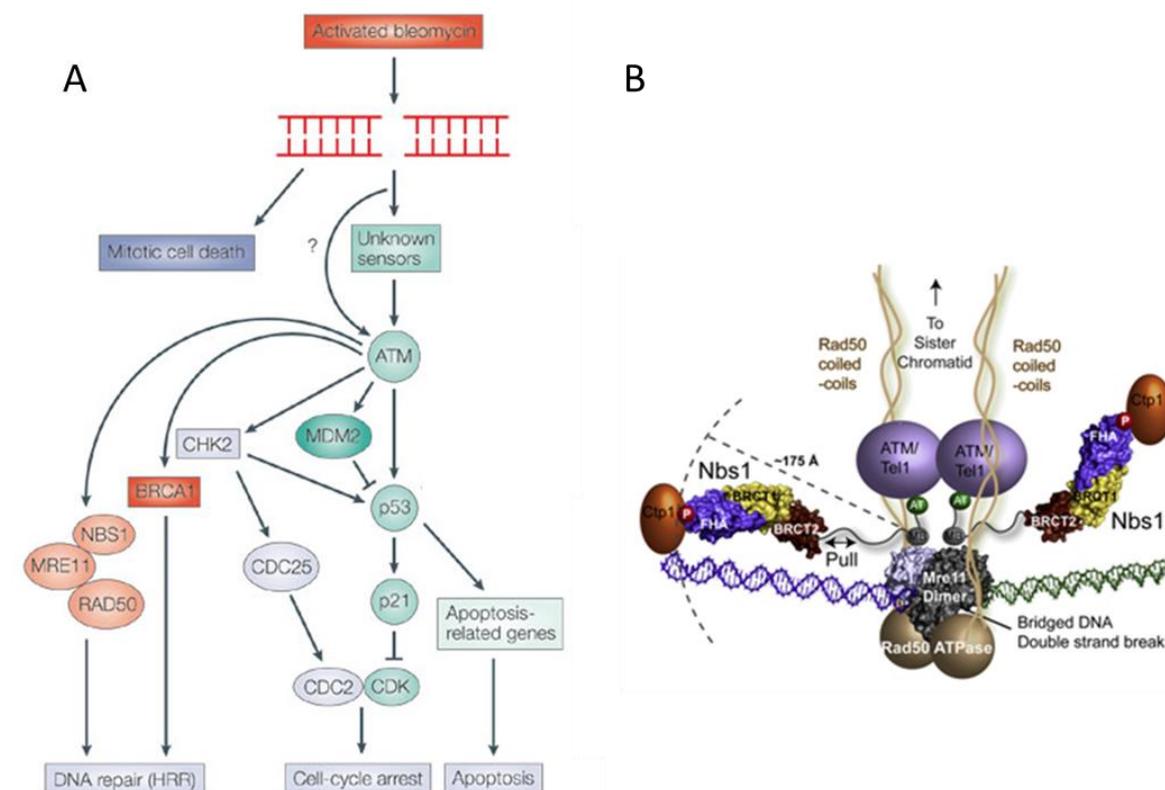


Abbildung 4-61 Übersicht über die Wirkungsweise von Bleomycin und Aufbau des MRN-Reparatur Komplexes

A. Bleomycin induziert durch Doppelstrangbrüche den ATM Reparaturweg und aktiviert dadurch den MRN-Komplex. Dadurch wird DNA-Reparatur im Zellkern aktiviert [angepasst an (J. Chen & Stubbe, 2005)] B. ATM Reparaturmechanismus induziert MRN-Komplex, der aus mehreren beteiligten Proteinen wie z.B. Mre11, Rad50 und Nibrin besteht.

Quelle: http://bl1231.als.lbl.gov/2009/10/01/MRN_model.png

Unabhängig davon konnten Wissenschaftler zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit Bleomycin, dazu führt, dass das Mre11 Protein vermehrt in den Mitochondrien auftritt und an die mitochondriale DNA bindet (Dmitrieva, Malide, & Burg, 2011). Mre11 bildet mit Rad50 und Nibrin den MRN-Komplex, der durch ATM angeschaltet wird, direkt an die DNA bindet und eine wichtige Rolle in der DNA Reparatur spielt (Abbildung 4-61B).

Zusätzlich konnten Wissenschaftler zeigen, dass A549 Zellen, die keine mitochondriale DNA mehr besitzen, resistent gegen die Behandlung mit Bleomycin sind (Brar et al., 2012).

Bleomycin schädigt wie Doxorubicin und Ethidiumbromid die mitochondrialen DNA [Abbildung 4-35 & (Dmitrieva et al., 2011)]. Die Behandlung mit unterschiedlichen Dosen Bleomycin [10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml und 60µg/ml, (Dmitrieva et al., 2011; Shen et al., 1995)] in unterschiedlichen Zeiträumen (2Std oder 24Std) führt zu einer Akkumulation der mitochondrialen DNA in A549 Zellen. Die Peak Plasma Konzentration für Bleomycin in Patienten liegt bei 1-10µg/ml. Jedoch ist die Peak Plasma Konzentration erhöht, wenn die Nieren nicht effektiv arbeiten.

(Quelle: http://mri.medagencies.org/download/NL_H_1792_001_FinalSPC_2of2.pdf).

Konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von Bleomycin in A549 Zellen

A549 Zellen wurden mit unterschiedlichen Bleomycin-Konzentrationen behandelt, um die Wirkung des Bleomycins auf mögliche Akkumulationen von AlkBh1 und mtDNA in den Mitochondrien zu untersuchen. Wie in Abbildung 4-62 (weiße Pfeile) gezeigt, kann man für alle hier getesteten Konzentrationen (10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml und 60µg/ml) nach zwei Stunden kleine Akkumulationen von AlkBh1 im Zytoplasma erkennen, die meistens mit der mitochondrialen DNA überlagern.

Die Behandlung der A549 Zellen mit 10µg/ml Bleomycin führt nach 2 Stunden zur Akkumulation von AlkBh1 (Abbildung 4-62 B'', weißer Pfeil). Jedoch ist die mitochondriale DNA noch nicht als „Knötchen“ sichtbar (Abbildung 4-62 B', B''', weiße Pfeile), sie zeigt eher ein punktuell Muster, dass partiell mit dem AlkBh1 Signal überlagert.

Bei einer Bleomycintherapie mit 20µg/ml (nach 2 Stunden) ist sowohl AlkBh1 als auch die mtDNA als „Knötchen“ im Zytoplasma erkennbar (Abbildung 4-62 C', C'', C''', weiße Pfeile). Für die beiden höheren Konzentrationen 40µg/ml (Abbildung 4-62 D'-D''', weiße Pfeile) und 60µg/ml (Abbildung 4-62 E'-E''', weiße Pfeile) Bleomycin ist sowohl für die mtDNA als auch für AlkBh1 ein „Knötchen“ sichtbar.

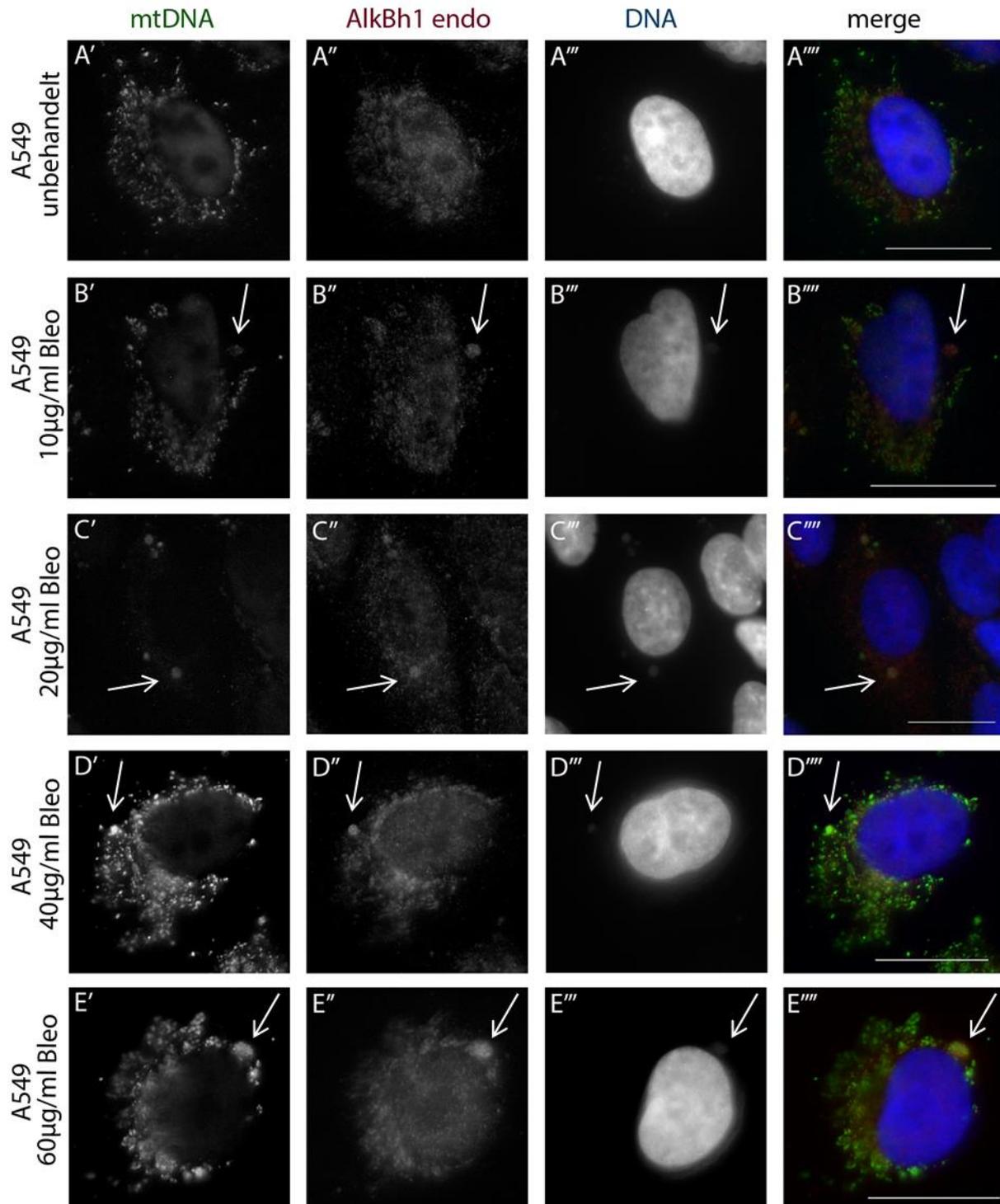


Abbildung 4-62 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün), behandelt mit unterschiedlichen Bleomycinkonzentrationen für 2 Stunden

A549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Bleomycin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. A.-A. A549 unbehandelt; B.-B. A549 behandelt mit 10µg/ml Bleomycin; C.-C. A549 Zellen behandelt mit 20µg/ml Bleomycin; D.-D. A549 Zellen behandelt mit 40µg/ml Bleomycin; E.-E. A549 Zellen behandelt mit 60µg/ml Bleomycin. Weiße Pfeile zeigen „Knötchen“, wahrscheinlich durch Bleomycin verursacht. Die Zellen wurden 2 Stunden behandelt. Fluoreszenzmikroskop. Maßstab:20µm

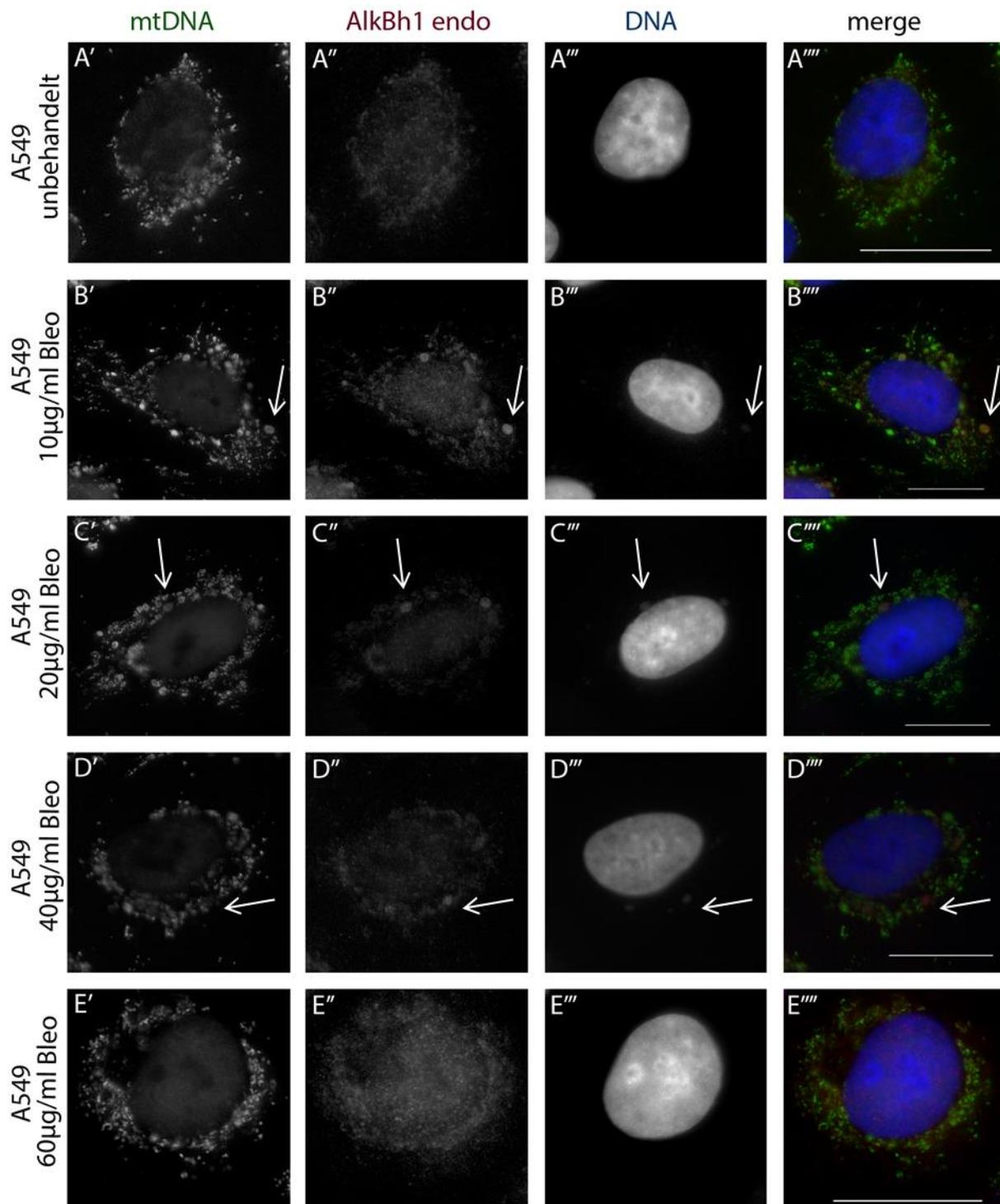


Abbildung 4-63 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün), behandelt mit unterschiedlichen Bleomycinkonzentrationen für 24 Stunden

A549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Bleomycin im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle. A.-A. A549 unbehandelt; B.-B. A549 behandelt mit 10 μ g/ml Bleomycin; C.-C. A549 Zellen behandelt mit 20 μ g/ml Bleomycin; D.-D. A549 Zellen behandelt mit 40 μ g/ml Bleomycin; E.-E. A549 Zellen behandelt mit 60 μ g/ml Bleomycin. Weiße Pfeile zeigen „Knötchen“, wahrscheinlich durch Bleomycin verursacht. Die Zellen wurden 24 Stunden behandelt; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab:20 μ m

Eine längere Behandlung von A549 Zellen mit Bleomycin in unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml und 60 μ g/ml) zeigen nach 24 Stunden, dass sich die „Knötchen“-

Konstellation verändert hat (Abbildung 4-63, weiße Pfeile). Nach 24 Stunden sind bei 60µg/ml keine „Knötchen“ in der Zelle detektierbar (Abbildung 4-63 E'-E''').

Bei 40µg/ml ist AlkBh1 als „Knötchen“ noch sichtbar (Abbildung 4-63 D'', D''', weiße Pfeile), jedoch scheint die mtDNA nicht mehr im „Knötchen“ zu sein (Abbildung 4-63 D', D''', weiße Pfeile). Bei den beiden niedrigen Konzentrationen, ist sowohl AlkBh1 als auch die mtDNA noch als Knötchenform im Zytoplasma sichtbar (Abbildung 4-63 B'-C''', weiße Pfeile). Es erweckt den Eindruck, dass AlkBh1 bei niedrigen Konzentrationen zuerst in der „Knötchen“-Form auftritt und dann erst die mitochondriale DNA akkumuliert (Abbildung 4-62 B', B'').

Als nächstes wurde der Einfluss von der Bleomycinbehandlungen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Vitalität in A549 getestet. Dazu wurden A549 Zellen mit vier unterschiedlichen Konzentrationen Bleomycin (10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml und 60µg/ml) über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden therapiert. Wie in Abbildung 4-64 gezeigt, hat 10µg/ml nach 24 Stunden keinen Effekt auf die Vitalität, bei den höheren Konzentrationen ist ein leichter Dosisseffekt sichtbar. Nach 48 Stunden fällt die Vitalität für 10µg/ml und 20µg/ml Bleomycin auf ~90% für die höheren Konzentrationen ist wieder ein höherer Abfall der Vitalität erkennbar. Nach 72 Stunden Therapie sinkt für alle vier Konzentrationen die Vitalität unter 40%.

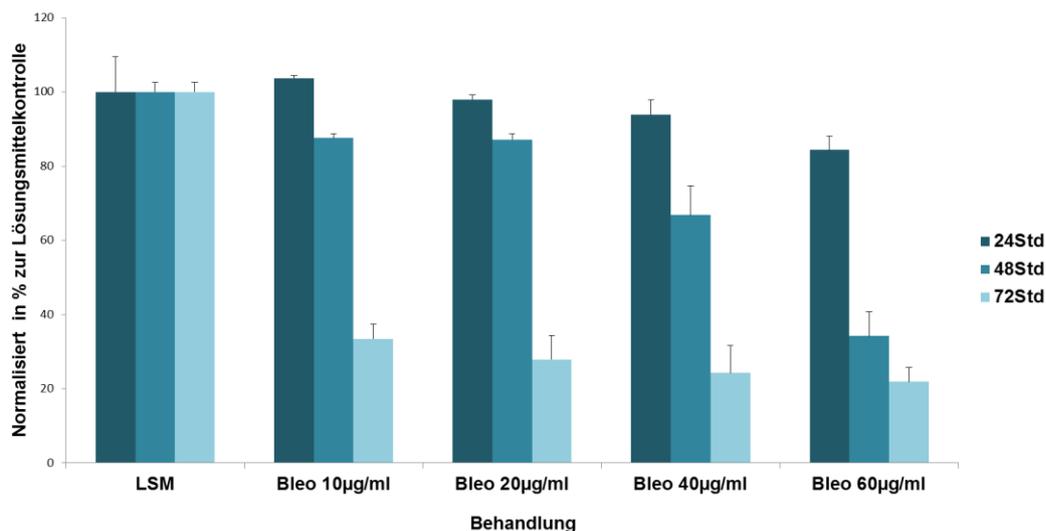


Abbildung 4-64 Bleomycinbehandlung von A549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitpunkten

A549 Zellen behandelt mit Bleomycin mit unterschiedlichen Konzentrationen (10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 60µg/ml) über drei unterschiedliche Zeitpunkte (24Std, 48Std, 72Std). Read out: Neutralrot-Aufnahme Assay. Die Werte wurden zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle normalisiert, 100% entspricht einer vollständigen Vitalität der Zellen

Wirkung von Bleomycin auf zellulärer Ebene in den Mitochondrien

Wie auch bei der Doxorubicinbehandlung, wurde in A549 Zellen Mito-GFP transient überexprimiert und mit Bleomycin (20µg/ml, 2Std) behandelt, um herauszufinden, ob und wie sich das mitochondriale Netzwerk und die Mitochondrienstruktur verändert. Dann wurden die Zellen mit einem AlkBh1 Antikörper gegengefärbt und mittels 3D SIM ausgewertet.

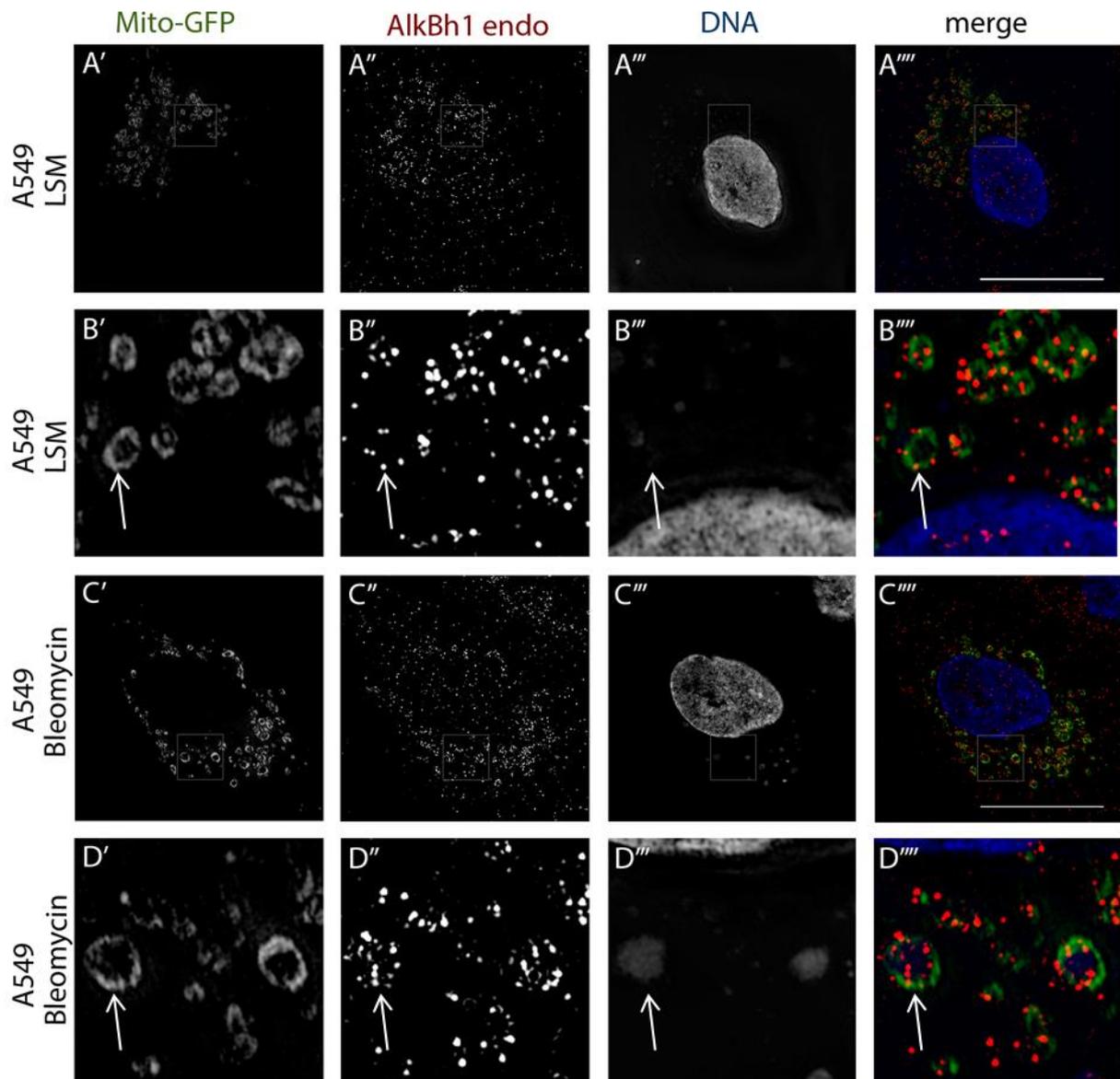


Abbildung 4-65 A549 Zellen mit Expression von Mito-GFP und kogefärbt mit α -AlkBh1 AK, behandelt mit Bleomycin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit transient exprimiertem Mito-GFP und α -AlkBh1 AK (rot) kogefärbt, DNA (DAPI 1 µg/ml, blau). A.'-B.''' Lösungsmittelkontrolle (LSM); C.'-D.''' behandelt mit 20 µg/ml Bleomycin für 2 Stunden. Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von AlkBh1 und Mito-GFP in „Knötchen“; 3D SIM; Maßstab: 20 µm

Wie in Abbildung 4-65 (C', D') sichtbar ist, sind die Mitochondrien nach Bleomycinbehandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um ungefähr das Doppelte vergrößert (Abbildung 4-65 A', B', weiße Pfeile). Die Akkumulation der Mitochondrien, die durch Bleomycin verursacht werden, sind jedoch um etwa die Hälfte kleiner als die knötchenartigen Mitochondrien, die durch Doxorubicin induziert werden (Abbildung 4-47 C'). Wenn man die Lokalisation von AlkBh1 nach Bleomycinbehandlung betrachtet, kann man eine Verschiebung von AlkBh1 in die Mitte der Mitochondrien erkennen (Lösungsmittelkontrolle: Abbildung 4-65 B'-B''', weiße Pfeile; Bleomycin behandelt: Abbildung 4-65 D'-D''', weiße Pfeile). An der DAPI Färbung kann man auch eine Akkumulation der mitochondrialen DNA zu größeren „Knötchen“ erkennen (Abbildung

4-65C''', D''', weiße Pfeile). Diese ist mit der Färbung der mtDNA unter gleichen Bedingungen auch erkennbar (Abbildung 4-62C').

Da ATAD3A ein Interaktionspartner von AlkBh1 ist (siehe dazu Kapitel 4.1.3 & 4.1.4), wurden A549 Zellen mit Bleomycin (10µg/ml, 2Std) behandelt und mit ATAD3A und AlkBh1 kogefärbt.

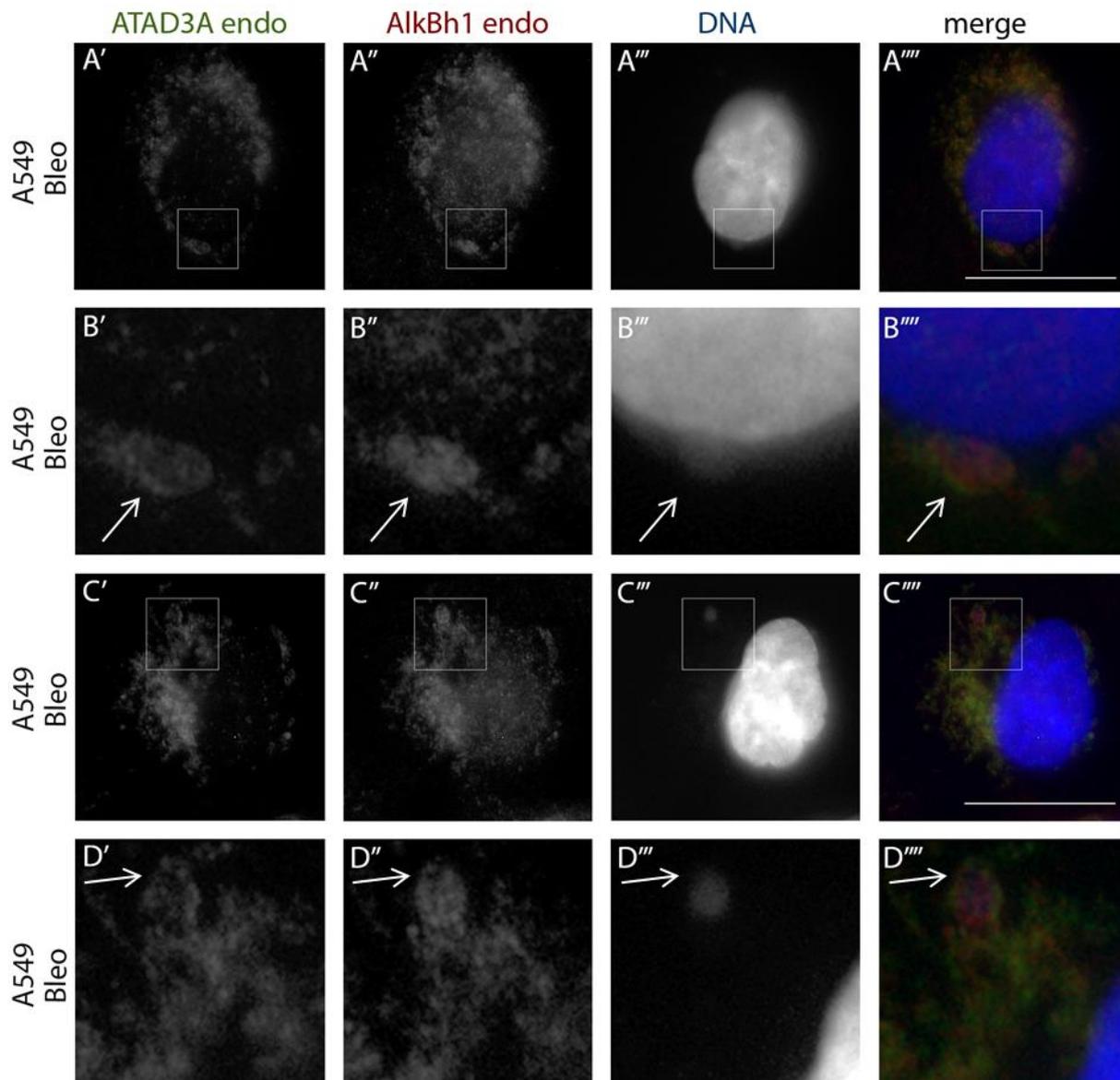


Abbildung 4-66 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -ATAD3A AK (grün), behandelt mit Bleomycin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -ATAD3A kogefärbt, DNA (DAPI 1µg/ml, blau). A.'-B.'''', C.'-D.''''. Behandelt mit Bleomycin 10µg/ml für 2 Stunden. Weiße Pfeile markieren die Lokalisation von AlkBh1 und ATAD3A in „Knötchen“; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20µm

ATAD3A scheint AlkBh1 zu umranden (Abbildung 4-66A', B', C', D'). AlkBh1 dagegen ist in einem „Knötchen“ in der Mitte (Abbildung 4-66 A'', B'', C'', D'') akkumuliert (Abbildung 4-66 A''', B''', C''', D''', weiße Pfeile). In Abbildung 4-66 (D'-D''', weiße Pfeile) ist in den großen Mitochondrien kaum eine Überlagerung von AlkBh1 und ATAD3A detektierbar.

4.2 AlkBh7

AlkBh7 ist wie AlkBh1 eine eisenabhängige 2-OG-Oxygenase, deren Lokalisation durch ein mitochondriales Signalpeptid in den Mitochondrien erwartet wird. AlkBh7 wurde von unterschiedlichen Gruppen mittels Immunfluoreszenz in den Mitochondrien nachgewiesen [Abbildung 2-5, (Fu et al., 2013; Solberg et al., 2013)]. Für AlkBh7 konnte eine mögliche Funktion in der Nekrose und im Fettstoffwechsel beschrieben werden (Fu et al., 2013; Solberg et al., 2013). Ein Substrat oder die genaue Funktion von AlkBh7 konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden.

4.2.1 AlkBh7 – Homologie

AlkBh7 weist 19% (41 AS) Gleichheit und 15% (32AS) Ähnlichkeit im Vergleich zur bakteriellen AlkB Sequenz auf (Abbildung 4-67).

```

Q9BT30 ALKB7_HUMAN  MAGTGLLALRTLPGPSWVRGS--GPSVLS-----RLQDA-----AVVRPGF  39
P05050 ALKB_ECOLI    -----MLDLF-ADAEPWQEPLAAGAVILRRFAFNAAEQLIRDINDVASQSPFRQMVTPGG  54
                   : * * . * . * : *                : : * .                : * **

Q9BT30 ALKB7_HUMAN  LSTAEETLSRELEPELRRRRY EYDHWDAAIHGFR ETEKSRWSEASRAILQRVQAA----  95
P05050 ALKB_ECOLI   YTMSVAMTNCGHLGWTHRQGYLYSPID-----PQTNKPWPAMPQSFHNLQRAATAA 107
                   : : * . * . * : * : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Q9BT30 ALKB7_HUMAN  ---AFGPGQTLSSVHVL DLEARGYIKPHVDSIKFCGATIAGLSLLSPSVMRLVHTQEFG 152
P05050 ALKB_ECOLI   GYPDFQPDACLINRYAP--GAKLSLHQDKDEP-DLRAPIVSVSLGLPAIFQFGGLKRND 163
                   * * * : . * : * : : . * . * * . : * * * : * : : : : .

Q9BT30 ALKB7_HUMAN  EWLELLEPGSLYILRGSARYDFSHEILRDEESFFGERRIPGRRISVICRSLPEGMGPG 212
P05050 ALKB_ECOLI   PLKRLLEHGDVVVWGGESRLFY-HGIQPLKAGFH-----PLTIDCRYNLTFRQAG 213
                   . **** * . : : * . : * : * * : * * : . * .                : : : * *

Q9BT30 ALKB7_HUMAN  ESGQPPAC                221
P05050 ALKB_ECOLI   KKE-----                216
                   : .

```

Abbildung 4-67 Alignment von humanem AlkBh7 (Q9BT30) und bakteriellem AlkB (P05050)

Homologie zwischen bakteriellen AlkB und humanem AlkBh7 mit Blick auf die konservierten Domänen. (*Alignment* durchgeführt mit: www.uniprot.org/align); Eisenbindestellen (H.D...H), 2-OG-Bindestelle, und DSBH-fold Domäne (2-OG-Dioxygenase Domäne) und Mitochondriales Signalpeptid; * → Gleiche Aminosäuren (AS), : → Ähnliche Aminosäuren

AlkBh7 ist in unterschiedlichen Modellorganismen wie z.B. von Hydra über *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus* bis Mensch relativ gut konserviert. Die doppelsträngige β -Helix Domäne, (DSBH-fold, *Double-stranded beta-helix*, 2-OG-Dioxygenase Domäne) weist am C-terminalen Ende mit Eisenbindestelle und 2-OG-Bindestelle die größte Sequenzhomologie auf, der N-terminus ist variabel in der Aminosäurezusammensetzung (Abbildung 4-68). Die Hydra Sequenz wurde bisher noch nicht vollständig bestimmt.

```

AlkBh7_Homo sapiens      --MAGTGLLALRLTLPGPS-----WVRGSGPSVLSRLQDAA 33
AlkBh7_Mus_musculus     --MAGSRRLAMRLLSGCA-----WVRGSDSAVLGRLRDEA 33
AlkBh7_D.melanogaster   MIIQNRSPFLIGHILRCHRQAVESNAIKANLTAYFGKWPETEQKEFRQHM 50
AlkBh7_C.elegans        MKITPRT--LQHLIKFHN-----LELWPKDLAETMKTCC 32
AlkBh7_Hydra_magnipapillata -----MASMRNFAIEGFR 13
      :
AlkBh7_Homo sapiens     VVRPGFLSTAAEETLSRELEPELRRRRYEDHWDAAIH GFRETEKSRWSE 83
AlkBh7_Mus_musculus     VVHPGFLSQEEEDTLTRELEPQLRRRRYEDHWDAAIHGFRETEKSCWSD 83
AlkBh7_D.melanogaster   RIITDFISEPEEQQLHEEIEPYMSRLRYEFDHWDDAIHGFRETERKKWFP 100
AlkBh7_C.elegans        YVKKDFITEAEKSLLDVPEPHMKRLRYEKSHWDDAIHLYREREQRKWRD 82
AlkBh7_Hydra_magnipapillata EVEKTIWSKECQLILDRVANKVFGDDIDSMQPFTHAIEGFREVEKTIWSK 63
      :
AlkBh7_Homo sapiens     ASRAILQVRVQAAAFGPGQ--TLLSSVHVLDLEARGYIKPHVDSIKFCGATI 132
AlkBh7_Mus_musculus     ASQVILQVRVRAAFGPDQ--SLLSPVHVLDLEPRGYIKPHVDSVKFCGSTI 132
AlkBh7_D.melanogaster   KNREILERVVRQVAFDG--AVMPYVHILD LAPDGVIKHVDSRYCGNTI 147
AlkBh7_C.elegans        ENLEVISRIRSESFGANT--EHLTYVHILD LHKDGVIKPHIDAIRYCGDVI 131
AlkBh7_Hydra_magnipapillata ECQLILDRVANKVFGDDIDSMQPFTHVLDLAKNGYIKPHIDSVKFCGSKI 113
      :
AlkBh7_Homo sapiens     AGLSLLSPSVMRLVHTQE----- 150
AlkBh7_Mus_musculus     AGLSLLSPSVMKLVHTQE----- 150
AlkBh7_D.melanogaster   SGISLLSDSVMRLVTRTDEQRYQQSSGTATDPNSQSEPDAAAYRHQPEAS 197
AlkBh7_C.elegans        TGVSLSDAIMRLRHKQ----- 149
AlkBh7_Hydra_magnipapillata AGLCLLSSAVMRFVSSN----- 131
      :
AlkBh7_Homo sapiens     --PGEWLELLELLEPGSLYILRGSARYDFSHEILRDEESFFGERRIPRGRRI 198
AlkBh7_Mus_musculus     --PEQWLELLELLEPGSLYILRGSARYDFSHEILRDEESFFGEHRVPRGRRI 198
AlkBh7_D.melanogaster   LKNFYADILLPRRSLYIMSHTARYKFTHEILAKEHSQFQCALVPRTRRI 247
AlkBh7_C.elegans        -KDELIMDLLMPPRSYRLGGPGRYDFTHEVLGEQESVWNGEQVPRRRRI 198
AlkBh7_Hydra_magnipapillata --SKLSVDVLMPRYCLVMSNDLRYDFTHEILSDEKSFWNGQHIPRDRRL 179
      :
AlkBh7_Homo sapiens     SVICRSLPEG----- 208
AlkBh7_Mus_musculus     SVICRSLPEG----- 208
AlkBh7_D.melanogaster   SIICRNEP----- 255
AlkBh7_C.elegans        SIICRDLPKV----- 208
AlkBh7_Hydra_magnipapillata AILRRSKPVSNLLYFEDQHMKMYIYGSIMKFI MKFLIVESLLLFISAAQGF 229
      :
AlkBh7_Homo sapiens     -MGPGESGQPPFAC----- 221
AlkBh7_Mus_musculus     -MGPGRPEEPFAC----- 221
AlkBh7_D.melanogaster   -----
AlkBh7_C.elegans        -ANRQTAEELIKLKIPEEI----- 227
AlkBh7_Hydra_magnipapillata NMKSYVPYKELSFKEYQQYINEQQWYNPACIFFNGGTFLQNYTNGLEMFN 279
      :
AlkBh7_Homo sapiens     -----
AlkBh7_Mus_musculus     -----
AlkBh7_D.melanogaster   -----
AlkBh7_C.elegans        -----
AlkBh7_Hydra_magnipapillata AKLEDKNMTLFIAPKQAKLFAKNVSSNLSLESNNSTFSDIPEKEVGIGSS 329
      :
AlkBh7_Homo sapiens     -----
AlkBh7_Mus_musculus     -----
AlkBh7_D.melanogaster   -----
AlkBh7_C.elegans        -----
AlkBh7_Hydra_magnipapillata KYNLLLFA 337

```

Abbildung 4-68 Abgleich von unterschiedlichen AlkBh7 Proteinsequenzen von diversen Modellorganismen

Durchgeführt mit CLUSTAL 2.1 für Mensch (NCBI: gi 74733083), Maus (NCBI: gi 81905503), Fliege (NCBI: gi 85726474), Wurm (NCBI: gi 71998257) und Hydra (NCBI: gi 449687322). Die Proteinsequenz für Hydra ist noch nicht charakterisiert worden, Sequenz wurde durch Blasten der humanen Sequenz in NCBI gefunden. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Mitochondriale Signalpeptid ist unter uniprot.com für Q9BT30 ausgewiesen. Eisenbindestellen (H.D...H), 2-OG-Bindestelle, DSBH (2-OG-Dioxygenase Domäne) und Mitochondriales Signalpeptid; * → Gleiche Aminosäuren (AS), : → Ähnliche Aminosäuren

4.2.2 Lokalisationsbestimmung von AlkBh7 in Zellen

In dieser Arbeit wurde mittels isolierteren Mitochondrien auf Proteinebene und mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation von AlkBh7 bestimmt.

4.2.2.1 Bestimmung der Lokalisation auf Proteinebene mittels WB

In Kooperation mit Frau Kremmer (IMI, Helmholtz Zentrum) wurden im Laufe dieser Arbeit diverse Antikörper für AlkBh7 hergestellt (AlkBh7_KR_34, AlkBh7_KR_38, siehe Kapitel 6.6). Es wurden mehrere, von unterschiedlichen Unternehmen hergestellten Antikörpern, für die Detektion von endogenem AlkBh7 getestet. Jedoch konnte mit keinem dieser Antikörper ein konstantes, spezifisches Signal für endogenes AlkBh7 auf Proteinebene detektiert werden. Alle in dieser Arbeit getesteten Antikörper, haben jedoch die Expression von ungetaggt, überexprimiertem AlkBh7 im Western Blot und in der Immunfluoreszenz erkannt. In der Immunfluoreszenz wurde das Signal des überexprimierten AlkBh7 ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert.

Die endogene Größe des Proteins wird bei 25 kDa erwartet. Wie in Abbildung 4-69A gezeigt, ist die Detektion von AlkBh7 in unterschiedlichen Zelllinien mittels Western Blot schwierig, da mehrere prominente Banden sichtbar werden.

Wenn AlkBh7 ungetaggt überexprimiert wird (AlkBh7_pcDNA3), ist eine eindeutige Bande auf der erwarteten Höhe (~25kDa) detektierbar (Abbildung 4-69B).

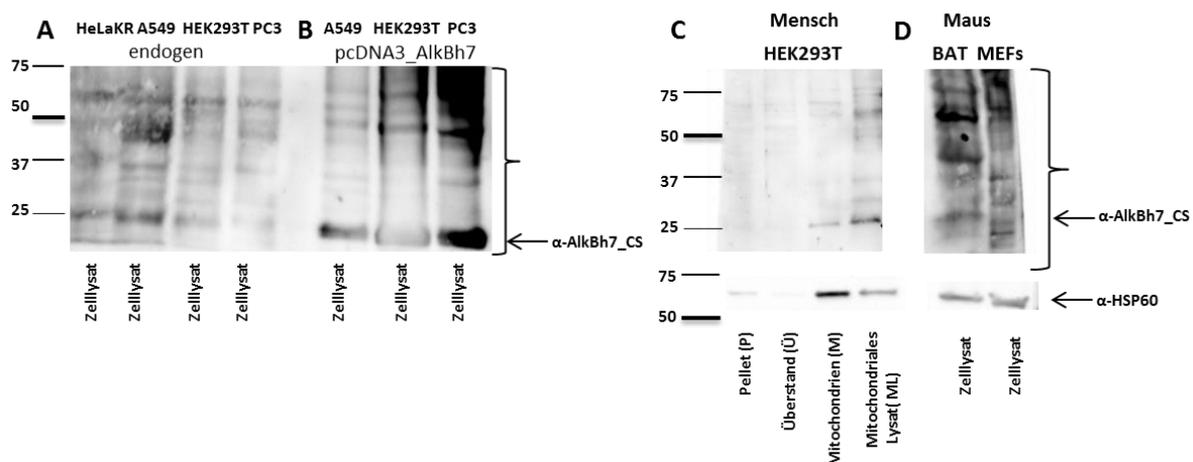


Abbildung 4-69 Expression von endogenem und überexprimiertem AlkBh7 auf Proteinlevel

A. Endogene Expression von AlkBh7 in unterschiedlichen Zelllinien (HeLa, A549, HEK293T, PC3); B. Überexpression von AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) in diversen Zelllinien (A549, HEK293T, PC3); C. HEK293T Zellen nach Isolation der Mitochondrien (M) im Vergleich zur Debrisfraktion (P) und Mitochondrialem Lysat (ML), Proben wurden von Olga Swolski zur Verfügung gestellt. D. BAT (brown adipose tissue, Maus) und MEFs (Embryonale Mausfibroblasten), [Proben wurden von Franz Kiefer (BAT) und Torben Gehring (MEF's) zur Verfügung gestellt]. Verwendeter Antikörper für AlkBh7 CS15093 = bezeichnet als AlkBh7_CS; α -Hsp60, als Ladekontrolle für mitochondriale Proteine;

Endogenes AlkBh7 konnte auf Proteinebene nach Mitochondrienisolierung als schwache Bande in der Mitochondrienfraktion (M) und im mitochondrialen Lysat (ML) in HEK293T auf der erwarteten Höhe (~25kDa) detektiert werden (Abbildung 4-69 C).

Da AlkBh7 im BAT (*Brown adipose tissue*) und in MEFs (embryonale Mausfibroblasten) aus Maus gut detektierbar sein soll (Solberg et al., 2013), wurden auch Proben aus murinem BAT und MEF's mit α -AlkBh7 (CS) Antikörper gegengefärbt (Abbildung 4-69D). Beim BAT können drei prominente Banden detektiert werden, jedoch konnte bei den MEF's keine Bande auf der richtigen Höhe (~25kDa) bestimmt werden (Abbildung 4-69D).

Obwohl AlkBh7 auf Proteinebene nicht als prominente Bande mit diversen α -AlkBh7 Antikörpern detektierbar ist, konnte mittels qPCR (durchgeführt von Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz Zentrum) gezeigt werden, dass AlkBh7 auf RNA Ebene in HeLa und HEK293T relativ hoch exprimiert wird (im Vergleich zu AlkBh1, Abbildung 4-70). Deshalb stellt sich die Frage, ob die Antikörpersensitivität gegen AlkBh7 sehr gering ist, oder AlkBh7 nur unter bestimmten Bedingungen hochreguliert wird.

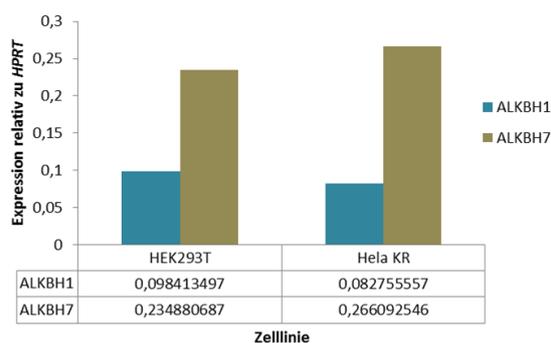


Abbildung 4-70 Expression von AlkBh7 auf RNA Ebene im Verhältnis zu AlkBh1 in HEK293T und HeLa (KR)

HEK293T und HeLa (KrabRed) Zellen wurden auf die Expression von AlkBh1 und AlkBh7 auf RNA Ebene hin untersucht. Es wurde sowohl für HEK293T als auch für HeLa (KR) eine höhere Expression von AlkBh7 als für AlkBh1 festgestellt. Read out: qPCR. Daten erhoben und ausgewertet von Dr. Gitta Heinz (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz München)

4.2.2.2 Bestimmung der Lokalisation mittels Immunfluoreszenz (IF)

Transient exprimiertes Mito-GFP (Abbildung 4-71 A', B') wurde mit endogenem AlkBh7 (Abbildung 4-71 A', B'') kogefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abbildung 4-71 A'-B'''). Es konnten vereinzelt Kollokalisationspunkte für Mito-GFP und endogenes AlkBh7 detektiert werden (Abbildung 4-71 C', weiße Pfeile). Zusätzlich konnte ein AlkBh7-Signal im Zellkern und außerhalb der Mitochondrien im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 4-71C', orange Sterne).

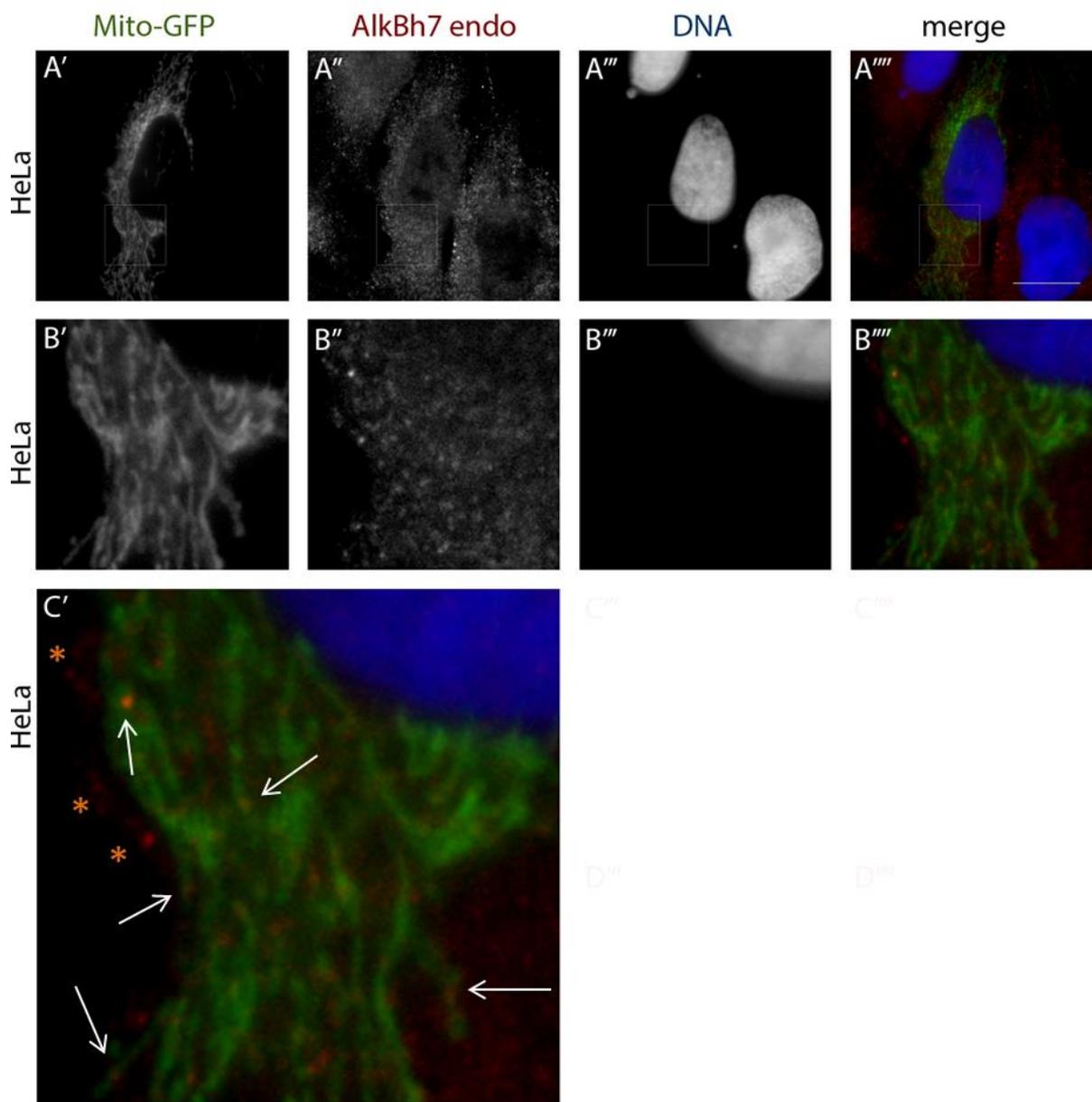


Abbildung 4-71 HeLa Zellen, mit Expression von Mito-GFP und kofärbt mit endogenem AlkBh7
 A.', B.' HeLa Zellen, die transient Mito-GFP exprimierten, A.', B.' wurden mit α -AlkBh7_KL Antikörper (rot) und A''', B''' die DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau) gegengefärbt. C.' HeLa Zellen mit teilweiser Überlagerung von Mito-GFP und AlkBh7 (weiße Pfeile) und Lokalisation außerhalb der Mitochondrien (orange Sterne); Fluoreszenzmikroskopie; Maßstab: 20 μ m

In den PC-3 Zellen konnte eine Struktur im Zytoplasma in der Interphase detektiert werden (Abbildung 4-72 E'-F'''). AlkBh7 soll in PC-3 Zellen auf RNA Ebene höher exprimiert sein (Quelle: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000125652-ALKBH7/cell/PC-3>).

AlkBh7 wurden in HeLa und PC-3 Zellen auf endogener Ebene angefärbt und mittels Immunfluoreszenz ausgewertet. In HeLa Zellen konnte AlkBh7 hauptsächlich in den Mitosephasen detektiert werden (Abbildung 4-72 A'-D'''). Dabei konnten vereinzelt auch Akkumulationen beobachtet werden (Abbildung 4-72, weiße Pfeile).

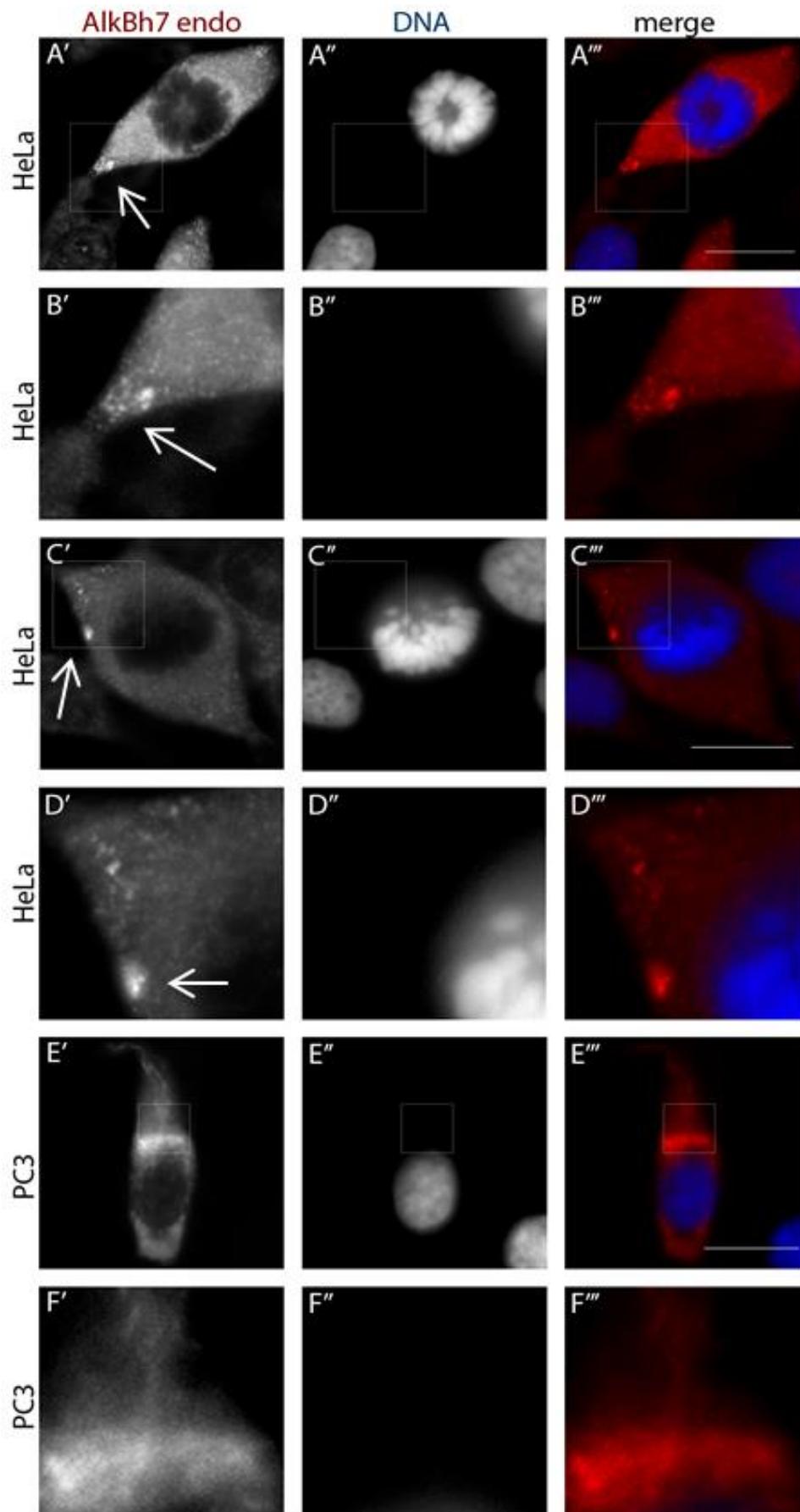


Abbildung 4-72 IF von AlkBh7 auf endogenem Level in HeLa und PC-3 Zellen

A.'-B.'''', C.'-D.''' HeLa Zellen in der Mitose, A.', B.', C.', D' Akkumulationen von AlkBh7 am Zellrand (weiße Pfeile) und E.'-F.''' PC-3 Zellen; Alle Zellen wurden mit α -AlkBh7 (KL) Antikörper gefärbt; DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau) gefärbt. Fluoreszenzmikroskop; Maßstab 20 μ m

In unterschiedlichen Zellen wurde transient Mito-GFP und ungetaggttes AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) überexprimiert. In HeLa kann man erkennen, dass ungetaggttes, überexprimiertes AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7, Abbildung 4-73A“, B“, rot) die gleiche Morphologie wie Mito-GFP aufweist (Abbildung 4-73 A‘, B‘).

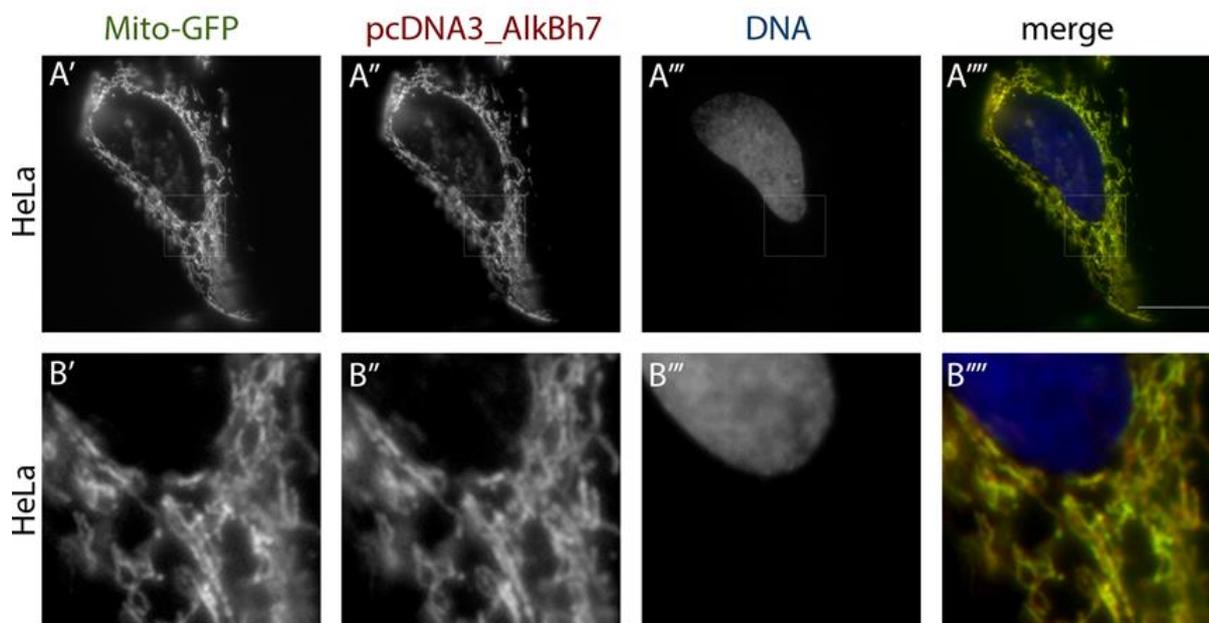


Abbildung 4-73 HeLa Zellen, mit Koexpression von Mito-GFP und ungetaggttem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7)

A‘, B‘ HeLa Zellen, die transient Mito-GFP exprimierten, A.“, B.“ wurden mit α -AlkBh7_KL (pcDNA3_AlkBh7) Antikörper (rot) und A.““, B.““ die DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau) gegengefärbt. Überlappung ist vorhanden; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab 20 μ m

Eine Überlagerung von Mito-GFP mit pcDNA3_AlkBh7 konnte auch in HEK293T (Abbildung 4-74 A‘-B“““), HT-29 (Abbildung 4-74C‘-D““““) und PC-3 (Abbildung 4-74E‘-F“““““) beobachtet werden.

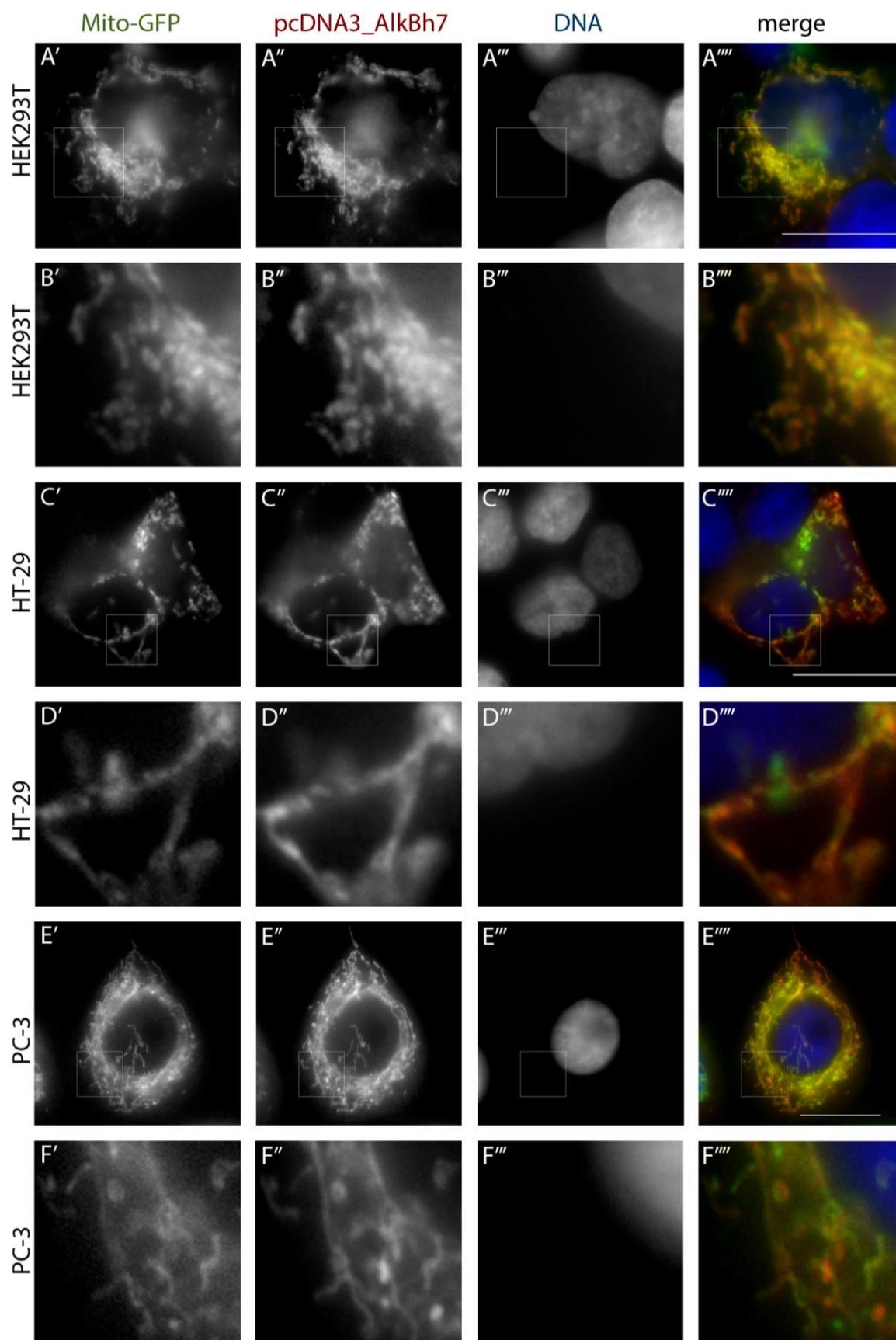


Abbildung 4-74 HEK293T, HT-29 und PC-3 Zellen mit einer Koexpression von Mito-GFP und ungetaggttem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7)

A.'-B.''''' HEK293T Zellen, C.'-D.''''' HT-29 Zellen und E.'-F.''''' PC-3 Zellen, die transientes Mito-GFP (grün) mit ungetaggttem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7, rot) koexprimiert haben. α -AlkBh7_KL Antikörper (rot), DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Fluoreszenzmikroskopie Maßstab 20 μ m

4.2.3 α -AlkBh7 – Immunpräzipitation (IP) mit massenspektrometrischer Analyse

AlkBh7 ist in diversen Zelllinien in den Mitochondrien lokalisiert (siehe Kapitel 4.2.2). Deshalb wurden sowohl aus ganzem Zelllysate als auch aus isolierten Mitochondrien (HEK293T) mehrere α -AlkBh7-Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner für AlkBh7 zu identifizieren.

Die Beadsfraktion der Antikörper-IP (siehe Abbildung 6-7), die die potentiellen Interaktionspartnern enthalten sollten, wurden an die Abteilung Proteomics am Helmholtz Zentrum zur Massenspektrometrie (MS) Analyse gegeben. Alle MS-Versuche in dieser Arbeit wurden in Kooperation mit Dr. Juliane Merl-Pham (Dr. Stefanie Hauck, Abteilung PROT, Helmholtz Zentrum) ausgelesen und vorab ausgewertet. Für diese Arbeit wurden die relevanten Hits für AlkBh7 in Tabelle 4-5 (ganzes Zelllysate) und Tabelle 4-6 (isolierte Mitochondrien) zusammengefasst. Was die einzelnen Spalten der Tabellen bedeuten, wurde bereits in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

4.2.3.1 α -AlkBh7-IP (α -AlkBh7_38_KR 12D10) aus HEK293T Zelllysate

Tabelle 4-5 zeigt einen Überblick über potentielle Interaktionspartner von AlkBh7 aus ganzem Zelllysate (HEK293T). AlkBh7 konnte nach Überexpression (ungetaggt, pcDNA3_AlkBh7) angereichert werden. Jedoch konnte endogenes AlkBh7 trotz Detektionsprobleme auf Proteinebene (Kapitel 4.2.2) auch auf den *Beads* angereichert werden. Es konnten potentielle Interaktionspartner aus unterschiedlichen Bereichen, wie z.B. DNA Reparatur (p53, Rad50) angereichert werden.

Tabelle 4-5 Übersicht über mögliche Interaktionspartner für AlkBh7-IP aus ganzen Zelllysaten

Verwendete Zellen HEK293T; Ablösemethode: Scrappen. Daten zusammengestellt von Dr. Juliane Merl-Pham, PROT, Helmholtz Zentrum. Tabelle ist nach Anreicherungsverhältnis von (pcDNA3_AlkBh7; α -AlkBh7-IP) im Verhältnis zur Kontrolle absteigend sortiert

Erkennungsnummer	Einzelne Peptide	Bewertungsziffer	Name	ganzes Zelllysate	
				Anreicherungsverhältnis Überexpression/Kontrolle	Anreicherungsverhältnis Endogen/Kontrolle
ENSP00000245812	6	256	ALKBH7	616,91	4,31
ENSP00000301071	3	185	TUBA1A	171,56	3,09
LRG_321p1	4	146	p53	149,54	1099,34
ENSP00000322439	2	73	TUFM	130,66	Infinity
ENSP00000339001	2	329	TUBB	86,20	5,49
ENSP00000217182	2	73	EEF1A2	27,20	1,10
ENSP00000282050	3	154	ATP5A1	18,70	0,92
ENSP00000264954	3	121	GRPEL1	12,75	0,09
ENSP00000265335	2	85	RAD50	12,70	7,21
ENSP00000262030	2	76	ATP5B	11,31	0,75

4.2.3.2 Mitochondrien

Mit der α -AlkBh7-IP aus isolierten Mitochondrien (HEK293T) konnten viele der potentiellen Interaktionspartner wieder angereichert werden, die bereits aus der α -AlkBh7-IP aus Ganzzellysat (Tabelle 4-5) bekannt waren. Von den DNA Reparatur Proteinen konnte nur Rad50 nach der Isolierung der Mitochondrien in der Hitliste detektiert werden.

Wenn man die Hits der α -AlkBh1-IP (Tabelle 4-2, isolierten Mitochondrien) mit der α -AlkBh7-IP (Tabelle 4-6, isolierten Mitochondrien) vergleicht, ergeben sich deutlich unterschiedliche Interaktionspartner für AlkBh7, obwohl AlkBh1 und AlkBh7 scheinbar miteinander auch in den Mitochondrien interagieren (siehe Kapitel 4.1.4).

Die Proteine TUFM (mitochondriales Elongationsprotein) und TUBB (Tubulin Beta Class I) konnten nach Isolierung der Mitochondrien wieder in beiden Fraktionen angereichert werden. Es wurden jedoch bisher keine weiteren Versuche durchgeführt, um diese Interaktionen zu validieren.

Tabelle 4-6 Übersicht über mögliche Interaktionspartner nach α -AlkBh7-IP aus isolierten Mitochondrien

Verwendete Zellen: HEK293T; Ablösemethode: Cell dissociation Puffer (CDP); Daten zusammengestellt von Dr. Juliane Merl-Pham, PROT, Helmholtz Zentrum. Tabelle ist nach Anreicherungsverhältnis von (pcDNA3_AlkBh7; α -AlkBh7-IP) im Verhältnis zur Kontrolle absteigend sortiert

Erkennungsnummer	Einzelne Peptide	Bewertungsziffer	Name	Mitochondrien	
				Anreicherungsverhältnis Überexpression/Kontrolle	Anreicherungsverhältnis Endogen/Kontrolle
ENSP00000245812	6	256	<i>ALKBH7</i>	32,59	Infinity
ENSP00000339001	2	329	TUBB	7,58	9,61
ENSP00000322439	2	73	TUFM	4,66	6,37
ENSP00000265335	2	85	RAD50	1,78	11,64
ENSP00000264954	3	121	GRPEL1	1,45	0,39
ENSP00000289352	4	177	HIST1H4H	1,37	0,03
ENSP00000431254	2	115	IGLL5	1,25	5,59
ENSP00000301071	3	185	TUBA1A	1,18	0,77
LRG_321p1	4	146	p53	0,58	0,92

Um herauszufinden, welche Funktion AlkBh7 in den Mitochondrien ausführt, wurde das ungetaggte, überexprimierte AlkBh7 (pcDNA3_Alkbh7) mit TFAM, als mitochondriales DNA Bindeprotein, und mit der mitochondrialen DNA in unterschiedlichen Zellen kogefärbt (siehe Kapitel 4.2.4).

4.2.4 Intra-mitochondriale Lokalisation von AlkBh7 mit Blick auf TFAM und mtDNA

Um herauszufinden welche Funktionen AlkBh7 in den Mitochondrien ausführen könnte, wurden ungetaggetes, überexprimiertes AlkBh7 mit mitochondrialen Proteinen wie TFAM und mit der mitochondriale DNA kogefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit unterschiedlich auflösenden Mikroskopen ausgewertet. Für endogenes AlkBh7 war dies aufgrund der schwachen Detektion auf Proteinebene nicht möglich.

4.2.4.1 TFAM

Die Kofärbung von endogenem TFAM (Mitochondrial transcription factor A) mit ungetaggetem überexprimiertem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) in PC-3 Zellen (Abbildung 4-75 A.'-B.'''') und Panc-1 Zellen (Abbildung 4-75 C.'-D.'''') zeigt eine teilweise Überlappung dieser beiden Proteine.

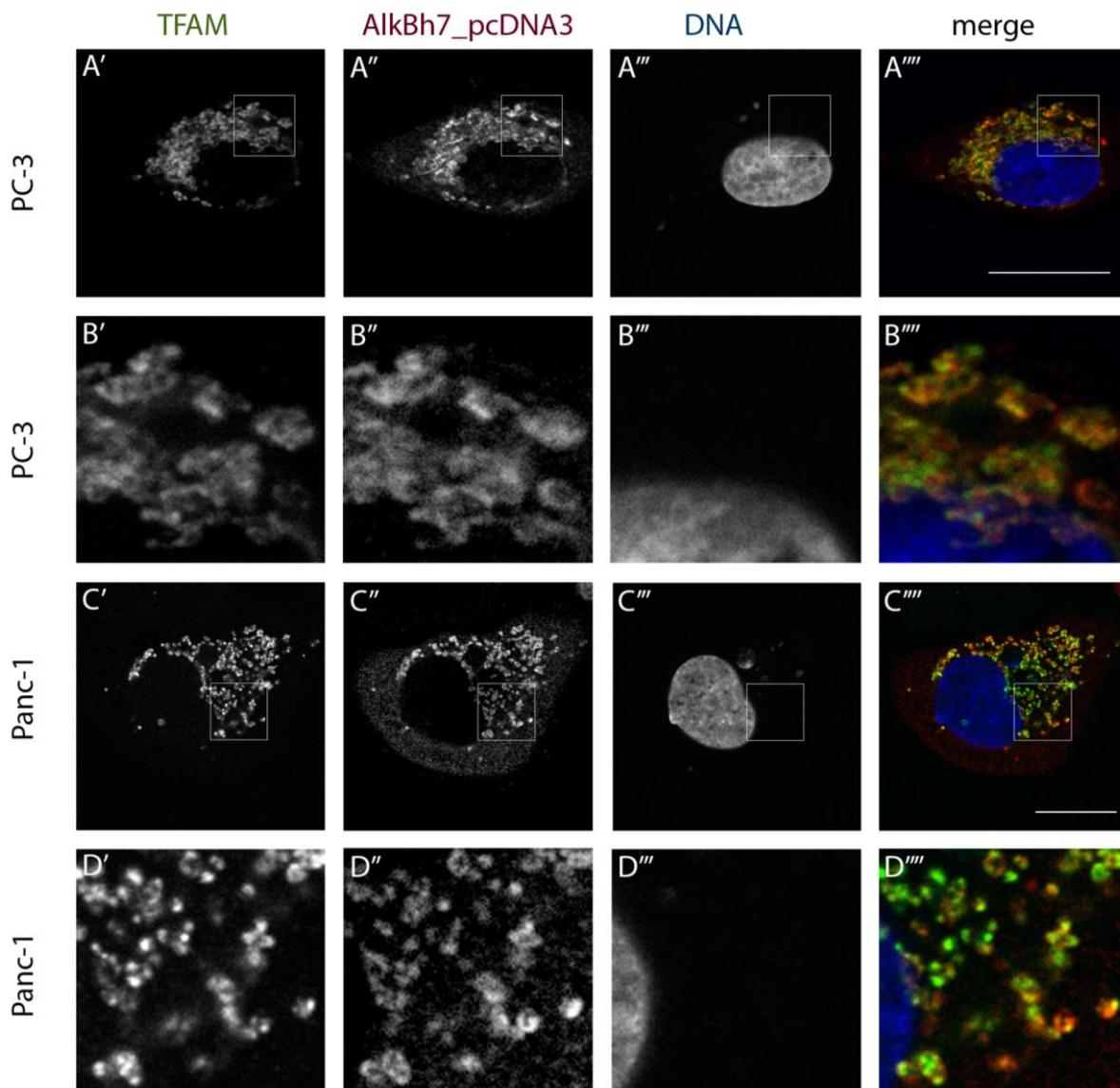


Abbildung 4-75 Kofärbung von ungetaggetem überexprimiertem AlkBh7 mit endogenem TFAM, konfokaler Schnitt, Maßstab 20µm

A.'-B.'''', PC-3 Zellen; C.'-D.'''', Panc-1 Zellen; die transient ungetaggetes AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) exprimieren, wurden mit α -AlkBh7_KL (AlkBh7_pcDNA3) Antikörper (rot) und α -TFAM (grün) kogefärbt, die DNA mit DAPI (1µg/ml, blau); Konfokale Schnitte; Maßstab 20µm

4.2.4.2 mitochondriale DNA

Wenn man mtDNA mit überexprimiertem ungetaggtten AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) in PC-3 (Abbildung 4-76 A'-B''') Zellen und Panc-1 Zellen (Abbildung 4-76C'-D''') kofärbt, kann man in beiden Zelllinien eine gelegentliche Überlagerung von überexprimiertem AlkBh7 mit der mtDNA beobachten. Jedoch ist sowohl AlkBh7 (pcDNA3_Alkbh7) als auch mtDNA unabhängig voneinander detektierbar (Abbildung 4-76B''', D''').

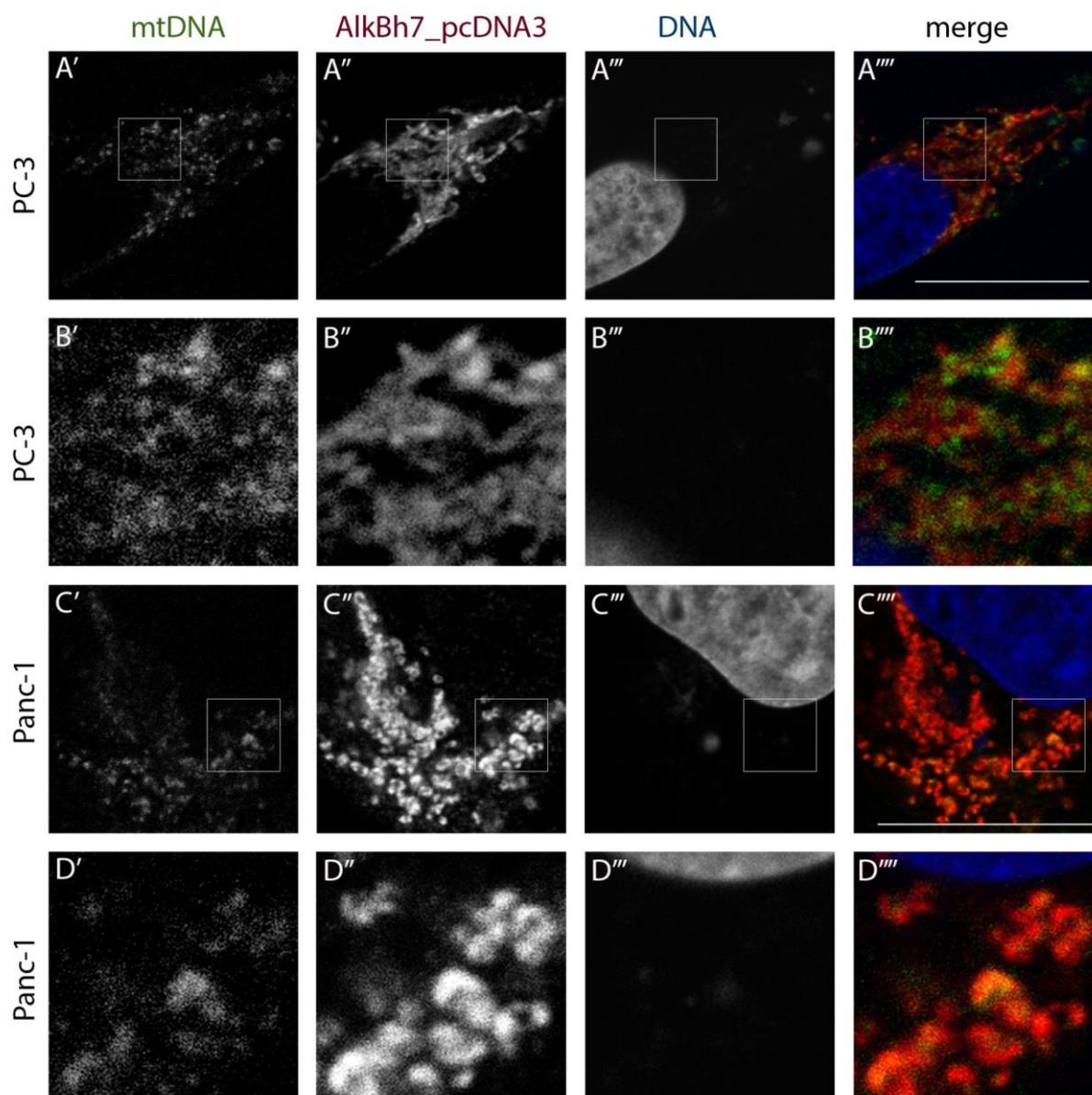


Abbildung 4-76 Kofärbung von ungetaggttem, überexprimiertem AlkBh7 mit mtDNA

A.'- B.'', PC-3 Zellen; C.'-D.''' Panc-1 Zellen; die transient ungetaggttes AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) exprimierten, wurden mit α -AlkBh7_KL (AlkBh7_pcDNA3) Antikörper (rot) und α -mtDNA (grün) kofärbt, die DNA mit DAPI (1 μ g/ml, blau). Konfokale Schnitte; Maßstab 20 μ m

4.2.5 Wirkung von Knockdown und Überexpression von AlkBh7 auf unterschiedliche Zelllinien unter diversen Stressbedingungen

Wie bereits für AlkBh1 (Kapitel 4.1.7) wurden für AlkBh7 diverse Zelllinien (HeLa, A549, PC3, HT29) generiert, die durch Doxycyclininduktion entweder stabil Knockdown oder Überexpression von AlkBh7 exprimieren. Dazu wurden drei unterschiedliche Kontrollen hergestellt (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7 Übersicht über verwendete Zelllinien mit unterschiedlicher AlkBh7 Expression

Bezeichnung für die etablierten Knockdown und Überexprimierer für AlkBh7, sowie die dazugehörigen Kontrollen

Kontrollen			Knock down			Überexprimierer	
Ko KR	ns shRNA	Mito-GFP	KD2763	KD2764	KD9385	ÜE_CD2_7	ÜE_GFP_7
Allgemeine Kontrolle	Kontrolle für Knockdowns	Kontrolle für Überexprimierer	Knockdown von AlkBh7	Knockdown von AlkBh7	Knockdown von AlkBh7	Überexpression von AlkBh7	Überexpression von AlkBh7

Mittels qPCR konnte nur bei der AlkBh7 Knockdown Zelllinie KD9385 eine Reduktion in HeLa und A549 nachgewiesen werden (Abbildung 4-77 A). Dafür ist die Überexpression mittels qPCR in beiden getesteten Zelllinien deutlich erkennbar (Abbildung 4-77 B, qPCR durchgeführt von Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz Zentrum).

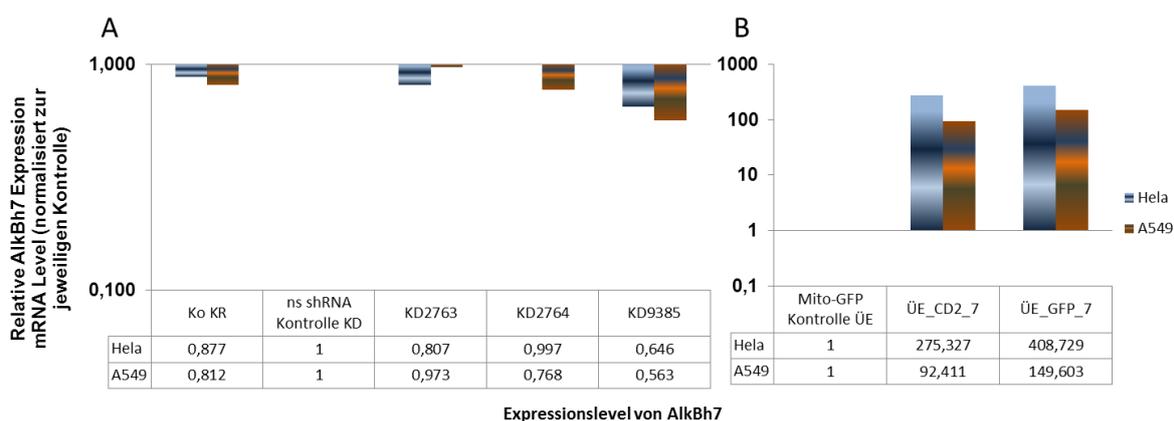


Abbildung 4-77 Stabil induzierbare HeLa KrabRed (KR) und A549 KR Zellen mit unterschiedlichen exprimierten AlkBh7 Levels auf RNA Ebene

Jeweils drei Knockdowns, zwei Überexprimierer und drei Kontrollen (A549 KR, HeLa KR) wurden auf die Effektivität des Knockdowns bzw. der Überexpression von AlkBh7 hin mittels qPCR untersucht (qPCR wurde von Dr. Gitta Heinz durchgeführt und ausgewertet). Zellen wurden sechs Tage mit 250ng/ml Doxycyclin induziert und dann geerntet. Werte sind zur jeweiligen Kontrolle normalisiert. A. Relative Expressionslevel nach Knockdown von AlkBh7 zur jeweiligen Kontrolle (ns shRNA), die auf den Wert 1 normalisiert wurde; B. Relative Expressionslevel nach Überexpression von AlkBh7 zur Kontrolle (Mito-GFP), die auch auf den Wert 1 normalisiert wurde.

4.2.6 Stressbehandlung der mtDNA → Auswertung mittels IF für AlkBh7

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, scheint AlkBh7 mit Proteinen zu interagieren, die mit der DNA Reparatur im Zellkern assoziiert werden. Deshalb wurden diverse Zellen mit unterschiedlichen DNA schädigenden Substanzen wie Doxorubicin und Bleomycin behandelt, die neben der nuklearen auch die mitochondriale DNA schädigen [Abbildung 4-41, Abbildung 4-61, (Dmitrieva et al., 2011)]. Diese Zellen wurden dann mit unterschiedlichen α -AlkBh7 Antikörpern gegengefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Aufgrund der Antikörperproblematik zur Detektion von endogenem AlkBh7 Signal mittels der Fluoreszenzmikroskopie (siehe Kapitel 4.2.2), ist es jedoch schwierig eine eindeutige Aussage über die folgenden Ergebnisse zu machen.

4.2.6.1 Wirkung von Doxorubicin auf AlkBh7 in A549 Zellen

Doxorubicin ist ein DNA schädigendes Chemotherapeutikum, das sowohl in die mitochondriale als auch in die nukleare DNA interkaliert und Strangbrüche induziert (siehe Kapitel 4.1.11).

A549 Zellen wurden mit 1.7 μ M Doxorubicin für 24 Stunden behandelt und mit α -AlkBh7 Antikörper gegengefärbt (Abbildung 4-78). In der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4-78 A'-B''') und der Lösungsmittelkontrolle (DMSO, Abbildung 4-78 C'-D''') scheint AlkBh7 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert zu sein. Die Behandlung von Doxorubicin scheint jedoch die Lokalisation von AlkBh7 zu verändern (Abbildung 4-78 E'-F'''). Auffällig ist, dass die Doxorubicinbehandlung dazu führt, dass AlkBh7 scheinbar im Zytoplasma in knötchenartige Strukturen akkumuliert (Abbildung 4-78 F', weiße Pfeile) und gleiche Strukturen wie die mtDNA in „Knötchen“ im Zytoplasma aufweist (Abbildung 4-78 F'', F''', weiße Pfeile). Des Weiteren konnten Akkumulationen im Zellkern (Abbildung 4-78 E'-E''', orange Sterne) für AlkBh7 detektiert werden.

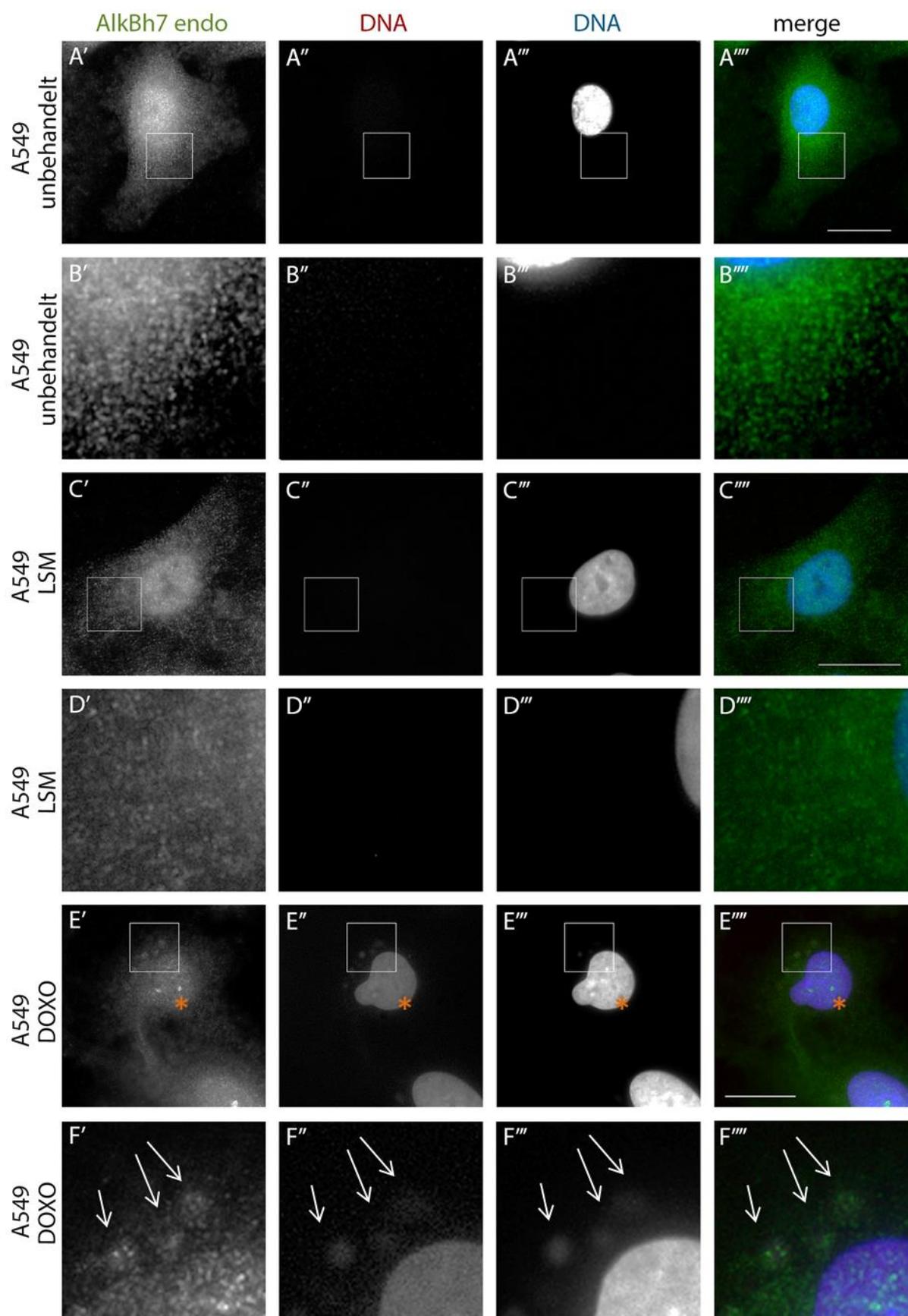


Abbildung 4-78 A549 Zellen gefärbt mit α -AlkBh7_KL AK (grün) behandelt mit Doxorubicin
 A549 Zellen wurden mit Doxorubicin behandelt, mit α -AlkBh7 AK (KL, grün) gefärbt, DNA (DAPI 1 μ g/ml, blau), DNA (interkaliertes Doxorubicin, rot); A.'-B.''''' unbehandelt, C.'-D.''''' Lösungsmittelkontrolle und E.'-F.''''' Behandlung mit Doxorubicin 1.7 μ M für 24 Stunden, weiße Pfeile: Akkumulation in „Knötchen“ im Zytoplasma, orange Sterne: Akkumulationen im Zellkern, Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20 μ m

4.2.6.2 Bleomycin

Um herauszufinden, ob AlkBh7 möglicherweise eine Rolle bei der DNA Reparatur in den Mitochondrien spielt, wurden A549 Zellen mit niedrigen Dosen Bleomycin (10µg/ml oder 20µg/ml) behandelt. Wie bereits in Kapitel 4.1.11.3 beschrieben führt die Behandlung mit Bleomycin in niedrigen Dosen zu einer Akkumulation der mtDNA und AlkBh1 im Zytoplasma. Des Weiteren konnte von Wissenschaftlern eine Reparatur der mitochondrialen DNA nach Schädigung mit Bleomycin gezeigt werden (Shen et al., 1995).

Aufgrund der potentiellen Interaktionspartner p53 und Rad50 könnte AlkBh7 eine Rolle bei der induzierten Stressantwort in den Mitochondrien spielen. Deshalb wurden A549 Zellen mit niedrigen Dosen Bleomycin behandelt und mit α -TFAM und α -AlkBh7 kofärbt (Abbildung 4-79).

Die unbehandelte Kontrolle (Abbildung 4-79 A'-B''') zeigt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 4-79 C'-D''') ähnliche Strukturen für TFAM und AlkBh7. Die Bleomycinbehandlung führt jedoch zur Akkumulation von TFAM in „Knötchen“ (Abbildung 4-79 E', F', weiße Pfeile). AlkBh7 (Abbildung 4-79 E'', F'', weiße Pfeile) scheint auch um diese „Knötchen“ angelagert zu sein und teilweise mit TFAM zu überlagern (Abbildung 4-79 F''', weiße Pfeile).

Zusätzlich wurde p53 als möglicher Interaktionspartner für AlkBh7 mittels MS identifiziert. Nachdem das Protein p53 auch eine wichtige Rolle bei der Stressantwort in Zellen spielt und möglicherweise eine Rolle bei der Reparatur der mitochondrialen DNA einnimmt (Park, Zhuang, Li, & Hwang, 2016), wurde endogenes AlkBh7 mit p53 nach Bleomycinbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen kofärbt (Abbildung 4-80).

p53 ist in der unbehandelten Kontrolle kaum detektierbar (Abbildung 4-80 A', B'). Nach DMSO Behandlung (Lösungsmittelkontrolle, LSM) ist für p53 ein schwaches Signal erkennbar (Abbildung 4-80 C', D'). Die Bleomycinbehandlung dagegen führt zur Expression von p53 im Zellkern (Abbildung 4-80 E', F') und scheint akkumuliert im Zellkern aufzutreten (Abbildung 4-80 E'-F''', orange Sterne). AlkBh7 scheint auch im Zellkern in bestimmten Strukturen zu akkumulieren (Abbildung 4-80 E'', F'', orange Sterne) und mit p53 in diesen Strukturen zu überlagern (Abbildung 4-80 E''', F''', orange Sterne).

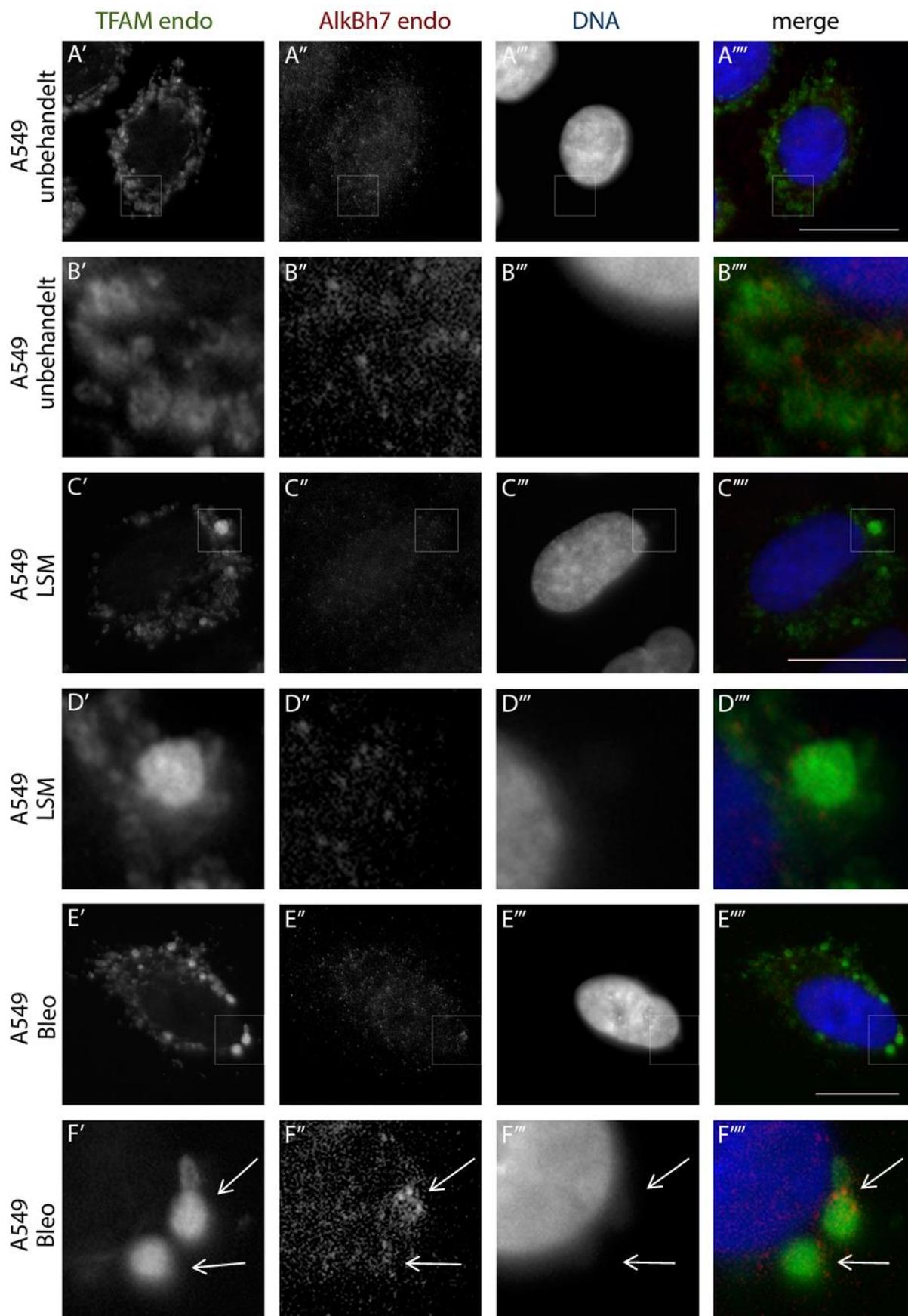


Abbildung 4-79 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh7_CS AK (rot) und α -TFAM (grün) behandelt mit Bleomycin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -AlkBh7_CS AK (rot) und α -TFAM gefärbt, DNA (DAPI 1 μ g/ml); A.'-B.' unbehandelt, C.'-D.' Lösungsmittelkontrolle (LSM), E.'-F.' Behandlung mit Bleomycin 10 μ g/ml für 2 Stunden; weiße Pfeile: Akkumulation in „Knötchen“; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20 μ m

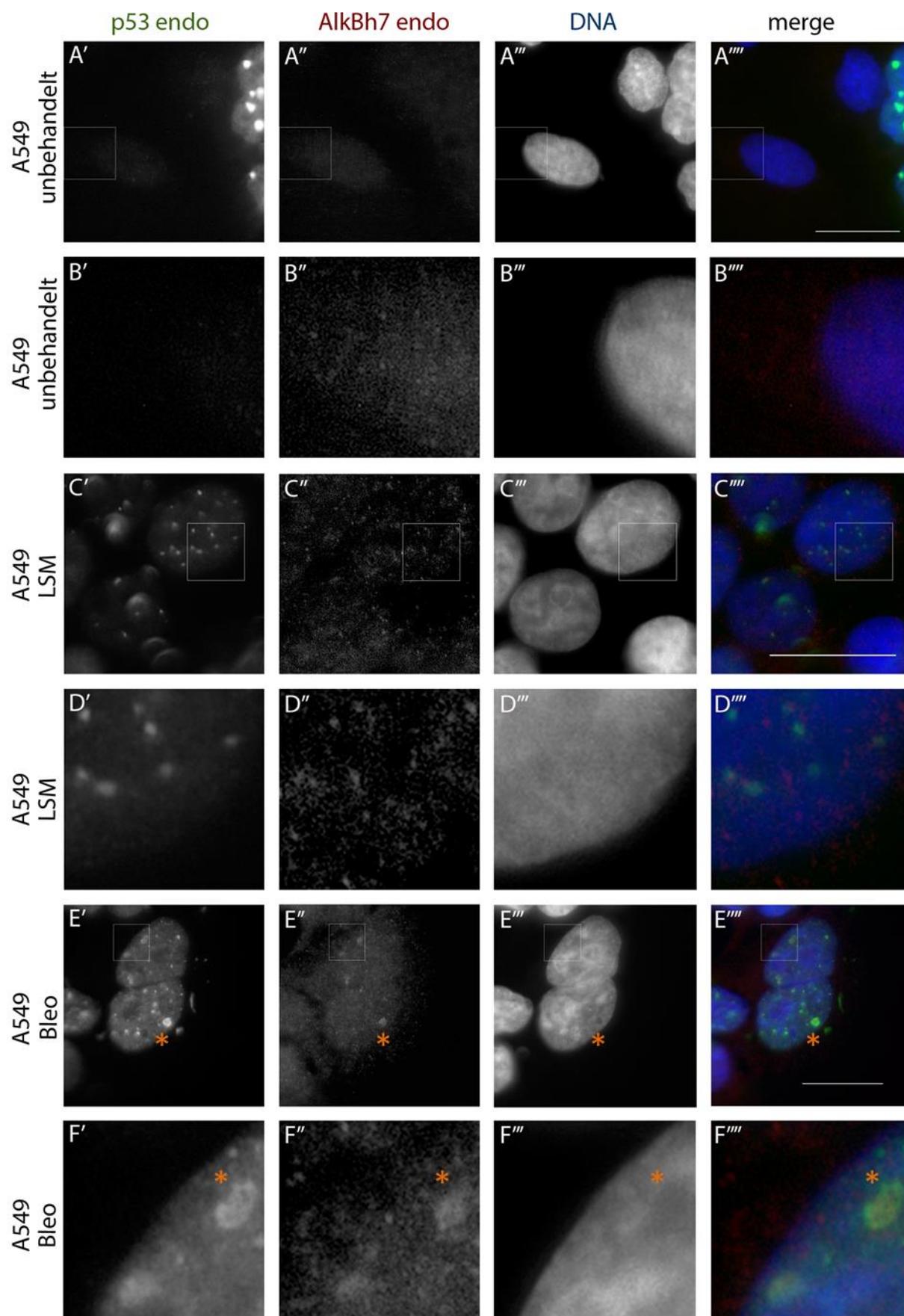


Abbildung 4-80 A549 Zellen kofärbt mit α -AlkBh7_CS AK (rot) und α -p53 (grün) behandelt mit Bleomycin

A549 Zellen wurden zum Vergleich mit α -AlkBh7_CS AK (rot) und α -p53 gefärbt, DNA (DAPI 1 μ g/ml, blau); A.'-B.''''' unbehandelt, C.'-D.''''' Lösungsmittelkontrolle (LSM), E.'-F.''''' Behandlung mit Bleomycin 20 μ g/ml für 2 Stunden; orange Sterne: Akkumulation im Zellkern; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 20 μ m

4.3 Drei dimensionale Zellkultur, Sphäroide (3D)

Die drei dimensionale (3D) Zellkultur findet mehr und mehr Anwendung in der Grundlagenforschung. Das 3D System hilft in vielerlei Hinsicht, mehr über die Zell-Zell-Interaktionen und das unterschiedliche intrazelluläre Milieu zu erfahren. Diese Erkenntnisse können dabei helfen, die ungelösten Fragen in Krankheiten wie Krebs, Alzheimer, Parkinson oder Diabetes zu beantworten (Hirschhaeuser et al., 2010).

Einzelne Zellen bilden in einer 3D Zellkultur nach kurzer Zeit einen großen gemeinsamen Komplex, aus dem die einzelnen Zellen auch mit Druck oder Scherkraft nur schwer zu lösen sind. Die Bildung von Zell-Zell-Kontakten und der Aufbau einer zellulären Matrix mit einem eigenen metabolischen Mikromilieu (Sauerstoffversorgung, Stoffwechselverarbeitung und Nahrungszufuhr) bildet den großen Unterschied zwischen Monolayer und Sphäroid (Hirschhaeuser et al., 2010; Ma et al., 2012; Mueller-Klieser, 2000). Unterschiede zwischen 2D und 3D Zellkulturen sind in Abbildung 4-81 zusammengestellt.

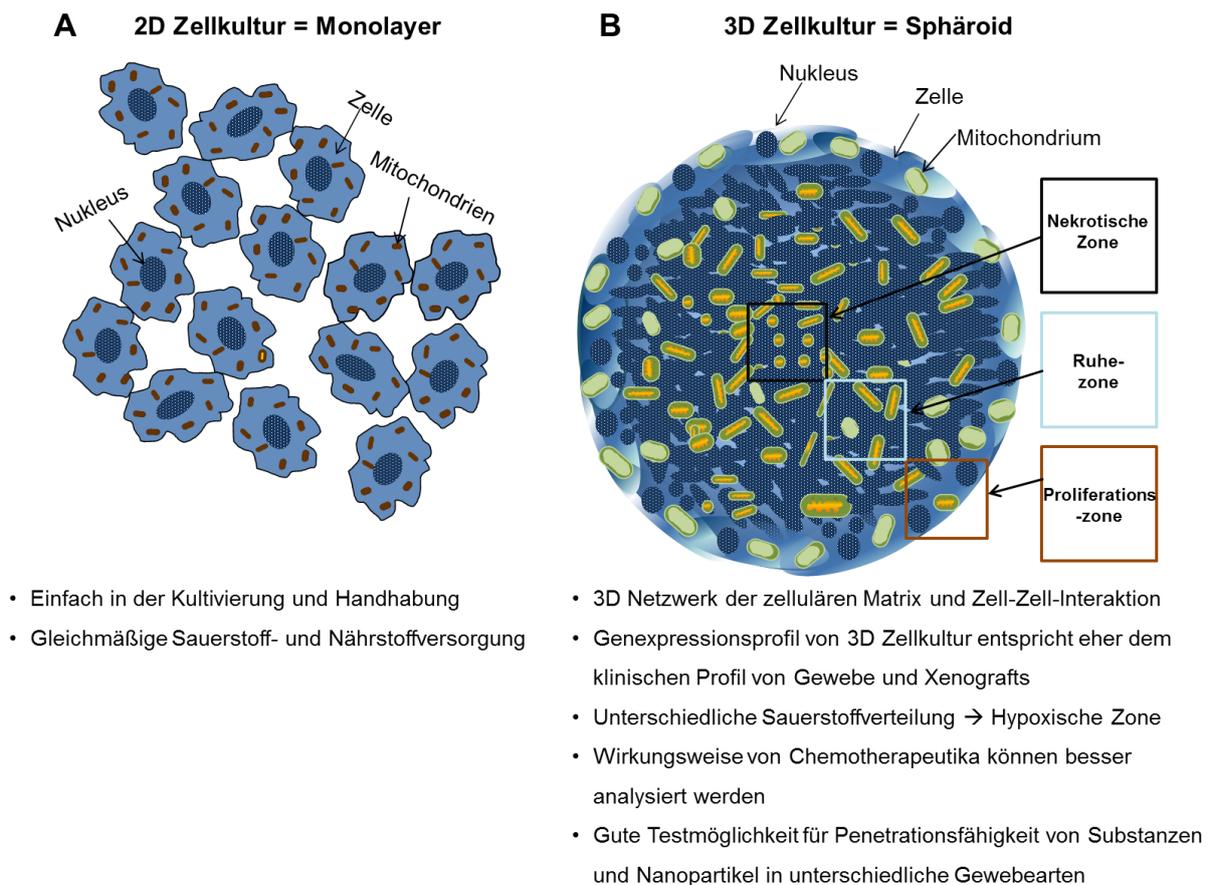


Abbildung 4-81 Überblick über den Unterschied zwischen Monolayer (2D) und Drei dimensionale Zellkultur (3D, Sphäroid)

A. Eigenschaften von Monolayerzellen in ihrem Mikromilieu; B. Eigenschaften und Aufteilung von Zellen in einem drei dimensional System, mit Blick auf die unterschiedlichen Bereiche in einem Sphäroid (Proliferationszone, Ruhezone, Nekrotische Zone), sowie charakteristische Merkmale von Zellen im 3D System.

Im 3D Modell bilden sich, durch die unterschiedliche Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und Stoffwechselprodukten, drei unterschiedliche Zonen aus, die als Proliferationszone, Ruhezone und nekrotische Zone bezeichnet werden [Abbildung 4-81 und (Mueller-Klieser, 2000)].

Während in der äußersten Schicht des Sphäroids noch Zellteilung stattfindet und die Mitose durchlaufen wird (Proliferationszone, PZ), befinden sich die Zellen in der mittleren Schicht in der G₀-Phase. Diese Zellen verharren in dem Wartemodus bis die Bedingungen sich soweit verbessert haben und ein Wachstum wieder möglich ist (Ruhezone, Quiescent zone, QZ). In der direkten Mitte eines 3D Sphäroids haben die Zellen den geringsten Zugang zu Sauerstoff, Nährstoffen und Metaboliten. Diese Zellen befinden sich im nekrotischen Kern, und sterben durch induzierte Apoptose oder Nekrose langsam ab (Nekrotische Zone, NZ), [Abbildung 4-82, (Hirschhaeuser et al., 2010; Ma et al., 2012)].

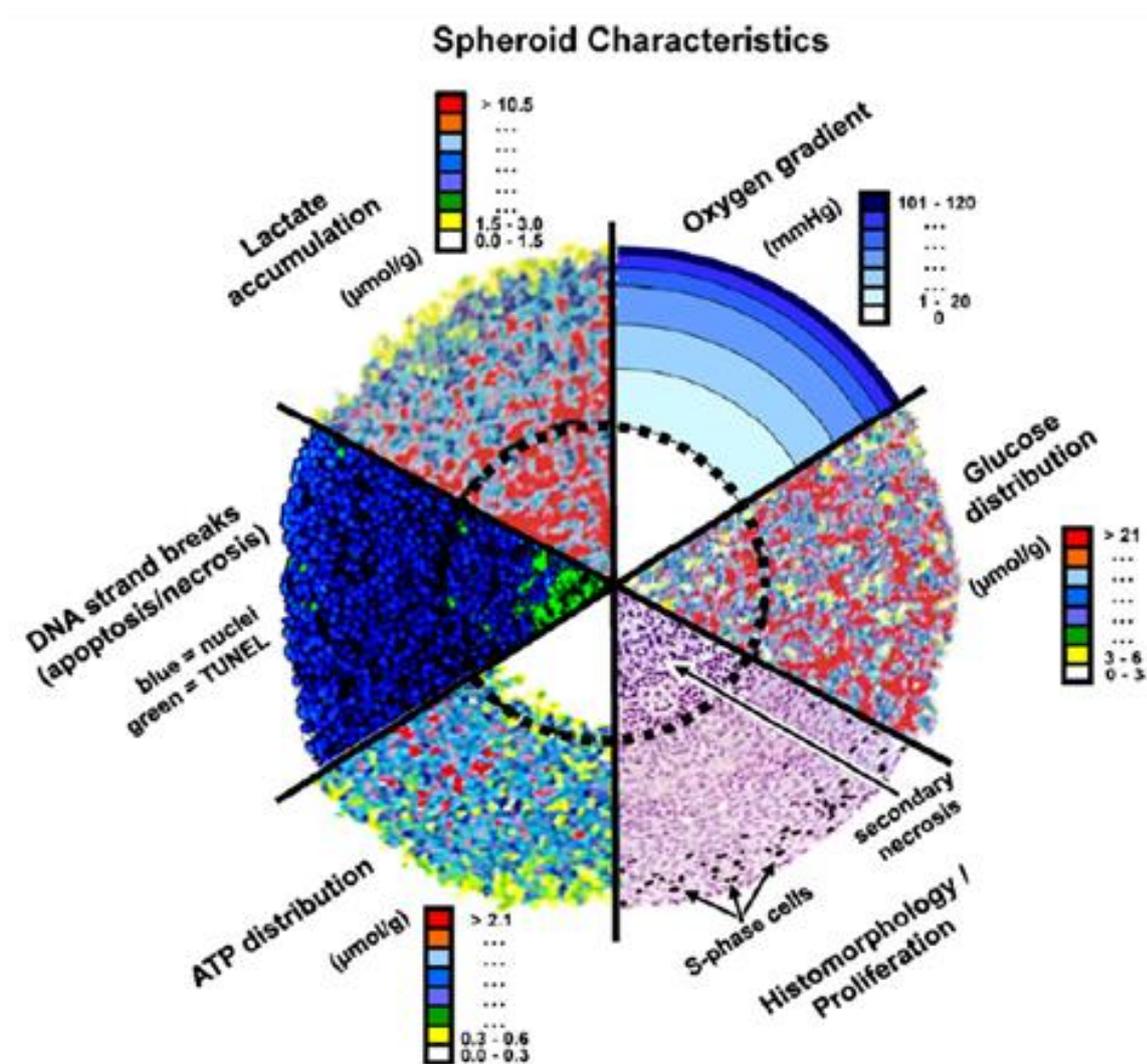


Abbildung 4-82 Charakterisierung von Homöostase und Milieu in einer 3D Zellkultur

Überblick über die unterschiedlichen Faktoren, die in einer 3D Zellkultur in den unterschiedlichen Zonen auftreten können. Man kann den Glucose- und Lactatgehalt bestimmen, ATP Verteilung in den unterschiedlichen Bereichen messen, Sauerstoffgehalt bestimmen und die Apoptose- oder Nekroserate im Sphäroid messen. Quelle: (Hirschhaeuser et al., 2010)

Diese unterschiedlichen Zonen in der 3D Zellkultur spiegeln das Mikromilieu von Metastasen oder Primärtumoren wieder, die kurz davor sind, die Angiogenese einzuleiten. Denn Metastasen und Primärtumore können nur bis zu einer bestimmten Größe ohne externe Sauerstoffzufuhr überleben (Mueller-Klieser, 2000). Dabei können diese Modelle dabei helfen, Metastasen besser zu charakterisieren (Hirschhaeuser et al., 2010). In einer 3D Zellkultur kann man die Sauerstoffverteilung detektieren, sowie den Lactat- und Glukosegehalt und die ATP- Verteilung in den unterschiedlichen Zonen bestimmen. Mit dem Tunnel Assay oder einer histologischen Färbung kann man z.B. die DNA-Strangbrüche, Nekrose und Mitosephasen sichtbar darstellen [Abbildung 4-82, (Hirschhaeuser et al., 2010)].

Deshalb bietet das 3D Zellkultur-Modell umfangreiche Möglichkeiten, um mehr über das Milieu und die Funktion von Proteinen und Signalwegen, sowie die Funktion von unterschiedlichen Organellen (z.B. Mitochondrien) in gewebeähnliche Strukturen zu erfahren.

Es ist möglich in einem Sphäroid unterschiedliche Zelltypen, wie Tumorzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Immunzellen miteinander zu kombinieren, um gewebeähnliche Strukturen darzustellen. Es ist auch möglich ein oder zwei getrennte 3D Modelle als Konfrontationsmodell miteinander zusammenwachsen zu lassen, um z.B. mehr über die Invasion von Krebszellen zu erfahren (Hirschhaeuser et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde das 3D Zellkultur Modell mit dem Blick auf die Mitochondrien etabliert. Dabei wurde der Focus besonders auf die Veränderungen der Morphologie der Mitochondrien in den drei Differenzierungszonen (Proliferationszone, PZ, Ruhezone, QZ und nekrotische Zone, NZ) gelegt.

4.3.1 Morphologie der Mitochondrien unter Normoxie und Hypoxie mit Blick auf Monolayer und 3D Zellkultur

Die Mitochondrienmorphologie spielt bei der Energiegewinnung in Zellen eine sehr große Rolle. Über Fusion und Fission der einzelnen Mitochondrien kann die Zelle auf extra- und intrazelluläre Impulse reagieren und darüber den Energiehaushalt steuern (Carter, Chen, & Hood, 2015). Der prozentuelle Anteil des Sauerstoffes in den Zellen ist einer dieser Faktoren. Bei sehr niedrigem Sauerstoffangebot versuchen die Zellen durch Teilung (Fission) der Mitochondrien die Homöostase in der Zelle aufrecht zu erhalten (Carter et al., 2015).

Um herauszufinden, wie der Sauerstoffgradient in einer 3D Zellkultur die Morphologie der Mitochondrien beeinflusst, wurden HeLa Zellen verwendet, die Mito-GFP (induziert mit 750ng/ml Doxycyclin) über einen längeren Zeitraum stabil exprimieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit Höchst 33342 (1µg/ml) gefärbt. Dieser Farbstoff ist auch in lebenden Zellen nach längerem

Zeitpunkt detektierbar. Um auszuschließen, dass die zusätzlichen Stresssituationen (Doxycyclin und Höchstfärbung) einen Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien haben, wurden HeLa Zellen als Monolayer unter den gleichen Bedingungen für 48 Stunden kultiviert, danach fixiert und ausgewertet (Abbildung 4-83). Die Morphologie der Mitochondrien entspricht der transienten Expression von Mito-GFP in HeLa Zellen (Abbildung 4-7).

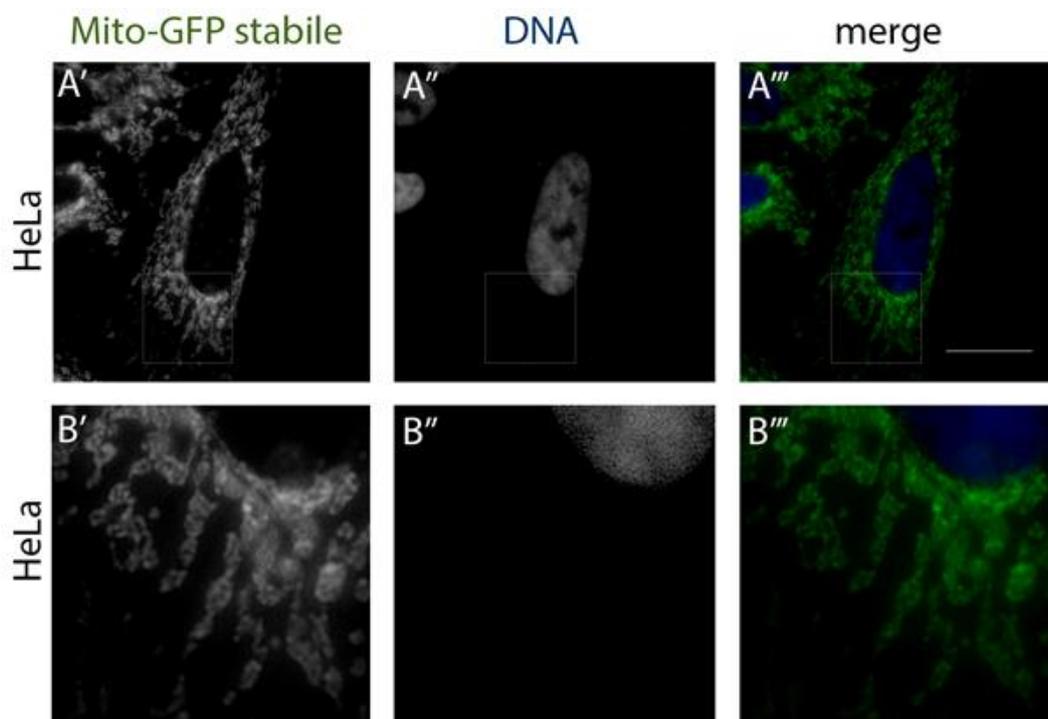


Abbildung 4-83 HeLa Monolayerzellen mit stabil exprimiertem Mito-GFP

A', B' HeLa Zellen, die stabil Mito-GFP exprimieren, wurden vor der Aussaat mit Höchst 33342 (1µg/ml, 30 Minuten) und Doxycyclin (0.750ng/ml) behandelt; A'', B'' DNA. Die Zellen wurden nach 48 Stunden fixiert. Fluoreszenzmikroskopie. (Kontrolle zur 3D Zellkultur für Abbildung 4-85 & Abbildung 4-86), Maßstab: 20µm

In Abbildung 4-84 sind 3D Modelle aus HeLa Zellen gezeigt, die aus 10.000 Zellen (Abbildung 4-84 A'-B'''), 20.000 Zellen (Abbildung 4-84 C'-D''') oder 50.000 Zellen (Abbildung 4-84 E'-F''') hergestellt worden sind. All diese Sphäroide exprimieren stabiles Mito-GFP, KrabRed und die DNA wurde mit Höchst 33342 angefärbt. Ein nekrotischer Kern ist erst ab einer Zellzahl von 20.000 Zellen erkennbar (Abbildung 4-84 C'-D'''). Bei einer Zellzahl bis 10.000 HeLa Zellen sieht der Sphäroid noch relativ gleichmäßig in der Verteilung aus (Abbildung 4-84A'-B'''). Für alle weiteren Versuche wurden Sphäroide aus 50.000 Zellen verwendet.

Die 3D Sphäroide (50.000 Zellen) wurden nach Mito-GFP Induktion und Färbung mit Höchst 33342 in zellabweisenden Platten für verschiedene Zeiträume (48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden) kultiviert, im Anschluss fixiert (4%PFA und 100% Methanol) und mittels hochauflösendem 3D SIM ausgewertet (in Kooperation mit Andreas Maiser, AG Prof. Dr. Leonhardt, LMU, München).

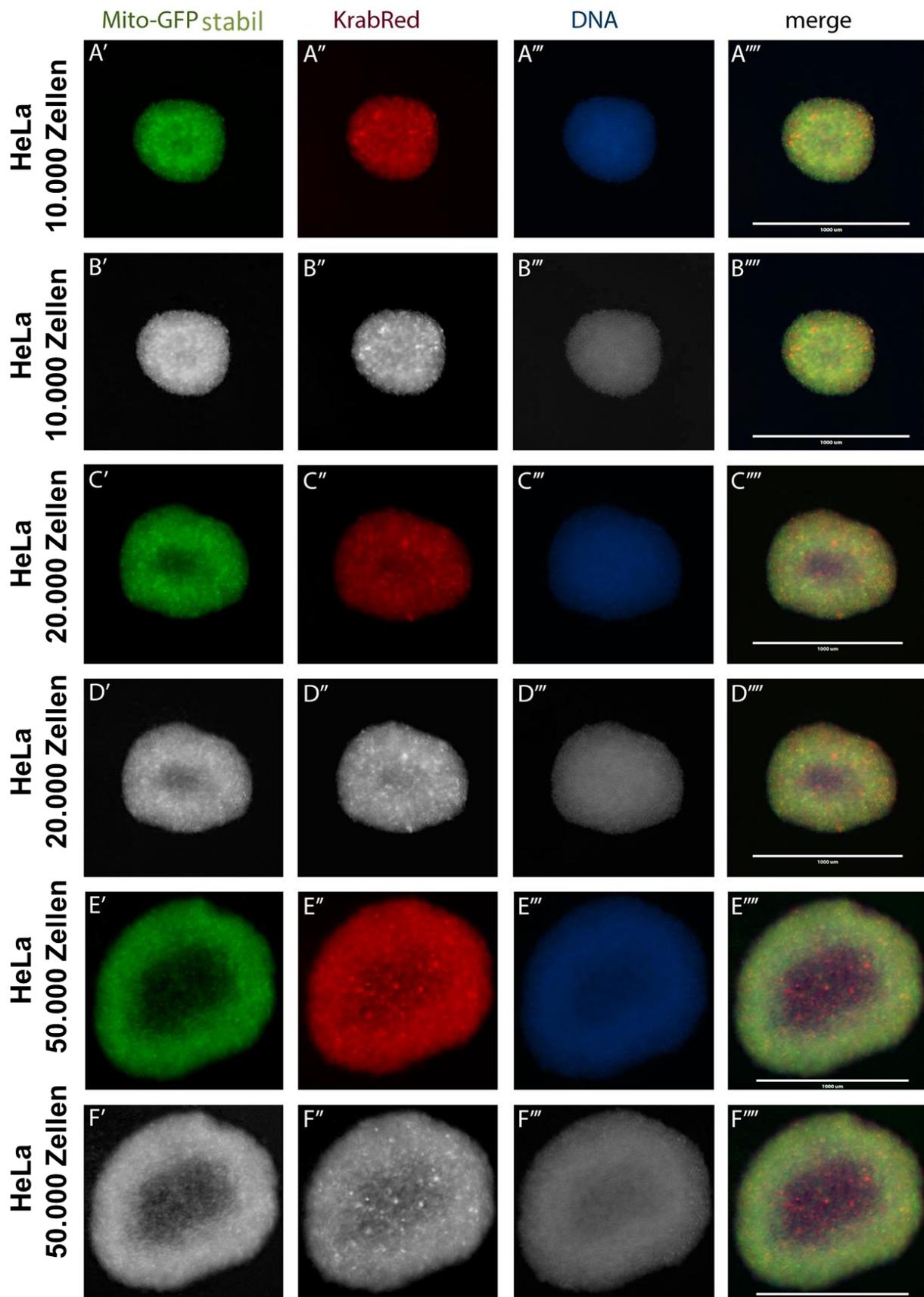


Abbildung 4-84 3D Zellkultur Modelle (Sphäroide) mit unterschiedlichen Zellzahlen (HeLa) nach 48 Stunden

A.'-B.''''' 10.000 HeLa Zellen, C.'-D.''''' 20.000 HeLa Zellen; E.'-F.''''' 50.000 HeLa Zellen; 3D HeLa Zellkulturen aus unterschiedlich vielen Zellen, die Mito-GFP (A.', C.', E.'), KrabRed exprimieren (A.', C.', E.') und mit Höchst33342 (1 μ g/ml) gefärbt wurden (A.'', C.'', E.''), geerntet nach 48 Stunden; Fluoreszenzmikroskop; Maßstab: 1000 μ m

Abbildung 4-85 und Abbildung 4-86 zeigen HeLa Zellen in einem Sphäroid (50.000 Zellen) mit Blick auf die Proliferationszone (PZ), Ruhezone (QZ) und nekrotische Zone (NZ), geerntet nach 48 Stunden (Abbildung 4-85) und 96 Stunden (Abbildung 4-86). Auffällig ist, dass bereits in der Proliferationszone die Mitochondrien als kugelförmige Struktur erkennbar sind (Abbildung 4-85 A'-A'''). Die Zellkerne sind noch intakt und es sind vereinzelt Zellen in der Mitose erkennbar (Abbildung 4-85A'', orange Sterne). Auch Zellen aus der Ruhezone (QZ) haben nach 48 Stunden noch intakte Zellkerne, jedoch wirken die kugelförmigen Mitochondrien etwas kleiner als noch am Sphäroidrand (Abbildung 4-85 B'-B'''). Bei Zellen aus der nekrotischen Zone sind bereits nach 48 Stunden kaum noch intakte Zellkerne sichtbar und es fällt schwer, Mitochondrien einzelnen Zellen zuzuordnen, außerdem wirken sie diffus und klein (Abbildung 4-85 C'-C''').

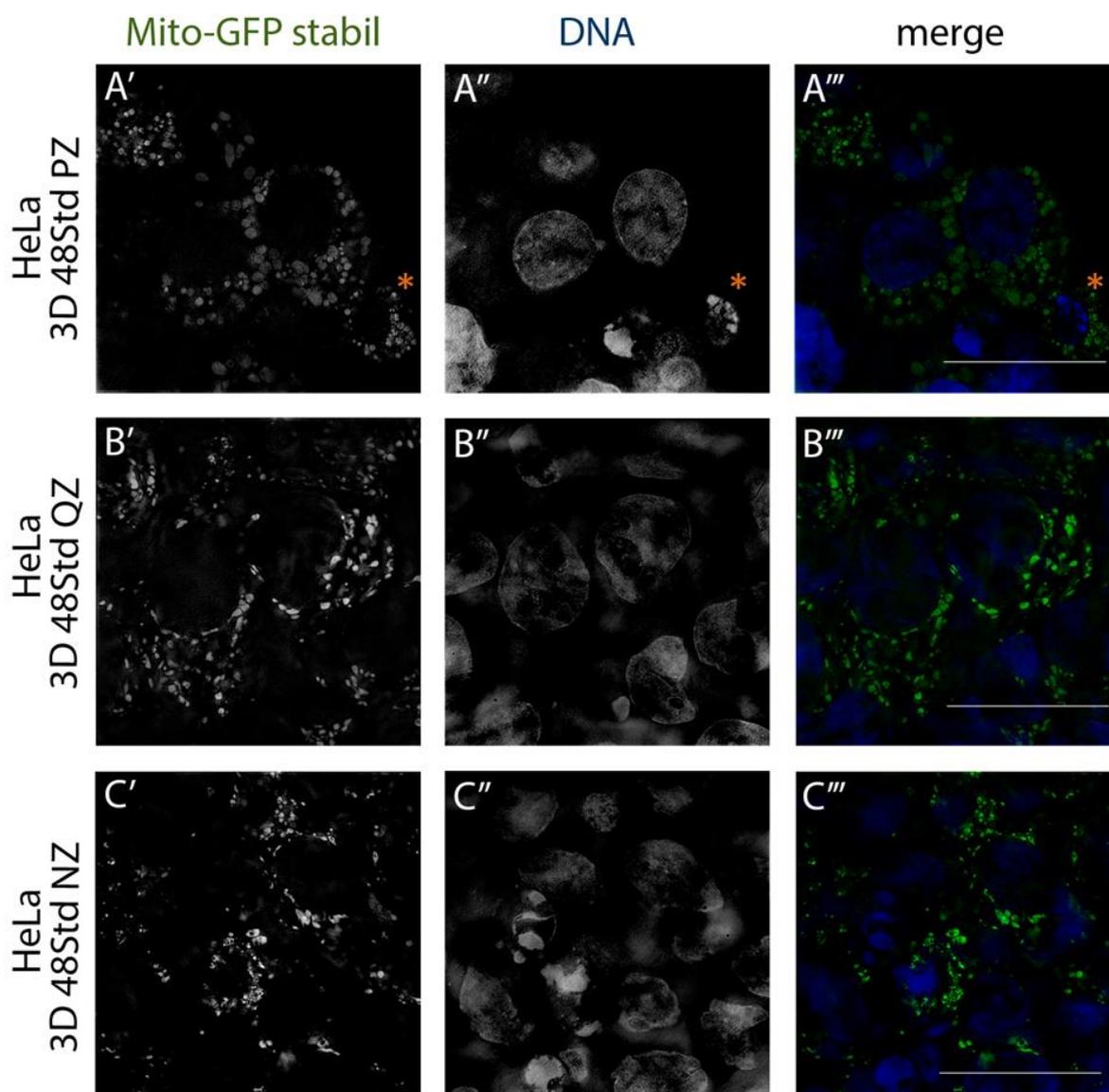


Abbildung 4-85 3D Zellkultur (Sphäroid) aus HeLa (50.000 Zellen) mit stabil exprimiertem Mito-GFP, ausgewertet mit dem 3D SIM, fixiert nach 48 Stunden

HeLa Zellen, die stabil Mito-GFP exprimieren, wurden vor dem Bau des 3D Systems mit Höchst 33342 (1µg/ml, 30 Minuten) und Doxycyclin (750ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden nach 48 Stunden fixiert und mittels 3D SIM ausgewertet. A.-A. zeigen Zellen aus dem äußeren Rand (Proliferationszone, PZ), B.-B. Zellen aus der Ruhezone (Quiescentzone, QZ), C.-C. Zellen aus der Mitte des Sphäroids, der nekrotischen Zone (NZ); orange Sterne zeigen Zellen in der Mitose. 3D SIM; Maßstab: 20µm

Eine ähnliche Mito- und Kernmorphologie ist auch im 3D-Zellkulturmodell nach 96 Stunden zu erkennen (Abbildung 4-86).

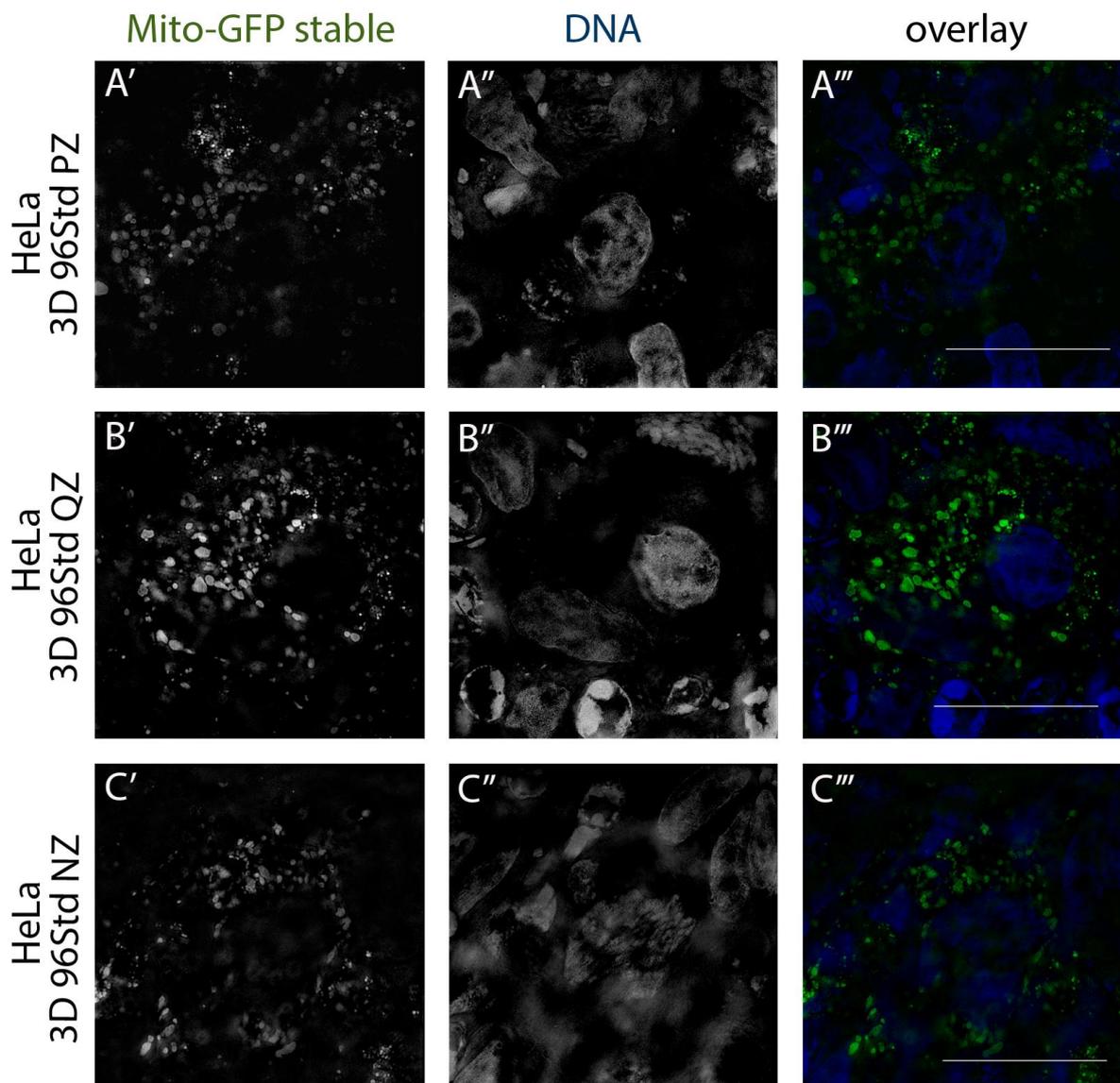


Abbildung 4-86 3D Zellkultur (Sphäroid) aus HeLa (50.000) mit stabil exprimiertem Mito-GFP ausgewertet mit dem 3D SIM, fixiert nach 96 Stunden

HeLa Zellen, die stabil Mito-GFP exprimieren, wurden vor dem Bau des 3D Systems mit Höchst 33342 (1µg/ml, 30 Minuten) und Doxycyclin (0.750ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden nach 96 Stunden fixiert und mittels 3D SIM ausgewertet. A.'-A.''' zeigen Zellen aus dem äußeren Sphäroid (Proliferationszone, PZ), B.'-B.''' Zellen aus der Ruhezone (Quizentzone, QZ), C.'-C.''' Zellen aus der Mitte des Sphäroids, der nekrotischen Zone (NZ). 3D SIM Maßstab: 20µm

Zum Vergleich wurden HeLa Zellen als Monolayer mit stabil exprimierendem Mito-GFP als Monolayer für 24 Stunden unter Sauerstoffausschluss (Hypoxie, 0,01% O₂), im Vergleich zu normalen Zellbedingungen (Normoxie, 21% O₂) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit einem α-HIF Antikörper gegengefärbt und am konfokalen Mikroskop ausgewertet.

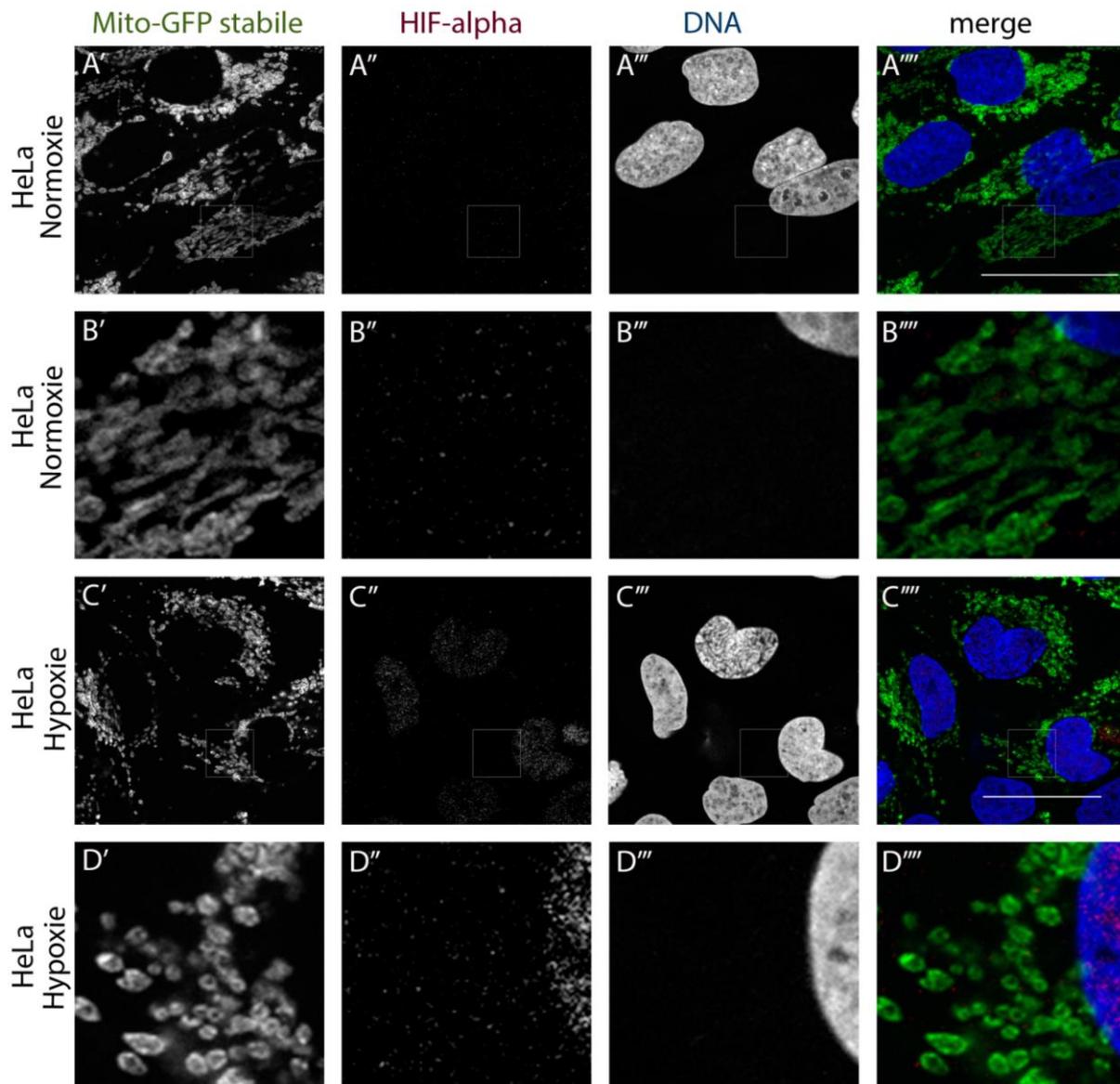


Abbildung 4-87 Morphologie der Mitochondrien in HeLa Monolayer Zellen unter der Bedingung der Normoxie und Hypoxie

HeLa Zellen behandelt mit Doxycyclin (250ng/ml). Dazu wurden die Zellen unter normalen Laborbedingungen als Kontrolle (21% O₂, A.-B.'''') und unter Hypoxie, (0,01% O₂ = Hypoxie, C.-D.'''') für 24 Stunden kultiviert. DAPI (1µg/ml); Konfokale Schnitte, Maßstab: 20µm

HeLa Zellen in Normoxie haben Mitochondrien mit einer netzwerkartige Struktur (Abbildung 4-87 A'-B'). Man kann jedoch eine Veränderung der mitochondrialen Struktur unter hypoxischen Bedingungen erkennen (Abbildung 4-87 C', D'). Die Zellen, bei denen HIF- α exprimiert wird, haben fraktionierte Mitochondrien. Man kann erkennen, dass die Mitochondrien nicht mehr netzwerkartig miteinander verbunden sind, sondern einzelne abgerundete Strukturen bilden.

5. Diskussion

AlkBh1 und AlkBh7 sind zwei Fe(II)- und 2-Oxoglutarat abhängige Oxygenasen, die zur Familie der AlkB Homologen gehören (Ougland et al., 2015). Diese Familie umfasst im Menschen neun Proteine [AlkBh1-AlkBh8, FTO, (Ougland et al., 2015)]. Für das ursprüngliche bakterielle AlkB wurden Nukleotide als Substrat identifiziert. AlkB kann DNA demethylieren (3-Methylcytosin) und dadurch Alkylierungsschäden reparieren und möglicherweise RNA *in vitro* modifizieren (Falnes et al., 2002; Ougland et al., 2004). Auch für einige humane AlkB Homologe konnten Nukleotide als Substrate identifiziert werden. AlkBh2 und AlkBh3 haben eine DNA-Reparaturfunktion, AlkBh8 modifiziert tRNA und AlkBh5 und FTO demethylieren 6-Methyl-Adenin (m^6A) in RNA (Ougland et al., 2015). Funktionen für AlkBh1, AlkBh6 und AlkBh7 sind bisher nicht bekannt.

5.1 AlkBh1 & AlkBh7

5.1.1 Lokalisation

AlkBh1

AlkBh1 wird in verschiedenen Organen unterschiedlich exprimiert, dabei zeigen „*Northern Blot*“ Analysen von Hoden, Pankreas, Plazenta, Herz und Muskeln höchste AlkBh1 Expressionen im humanen Gewebe. Dagegen konnte z. B. im humanem Darmgewebe kaum AlkBh1 detektiert werden (Westbye et al., 2008). In 12 Wochen alten Mäusen wurde eine erhöhte Expression von AlkBh1 in Hoden, Augen, Gehirn und Nieren mittels qPCR detektiert (Nordstrand et al., 2010).

In der Literatur gab es bisher kontroverse Ergebnisse zur intrazellulären Lokalisation von AlkBh1. AlkBh1 wurde in Mausfibroblasten und in humanen embryonalen Stammzellen (H9) im Zellkern nachgewiesen (Ougland et al., 2012; Ougland et al., 2015; Pan et al., 2008). In HeLa Zellen wurde die Lokalisation von AlkBh1 in den Mitochondrien beschrieben (Westbye et al., 2008; Wollen Steen et al., 2012).

In dieser Arbeit konnte AlkBh1 auf endogenem und überexprimiertem Level in verschiedenen humanen Zelllinien (z. B. HeLa, A549, HEK293T) primär in den Mitochondrien detektiert werden. Die Kolokalisation mit Mito-GFP zeigt, für die hier verwendete, ungetaggte, überexprimierte Proteinsequenz von AlkBh1 (Sequenz: Q13686, uniprot.org) ausschließlich eine mitochondriale Lokalisation. Vereinzelt konnte endogenes AlkBh1 Signal neben dem Mitochondriensignal auch im Zellkern detektiert werden. Mit diversen Sequenzanalyseprogrammen konnte für AlkBh1 kein mitochondriales Signalpeptid vorhergesagt werden.

AlkBh7

Für AlkBh7 wird am N-terminalen Ende der Sequenz ein mitochondriales Signalpeptid vorhergesagt (Fu et al., 2013). Für AlkBh7 konnten, unterschiedliche Expressionslevel in verschiedenen Mausgewebearten auf RNA Level detektiert werden (Solberg et al., 2013). AlkBh7 ist besonders hoch im Herzgewebe, im Gehirn, im braunen Fettgewebe, in Hoden und in der Leber angereichert (Solberg et al., 2013). Auf zellulärer Ebene konnte für AlkBh7 eine Lokalisation in den Mitochondrien bestimmt werden (Fu et al., 2013; Solberg et al., 2013). Ungetaggtetes, überexprimiertes AlkBh7 (Sequenz: Q9BT30, uniprot.org) ist ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert. Der Nachweis von endogenem AlkBh7 Signal erwies sich trotz hoher mRNA Level unter normalen Bedingungen als schwierig, da mit mehreren getesteten Antikörpern (siehe Tabelle 6-6) keine eindeutige Färbung im Western Blot und in Zellen erkennbar war.

AlkBh1 und AlkBh7 sind mitochondriale Proteine, bei denen aber auch eine Kernlokalisation nicht ausgeschlossen werden kann. Die Lokalisation von Proteinen in unterschiedlichen Kompartimenten kann z. B. durch alternatives Splicing beeinflusst werden (Matthews, Gould, & Vardimon, 2005; Tolkunova, Park, Xia, King, & Davidson, 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass Proteine mit einem schwachen mitochondrialen Signalpeptid durch ein verändertes mitochondriales Membranpotential die intrazelluläre Lokalisation wechseln, z.B. vom Zytoplasma in die Mitochondrien (Matthews, Gur, Koopman, Pines, & Vardimon, 2010). Die Glutaminsynthase ist z.B. in Astrozyten im Zytoplasma und in Hepatozyten im Mitochondrium lokalisiert (Matthews et al., 2005; Matthews et al., 2010; Tolkunova et al., 2000).

5.1.2 Funktion**AlkBh1**

AlkBh1 scheint eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung von Mäusen zu spielen. Knockout Mäuse von AlkBh1 weisen einen Phänotypen auf, der durch ein stark verformtes Gehirn und Skelett gekennzeichnet ist (Nordstrand et al., 2010). Die enzymatische Aktivität, die für diese Defekte verantwortlich ist, konnte noch nicht identifiziert werden. Humane 2-OG-Oxygenasen können Proteine oder Nukleotide als Substrate haben (Ougland et al., 2015). Es gibt kontroverse Aussagen über die enzymatische Aktivität von AlkBh1. So wurde für AlkBh1 bereits eine Funktion als Histondemethylase (Ougland et al., 2012) und als 3-Methylcytosin Demethylase (Westbye et al., 2008) nachgewiesen. Kürzlich wurde für AlkBh1 gezeigt, dass es für Modifikationen an bestimmten tRNA's in Mitochondrien verantwortlich ist (Haag et al., 2016; Liu et al., 2016).

Für AlkBh1 wurde eine Aktivität an Histonen im *CO₂-Capture Assay* gezeigt, die mit der inaktiven Variante nicht detektierbar war (Ougland et al., 2012). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass AlkBh1 3-Methylcytosin in DNA demethyliert (Westbye et al., 2008) und die 3-Methylcytosin Modifikation *in vitro* durch eine direkte Interaktion mit mtSSBP beeinflusst wird (Wollen Steen et al., 2012).

Des Weiteren wurde für AlkBh1 gezeigt, dass es die tRNA für Methionin (tRNA^{Met}) in Mitochondrien modifiziert (Haag et al., 2016; Liu et al., 2016), eine ähnliche Funktion konnte für AlkBh8 im Zytoplasma gezeigt werden (Ougland et al., 2015; van den Born et al., 2011). Die Modifizierung durch AlkBh1 an der tRNA ist scheinbar von der Glukosekonzentration in der Zelle abhängig (Liu et al., 2016). AlkBh1 ist nur dann in der Lage Proteine zu modifizieren, wenn genug Glukose (25mM) zur Verfügung steht. Bei einer niedrigen Glukose Dosis (5mM) wurde eine verringerte Aktivität von AlkBh1 festgestellt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die tRNA Modifikation von 5-Methylcytosin (m⁵C) zu 5-Formylcytosin (f⁵C) an der *Wobble* Position Cytosine 34 ein reversibler Prozess ist (Liu et al., 2016).

Interaktionspartner und mögliche Funktion von AlkBh1 – ATAD3A

Es wurden mittels α -AlkBh1-IP aus isolierten Mitochondrien und anschließender Auswertung mittels Massenspektrometrie (MS) ATAD3A und AlkBh7 als Interaktionspartner für AlkBh1 identifiziert und in weiteren Versuchen validiert. Die Behandlung mit DNA/RNase hatte keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen AlkBh1 und ATAD3A. Damit kann eine indirekte Bindung der beiden Proteine über die mitochondriale DNA oder RNA ausgeschlossen werden.

ATAD3A ist eine Transmembran-ATPase in den Mitochondrien (S. Li & Rousseau, 2012) und spielt möglicherweise eine Rolle in der Proteinbiosynthese, indem es direkt an die mitochondrialen Ribosomen während der Translation bindet. ATAD3 Substrate sind nicht bekannt (He et al., 2012). Die Interaktion von ATAD3A und AlkBh1, und die modifizierende Funktion von AlkBh1 an der tRNA (Haag et al., 2016) zeigen, dass AlkBh1 auch eine Funktion in der mitochondrialen Proteinbiosynthese haben könnte (Haag et al., 2016; Liu et al., 2016; Pan et al., 2008).

Die Proteinsynthese in Mitochondrien findet in speziellen RNA-Granules statt, die an die Nukleotide in der mitochondrialen Matrix angelagert sind. Die RNA-Granules enthalten Markerproteine, wie z.B. FASTKD2 und FASTKD5 (Antonicka & Shoubridge, 2015; Tu & Barrientos, 2015). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass AlkBh1 mit FASTKD2 teilweise überlagern und deshalb Teil der RNA Granules sein könnte.

Eine Subfraktion von ATAD3A scheint auch an die mtDNA zu binden und eine Rolle bei der Replikation zu spielen, in dem ATAD3A wahrscheinlich den Nukleoid mit Twinkle an die Membran bindet (He et al., 2012). In dieser Arbeit konnte keine direkte Kollokalisierung oder Interaktion von AlkBh1 mit der mitochondrialen DNA unter normalen Bedingungen gezeigt werden. Die 3D-SIM Daten zeigen, dass auch AlkBh1 und ATAD3A gelegentlich überlagern.

In Kollaboration mit der Gruppe von Dr. Michal Minczuk, MRC, Cambridge, wird an den in dieser Arbeit generierten, induzierbaren HeLa Knockdown Zelllinien mittels mitochondrialen Transkriptanalysen nach einer möglichen Rolle von AlkBh1 und AlkBh7 bei der Entstehung der f^5C Modifikation an der mitochondrialen tRNA gesucht.

Auswirkung von AlkBh1 auf die Entwicklung und Proliferation

Der AlkBh1 Knockout (Pan et al., 2008) und ATAD3 Knockout in Mäusen (Goller et al., 2013) führt in beiden Fällen zu einem Defekt bei der Entwicklung während der Differenzierung von Trophoblasten im Uterus. Die Knockoutmäuse von AlkBh1 und ATAD3A zeigten eine erhöhte Sterblichkeit in ähnlichen Entwicklungsstadien (Goller et al., 2013; Nordstrand et al., 2010).

AlkBh1 scheint bei der Apoptose eine Rolle zu spielen, da ein Knockdown von AlkBh1 in embryonalen Stammzellen zu einer erhöhten Apoptoserate führt (Ougland et al., 2012). Die Ergebnisse des Proliferationsassay aus dieser Arbeit zeigen, dass die AlkBh1 Knockdown Zelllinien KD5017 und KD5020 nach Induktion des Knockdowns mit Doxycyclin langsamer wachsen (Abbildung 4-32). Knockdown von AlkBh1 in *C. elegans* führt auch zu einer Wachstumsverzögerung (siehe Abbildung 4-30). Im Gegensatz zu AlkBh7, dessen Knockdown, weder im Proliferationsassay in humanen Zellen noch in *C. elegans* einen offensichtlichen Phänotyp aufweist.

AlkBh7

Wissenschaftler konnten eine mögliche Funktion von AlkBh7 im Fettstoffwechsel beschreiben (Solberg et al., 2013). AlkBh7 Knockoutmäuse zeigten nur dann besondere Phänotypen, wenn sie mit fettreicher Nahrung gefüttert wurden. Dabei waren die Adipozyten der Knockoutmäuse doppelt so groß ausgebildet wie die der Wildtypmäuse. Des Weiteren wiesen die Knockoutmäuse einen höheren Fettanteil und Körpergewicht auf, obwohl sie weniger Kalorien zu sich nahmen (Solberg et al., 2013). Der Knockout von AlkBh7 scheint die Fettsäureoxidation zu beeinflussen, da diese Mäuse in hohem Masse Glykogen und Fett speicherten (Solberg et al., 2013). Die spezifische Funktion von AlkBh7 in diesem Prozess ist bisher jedoch unbekannt.

Andererseits konnte auch eine Aufgabe für AlkBh7 in der programmierten Nekrose beschrieben werden, die durch DNA schädigende Agenzien induziert wird. Der apoptotische Zelltod wird durch den Verlust von AlkBh7 nicht beeinflusst (Fu et al., 2013). In AlkBh7 Knockdown Zellen ist der nekrotische Zelltod unterdrückt, der normalerweise durch diverse alkylierende (wie z.B. Methanesulfonat, MMS) und oxidative (wie z. B. Wasserstoffperoxid, H₂O₂) Agenzien verursacht wird (Fu et al., 2013). AlkBh7 scheint den stressinduzierten intrazellulären NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) und ATP (Adenosinetriphosphate) Verlust in den Mitochondrien wiederherstellen zu können (Fu et al., 2013).

Interaktionspartner für AlkBh7

Mittels Antikörper-IP's und MS Analysen wurde nach möglichen Interaktionspartnern für AlkBh7 gesucht. Es konnten Proteine aus ganzem Zelllysate und isolierten Mitochondrien als potentielle Bindepartner für AlkBh7 identifiziert werden (Tabelle 4-5, Tabelle 4-6). Die in dieser Arbeit identifizierten potentiellen Interaktionspartner können nach drei möglichen Funktionsbereichen unterteilt werden: Translation der mitochondrialen DNA (z.B. TUFM), programmierte Nekrose oder Ferroptose (z.B. p53) und DNA Reparaturmechanismen (z.B. Rad50). Allerdings wurden aufgrund der α -AlkBh7 Antikörperproblematik keine weiteren Versuche durchgeführt, die diese Interaktionen validieren.

5.1.3 Stress der mitochondrialen DNA

Das ursprüngliche bakterielle AlkB spielt eine Rolle bei der Stressantwort mittels DNA Reparatur, nach Induktion von Schäden an der DNA mit alkylierenden Agenzien (wie z. B. MMS). Für AlkBh1 konnte diese Funktion bisher nicht bestätigt werden (Aas et al., 2003; Wei et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnte für AlkBh7 Knockdown Zelllinien nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien (z. B. MMS) ein Vorteil gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Jedoch konnte bisher keine direkte DNA Reparaturfunktion von AlkBh7 gezeigt werden (Fu et al., 2013; Solberg et al., 2013). Nachdem sowohl AlkBh1 als auch AlkBh7 in den Mitochondrien lokalisiert sind (Fu et al., 2013; Westbye et al., 2008), wäre eine Funktion bei der mitochondrialen DNA Reparatur denkbar.

Bestimmte Reagenzien wie z.B. EtBr, Doxorubicin und Bleomycin haben neben der Schädigung der Kern-DNA auch eine schädigende Wirkung auf die mitochondriale DNA (Ashley & Poulton, 2009; Dmitrieva et al., 2011). Dadurch wird möglicherweise eine DNA-Reparaturantwort in den Mitochondrien aktiviert (Ashley & Poulton, 2009; Dmitrieva et al., 2011; Scheibye-Knudsen et al., 2015).

Im Zellkern sind verschiedene DNA Reparatursysteme beschrieben, wie z. B. DNA *Mismatch* Reparaturweg, *Base excision* Reparaturweg, *Nucleotide excision* Reparaturweg und die DNA-*double-stranded-break* Reparatur (Scheibye-Knudsen et al., 2015). Mitochondriale DNA Reparaturwege sind bisher noch nicht vollständig beschrieben. Bis vor ein paar Jahren ging man noch davon aus, dass an der mitochondrialen DNA keine Reparatur stattfindet, sondern geschädigte mtDNA selektiv abgebaut wird (Kazak, Reyes, & Holt, 2012; Scheibye-Knudsen et al., 2015).

Mittlerweile konnten mehrere DNA Reparaturwege für die mitochondriale DNA beschrieben werden (Scheibye-Knudsen et al., 2015). So wurden bereits mehrere DNA-Reparatur Proteine (wie z.B. Mre11) aus dem Zellkern auch in den Mitochondrien gefunden (Dmitrieva et al., 2011), die darauf hindeuten, dass es DNA-Reparatur an der mitochondrialen DNA geben könnte (Morel, Renoux, Lachaume, & Alziari, 2008; Shen et al., 1995).

Bisher konnte nur der *Base excision* Reparaturweg mit den beteiligten Proteinen OGG1 (8-oxoguanine Glycosylase) und APE1 (Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 1) als mitochondrialen Reparaturweg nachweislich beschrieben werden (Scheibye-Knudsen et al., 2015). In mehreren α -AlkBh7-IP's konnte Rad50, ein Reparaturprotein, das normalerweise nur im Zellkern vorkommt auch aus isolierten Mitochondrien angereichert können. Mre11, Rad50 und Nibrin, bilden zusammen einen MRN-Komplex, der Doppelstrangbrüche reparieren kann (Abbildung 5-1). Es ist möglich, dass AlkBh7 als Interaktionspartner mit dem MRN-Komplex eine Rolle bei der Reparatur der mitochondrialen DNA spielt.

Aus diesem Grund wurden verschiedene DNA-schädigende Agenzien, wie z.B. EtBr, Doxorubicin und Bleomycin verwendet, um eine mögliche Funktion von AlkBh1 und AlkBh7 in der DNA Reparatur zu erforschen.

Es wurden HeLa und A549 Zellen mit Ethidiumbromid, Doxorubicin und Bleomycin behandelt. Danach wurde die Lokalisation und Verteilung von AlkBh1 und AlkBh7 in den Zellen beobachtet. In HeLa Zellen verändert sich die Lokalisation von AlkBh1 nach EtBr und Doxorubicinbehandlung im Vergleich zur Kontrolle nicht. In A549 Zellen dagegen führt die Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien zu einer Umverteilung von AlkBh1 in knötchenartige Akkumulationen im Zytoplasma. Für AlkBh7 konnte sowohl unter der Behandlung mit Doxorubicin als auch mit Bleomycin eine Akkumulation im Zellkern beobachtet werden. Diese beiden DNA-schädigenden Agenzien führten auch zu einer Akkumulation von AlkBh7 in „Knötchen“ im Zytoplasma.

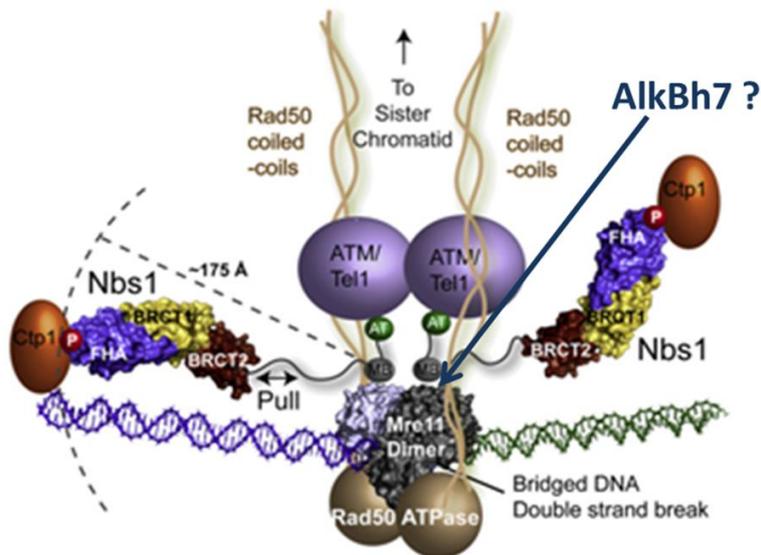


Abbildung 5-1 Überblick über die Funktionsweise des MRN Komplex während der DNA Reparatur

Der MRN-Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen an der DNA im Zellkern. Dieser Komplex besteht aus vielen Proteinen wie z.B. MRE11, RAD50, Nibrin (NBS), und BRCA-Proteinen. AlkBh7 könnte als potentieller Interaktionspartner möglicherweise eine Funktion bei der DNA Reparatur einnehmen.

(Angepasst an Quelle: http://bl1231.als.lbl.gov/2009/10/01/MRN_model.png)

EtBr

EtBr Behandlung von A549 Zellen führt zu einer Akkumulation von TFAM, der mitochondrialen DNA und AlkBh1 in kleinen „Knötchen“ in der Zelle (Abbildung 4-43, Abbildung 4-45). Eine ähnliche Akkumulation von TFAM und mtDNA konnte in HepG2 Zellen nach Ethidiumbromidbehandlung beobachtet werden (Alan et al., 2016; Dmitrieva et al., 2011). HeLa Zellen dagegen zeigten nach Behandlung mit EtBr für mtDNA und AlkBh1 kaum ein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4-42). Dies kann daran liegen, dass TFAM in HeLa Zellen durch Ethidiumbromidbehandlung bereits bei einer viel niedrigeren EtBr Konzentration, als sie in dieser Arbeit verwendet wurde, reduziert wird (Seidel-Rogol & Shadel, 2002). Ohne TFAM kann mitochondriale DNA nicht verpackt werden (Kanki et al., 2004; Kukat et al., 2015). Des Weiteren akkumulieren HeLa Zellen mit einem Knockdown von TFAM Schäden an der mitochondrialen DNA (Canugovi et al., 2010).

A549 und HeLa Zellen wurden mit gleichen Konzentration EtBr für 24 Stunden behandelt und schließlich mit H2AX Antikörper, einem Marker für DNA-Reparatur, gegengefärbt (Kuo & Yang, 2008). Sowohl für A549 Zellen als auch für HeLa Zellen ist ein erhöhtes Signal für H2AX sichtbar. Das deutet darauf hin, dass in beiden Zelllinien DNA Reparatursysteme im Zellkern aktiviert wurden.

Dieses unterschiedliche Verhalten von HeLa und A549 konnte auch nach Doxorubicinbehandlung beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten auch darauf hindeuten, dass HeLa Zellen und A549 Zellen unterschiedliche Strategien anwenden, um mit DNA-schädigendem Stress umzugehen. Deshalb wurden weitere Versuche mit Doxorubicin und Bleomycin in A549 Zellen durchgeführt, um herauszufinden, ob es sich bei den „Knötchen“ um mitochondriale DNA Reparatur handeln könnte (siehe Kapitel 4.1.11).

Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Chemotherapeutikum, aus der Familie der Anthracycline, das eine breite Anwendung in der Krebsforschung findet (Varga et al., 2015). Dieses Chemotherapeutikum ruft Nebenwirkungen wie schwere Herzerkrankungen (wie z. B. Kardiomyopathie, Kardiotoxizität) hervor, deren Ursache bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Allerdings wird vermutet, dass diese Nebenwirkungen durch defekte Mitochondrien verursacht werden (Minotti et al., 2004; Varga et al., 2015).

Nach Behandlung von humanen Zellen interkaliert Doxorubicin in die nukleare und mitochondriale DNA (Ashley & Poulton, 2009; Varga et al., 2015). Bei der Interkalation von Doxorubicin in die mitochondriale DNA, aggregieren die Nukleotide in Fibroblasten und A549 Zellen zu „Knötchen“. Akkumulationen sollen angeblich neu replizierte mitochondriale DNA schützen (Alan et al., 2016; Ashley & Poulton, 2009). Es gibt aber auch konträre Aussagen, die zeigen, dass die Bildung von riesigen Mitochondrien schwere Erkrankungen verursachen oder als Symptome bei Krankheiten wie Diabetes oder Krebs auftreten können (Wakabayashi, 2002).

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die detaillierte intra-mitochondriale Lokalisation von mitochondrialen Proteinen nach Doxorubicinbehandlung gelegt. AlkBh1 überlappt in den „Knötchen“ teilweise mit TFAM und Hsp60, und weist ähnliche Strukturen wie mtSSBP auf. ATAD3A, ein Transmembranprotein und Interaktionspartner von AlkBh1, dagegen scheint diese Akkumulation von außen zu umschließen (Abbildung 4-58; Abbildung 4-59). Um mehr über die Funktion von AlkBh1 in den „Knötchen“ nach Doxorubicinbehandlung herauszufinden, wurden α -AlkBh1-IP's durchgeführt und mittels MS Analyse nach veränderten Interaktionspartnern gesucht.

Auch AlkBh7 scheint in den mitochondrialen „Knötchen“ nach Doxorubicinbehandlung akkumuliert zu sein (Abbildung 4-78). Jedoch scheint AlkBh7 zusätzlich auch in Akkumulationen im Zellkern aufzutreten. AlkBh7 könnte im Zellkern eine Rolle bei der durch

Doxorubicin induzierten programmierten Nekrose spielen (Shin et al., 2015), da AlkBh7 als ein Schlüsselprotein bei der programmierten Nekrose identifiziert wurde (Fu et al., 2013).

Defekte oder nicht benötigte Mitochondrien oder andere Organelle werden mittels Mitophagie oder Autophagie entsorgt. Dabei binden zuerst Proteine wie PINK1, Parkin und p62 an die durch Stress geschädigt Mitochondrien und induzieren die Mitophagie (Kubli & Gustafsson, 2012). Dadurch werden die defekten Mitochondrien in Mitophagosomen eingeschlossen (Scheibye-Knudsen et al., 2015). An die Mitophagosomen binden dann wiederum Proteine, wie z.B. LC3-B, die die Autophagie induzieren. Die so entstandenen Autophagosomen werden dann von den Lysosomen umschlossen und schlussendlich abgebaut (Kubli & Gustafsson, 2012; Scheibye-Knudsen et al., 2015).

Die Kofärbungen der beiden Markerproteine p62 und LC3-B mit TFAM und AlkBh1 nach Doxorubicinbehandlung zeigen eindeutig, dass sich die durch Doxorubicin induzierten „Knötchen“ und den Mitophagosomen bzw. Autophagosomen gegenseitig ausschließen.

Bleomycin

Bleomycin ist ein Glycopeptidantibiotikum mit Antitumoraktivität (J. Chen & Stubbe, 2005). Es ist in der Lage sowohl Einzelstrangbrüche als auch Doppelstrangbrüche zu induzieren. Die Schäden, die durch Bleomycin verursacht werden, sind mit ionisierender Strahlung vergleichbar (J. Chen & Stubbe, 2005). Die Einnahme dieses Chemotherapeutikum kann bei Patienten zu schweren Nebenwirkungen, wie Lungenfibrose führen (J. Chen & Stubbe, 2005).

Mehrere Publikationen zeigen, dass Bleomycin in der Lage ist, Doppelstrangbrüche in die mitochondriale DNA einzufügen, die wiederum durch eine Stressantwort repariert werden können (Morel et al., 2008; Shen et al., 1995). Der detaillierte Reparaturmechanismus an der mitochondrialen DNA ist unbekannt. Es ist aber bekannt, dass Bleomycin den ATM Reparatur Weg, *DNA-double-stranded-break-Reparaturweg* im Zellkern induziert, bei dem der MRN-Komplex bestehend aus MRE11, Rad50 und Nibrin beteiligt ist (J. Chen & Stubbe, 2005).

MRE11 bindet nach Behandlung von humanen Zellen mit niedrigen Konzentrationen Bleomycin vermehrt an die mtDNA (Dmitrieva et al., 2011). Des Weiteren scheinen A549 Zellen ohne mitochondriale DNA gegen die Behandlung mit Bleomycin resistent zu sein (Brar et al., 2012), was einen Wirkmechanismus über die mitochondriale DNA nahelegt (J. Chen & Stubbe, 2005).

Die Behandlung von A549 Zellen mit Bleomycin führt zu einer Überlagerung von AlkBh7 und p53 in „Knötchen“ im Zellkern. Welche Funktion diese beobachtete Überlagerung von AlkBh7 und p53 haben, ob möglicherweise regulierte Nekrose bzw. Nekroptose eine Rolle spielt, bleibt offen. Jedoch konnte p53 als potentieller Interaktionspartner von AlkBh7 mittels MS Analyse identifiziert werden.

Obwohl bereits eine Lokalisation von p53 nach oxidativem Stress in der mitochondrialen Matrix gezeigt werden konnte, die scheinbar eine Reduktion der mitochondrialen DNA zur Folge hat (Koczor, Torres, Fields, Boyd, & Lewis, 2013), konnte eine mögliche Kollokalisierung von AlkBh7 und p53 in den Mitochondrien nach induziertem Stress nicht nachgewiesen werden. Dass p53 nach Stressinduktion an der mitochondrialen DNA eine Funktion z.B. bei der mtDNA Synthese ausübt, wurde bereits von einigen Wissenschaftlern gezeigt (Ashley & Poulton, 2009; Bakhanashvili et al., 2008; Canugovi et al., 2010; Koczor et al., 2013).

Rad50 ist ein potentieller Interaktionspartner von AlkBh7 und ein zugehöriges Protein des MRN-DNA-Reparatur-Komplexes im Zellkern (J. Chen & Stubbe, 2005). Nachdem MRE11 nach Bleomycinbehandlung in geringen Dosen an die mitochondriale DNA bindet (Dmitrieva et al., 2011) und Rad50 auch in isolierten Mitochondrien in den α -AlkBh7-IP's angereichert werden konnten, wurden A549 Zellen mit Bleomycin behandelt. Dabei wurde das Augenmerk auf die Mitochondrien gelegt.

Die Behandlung von A549 Zellen führt dazu, dass AlkBh1 bereits nach zwei Stunden akkumuliert im Zytoplasma detektierbar ist. Dies konnte auch für die mitochondriale DNA beobachtet werden [Abbildung 4-62, (Dmitrieva et al., 2011)]. Wobei auffällig ist, dass AlkBh1 scheinbar zuerst in „Knötchen“ akkumuliert und danach die mitochondriale DNA in Akkumulationen auftritt.

Eine mögliche Erklärung dafür kann sein, dass AlkBh1 an die mitochondrialen DNA assoziierten Proteine TFAM und mtSSBP zu binden scheint. Eine Interaktion bzw. eine direkte Abhängigkeit von AlkBh1 mit mtSSBP konnte von Wissenschaftlern (Wollen Steen et al., 2012) *in vitro* nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Überlappung von AlkBh1 und mtSSBP mittels Immunfluoreszenz in A549 Zellen beobachtet werden.

TFAM konnte in dieser Arbeit auch als möglicher Interaktionspartner für AlkBh1 in A549 Zellen identifiziert und mittels mehrerer Antikörper-IP's validiert werden. TFAM wird auch als Histon der mitochondrialen DNA bezeichnet, da dieses Protein für die Windung der mitochondrialen DNA zuständig ist (Kanki et al., 2004). Da TFAM neben seiner Funktion in der Transkription

und Replikation (Canugovi et al., 2010) auch noch an die mitochondriale tRNA zu binden scheint (Brown, Tkachuk, & Clayton, 2015), und AlkBh1 bei der tRNA Modifikation eine Rolle bei der Translation der Mitochondrien spielt (Haag et al., 2016), könnten diese beiden Proteine eine gemeinsame Funktion in der Proteinsynthese haben.

5.2 3D Zellkultur

Es wurde ein stabil, induzierbares Mito-GFP System etabliert, um die Mitochondrienmorphologieveränderungen im 3D Modell zu verfolgen und zu analysieren.

Das 3D Zellkulturmodell mittels zellabweisenden Platten besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen (500 bis 50.000 Zellen pro Sphäroid). Diese entwickeln nach ca. 24 Stunden einen Zellverband, der durch direkten Zell-Zell-Kontakt fest miteinander verbunden ist. Diese 3D Zellkultur ähnelt den Bedingungen im Tumorgewebe (Hirschhaeuser et al., 2010). Die Zellen müssen sich an unterschiedliche Stressbedingungen wie z. B. variierende Sauerstoffversorgung, erhöhte Lactatproduktion und Nährstoffversorgung, anpassen (Hirschhaeuser et al., 2010; Mueller-Klieser, 2000).

Erste Versuche haben gezeigt, dass durch Hypoxie vermehrt fragmentierte Mitochondrien in Monolayerzellen auftreten (Carter et al., 2015) und Abbildung 4-87. Allerdings scheint die Morphologie der Mitochondrien im 3D Modell bereits nach 48 Stunden nicht mehr mit der Morphologie der Mitochondrien in Monolayer vergleichbar zu sein auch nicht bei Zellen, die unter Hypoxie kultiviert wurden. Diese veränderten Strukturen der Mitochondrien werden wahrscheinlich durch die weiteren vorhandenen Stressfaktoren im 3D Modell verursacht (H. Chen & Chan, 2009; Hirschhaeuser et al., 2010).

6. Material & Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Tabelle 6-1 Überblick über die verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Verwendung	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	SDS, WB	31350010	Thermo scientific
6XLOADING DYE SOLUTION,5X1ML	Agarosegel	R0611	Thermo scientific
Agar-Agar	BK	2266.3	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	SDS, WB	903001	Biozym
Ampicillin Natriumsalz 10g	BK	K029.1	Roth
Bleomycin sulfate	IF	SE/00015154/000001	Th Geyer
Bovine serum albumine (BSA)	IF, WB	A9647-10G	Sigma
CCCP	MT		
Cell Dissociation Solution (1x)	PD, KRS, 3D	C5789	Sigma
Cell Extraktion Puffer (CE)	WB, PD	FNN0011	Life Technologies
Complete mini, EDTA-free, protease inhibitor cocktail	WB, PD	11836170001	Roche
Complete mini, EDTA-free, protease inhibitor cocktail	WB, KRS	11836170001	Roche
DAPI (Diamidine-2-Phenylindoline-Dihydrochlorid)	IF	D9542-10mg	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ZK, MT, IF, PT	A994.1	Roth
DMEM, high Glucose, GlutaMAX	ZK	31966047	Life Technologies
Doxorubicin	IF, PD	44583-1mg	Sigma
Doxycycline Hydrochloride	KRS	D9881	Sigma
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	ZK	14190094	Life Technologies
ECL Western Blotting Detection Reagents	WB	RPN2209	VWR
EDTA	Allgemein	8043.2	Roth

Essigsäure p. a.	Allgemein	1000631000	VWR
Ethanol absol. P.A. 1L M983	Allgemein	1009832500	Merck
Ethidiumbromidlösung 0,5% (EtBr)	IF, PT	HP46.1	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Agarosegel	8043.2	Roth
Fötales Bovines Serum (FBS)	ZK	S0115	Biochrom
Glucose D(+) wasserfrei	BK	X997.1	Roth
Glycin	Allgemein	3908.3	Roth
Glycerin	BK	3783.1	Roth
HDGreen Plus DNA Stain	Agarosegel	ISII-HD Green Plus	INTAS
HEPES	KRS	9105.4	Roth
Höchst33342	IF, 3D, FACS	H3570	Life Technologies
Isopropyl Alkohol chem. rein 5 L	Allgemein	11575000	Th. Geyer
Kaliumacetat	KRS	10328500	Fisher Scientific
Kaliumchlorid	SDS, WB	6781.3	Roth
Kanamycin mind. 750u/Mg 5 g	BK	T832.1	Roth
Laemmle Sample Buffer 4X, 10 ml	WB	161-0747	Biorad
LB-Medium (Lennox) 1 kg	BK	X964.2	Roth
Lipofectamin 2000	TF (IF)	11668019	Life Technologies
Magnesiumacetat	KRS	0275.1	Roth
Methanol HPLC	IF, 3D, BK	1060072500	Merck
Milchpulver Blotting Grade 1kg	WB	T145.3	Roth
NaCl	Allgemein	3957.2	Roth
Nagellack	IF	---	DM Drogeriemarkt
Neutralrot	MT	N4638	Sigma
Nonidet(TM) P 40	PD	74385-1L	Sigma

Oligomycin	MT	O4876	Sigma
Paraformaldehyde Lösung 4% in PBS	IF, 3D	sc-281692	Santa cruz
Pen Strep	ZK	15140122	Thermo scientific
Phosphatase inhibitor cocktail 3	PD	P0044-1ML	Sigma
Phosphatase inhibitor cocktail II	PD	P5726-1ML	Sigma
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	PCR	F548	Biozym
Piericidin A	MT	sc-202287	Santa cruz
Polybrene	KRS	TR-1003-G	Merck
Poly-D-lysin hydrobromid (coating)	PT	P6407	Sigma
Polyethylenimine, branched (PEI)	TF (WB, PD)	408727-250ML	Sigma
Ponceau S Solution	WB	P7170-1L	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail ohne Meta L Chelate	PD	P8340-1ML	Sigma
PROTEIN G SEPHAROSE 4 Fast Flow	PD	17-0618-01	VWR
Reinstwasser, steril	ZK	L0015	Biochrom
Rotenon	MT		
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 1 l	SDS, WB	3029.1	Roth
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX	ZK	61870044	Life Technologies
SALZSAEURE 32% ZUR ANALYSE	Allgemein	1003191000	VWR
SDS Natriumdodecylsulfat	Allgemein	2326.2	Roth
trans-Resveratrol	MT, IF	CAY-70675-50	Biozol
Tris-Puffer p.a. 5kg	Allgemein	4855.3	Roth
Triton X-100 (BioChemica)	IF	A1388,0500	Applichem
Trypanblau-Lösung, für die Mikroskopie, 0,4%	ZK	93595-50ML	Sigma
Trypsin +EDTA (10x)	ZK	L-2153	Biochrom
TTFA (Thenoyltrifluoracetone)	MT		

Tween 20	Allgemein	9127.2	Roth
Vectashield	IF, 3D	VEC-H-1000	Biozol
Wasserstoffperoxid Stab., 30%, Ph.Eur 1l	Allgemein	9681.1	Roth
X-tremeGENE HP DNA Transf. Reag.	TF (Virus)	6366236001	Roche

6.1.2 Restriktionsenzyme und Puffer

Tabelle 6-2 Überblick über die verwendeten Enzyme und Puffer

Enzym & Puffer	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Age1 - HF	R3552 S	NEB
BamHI-HF	R3136 S	NEB
Clal recombinant	R0197S	NEB
EcoRI - HF	R3101 S	NEB
KpnI – HF	R3142 S	NEB
MluI	R0198 S	NEB
NdeI	R0111S	NEB
PmeI	R0560 S	NEB
PstI-HF	R3140 S	NEB
SacI	R3156 S	NEB
SpeI-HF	R3133 S	NEB
XbaI, recombinant	R0145S	NEB
XhoI	R0146 S	NEB
Alkaline Phosphatase (CIP),1000 U	M0290S	NEB
RNAse	EN0531	Thermo scientific
T4 DNA Ligase, 20.000 U	M0202 S	NEB
100xBSA	---	NEB

CutSmart Puffer / NEB 4x Puffer	---	NEB
Dilutionspuffer (5x)	---	NEB
Ligationspuffer (2x)	---	NEB

6.1.3 Kits

Tabelle 6-3 Überblick über die verwendeten Kits

Kits	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
First strand cDNA synthesis	27-9261-01	VWR
NUCLEOSPIN Gel and PCR Clean-up	74060950	MACHEREY-NAGEL
QIAFiltermaxi plasmid kit	12263	Qiagen
QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (50)	27104	Qiagen
Rapid Ligation Kit	11635379001	Roche

6.1.4 Marker → DNA- und Proteingrößenstandards

Tabelle 6-4 Überblick über die verwendeten Marker

DNA- und Proteingrößenstandards	Bestell Nr.	Bezugsquelle
GeneRuler 1kb DNA Ladder	SM0313	Thermo scientific
Precision Plus Protein Dual color standard	161-0374	Biorad

6.1.5 Beads

Tabelle 6-5 Überblick über die verwendeten Beads

Beads	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
3x FLAG peptide (zu Flag-PD)	F4799-4MG	Sigma
Anti-FLAG M2 Affinity Gel	A2220-1ML	Sigma
GFP-Trap_A	gta-20	ChromoTek
PROTEIN G SEPHAROSE 4 Fast Flow	17-0618-01	VWR

6.1.6 Antikörper

Erstantikörper

Tabelle 6-6 Überblick über die verwendeten Erstantikörper

Protein / Peptid	Bezeichnung	Verwendung	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Aktin (Human)	Anti-Aktin Antikörper	WB (1:200)	sc-1616	Santa cruz
Aktin_HRP	Anti-Aktin antibody coupled with HRP	WB (1:200; 1:500)	sc-1616 HRP	Santa cruz
AlkBh1 (Human)	Anti-ABH1 Antikörper [EPR6176]	IF (1:100); WB (1:500)	ab126596	Abcam
AlkBh1 (Human)	Anti-ABH1 antibody [hABH1-151]	IF (1:100); WB (1:500)	ab49738	Abcam
AlkBh7	AlkBh7_38, 12D10	IF und WB (unverdünnt)	Dr. Elisabeth Kremmer	Helmholtz intern
AlkBh7	AlkBh7_34, 11E2	IF und WB (unverdünnt)	Dr. Elisabeth Kremmer	Helmholtz intern
AlkBh7 (Human)	anti AlkBH7 Antikörper	IF (1:100), WB (1:200)	ab122596	Abcam
AlkBh7(D-19)	AlkBh7	kein Signal in IF und WB	sc-244895	Santa cruz
AlkBh7	AlkBh7	IF (1:100) WB (1:1000)	#15093	Cell signal
AlkBh7_KI (Maus)	AlkBh7	IF (1:100), WB (1:200)	Prof. Dr. Arne Klungland	Oslo University Hospital
ATAD3A	ATAD3A_FLJ4D5	IF (1:10), Blot (1:100)	Dr. Elisabeth Kremmer	Helmholtz intern
Flag	M2 anti-Flag Antikörper	IF (1:100); WB (1:500)	F1804-200UG	Sigma
FTO (Human)	Anti-FTO antibody	WB (1:200); IF kein Signal	ab126605	Abcam
GFP	anti-GFP (blot)	WB (1:500)	11814460001	Roche
H2AX	H2AX	IF (1:2000 in	05-636	Millipore

		BSA)		
HIF (Human)	Anti-HIF1 alpha Antikörper	IF (1:100 in BSA)	Ab16066	Abcam
HSP-60 (Human)	anti-Hsp60 Antikörper	IF (1:200 in BSA); WB (1:500)	ab46798	Abcam
FASTKD2	(Rabbit)	IF 1:100	17464-1-AP	Proteintech
LC3B	LC3B (Rabbit)	IF (1:200 in BSA)	L7543	Sigma
mtDNA / DNA (Human)	Double- and single-stranded DNA mtDNA	IF (1:15)	61014 / AC-30-10	Progen
OxPhos	Anit-Complex I-V	WB (1:500)	45-8099	Thermo fisher
P53 (Human)	p53 (1C12) Mouse mAb	IF (1:100 in BSA), WB (1:200)	2524 S	NEB
P62	P62 SQSTM1 (Maus)	IF (1:100 und 1:200 in BSA)	sc-28359	Santa cruz
p62	P62 (Hase)	IF (1:200 in BSA)		Sigma
SSBP	SSBP (Hase)	IF (1:200 oder 1:300); WB (1:1000)	Robert Kopajtich	Helmholtz intern
TFAM (Human)	mtTFA antibody [18G102B2E11]	IF (1:200 in BSA)	ab119684-100ug	Abcam

Zweitantikörper

Tabelle 6-7 Überblick über die verwendeten Zweitantikörper

Spezies	Bezeichnung	Verwendung	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Hase - 350	Alexa Fluor 350 Ziege Anti-Hase IgG	IF (1:500) Filter DAPI	A11046	Life Technologies
Hase - 488	Alexa Fluor(R) 488 Esel anti Hase IgG	IF (1:500) Filter GFP	A21206	Life Technologies
Hase - 594	Alexa Fluor(R) 594 Esel anti Hase IgG	IF (1:500) Filter RFP	A21207	Life Technologies
Hase - 647	Alexa Fluor Esel anti Hase 647	IF (1:500) Filter Cy5	A31573	Life Technologies

Hase – HPR	Esel anti Hase IgG (H+L) HRPO	WB (1:500)	711-035-152	Life Technologies
Maus - 488	Alexa Fluor(R) 488 Huhn anti Maus IgG	IF (1:500) Filter GFP	A21200	Life Technologies
Maus - 594	Alexa Fluor(R) 594 Hase anti Maus IgG	IF (1:500) Filter RFP	A11062	Life Technologies
Maus - 647	Alexa Fluor 647 Ziege Anti-Maus IgG	IF (1:500) Filter Cy5	A21235	Life Technologies
Maus – HPR	Esel anti Maus IgG (H+L) HRPO	WB (1:500)	715-035-150	Dianova
Ratte - 488	Alexa Fluor 488 Esel anti Ratte IgG	IF (1:500) Filter GFP	A21208	Life Technologies
Ratte - 594	Alexa Fluor 594 Ziege anti-Ratte IgG	IF (1:500) Filter RFP	ab150160	Abcam
Ratte - 647	Alexa Fluor 647 Ziege anti Ratte IgM	IF (1:500) Filter Cy5	A21248	Life Technologies
Ratte - R2c	Ratte - R2c HRP	WB (1:500)	Elisabeth Kremmer	Helmholtz Zentrum
Ratte - R2a	Ratte -R2a HRP	WB (1:500)	Elisabeth Kremmer	Helmholtz Zentrum
Ratte - HRP	Ziege anti Ratte IgG-HRP	WB (1:500)	sc-2032	Santa cruz
Ziege - 594	Alexa Fluor 594 Huhn anti-Ziege IgG	IF (1:500) Filter RFP	A21468	Life Technologies
Ziege-HPR	Kaninchen anti-Ziege IgG	WB (1:500)	305-035-045	Dianova

6.1.7 Sonstige verwendete Materialien

Tabelle 6-8 Überblick über die allgemein verwendeten Materialien

Sonstige verwendete Materialien	Verwendung	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
96 Well Platten, transparent, Flachboden, steril, mit Deckel	MT, PT	167008	Thermo Fisher
96-Well Platte (Zellabweisend)	3D	650970	Greiner
Amicon Ultra Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit 15ml 100K NMWL	KRS	UFC910024	Neolab
Cryo-tube 1,8ml	ZK	375418	Thermo scientific
Deckgläser, rund	IF	P233.1	Roth
Einmalpipetten Falcon 10 ml	Allgemein	356551	BD Falcon
Einmalpipetten Falcon 5 ml	Allgemein	356543	BD Falcon

Einmalspritze	KRS	4606728V	Braun
Einweg-Pasteurpipetten	3D	EA66.1	Roth
Entwicklerfilme GE 18x24 cm	WB	GE 28-9068-37	GE Lifesciences
Gene Pulser/MicroPulser Küvetten, 0.2 cm	BK	165-2086	Biorad
Handschuhe-Nitril Purple M puderfrei	Sicherheit	52002M	Kimtech
Impföse Flexibel 10µl,	BK	612-9357	VWR
Kapillarspitzen, 200µl 0.31mm	SDS, 3D	729015	Biozym
Marker II rot	Allgemein	5050612	Schubert & Weiss
Marker II schwarz	Allgemein	5050611	Schubert & Weiss
Neubauer Zählkammer	ZK	T729.1	Roth
Nitrozulosemembran 0.45 Nc,300mmx4m Rolle,0.45µm Porengröße	WB	AM/10600003/000001	Th. Geyer
Objektträger mit mattrand 76X26	IF	HECHT 2407/1	Hecht
Objektträgerkästen gelb	IF	K535.1	Roth
PARAFILM M 10 CM BREIT	Allgemein	HS234526C	Lab Logistics Group
PCR-Tubes 0,2ml	Allgemein	AB – 0620	Thermo scientific
Petrischalen für Agarplatten 94x16mm	BK	633180	Greiner
Pinzette Präzisionspinzette	IF	LH81.1	Roth
PP-ROEHRE 15ML FALCON	Allgemein	352096	BD Falcon
PP-Röhre 50ml FALCON	Allgemein	352070	BD Falcon
Safe-Lock Tubes 1,5ml farblos	Allgemein	0030 120.086	Eppendorf
Safe-Lock Tubes 2,0ml farblos	Allgemein	0030 120.094	Eppendorf
Serologische Pipette 25 ml	ZK	734-0307	VWR
Spritzenfilter 0,45µm	KRS	SLHV033RS	Millipore

Whatman 3mm CHR, Rolle 10cm	WB	5028510	Schubert & Weiss
Zellkulturflaschen 275 ml 75cm ²	ZK	353136	BD Falcon
Zellkulturflaschen 50 ml 25cm ²	ZK	353109	BD Falcon
Zellkulturflaschen 750 ml 175cm ²	ZK	353112	BD Falcon
Zellkulturplatten 12 well, steril	IF, KRS	5380011	Schubert & Weiss
Zellkulturplatten 6 well, steril	IF, KRS	5380009	Schubert & Weiss
Zellkulturschalen 100X20MM	ZK, KRS	353005	BD Falcon
Zellkulturschalen 60x15 mm	ZK, 3D	150288	Thermo scientific
Zellschaber 25cm Klinge 17MM	ZK	831.830	Sarstedt

6.1.8 Verwendete Geräte

Tabelle 6-9 Geräteliste

Geräte	Methode	Verwendung
Autoklav Systec VX-95	Abfall vernichten, Sterilisieren	Allgemein
BioTek Synergy 2	Neutralrotaufnahmetest auslesen	MT
Blot Systeme	Blotten von Proteine auf Membran	WB
BRADY BBP11	Etikettendrucker	ZK
Brutschrank	Binder CB210	ZK
Delta Vision OMX	Hochauflösende Bilder	IF, 3D
DNA Gel Systeme	Proteinauftrennung	SDS
ECL Chomcam Imager	Chemilumineszenzgerät, Auslesen von Western Blots	WB
Entwicklermaschine	Auslese der Western Blots	WB
Evos FL	Fluoreszenzmikroskop	IF, 3D
FACS Attune	Durchflusszytrometer; Messen der GFP bzw. RFP anteiligen Zellen	KRS
FACS BD LSR II	Bestimmung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen, Vitalität der Zellen	Allgemein

Hypoxiekammer Invivo 300	Vergleich Normoxie mit Hypoxie	ZK, IF, 3D
Intas Science imaging	Auslesen der Agarosegele	Agarosegel
Leica DM 6000 CS	Konfokales Mikroskop	IF, 3D
Mikropulser	Transformation	BK
Nanodrop 2000 Spektrophotometer	Bestimmung von DNA und Proteinkonzentrationen	BK, Mitos, PD,
Operetta	Bestimmung der Wachstumsrate über Zählzählung	PT
Pipettierhilfe	AccuJet pro	Allgemein
Pump 11 Elite	Isolierung von Mitochondrien	PD, Mitos isolieren
S1000 Thermo Cycler	PCR	PCR
Schüttler	Klonierung, Maxi, Minipreps	BK
SDS Gel System	Auftrennen von Proteinen	Allgemein
Vi-Cell XR	Zellzahlbestimmungsgerät	ZK, 3D
VortexGenie		Allgemein
Wasserbad	Transformation, ZK	BK, ZK
Zeiss Imager. Z1	Fluoreszenzmikroskop	IF, 3D
Zellkulturbank Mars	Bearbeitung von Zell- und Bakterienkultur	ZK, BK
Zentrifuge Avanti J-26S XP	Sedimentieren von Zellen, Bakterien oder Virus	BK, ZK, KRS, Mitos
Zentrifugen	Sedimentieren von Zellen, Bakterien oder Virus	BK, ZK, KRS, Mitos

6.1.9 Programme, Software und Webseiten

Tabelle 6-10 Überblick über die verwendeten Programme

Programm	Verwendung	Methode
ApE	Nukleotidsequenzen verbinden, Primer designen	Allgemein
Attune Cytometric Software	Bestimmung der Virusinfektionsrate	KRS
Axiovision 4.0	Fluoreszenzmikroskop (Patho)	IF, 3D

DIVA	Programm zur FACS Analyse	FACS
FlowJo	Auswerten von FACS Daten	IF, 3D
Gen 1.11	Neutralrotaufnahmetest auslesen	MT
ImageJ	Auswertung Bilderstacks	IF, 3D
INTAS Chemostar	Auslesen und Auswerten von Western Blots	WB
INTAS GDS	Auslesen und Auswerten von Agarosegelen	Allgemien
LabelMark 6	Etikettendrucker	ZK
Las af TCS SPS	Konfokales Mikroskop (LMU)	IF, 3D
Nanodrop 2000/2000	Bestimmung DNA und Proteinkonzentrationen	Allgemien
Photoshop	Auswertung Bilder von unterschiedlichen Mikroskopen	IF, 3D
Scaffold	Auswertung Daten Massenspektrometrie	PD
Vi-Cell XR 2.0	Zellzählung	ZK, 3D
Genologigs GLS	Proben für MS anmelden	PD

Tabelle 6-11: Überblick über die verwendeten Webseiten

Webseiten	Verwendung
http://web.expasy.org/translate/	Verlinken von Protein- mit Nukleotidesequenzen
http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2	Abgleich von Proteinsequenzen unter unterschiedlichen Organismen
http://www.ensembl.org	Blasten nach verschiedenen Homologen für diverse Proteine; Erstellen eines Stammbaum
http://www.proteinatlas.org/ENSG00000100601-ALKBH1/tissue	Bestimmung der Proteinanteile im Gewebe und auf RNA ebene
http://www.proteinatlas.org/ENSG00000125652-ALKBH7/tissue	Bestimmung der Proteinanteile im Gewebe und auf RNA ebene
http://www.uniprot.org/	Proteincharakterisierung, Abgleich von Proteinsequenzen
http://www.broadinstitute.org/rnai/public/gene/search	Designen der shRNA Sequenzen für den Knockdown für unterschiedliche Gene

6.1.10 Plasmide und Vektoren

Tabelle 6-12 Überblick über die bereits verfügbaren Plasmide:

Gen	Spezies	Vektor	Expression in	Herkunft
AlkBh1	Human	pcDNA3	Humane Zelllinien	Alex Wolf
AlkBh1	Human	pEGFP-C1	Humane Zelllinien	Alex Drong
AlkBh1	Human	pEGFP-N1	Humane Zelllinien	Alex Drong
AlkBh7	Human	pcDNA3	Humane Zelllinien	Alex Wolf
AlkBh7	Human	pEGFP-C1	Humane Zelllinien	Alex Drong
AlkBh7	Human	pEGFP-N1	Humane Zelllinien	Alex Drong
ATAD3A	Human	pcDNA5/FRT	Humane Zelllinien	Ian Holt, Helen Cooper
ATAD3B	Human	pcDNA5/FRT	Humane Zelllinien	Ian Holt, Helen Cooper
KRABred T2A	Human	pLVTHM	Humane Zelllinien	Michelle Vincendeau
Leer	Human	pEGFP-C1	Humane Zelllinien	Clontech
Mito-Cherry	Human	pEGFP-N3	Humane Zelllinien	K. Müller-Rischart
Mito-GFP	Human	pcDNA3	Humane Zelllinien	K. Müller-Rischart
nsshRNA	Human	pLVTHM	Humane Zelllinien	Michelle Vincendeau

Tabelle 6-13: Überblick über die neu angefertigten Plasmide:

Gen	Spezies	Vektor	Funktion	Expression in
AlkBh1	Human	L4440	Transfektion	C. elegans
AlkBh1_5017	Human	pLVTHM	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh1_5020	Human	pLVTHM	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh1_7996	Human	pLVTHM	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh1_CD2	Human	pLVTHM_T2A_CD2	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh1_GFP	Human	pLVTHM_GFP	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh7	Human	L4440	Transfektion	C. elegans

AlkBh7_2763	Human	pLVTHM	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh7_2764	Human	pLVTHM	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh7_9385	Human	pLVTHM	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh7_CD2	Human	pLVTHM_T2A_CD2	Virusinfektion	Humane Zelllinien
AlkBh7_Flag	Human	pCMV-Tag2 oder 4	Transfektion	Humane Zelllinien
AlkBh7_GFP	Human	pLVTHM_GFP	Virusinfektion	Humane Zelllinien
Mito-GFP	Human	pLVTHM_T2A_CD2	Virusinfektion	Humane Zelllinien

6.1.11 Zelllinien

Tabelle 6-14 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Herkunft	Charakterisierung	Quelle
A549	Human	Lungen	Karzinom	Helmholtz Zentrum
HEK293	Human	embryonale Nierenzellen	Epithelial	ATCC
HEK293T	Human	embryonale Nierenzellen	Epithelial	Helmholtz Zentrum
HeLa	Human	Zervix	Karzinom	ATCC
HT29	Human	Darm	Karzinom	Helmholtz Zentrum
Panc-1	Human	Bauchspeicheldrüse	Karzinom	Helmholtz Zentrum
PC3	Human	Prostata	Karzinom	Helmholtz Zentrum

6.1.12 Bakterien- und Phagenstämme

Tabelle 6-15 Verwendete Bakterienstämme

Bakterien	Spezies	Verwendung	Quelle
BL21	Escherichia coli	Bakterienexpression	Agilent
STBL3	Escherichia coli	Bakterienexpression	Life technologies
TOP10	Escherichia coli	Bakterienexpression	Life technologies
XL1 blue	Escherichia coli	Bakterienexpression	Agilent

6.1.13 Primer

Alle hier aufgeführten Primer wurden bei der Firma Eurofins Genomics bestellt.

Tabelle 6-16 Primer für Knockdown in *C. elegans*

Protein	für Vektor	Sequenz	Enzyme	Stopcodon
AlkBh1 + Enzym 3'	L4440	ATGGTACCCAAATTCGTGATATTCGGTGGTTC	Kpn I-HF	nein
AlkBh7 + Enzym 3'	L4440	GCGGTACCATATAAACTTCTTCTAGGCATCAG	Kpn I-HF	nein
AlkBh1 + Enzym 5'	L4440	ATAGAGCTCATGTTATTGAGCATTCTGGAAG	Sac I-HF	5'
AlkBh7 + Enzym 5'	L4440	AGAGCTCATGAAAATTACACCGAGAACTCTGC	Sac I-HF	5'

Tabelle 6-17 Primer für ungetaggte Überexpression in humanen Zellen

Protein	für Vektor	Sequenz	Enzyme	Stopcodon
AlkBh1 + Enzym 3'	pcDNA3	ccggaattcTCAGCTGTCAGGGTTTATCCTG	EcoRI-HF	ja
AlkBh7 + Enzym 3'	pcDNA3	ccggaattcTCAGCAGGCTGGGGGCGG	EcoRI-HF	ja
AlkBh1 + Enzym 5'	pcDNA3	cgggggtaccATGGGGAAGATGGCAGC	Kpn I-HF	5'
AlkBh7 + Enzym 5'	pcDNA3	cgggggtaccATGGCCGGGACTGGGCTG	Kpn I-HF	5'

Tabelle 6-18 Primer für flaggetaggte (C-Terminal) Überexpression in humanen Zellen

Protein	für Vektor	Sequenz	Enzyme	Stopcodon
AlkBh7 + Enzym 5'	pcDNA5_FRT	gggggtaccATGGCCGGGACTGGGCTG	KpnI-HF	5'
AlkBh7 + Enzym 3'	pcDNA5_FRT	ctcgagGCAGGCTGGGGGCGG	Xho-I	Nein

Tabelle 6-19 Primer für stabile induzierbare Überexpression in humanen Zellen

Protein	für Vektor	Sequenz	Enzyme	Stopcodon
AlkBh1 + Enzym 3'	pLVTHM	CGGACTAGTGCTGTCAGGGTTTATCCTG	SpeI-HF	ja
AlkBh1 + Enzym 5'	pLVTHM	AGCTTTGTTTAAACATGGGGAAGATGGC	PmeI	5'

AlkBh7 + Enzym 3'	pLVTHM	CGGACTAGTGCAGGCTGGGGGCGGCTGTC	Spel-HF	ja
AlkBh7 + Enzym 5'	pLVTHM	AGCTTTGTTTAAACATGGCCGGGACTGGG	PmeI	5'
Mito-GFP + Enzym 5'	pLVTHM	AGCTTTGTTTAAACATGCTGTCTAATTTG	Pme I	5'
Mito-GFP + Enzym 3'	pLVTHM	CGGACTAGTCTTGTACAGCTCGTCCAT	Spel-HF	ja

Tabelle 6-20 Primer zum sequenzieren von verwendeten Proteinen

Protein	für Vektor	Sequenz	Verwendung
AlkBh1/AlkBh7	pcDNA3_for	GGC TAA CTA GAG AAC CCA CTG	für Sequenzierung
AlkBh1/AlkBh7	pcDNA3_rev	GGC AAC TAG AAG GCA CAG TC	für Sequenzierung
AlkBh1/AlkBh7	pEGFPC1for	GAT CAC TCT CGG CAT GGA C	für Sequenzierung
AlkBh1/AlkBh7	pEGFPC1rev	CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GG	für Sequenzierung
AlkBh1/AlkBh7	pEGFPN1for	GTC GTA ACA ACT CCG CCC	für Sequenzierung
AlkBh1/AlkBh7	pEGFPN1rev	GTC CAG CTC GAC CAG GAT G	für Sequenzierung
AlkBh7-Flag	CMVfor	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG	für Sequenzierung
ATAD3A ATAD3B	/ CMVfor	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG	für Sequenzierung
ATAD3A ATAD3B	/ pCR3.1-BGHrev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	für Sequenzierung
ATAD3A Mitte	pcDNA5_FRT	GTCAGACCGTCTTGGAGTC	für Sequenzierung
ATAD3B Mitte	pcDNA5_FRT	ACCGTCTTGGAGTCCATCAG	für Sequenzierung
EF-1a	pLVTHM_Überexpression	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC	für Sequenzierung
H1	pLVTHM_Knockdown	TCGCTATGTGTTCTGGGAAA	für

			Sequenzierung
Mito-GFP/Cherry	CMVfor	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG	für Sequenzierung
mtDNA_5_for	mt Genom R1234	CTCACCACCTCTTGCTCAGC	für Sequenzierung
mtDNA_5_rev	mt Genom R1769	GCCAGGTTTCAATTTCTATCG	für Sequenzierung

6.2 Lösungen und Puffer

6.2.1 Minipräparation

Lösung I

Glucose (50mM)	4,95g
1M TrisCl pH8,0 (25mM)	25,00ml
0.5M EDTA pH8.0 (10mM)	10,00ml
→ ad ddH ₂ O	500,00ml
→ autoklavieren	
→ Lagerung: 4°C	

Lösung II

10N NaOH (200mM)	0,040ml
10% SDS (1% (W/V))	0,200ml
→ ad ddH ₂ O	
→ immer	2,000ml
frisch herstellen	

Lösung III

Kaliumacetat (2.55M)	62,57g
→ Check pH 4.8	~20,00ml
(mit Essigsäure einstellen)	
→ ad ddH ₂ O	250,0ml

ddH₂O + RNase

RNase	0,001ml
ad ddH ₂ O	2,000ml

1M Tris Puffer

Tris	60,55g
ddH ₂ O	400,00ml
→ Check pH 8.0	
(mit HCl einstellen)	
→ ad ddH ₂ O	500,00ml

6.2.2 Polyacrylamid (SDS)-Gelelektrophorese und Western Blot

Trenngel 12% reicht für 4 Gele

30 % Acrylamid	8,160ml
1.5M Tris-HCL pH 8.8	5,000ml
ddH ₂ O	6,280ml
10% SDS-Lösung	0,200ml
APS Stocklösung	0,200ml
TEMED	0,020ml
Gesamtvolumen	19,860ml

Sammelgel 3%

30 % Acrylamid	1,000ml
0.5M Tris-HCL pH 6.8	2,500ml
ddH ₂ O	6,280ml
10% SDS-Lösung	0,100ml
APS Stocklösung	0,100ml
TEMED	0,010ml
Gesamtvolumen	9,990ml

4x Laemmli Puffer

4x Laemmli Puffer (LP)	1,8ml
2-Mercaptoethanol	0,9ml
Gesamtvolumen	2,0ml

2x Ladepuffer (LP)

4xLP Stock	1,0ml
ddH ₂ O	1,0ml
Gesamtvolumen	2,0ml

1x Ladepuffer (LP)

2xLP Stock	1,0ml
ddH ₂ O	1,0ml
Gesamtvolumen	2,000ml

0.5M Tris-Puffer pH 6.8

Tris (0.5M)	12,0g
SDS (0,4% (W/V))	0,8g
ddH2O	150,0ml
→ Check pH 6.8	
→ ad ddH2O	200,0ml

1.5M Tris-Puffer pH 8.8

Tris (1.5M)	91,0g
SDS (0,4% (W/V))	2,0g
ddH2O	400,0ml
→ Check pH 8.8	
→ ad ddH2O	500,0ml

10% SDS-Lösung

SDS Pulver	10,0g
ad ddH2O	100,0ml
Gesamtvolumen	100,0ml

APS Stocklösung

APS Pulver	1,0g
ad ddH2O	10,0ml
Gesamtvolumen	10,0ml

10x Elektrophorese Puffer

Tris (250mM)	60,0g
Glycin (1.9M)	288,2g
SDS (1% (W/V))	20,0g
ddH2O	1800,0ml
→ Check pH 8.3 (nicht mit HCl einstellen)	
→ ad ddH2O	2000,0ml

10x Blot Puffer

Tris (250mM)	60,0g
Glycin (1.9M)	288,0g
→ ad ddH2O 2000,0ml	

1x Blot Puffer

10x Blot Puffer	200,0ml
→ ad ddH2O	2000,0ml

1x SDS Elektrophorese Puffer

10x Elektrophorese Puffer	200,0ml
→ ad ddH2O	2000,0ml

10x TBST Puffer

Tris (200mM)	48,4g
NaCl (1.4M)	136,6g
Tween 20 (1% (V/V))	20,0ml
ddH2O	1800,0ml
→ Check pH 7.6 (mit HCl einstellen)	
→ ad ddH2O	2000,0ml

10x TBS Puffer

Tris (250mM)	60,0g
NaCl (1.4M)	163,6g
KCl (27mM)	4,0g
→ Check pH 7.4 (mit HCl einstellen)	
→ ad ddH2O	2000,0ml

5% Blocklösung für Blots

Milchpulver (5% (W/V))	5g
→ ad 1xTBST	100,0ml

3% Blocklösung für Blots

BSA (3% (W/V))	3g
→ ad 1xTBST	100,0ml

6.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

50x TAE Puffer

Tris (2M)	242,0g
Essigsäure	57,1ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	20,0ml
→ ad ddH2O	1000,0ml

0.5M EDTA Lösung (pH 8.0)

EDTA (0.5M)	93,06g
→ Check pH 8.0	163,6g
(mit NaOH 5M einstellen)	4,0g
→ ad ddH2O	500,0ml

1% Agarose

Agarose (5% (W/V))	0,7g
→ ad 1xTAE Puffer	70,000ml
→ HDGreen Plus	0,007ml

1x TAE Puffer

50x TAE	20,0ml
→ ad ddH2O	1000,0ml

6.2.4 Bakterien

<u>Ampicillin – Lösung (100mg/ml)</u>		<u>Kanamycin – Lösung (50mg/ml)</u>		<u>10% Glycerin</u>	
Ampicillin	1,00g	Kanamycin	0,50mg	Glycerin	5,00ml
→ ad ddH ₂ O	10,00ml	→ ad ddH ₂ O	10,00ml	→ ad ddH ₂ O	50,00ml
→ Steril filtriert		→ Steril filtriert		→ Steril filtriert	
→ Aliquotiert (Lagerung: -20°C)		→ Aliquotiert (Lagerung: -20°C)		→ (Lagerung: RT))	
<u>LB-Medium</u>		<u>LB-Agar</u>			
LB-Pulver	20,0g	LB-Pulver	5,000g		
→ ad ddH ₂ O	1000,0ml	Agar-Agar	3,750g		
→ Autoklavieren		Antibiotika (Ampicillin	0,250ml		
→ (Lagerung: 4°C)		100mg/ml oder	250,000ml		
		Kanamycin 50mg/ml)			
		→ ad ddH ₂ O;			
		→ Autoklavieren			
		→ (Lagerung: 4°C)			

6.2.5 Zellkultur, Immunfluoreszenz, Proliferationstest und 3D

<u>Permeabilisierungslösung</u>		<u>Waschlösung</u>		<u>1x Trypsin/EDTA</u>	
Triton (1%)	0,5ml	BSA	1,000g	10xTrypsin/EDTA	5,0ml
PBS	49,5ml	Tween 20 (0,2%)	0,200ml	Reinstwasser	45,0ml
→ Gesamtvolumen	50,0ml	PBS	99,800ml	→ Gesamtvolumen	50,0ml
		→ Gesamtvolumen	100,00ml		
<u>3% Blocklösung für IF</u>		<u>Blocklösung für IF (FKS)</u>		<u>Zellkulturvollmedium (10%FKS, 1% Penstrep)</u>	
BSA (3% (W/V))	3g	FKS (10%)	10,000ml	DMEM/RPMI	500,0ml
→ ad 1xTBST	100,0ml	Tween 20 (0,2%)	0,200ml	100%FKS	50,0ml
		PBS	89,800ml	Penstrep	5,5ml
		→ Gesamtvolumen	100,00ml	→ Gesamtvolumen	555,5ml
<u>DAPI Stocklösung (1mg/ml)</u>		<u>DAPI Arbeitslösung</u>		<u>Höchst 33342 Arbeitslösung</u>	
DAPI	0,010g	DAPI (1mg/ml)	0,025ml	Höchst 10mg/ml	0,001ml
→ ad ddH ₂ O	10,0ml	PBS	24,975ml	PBS	9,999ml
		→ Gesamtvolumen	25,000ml	→ Gesamtvolumen	10,000ml
<u>Doxycyclin Arbeitslösung 250ng/µl</u>		<u>Doxycyclin Stocklösung</u>		<u>Beschichtungspuffer</u>	
Doxycyclin 10mg/ml	1,25µl	Doxycyclin	10,0mg	Poly-D-lysine	5,0mg
Zellkulturmedium	50,00ml	ddH ₂ O	1,0ml	Hydrobromide	
				ddH ₂ O (steril)	100,0ml
				→ 10ml Aliquots	
				→ Bei -20° lagern	

6.2.6 Metabolismusassay

TTFA-Lösung 4,5mM	Neutralrot	Neutralrot-Anwendungslösung
TTFA 1mg ad DMEM 1,0ml (+10%FKS, 1% Penstrep)	Neutralrot 4,0mg ad PBS 1,0ml	Neutralrotlösung 0,600ml DMEM Phenolfrei 60,0ml (2%FKS, 1% Penstrep) (1:100 Lösung)
TTFA-Lösung 450µM	→ Zentrifugation für 5 Min, 800g, RT → Sedimentation der Kristalle → Stören bei Auslesen	Entfärber
TTFA 1mg ad DMEM 10,0ml (+10%FKS, 1% Penstrep)		Ethanol 480,0ml Essigsäure 510,0ml ddH2O 10,0ml Gesamtvolumen 1.000,0ml
→ Sehr schwer zu lösen, bei 60°C für 30 Minuten inkubieren		

6.2.7 Mitochondrienisolierung

Mitochondrialer Isolierungspuffer (MIP)	Mitochondrialer Isolierungspuffer wurde von der AG Zischka, Helmholtz Zentrum fertig zur Verfügung gestellt
Sucrose (300mM) 102,800g TES (5mM) 1,146g EGTA (0.2mM) 0,076g ddH2O 900,0ml	
→ Check pH 7.2 (mit ca.500µl KOH (5M) einstellen Ad ddH2O 1.000,0ml	

6.2.8 Proteincharakterisierung und Immunpräzipitation

CE Lysepuffer	1M NaCl	1M Tris-HCl pH8
Cell Extraction Puffer 10,0ml Complete mini, protease inhibitor cocktail 1Stück Endvolumen 10,0ml → Alle Schritte auf Eis → Lösen und 1ml Aliquots herstellen → Lagerung -20°C → Auf Eis auftauen und verwenden	NaCl 29,22g → ad ddH2O 500,00ml	Tris 60,5g ddH2O 400,0ml → Check pH 8,0 (mit HCl einstellen) → ad ddH2O 500,0ml

Lysepuffer für AK-IP, GFP-IP	Waschpuffer 1	Waschpuffer 2
NaCl (300mM) 75,0µl Tris-HCl pH 8 (10mM) 5,0µl NP40 (0,5%) 2,5µl Protease Inhibitor 5,0µl Protease Inhibitor II 5,0µl Protease Inhibitor III 5,0µl ad ddH2O 500,0µl	NaCl (150mM) 15,0ml Tris-HCl pH 8 (10mM) 1,0ml ad ddH2O 100,0ml	NaCl (300mM) 33,3ml Tris-HCl pH 8 (10mM) 1,0ml ad ddH2O 100,0ml

6.3 Molekularbiologische Standardmethoden

6.3.1 Primer erstellen

Um ein Protein mittels PCR zu amplifizieren oder eine Aminosäuresequenz eines Gens zu überprüfen, musste man spezifische Primer erstellen. Die Primer dieser Arbeit wurden mit dem Programm „ApE“ erstellt und bei der Firma Eurofins Genomics bestellt.

Bei der Anfertigung der Primer wurde darauf geachtet, dass sie eine Gesamtlänge von 18-30 Basen haben. In dieser Länge sind auch, bei Bedarf, die Restriktionsschnittstellen mit eingefügt.

Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass der Anteil von Guanidin (G) und Cytosin (C) im Bereich von 40-60% und die Schmelztemperatur im Bereich von 55-80°C lag. Daraus wurde die beste Annealingtemperatur errechnet, um die Effizienz der PCR zu verbessern. Die gelieferten Primer wurden nach Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst und in einer Verdünnung von 1:10 verwendet.

6.3.2 Standard-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Um eine Standard-PCR durchführen zu können, wurden folgende Mittel verwendet:

PCR-Ansatz mit der Verwendung des Phusion PCR Mastermixes:

PCR Reaktionsmix		PCR Reaktionsmix	
Ausgangs-DNA (Template)	1,0µl	Ausgangs-DNA (Template)	1,5µl
5`Vorwärtsprimer (10pmol/µl)	1,0µl	5`Vorwärtsprimer (10pmol/µl)	1,0µl
3`Rückwärtsprimer (10pmol/µl)	1,0µl	3`Rückwärtsprimer (10pmol/µl)	1,0µl
Phusion PCR Master Mix	10,0µl	Phusion PCR Master Mix	25,0µl
→ ad ddH ₂ O	20µl	→ ad ddH ₂ O	50µl

Tabelle 6-21 Programmierung einer PCR

Einzelne Schritte in der PCR	Temperatur	Zeit	Zyklen
Erste Denaturierung → Trennung der beiden DNA Stränge	95°C	5 Minuten	1x
Weitere Denaturierung	95°C	1 Minute	25x bis 35x → Anzahl hängt von der Länge der Sequenz ab
Annealingtemperatur →Hybridisierung der Primer an die DNA	~60°C → Genaue Temperatur hängt von der errechneten Schmelz- temperatur an	1 Minute	
Elongationsschritt → dient der Verlängerung des Primers, bis die DNA wieder komplett doppelsträngig vorhanden ist	72°C	~1 Minute Genaue Zeit hängt von der Länge der amplifizierten Sequenz ab	
Elongationsschritt → Alle DNA- Stränge sollten fertiggestellt werden	72°C	10 Minuten	1x
Kühlen des Reaktionsmix	4°C	Endlosschleife	

6.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um DNA-Fragmente voneinander zu trennen, wurde ein 1% Agarose-Gel gegossen und laufen gelassen. Dazu wurde 0,7g Agarose abgewogen, in 70ml 1XTAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle für ca. 1,5 Minuten bei hoher Stufe gelöst. Dann wurde die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt und 7µl HDGreen Plus DNA Stain dazugegeben. Bevor das Gel wieder fest werden konnte, wurde es in einen vorher vorbereiteten Gelschlitten gegossen, die Anzahl der Taschen waren variabel und konnten mithilfe eines geeignet Kammes immer auf den jeweiligen Versuch angepasst werden.

Das erstarrte Gel wurde in eine Kammer mit Elektrophoresepuffer gegeben und die DNA-Lösung, die vorher mit einem 6x Ladepuffer versehen worden war, wurde in die Taschen geladen. Zur Bestimmung der Bandengröße der aufgetragenen DNA wurde zusätzlich 5µl eines DNA-Größenmarkers (GeneRuler DNA Ladder Mix) aufgetragen. Das Gel wurde bei 80V für ca. 45 Minuten laufen gelassen und schließlich am UV-Tisch ausgewertet und dokumentiert.

6.3.4 Gelextraktion

Wenn die aufgetrennte DNA weiter verarbeitet werden sollte, wurde die Zielbande mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß gegeben. Die DNA in diesem Gelstück wurde dann nach dem Protokoll des Gel-Extraktionskits (NUCLEOSPIN) von Macherey Nagel verarbeitet und mit zum Schluss mit 30µl ddH₂O eluiert.

6.3.5 Klonierung

Für ein neues Konstrukt wurden Primer erstellt (siehe 6.3.1), eine PCR (siehe 6.3.2) damit durchgeführt, das PCR-Produkt wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und ausgeschnitten (siehe 6.3.4), dann wurde das Gelstück mit der gewünschten DNA eluiert und nach folgendem Protokoll verdaut.

<u>Verdau des PCR - Eluats</u>		<u>Verdau des Vektors</u>		<u>Dephosphorylierung des vektors</u>	
Ausgangs-DNA (PCR-Template)	30,0µl	Vektor-Plasmid (→ in den DNA kloniert werden soll; ca 0.5-1µg DNA)	~1,0µl	Vektor-Plasmid (→ aus Gel eluiert)	20,0µl
Restriktionsenzyme I	1,0µl	Restriktionsenzyme I	1,0µl	Alkaline phosphatase (CIP)	0,5µl
Restriktionsenzyme II	1,0µl	Restriktionsenzyme II	1,0µl	Cutsmart Puffer (10x)	2,5µl
Cutsmart Puffer (10x)	4,0µl	Cutsmart Puffer (10x)	2,0µl	→ ad ddH ₂ O	25,0µl
→ ad ddH ₂ O	40,0µl	→ ad ddH ₂ O	20,0µl		

Verdau wurde bei 37°C im Bakterienbrutschrank ausgeführt. Bei Bedarf wurde noch eine Hitzedeaktivierung nach Protokoll von NEB durchgeführt. Der ganze verdaute Vektor (20µl) wurde dann für eine Stunde dephosphoryliert und bei Bedarf hitzedeaktiviert. Diese Maßnahme sollte dazu führen, dass die Ligation problemlos ablaufen kann.

Danach wurde die Ligation aus den verdauten DNA-Plasmiden und dem dephosphorylierten Vektor in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander zusammen pipettiert. Die Ligation wurde eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Klonierung von den shRNA – Konstrukten in den pLVTHM Vektor wurde das Rapid-Ligation-Kit verwendet. Vor der Ligation wurden die shRNA „for“ und shRNA „rev“ mit einem *Annealing*-Puffer hybridisiert.

<u>Annealing-Puffer</u>	<u>Annealing / Hybridisierung</u>	<u>Durchführung der Hybridisierung:</u>
Kaliumacetat (100mM)	shRNA for	<u>Suspension zusammen pipettieren</u>
HEPES (30mM) pH7.4	shRNA rev	4 Minuten bei 95°C
Magnesiumacetat (2mM)	Annealing-Puffer	10 Minuten bei 70°C
		20-40 Minuten bei RT abkühlen lassen
→ Puffer und Protokoll	Gesamtvolumen	10 Minuten bei 4°C (Kühlschrank)
wurden von AG Krappmann		→ DNA-Konzentration bestimmen
gestellt		→ Ligation mit pLVTHM ansetzen

Der fertige Ligationsansatz konnte für die Transformation von Bakterien verwendet werden (siehe 6.4.1 und 6.4.2).

Tabelle 6-22 Pipettierschema für einen Ligationsansatz

Ligationsansätze	1:3	1:1	3:1
Vektor	1 Teil in µl	1 Teil in µl	3 Teile in µl
Insert	3 Teile in µl	1 Teil in µl	1Teil in µl
T4 – Ligase	1,0µl	1,0µl	1,0µl
T4 – Ligase Puffer	2,0µl	2,0µl	2,0µl
Ad ddH ₂ O	20,0µl	20,0µl	20,0µl

6.3.6 Präparation von Plasmid-DNA

Minipräparation

Es wurden einzelne Klone (siehe 6.4) von der LB-Platte mit transformierten Bakterienkulturen gepickt und in je 2ml LB-Medium + 2µl Ampicillin oder + 1µl Kanamycin (je nach Versuchsansatz) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Dann wurde die Übernachtskultur in ein 2ml Reaktionsgefäße überführt, bei 4°C, 12.000g für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Für die weiteren Schritte wurde entweder das Qiaprep Spin Miniprep Kit von Qiagen oder ein eigenes Protokoll verwendet, dass im Folgenden beschrieben wird. Zum trockenen Pellet wurde 100µl Lösung I dazugegeben und durch heftiges Vortexen resuspendiert. Auf die gelöste Suspension wurde 200µl frisch hergestellte Lösung II dazugegeben und 5x schnell invertiert. Dann wurde 150µl Lösung III dazugegeben und der Ansatz wurde kurz geschüttelt. Danach wurden die Ansätze für 3-5 Minuten auf Eis inkubiert, damit sich die DNA beim anschließenden Zentrifugationsschritt besser lösen konnte, und sich die SDS-Flocken gut pelletieren lassen. Dann wurde der Ansatz 5 Minuten bei 4°C und 12.000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde

in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900µl 100% EtOH (eisgekühlt) versehen, damit die DNA präzipitiert werden konnte. Das Gemisch wurde gut gevortext und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Ansatz wieder für 10 Minuten, bei 4°C bei 12.000 g zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Dann wurde der Überstand wiederum verworfen und es wurde nochmals 1000µl 70% EtOH (eisgekühlt) dazugegeben, um das DNA-Pellet zu waschen. Der Ansatz wurde wiederum zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wurde an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA in 50µl ddH₂O mit RNase versetzt, gelöst und bei –20°C aufbewahrt. Um sicherzugehen, dass man den richtigen Klon erhalten hat, wurde von den geprägten Klonen ein Testverdau mit den zugehörigen Restriktionsenzymen durchgeführt und zum Sequenzieren geschickt.

Maxipräparation

Die Maxi-Präparation wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen für QIAFiltermaxi plasmid kit durchgeführt. Die isolierte DNA wurde schließlich in 300µl ddH₂O gelöst. Bei mehreren gleichen Proben wurde ein Testverdau durchgeführt und zum Sequenzieren geschickt.

Testverdau für Mini- und Maxipräparation

<u>Verdau der Minipröp</u>		<u>Verdau der Maxipröp</u>	
Plasmid-DNA	2,0µl	Plasmid-DNA	2,0µl
Restriktionsenzyme I	1,0µl	Restriktionsenzyme I	1,0µl
Restriktionsenzyme II	1,0µl	Restriktionsenzyme II	1,0µl
Cutsmart Puffer (10x)	2,0µl	Cutsmart Puffer (10x)	2,0µl
→ ad ddH ₂ O	20,0µl	→ ad ddH ₂ O	20,0µl

Der Verdau wurde eine Stunde bei 37°C durchgeführt und wenn nötig hitzedeaktiviert.

6.3.7 Protein-, DNA und RNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen, DNA und RNA erfolgte mit dem Nanodrop. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm durchgeführt. Als Blankwert wurde für Proteine, DNA und RNA das entsprechende Lösungsmittel verwendet.

6.3.8 Protein-SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinproben werden SDS-Gele verwendet. Das Trenngel wurde bei 80V laufen gelassen, bis die Proben alle in gleicher Höhe im Sammelgel waren, dann wurde das Sammelgel bei einer Spannung von 160V für ca. 1h laufen gelassen. Während

dem Gellauf werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach dem die Proteine aufgetrennt worden sind, wird das Gel auf eine Membran geblottet.

6.3.9 Wet Western Blot

Für einen Blot benötigte man ein SDS-Gel, das man auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden vier Stück Filterpapier (Whatmanpapier) und eine Nitrozellulosemembran so zurechtgeschnitten, dass das Gel genau darauf passt, zusätzlich wurden noch zwei passende Schwämmchen verwendet. Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt und je 2 Filterpapiere und je 1 Schwämmchen auf jede Seite gegeben. Alle Bestandteile wurden vorher in 1xBlotpuffer getränkt und luftblasenfrei sandwichartig zusammengebaut und die dafür vorgesehene Halterung gegeben. Dann wurden die Halterung mit einem Kühlakku in die Laufkammer gestellt und sehr großzügig mit 1x Blotpuffer übergossen. Dieser Blot wurde dann für 2 Stunde bei 200 mA bzw. über Nacht bei 18mA geblottet.

Ponceau-Färbung:

Nach dem das Blotten des Gels auf die Nitrozellulosemembran abgeschlossen war, wurde die Membran für 5 Minuten mit Ponceau S Färbelösung gefärbt. Dies ist eine reversible Färbung und wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Transfer vom Gel auf die Membran stattgefunden hat. Die Ponceau S Färbung wurde dann mit Wasser wieder entfernt.

Blocken:

Anschließend wurde die Membran in 5% Magermilchpulver-TBST oder 3%BSA geblockt. Dieser Prozess wurde entweder über Nacht oder für 1-2 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Färbung mit Antikörper

Nach dem Blocken wurde die Membran mit spezifischen Erstantikörpern (1.AK) für eine Stunde inkubiert. Die Verdünnung des jeweiligen Erstantikörpers war sowohl von der Konzentration des Antikörpers als auch von dem Ausgangsprotein abhängig und musste für jedes Protein einzeln etabliert werden (siehe Tabelle 6-6). Der Antikörper wurde entweder in Blocklösung verdünnt oder direkt zur Inkubation auf die Membran pipettiert. Um unabhängig von der Raumtemperatur, gleichbleibende Ergebnisse zu erzielen, wurde die Inkubation des Antikörpers immer unter der gleichen Bedingungen auf Kühlpacks durchgeführt. Nach der

Inkubation mit dem 1.AK wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in 1xTBS-T gewaschen.

Nach dem Waschschrift wurde die Membran mit einem spezifischen Sekundärantikörper versehen und wiederum für eine Stunde unter gekühlten Bedingungen inkubiert. Der Zweitantikörper (2. AK) wurde wieder in Blocklösung verdünnt (siehe Tabelle 6-7).

Nach der Inkubation wurde die Membran wiederum zweimal für je 10 Minuten mit 1x TBS-T und zum Schluss für 10 Minuten in 1xTBS gewaschen.

Auswertung mit dem INTAS Chemocam Imaging

Nach dem letzten Waschschrift in TBS wurde der Blot mit dem ECL Reagenz für 1 Minute inkubiert und anschließend in eine lichtundurchlässige Kassette gegeben. Dieser Blot wurde dann an der Entwicklungsmaschine oder am Chemilumineszenzgerät von INTAS ausgelesen, verarbeitet und der Marker dokumentiert.

Densitometrie – Semi-quantitativ Western Blot Analyse

Die Densitometrie hilft dabei, einzelne Proteinbanden nach ihrer Intensität mittels der Computer gestützter Auswertung mit Hilfe des Programms ImageJ miteinander zu vergleichen. Mittels ImageJ wurden die einzelnen Western Blot Banden nach ihrer Bandenstärke gemessen und mit den Banden der Vergleichsproteine abgeglichen. Dann wurden die Werte der Intensitäten miteinander ins Verhältnis gesetzt. Dabei zeigt die Zahl 1 die gleiche Intensität der verglichenen Banden an. Mit dieser Methode, kann man die Banden zueinander quantifizieren.

6.4 Standardmethoden für Bakterienkultur

6.4.1 Transformation elektrokompenter Bakterien

Für diese Transformation mit elektrokompenten Zellen musste man zuerst ein Aliquot mit dem geeigneten Bakterienstamm z.B. XL1-Blue (Lagerung bei -80°C) auf Eis auftauen. Zur gleichen Zeit wurde eine 1:20 Verdünnung des Ligationsproduktes mit Wasser (siehe Tabelle 6-22) hergestellt [5µl des Ligationsansatzes + 95µl ddH₂O]. Diese Lösung wurde mit 50µl des kompetenten Bakterienansatzes gut gemischt und dann für 1 Minute auf Eis inkubiert. Danach wurde die ganze Bakteriensuspension in eine Elektroporationsküvette von BioRad pipettiert und bei 2,5V mit dem MicroPulser von BioRad elektroporiert, gleich danach wurde 1ml LB-Medium (ohne Antibiotika) dazugegeben und die ganze Suspension wurde für 1

Stunde bei 37°C im Bakterienschüttler geschüttelt. Dieser Schritt führte dazu, dass das transformierte DNA-Plasmid gut aufgenommen und schließlich erfolgreich exprimiert werden konnte. Schließlich wurde die ganze Bakteriensuspension auf eine LB-Ampicillin oder LB-Kanamycin-Platte (je nach Resistenz des Fusionsproteins) ausplattieren und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Um ein vorhandenes Plasmid zu amplifizieren wurde eine 1:100 Verdünnung aus der Plasmid-DNA (z. B. Maxipräparation) in Wasser [1µl der Plasmid-DNA + 99µl ddH₂O] hergestellt. Die restliche Prozedur wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

6.4.2 Transformation hitzeschockkompetenter Bakterien

Transformation hitzeschockkompetenter Bakterien mit Ligationsprodukt für Knockdown (shRNA)

Die Bakterien STBL-3 (50µl) wurden auf Eis aufgetaut, dann wurden 10,75µl des Ligationsansatzes (siehe Tabelle 6-22) unverdünnt zu den Bakterien dazugegeben, gut gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit das Ligationsprodukt gut mit den Bakterien gemischt und an die Bakterien anlagern konnte. Im Anschluss wurde der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden induziert, damit die Bakterien das Ligationsprodukt aufnehmen konnten. Dann wurde 1ml SOC-Medium (wurde mit Bakterien mitgeliefert) dazugegeben und die ganze Bakteriensuspension für 1h bei 37°C geschüttelt. Der ganze Ansatz wurde dann auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert.

Transformation hitzeschockkompetenter Bakterien mit Ligationsprodukt (z.B. für *C.elegans*)

Die Bakterien TOP10 (50µl) wurden auf Eis aufgetaut. Zur gleichen Zeit wurde eine 1:20 Verdünnung des Ligationsproduktes mit Wasser (siehe Tabelle 6-22) hergestellt [5µl des Ligationsansatzes + 95µl ddH₂O]. Danach wurde der Ligationsansatz zu den Bakterien dazugegeben, gut gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit das Ligationsprodukt gut mit den Bakterien gemischt und an die Bakterien anlagern konnte. Im Anschluss wurde der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden induziert, damit die Bakterien das Ligationsprodukt aufnehmen konnten. Dann wurde 1ml LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) dazugegeben und die ganze Bakteriensuspension für 1h bei 37°C geschüttelt. Der ganze Ansatz wurde dann auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert.

Transformation hitzeschockkompetente Bakterien für Proteinexpression, etc.

Die Bakterien TOP10 (50µl) wurden auf Eis aufgetaut. Zur gleichen Zeit wurden eine 1:50 Verdünnung aus der Plasmid-DNA und Wasser [1µl des Ligationsansatzes + 49µl ddH₂O] hergestellt. Danach wurde der Ligationsansatz zu den Bakterien dazugegeben, gut gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, damit das Ligationsprodukt gut mit den Bakterien gemischt und an die Bakterien anlagern konnte. Im Anschluss wurde der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden induziert, damit die Bakterien das Ligationsprodukt aufnehmen konnten. Dann wurde 1ml LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) dazugegeben und die ganze Bakteriensuspension für 1h bei 37°C geschüttelt. 200µl des Ansatzes wurde dann auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert.

6.4.3 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien

Es wurde eine Übernachtskultur mit dem E. coli- Stamm XL1-Blue in 50ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden je 15ml dieser Übernachtskultur in je 500ml vorgewärmtes LB-Medium (bereits in großen Kolben vorautoklaviert) gegeben und bei 37°C und 200rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen (~ca. 4Std Wachstumszeit). Nachdem die Bakteriensuspension die gewünschte OD (optische Dichte) erreicht hatten, wurden sie für 15 Minuten im Kühlraum auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien für 20 Minuten bei 4000rpm und 2°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Bakterien wurden in 10ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert, in ein 50ml Falconröhrchen überführt und auf 50ml mit sterilem, eiskaltem ddH₂O aufgefüllt und wieder für 10 Minuten bei 4°C bei 4000rpm zentrifugiert, dieser Schritt wurde noch 4x wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt, die wiederum für 20 Minuten, bei 2°C und 10.000rpm zentrifugiert wurden. Nach diesem Schritt wurde der Überstand verworfen und alle weiteren Schritte wurden im 4°C Raum durchgeführt. Dann wurde das restliche Bakterienpellet in gleichem Volumen (1:1) mit 10% Glycerin resuspendiert (Pro Reaktionsgefäß 300µl – 600µl). Schließlich wurde von dieser Suspension in 50µl Aliquots auf Trockeneis oder im flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei –80°C aufbewahrt (Ausbeute: ~ 60 Aliquots).

6.5 Standardmethoden für Zellkultur

Alle Arbeitsschritte die mit der Kultivierung von Zellen zusammenhingen, wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Für die folgenden Versuche wurden unterschiedliche humane Zellen verwendet (siehe Tabelle 6-14). Alle Zellen wurden bei 37°C, 5%CO₂ und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden entweder in dem Medium DMEM oder dem Medium RPMI (+1% Antibiotikum Pentstrep und 10%FKS) herangezogen.

6.5.1 Passagieren der Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren adhärent wachsende Zellen, die erst mit 1xTrypsin/EDTA abgelöst werden mussten, um passagiert werden zu können. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 85% bis 95% auf dem Flaschenboden erreicht hatten, wurden sie gesplittet oder für Experimente verwendet, um ein Überwachsen in der Zellkulturflasche zu vermeiden. Zum abzulösen der Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen mit in 1x PBS gespült, dabei war zu beachten, dass niemals eine Flüssigkeit (Medium, PBS oder Trypsin) direkt auf den Zellrasen pipettiert werden durfte. Dann wird 1xTrypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, so dass der Flaschenboden bedeckt war und für eine zellabhängige Zeit inkubiert. Nachdem die Zellen abgerundet waren, wurde die Wirkung von Trypsin mit Vollmedium gestoppt. Die Zellen wurden bei 800g und 24°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Zellen weiterpassagiert und für weitere Versuche verwendet. Um eine Differenzierung der Zellen zu vermeiden, wurden die Zellkulturflaschen nur für drei Splittvorgänge verwendet, danach wurde die Flasche gewechselt.

6.5.2 Transfektion von humanen Zellen

Alle Zellen in dieser Arbeit, die mit Lipofectamin oder PEI transfiziert worden sind, wurden spätestens 24 Stunden nach Transfektion für Experimente verwendet. Die HEK293T für die Virusinfektion wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit X-tremeGene geerntet.

In Abbildung 6-1 sind in einer Übersicht alle in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsreagenzien mit den Konzentrationen der jeweiligen Plasmid DNA verzeichnet. Dazu ist auch ersichtlich, welches Reagenz für welche Experimente verwendet wurde.

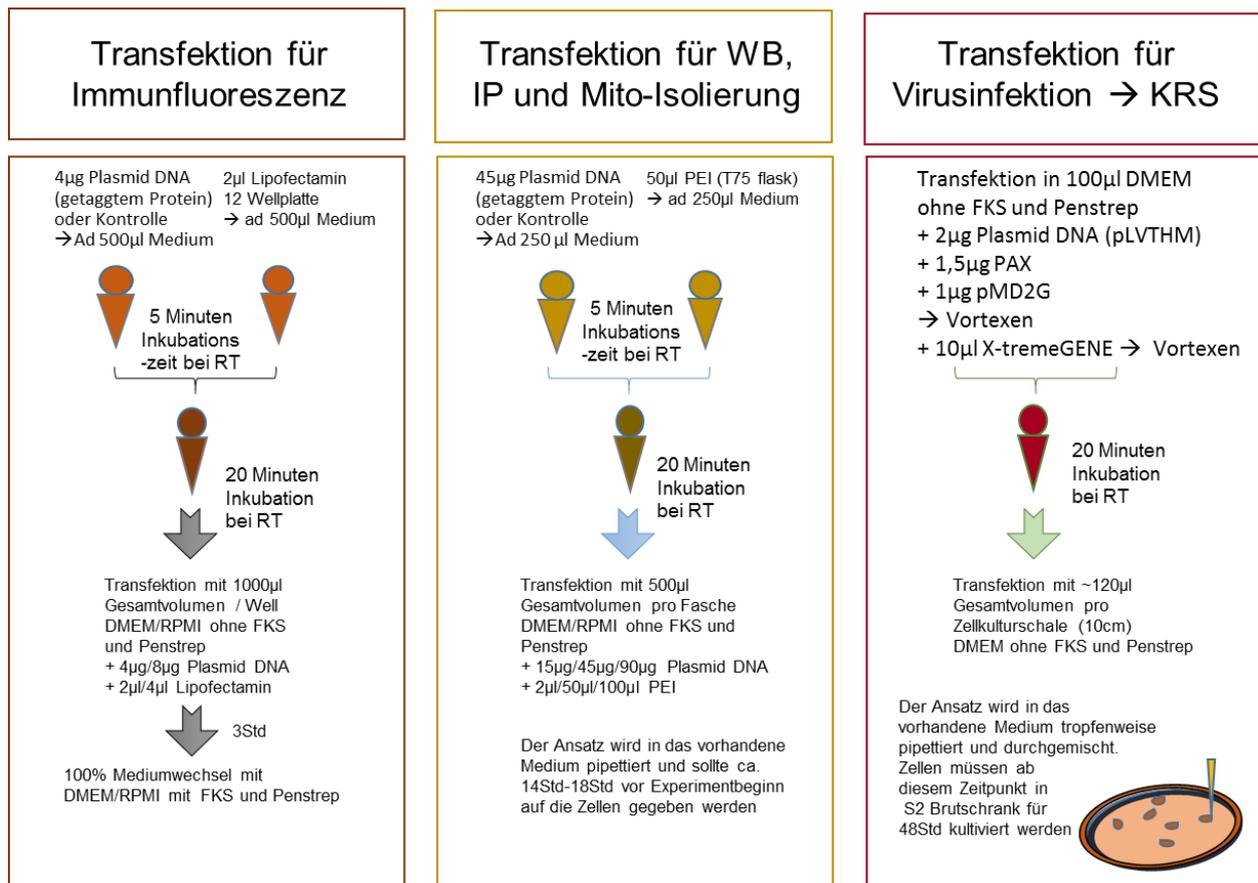


Abbildung 6-1 Übersicht über verschiedene Transfektionsmethoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden

6.5.3 Ernten der Zellen

Die Erntemethode der kultivierten Zellen hing davon ab, welche Experimente damit durchgeführt werden sollten. Zellen für die Proteincharakterisierung und Immunpräzipitation aus ganzen Zelllysaten wurden gescrappt. Bei Zellen, die für die Isolierung der Mitochondrien verwendet wurden, kam meistens 1xTrypsin/EDTA zum Einsatz. Ausnahmsweise wurde für die α -AlkBh7-IP das 1xTrypsin/EDTA durch Cell Dissociation solution (1x) ersetzt.

Die Cell Dissociation solution (1x) kam auch bei allen Experimenten zum Einsatz, die mit dem stabilem induzierbaren System (KRS) durchgeführt wurden.

6.5.4 Fixieren von humanen Monolayer und 3D dimensionale Zellkultur

Die Fixierung, mit der der Großteil der Experimente (IF) in dieser Arbeit durchgeführt wurde, setzt sich zusammen aus 4%PFA für 5 Minuten, zweimal Waschen mit 1xPBS, einer anschließenden Fixierung mit 100% eiskaltem Methanol für 5 Minuten (ab hier wurden die Proben immer leicht gekühlt), zweimal Waschen mit 1xPBS, gefolgt von einem Permeabilisierungsschritt von 5 Minuten, mit anschließendem Waschschrift mit 1xPBS,

danach folgte das Blocken mit Blocklösung (Art der Blocklösung hing vom Antikörper ab) für mindestens 1 Stunde bei 4°C.

Die Fixierungsmethode mit 4%PFA für 5 Minuten, zweimal Waschen mit 1xPBS, einer anschließenden Fixierung mit 100% eiskaltem Methanol für 5 Minuten (ab hier wurden die Proben immer leicht gekühlt), zweimal Waschen mit 1xPBS wurden auch für die 3D Zellkultur verwendet.

6.5.5 Immunfluoreszenzfärbung von humanen Zelllinien

Wie in 6.5.1 beschrieben und in der Abbildung 6-2 gezeigt wurden Zellen gesplittet und auf Deckgläser so in eine 12- oder 6-Wellplatte gesät (abhängig von der Wachstumsrate der Zellen), dass die Zellen nach 24Std eine Konfluenz von 50-60% erreicht hatten. Diese Zellen wurden dann mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin transfiziert. Nach ungefähr 24Std konnten die Zellen fixiert und mit dem spezifischen Antikörper gefärbt werden. Wenn man in der Immunfluoreszenz die endogenen Proteine charakterisieren wollte, verwendete man die gleiche Methode wie in Abbildung 6-2 gezeigt, jedoch fiel der Transfektionsschritt aus und die Zellen wurden 24 Stunden früher fixiert. Deshalb musste hier auch darauf geachtet werden, dass die Zellen in einer höheren Konzentration ausgesät werden mussten, damit die Konfluenz am Erntetag passend ist.

Die Konzentration der eingesetzten Antikörper war von unterschiedlichen Faktoren abhängig und musste für jedes einzelne Protein getestet werden (verwendete Konzentrationen: Erstantikörper: Tabelle 6-6, Zeitantikörper: Tabelle 6-7). Bei gleichzeitiger Färbung von zwei Proteinen musste für die beiden Zweitantikörper immer auch eine Kontrolle durchgeführt werden, um eine Kreuzreaktion auszuschließen. Die in Vectashield eingebettete und gefärbten Zellen wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzmikroskopen ausgewertet (z. B. Konfokal, Super Resolution Imaging (3D-SIM) Mikroskop (OMX)). Die Daten, die mit dem Super Resolution Imaging (3D-SIM) Mikroskop ausgewertet wurden, sind in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Leonhardt, LMU durch Andreas Maiser ausgeführt worden. Die konfokalen Bilder sind in Kooperation mit Astrid Heim, AG Prof. Dr. Böttger, LMU hergestellt worden. Das normalen Fluoreszenzmikroskop wurde von Andreas Voss, (AG Prof. Walch, PATH, Helmholtz) zur Verfügung gestellt.

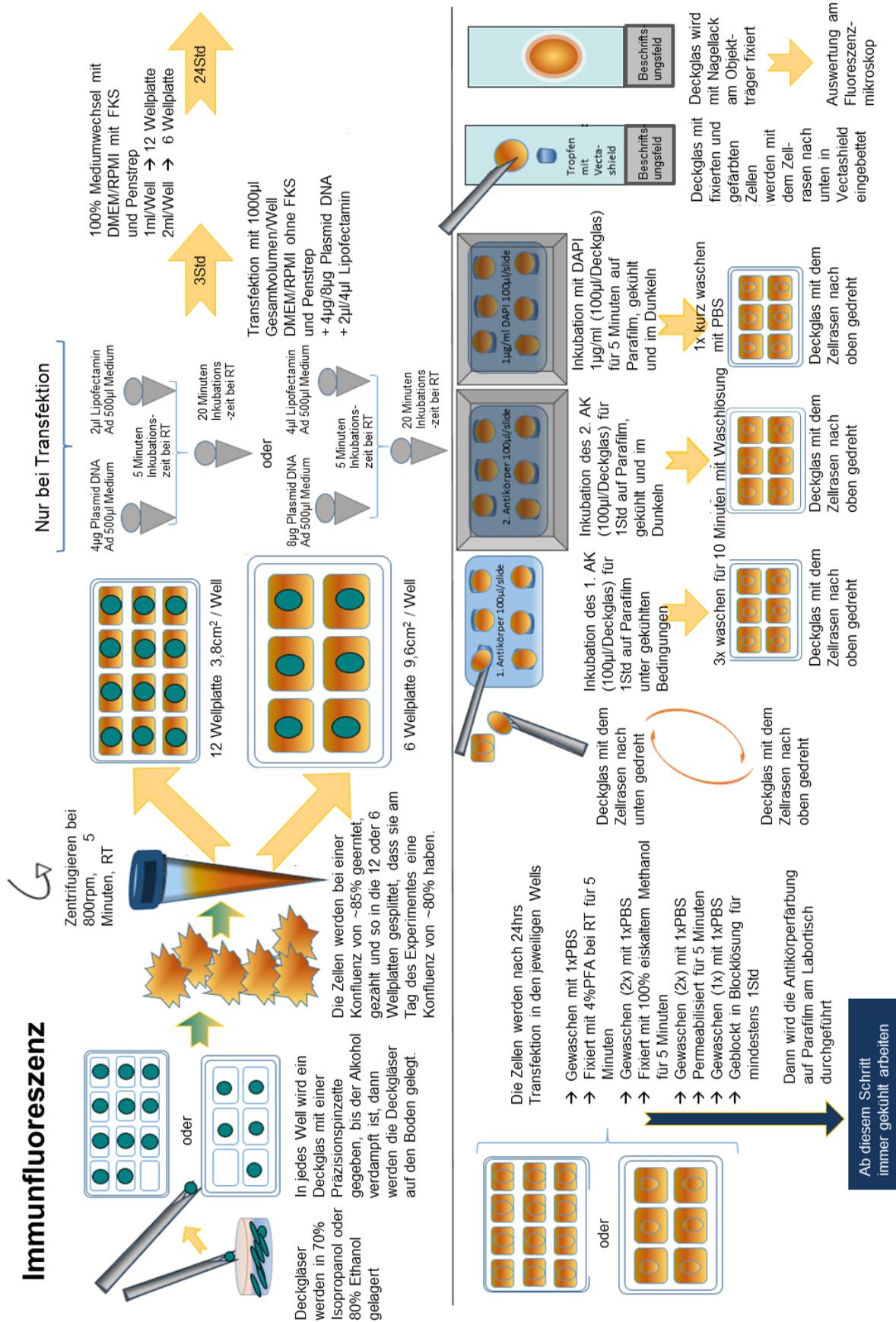


Abbildung 6-2 Immunfluoreszenz. Überblick über Transfektion, Fixierung und Antikörperfärbung von humanen Zelllinien in der IF

6.5.6 Hypoxie und Normoxie

Um herauszufinden, ob und wie unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen auf die Morphologie von Mitochondrien wirken, wurden monolayer Zellen für 24Std bei 21% Sauerstoff, 37°C und im Vergleich bei 0,1% Sauerstoff, 37°C für 24Std kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert. Die Zellen mit geringer Sauerstoffkonzentration dagegen, wurden direkt unter geringen Sauerstoffbedingungen in der Hypoxiekammer einmal mit 1xPBS gewaschen, danach gleich für fünf Minuten mit 4%PFA fixiert und wiederum zweimal mit 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen wie in Kapitel 6.5.4 weiterbehandelt.

6.5.7 qPCR

Die qPCR wurde in Kooperation mit Dr. Gitta Heinz (AG Alex Wolf, Helmholtz Zentrum) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte, von dem Zellen sähen, induzieren mit Doxycyclin der Zelllinien bis zur Zellernte wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Danach wurden die geerntet Zellen an Dr. Gitta Heinz weitergegeben. Die Durchführung der Probenvorbereitung für die qPCR, die qPCR und Datenauswertung wurden von Dr. Gitta Heinz ausgeführt.

Folgende Schritte wurden von Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alexander Wolf, Helmholtz Zentrum durchgeführt:

- RNA Aufreinigung wurde mit dem InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit von Stratec Molecular, Bestell-Nr: 1060100200 und RNeasy Mini Kit, Bestell-Nr. 74107 nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt;
- Die Reverse Transkription wurde mit dem Verso cDNA synthesis Kit von Fermentas, mit der Bestell-Nr. AB-1453A nach Protokoll durchgeführt;
- Die PCR wurde mit dem qPCR Reaktionskit Kapa Sybr Fast Lightcycler 480, Bestell-Nr. 07-KK4609-03 von Peqlab in dem FrameStar 96well (mit Klebefolie), von 4titude, Bestell-Nr. 4ti-0952 mittels Roche Lightcycler 480 durchgeführt. Die Filter: SYBR Green I / HRM Dye (465-510) wurden für die qPCR verwendet;
- qPCR Lauf: 42°C for 30 Minuten, 95°C for 2 Minuten; nach der Reaktion ad 80 µl H₂O, Finales Volumen von 100 µl

Zusammensetzung	1x [µl]
2x KAPA Sybr FAST qPCR Master Mix	10,00
10 µM F-Primer	0,40
10 µM R-Primer	0,40
cDNA Templat	5,00
H ₂ O	4,20
Summe	20,00

Zusammensetzung qPCR pro Ansatz:

Tabelle 6-23 Liste mit verwendeten Primer für qPCR (Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alex Wolf)

Gen	Primernamen	Spezies	Typ	Primer Sequenz	Primergröße	Amplifikationslänge	Anilining Temperatur	Schmelztemperatur	Primerdimer
RPollI	for	human	reference	F- GCACCACGTCCAATGACA	18	267 bp	61 °C	86.7 °C	Nein
RPollI	rev	human	reference	R- GTGCGGCTGCTCCATAA	18				
HPRT	for	human	reference	F- TGACACTGGCAAAACAATGCA	21	94 bp	61 °C	81.8 °C	Nein
HPRT	rev	human	reference	R- GGTCTTTTCACCAGCAAGCT	21				
Alkbh1	for	human	target	F- AGAAGCGACTAAACGGAGACC	21	117 bp	61 °C	81.9 °C	Nein
Alkbh1	rev	human	target	R- GGGAAAGGTGTGTAATGATCTGC	23				
Alkbh7	for	human	target	F- GAGACGTGAGCCGAGAACT	20	98 bp	61 °C	88.2 °C	Nein
Alkbh7	rev	human	target	R- TTCTCTGTCTCTCGGAAGCC	20				
mitoDNA5	for	human	target	F- CTCACCACCTCTTGCTCAGC	20	536 bp	61 °C	84.3 °C	in neg ctrl, +15 cycles
mitoDNA5	rev	human	target	R- GCCAGGTTCAATTTCTATCG	21				

6.5.8 Stressbehandlung von humanen Zellen

Es wurden unterschiedliche Substanzen verwendet, die bekannt dafür sind, die Mitochondrien bzw. die mitochondriale DNA zu schädigen und damit eine Stressantwort einzuschalten. Um herauszufinden, ob und wie dieser Stress auf die mitochondriale Struktur eine Auswirkung hat, wurden die Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen mitochondrienspezifischen Antikörpern gefärbt und ausgewertet (siehe Tabelle 6-6). Die unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitpunkte mit den dazugehörigen Quellen der verwendeten Substanzen (Doxorubicin, Bleomycin, Ethdiumbromid, Resveratrol, H₂O₂ und UV (siehe Abbildung 6-3) die die mtDNA schädigen, sind in Tabelle 6-24 zusammengefasst.

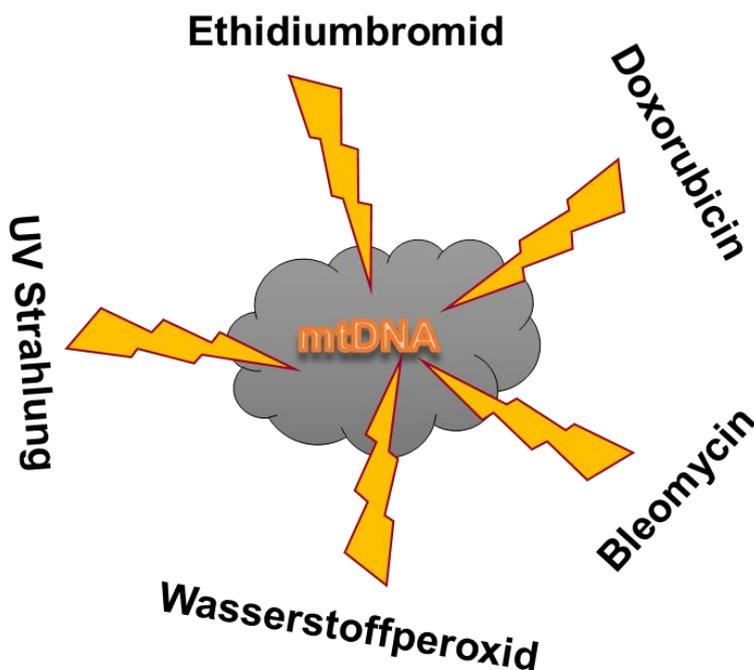


Abbildung 6-3 Stressfaktoren der mitochondrialen DNA

Tabelle 6-24 Übersicht über die angewendeten Therapien und verwendeten Konzentrationen in der IF

Behandlung	Lösungs- mittel	Therapiedauer	Stock- [c]	Anwendungs- [c]	Quelle
Bleomycin (Bleo)	DMSO	<u>2Std</u> , 4Std, 24Std		10µg/ml, <u>20µ/ml</u> , 40µg/ml	(Dmitrieva et al., 2011)
Doxorubicin (DOX)	DMSO	<u>24Std</u> ; 1Std, 3Std, 6Std, 9Std	1mM	<u>1,7µM</u> 0,04µM, 1,7µM, 3,4µM, 17µM, 30µM	(Ashley & Poulton, 2009)
Ethidium-bromid (EtBr)	Wasser		5mg/ml	0,1µg/ml, 0,5µg/ml, 1µg/ml	(Ashley & Poulton, 2009)

6.6 Herstellung eines humanen AlkBh7 Antikörpers

Herstellung eines humanen Antikörpers gegen AlkBh7 in Kooperation mit Dr. Elisabeth Kremmer (IMI, Helmholtz Zentrum). Das Peptid (ELEPELRRRRYEYDH) für den Antikörper AlkBh7 (Q9BT30), wurde von der Firma: Peps 4 LS GmbH synthetisiert und der Frau Dr. Kremer, IMI, Helmholtz Zentrum zur Verfügung gestellt, damit sie einen geeigneten Antikörper herstellen konnte (Abbildung 6-4).

MAGTGLLALRTLPGPSWVRGSGPSVLSRLQDAAVVRPGFLSTAEETLSR **ELEPELRRRRYEYDH**W
DAAIHGFRETEKSRWSEASRAILQRVQAAAFGPGQTLSSVHVLDEARGYIKPHVDSIKFCGATIAGL
SLLSPSVMRLVHTQEPGEWLELLLEPGSLYLIRGSARYDFSHEILRDEESFFGERRIPRGRRISVICRSL
PEGMGPGESGQPPPAC

Abbildung 6-4 Aminosäuresequenz von AlkBh7 (Q9BT30) mit markiertem Peptid (grün) von der AS 51 bis AS 65

Dieses Peptid wurde als Grundlage verwendet, um einen neuen Antikörper gegen AlkBh7 in Ratte zu produzieren

Wie in Tabelle 6-25 und Abbildung 6-5 gezeigt, wurden mehrere Antikörper-Proben gegen AlkBh7 auf die Spezifität hin überprüft. Dabei wurde primär darauf geachtet, ob das AlkBh7 Protein, mit GFP-Tag (erwartete Größe ~53 kDa) am C-Terminal mit den zur Verfügung gestellten Antikörper detektiert werden konnte. Zusätzlich wurde bei den erfolgversprechenden Antikörpern (#34, #38, rote Sterne) auch ungetaggetes und überexprimiertes AlkBh7-Signal mittels Western Blot auf der erwarteten Höhe (25 kDa) detektiert (Abbildung 6-5). Endogenes AlkBh7 (erwartete Größe ~25 kDa) konnte jedoch bei keinem der fünfzig getesteten Antikörpern detektiert werden.

Tabelle 6-25 Übersicht über hergestellt und getestete Antikörper für AlkBh7 von Frau Dr. Kremmer (IMI, Helmholtz Zentrum)

Die getesteten Antikörper wurden durchnummeriert, die Spalte Serum für 1. AK unverdünnt gibt die Bezeichnung der IMI, Helmholtz Zentrum an, 2.AB = zweiter Antikörper, von IMI zur Verfügung gestellt, es handelt sich um Ratte Antikörper; rote Sterne markieren Ausgewählte Antikörper

AlkBh7					AlkBh7				
Serum für 1.AK		WB signal			Serum für 1.AK		WB signal		
unverdünnt	2.AB 1:1000	Ja /Nein 53kDa	Ja /Nein endogen		unverdünnt	2.AB 1:1000	Ja /Nein 53kDa	Ja /Nein endogen	
1	1A3	R-2c	leicht	nein	27	8G6	R-2c	mittel	vielleicht
2	1D11	R-2c	nein	nein	28	9A2	R-2c	leicht	vielleicht
3	1E1	R-2b	nein	nein	29	9B3	R-2c	leicht	vielleicht
4	1F5	R-2c	sehr leicht	nein	30	9D6	R-2c	leicht	nein
5	2C7	R-2c	mittel	nein	31	10H8	R-2c	leicht	nein
6	2C8	R-2c	mittel	nein	32	11A7	R-2c	nein	nein
7	2E1	R-2c	nein	nein	33	11B5	R-2c	stark	nein
8	2E4	R-2c	leicht	nein	* 34	11E2	R-2c	stark	vielleicht
9	2F3	R-2c	stark	nein	35	11E12	R-2c	stark	nein
10	3C1	R-2c	nein	nein	36	11H7	R-2c	leicht	nein
11	3H4	R-2c	mittel	nein	37	12C3	R-2c	leicht-mittel	nein
12	4B11	R-2c	leicht - mittel	nein	* 38	12D10	R-2c	stark	vielleicht
13	5B5	R-2c	stark	vielleicht	39	13A9	R-2c	sehr leicht	nein
14	5C11	R-2c	nein	nein	40	13F9	R-2a	nein	nein
15	5D6	R-2c	stark	vielleicht	41	13H5	R-2c	stark	nein
16	5F5	R-2a	nein	nein	42	14A1	R-2c	stark	nein
17	6A5	R-2c	stark	vielleicht	43	14A8	R-2c	nein	nein
18	6D3	R-2c	leicht	nein	44	14A10	R-2b	nein	nein
19	6E5	R-2c	leicht	nein	45	14F12	R-2c	leicht	nein
20	6G9	R-2c	sehr leicht	nein	46	14H11	R-2c	mittel	nein
21	7E7	R-2c	sehr leicht	nein	47	15B11	R-2c	mittel	nein
22	7E8	R-2c	sehr leicht	nein	48	16B6	R-2c	nein	nein
23	7F9	R-2b	sehr leicht	nein	49	16C11	R-2a	nein	nein
24	8F1	R-2c	mittel	nein	50	16E6	R-2c	nein	nein
25	8F4	R-2c	mittel	nein					
26	8F10	R-2a	nein	nein					

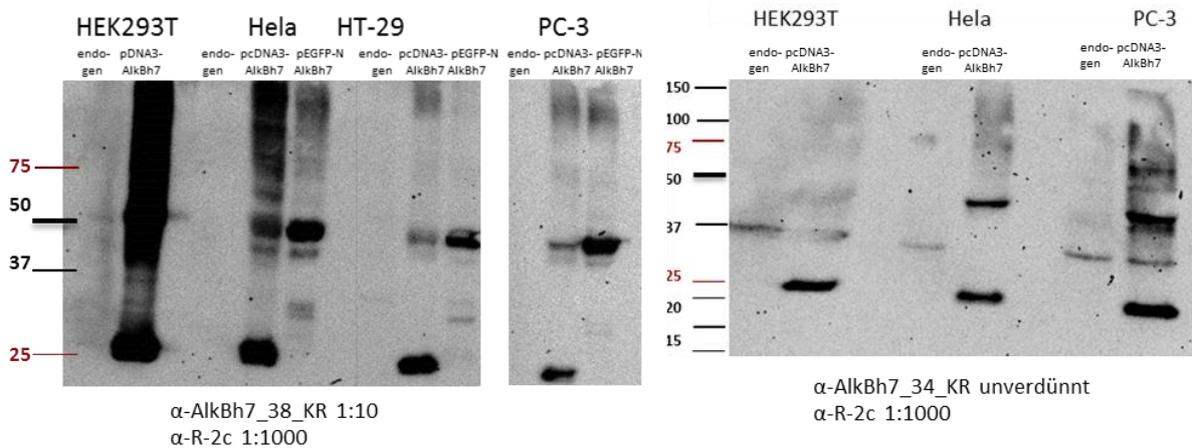


Abbildung 6-5 AlkBh7 Antikörper Test in unterschiedlichen Zelllinien

Die beiden Antikörper (#34_KR,11E2; #38_KR, 12D10), die für AlkBh7 als passend ausgesucht worden sind, wurden in mehreren Zelllinien (HEK293T, HeLa, HT-29 und PC-3) auf die Spezifität für endogenes und überexprimiertes AlkBh7 Signal getestet.

6.7 Mitochondrienisolierung

Die Methode zur Isolierung der Mitochondrien wurde von (Schmitt et al., 2013) übernommen und wie in Abbildung 6-6 gezeigt durchgeführt. Bevor die eigentlichen Experimente beginnen konnten, wurden für jede Zelllinie die idealen Isolierungsparameter bestimmt. Zu diesen Parametern gehörte die Zellzahl pro ml, Anzahl wie oft die Zellsuspension von der Hochpräzisionspumpe pro Ansatz homogenisiert wurde (Hypes) und die Größe der Hartmetallkugel (Clearance), die in der Mitte des Homogenisators liegt und Einfluss auf die

erhaltene Größe und Intaktheit der Mitochondrien hat. Eine Übersicht mit allen Parametern ist in Tabelle 6-26 zusammengefasst.

HEK293T, HeLa und A549 Zelllinien wurden kultiviert, wenn nötig vorher transfiziert (siehe Kapitel 6.5.2) geerntet. Dann wurde die Zellzahl bestimmt und mit mitochondrialem Isolationspuffer (MIP) eingestellt. Dann wurde jeweils 1ml Zellsuspension der Hochpräzisionspumpe mit 700 μ l/min durch den Homogenisator gedrückt (Anzahl der Hypes) und es wurde danach jeweils mit 1ml MIP nach gespült. Diese Methode führte durch die unterschiedlichen Clearances zu einer präzisen Isolierung von Mitochondrien, ohne sie dabei zu zerstören. Durch zwei unterschiedliche Zentrifugationsschritte (1 Schritt: 800g, 5 Minuten bei 4°C → Entfernung des Zelldebris; 2 Schritt: 9000g, 10 Minuten, 4°C → Pelletieren der Mitochondrienfraktion) wurden die Mitochondrien von den restlichen Zelldebris und Organellen getrennt. Daraus ergeben sich drei unterschiedliche Fraktionen (P=Pellet → alle größeren Kompartimente und Zelldebris; Ü = Überstand → kleinere Kompartimente; M= Mitochondrien → braunes Pellet erkennbar). Wenn über den Mitochondrienfraktion noch eine weiße leicht schleimige Schicht lag, musste diese mit einer 200 μ l Pipettenspitze entfernen werden, ohne dabei die Mitochondrienfraktion zu berühren. Das Pellet und die Mitochondrienfraktion wurden in etwas MIP resuspendiert, um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Danach wurde je 10 μ g Protein von Pellet, Überstand und Mitochondrienfraktion auf ein SDS-Gel geladen und ein WB durchgeführt, um mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 6-6) den Gehalt und die Lokalisation der Zielproteine zu bestimmen.

Tabelle 6-26 Übersicht über zellabhängige Parameter zum Isolieren von Mitochondrien

Zelllinien	Zellzahl / ml	Anzahl der Hypes	Clearance
HeLa (etabliert von Dr. Sabine Schmitt (AG Zischka), Helmholtz Zentrum)	4x10 ⁶	3	6
HEK293T	7x10 ⁶	6	8
A549	7x10 ⁶	3	8
PC3 (etabliert von Ariane Hallermayr, Praktikum, LMU)	5x10 ⁶	3	10

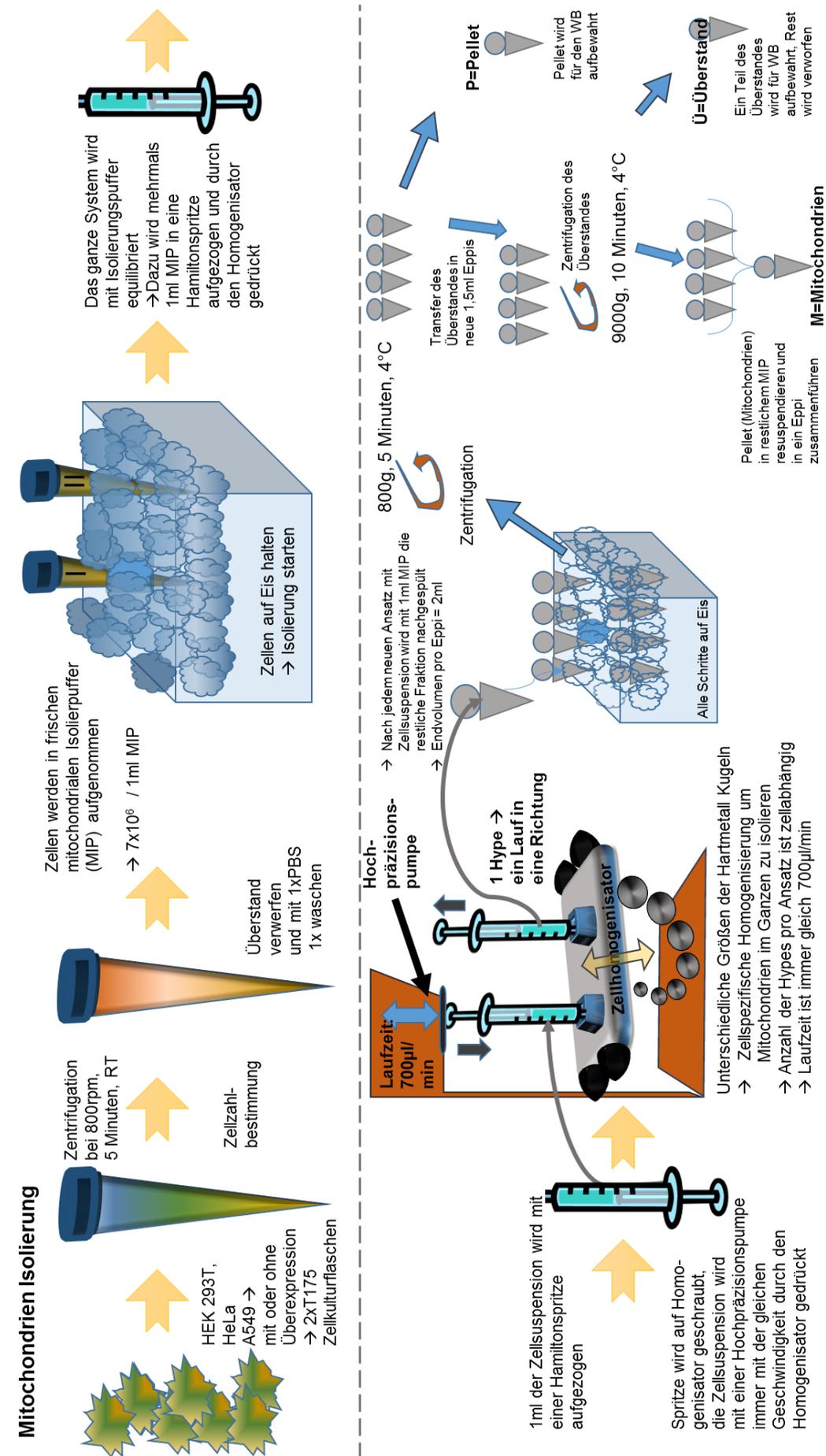


Abbildung 6-6 Methode zur Isolierung von Mitochondrien

6.9 Stabiles induzierbares KrabRed System (KRS) durch Virusinfektion

Die Methode zur Herstellung von stabilen induzierbaren Zelllinien wurde nach (Wiznerowicz & Trono, 2003) durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendete Methode wurde durch Dr. Michelle Vincendeau (AG Prof. Dr. Krappmann) am Helmholtz Zentrum etabliert. Alle verwendeten proteinunabhängigen Plasmide (pLVTHM, PAX, pMD2.G), Puffer (Annealing-Puffer) und Kontrollen (z.B. ns shRNA) zur Klonierung und Transfektion wurden von der AG Prof. Dr. Krappmann zur Verfügung gestellt.

In dieser Arbeit wurden sowohl Konstrukte für den Knockdown als auch für die Überexpression von unterschiedlichen Proteinen angefertigt (siehe Tabelle 6-13).

Das stabil Doxycyclin-induzierbare KrabRed System arbeitet über zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarker, die in zwei Schritten mit einer Virusinfektion in die Zelle stabil transformiert wurden. Exprimierte die infizierte Zelle RFP, war das ein Indiz dafür, dass die Zelle KrabRed exprimiert, ein Marker, der anzeigte, dass die Zelle durch Doxycyclin (250ng/ml) induzierbar ist. Wurde durch eine zweite Virusinfektion das Zielprotein in die Zelle geschleust und die Zelle mit Doxycyclin induziert, wurde das GFP-Protein als Zeichen dafür exprimiert, dass Knockdown bzw. Überexpression stattfindet (siehe Abbildung 6-11).

Knockdown

Auf der Homepage <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/gene/search> wurde nach passenden shRNAs für den Knockdown von unterschiedlichen Proteinen gesucht. Für die jeweiligen Proteine AlkBh1 (Abbildung 6-8), AkBh7 (Abbildung 6-9) wurden je drei unterschiedlichen Sequenzen ausgesucht und nach der Vorlage von Abbildung 6-10 entworfen.

Die shRNAs wurden alle in den pLVTHM Vektor kloniert (siehe Kapitel 6.3.5) bis hin zur Maxipräp (siehe Kapitel 6.3.6). Bei diesem Schritt war zu beachten, dass die shRNAs vor der Ligation mit dem Vektor nicht mehr verdaut werden musste. Jedoch musste das jeweilige Paar (shRNA for und shRNA rev) mit einem Annealing-Puffer hybridisiert werden. Für die Transformation von allen pLVTHM Plasmiden wurden die Bakterien STBL3 verwendet und wie in Kapitel 6.4.2 beschrieben, transformiert.

Virusinfektion

Ein Überblick, wie die Virusinfektion im KrabRed System funktioniert ist in Abbildung 6-11 beschrieben. Für die Transfektion zur Virusproduktion wurden immer HEK293T bis zur Passage 10 verwendet. Danach nahm die Effizienz zur Virusproduktion trotz Viruspromoter rapide ab. Für die Virusinfektion waren drei unterschiedliche Plasmide nötig (pLVTHM = DNA, PAX2 = Verpackung; pPD2.G = Hülle), damit die Virusproduktion stattfinden konnte. Diese drei Plasmide wurden mit einer Transfektionsreagenz (siehe Abbildung 6-1) zusammen auf die ausgesäten HEK293T Zellen (1×10^6 Zellen aussähen) gegeben, danach musste in S2 gearbeitet werden. Nach 48 Stunden wurde der Virus geerntet und die bereits vorbereitet Zellen wurden infiziert. In dieser Arbeit funktionierte nur die Infektion mit dem Zentrifugationsschritt (2100rpm, 90 Minuten, 37°C).

Kultivierung

Nach dem Infektionsschritt wurden Zellen unter normalen Bedingungen kultiviert, expandiert und bei geringer Infektionsrate (GFP und RFP Anteil unter 90%) nach beiden Signalen gesortet und wieder expandiert und kryokonserviert. Wenn die Zellen für Experimente verwendet wurden, wurde die Induktion der Zielproteine mit Doxycyclin (250ng/ml) gestartet. Die Überexpression wurde im Western Blot schon nach zwei bis drei Tagen sichtbar (Doxycyclin (250ng/ml, musste täglich frisch zugegeben werden), für einen effektiven Knockdown musste man die Zellen für vier bis sieben Tage täglich mit Doxycyclin (250ng/ml) induzieren.

Ob eine Veränderung des Levels auf Proteinebene stattfand, wurde mittels Western Blot und spezifischem Antikörper getestet. Als Ladekontrolle wurde in dieser Arbeit immer Aktin verwendet. Ob der Knockdown bzw. Überexpression auch auf RNA-Ebene nachweisbar war, wurde mit einer qPCR (siehe 6.5.6) getestet.

Auf diese Weise wurden folgende Zelllinien hergestellt:

AlkBh1: KR-co, ns shRNA, AlkBh1 (KD5017; KD5020; KD7996), Mito-GFP_ÜE, AlkBh1_CD2; AlkBh1_GFP in HeLa, A549, Panc-1, PC-3 und HEK293T, Überexpression nur in HeLa und A549

AlkBh7: KR-co, ns shRNA, AlkBh7 (KD2763; KD2764; KD9385), Mito-GFP_ÜE, AlkBh7_CD2; AlkBh7_GFP in HeLa, A549, Panc-1, PC-3 und HEK293T, Überexpression nur in HeLa und A549

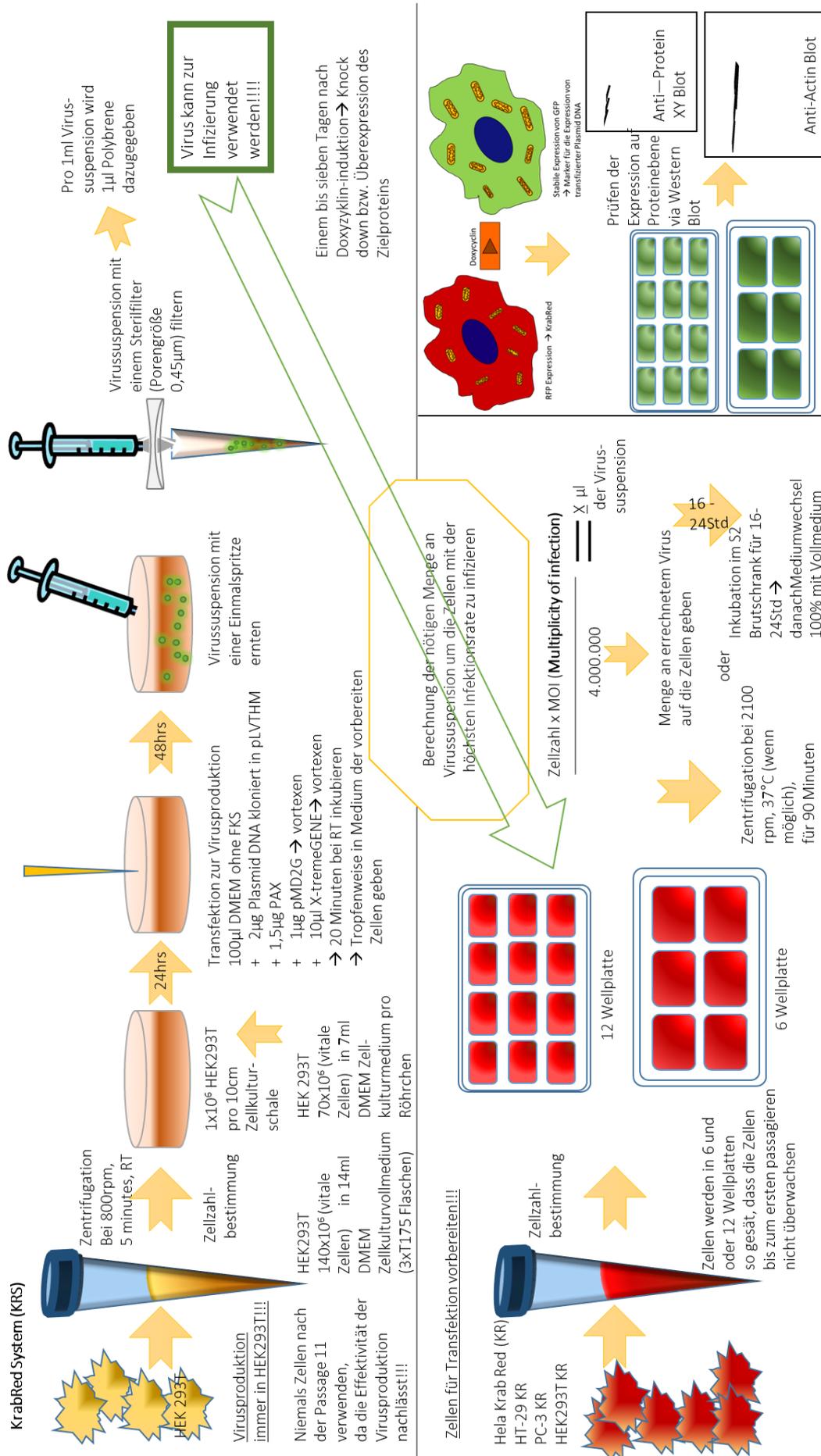


Abbildung 6-11 Überblick über die Bildung des stabilen induzierbaren KrabRed Systems

Die stabilen induzierbaren Zelllinien waren die Grundlage für viele unterschiedliche Versuchsansätze und Methoden (Abbildung 6-12).

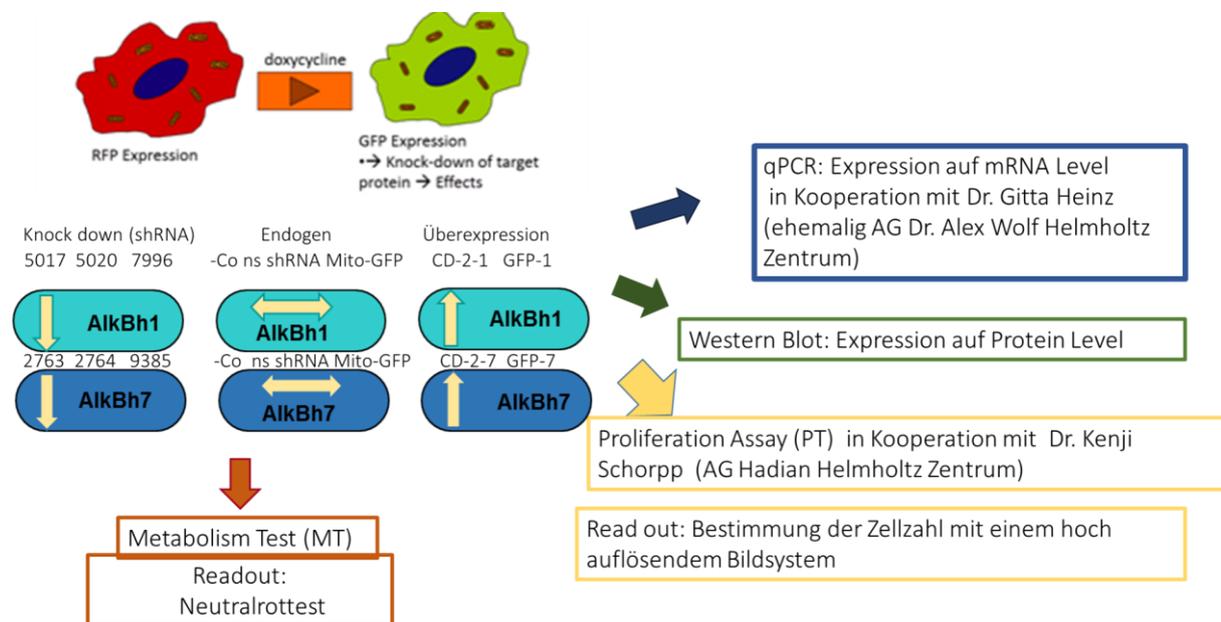


Abbildung 6-12 Anwendungsbeispiele für KrabRed induzierte Zelllinien

6.10 Proliferation Assay

Der Proliferation Assay wurde von Dr. Kenji Schorpp (AG Dr. Hadian, Helmholtz Zentrum) und Kevin Brockers (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz Zentrum) etabliert.

Der Ablauf des Proliferation Assays ist in Abbildung 6-13 dargestellt. Für diesen Versuch wurden entweder acht unterschiedliche AlkBh1 oder AlkBh7 Zelllinien (KrabRed Kontrolle, ns shRNA, 3 Knockdown Zelllinien, zwei überexprimierende Zelllinien und Mito-GFP als Kontrolle für die Überexpressionen) verwendet. Es wurden jeweils sieben 96-Well-Platten vorher mit 50µg/ml Poly-D-lysine Beschichtungspuffer für eine Stunde behandelt, danach mit je 100µl 1xPBS gewaschen und trocken geklopft. Danach wurde pro Zelllinie dreimal (Triplets) die gleiche Zellzahl ausgesät und täglich mit Doxycyclin (250ng/ml) induziert. Jeden Tag wurde eine Platte geerntet (T0-T6), wobei T0 unbehandelt fixiert wurde. Danach wurden die Zellen fixiert, mit 1µg/ml DAPI gefärbt und anschließend am hochauflösenden bildgebenden Plattenleser Operetta von Dr. Kenji Schorpp (AG Dr. Hadian, Helmholtz Zentrum) ausgelesen und mit Excel ausgewertet.

Proliferation Assay

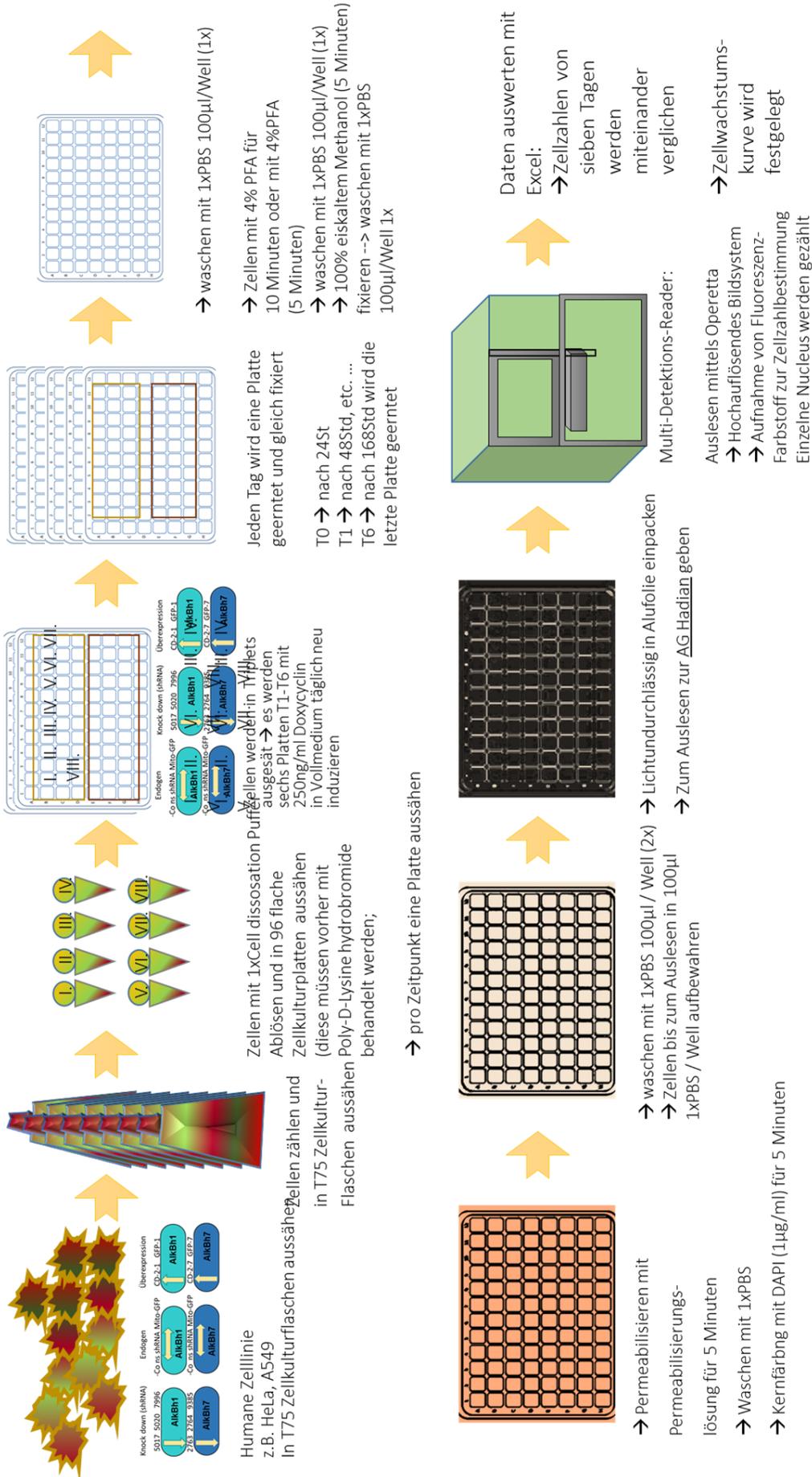


Abbildung 6-13 Überblick über die Durchführung eines Proliferationsassays

6.11 Metabolismus Assay

Der Metabolismusassay und die verwendeten Lösungen und Substanzen (die Komplexe I-V Inhibitoren und der Entkoppler CCCP) wurden von Dr. Sabine Schmitt, AG PD Dr. Zischka (Helmholtz Zentrum) zur Verfügung gestellt.

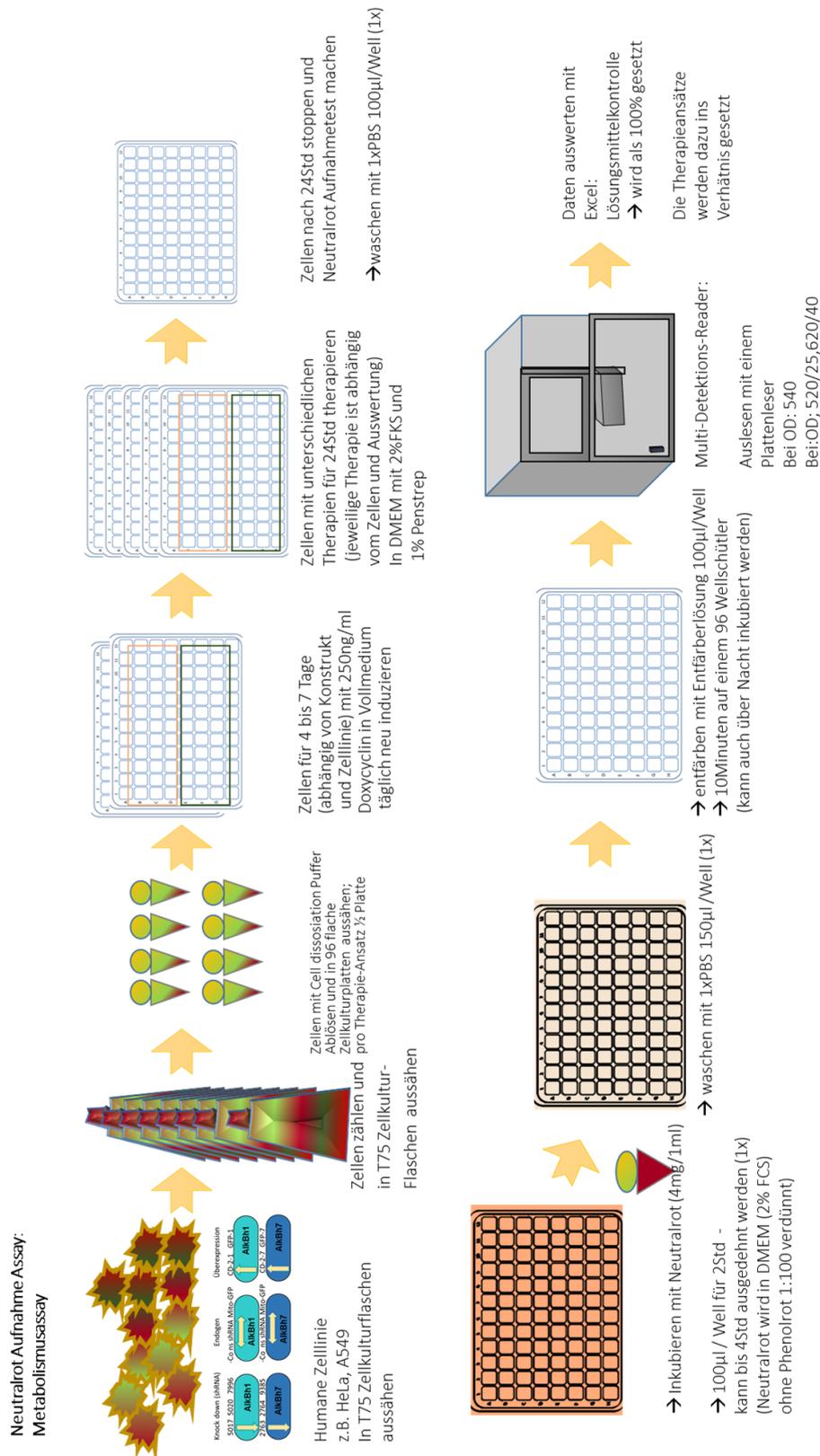


Abbildung 6-14 Überblick über die Durchführung des Metabolismus Assay

Der Ablauf des Metabolismus Assay ist in Abbildung 6-14 dargestellt. Zur Auswertung der Daten wurde der Neutralrot Aufnahme Assay verwendet, ein Zellviabilität Test der häufig für die Zytotoxizität von Substanzen verwendet wird (Repetto, del Peso, & Zurita, 2008). Das Prinzip dieses Tests beruhte darauf, dass bei lebendigen Zellen der rote Farbstoff in die Lysosomen eingebunden wurde und deshalb zwischen toten und lebendigen Zellen unterschieden werden konnte. Durch die Entfärbungslösung wurden die Zellen fixiert und lysiert. Der gebundene Farbstoff wurde bei OD520 im Plattenleser ausgelesen und in das Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle gesetzt.

Von jedem Therapieansatz (Tabelle 6-27) wurde ein Triplet angelegt und ausgelesen, daraus wurde dann ein Durchschnittswert errechnet, der mit einer Standardabweichung versehen wurde. Die Daten wurden ins Verhältnis zu der unbehandelten Probe (100%) gesetzt. Dabei wurde die Lösungsmittelkontrolle mit eingebunden.

Tabelle 6-27 Übersicht über verwendete Therapien und Konzentrationen im Metabolismusassay

Angriffspunkt	Behandlung	Lösungsmittel	Anwendungs - [c]	Stock - [c] in mM	Stock - [c] in mg/ml	Therapiedauer
Kontrolle	unbehandelte Kontrolle	DMEM (2% FCS, 1% Penstrep)	x	x	x	2Std / 24Std
Complex I	Rotenon	100% Ethanol	2 nM	2 mM		24Std
			20 nM	2 mM		24Std
			2 µM	2 mM		24Std
Complex II	TTFA (Thenoyltrifluoroacetone)	DMEM (2% FCS, 1% Penstrep)	45 µM	0,450 mM		24Std
			450 µM	0,450 mM	1 mg/10 ml	24Std
			450 µM	4,5 mM	1 mg/ml	24Std
Complex V	Oligomycin	70% Ethanol	80 nM	8 mM		24Std
			8 µM	8 mM		24Std
			80 µM	8 mM		24Std
uncoupling	CCCP	DMSO	5 µM	50 mM		24Std
			50 µM	50 mM		24Std
			100 µM	50 mM		24Std
mtDNA	Doxorubicin	DMSO	0,04 µM	1 mM		24Std
			1,7 µM	1 mM		24Std
			17 µM	1 mM		24Std
			30 µM	1 mM		24Std
mtDNA	Resveratrol	DMSO	0,2 µM	285 mM	65 mg/ml	24Std
			5 µM	285 mM	65 mg/ml	24Std
			20 µM	285 mM	65 mg/ml	24Std
			50 µM	285 mM	65 mg/ml	24Std
mtDNA	Bleomycin	DMSO	98 ng/µl		2 mg/ml	24hrs
			20 µg/µl		2 mg/ml	24hrs
			40 µg/ml		2 mg/ml	24hrs
			20 µg/µl		2 mg/ml	2hrs
			40 µg/ml		2 mg/ml	2hrs

6.12 3D Zellkultur (Sphäroide)

3D Zellkultur

Der genaue Ablauf, wie diese Sphäroide hergestellt werden, ist in Abbildung 6-15 zu finden. Nach der Zellernte, Zellzahlbestimmung und Färbung der Zellen mit 1µg/ml Höchst 33342 in PBS wurden die Zellen so in 100µl oder 200µl Vollmedium aufgeteilt, dass pro einem Well (in einer 96 Wellplatte) zwischen 500 Zellen und 50.000 Zellen ausgesät werden konnte. Die gesäte Zellzahl war abhängig vom Ziel des Experimentes.

Mito-GFP Expression in 3D Zellkulturmodell

Das 3D Zellkulturmodell wurde so weiterentwickelt, dass man damit induzierbare stabile Zielproteine (Überexpression und Knockdown) über einen längeren Zeitpunkt verfolgen kann. Die hier verwendeten induzierbaren stabilen Zelllinien (Expression von Mito-GFP) wurden wie in Kapitel 6.9 beschrieben hergestellt und wie in Abbildung 6-16 weiterverarbeitet. Bei dieser Methode war zu beachten, dass die Zellen immer mit 1x Cell dissociation solution abgelöst wurden, damit das Konstrukt weiter stabil exprimiert werden konnte. Um sicherzugehen, dass die mitochondriale Struktur erhalten bleibt, wurde eine neue Fixierungsmethode für das 3D System etabliert (siehe Kapitel 6.5.4). Die fixierten eingebetteten Sphäroide wurden mit unterschiedlichen hochauflösenden Mikroskopen ausgewertet. Zwei dieser Mikroskope, die zum Einsatz kamen, waren das konfokale Mikroskop (Astrid Heim (AG Prof. Dr. Böttger, LMU) und das 3D-SIM, OMX (Andreas Maiser (AG Prof. Dr. Leonhardt, LMU), ein sehr hoch auflösendes Mikroskop. Das 3D-SIM, OMX ermöglichte es, jede einzelne Zelle im Sphäroid zu fokussieren und abzulichten. Dadurch war es möglich gezielt Zellen aus dem äußeren Bereich (Proliferationszone, PZ), mittleren Bereich (Ruhezone, Quiescentzone, QZ) und Innenbereich (nekrotische Zone, NZ) auszuwählen und zu dokumentieren. Die großen Datensätze wurden im Image J zu einem Film verarbeitet oder es wurden einzelne Schnitte zur Veranschaulichung verwendet und in Photoshop bearbeitet und ausgewertet.

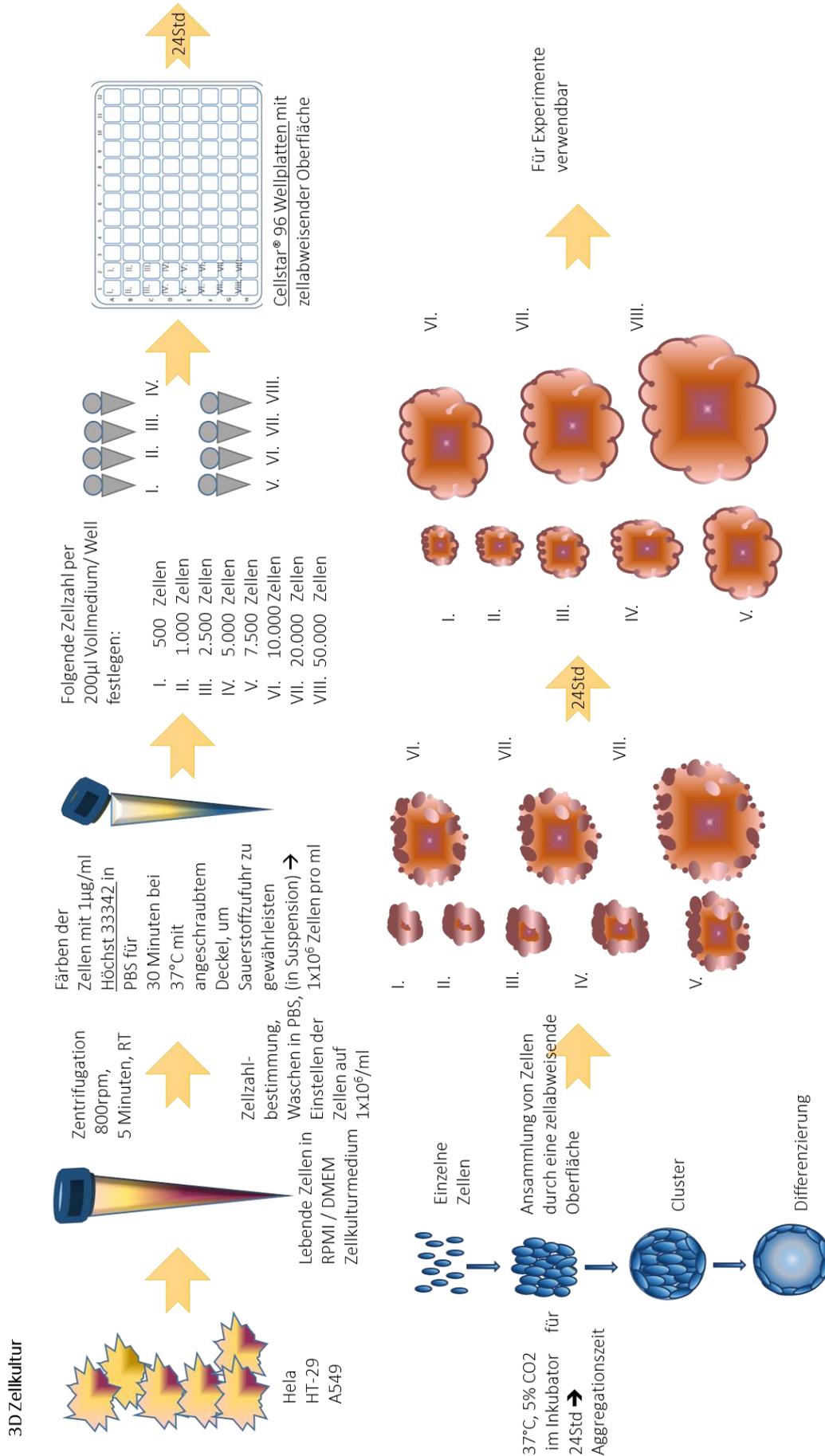
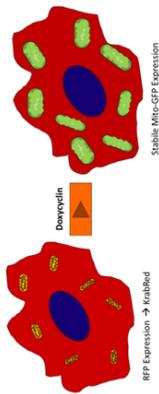


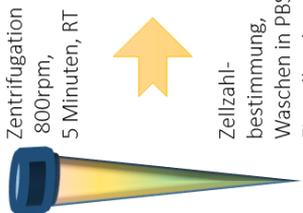
Abbildung 6-15: Herstellung der 3D Zellkultur (Sphäroide)

3D Zellkultur mit Mito-GFP Überexpression

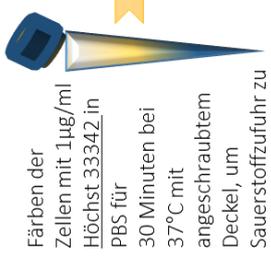


HeLa KR, HT-29 KR, A549 KR, etc.
→ mit stabiler Mito-GFP Expression induziert mit 250ng/ml Doxycyclin für mindestens 3 Tage

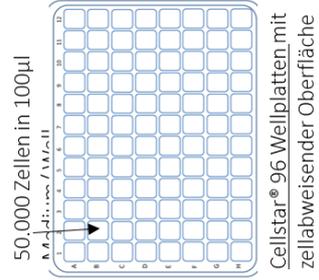
Ablösen der Zellen mit 1x Cell Dissociation solution, damit dass Konstrukt auch weiter exprimiert wird



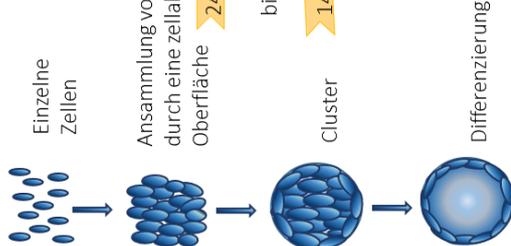
Zellzahlbestimmung, Waschen in PBS, Einstellen der Zellen auf 1×10^6 /ml



Zellen mi PBS waschen, danach Zellzahlso einstellen, dass z. B. 50.000 Zellen in 100µl oder 200µl Vollmedium (+750ng/ml Doxycyclin) /Well sind



24Std
37°C, 5% CO2 im Inkubator für mindestens 24Std



- Im 24 Stundenakt werden die Sphäroide gererntet:
- Waschen mit 1xPBS
 - Fixieren mit 4% PFA für 5 Minuten
 - Waschen mit 1xPBS 2x
 - Fixieren mit eiskaltem 100% Methanol für 5 Minuten
 - Waschen mit 1xPBS 2x
 - Auf einem Objektträger mit Vectashield einbetten
 - Mit Deckglas und Nagellack versiegeln

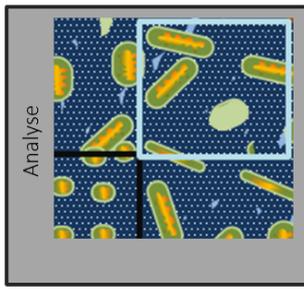
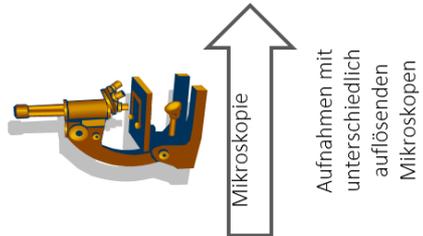
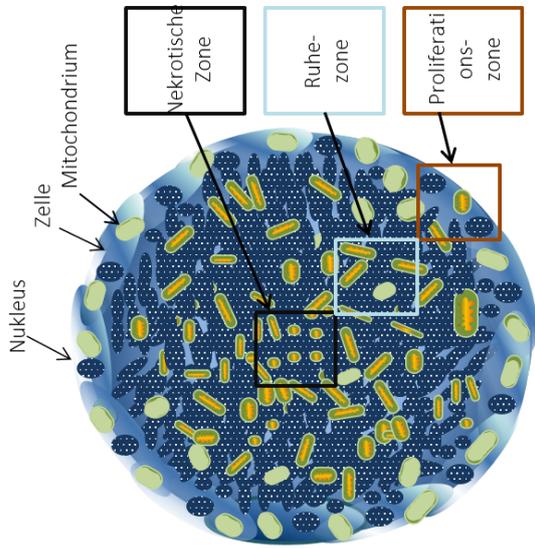


Abbildung 6-16 Mito-GFP Expression im 3D Modell

6.13 AlkBh1 und AlkBh7 in *C. elegans*

Experimente für AlkBh1 und AlkBh7 mit Knockdown und Überexpression in *C. elegans* in Kooperation mit Dr. Stephane Rolland (AG Prof. Barbara Conratt, LMU) durchgeführt.

Dazu wurden die Plasmide für die Knockdowns in den Vektor L4440 kloniert. Diese Plasmide haben jedoch nicht funktioniert. Deshalb wurden von Dr. Stephane Rolland (AG Prof. Barbara Conratt, LMU) die *C. elegans* Sequenzen in einen pBluescript Vektor mit T7 Promotor auf einer Seite und T3 Promotor auf der anderen Seite kloniert. Dabei wurden zwei komplementäre Einzelstrang RNA's *annealed*, um dsRNA herzustellen.

Nach der Injektion von dsRNA von AlkBh1, AlkBh7 oder einer Kontrolle in jeweils 10 Erwachsene Wildtyp Würmer (N2), wurden diese nach 24 Stunden für 4 Stunden auf eine Agarplatte ausgesetzt. In dieser Zeit legten die Würmer Eier, die erwachsenen Würmer wurden danach entfernt. Die Entwicklung der Embryos für 72 Stunden bei 20°C wurde dokumentiert.

```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90 * 100 * 110 * 120 * 13
1 AACCTGGCTTATCGAAATTAACGACTCACTATAGGGAGACCGGAGATCTGATATCAICGATGAATTCGAGCTCATGTTATTGAGCATTTCTGGAAAGCCTATGGAAACATACGAAACCGAATTGGAT
130 CACGGAAAATGGAACTTTTCAGAAATAAAGCGCAITCAIGATGAAGAAGTGGCCAGGAAATGGAAATTAAGAAAAGAAATCGATCAATACGCGGATCCTCCGGGGAAGACTCTGACGACGG
259 ATCCAAATTTATCAAGCTGTTTCAAAAAATAAAGAAACGAAGCGCTCACCGGAGCTTTCTGAGCTTATTGACGTCAAAAGCTCTTCGCTGCTCCAAATCAAAATAGTATTAGTACGGATGAGAT
388 CACATCAGAGACGACATCGCTTGCAGGAGATAGGTCTAATTCCTGATCCGAGTGGGCTGCTATTGGTTTTCCCGATCGTATTGGCCTATATCTCCTGCCAAGCCTTTACGGAAGAAAATCGAG
517 ATGTGGATGAACGAGCTTCAAGTACGCCGAACCGAATATCAGAAATTTGGTACCCTAATTCGCTTATAGTGGTCTATTACGCGCTCACTGGCGCTGTTTTACAAGCTCGTACTGGG
646 AAAACCTTGGCTTACCACTTAATCGCTTTCAGCACATCCCGCTTTCGCGACTGGGCTAATAGCGAAGAGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACGTTGGCGAGCTGAATGGCGAATGGGACG
775 GCGCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGTACGGCGAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCCGTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCT
904 TCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGAGTTTASTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATAGGGTGAATGTTCACTAGTGGCCATCGCCTGATAGACGGTTI
1033 TTCGCTTTGACGTTGGAGTCCAGTTCCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAAACACTCAACCTTCTCGCTCTATTCTTTGATTTATAAGGATTTTGGCGATTTGGCTATTGGT
1162 TAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAAGCGAATTTAACAATAAATTAAGCGCTTCAAAATTTAGTGGCCTTTTCGGGAAATGTGGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTC
1291 AAATATGATCCGCTCATGACAAATAACCTGATAAATGCTTCAATAAATTAAGAAAAGAAAGAGTATGATTAACAATTTCCGTTGCGCCCTATTCCCTTTTTGGCGAATTTGGCTTCTGT
1420 TTTTGTCCACCGAAGCGCTGTAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGTGCAGAGTGGGTACATCGAATGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCGGAAGAACGTTI
1549 TCCATGATGAGCATTTTAAAGTTCGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACCGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTTCTCAGAATGACTGGTTGAGTACTCACCAGTCA
1678 AGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTAAGAAATTAAGCATGCTGCCAATACCATGATGATAACTCTGCGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTI
1807 GCACAACATGGGGATCATGTAATCGCTTGTATCGTTGGGAACGGAGCTGAATGAACCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCGCTGATCAATGGCAACAACTGGCGAACTATTAA
1936 TGGCAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAACAAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTCGCTCGGCCCTTCCGGTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGG
2065 TGAGCGTGGGTCTCGCGGATCAITGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTAICGTAATATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
2194 TGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATGATTTAAACTTCAATTTTAAATTAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACAA
2323 AATCCCTTAACGTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGCTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAAGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAAAAAACCCCGCTACCAG
2452 GGTGGTTTTGTTGGCGGATCAAGAGCTACCACTCTTTTCCGAGGTTAATCGCTTCCAGAGCGCGAGATACCAAACTGCTTCTGATGAGCTAGTGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTI
2581 AGCACCGCTTACATACCTGCTCTGCTAATCCGTTTACCAGTGGCTGCTCCAGTGGCGATAGCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTACCAGTAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAAC
2710 GGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCAACCACTACACGAACTGAGATACCTACAGCGTGGACTGAGAAAAGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGATCCGGTAACGG
2839 CAGGTCCGAAACGAGAGCCACGAGGAGCTTCCAGGGAAACCGCTGATCTTATAGTCTGCTGGGTTTTCCGCACTCTGACTTGAAGCTCGATTTTGTGATCTGCTCAGGGGGCGGAG
2968 CCTATGGAAAACCGCACCAACCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCTTTTGTGCTGCTTTTGTCTCAGATGTTCTTCTGCTGATCCCTGATCTGAGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAAG
3097 TGATACCGCTCCCGCAGCGAAGCAGCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAG
    
```

Abbildung 6-17 AlkBh1 (Y51H7C.5, 1-495) kloniert in L4440 Plasmid mit SacI und KpnI Zusammenstellung der Sequenzen mit ApE A Plasmid Editor

```

1  * 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90 * 100 * 110 * 120 * 130
130 AACCTGGCTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCGAGTCTGATATCATCGATGAATTCGASCTCATGAAAAATACACCGAGAAGCTCTGCAACATTGATAAAAATTCATAATTGGA
259 ACTGTGGCCGAAGGATTGGCTGAAACTATGAAAACCTGCTGTATGTAAAAAAGATTTCATCAGAGAGCCGAGAGAAAAGCCTCTCGTCGACGTTGAGCCACATGAAGCGCTTCGGTACGA
388 GAAGAGCCATTGGGACGATGCCATCCACTATACCGAGAACGTGAGCAACGAAAATGGCGAGACGAGAATCTCGAAGTGATCTCCCGCATCCGGAGTGAATGTTTGGCCGCAACACCGAACCATTGAC
517 CTACGTGCATATTTGGATCTACACAAGGACGGTGTATCAAAACACACATTCGACGCGATTTCGATGATTTGGTGACGTATCACGGGTGTCTCCCTGCTCTCCGACGCTAATATGCGGCTCCGGCACAA
646 GGATCAGAGGATGAATGATGATCTTCGATGCTAGAAAGATTTATATGGTACCCTAATTCGCGCTATAGTGAGTCGATTAACGCGCGCTCAGTGGCGGTCGTTTACAACTCGTGACTGGG
775 AAAACCTTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGGAGCACATCCCGCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGAGC
904 CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGGGGTTGGTGGTTACGGCAGCGTGAACGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCCTTCGCTTCTCCCTTCCTTTCGCGCAGTTTCGCGGCT
974 TTCCTCCGTCAGACTTAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTCTTTACGCGACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGAATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGCTTT
1033 TTCGCCCTTTCGACTTGGAGTCCAGCTTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAACTGGAAACACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATCTTTTGATTATAAGGATTTTGGCGATTTTCGCGCTATTGGT
1162 TAAAAAATGAGCTGATTAACAAAAATTAACCGGAAATTTAACAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGGGAACCCCTAATTTGTTAATTTTCTAATATCCT
1291 AAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTCGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAGGAGAGTATGATTAACAATTCGCTCGCCCTTATCCCTTTTTCGCGCATTTTCCTTCCTGT
1420 TTTTGTCCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGTAAAGTCCCTTGAGAGTTTTCGCCGGAAGAGCTTT
1549 TCCATGATGAGCATTAAAGTCTGCTATGTCGCGGGTATATCCGCTATTCAGCCTGGGCAAGAGCACTCGGTCGCGCCATACACTATCTCAGAAATGACTTGGTGGTACTCACCGATC
1678 AGAAAGCTCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAAATATGACAGTCTGCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATCTACTCTGCAACGATCGAGGACCGAAGAGCTAACCGCTTTTTT
1807 GCACAAGATGGGGATCATGTAATCGCCTTGTGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCATAACAAAGCAGCGCTGACACCCGATGCTGTAGCAATGGCAACAGCTTGCSCAACTATTAAAC
1936 TGGCAACTACTTACTTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGATGGAGCGGATAAAGTTCGAGGACCCTTCTCGCTCGGCCCTTCGCGTGGCTGGTTTATGCTGATAAACTGGAGCCGG
2065 TGAGCTGGGTCTCGGGTATCATTGCAGCAGTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTASTTATCTACAGCAGGGAGTCAGGCACTATGGATGACGAAATAGACGATCGCTGAGATAGG
2194 TGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTGACAGCCAGTTTACTCATATATACTTAGATTGATTAAAACCTTCATTTTAAATTAAGAGGATCTAGGTGAAGATCCCTTTTGATATCTCATGACCAA
2323 AATCCCTTACGTGAGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAAGATCTCTTGAGATCCCTTTTTTCTGGCGTAACTGTGCTGTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCACG
2452 GGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGTACCAACTTTTTTTCGAGAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCCGAGATACCAAACTGCTCTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
2581 ASCACCGCTCATACCTCGCTCTGCTAATCCGTTTACCAGTGGCTCTCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCCGACGCGCTCGGCTGAAC
2710 GGGGGGTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAAGCACTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCCGACGCTTCCGAGGGGAGAAAGCGGACAGTATCCGGTAAGCGG
2839 CAGGTTCGAGCAGGAGAGCCAGAGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGTATCTTTAATAGTCTGTGGGTTTCGCCACTCTGACTTGAAGCTCGAATTTTGTGATGCTGTGAGGGGGCGGAG
2968 CCTATGAAAAACCCAGCAACCGCGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTTATGCTCAGATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATCTGTGGATACCGCTTATCCGCTTGTGAGTGAAC
3097 TGATACCCTCCCGCAGCCAGCCAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGGAGGAG

```

Abbildung 6-18 AlkBh7 (Y46G5A.35, 1-495) cloned in L4440 with SacI and KpnI
Zusammenstellung der Sequenzen mit ApE A Plasmid Editor

6.14 Mitochondriale DNA-Immunpräzipitation (mtDNA-IP) nach (Lu et al., 2007; Picca et al., 2013)

Die folgenden Methoden wurden alle von Ariane Hallermayr, Dr. Gitta Heinz und Olga Swolski etabliert, durchgeführt und ausgewertet.

Durchführung des Crosslinking nach Isolierung intakter Mitochondrien (Kapitel 6.7):

Zuerst wurde eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 9000g und 4°C durchgeführt, danach wurden die Mitochondrien mit eiskaltem PBS resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels Nanodrop bei 280nm bestimmt. Die isolierten Mitochondrien wurden wiederum für 10 Minuten bei 9000g und 4°C zentrifugiert. Die Fixierung der Mitochondrien in 500µl PBS mit 1% Formaldehyd (PBS plus 4% Formaldehyd) wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Im Anschluss wurde der Crosslinkingschritt mit 125mM Glycin (finale Konzentration, 26.32µl der 2.5M Stocklösung zu 500µl) mit einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Danach wurde die Suspension zweimal mit eiskaltem PBS, gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei 9000g und 4°C zentrifugiert. Diese Proben wurden für weitere Antikörper-IP verwendet.

Durchführung einer α-AlkBh1-IP oder α-TFAM-IP im Vergleich zur Kontrolle (siehe Kapitel 6.8)

Vorbereitung des mitochondrialen Lysats für die unterschiedlichen IP's. Dazu wurden Lysepuffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, -20°C; Phosphatase Inhibitor Cocktail 2&3, Sigma, 4°C → 1:100 alle wurden 1:100 verdünnt) dazugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, zwischendrin wurde gevortext. Im Anschluss wurde das Lysat sonifiziert, um die Mitochondrien aufzuschließen und die DNA

zu fragmentieren. Dazu wurden 30% Amplitude, 0.5 Cycles, 10x 10 Pulse verwendet. Die Zentrifugation der Suspension dauerte 10 Minuten bei 13.000g und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt; dann wurde das Lysat mit 40µl leeren ProteinGAgarose Beads für 30 Minuten bei 4°C drehend inkubiert. Diese Beads wurden mit einer Zentrifugation von 2 Minuten bei 5000g und 4°C pelletiert. Das Mitochondriale Lysat wurde in zwei geteilt und eine Hälfte des Lysats wurde für die α -AlkBh1-IP und die andere für die Kontroll-IP genutzt. Dabei wurden folgende Antikörper verwendet: 10µl anti-AlkBh1 (Abcam, ab49738, IgG1, 2mg/ml) und Lysat und 20µl anti-Flag (Sigma, M2, F1804, 1mg/ml) Während dessen wurden unspezifische DNA-Bindestellen der ProteinG-Sepharose geblockt, indem die Sepharose mit 200µL 200µg/mL Lachssperma-DNA und 500 µg/mL BSA für mehr als zwei Stunden bei 4°C inkubiert wurde. Die Beads, Antikörper und mitochondriale Lysate werden rotierend für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Damit wurden die ProteinGAgarose Beads für 1,5 Stunden und 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads 3x mit 500µl niedrig-Salz RIPA Puffer gewaschen und für 2 Minuten bei 5.000g bei 4°C zentrifugiert. Danach werden die Beads 3x mit 500µl RIPA Puffer mit hohem Salzgehalt für 5 Minuten bei 4°C inkubiert und wiederum für 2 Minuten bei 5.000g für 4°C pelletiert. Daraufhin wurden die Beads noch drei Mal mit 500µL LiCl Puffer je 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurden die Beads zweimal mit 500µl TE Puffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) behandelt und in ein neues Reagenzgefäß überführt. Beim letzten Waschschrift wurde die Beadssuspension in zwei geteilt. 200µL Beadssuspension wurden zentrifugiert und in 40µL Laemmli Puffer für die Western Blot Analyse aufgekocht. Die Restlichen 300µL wurden pelletiert und in 200µL 0,5% SDS in TE Puffer bei 65°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads mit 20µg Proteinase K für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1/10 des Überstandvolumens mit 3M Natriumacetat und dem 2,5fachen des Überstandvolumens mit kaltem, absolutem Ethanol aufgefüllt. Die DNA wurde bei -20°C über Nacht gefällt und am nächsten Morgen bei 15000rpm für 30 Minuten bei 4°C pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die präzipitierte DNA in 40µL H₂O aufgenommen und mit dem PCR clean up Kit (PCR clean up Protokoll, Macherey-Nagel) gereinigt.

PCR

Um eine direkte Interaktion von AlkBh1 mit der mtDNA zu überprüfen, wurde die Immunpräzipitationen (IP, siehe Kapitel 6.8) von α -AlkBh1-IP oder α -TFAM aus isolierten Mitochondrien (HEK293T, Mitochondrienisolation, siehe Kapitel 6.7) nach Formaldehyd-crosslinking durchgeführt. Die Formaldehydbehandlung dient der Bewahrung von mtDNA-Protein Interaktionen. Bei dieser Methode wird nach der α -AlkBh1-IP eine Standard-PCR

(siehe Kapitel 6.3.2) mit spezifischen Primerpaaren [F1234-R1769 aus (Levin, Cheng, & Reeder, 1999)] durchgeführt. Bei einer Interaktion von AlkBh1 mit der DNA sollte eine Amplifikation der mtDNA auf dem Agarosegel nachweisbar sein. Diese Methode wurde von Ariane Hallermayr, Dr. Gitta Heinz und Olga Swolski (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz München) etabliert, durchgeführt und ausgewertet.

Dot Blot

Diese Methode wurde von Olga Swolski (AG Dr. Alex Wolf, Helmholtz München) etabliert, durchgeführt und ausgewertet. Es wurden zuerst Mitochondrien isoliert und mtDNA-IP, wie beschrieben durchgeführt. Danach wurde zum Abgleich zu den Proben eine Verdünnungsreihe von Nukleinsäuren (Lachssperm-DNA) hergestellt. Begonnen wurde mit 300ng per 2 μ l; und beendet wurde mit 3,125ng pro 2 μ l; ddH₂O wurde als Negativkontrolle verwendet. Dann wurde eine Nitrozellulosemembran vorbereitet und ein kleiner Punkt pro Konzentration jeweils je 2,5 μ l bis 0,5 μ L auf auf die Membran aufgetragen. Diese wurde anschließend an der Luft für 5 Minuten getrocknet und danach für 1 Stunde bei 70°C gebacken. Im Anschluss wurde die Membran mit Blocklösung für eine Stunde geblockt. Danach mit α -DNA-Antikörper (AC-30-10, Progene) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Protokoll für den Western Blot verwendet (Kapitel 6.3.9).

7. Abkürzungen

%	<i>Prozent</i>
3D	<i>Drei dimensionale Zellkultur</i>
1-MeA	<i>1-Methyladenine</i>
2-OG	<i>2-Oxoglutarat, α-Ketoglutarsäure</i>
3-mC	<i>3-Methylcytosine</i>
6mA	<i>6-Methyladenin</i>
α	<i>anti</i>
AAA	<i>ATPases associated with a variety of cellular activities</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AK	<i>Antikörper</i>
AlkB	<i>Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase</i>
AlkBH	<i>AlkB Homolog</i>
amp	<i>Ampicillin</i>
Apaf-1	<i>Apoptosis-activating factor-1</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
AS	<i>Aminosäuren</i>
ATAD3A	<i>ATPase family AAA domain-containing protein 3A</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell-lymphoma2</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology 3</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BK	<i>Bakterienkultur</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ²⁺	<i>Calcium</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domains</i>
Caspases	<i>cysteine-aspartic acid proteases</i>
CCCP	<i>Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon</i>
Ced	<i>Cell death abnormal</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CO ₂	<i>Kohlendioxid</i>

<i>C-terminal</i>	<i>Carboxyterminal</i>
<i>Da</i>	<i>Dalton</i>
<i>DAPI</i>	<i>4,6-Diamin 2-phenylindol</i>
<i>ddH₂O</i>	<i>MilliQ ddH₂O</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilo Dalton</i>
<i>Dark</i>	<i>Drosophila Apaf-1 related killer</i>
<i>DAPI</i>	<i>4,6-2-phenylindoldihydrochlorid Diamidino-2</i>
<i>DD</i>	<i>Death domain</i>
<i>DED</i>	<i>Death effector domain</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>ds DNA</i>	<i>Doppelsträngige DNA</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxy-Nukleosid-Triphosphat</i>
<i>DOB</i>	<i>Drop out base</i>
<i>DSBH</i>	<i>Double-stranded beta-helix</i>
<i>DTT</i>	<i>Dithiotreitol</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylen-Diamin-Tetraacetat</i>
<i>Egl-1</i>	<i>Egg laying defective</i>
<i>EGTA</i>	<i>Ethylenglycoltetraacetat</i>
<i>ER</i>	<i>endoplasmatische Reticulum</i>
<i>EST</i>	<i>Expressed Sequence Tags</i>
<i>EtBr</i>	<i>Ethidiumbromid</i>
<i>EtOH</i>	<i>Ethanol</i>
<i>GFP</i>	<i>Grün fluoreszierendes Protein</i>
<i>f⁵C</i>	<i>5-Formylcytosine</i>
<i>FACS</i>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<i>FADD</i>	<i>Fas associated protein with a death domain</i>
<i>Fas L</i>	<i>Fas Ligand</i>
<i>FASTKD2</i>	<i>FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial</i>
<i>Fe(II)</i>	<i>Eisen</i>
<i>FITC</i>	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
<i>FKS</i>	<i>Fetales Kälberserum</i>
<i>FTO</i>	<i>AlkBh9, fat mass and obesity associated</i>

<i>GST-</i>	<i>aminoterimanler Glutathion-S-Tarnsferase-Taq</i>
<i>HA</i>	<i>Hemagglutinin</i>
<i>HEK 293T- Zellen</i>	<i>human embryonic kidney- cell line</i>
<i>HIF-α</i>	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
<i>Hsp60</i>	<i>mitochondriales Heat Shock Protein, 60kDa</i>
<i>IAP</i>	<i>Inhibitors of apoptosis</i>
<i>IF</i>	<i>Immunfluoreszenz</i>
<i>IgG</i>	<i>Immunglobulin G</i>
<i>IPTG</i>	<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid</i>
<i>JMJD6</i>	<i>Bifunctional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase</i>
	<i>JMJD6</i>
<i>K</i>	<i>Lysin</i>
<i>kDa</i>	<i>kilo Dalton</i>
<i>KCl</i>	<i>Kaliumchlorid</i>
<i>KDM</i>	<i>Lysine demethylases</i>
<i>KD</i>	<i>Knockdown</i>
<i>KO</i>	<i>Knockout</i>
<i>KRS</i>	<i>KrabRed System</i>
<i>LB</i>	<i>Luria Bertani</i>
<i>LiAc</i>	<i>Lithiumacetat</i>
<i>MgSO₄</i>	<i>Magnesiumsulfat</i>
<i>m⁵C</i>	<i>5-Methylcytosine</i>
<i>m⁶A</i>	<i>N⁶-methyl-adenosine</i>
<i>MMS</i>	<i>Methanesulfonat</i>
<i>mRNA</i>	<i>messenger-RNA</i>
<i>mSSBP</i>	<i>mitochondrial single strand binding protein</i>
<i>-myc-(His)₆</i>	<i>carboxyterminaler Myc-sechsfacher Histidin-Tag</i>
<i>MS</i>	<i>Massenspektrometrie</i>
<i>MT</i>	<i>Metabolismus Test /Assay</i>
<i>NaCl</i>	<i>Natriumchlorid</i>
<i>NaOH</i>	<i>Natriumhydroxid</i>
<i>NB-ARC</i>	<i>Nucleotide-binding adaptor shared by Apaf-1, R proteins and ced-4</i>
<i>NBD</i>	<i>Nucleotide binding domain</i>
<i>N-terminal</i>	<i>aminoterminal</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxynukleotidtriphosphat</i>

<i>O₂</i>	<i>Sauerstoff</i>
<i>OD</i>	<i>optische Dichte</i>
<i>P oder PD</i>	<i>Prodomäne</i>
<i>PAGE</i>	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase-Kettenreaktion = Polymerase chain reaction</i>
<i>PEG</i>	<i>Polyethylenglykol</i>
<i>PFA</i>	<i>Paraformaldehyd</i>
<i>PHD</i>	<i>prolyl hydroxylase domain</i>
<i>PMSF</i>	<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>
<i>PD</i>	<i>Pulldown</i>
<i>PDS</i>	<i>Particle delivery system</i>
<i>PT</i>	<i>Proliferationsassay</i>
<i>Upm</i>	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
<i>RACE</i>	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure</i>
<i>Rpm</i>	<i>rotations per minute</i>
<i>ROS</i>	<i>„reactive oxygen species“</i>
<i>RT</i>	<i>Raumtemperatur</i>
<i>SAP</i>	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
<i>SDS</i>	<i>sodium dodecyl surface</i>
<i>ssDNA</i>	<i>einzelsträngige DNA</i>
<i>SU</i>	<i>small unit, kleine Untereinheit</i>
<i>TAE</i>	<i>Tris-Acetat EDTA</i>
<i>TBS</i>	<i>Tris Buffered Saline</i>
<i>TEMED</i>	<i>N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamid</i>
<i>TET</i>	<i>Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase</i>
<i>TF</i>	<i>Transfektion</i>
<i>TFAM</i>	<i>Mitochondrial transcription factor A</i>
<i>TM</i>	<i>Transmembrandomäne</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Tumornekrosesfaktor</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
<i>TTFA</i>	<i>Thenoyltrifluoroacetone</i>
<i>ÜK</i>	<i>Übernachtkultur</i>
<i>UV</i>	<i>Ultraviolett</i>

<i>WD40-“Repeats”</i>	<i>kurze bis zu 40 Aminosäuresequenzen, die oft mit Tryptophan und Aspartat enden.</i>
<i>WT</i>	<i>Wildtyp</i>
<i>YNB</i>	<i>Yeast nitrogen base</i>
<i>ZK</i>	<i>Zellkultur</i>

8. Abbildungsnachweisverzeichnis

Abbildung 2-1 Die Mitglieder der Proteinfamilie der 2-OG-Oxygenasen beeinflussen die Regulation der Genexpression von der Transkription bis zur Proteinbiosynthese.....	2
Abbildung 2-2 Oxidative Demethylierung von 1-meA (1-Methyladenin) durch AlkB	3
Abbildung 2-3 Übersicht über die Funktionen von unterschiedlichen AlkB Homologen (AlkBh)	5
Abbildung 2-4 Phänotypen von AlkBh1 Knockout Mäusen	7
Abbildung 2-5 Lokalisation und Funktion von AlkBh7 aus unterschiedlichen Blickwinkeln	9
Abbildung 4-1 <i>Alignment</i> von humanem AlkBh1 (Q13686) und bakteriellem AlkB (P05050)	12
Abbildung 4-2 <i>Alignment</i> von unterschiedlichen AlkBh1 Proteinsequenzen von diversen Modellorganismen	13
Abbildung 4-3 Lokalisationsbestimmung von endogenem AlkBh1 mittels Mitochondrienisolierung und Western Blot.....	15
Abbildung 4-4 Lokalisationsbestimmung von AlkBh1 nach der Überexpression im pEGFP Vektor mittels Mitochondrienisolierung und Western Blot	16
Abbildung 4-5 HeLa Zellen mit endogenem AlkBh1 allein oder kofärbt mit Mito-GFP	18
Abbildung 4-6 Panc-1, PC-3, HT-29 Zellen zeigen Expression von Mito-GFP kofärbt mit endogenem AlkBh1	19
Abbildung 4-7 HeLa Zellen zeigen Koexpression von transientem Mito-GFP mit ungetagtem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1)	20
Abbildung 4-8 PC-3, A549 und HT-29 Zellen zeigen Koexpression von Mito-GFP mit ungetagtem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1)	21
Abbildung 4-9 Lokalisation und Aktivität der ATAD3 Familie in den Mitochondrien.....	24
Abbildung 4-10 Antikörpervalidierung von α -AlkBh1 und α -ATAD3A AK in HEK293T mittels WB	25
Abbildung 4-11 Validierung der Interaktion von AlkBh1 und ATAD3A in isolierten Mitochondrien aus HEK293T Zellen	25
Abbildung 4-12 Bestimmung der Überlagerung von endogenem AlkBh1 mit ATAD3A in A549 Zellen mittels IF	26
Abbildung 4-13 Bestimmung der Überlagerung von endogenem AlkBh1 mit ATAD3A in HeLa Zellen mittels IF	27
Abbildung 4-14 Validierung der Interaktion von überexprimiertem AlkBh1 und AlkBh7 aus ganzem Zelllysate (HEK293T Zellen) mittels Antikörper-IP	28
Abbildung 4-15 Kofärbung von ungetagtem überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) mit AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7) in HeLa Zellen mittels IF	29
Abbildung 4-16 Strukturelles Modell eines mitochondrialen Nukleoids und detaillierter Aufbau der mitochondrialen DNA mit kodierbaren Genen.....	30
Abbildung 4-17 Überblick über den Aufbau der Nukleoide und mitochondriale RNA Granules	31
Abbildung 4-18 Mitochondrium mit möglicher Lokalisation von AlkBh1.....	32
Abbildung 4-19 Bestimmung der Kolokalisation von endogenem AlkBh1 mit TFAM in A549 Zellen mittels IF und Überprüfung der direkten Interaktion mittels Ko-IP.....	33
Abbildung 4-20 Mögliche Interaktion von AlkBh1 mit H2A und TFAM.....	34
Abbildung 4-21 Bestimmung der Kolokalisation von endogenem AlkBh1 mit mtSSBP in A549 Zellen mittels IF	35
Abbildung 4-22 Kolokalisation von ungetagtem überexprimiertem AlkBh1 (pcDNA3_AlkBh1) mit endogenem mtSSBP in HeLa Zellen mittels IF	36
Abbildung 4-23 Bestimmung der Überlagerung von endogenem AlkBh1 mit mtDNA in A549 Zellen mittels IF	37
Abbildung 4-24 PCR Amplifikation und Dot Blot zur Überprüfung einer möglichen Interaktion von AlkBh1 und mtDNA.....	39
Abbildung 4-25 Bestimmung der Kolokalisation von endogenem AlkBh1 und Hsp60 in A549 Zellen mittels IF	40

Abbildung 4-26 Bestimmung der Kolo-kalisation von endogenem AlkBh1 und FASTKD2 in A549 Zellen mittels IF	41
Abbildung 4-27 Modell über Funktion und mögliche Interaktionspartner von AlkBh1 in den Mitochondrien.....	42
Abbildung 4-28 <i>Alignment</i> von humanem AlkBh1 (Q13686) mit AlkBh1 Homolog aus <i>C. elegans</i> Y51H7C.5 (E0DBL0).....	43
Abbildung 4-29 <i>Alignment</i> von humanem AlkBh7 (Q3BT90) mit AlkBh7 Homolog aus <i>C. elegans</i> Y46G5A.35 (Q7YWP5)	44
Abbildung 4-30 Knockdown von AlkBh1 und AlkBh7 in <i>C. elegans</i> im Vergleich zur Kontrolle	44
Abbildung 4-31 Nachweis von induziertem Knockdown und Überexpression für AlkBh1 in HeLa Zellen.....	46
Abbildung 4-32 Proliferationsassay von AlkBh1 Knockdown Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle Wachstumsverhalten von stabil induzierbaren Knockdown HeLa Zelllinien (AlkBh1; KD5017, KD5020, KD7996) im Vergleich zur ns shRNA Kontrolle.). Zellzahl von Tag 0 wurde auf 1% festgelegt, die restlichen Tage wurden im Verhältnis zu Tag 0 normalisiert. Zellen wurden über sieben Tage hinweg nach Induktion beobachtet; (A. 1500 Zellsä-hzahl; B. 3500 Zellsä-hzahl; * = Signifikanz (Ausgewertet mit ttest); Read out: Operetta <i>High-Content Imaging System</i> ; Zellzählung mittels Kernfä-rbung (DAPI 1µg/ml).....	47
Abbildung 4-33 Proliferationsassay von AlkBh1 Überexpression im Vergleich zur Kontrolle Wachstumsverhalten von stabil induzierbaren Überexprimierern (HeLa Zelllinien für AlkBh1; ÜE_CD2_1, ÜE_GFP_1) im Vergleich zur Kontrolle (Mito-GFP). Zellzahl von Tag 0 wurde auf 1% festgelegt, die restlichen Tage wurden im Verhältnis zu Tag 0 normalisiert. Zellen wurden über sieben Tage hinweg nach Induktion beobachtet; A. 1500 Zellsä-hzahl; B. 3500 Zellsä-hzahl; * = Signifikanz; Read out: Operetta <i>High-Content Imaging System</i> ; Zellzählung mittels Kernfä-rbung (DAPI 1µg/ml)	48
Abbildung 4-34 Kodierung der mtDNA und Übersicht über die oxidative Phosphorylierung ..	50
Abbildung 4-35 Schema eines Mitochondriums, dass die Inhibitoren der einzelnen Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zeigt.....	51
Abbildung 4-36 Inhibierung des Komplexes I der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) ..	52
Abbildung 4-37 Inhibierung des Komplexes II und des Komplexes V der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS)	53
Abbildung 4-38 Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) mit CCCP	53
Abbildung 4-39 Wirkung von unterschiedlichen AlkBh1 Level auf die unterschiedlichen Komplexe der Atmungskette in HeLa Zellen auf Proteinebene mittels Western Blot.....	54
Abbildung 4-40 Überblick über die Modifikation von tRNA in den Mitochondrien	55
Abbildung 4-41 Schema eines Mitochondriums, dass die Inhibitoren der mtDNA Synthese und mtDNA Schädigende Agenzien zeigt.....	56
Abbildung 4-42 HeLa Zellen kogefä-rbt mit α-AlkBh1 AK (rot) und α-mtDNA AK (grün) behandelt mit Ethidiumbromid	58
Abbildung 4-43 Ethidiumbromid behandelte A549 Zellen kogefä-rbt mit α-AlkBh1 AK (rot) und α-mtDNA AK (grün)	59
Abbildung 4-44 A549 Zellen kogefä-rbt mit α-ATAD3A AK (grün) behandelt mit Ethidiumbromid	60
Abbildung 4-45 A549 Zellen kogefä-rbt mit α-AlkBh1 AK (rot) und α-TFAM AK (grün) behandelt mit Ethidiumbromid	61
Abbildung 4-46 Funktion und Wirkungsweise von Doxorubicin in den Mitochondrien	62
Abbildung 4-47 A549 Zellen kogefä-rbt mit α-AlkBh1 AK (grün), behandelt mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen für 24 Stunden.....	63
Abbildung 4-48 A549 Zellen kogefä-rbt mit α-SSBP AK (grün) behandelt mit unterschiedlichen Doxorubicinkonzentrationen für 24 Stunden	64
Abbildung 4-49 Doxorubicinbehandlung von A549 Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten	65
Abbildung 4-50 A549 Zellen kogefä-rbt mit α-AlkBh1 (grün) mit α-SSBP AK (blau) behandelt mit Doxorubicin.....	66

Abbildung 4-51 A549 Zellen mit transient exprimierten Mito-GFP (grün) kogefärbt mit α -SSBP AK (blau) behandelt mit Doxorubicin	67
Abbildung 4-52 A549 Zellen mit transient exprimiertem Mito-GFP (grün) kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) behandelt mit Doxorubicin	68
Abbildung 4-53 Modell wie Mitochondrien mittels Mitophagie und Autophagie ubiquitiniert werden Ansicht einer induzierten Mitophagie mit p62 als Marker mit anschließender Autophagie mit LC3 als Marker. Quelle: (Kubli & Gustafsson, 2012)	69
Abbildung 4-54 A549 Zellen gefärbt mit α -TFAM AK (grün) und α -p62 (rot), ein Mitophagiemarker, behandelt mit Doxorubicin	70
Abbildung 4-55 A549 Zellen gefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) mit α -LC3-B AK, ein Autophagiemarker behandelt mit Doxorubicin	71
Abbildung 4-56 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -TFAM AK (grün), behandelt mit Doxorubicin	72
Abbildung 4-57 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün) behandelt mit Doxorubicin	72
Abbildung 4-58 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -ATAD3A AK (grün), behandelt mit Doxorubicin	73
Abbildung 4-59 A549 Zellen kogefärbt mit α -SSBP AK (blau) und α -ATAD3A AK (grün), behandelt mit Doxorubicin	74
Abbildung 4-60 Skizze über die mögliche Lokalisation von AlkBh1 nach Doxorubicinbehandlung	75
Abbildung 4-61 Übersicht über die Wirkungsweise von Bleomycin und Aufbau des MRN-Reparatur Komplexes	76
Abbildung 4-62 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün), behandelt mit unterschiedlichen Bleomycinkonzentrationen für 2 Stunden	78
Abbildung 4-63 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -mtDNA AK (grün), behandelt mit unterschiedlichen Bleomycinkonzentrationen für 24 Stunden	79
Abbildung 4-64 Bleomycinbehandlung von A549 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitpunkten	80
Abbildung 4-65 A549 Zellen mit Expression von Mito-GFP und kogefärbt mit α -AlkBh1 AK, behandelt mit Bleomycin	81
Abbildung 4-66 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh1 AK (rot) und α -ATAD3A AK (grün), behandelt mit Bleomycin	82
Abbildung 4-67 <i>Alignment</i> von humanem AlkBh7 (Q9BT30) und bakteriellem AlkB (P05050)	83
Abbildung 4-68 Abgleich von unterschiedlichen AlkBh7 Proteinsequenzen von diversen Modellorganismen	84
Abbildung 4-69 Expression von endogenem und überexprimiertem AlkBh7 auf Proteinlevel	85
Abbildung 4-70 Expression von AlkBh7 auf RNA Ebene im Verhältnis zu AlkBh1 in HEK293T und HeLa (KR)	86
Abbildung 4-71 HeLa Zellen, mit Expression von Mito-GFP und kogefärbt mit endogenem AlkBh7	87
Abbildung 4-72 IF von AlkBh7 auf endogenem Level in HeLa und PC-3 Zellen	88
Abbildung 4-73 HeLa Zellen, mit Koexpression von Mito-GFP und ungetaggttem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7)	89
Abbildung 4-74 HEK293T, HT-29 und PC-3 Zellen mit einer Koexpression von Mito-GFP und ungetaggttem AlkBh7 (pcDNA3_AlkBh7)	90
Abbildung 4-75 Kofärbung von ungetaggttem überexprimiertem AlkBh7 mit endogenem TFAM, konfokaler Schnitt, Maßstab 20 μ m	93
Abbildung 4-76 Kofärbung von ungetaggttem, überexprimiertem AlkBh7 mit mtDNA	94
Abbildung 4-77 Stabil induzierbare HeLa KrabRed (KR) und A549 KR Zellen mit unterschiedlichen exprimierten AlkBh7 Levels auf RNA Ebene	95
Abbildung 4-78 A549 Zellen gefärbt mit α -AlkBh7_KL AK (grün) behandelt mit Doxorubicin	97
Abbildung 4-79 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh7_CS AK (rot) und α -TFAM (grün) behandelt mit Bleomycin	99

Abbildung 4-80 A549 Zellen kogefärbt mit α -AlkBh7_CS AK (rot) und α -p53 (grün) behandelt mit Bleomycin.....	100
Abbildung 4-81 Überblick über den Unterschied zwischen Monolayer (2D) und Drei dimensionale Zellkultur (3D, Sphäroid).....	101
Abbildung 4-82 Charakterisierung von Homöostase und Milieu in einer 3D Zellkultur	102
Abbildung 4-83 HeLa Monolayerzellen mit stabil exprimiertem Mito-GFP.....	104
Abbildung 4-84 3D Zellkultur Modelle (Sphäroide) mit unterschiedlichen Zellzahlen (HeLa) nach 48 Stunden	105
Abbildung 4-85 3D Zellkultur (Sphäroid) aus HeLa (50.000 Zellen) mit stabil exprimiertem Mito-GFP, ausgewertet mit dem 3D SIM, fixiert nach 48 Stunden	106
Abbildung 4-86 3D Zellkultur (Sphäroid) aus HeLa (50.000) mit stabil exprimiertem Mito-GFP ausgewertet mit dem 3D SIM, fixiert nach 96 Stunden	107
Abbildung 4-87 Morphologie der Mitochondrien in HeLa Monolayer Zellen unter der Bedingung der Normoxie und Hypoxie	108
Abbildung 5-1 Überblick über die Funktionsweise des MRN Komplex während der DNA Reparatur.....	115
Abbildung 6-1 Übersicht über verschiedene Transfektionsmethoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden	150
Abbildung 6-2 Immunfluoreszenz. Überblick über Transfektion, Fixierung und Antikörperfärbung von humanen Zelllinien in der IF.....	152
Abbildung 6-3 Stressfaktoren der mitochondrialen DNA.....	154
Abbildung 6-4 Aminosäuresequenz von AlkBh7 (Q9BT30) mit markiertem Peptid (grün) von der AS 51 bis AS 65	155
Abbildung 6-5 AlkBh7 Antikörper Test in unterschiedlichen Zelllinien	156
Abbildung 6-6 Methode zur Isolierung von Mitochondrien	158
Abbildung 6-7 Überblick die Durchführung einer Antikörper-IP	159
Abbildung 6-8 Erstellte shRNA Plasmide für den Knockdown von AlkBh1	161
Abbildung 6-9 Erstellte shRNA Plasmide für den Knockdown von AlkBh7.....	161
Abbildung 6-10 Vorlage einer Zielsequenz zum Klonieren in den pLVTHM Vektor mit der dazugehörigen Klonierungsseite (Quelle: http://lentiweb.com/cloning_strategies.php)	161
Abbildung 6-11 Überblick über die Bildung des stabilen induzierbaren KrabRed Systems .	163
Abbildung 6-12 Anwendungsbeispiele für KrabRed induzierte Zelllinien.....	164
Abbildung 6-13 Überblick über die Durchführung eines Proliferationsassays	165
Abbildung 6-14 Überblick über die Durchführung des Metabolismus Assay	166
Abbildung 6-15: Herstellung der 3D Zellkultur (Sphäroide)	169
Abbildung 6-16 Mito-GFP Expression im 3D Modell	170
Abbildung 6-17 AlkBh1 (Y51H7C.5, 1-495) kloniert in L4440 Plasmid mit SacI und KpnI ...	171
Abbildung 6-18 AlkBh7 (Y46G5A.35, 1-495) cloned in L4440 with SacI and KpnI	172

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Übersicht über die Verteilung von AlkB Homologen in Eukaryoten	4
Tabelle 4-1 Übersicht über möglichen Interaktionspartner von AlkBh1 nach α -AlkBh1-IP aus ganzen Zellysaten	23
Tabelle 4-2 Übersicht über mögliche Interaktionspartner für AlkBh1 nach α -AlkBh1-IP aus isolierten Mitochondrien.....	23
Tabelle 4-3 Erklärung der Kurzbezeichnungen für Knockdown, Überexprimierer und zugehörigen Kontrollen.....	45
Tabelle 4-4 Überblick über die hier verwendeten HeLa Zelllinien	55
Tabelle 4-5 Übersicht über mögliche Interaktionspartner für AlkBh7-IP aus ganzen Zellysaten.....	91
Tabelle 4-6 Übersicht über mögliche Interaktionspartner nach α -AlkBh7-IP aus isolierten Mitochondrien.....	92
Tabelle 4-7 Übersicht über verwendete Zelllinien mit unterschiedlicher AlkBh7 Expression .	95
Tabelle 6-1 Überblick über die verwendeten Chemikalien	120
Tabelle 6-2 Überblick über die verwendeten Enzyme und Puffer.....	123
Tabelle 6-3 Überblick über die verwendeten Kits.....	124
Tabelle 6-4 Überblick über die verwendeten Marker.....	124
Tabelle 6-5 Überblick über die verwendeten Beads.....	124
Tabelle 6-6 Überblick über die verwendeten Erstantikörper.....	125
Tabelle 6-7 Überblick über die verwendeten Zweitantikörper.....	126
Tabelle 6-8 Überblick über die allgemein verwendeten Materialien	127
Tabelle 6-9 Geräteliste	129
Tabelle 6-10 Überblick über die verwendeten Programme	130
Tabelle 6-11: Überblick über die verwendeten Webseiten	131
Tabelle 6-12 Überblick über die bereits verfügbaren Plasmide:	132
Tabelle 6-13: Überblick über die neu angefertigten Plasmide:	132
Tabelle 6-14 Verwendete Zelllinien.....	133
Tabelle 6-15 Verwendete Bakterienstämme	133
Tabelle 6-16 Primer für Knockdown in <i>C. elegans</i>	134
Tabelle 6-17 Primer für ungetaggte Überexpression in humanen Zellen	134
Tabelle 6-18 Primer für flaggetaggte (C-Terminal) Überexpression in humanen Zellen	134
Tabelle 6-19 Primer für stabile induzierbare Überexpression in humanen Zellen.....	134
Tabelle 6-20 Primer zum sequenzieren von verwendeten Proteinen	135
Tabelle 6-21 Programmierung einer PCR.....	141
Tabelle 6-22 Pipettierschema für einen Ligationsansatz.....	143
Tabelle 6-23 Liste mit verwendeten Primer für qPCR (Dr. Gitta Heinz, AG Dr. Alex Wolf) ..	154
Tabelle 6-24 Übersicht über die angewendeten Therapien und verwendeten Konzentrationen in der IF	155
Tabelle 6-25 Übersicht über hergestellt und getestete Antikörper für AlkBh7 von Frau Dr. Kremmer (IMI, Helmholtz Zentrum)	156
Tabelle 6-26 Übersicht über zellabhängige Parameter zum Isolieren von Mitochondrien ...	157
Tabelle 6-27 Übersicht über verwendete Therapien und Konzentrationen im Metabolismusassay.....	167

10. Literaturverzeichnis

- Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P. O., Vagbo, C. B., Skorpen, F., Akbari, M., . . . Krokan, H. E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, *421*(6925), 859-863. doi: 10.1038/nature01363
- Adam, J., Yang, M., Soga, T., & Pollard, P. J. (2014). Rare insights into cancer biology. *Oncogene*, *33*(20), 2547-2556. doi: 10.1038/onc.2013.222
- Alan, L., Spacek, T., Pajuelo Reguera, D., Jaburek, M., & Jezek, P. (2016). Mitochondrial nucleoid clusters protect newly synthesized mtDNA during Doxorubicin- and Ethidium Bromide-induced mitochondrial stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, *302*, 31-40. doi: 10.1016/j.taap.2016.04.011
- Antonicka, H., & Shoubridge, Eric A. (2015). Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. *Cell Reports*, *10*(6), 920-932. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.030
- Ashley, N., & Poulton, J. (2009). Anticancer DNA intercalators cause p53-dependent mitochondrial DNA nucleoid re-modelling. *Oncogene*, *28*(44), 3880-3891. doi: 10.1038/onc.2009.242
- Bakhanashvili, M., Grinberg, S., Bonda, E., Simon, A. J., Moshitch-Moshkovitz, S., & Rahav, G. (2008). p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis. *Cell Death Differ*, *15*(12), 1865-1874. doi: 10.1038/cdd.2008.122
- Brar, S. S., Meyer, J. N., Bortner, C. D., Van Houten, B., & Martin, W. J., 2nd. (2012). Mitochondrial DNA-depleted A549 cells are resistant to bleomycin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *303*(5), L413-424. doi: 10.1152/ajplung.00343.2011
- Brown, T. A., Tkachuk, A. N., & Clayton, D. A. (2015). Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) Binds to RNA Containing 4-Way Junctions and Mitochondrial tRNA. *PLoS One*, *10*(11), e0142436. doi: 10.1371/journal.pone.0142436
- Canugovi, C., Maynard, S., Bayne, A. C., Sykora, P., Tian, J., de Souza-Pinto, N. C., . . . Bohr, V. A. (2010). The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, *9*(10), 1080-1089. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.07.009
- Carter, H. N., Chen, C. C., & Hood, D. A. (2015). Mitochondria, muscle health, and exercise with advancing age. *Physiology (Bethesda)*, *30*(3), 208-223. doi: 10.1152/physiol.00039.2014
- Chen, H., & Chan, D. C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, *18*(R2), R169-176. doi: 10.1093/hmg/ddp326
- Chen, J., & Stubbe, J. (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*, *5*(2), 102-112. doi: 10.1038/nrc1547

- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., & Norwich, A. L. (1990). The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature*, *348*(6300), 455-458.
- Dazard, J. E., Saha, S., & Ewing, R. M. (2012). ROCS: a reproducibility index and confidence score for interaction proteomics studies. *BMC Bioinformatics*, *13*, 128. doi: 10.1186/1471-2105-13-128
- Dimitrakis, P., Romay-Ogando, M. I., Timolati, F., Suter, T. M., & Zuppinger, C. (2012). Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res*, *350*(2), 361-372. doi: 10.1007/s00441-012-1475-8
- Dmitrieva, N. I., Malide, D., & Burg, M. B. (2011). Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *301*(3), R632-640. doi: 10.1152/ajpregu.00853.2010
- Falnes, P. O., Johansen, R. F., & Seeberg, E. (2002). AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, *419*(6903), 178-182. doi: 10.1038/nature01048
- Falnes, P. O., Klungland, A., & Alseth, I. (2007). Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience*, *145*(4), 1222-1232. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.11.018
- Fedeles, B. I., Singh, V., Delaney, J. C., Li, D., & Essigmann, J. M. (2015). The AlkB Family of Fe(II)/alpha-Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond. *J Biol Chem*, *290*(34), 20734-20742. doi: 10.1074/jbc.R115.656462
- Foster, K. A., Galeffi, F., Gerich, F. J., Turner, D. A., & Müller, M. (2006). Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, *79*(3), 136-171. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.07.001>
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, *505*(7483), 335-343. doi: 10.1038/nature12985
- Fu, D., Jordan, J. J., & Samson, L. D. (2013). Human ALKBH7 is required for alkylation and oxidation-induced programmed necrosis. *Genes Dev*, *27*(10), 1089-1100. doi: 10.1101/gad.215533.113
- Goller, T., Seibold, U. K., Kremmer, E., Voos, W., & Kolanus, W. (2013). Atad3 function is essential for early post-implantation development in the mouse. *PLoS One*, *8*(1), e54799. doi: 10.1371/journal.pone.0054799
- Greene, R. F., Collins, J. M., Jenkins, J. F., Speyer, J. L., & Myers, C. E. (1983). Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res*, *43*(7), 3417-3421.

- Haag, S., Sloan, K. E., Ranjan, N., Warda, A. S., Kretschmer, J., Blessing, C., . . . Bohnsack, M. T. (2016). NSUN3 and ABH1 modify the wobble position of mt-tRNAMet to expand codon recognition in mitochondrial translation. *Embo j*. doi: 10.15252/embj.201694885
- He, J., Cooper, H. M., Reyes, A., Di Re, M., Sembongi, H., Litwin, T. R., . . . Holt, I. J. (2012). Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, *40*(13), 6109-6121. doi: 10.1093/nar/gks266
- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*, *148*(1), 3-15. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012
- Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, T. I., Hamasaki, N., & Kang, D. (2004). Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci*, *1011*, 61-68.
- Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(10), 659-671. doi: 10.1038/nrm3439
- Koczor, C. A., Torres, R. A., Fields, E. J., Boyd, A., & Lewis, W. (2013). Mitochondrial matrix P53 sensitizes cells to oxidative stress. *Mitochondrion*, *13*(4), 277-281. doi: 10.1016/j.mito.2013.03.001
- Kubli, D. A., & Gustafsson, A. B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*, *111*(9), 1208-1221. doi: 10.1161/circresaha.112.265819
- Kukat, C., Davies, K. M., Wurm, C. A., Spahr, H., Bonekamp, N. A., Kuhl, I., . . . Larsson, N. G. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(36), 11288-11293. doi: 10.1073/pnas.1512131112
- Kuo, L. J., & Yang, L. X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, *22*(3), 305-309.
- Kurz, E. U., Douglas, P., & Lees-Miller, S. P. (2004). Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, *279*(51), 53272-53281. doi: 10.1074/jbc.M406879200
- Levin, B. C., Cheng, H., & Reeder, D. J. (1999). A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. *Genomics*, *55*(2), 135-146. doi: 10.1006/geno.1998.5513
- Li, M. M., Nilsen, A., Shi, Y., Fusser, M., Ding, Y. H., Fu, Y., . . . Yang, Y. G. (2013). ALKBH4-dependent demethylation of actin regulates actomyosin dynamics. *Nat Commun*, *4*, 1832. doi: 10.1038/ncomms2863
- Li, S., & Rousseau, D. (2012). ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression. *J Bioenerg Biomembr*, *44*(1), 189-197. doi: 10.1007/s10863-012-9424-5

- Liu, F., Clark, W., Luo, G., Wang, X., Fu, Y., Wei, J., . . . He, C. (2016). ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation. *Cell*, 167(3), 816-828.e816. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.038
- Loenarz, C., & Schofield, C. J. (2011). Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends Biochem Sci*, 36(1), 7-18. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.002
- Lu, B., Yadav, S., Shah, P. G., Liu, T., Tian, B., Puksza, S., . . . Suzuki, C. K. (2007). Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J Biol Chem*, 282(24), 17363-17374. doi: 10.1074/jbc.M611540200
- Ma, H. L., Jiang, Q., Han, S., Wu, Y., Cui Tomshine, J., Wang, D., . . . Liang, X. J. (2012). Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol Imaging*, 11(6), 487-498.
- Matthews, G. D., Gould, R. M., & Vardimon, L. (2005). A single glutamine synthetase gene produces tissue-specific subcellular localization by alternative splicing. *FEBS Lett*, 579(25), 5527-5534. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.082
- Matthews, G. D., Gur, N., Koopman, W. J., Pines, O., & Vardimon, L. (2010). Weak mitochondrial targeting sequence determines tissue-specific subcellular localization of glutamine synthetase in liver and brain cells. *J Cell Sci*, 123(Pt 3), 351-359. doi: 10.1242/jcs.060749
- McDonough, M. A., Loenarz, C., Chowdhury, R., Clifton, I. J., & Schofield, C. J. (2010). Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Curr Opin Struct Biol*, 20(6), 659-672. doi: 10.1016/j.sbi.2010.08.006
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56(2), 185-229. doi: 10.1124/pr.56.2.6
- Morel, F., Renoux, M., Lachaume, P., & Alziari, S. (2008). Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of Drosophila cells are repaired. *Mutat Res*, 637(1-2), 111-117. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.07.007
- Mueller-Klieser, W. (2000). Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*, 36(2-3), 123-139.
- Muller, T. A., Andrzejak, M. M., & Hausinger, R. P. (2013). A covalent protein-DNA 5'-product adduct is generated following AP lyase activity of human ALKBH1 (AlkB homologue 1). *Biochem J*, 452(3), 509-518. doi: 10.1042/bj20121908
- Nakano, S., Suzuki, T., Kawarada, L., Iwata, H., Asano, K., & Suzuki, T. (2016). NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nat Chem Biol*, 12(7), 546-551. doi: 10.1038/nchembio.2099

- Nilsen, A., Fusser, M., Greggains, G., Fedorcsak, P., & Klungland, A. (2014). ALKBH4 depletion in mice leads to spermatogenic defects. *PLoS One*, 9(8), e105113. doi: 10.1371/journal.pone.0105113
- Niu, Y., Zhao, X., Wu, Y. S., Li, M. M., Wang, X. J., & Yang, Y. G. (2013). N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 11(1), 8-17. doi: 10.1016/j.gpb.2012.12.002
- Nordstrand, L. M., Svard, J., Larsen, E., Nilsen, A., Ougland, R., Furu, K., . . . Klungland, A. (2010). Mice lacking Alkbh1 display sex-ratio distortion and unilateral eye defects. *PLoS One*, 5(11), e13827. doi: 10.1371/journal.pone.0013827
- Ougland, R., Jonson, I., Moen, M. N., Nesse, G., Asker, G., Klungland, A., & Larsen, E. (2016). Role of ALKBH1 in the Core Transcriptional Network of Embryonic Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*, 38(1), 173-184. doi: 10.1159/000438619
- Ougland, R., Lando, D., Jonson, I., Dahl, J. A., Moen, M. N., Nordstrand, L. M., . . . Larsen, E. (2012). ALKBH1 is a histone H2A dioxygenase involved in neural differentiation. *Stem Cells*, 30(12), 2672-2682. doi: 10.1002/stem.1228
- Ougland, R., Rognes, T., Klungland, A., & Larsen, E. (2015). Non-homologous functions of the AlkB homologs. *J Mol Cell Biol*, 7(6), 494-504. doi: 10.1093/jmcb/mjv029
- Ougland, R., Zhang, C. M., Liiv, A., Johansen, R. F., Seeberg, E., Hou, Y. M., . . . Falnes, P. O. (2004). AlkB restores the biological function of mRNA and tRNA inactivated by chemical methylation. *Mol Cell*, 16(1), 107-116. doi: 10.1016/j.molcel.2004.09.002
- Pan, Z., Sikandar, S., Witherspoon, M., Dizon, D., Nguyen, T., Benirschke, K., . . . Lipkin, S. M. (2008). Impaired placental trophoblast lineage differentiation in Alkbh1(-/-) mice. *Dev Dyn*, 237(2), 316-327. doi: 10.1002/dvdy.21418
- Park, J. H., Zhuang, J., Li, J., & Hwang, P. M. (2016). p53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Lett*, 590(7), 924-934. doi: 10.1002/1873-3468.12061
- Picca, A., Fracasso, F., Pesce, V., Cantatore, P., Joseph, A. M., Leeuwenburgh, C., . . . Lezza, A. M. (2013). Age- and calorie restriction-related changes in rat brain mitochondrial DNA and TFAM binding. *Age (Dordr)*, 35(5), 1607-1620. doi: 10.1007/s11357-012-9465-z
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 3(7), 1125-1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75
- Salminen, A., Haapasalo, A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., Soininen, H., & Hiltunen, M. (2015). Impaired mitochondrial energy metabolism in Alzheimer's disease: Impact on pathogenesis via disturbed epigenetic regulation of chromatin landscape. *Progress in Neurobiology*, 131, 1-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.001>
- Scheibye-Knudsen, M., Fang, E. F., Croteau, D. L., Wilson, D. M., 3rd, & Bohr, V. A. (2015). Protecting the mitochondrial powerhouse. *Trends Cell Biol*, 25(3), 158-170. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.002

- Schermelleh, L., Heintzmann, R., & Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol*, 190(2), 165-175. doi: 10.1083/jcb.201002018
- Schmitt, S., Saathoff, F., Meissner, L., Schropp, E. M., Lichtmannegger, J., Schulz, S., . . . Zischka, H. (2013). A semi-automated method for isolating functionally intact mitochondria from cultured cells and tissue biopsies. *Anal Biochem*, 443(1), 66-74. doi: 10.1016/j.ab.2013.08.007
- Schon, E. A., DiMauro, S., & Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*, 13(12), 878-890. doi: 10.1038/nrg3275
- Seidel-Rogol, B. L., & Shadel, G. S. (2002). Modulation of mitochondrial transcription in response to mtDNA depletion and repletion in HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, 30(9), 1929-1934.
- Shen, C. C., Wertelecki, W., Driggers, W. J., LeDoux, S. P., & Wilson, G. L. (1995). Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells. *Mutat Res*, 337(1), 19-23.
- Shin, H. J., Kwon, H. K., Lee, J. H., Gui, X., Achek, A., Kim, J. H., & Choi, S. (2015). Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Sci Rep*, 5, 15798. doi: 10.1038/srep15798
- Solberg, A., Robertson, A. B., Aronsen, J. M., Rognmo, O., Sjaastad, I., Wisloff, U., & Klungland, A. (2013). Deletion of mouse Alkbh7 leads to obesity. *J Mol Cell Biol*, 5(3), 194-203. doi: 10.1093/jmcb/mjt012
- Songe-Moller, L., van den Born, E., Leihne, V., Vagbo, C. B., Kristoffersen, T., Krokan, H. E., . . . Klungland, A. (2010). Mammalian ALKBH8 possesses tRNA methyltransferase activity required for the biogenesis of multiple wobble uridine modifications implicated in translational decoding. *Mol Cell Biol*, 30(7), 1814-1827. doi: 10.1128/mcb.01602-09
- St John, J. C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., & Salah, R. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*, 16(5), 488-509. doi: 10.1093/humupd/dmq002
- Sundheim, O., Vagbo, C. B., Bjoras, M., Sousa, M. M., Talstad, V., Aas, P. A., . . . Slupphaug, G. (2006). Human ABH3 structure and key residues for oxidative demethylation to reverse DNA/RNA damage. *Embo j*, 25(14), 3389-3397. doi: 10.1038/sj.emboj.7601219
- Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M. P., & Davidson, E. (2000). The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J Biol Chem*, 275(45), 35063-35069. doi: 10.1074/jbc.M006265200
- Trewick, S. C., Henshaw, T. F., Hausinger, R. P., Lindahl, T., & Sedgwick, B. (2002). Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature*, 419(6903), 174-178. doi: 10.1038/nature00908

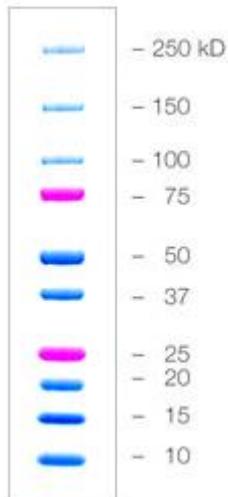
- Tu, Y.-T., & Barrientos, A. (2015). The Human Mitochondrial DEAD-Box Protein DDX28 Resides in RNA Granules and Functions in Mitoribosome Assembly. *Cell Reports*, *10*(6), 854-864. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.033
- van den Born, E., Vagbo, C. B., Songe-Moller, L., Leihne, V., Lien, G. F., Leszczynska, G., . . . Falnes, P. O. (2011). ALKBH8-mediated formation of a novel diastereomeric pair of wobble nucleosides in mammalian tRNA. *Nat Commun*, *2*, 172. doi: 10.1038/ncomms1173
- Van Haute, L., Dietmann, S., Kremer, L., Hussain, S., Pearce, S. F., Powell, C. A., . . . Minczuk, M. (2016). Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat Commun*, *7*, 12039. doi: 10.1038/ncomms12039
- Varga, Z. V., Ferdinandy, P., Liaudet, L., & Pacher, P. (2015). Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *309*(9), H1453-1467. doi: 10.1152/ajpheart.00554.2015
- Wakabayashi, T. (2002). Megamitochondria formation - physiology and pathology. *J Cell Mol Med*, *6*(4), 497-538.
- Wei, Y. F., Carter, K. C., Wang, R. P., & Shell, B. K. (1996). Molecular cloning and functional analysis of a human cDNA encoding an Escherichia coli AlkB homolog, a protein involved in DNA alkylation damage repair. *Nucleic Acids Res*, *24*(5), 931-937.
- Westbye, M. P., Feyzi, E., Aas, P. A., Vagbo, C. B., Talstad, V. A., Kavli, B., . . . Krokan, H. E. (2008). Human AlkB homolog 1 is a mitochondrial protein that demethylates 3-methylcytosine in DNA and RNA. *J Biol Chem*, *283*(36), 25046-25056. doi: 10.1074/jbc.M803776200
- Wiznerowicz, M., & Trono, D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*, *77*(16), 8957-8961.
- Wollen Steen, K., Doseeth, B., M, P. W., Akbari, M., Kang, D., Falkenberg, M., & Slupphaug, G. (2012). mtSSB may sequester UNG1 at mitochondrial ssDNA and delay uracil processing until the dsDNA conformation is restored. *DNA Repair (Amst)*, *11*(1), 82-91. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.10.026
- Wu, T. P., Wang, T., Seetin, M. G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., . . . Xiao, A. Z. (2016). DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, *532*(7599), 329-333. doi: 10.1038/nature17640
- Yako, Y. Y., Madubedube, J. H., Kengne, A. P., Erasmus, R. T., Pillay, T. S., & Matsha, T. E. (2015). Contribution of ENPP1, TCF7L2, and FTO polymorphisms to type 2 diabetes in mixed ancestry ethnic population of South Africa. *Afr Health Sci*, *15*(4), 1149-1160. doi: 10.4314/ahs.v15i4.14
- Yeung, M., Hurren, R., Nemr, C., Wang, X., Hershenfeld, S., Gronda, M., . . . Schimmer, A. D. (2015). Mitochondrial DNA damage by bleomycin induces AML cell death. *Apoptosis*, *20*(6), 811-820. doi: 10.1007/s10495-015-1119-z

- You, W. C., Chiou, S. H., Huang, C. Y., Chiang, S. F., Yang, C. L., Sudhakar, J. N., . . . Chow, K. C. (2013). Mitochondrial protein ATPase family, AAA domain containing 3A correlates with radioresistance in glioblastoma. *Neuro Oncol*, *15*(10), 1342-1352. doi: 10.1093/neuonc/not077
- Yu, M., Shi, Y., Wei, X., Yang, Y., Zhou, Y., Hao, X., . . . Niu, R. (2007). Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett*, *170*(1), 83-93. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.02.013
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., . . . He, C. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, *49*(1), 18-29. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015

11. Anhang

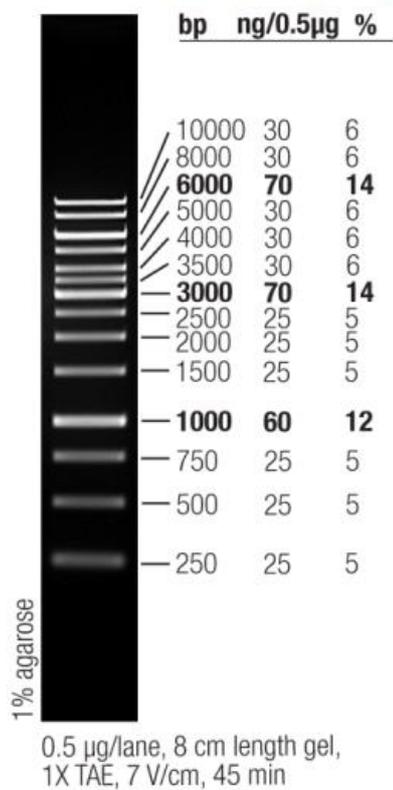
DNA- und Proteingrößenstandards:

Marker für SDS-Gelelektrophorese von der Firma Peqlab: 161-0374



Marker für Agarosegele: Gene Ruler 1kb DNA ladder MBIFermentas

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use



Plasmid: pcDNA3

Insert: Mito-Signalpeptid: *pot. ornithine transcarbamylase pOTC*, teilweise [Rattus norvegicus]

Gen ID (NCBI): CAA25618

Restriktionsschnittstellen: KpnI (5') / BamHI (3')

Information:

lila = pcDNA3 *open reading frame*

blau = mitochondriales Zielprotein : *pot. ornithine transcarbamylase pOTC* [Rattus norvegicus]

orange: KpnI / BamHI ; grün: EGFP

Nukleotid Sequenz im Plasmid:

GATTATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCATGCTGTCTAATTTGAGAATCCTGCTCAACAAGGCAGCTCTTAGAAAGGCTCACACTTCCATGGTTCGAAATTTTCGGTATGGGAAGCCAGTCCAGAGTCAAGTACAGCTGGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Plasmid: pcDNA3

Insert: AlkBh1

Gen ID (NCBI): NP_006011

Restriktionsschnittstellen: KpnI (5') / BamHI (3')

Information:

lila = pcDNA3 open reading frame

blau = AlkBh1 open reading frame

orange: KpnI / EcoRI

Nukleotid Sequenz im Plasmid von pcDNA3_AlkBh1

ATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCATGGGGAAGATGGCAGCGGC
 CGTGGGCTCTGTGGCGACTCTGGCGACTGAGCCCGGGGAGGACGCCTTTCGGAAAC
 TTTCCGCTTCTACCGTCAGAGCCGGCCCGGGACCGCAGACCTGGAAGGGGTCATCG
 ACTTCTCGGCGGCCACGCAGCCCGTGGCAAGGGTCCTGGTGCCAAAAGGTGATC
 AAATCTCAGCTAAATGTGTCTTCTGTCTCAGTGAGCAGAATGCATATAGAGCAGGTCTTC
 AGCCCGTCAGCAAGTGGCAAGCCTATGGACTCAAAGGCTATCCTGGGTTTATTTTTAT
 CCCAAACCCCTTCCCTCCAGGTTACCAGTGGCACTGGGTGAAACAGTGCCTTAAGTT
 ATATTCCCAGAAACCTAATGTATGTAACCTGGACAAACACATGTCTAAAGAAGAGAC
 CCAAGATCTGTGGGAACAGAGCAAAGAGTTCCCTGAGGTATAAAGAAGCGACTAAAC
 GGAGACCCGAAGTTTACTGGAGAACTGCGTTGGGTGACCGTAGGCTACCATTATA
 ACTGGGACAGTAAGAAATACTCAGCAGATCATTACACACCTTCCCTTCTGACCTGGG
 TTTCTCTCAGAGCAAGTAGCCGCTGCCTGTGGATTTGAGGATTTCCGAGCTGAAGCA
 GGGATCCTGAATACTACCGCCTGGACTCCACACTGGGAATCCACGTAGACAGATCT
 GAGCTAGATCACTCCAAACCCTTGCTGTCATTAGCTTTGGACAGTCCGCCATCTTTC
 TCCTGGGTGGTCTTCAAAGGGATGAGGCCCCACGGCCATGTTTATGCACAGTGGTG
 ACATCATGATAATGTCGGGTTTCAGCCGCTCTTGAACCACGCAGTCCCTCGTGTCTCT
 TCCAAATCCAGAAGGGGAAGGCCTGCCTCACTGCCTAGAGGCACCTCTCCCTGCTGT
 CCTCCCGAGAGATTCAATGGTAGAGCCTTGTCTATGGAGGACTGGCAGGTGTGTGC
 CAGCTACTTGAAGACCGCTCGTGTTAACATGACTGTCCGACAGGTCCTGGCCACAGA
 CCAGAATTTCCCTCTAGAACCCATCGAGGATGAAAAAAGAGACATCAGTACAGAAGG
 TTTCTGCCATCTGGATGACCAGAATAGCGAAGTAAAACGGGCCAGGATAAACCCCTGA
 CAGCTGA GAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAG
 AGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAG

Plasmid: pcDNA3

Insert: AlkBh7

Gen ID (NCBI): AAH04393

Restriktionsschnittstellen: KpnI (5') / BamHI (3')

Information:

lila = pcDNA3 open reading frame

blau = AlkBh7 open reading frame

orange: KpnI / EcoRI

Nukleotid Sequenz im Plasmid von pcDNA3_AlkBh1

```

ATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCATGGCCGGGACTGGGCTGCTG
GCGCTGCGGACGCTGCCAGGGCCCAGCTGGGTGCGAGGCTCGGGCCCTCCGTGCT
GAGCCGCCTGCAGGACGCGGCCGTGGTGCGGCCCTGGCTTCCTGAGCACGGCAGAGG
AGGAGACGCTGAGCCGAGAAGTGGAGCCGAGCTGCGCCGCCGCCGCTACGAATAC
GATCACTGGGACGCGGCCATCCACGGCTTCCGAGAGACAGAGAAGTCGCGCTGGTC
AGAAGCCAGCCGGGCCATCCTGCAGCGCGTGCAGGCGGCCGCCTTTGGCCCCGGCC
AGACCCTGCTCTCCTCCGTGCACGTGCTGGACCTGGAAGCCCGCGGCTACATCAAGC
CCCACGTGGACAGCATCAAGTTCTGCGGGGCCACCATCGCCGGCCTGTCTCTCCTGT
CTCCCAGCGTTATGCGGCTGGTGACACCCAGGAGCCGGGGGAGTGGCTGGAATC
TTGCTGGAGCCGGGCTCCCTCTACATCCTTAGGGGCTCAGCCCGTTATGACTTCTCCC
ATGAGATCCTTCGGGATGAAGAGTCTTCTTTGGGAACGCCGGATTCCCCGGGGCC
GGCGCATCTCCGTGATCTGCCGCTCCCTCCCTGAGGGCATGGGGCCAGGGGAGTCT
GGACAGCCGCCCCAGCCTGCTGAGAATTCGTCAGATATCCATCACACTGGCGGCCG
CTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTCACCTAAATGCTAGAGCTCGC
TGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCG
TGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGT

```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein allergrößter Dank gilt Dr. Alexander Wolf, der mir ein spannendes und abwechslungsreiches Thema für meine Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat. Die gute Betreuung, Lob und konstruktive Kritik trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Barbara Conradt für die gute Betreuung und die förderliche wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Angelika Böttger, die als Mitglied meines Thesis Committees mit effektiven Ratschlägen und aufmunternden Worten zusätzlich eine gute Stütze war.

Zusätzlich möchte ich mich herzlich bei Olga Swolski, Andreas Maiser, Dr. Michelle Vincendeau, Dr. Kenji Schorpp, Katrin Demski, Dr. Sabine Schmitt, Dr. Gisela Schimmack, Andreas Voss, Kevin Brockers, Astrid Heim, Dr. Gitta Heinz, Ariane Hallermayr, Steffi Brandner und Franz Kiefer für die bereitwilligen wissenschaftlichen Beiträge und hilfreichen Ratschläge bedanken.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei all meinen jetzigen und früheren Kollegen, darunter besonders bei Olga, Kevin, Katha, Juste, Sarah, Nikoleta und Gitta für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Von ganzem Herzen möchte ich mich vor allem bei Olga und Kevin für die angenehme Zeit im Labor bedanken. Sie bereicherten die Laborarbeit mit Spaß und Freude.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei meiner wunderbaren Familie und bei meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 29.11.2016

Anita Wagner
.....

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

~~dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach
und in den Nebenfächern
bei der Fakultät für der
..... (Hochschule/Universität)
unterzogen habe.~~

~~dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.~~

München, den 29.11.2016

Anita Wagner
.....

(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen