

Zusammenfassung

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann positive oder negative Auswirkung auf Zellen haben, und zwar in Abhängigkeit seiner Konzentration und Lokalisation. H_2O_2 ist involviert in zelluläre Signalwege aber auch in verschiedenste Krankheiten. Auf Grund dessen ist es essenziell die Dynamiken von H_2O_2 und deren zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zu verstehen. Mitochondrien sind eine der Hauptquellen für H_2O_2 in der Zelle und die Freisetzung von H_2O_2 dient vermutlich der zellulären Kommunikation. Bisher fehlt uns ein umfassendes Bild von der mitochondrialen H_2O_2 Freisetzung und seiner Rolle in der Signaltransduktion.

Sensitive, genetisch codierte Sensoren können eingesetzt werden, um die Dynamiken von mitochondriellem H_2O_2 in Echtzeit und mit subzellulärer Auflösung zu untersuchen. Um die Antwort der Sensoren in einzelnen Zellen analysieren zu können, wurde ein robustes Assay etabliert. Dies erlaubt die simultane Messung von vielen Zellen und bringt einen Einblick in deren Heterogenität.

Wir konnten zeigen, dass die Freisetzung von mitochondriellem H_2O_2 durch die metabolischen Konditionen der Zellen reguliert wird. Wenn Zellen auf respiratorischem Medium wachsen, exprimieren sie mehr vom TRX-System, um die erhöhte basale H_2O_2 Menge zu bekämpfen. Diese entsteht durch die vermehrte Aktivität der Atmungskette zum ATP -Gewinn. Folglich wird weniger von matrix-DAO produziertes H_2O_2 im Cytoplasma detektiert. Wird hingegen die Atmungskette inhibiert, wird das Gegenteil beobachtet. In Zellen, die auf Galaktose gewachsen sind, wird mehr H_2O_2 in allen Kompartimenten gemessen. Dies ist zurückzuführen auf die erhöhte Aktivität der Atmungskette und folglich der erhöhten Produktion von H_2O_2 . Interessanterweise wurde mit Antimycin A das meiste H_2O_2 in der Matrix und nicht wie zu erwarten im IMS detektiert.

Cytosolische PRDX sind potenzielle Überträger der Oxidation von mitochondrial freigesetztem H_2O_2 auf Zielproteine. Um erste Einblicke in die Handhabung von H_2O_2 durch PRDX zu erhalten, wurden CRISPR-Cas9 Knockouts generiert. Überraschenderweise resultiert das Deletieren von einem cytosolischen PRDX zur Verbesserung der zellulären H_2O_2 Handhabungskapazitäten und Resistenz.

Zusätzlich hat es uns der neu entwickelte, sehr sensitive H_2O_2 Sensor namens HyPer7 erlaubt H_2O_2 Dynamiken während physiologischer Prozesse zu analysieren. Während der Differenzierung von Maus Muskelvorläuferzellen zu Muskelfibrillen wurde zunächst ein Absinken und anschließend ein kontinuierliches Ansteigen von H_2O_2 beobachtet. Dies weist auf eine wichtige Rolle von H_2O_2 in der Differenzierung hin. Des Weiteren gibt es bereits Hinweise, dass mitochondrial freigesetztes H_2O_2 eine Rolle in Hypoxie und HIF-1 α Stabilisierung spielt. Jedoch haben Messung mit HyPer7 in HEK Zellen gezeigt, dass in keinem Kompartiment ein Anstieg von H_2O_2 zu beobachten ist. Allerdings wird dieser während der anschließenden Reoxygenierung detektiert und weist auf eine wichtige Rolle für mitochondrielles H_2O_2 bei Reperfusionsschaden hin.

Summary

Hydrogen peroxide (H_2O_2) can either be beneficial or deleterious for cells depending on its concentration and fluxes. Thus, it is found to be involved in cellular signaling as well as in different diseases. Therefore, it is essential to understand the dynamics and handling of H_2O_2 and the underlying molecular mechanisms in detail. Mitochondria are a major source of H_2O_2 , and its release is supposed to be important for the communication with the remainder of the cell. Currently, we lack a comprehensive picture of the release of mitochondrial H_2O_2 , its regulation, and its role in signaling.

Highly sensitive, genetically encoded, and targetable sensors can be employed to investigate the spatiotemporal dynamics of mitochondrial H_2O_2 handling and release. A robust assay for the high throughput analysis of the sensor in single cells was established. This assay allows measuring of many cells simultaneously leading to an insight in cellular heterogeneity upon treatments.

Using this assay, we found that the mitochondrial H_2O_2 release is regulated by metabolic conditions. When cells are grown on respiratory media, the TRX system is upregulated to scavenge increased basal H_2O_2 levels due to a more active respiratory chain. Consequently, less matrix-DAO derived H_2O_2 was detected in the cytosol when cells were grown on galactose. However, when using inhibitors for the respiratory chain, the opposite was observed. On galactose, more H_2O_2 was detected in all compartments. This is caused by the increased respiratory chain activity which led to increased H_2O_2 production upon inhibition. Interestingly, the H_2O_2 production upon inhibition with Antimycin A was largest in the matrix and not, as expected, in the IMS.

Cytosolic PRDXs potentially transfer the oxidation from mitochondrially released H_2O_2 to target proteins. To obtain a first insight in the roles of cytosolic PRDXs in H_2O_2 handling, CRISPR-Cas9 knockouts were generated. Surprisingly, the knockout of a cytosolic PRDX lead to an increased H_2O_2 handling and resistance.

Furthermore, the new, extremely sensitive, HyPer7 sensor allowed us to follow H_2O_2 dynamics during physiological processes. When cells differentiate from myoblasts to myotubes, they exhibit an H_2O_2 drop in the beginning and then slowly start to rise again indicating a role of H_2O_2 during the differentiation. There were indications that mitochondrial H_2O_2 is released during hypoxia and is necessary for the stabilization of HIF-1 α . However, measurements using HyPer7 revealed no increase in H_2O_2 in any compartment. Only upon reoxygenation, a strong increase in H_2O_2 was detected indicating a role of mitochondrial H_2O_2 during ischemia reperfusion injury.