

**Expression des mitochondrialen
Komplexes I der Atmungskette in der
Hirnentwicklung der Maus**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Wirtz

aus Berlin

2011

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld in der Zeit von September 2005 bis August 2010 am Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NWFZ) der Charité - Universitätsmedizin Berlin und am NeuroCure Clinical Research Center (NCRC) der Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld
Klinik für Pädiatrie m. S. Neurologie, CVK
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Augustenburger Platz 1
D-13353 Berlin

2. Prof. Dr. Volker Haucke
Institut für Chemie und Biochemie
Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustr. 6
D-14195 Berlin

Datum der Disputation: 29.11.2011

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.*

(Sir Isaac Newton)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Die oxidative Phosphorylierung	9
1.1.1	Komponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette	11
1.2	Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette	12
1.2.1	Funktion	12
1.2.2	Aufbau und Struktur	13
1.2.3	Biogenese	18
1.2.4	Inhibition des Komplexes I und seine Beteiligung an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	19
1.3	Die Struktur des <i>NDUFVI</i> -Gens	20
1.4	Patienten mit Komplex I-Mangel	21
1.5	Gehirnentwicklung	22
1.5.1	Die embryonale Gehirnentwicklung der Maus	22
1.5.2	Vergleich der Gehirnentwicklung zwischen Maus und Mensch	28
1.6	<i>Knockout</i> -Modelle: Gezieltes Ausschalten von Genen durch homologe Rekombination	30
2	Zielsetzung	32
3	Material	34
3.1	Geräte	34
3.1.1	Geräte für molekularbiologische und biochemische Arbeiten	34
3.1.2	Geräte für histologische Arbeiten	34
3.1.3	Geräte für zellbiologische Arbeiten	34
3.2	Chemikalien	35
3.3	Enzyme und Kitsysteme	36
3.4	Antikörper	36
3.5	Molekulargewichtsstandards	37
3.6	Nukleotide	37
3.7	Verbrauchsmaterialien	37

3.8	Plasmide	37
3.9	Bakterienstämme.....	37
3.10	Zelllinien.....	38
3.11	Mausstämme	38
3.12	Primer.....	38
3.13	Oligonukleotidsonden	38
3.14	Software.....	38
4	Methoden.....	39
4.1	Methoden zur Untersuchung der Expression nukleärer Komplex I- Gene in unterschiedlichen Hirnregionen der Maus	39
4.1.1	Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	39
4.1.1.1	<i>Isolierung der RNA.....</i>	40
4.1.1.2	<i>Reverse PCR (RT-PCR)</i>	40
4.1.1.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	41
4.1.1.4	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren.....</i>	41
4.1.1.5	<i>DNA-Extraktion aus Agarosegelen</i>	41
4.1.1.6	<i>Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren</i>	42
4.1.1.7	<i>Klonierung der DNA-Fragmente</i>	42
4.1.1.8	<i>Kolonie-PCR</i>	43
4.1.1.9	<i>Isolierung der Plasmid-DNA.....</i>	43
4.1.1.10	<i>DNA-Sequenzierung</i>	44
4.1.1.11	<i>Restriktionsverdau der DNA</i>	44
4.1.1.12	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	45
4.1.1.13	<i>Fällung der Nukleinsäuren.....</i>	45
4.1.1.14	<i>Quantitative PCR</i>	45
4.1.1.15	<i>In vitro Transkription der DNA in RNA.....</i>	46
4.1.2	<i>In situ Hybridisierung auf Schnittpräparaten</i>	46
4.1.2.1	<i>Gewebepräparation.....</i>	46
4.1.2.2	<i>In situ Hybridisierung</i>	47
4.1.3	Statistische Methoden	48
4.1.3.1	<i>Z-Transformation</i>	48
4.1.3.2	<i>Hierarchische Clusteranalyse</i>	49

4.1.3.3	<i>Mann-Whitney U-Test</i>	49
4.2	Methoden zur Herstellung einer „geflochten“ <i>Ndufv1</i>-Maus für einen gewebsspezifischen konditionellen <i>knockout</i>	50
4.2.1	Herstellung des <i>targeting vectors</i>	51
4.2.1.1	<i>Recombineering</i>	51
4.2.1.2	Herstellung der Kolonie-Filter	52
4.2.1.3	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	53
4.2.1.4	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden	53
4.2.1.5	Ligation restringierter DNA-Fragmente	54
4.2.1.6	Herstellung kompetenter Bakterienzellen für das <i>recombineering</i>	54
4.2.1.7	Elektroporation kompetenter Bakterienzellen	54
4.2.2	Methoden der ES-Zellkultur	55
4.2.2.1	<i>Feeder-Zellkultur</i>	55
4.2.2.2	ES-Zellkultur	56
4.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	56
4.2.2.4	Elektroporation der ES-Zellen	56
4.2.2.5	Selektion der ES-Klone	57
4.2.2.6	Ernten der ES-Klone	57
4.2.2.7	DNA-Extraktion aus ES-Zellen	57
4.2.3	Southern Blot Analyse	58
4.2.4	Blastozysteninjektion und Herstellung chimärer Mäuse	58
4.2.5	Generierung „gefloxter“ <i>Ndufv1</i> -Mäuse	59
4.2.6	Genotypisierung der Mäuse	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Untersuchung der Expression nukleärer Komplex I-Gene in unterschiedlichen Hirnregionen der Maus	60
5.1.1	Generierung Komplex I-spezifischer mRNA-Sonden	60
5.1.2	Expression der kernkodierten Untereinheiten des Komplexes I	60
5.1.3	Bestimmung der Expressionsstärke der Komplex I-Untereinheiten anhand der relativen ISH-Intensitäten	62
5.1.4	Entwicklungsabhängige Unterschiede in Expressionsmustern	64
5.1.5	Komplex I-Genexpression im Hippokampus	69

5.1.6	Expressionsunterschiede innerhalb der hippokampalen Subregionen	69
5.1.7	Komplex I-Genexpression im Kleinhirn	71
5.1.8	Komplex I-Genexpression im zerebralen Kortex.....	72
5.1.9	Komplex I-Genexpression im Mesenzephalon	72
5.2	Herstellung einer „geflochten“ <i>Ndufv1</i>-Maus für einen gewebsspezifischen konditionellen <i>knockout</i>	76
5.2.1	Klonierung der genomischen <i>Ndufv1</i> -DNA in einen <i>Bluescript</i> Vektor	77
5.2.2	Herstellung des <i>Ndufv1_ko targeting</i> Konstrukts	80
5.2.3	Einführung der ersten loxP-Stelle	80
5.2.4	Einführung der zweiten loxP-Stelle und der Neo-Selektionskassette	82
5.2.5	Funktionelle Tests des <i>Ndufv1_ko targeting</i> Konstrukts <i>in vitro</i>	83
5.2.6	Elektroporation embryonaler Stammzellen und Selektion homolog rekombinanter Klone	85
5.2.7	Southern Blot Analyse homolog rekombinanter ES-Klone	85
5.2.8	Generierung chimärer Mäuse durch Blastozysteninjektion homolog rekombinanter ES-Klone.....	87
5.2.9	Nachweis der Keimbahntransmission: Genotypisierung der F ₁ -Generation	88
5.2.10	Entfernung der Neo-Selektionskassette: Genotypisierung der F ₂ -Generation	89
6	Diskussion.....	91
6.1	Untersuchung der Expression nukleärer Komplex I-Gene in unterschiedlichen Hirnregionen der Maus.....	91
6.1.1	Quantifizierung der ISH-Signale.....	91
6.1.2	Komplex I-Genexpression im Hippokampus.....	92
6.1.2.1	<i>Die Stärke der Komplex I-Genexpression im Hippokampus korreliert mit der power der Gamma-Oszillationen</i>	94
6.1.3	Komplex I-Genexpression im Kleinhirn	95
6.1.4	Komplex I-Genexpression im zerebralen Kortex.....	96
6.1.5	Komplex I-Genexpression im Mesenzephalon	96
6.1.6	Schlussfolgerung	97

6.2	Herstellung einer „geflochten“ <i>Ndufv1</i>-Maus für einen gewebsspezifischen konditionellen <i>knockout</i>	98
6.2.1	Konditioneller <i>knockout</i> für eine gewebsspezifische Geninaktivierung	98
6.2.2	Auswirkungen eines <i>Ndufv1-knockouts</i>	99
7	Zusammenfassung	101
8	Summary	103
9	Literaturverzeichnis	104
10	Abkürzungsverzeichnis	126
11	Anhang	129
11.1	Primer	129
11.2	Oligonukleotidsonden	131
11.3	Vektorkarten	133
11.4	Untereinheiten des mitochondrialen Komplexes I	134
11.5	Aminosäuresequenz des humanen NDUFV1-Proteins	135
11.6	<i>Heat scale</i> Abbildungen der Komplex I-Expressionsintensitäten	136
11.7	Publikationen	143
11.8	Danksagung	144

1 Einleitung

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle beim Energie-Stoffwechsel und beeinflussen somit auch Hirnentwicklung und neuronales Wachstum. Mitochondriale Fehlfunktionen sind die pathophysiologische Ursache einer kontinuierlich wachsenden Gruppe heterogener Krankheiten und klinischer Syndrome, die meist mit einer Störung der Atmungskette verbunden sind (Torraco *et al.* 2009; Ugalde *et al.* 2009). Mitochondriale Erkrankungen treten bei Lebendgeburten mit einer Inzidenz von über 13,1/100.000 auf (Skladal *et al.* 2003a). Das klinische Erscheinungsbild ist hierbei äußerst vielfältig. Es reicht von letalen, neonatalen Erkrankungen bis hin zur Neurodegeneration im Erwachsenenalter (Loeffen *et al.* 2000; Skladal *et al.* 2003b; Distelmaier *et al.* 2009). Einer der häufigsten klinischen Phänotypen ist das Leigh Syndrom, eine fortschreitende Neurodegeneration der subkortikalen grauen Substanz, die durch den Untergang spezifischer Hirnareale, vor allem der Basalganglien, des *Putamens*, des Thalamus, des Mesenzephalons und des Hirnstammes charakterisiert ist (Leigh 1951). Die häufigste biochemische Ursache für das Leigh Syndrom ist ein isolierter Komplex I-Mangel (Rahman *et al.* 1996; Smeitink *et al.* 2001). Ein besonderes Interesse kommt hierbei dem *NDUFV1*-Gen zu, dessen kodiertes Protein als „Eingangstor“ zum Komplex I angesehen wird und als *hotspot* für Mutationen in diesem gilt (Schuelke *et al.* 1999, 2002; Benit *et al.* 2001). Bislang existieren keine Tiermodelle für einen isolierten *NDUFV1*-Defekt, mit denen man Einblicke in die molekulare Pathogenese und die Störung der Gehirnentwicklung gewinnen könnte.

Zunächst möchte ich einen Einblick in den Aufbau und die Funktionsweise des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette geben und die daraus resultierenden Veränderungen eines Komplex I-Mangels beschreiben. Als Grundlage für die Untersuchungen an transgenen Tiermodellen hinsichtlich der Hirnentwicklung am *knockout*-Mausmodell habe ich in der Folge zunächst die mRNA-Expression der Komplex I-Gene in der normalen Mausentwicklung untersucht und diese mit dem Menschen verglichen.

1.1 Die oxidative Phosphorylierung

Zelluläre Energie in Form von ATP für anabole oder katabole Prozesse wird in den Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung erzeugt. Dies ist ein Prozess, bei dem durch die konzertierte Aktion mehrerer Multi-Enzym-Komplexe die Oxidation von NADH-H^+ und FADH_2 an die Phosphorylierung von ADP zu ATP gekoppelt ist. Die bei der Oxidation frei-

werdenden Elektronen werden über mehrere Stufen (Atmungskettenenzym-Komplexe) auf molekularen Sauerstoff übertragen. Ein Teil der bei der stark exergonen Reaktion freiwerdenden Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran genutzt, der als Triebkraft für die ATP-Synthese durch Komplex V (F_1F_0 ATPase) dient (Mitchell 1961). Das erzeugte ATP wird dann in einer energieabhängigen Reaktion im Austausch gegen ADP durch die ADP-ATP-Translokase (Adenin-Nukleotid Carrier) aus der mitochondrialen Matrix in das Zytosol transportiert (Saraste und Walker 1982). Die Atmungskette besteht aus fünf Multi-Enzym-Komplexen (Komplex I-V), die in der inneren Mitochondrienmembran integriert sind, sowie den zwei in der inneren Mitochondrienmembran beweglichen Überträgermolekülen Ubiquinon (Coenzym Q_{10}) und Cytochrom c (Hatefi 1985).

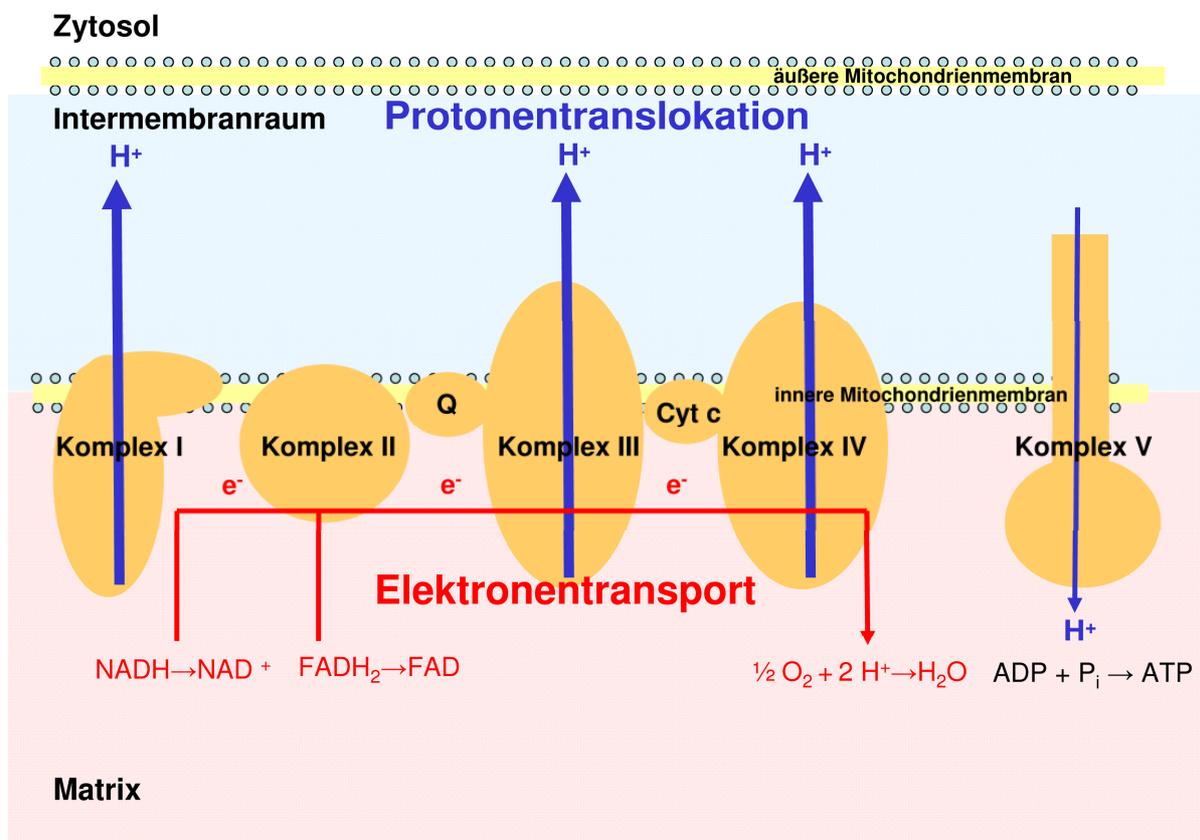


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Elektronen von $NADH-H^+$ und $FADH_2$ werden über die Komplexe I-IV und die beiden löslichen Überträgermoleküle Ubiquinon (Q) und Cytochrom c (Cyt c) auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die Komplexe I, III und IV transportieren gleichzeitig Protonen in den Intermembranraum. Der auf diese Weise generierte Protonengradient dient als Antriebskraft für die ATP-Synthese durch Komplex V.

Mit Ausnahme des Komplexes II, dessen Untereinheiten ausschließlich kernkodiert sind, werden die Untereinheiten der übrigen Enzym-Komplexe sowohl durch das nukleäre als auch durch das mitochondriale Genom kodiert. Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist ein

16.569 bp großes doppelsträngiges, zirkuläres Molekül, das sieben Untereinheiten des Komplexes I, eine Untereinheit des Komplexes III, drei Untereinheiten des Komplexes IV und zwei Untereinheiten des Komplexes V kodiert. Zusätzlich finden sich auf der mtDNA die Gene für 22 tRNAs und zwei rRNAs (Anderson *et al.* 1981). An der Proteinausstattung der Atmungskette sind neben den genannten 13 mitochondrialen Proteinen etwa 70 nukleär-kodierte Strukturproteine beteiligt. Zusätzlich finden sich als proteingebundene Redox-Kofaktoren die Flavine FMN und FAD, verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster, sowie Häm-Gruppen.

1.1.1 Komponenten der mitochondrialen Elektronentransportkette

Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, besteht aus 45 Untereinheiten, von denen sieben durch die mtDNA kodiert werden, sowie mehreren proteingebundenen Komponenten, darunter Flavin-Mononukleotide, acht Eisen-Schwefel-Cluster und Phospholipide (Chomyn *et al.* 1985, 1986; Walker 1992; Efremov *et al.* 2010). Er katalysiert die Oxidation von NADH-H⁺. Die freiwerdenden Elektronen gelangen über FMN und Eisen-Schwefel-Cluster zum Ubiquinon und reduzieren dieses zu Ubiquinol.

Komplex II, die Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase, besteht aus vier kernkodierten Untereinheiten, die neben kovalent gebundenem FAD drei Eisen-Schwefel-Cluster, einen Häm b-Ring und eine Ubiquinon-Bindestelle aufweisen. Der Komplex katalysiert die Oxidation von Succinat. Die Elektronen werden von enzymgebundenem FAD auf Ubiquinon übertragen (Kita *et al.* 1990; Hirawake *et al.* 1994a, 1994b; Morris *et al.* 1994).

Komplex III, die Ubiquinol-Cytochrom c-Reduktase, umfasst elf Untereinheiten, von denen nur das Cytochrom b durch die mtDNA kodiert wird. Dieser Komplex katalysiert die Oxidation von Ubiquinol zu Ubiquinon (Schägger *et al.* 1995). Die Elektronen werden dabei in einem als Q-Zyklus bezeichneten Mechanismus von zwei enzymgebundenen Häm b-Gruppen aufgenommen und über einen Eisen-Schwefel-Cluster und Häm c₁ auf Cytochrom c übertragen (Trumpower 1990).

Komplex IV, die Cytochrom c-Oxidase, besteht aus 13 Untereinheiten, von denen die drei mit dem höchsten Molekulargewicht durch das mitochondriale Genom kodiert werden. Das Enzym enthält als redoxaktive Gruppen zwei Kupfer-Zentren Cu_A und Cu_B und die Häm a- und a₃-Gruppen, von denen die Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Grossman und Lomax 1997).

Bei den Komplexen I, III und IV ist der Elektronentransport an einen Protonentransport gekoppelt. Dabei werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert, was zum Aufbau eines Protonengradienten führt. Die daraus resultierende protonenmotorische Kraft dient als Triebkraft für die ATP-Synthese durch Komplex V.

Komplex V, die F_1F_0 ATPase, katalysiert über Änderung der Enzymkonformation die Bildung von ATP aus ADP und P_i . Sie ist aus 16 Untereinheiten aufgebaut, von denen zwei durch das mitochondriale Genom kodiert sind (Walker und Dickson 2006). Die im Protonengradienten gespeicherte freie Energie wird für die Konformationsänderung des Enzyms und somit letztlich für die ATP-Bildung eingesetzt. Die Translokation dreier Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix führt dabei zur Synthese eines Moleküls ATP (Senior 1988, 1990; Brand 1994).

1.2 Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette

1.2.1 Funktion

Komplex I initiiert den Elektronentransport, indem er $NADH-H^+$ oxidiert und das lösliche Überträgermolekül Ubiquinon als Elektronenakzeptor nutzt. Der Transfer zweier Elektronen von $NADH-H^+$ auf Ubiquinon ist an die Translokation von vier Protonen aus der negativ geladenen Matrix in den positiv geladenen Intermembranraum gekoppelt. Die Elektronen werden auf den primären Akzeptor, nicht-kovalent gebundenes FMN, übertragen und nachfolgend über acht Redoxzentren, die aus den zwei binukleären Eisen-Schwefel-Clustern N1a und N1b und den sechs tetranukleären Eisen-Schwefel-Clustern N2, N3-N6a, N6b bestehen, auf den finalen Akzeptor Ubiquinon übertragen, der zu Ubiquinol reduziert wird.

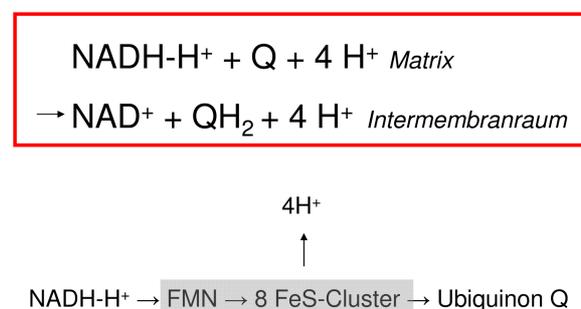


Abb.1.2: Katalytische Reaktion des Komplexes I. Bei der Oxidation von $NADH-H^+$ gelangen Elektronen über FMN und mehrere Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) zum Ubiquinon (Q), welches zu Ubiquinol (QH_2) reduziert wird. Dieser Elektronentransport ist an die Translokation von vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gekoppelt.

1.2.2 Aufbau und Struktur

Der humane Komplex I ist aus 45 Untereinheiten aufgebaut, von denen sieben durch das mitochondriale Genom kodiert sind. Er weist eine L-förmige Struktur auf, die aus einem hydrophoben Arm besteht, der in der Lipid-Doppelschicht verankert ist, und einem hydrophilen, peripheren Arm, der in die mitochondriale Matrix hineinragt (Walker 1992; Grigorieff 1999; Sazanov *et al.* 2000b, 2006; Friedrich und Bottcher 2004; Efremov *et al.* 2010). Die strukturelle Integrität wird durch fest gebundenes Cardiolipin aufrechterhalten, wohingegen schwach gebundenes Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin für die katalytische Aktivität wichtig sind (Sharpley *et al.* 2006). Mittels milder chaotroper Reagenzien kann Komplex I in die vier Subkomplexe I α , I β , I γ , I λ gespalten werden (Sazanov und Walker 2000a; Carroll *et al.* 2002, 2003). Subkomplex I α umfasst den hydrophilen, peripheren Arm und Teile des Membranarms, während der Hauptteil der Proteine des Membranarms im Subkomplex I β lokalisiert ist. Untereinheiten, die sich weder in Subkomplex I α noch in I β finden, werden als Subkomplex I γ zusammengefasst. Unter definierten Bedingungen dissoziiert Subkomplex I α und bildet einen Subkomplex I λ aus, der den hydrophilen Arm repräsentiert und alle Redoxzentren enthält.

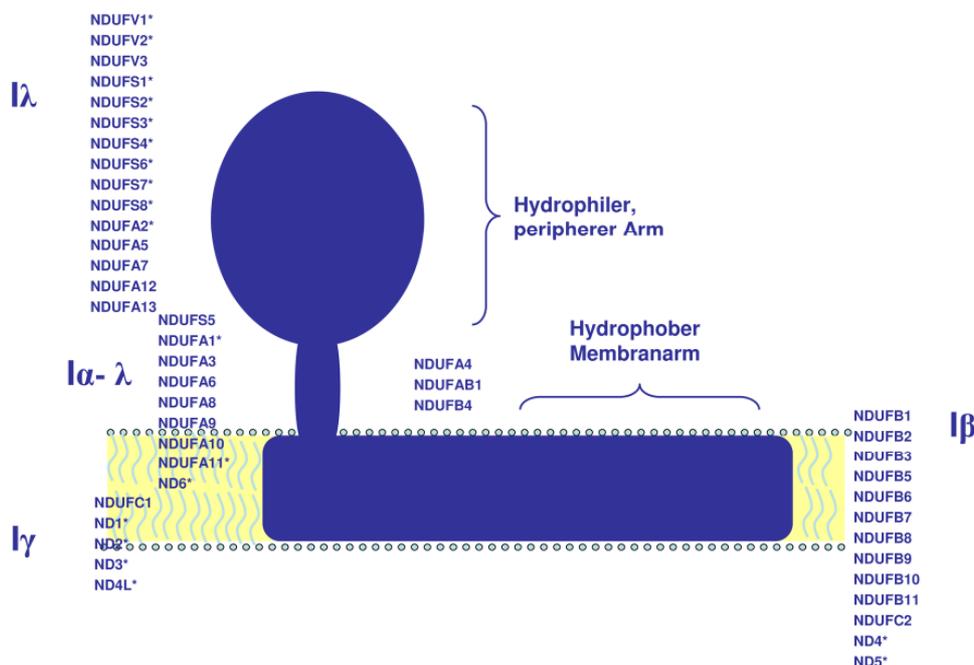


Abb.1.3: Komplex I-Topologie. Der L-förmige Enzym-Komplex wird in einen hydrophilen, peripheren Arm und in einen hydrophoben Membranarm unterteilt. Die Einteilung der 45 Untereinheiten erfolgt in die Subkomplexe I α , I β , I λ und I γ . Untereinheiten, von denen Mutationen beschrieben sind, die zu einem Komplex I-Defekt führen, sind mit einem Sternchen versehen.

Funktionell lassen sich die Proteinuntereinheiten in drei Gruppen unterteilen: die **FP (Flavoprotein)-Fraktion**, die für die FMN- und NADH-H⁺-Bindung verantwortlich ist, die **IP (Eisen-Schwefel)-Fraktion**, die in Redoxreaktionen involviert ist und die **HP (hydrophobe)-Fraktion**, die eine Rolle bei der Protonentranslokation übernimmt und den Komplex in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Untereinheiten der FP- und IP-Fraktionen sind hydrophil und daher im peripheren Arm des Komplexes lokalisiert, während die Untereinheiten der HP-Fraktion im membranständigen Arm liegen und wasserunlösliche Aggregate bilden (Galante und Hatefi 1979; Ohnishi *et al.* 1985; Ragan 1987; Belogradov und Hatefi 1994).

In *Escherichia coli* (*E. coli*) existiert eine trunke Form des Komplexes I, bestehend aus 14 evolutionär stark konservierten Untereinheiten, welche Homologe unter den Komplex I-Untereinheiten der eukaryontischen Zelle haben. Die Gene sind im sogenannten Nuo-Operon (NADH-Ubiquinon-Oxidase) organisiert, das als Minimalstruktur angesehen wird, die für die Funktionalität des Enzyms notwendig ist (Friedrich *et al.* 1993; Leif *et al.* 1993). Diese 14 mitochondrialen Homologe werden als *core*-Untereinheiten bezeichnet und sind essentiell für die Katalyse des Elektronentransfers von NADH-H⁺ auf Ubiquinon sowie die Protonentranslokation. Die restlichen 31 Untereinheiten mit teils noch unbekannter Funktion werden als *accessory*-Untereinheiten bezeichnet (Carroll *et al.* 2003; Hirst *et al.* 2003; Efremov *et al.* 2010).

Die *core*-Untereinheiten selbst werden in sieben hydrophobe Untereinheiten unterteilt, die durch die mtDNA kodiert werden, und sieben hydrophile Untereinheiten, die kernkodiert sind. Zu den hydrophoben *core*-Untereinheiten gehören die Proteine ND1-6 und ND4L (NADH-Dehydrogenase). Sie sind im Membranarm lokalisiert und durchspannen die Lipid-Doppelschicht mit mehreren Transmembranhelizes. Sequenzvergleiche zeigen, dass die Untereinheiten ND2, ND4 und ND5 eng mit der Familie der Na⁺/H⁺ Antiporter verwandt sind, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die hydrophoben *core*-Untereinheiten hauptsächlich für die Protonentranslokation über die Mitochondrienmembran verantwortlich sind (Fearnley und Walker 1992; Friedrich 2001; Mathiesen und Hägerhäll 2002). ND1 weist eine Ubiquinon-Bindestelle auf und scheint somit an der Ubiquinon-Bindung beteiligt. Zusätzlich spielen die hydrophoben *core*-Untereinheiten eine wichtige Rolle beim Aufbau und der Stabilität des Enzym-Komplexes.

Die sieben nukleär-kodierten *core*-Untereinheiten NDUFS1-3, NDUFS7-8, sowie NDUFV1-2 sind hydrophil und somit im peripheren Arm gelegen. Sie weisen Bindemotive für Redoxgruppen und das Substrat NADH-H⁺ auf. Als katalytisches Zentrum sind sie für den

Elektronentransfer von NADH-H^+ auf Ubiquinon verantwortlich. Außerdem übernehmen sie Funktionen in der Ubiquinon-Bindung und dem Aufbau und der Stabilität des Enzym-Komplexes (Hirst *et al.* 2003).

Die Eintrittspforte für den Elektronentransport liegt in der NDUFV1-Untereinheit. Sie weist eine NADH-H^+ -Bindestelle auf, die das Substrat bindet. Elektronen werden direkt auf NDUFV1-gebundenes FMN übertragen. Über vektoriellen Transport über die Eisen-Schwefel-Cluster N3-N1b-N4-N5-N6a-N6b-N2 werden die Elektronen dann auf Ubiquinon übertragen (Brandt *et al.* 2003). Der Eisen-Schwefel-Cluster N2 der NDUFV7-Untereinheit ist der letzte in der Elektronentransportkette und weist im Gegensatz zu den anderen Isopotential-Clustern ein positives, pH-abhängiges Redox-Potential auf. Durch seine räumliche Nähe zum Membranarm scheint er einen kritischen Teil zur Protonenpumpe beizutragen (Ingledeu und Ohnishi 1980; Brandt 1997; Ohnishi 1998). Der Eisen-Schwefel-Cluster N1a nimmt nicht am Elektronentransfer teil. Ihm wird eine Rolle als Antioxidans zugeschrieben, indem er Elektronen von FMN übernimmt und so die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) reduziert (Sazanov und Hinchliffe 2006).

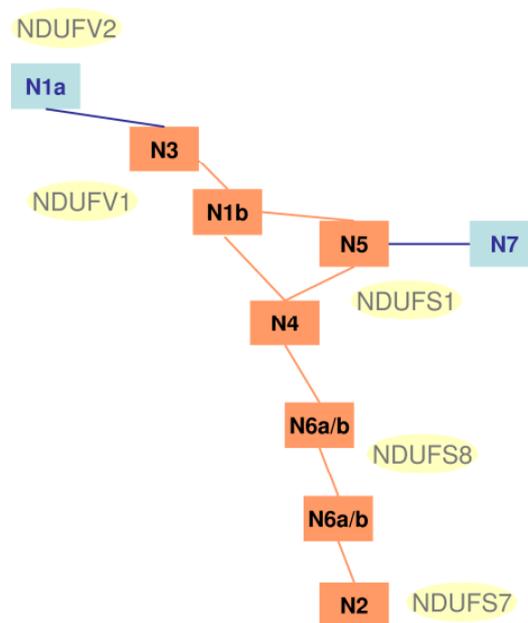


Abb. 1.4: Vektorieller Elektronentransport über Eisen-Schwefel-Cluster. Dargestellt sind die Redoxzentren (rot), die eine kontinuierliche Elektronentransportkette durch den Komplex I bilden. N1a (blau) nimmt nicht direkt am Transport teil. N7 ist nur in Prokaryonten zu finden. Die Zugehörigkeit der Redoxzentren zu den einzelnen Untereinheiten (gelb) ist ebenfalls angegeben.

Die Reduktion von Ubiquinon zu Ubiquinol verläuft über ein Semiquinon-Zwischenprodukt. Man geht davon aus, dass der Komplex I mehrere Ubiquinon-Bindestellen besitzt. An der

Ubiquinon-Bindung sind die kernkodierte Untereinheiten NDUFS2 und NDUFS7 (Kashani-Poor *et al.* 2001), sowie die mtDNA-kodierte Untereinheit ND1 beteiligt (Earley *et al.* 1987).

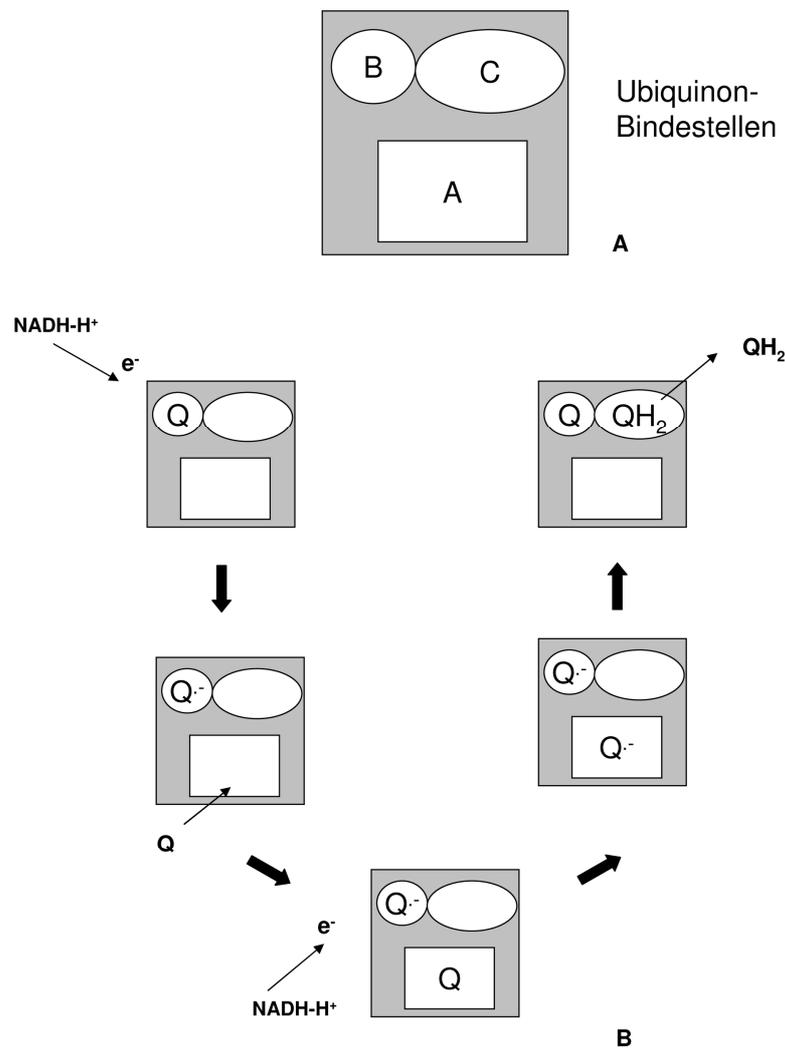


Abb. 1.5: Ubiquinon-Reduktion. (A) Ubiquinon-Bindestellen im Komplex I. (B) Katalytischer Zyklus der Ubiquinon-Reduktion. Das erste Elektron von $NADH-H^+$ reduziert ein schwach gebundenes Ubiquinon an der **Bindestelle B**, wodurch ein Semiquinon-Zwischenprodukt gebildet wird. Das zweite Elektron von $NADH-H^+$ wird an ein weiteres Molekül Ubiquinon gebunden, das in den Komplex an der hydrophoben **Bindestelle A** eintritt. Dieses zweite gebildete Semiquinon bildet mit dem ersten an **Bindestelle C** das Ubiquinol-Produkt, welches den Komplex schließlich verlässt. Oxidiertes Ubiquinon verbleibt an Bindestelle B und reinitiert den katalytischen Zyklus (Degli Esposti und Ghelli 1994).

Während die Funktion der 14 *core*-Untereinheiten relativ gut untersucht ist, ist sie für die restlichen 31 *accessory*-Untereinheiten teilweise noch ungeklärt. Generell scheinen sie Aufgaben beim Aufbau und der Stabilität des Komplexes zu übernehmen und Schutzfunktionen gegen oxidative Schäden auszuüben (Schulte *et al.* 1999; Hirst *et al.* 2003; Efremov *et al.* 2010). Auch werden in ihnen regulatorische Funktionen vermutet und sie scheinen am Import kernkodierter Untereinheiten durch die mitochondriale Doppelmembran teilzunehmen. Die *acces-*

sory-Untereinheiten sind alle kernkodiert und weisen unterschiedliche Modifikationen auf. Untereinheiten mit einer Transmembranhelix (*single transmembrane domain*, STMD) könnten an der Organisation der sieben mtDNA-kodierten ND-Untereinheiten in der Membran beteiligt sein (Abdrakhmanova *et al.* 2004). Vier *accessory*-Untereinheiten besitzen mehrere konservierte Cysteine, so dass sie wahrscheinlich am Zusammenbau (*assembly*) der Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt sind (Videira 1998; Cardol *et al.* 2004). Mehrere Untereinheiten unterliegen einer reversiblen Phosphorylierung, die bei der Regulation der Enzymaktivität eine Rolle spielt und den Elektronentransfer und die ROS-Produktion beeinflusst (Schilling *et al.* 2005). Einige Untereinheiten zeigen besondere Charakteristika. So findet sich bei NDUFA11 eine Homologie zu TIM-Proteinen der Translokase der inneren Mitochondrienmembran, die eine Rolle beim Proteinimport spielen. (Carroll *et al.* 2002; Gabaldon *et al.* 2005). NDUFA13, auch bekannt als GRIM-19 (*gene associated with retinoid-interferon-induced mortality 19 protein*), fungiert unter anderem als proapoptotischer Faktor und spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptose-Induktion (Fearnley *et al.* 2001; Angell *et al.* 2002; Huang *et al.* 2004). Möglicherweise könnte dieses Protein die mitochondriale Atmungskette mit apoptotischen Prozessen verknüpfen (Hirst *et al.* 2003). NDUFA10 zeigt eine Homologie zur mitochondrialen Thymidin-Kinase, so dass hier eine mögliche Verbindung zwischen Komplex I und der mitochondrialen Proteinsynthese besteht (Gabaldon *et al.* 2005). NDUFAB1 ist mit einer Phosphopantethein-Gruppe modifiziert. Es ist eng verwandt mit den Acyl-Carrier-Proteinen, so dass ihm neben seiner Rolle im Komplex I eine Funktion bei der *de novo* Fettsäure-Synthese zukommt (Cronan *et al.* 2005). Ein Überblick über die einzelnen Untereinheiten des Komplexes I und ihre Charakteristika findet sich im Anhang (Tabelle A.7, in Anlehnung an Janssen *et al.* 2006).

Komplex I liegt in der Elektronentransportkette nicht isoliert vor, sondern bildet mit den Komplexen III und IV einen sogenannten Superkomplex, ein Respirasom (Schägger und Pfeiffer 2000; Schägger 2002). Solch ein Respirasom besteht aus einem monomeren Komplex I, einem dimeren Komplex III und bis zu vier Kopien des Komplexes IV ($I_1III_2IV_{2-4}$). Die Signifikanz der Respirasome liegt in der Erhöhung der katalytischen Aktivität durch Verringerung der Diffusionszeit der Substrate und durch Abschirmung konkurrierender Enzyme, sowie der besseren Stabilisierung der einzelnen Subkomplexe (Schägger *et al.* 2002, 2004; Acin-Perez *et al.* 2004).

1.2.3 Biogenese

Die Biogenese und das *assembly* des Komplexes I unterliegen einem komplizierten Prozess, bei dem die Bildung von peripherem Arm und Membranarm über mehrere Intermediate erfolgt. Die beiden Arme werden dabei nicht unabhängig voneinander gebildet, sondern über eine konzertierte Aktion der Membranverankerung eines Intermediats des peripheren Arms mit einem Intermediat des Membranarms und die Erweiterung beider Arme mit weiteren Untereinheiten zum vollständigen Komplex I (Antonicka *et al.* 2003). Ein Konsensus-Modell für das *assembly* des humanen Komplexes I beschreibt folgende Schritte: Ein erstes Intermediat des peripheren Arms besteht mindestens aus den nukleären *core*-Untereinheiten NDUFS2 und NDUFS3, die durch die mitochondriale Untereinheit ND1 in der Membran verankert werden. Dieser Prä-Komplex wird dann um ein vorgefertigtes Membran-Intermediat aus den restlichen ND-Untereinheiten, sowie ein vorgefertigtes Intermediat aus den Untereinheiten NDUFS1, NDUFS7 und NDUFS8 des peripheren Arms erweitert. Nach dem *assembly* der beiden peripheren und Membran-Intermediate wird die Struktur um die Untereinheiten des Membranarms NDUFA9, NDUFA10 und NDUFB8 und des peripheren Arms NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, NDUFS4 und NDUFS6 erweitert, um schließlich vollständig zum Komplex I aufgebaut zu werden (Antonicka *et al.* 2003; Ugalde *et al.* 2004; Lazarou *et al.* 2007; Vogel *et al.* 2007a).

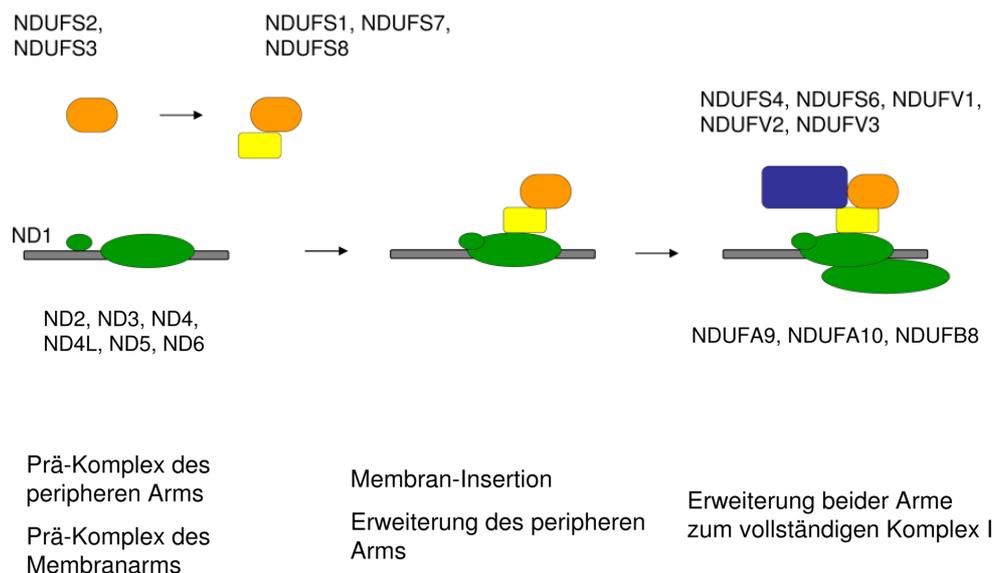


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des *assembly*-Prozesses des Komplexes I. Der Zusammenbau beginnt mit der Bildung von Prä-Komplexen aus nukleär-kodierten Untereinheiten (orange, gelb) und mtDNA-kodierten Untereinheiten (grün). Nach Verankerung beider Prä-Komplexe in der Membran erfolgt die Erweiterung um weitere nukleär-kodierte Untereinheiten (blau) bis hin zum vollständig zusammengesetzten Komplex I.

Um den Aufbauprozess des Komplexes I zu koordinieren, sind Chaperone nötig, die am *assembly* beteiligt sind, ohne selbst Bestandteil der finalen Komplex I-Struktur zu sein. Als am Aufbau des Säuger-Enzyms beteiligten Chaperone wurden bislang NDUFAB1 (Vogel *et al.* 2005), Ecsit (Vogel *et al.* 2007b), Mimitin (Ogilvie *et al.* 2005, Tsuneoka *et al.* 2005), AIF (Vahsen *et al.* 2004, Joza *et al.* 2005), C6orf66 (Saada *et al.* 2008), C8orf38 (Pagliarini *et al.* 2008) und C20orf7 (Sugiana *et al.* 2008) identifiziert.

1.2.4 Inhibition des Komplexes I und seine Beteiligung an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Komplex I kann von mehr als 60 verschiedenen organischen Verbindungen inhibiert werden. Diese können sowohl natürlich vorkommen als auch synthetisch erzeugt sein. Diese Inhibitoren wirken zum Großteil auf die NADH-Ubiquinon-Reduktase-Aktivität ein. Sie lassen sich anhand ihrer Enzymkinetik in drei Gruppen einteilen. **Gruppe I** sind direkte Antagonisten des Ubiquinon-Substrats. Prototyp dieser Gruppe ist Piercidin A. **Gruppe II**, zu denen der klassische Komplex I-Inhibitor Rotenon zählt, sind Antagonisten des enzymgebundenen Semiquinon-Derivats. **Gruppe III** fungieren als Antagonisten des Produkts Ubiquinol und umfassen die Familie der Vanilloide (Degli Esposti 1998; Okun *et al.* 1999). Während Gruppe II-Inhibitoren nicht kompetitiv binden, zeigen Gruppe I-Inhibitoren einen kompetitiven Hemmtyp gegenüber endogenem Ubiquinon und eine teilweise kompetitive Hemmung in Bezug auf exogene Ubiquinon-Analoga (Friedrich *et al.* 1994). Gruppe III-Inhibitoren interagieren entweder direkt mit der Ubiquinol-Freisetzungsstelle oder aber beeinträchtigen die Disproportionierung der beiden Semiquinon-Derivate, so dass keine vollständige Reduktion zu Ubiquinol stattfindet (Degli Esposti 1998).

Neben seiner Redox-Funktion in der Elektronentransportkette wird Komplex I auf der anderen Seite auch selbst als eine Hauptquelle der ROS (*reactive oxygen species*)-Bildung angesehen (Fridovic 1978; Turrens 2003). Alle Kofaktoren, die auch am Elektronentransport beteiligt sind, scheinen eine Rolle bei der Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies zu spielen: Flavine (Liu *et al.* 2002; Galkin und Brandt 2005; Vinogradov und Grivennikova 2005; Kussmaul und Hirst 2006), Eisen-Schwefel-Cluster (Genova *et al.* 2001; Kushnareva *et al.* 2002), sowie enzymgebundenes NAD (Krishnamoorthy und Hinkle 1988). Auch die Semiquinon-Zwischenprodukte gelten als Erzeuger von ROS (Lambert und Brand 2004; Ohnishi *et al.* 2005). Der Hauptdonor für Elektronen zur ROS-Generierung ist aber reduziertes FMN (Galkin und Brandt 2005; Kussmaul und Hirst 2006). Der Hauptvertreter der von Komplex I

gebildeten ROS ist das Superoxid-Anion Radikal O_2^- (Kussmaul und Hirst 2006). Da die Bildung von Sauerstoffradikalen beim Komplex I-Mangel erhöht ist, scheinen strukturelle Modifikationen des Enzyms eine entscheidende Rolle für den Prozess der ROS-Bildung bei nicht korrekt zusammengebautem Komplex I zu spielen. So hat vermutlich ein Teil der *accessory*-Untereinheiten einen Einfluss auf die ROS-Produktion (Raha und Robinson 2000). Komplex I-Inhibitoren der Gruppen I und II induzieren eine erhöhte ROS-Produktion, da sie den Zugang von Ubiquinon zu seiner Reduktionsbindestelle blockieren und so die Abgabe der Elektronen an molekularen Sauerstoff ermöglichen (Lenaz *et al.* 2006; Fato *et al.* 2009). Inhibitoren der Klasse III dagegen verhindern die ROS-Bildung. Sie erlauben die Übertragung von Elektronen auf Ubiquinon, wodurch sich das Semiquinon-Zwischenprodukt bildet und Elektronen nicht an molekularen Sauerstoff abgegeben werden können. Die weitere Reduktion zu Ubiquinol wird jedoch verhindert (Lenaz *et al.* 2006; Fato *et al.* 2009).

1.3 Die Struktur des *NDUFVI*-Gens

Das humane *NDUFVI*-Gen ist rund 6 kbp groß und auf dem Chromosom 11q13 lokalisiert (Ali *et al.* 1993; Schuelke *et al.* 1998). Es besteht aus zehn Exons mit Größen von 72-213 bp und neun Introns mit Größen von 73-1320 bp.

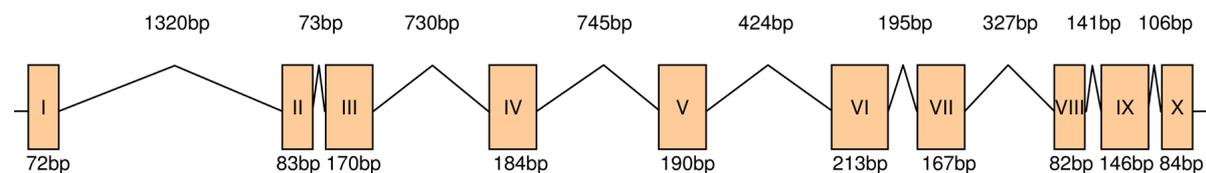


Abb. 1.7: Genomische Struktur des humanen *NDUFVI*-Gens. Die zehn Exons (orange Kästen) werden durch römische Zahlen beziffert. Die Größe der Exons und Introns (durchgezogene Striche) sind jeweils angegeben. Die genomische Sequenz wurde von GenBank (*accession number* AF053069) bezogen.

Alle Exon-Intron Übergänge gehorchen in ihrem Spleißverhalten der AG...GT-Regel. Die 1.540 bp lange cDNA des *single copy* Gens kodiert für ein Protein mit einer Masse von 50,8 kb, bestehend aus 464 Aminosäuren. Die ersten 20 Aminosäuren bilden dabei die putative Mitochondrien-Import-Sequenz. Innerhalb der Aminosäuresequenz wurden Motive für die Bindestellen von FMN, der Eisen-Schwefel-Cluster und von $NADH-H^+$ identifiziert (Wierenga *et al.* 1986; Walker 1992; Schuelke *et al.* 1998, siehe Anhang, Abb. A.2). Die *NDUFVI*-Untereinheit ist hoch konserviert und zeigt eine hohe Homologie innerhalb verschiedener pro- und eukaryontischen Spezies (Patel *et al.* 1991).

1.4 Patienten mit Komplex I-Mangel

Erkrankungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels treten bei Lebendgeburten mit einer Inzidenz von über 13,1/100.00 auf (Skladal *et al.* 2003a). Ein isolierter Komplex I-Mangel gehört dabei zu den häufigsten Auslösern von Mitochondriopathien (Robinson 1998). Komplex I-Defekte können dabei sowohl durch Mutationen der mtDNA- und nukleär-kodierten Strukturgene zustande kommen, als auch durch Mutationen in Nicht-Strukturgenen, die an *assembly*, der Regulation von Transkription und Translation, dem Proteinimport und der Proteinfaltung, sowie an der Regulation der katalytischen Aktivität beteiligt sind (van den Heuvel und Smeitink 2001; Distelmaier *et al.* 2009; Willems *et al.* 2009). Mutationen wurden in allen sieben mtDNA-kodierten Untereinheiten, sowie in folgenden nukleär-kodierten Strukturgenen beschrieben: *NDUFV1* (Schuelke *et al.* 1999; Benit *et al.* 2001), *NDUFV2* (Benit *et al.* 2003), *NDUFS1* (Martin *et al.* 2005), *NDUFS2* (Loeffen *et al.* 2001), *NDUFS3* (Benit *et al.* 2004), *NDUFS4* (van den Heuvel *et al.* 1998), *NDUFS6* (Kirby *et al.* 2004), *NDUFS7* (Triepels *et al.* 1999), *NDUFS8* (Loeffen *et al.* 1998; Procaccio und Wallace 2004), *NDUFA1* (Fernandez-Moreira *et al.* 2007), *NDUFA2* (Hoefs *et al.* 2008) und *NDUFA11* (Berger *et al.* 2008). Ebenfalls wurden Mutationen in den *assembly* Genen *NDUFAF2* (Ogilvie *et al.* 2005), *C20orf7* (Sugiana *et al.* 2008), *NDUFAF3*, *NDUFAF4* (Saada *et al.* 2009), *NUBPL* und *FOXRED1* (Calvo *et al.* 2010), sowie in mitochondrialen tRNAs beschrieben, die einen Komplex I-Defekt nach sich ziehen (Zeviani *et al.* 1998).

Patienten mit Komplex I-Mangel sind bezogen auf ihren Krankheitsverlauf und ihren klinischen und biochemischen Phänotyp äußerst heterogen (Robinson 1993; Pitkanen *et al.* 1996; Kirby *et al.* 1999; Loeffen *et al.* 2000). Bei einem Großteil der Patienten zeigen sich die ersten Symptome häufig nach der Geburt oder innerhalb der ersten fünf Lebensjahre. Klinisch manifestieren sich mitochondriale Krankheiten meist innerhalb der ersten 15 Lebensmonate. Neben einem Krankheitsverlauf mit einer milden Myopathie (Pitkanen *et al.* 1996) ist der weitaus häufigere Phänotyp durch eine Multi-Systemerkrankung gekennzeichnet, bei der vor allem Gewebe und Organe mit einem hohen Energiebedarf wie Gehirn, Skelett- und Herzmuskulatur, Leber und Bauchspeicheldrüse betroffen sind (Loeffen *et al.* 2000). Phänotypisch zeigt sich dies anhand von Enzephalo- und Kardiomyopathien, Leukodystrophie, Epilepsie und Ataxie. Biochemische Charakteristika sind neben einer verminderten ATP-Produktion erhöhte Konzentrationen von Laktat, Alanin und Ketonkörper in den Körperflüssigkeiten, sowie ein erhöhtes Laktat/Pyruvat Verhältnis (Munnich *et al.* 1992; Trijbels *et al.* 1993). Ebenso können abnormale Konzentrationen von Prolin und Zitrullin beobachtet werden (Ra-

bier *et al.* 1998). Des Weiteren wurde in Geweben mit Komplex I-Mangel eine erhöhte Produktion von ROS festgestellt (Balaban *et al.* 2005; Koopman *et al.* 2005) und damit zusammenhängend eine Veränderung des Membranpotentials (Nicolls 2004; Distelmaier *et al.* 2009), sowie die Induktion und Vermehrung apoptotischer Prozesse (Green 2005). In Folge des gestörten Aufbaus eines Protonengradienten wurden in diesem Zusammenhang auch Störungen in der Kalzium-Homöostase gefunden (Brini *et al.* 1999; Visch *et al.* 2004; Tavi *et al.* 2005).

Der häufigste Phänotyp der Patienten mit einem Komplex I-Defekt ist das Leigh Syndrom. Hierbei handelt es sich um eine fortschreitende Neurodegeneration, die durch meist bilateral symmetrische Veränderungen im Gehirn gekennzeichnet ist (Leigh 1951; Finsterer 2008). Charakteristisch ist eine Degeneration der Basalganglien, besonders des *Putamens*, des Thalamus und Hirnstammes, des Kleinhirns und Dienzephalons, sowie der weißen und grauen Substanz. Dementsprechend zeigt der Großteil der Patienten einen neuronalen Funktionsverlust, der sich in psychomotorischer Regression, einzelnen zerebralen Krampfanfällen bis hin zu Epilepsie, Dystonie, Ataxie, Lähmung der Sehnerven und einer Störung der Atemregulation (Hypopnoe) manifestiert. Symptome der Erkrankung treten für gewöhnlich im Säuglings- und Kleinkindalter auf (Loeffen *et al.* 2000; Ostergaard *et al.* 2007). Die Erkrankung verläuft meist sehr schwer und ein Großteil der Patienten verstirbt vor Vollendung des fünften Lebensjahres (Benit *et al.* 2004).

1.5 Gehirnentwicklung

Da ich mit meiner Dissertation die Expression des mitochondrialen Komplexes I während der embryonalen und postnatalen Entwicklung des Gehirns untersuchen möchte, beschreibe ich im Folgenden kurz die Hirnentwicklung in dem hier betrachteten Modellorganismus, der Maus.

1.5.1 Die embryonale Gehirnentwicklung der Maus

Zur Beurteilung des Entwicklungsstadiums der Maus dienen Einteilungsschemata nach Embryonaltag (E) oder die Einteilung nach Theiler (Theiler-Stadium TS, Theiler 1972). Der Morgen nach der *plug*-positiven Verpaarung wird dabei als E0.5 festgelegt, was dem Theiler-Stadium 1 (TS1) entspricht.

Nach der Befruchtung der Eizelle bildet sich über kleinere Furchungszellen (Blastomere) und das Morula-Stadium die Blastozyste aus, die sich in der Gebärmutter einnistet (E3-E4). Die eigentliche Entwicklung des Embryos beginnt am Tag E6.5 mit der Gastrulation (Kaufman und Bard 1999). Nach erfolgter Implantation entwickelt sich aus der Blastozyste der Embryoblast, der zunächst aus zwei Keimblättern, dem Endoderm (Hypoblast) und dem Ektoderm (Epiblast) besteht. Aus letzterem entwickelt sich unter anderem das Zentralnervensystem (ZNS). Im Gegensatz zum Menschen sind bei der Maus die Keimblätter umgekehrt angeordnet: Das Endoderm legt sich nach außen, das Ektoderm nach innen. Durch Zelleinwanderung aus dem Ektoderm zwischen beide Keimblätter bildet sich als drittes Keimblatt das Mesoderm aus. Die mesodermalen Zellen bilden zunächst einen Primitivstreifen, welcher zur *Chorda dorsalis*, dem Vorläufer der Wirbelsäule, differenziert. Es schließt sich am Tag E7.5 die Neurulation an, womit die frühe Organogenese beginnt. Durch Induktion aus dem *Chorda*-Mesoderm proliferiert das darübergelegene Ektoderm zum Neuroektoderm, welches die Neuralplatte bildet. Durch Furchung entsteht die Neuralrinne, welche sich nach kranial und kaudal verlängert. Seitlich der Neuralrinne bilden sich aus dem Neuroektoderm Neuralfalten, die über der Neuralrinne fusionieren und so das Neuralrohr bilden. Aus dem rostralen Ende des Neuralrohrs entwickelt sich das Gehirn, aus dem kaudalen Ende das Rückenmark. Der Hohlraum differenziert zum Ventrikelsystem (Jacobsen 1991). Durch Einstülpungen im rostralen Bereich bilden sich ab dem Embryonaltag E9 drei primäre Gehirnbläschen aus: Prosenzephalon (Vorderhirn), Mesenzephalon (Mittelhirn) und Rhombenzephalon (Hinterhirn). Das Prosenzephalon differenziert weiter in das Diencephalon mit der Augenanlage und zwei telencephale Bläschen. Aus letzteren entwickeln sich nach lateral die zerebralen Kortizes und nach rostral das olfaktorische System. Aus dem Diencephalon entwickeln sich Thalamus, Epithalamus und Hypothalamus. Das Mesenzephalon stellt die Verbindung zwischen Vorder- und Hinterhirn dar. Das Rhombenzephalon differenziert seinerseits in das Metenzephalon und das Myelenzephalon. Während der Bildung dieser fünf Gehirnabschnitte wird die ursprünglich röhrenförmige Gestalt des Gehirns stark verändert, da die verschiedenen Areale unterschiedlich schnell an Volumen zunehmen. Der größte Hirnabschnitt ist das Telencephalon, der sich ab dem Embryonaltag E10 in zwei Hemisphären separiert. Rostral bildet sich um den Zeitpunkt E12.5 der olfaktorische Kortex, der zwei paarige *Bulbi olfactorii* (Riechkolben) formt. Verbunden werden die beiden Hemisphären durch das *Corpus callosum* (Balken). Der Balken dient dem Informationsaustausch und der Koordination zwischen beiden Hemisphären. An ihrer Oberfläche sind sie durch den *Cortex cerebri* (Großhirnrinde) bedeckt. Die Kortikogenese ist ein sukzessiver Prozess. Der Kortex entwickelt sich aus den beiden telencephalen Bläs-

chen, die anfangs aus einer Schicht undifferenzierter Neuroepithelzellen bestehen, der ventrikulären Zone. Etwa ab dem Tag E10 wandern postmitotische Zellen radiär aus der ventrikulären Zone aus und bilden die erste sichtbare Kortexschicht, die Marginalzone. Die Wanderung wird durch radiale Gliazellen unterstützt (Rakic 1971, 1972, 1974; Edmondson und Hatten 1987). Die Zellen differenzieren weiter und bilden synaptische Verbindungen aus. Durch das Einwachsen afferenter Axone aus dem Diencephalon bildet sich zwischen der ventrikulären Zone und der Marginalzone eine intermediäre Zone aus. Aus der ventrikulären Zone wandern weitere Neurone in die Marginalzone und bilden die kortikale Platte, welche die Marginalzone in einen äußeren Teil, die spätere *Lamina I* (Molekularschicht), und einen inneren Teil (Sub-Platte), die spätere *Lamina VI* (multiforme Schicht), teilt (Allendoerfer und Shatz 1994). Während bei Nagern die Sub-Platte relativ dünn ist, bildet sie beim Menschen die markanteste transiente Zellschicht (Kostovic und Rakic 1990; Uylings und van Eden 1990). Die Bildung der kortikalen Platte setzt etwa zum Zeitpunkt E13-E14 ein (Super *et al.* 1998). Durch weiteres Einwandern von Neuronen aus der ventrikulären Zone entstehen innerhalb der kortikalen Platte die *Laminae II-V*, wobei sich zuerst die Zellen der späteren *Lamina V* (innere Pyramidenzellschicht) entwickeln, dann die der *Lamina IV* (innere Körnerzellschicht), der *Lamina III* (äußere Pyramidenzellschicht) und schließlich die der *Lamina II* (äußere Körnerzellschicht).

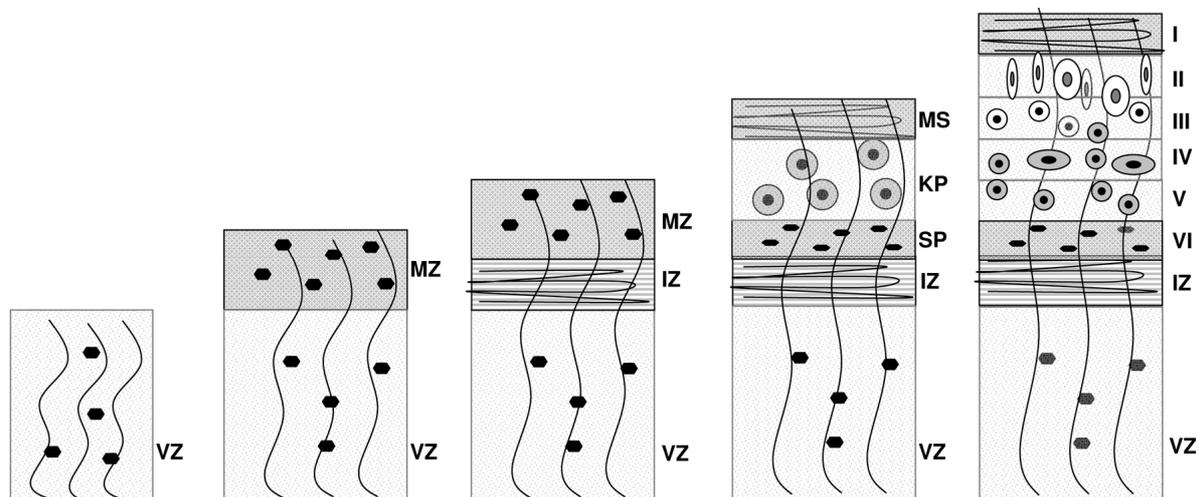


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Kortikogenese. Aus dem Neuroepithel der ventrikulären Zone (VZ) wandern postmitotische Zellen in die Marginalzone (MZ). Unterhalb der MZ bildet sich eine intermediäre Zone (IZ) aus. Aus dieser wandern Neurone in die MZ und bilden die kortikale Platte (KP), die die MZ in die Molekularschicht (MS, spätere Schicht I) und die Sub-Platte (SP, spätere Schicht VI) teilt. Durch die Zellmigration nach dem *inside-out*-Prinzip bilden sich innerhalb der kortikalen Platte die kortikalen Schichten II-V aus.

Da die Entwicklung einem von innen nach außen gerichteten Reifungsgradienten folgt, wird sie auch als *inside-out-layering* bezeichnet (Angevine und Sidman 1961; Berry und Rogers 1965; Rakic 1974). Die neuronale Migration ist etwa zum Zeitpunkt E18 abgeschlossen. Postnatal folgen weitere morphologische und funktionelle Differenzierungsprozesse der eingewanderten Zellen. Anders als beim Menschen, bei dem die meisten Neurone der Sub-Platte nach abgeschlossener Entwicklung verschwinden (Kostovic und Rakic 1980; Luskin und Shatz 1985; Allendoerfer und Shatz 1994), bilden sie bei Nagern die kortikalen *Laminae* VIb und VII (Valverde *et al.* 1989; Uylings *et al.* 1999).

Das Telenzephalon besteht aus der *Substantia grisea* (graue Substanz) und der innen liegenden *Substantia alba* (weiße Substanz). Die graue Substanz besteht vorwiegend aus Nervenzellkörpern. Sie umfasst den Kortex und die subkortikalen Kerne. Ihren Namen trägt sie daher, weil diese Zellstrukturen im Formalin-fixierten Präparat grau erscheinen. Die weiße, zellarme Substanz besteht aus Nervenfasern. Die Axone der Nervenfasern werden durch Myelinscheiden elektrisch isoliert. Da Myelin einen sehr hohen Lipidanteil besitzt, erscheinen myelinreiche Strukturen makroskopisch weiß, woher die weiße Substanz ihren Namen bezieht. Das Myelin wird von Gliazellen, den Oligodendrozyten, gebildet. Die Mehrheit der Gliazellen im Zentralnervensystem der Säuger wird jedoch von Astrozyten gebildet. Man unterscheidet zwei Arten von Astrozyten: die protoplasmatische Glia, die sich vor allem in der grauen Substanz findet und die fibrillenreiche Faserglia, die in der weißen Substanz lokalisiert ist. Der Mensch besitzt im Gegensatz zur Maus sehr viel mehr weiße Substanz. Im Bereich der Basalganglien bildet die weiße Substanz die *Capsula interna*, welche kortikospinale Projektionsbahnen (Pyramidenbahn) enthält. Dem Kortex angeschlossen sind der Palaeokortex, der das Rhinenzephalon (Riechhirn) enthält, und der Archiokortex, der den Hippokampus formt, welcher eine zentrale Rolle beim Lernen und Gedächtnisprozessen spielt. Zur hippokampalen Formation zählen der *Gyrus dentatus*, das *Cornu ammonis* (Ammonshorn), das in die Regionen CA1 und CA3 (distaler und proximaler Teil) unterteilt wird, sowie als Übergang zum zerebralen Kortex das *Subiculum*. Im *Gyrus dentatus* finden sich hauptsächlich Körnerzellen, in den Regionen des Ammonshorns exzitatorische Pyramidenzellen (Lorente de No 1934). Der *Gyrus dentatus* ist das wichtigste afferente System des Hippokampus, während das *Subiculum* einen Großteil des efferenten Systems bildet. Im Gegensatz zum sechsschichtigen Kortex ist der Hippokampus nur dreischichtig. Der Entwicklungsprozess, der etwa ab dem Embryonaltag E14 beginnt, ist aber sehr ähnlich. Die Schichtung erfolgt ebenfalls nach dem Prinzip des *inside-out-layerings* (Caviness 1973; Marin-Padilla 1978; Altman und Bayer 1990). In dem sich entwickelnden Hippokampus wird die Marginalzone in eine innere und eine äußere

Marginalzone unterteilt. Aus der inneren Marginalzone entwickelt sich das *Stratum radiatum*, aus der äußeren das *Stratum lacunosum*. Beide Schichten gehören zum *Stratum moleculare* (Molekularschicht), der äußeren der drei Hippokampusschichten. Die mittlere Schicht, das *Stratum pyramidale* (Pyramidenschicht), entwickelt sich aus der kortikalen Platte, die im Gegensatz zum zerebralen Kortex nicht mehrschichtig wird, sondern nur diese eine Schicht bildet. Die innerste Schicht, das *Stratum oriens* (Korbzellschicht), entwickelt sich aus der Subplatte, welche im Vergleich zum Neokortex schwach entwickelt ist (Soriano *et al.* 1994; Super *et al.* 1998). Im *Gyrus dentatus* ist das *Stratum pyramidale* durch das *Stratum granulare* ersetzt. Der *Gyrus dentatus* bildet zeitlebens neue Nervenzellen (Altman und Das 1965).

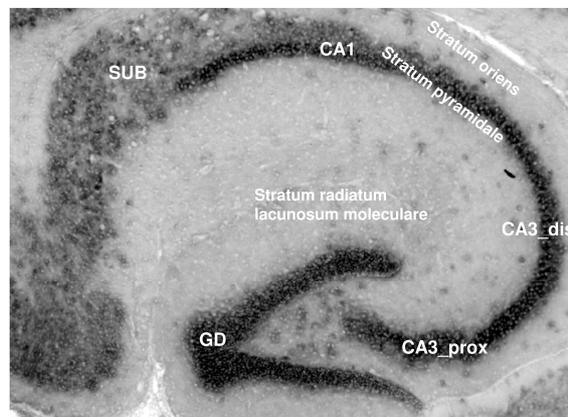


Abb. 1.9: Adulte Hippokampusformation. Darstellung einer *in situ* Färbung des Hippokampus der adulten Maus. Der *Gyrus dentatus* (GD) bildet zusammen mit den *Cornu ammonis* Schichten CA1 und CA3 (distaler und proximaler Teil), sowie dem *Subiculum* (SUB) die Hippokampusformation. Der Hippokampus zeigt den dreischichtigen Aufbau aus *Stratum oriens*, *Stratum pyramidale* und *Stratum radiatum lacunosum moleculare*.

Ab dem Embryonaltag E12 differenziert sich das Diencephalon in Thalamus, Hypothalamus und Epithalamus. Der Thalamus, der größte Anteil des ehemaligen Diencephalons, ist für die Verarbeitung sensorischer Impulse verantwortlich und somit an der Generation von Emotionen, Schmerz, Gedächtnis und instinktivem Verhalten beteiligt. Er besteht aus zwei Hälften, die sich zum Embryonaltag E17 soweit vergrößert haben, dass sie sich unterhalb der *Commissura anterior* treffen und voneinander durch die *Massa intermedia* getrennt werden. Vom Hypothalamus, dessen Differenzierung ab dem Embryonaltag E12.5 beginnt, wird er durch den *Sulcus hypothalamicus* getrennt. Der Hypothalamus kontrolliert alle vegetativen Funktionen wie Nahrungsaufnahme, Wasserhaushalt und Körpertemperatur. Mit der benachbarten Hypophyse bildet er ein übergeordnetes neuroendokrines Zentrum. Der Epithalamus wird ab dem Zeitpunkt E13.5-E14.5 sichtbar. Er fungiert als Verbindung zwischen Projektionsbahnen aus dem Riechhirn, dem Hirnstamm und der Zirbeldrüse. Über den *Sulcus epithalamicus* ist er

mit dem Hypothalamus verbunden. Zum Zeitpunkt E12 entwickelt sich der *Plexus choroideus*, der den *Liquor cerebrospinalis* (Rückenmarksflüssigkeit) bildet. Ab E13.5 bildet sich der *Nucleus caudatus* (Schweifkern) und ab E16.5 der *Nucleus lentiformis* (Linsenkern), der in das *Putamen* und den *Globus pallidus* unterteilt wird. *Nucleus caudatus* und *Putamen* werden zwar durch die *Capsula interna* voneinander getrennt, bleiben aber durch einen Streifen grauer Substanz miteinander verbunden und werden deshalb als *Corpus striatum* (Streifenkörper) bezeichnet. Zusammen mit der *Substantia nigra* (schwarze Substanz), die ein wichtiges Kerngebiet der Motorik darstellt und durch seinen hohen Anteil an Eisen und Melanin dunkel erscheint, und dem *Nucleus subthalamicus*, der für die Steuerung der Grobmotorik verantwortlich ist, werden diese Strukturen auch als Basalganglien bezeichnet. Sie sind für die Kontrolle willkürlicher Bewegungen verantwortlich.

Das Mesenzephalon (Mittelhirn) ist der kleinste Teil des Gehirns. Es verbindet das Diencephalon des Vorderhirns mit der Brücke des Hinterhirns. Zum Zeitpunkt E17.5 ist seine Größenentwicklung vollständig abgeschlossen. Es ist unter anderem an der Regulation der Augenbewegung beteiligt.

Das Metenzephalon entwickelt sich zum *Cerebellum* (Kleinhirn) und zur *Pons* (Brücke). Das Myelenzephalon entwickelt sich zur *Medulla oblongata* (verlängertes Rückenmark). Die Gewebe des Mittel- und Hinterhirns werden als Hirnstamm bezeichnet. Sie kontrollieren essentielle Funktionen wie Herzschlag, Blutdruck und Atmungsfrequenz.

Das Kleinhirn besteht aus zwei Hemisphären, die durch den *Vermis* (Kleinhirnwurm) voneinander getrennt sind. Wie im Kortex des Großhirns umgibt die graue Substanz die innen liegende weiße Substanz, zu welcher das Kleinhirnmark mit den *Laminae medullares* zählt. Funktionell erfüllt das Kleinhirn wichtige Aufgaben bei der Steuerung und Feinabstimmung der Motorik (Feinmotorik). Seine Entwicklung beginnt etwa ab dem Embryonaltag E14 und ist in der dritten postnatalen Woche abgeschlossen. Der zerebelläre Kortex entwickelt sich aus zwei Proliferationszonen: der Ventrikelzone, aus der das *Stratum ganglionare* (Purkinjellschicht) hervorgeht, und einer Proliferationszone im Bereich der Rautenlippe (Altman 1982; Altman und Bayer 1985). Mitotisch aktive Neurone aus diesem Bereich bilden zeitgleich zur Entstehung der Purkinjellschicht eine externe Körnerzellschicht, die den Hauptteil der Körnerzellen sowie auch Gliazellen beinhaltet (Hausmann und Sievers 1985; Goldowitz und Hamre 1998). Diese externe Körnerzellschicht besteht wiederum aus einer äußeren proliferativen Zone und einer inneren prä-migratorischen und migratorischen Zone postmitotischer Zellen. Postnatal verlassen die Körnerzellen die externe Körnerzellschicht und wandern entlang der Bergmann-Gliafasern durch die Purkinjellschicht hindurch, unterhalb derer sie die

innere Körnerzellschicht bilden. Nach weiteren Differenzierungsprozessen zeigt das Kleinhirn den typischen dreischichtigen Aufbau aus *Stratum moleculare* (Molekularschicht), *Stratum ganglionare* (Purkinjezellschicht) und *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht).

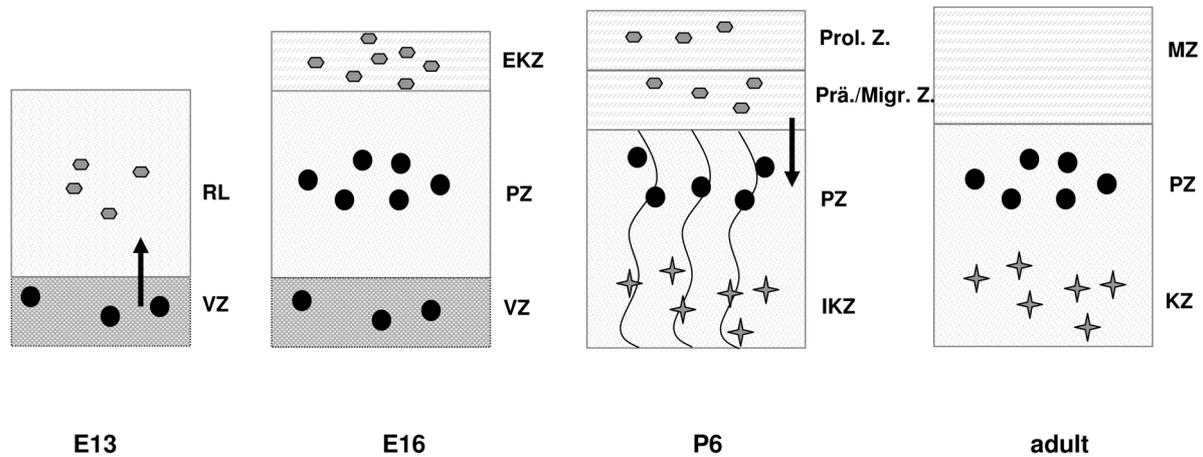


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Kleinhirnentwicklung. Neben der Ventrikelzone (VZ) entsteht im Bereich der Rautenlippe (RL) eine zweite Proliferationszone. Während die Purkinjezellen (PZ ●) postmitotisch werden und sich aus der VZ entwickeln, wandern Vorläufer-Zellen der Körnerzellen (◐) aus der RL in die externe Körnerzellschicht (EKZ), welche aus einer äußeren proliferativen Zone (Prol. Z.) und einer inneren prä-migratorischen und migratorischen Zone (Prä./Migr. Z.) besteht. Aus dieser wandern postmitotische Körnerzellen (✦) entlang von Bergmann-Gliafasern (S) durch die PZ und bilden die innere Körnerzellschicht (IKZ). Am Ende der Entwicklung zeigt das Kleinhirn den typischen dreischichtigen Aufbau aus Molekularzone (MZ), Purkinjezellzone (PZ) und Körnerzellzone (KZ).

Bis zur Geburt der Maus um den Tag E20 und postnatal bis P10 finden weiterhin Wachstums- und Differenzierungsprozesse im gesamten sich entwickelnden Gehirn statt.

1.5.2 Vergleich der Gehirnentwicklung zwischen Maus und Mensch

Der Ablauf der Entwicklung des Nervensystems in Säugern ist sehr stark konserviert (Finlay und Darlington 1995; Darlington *et al.* 1999). Um den zeitlichen Ablauf der Gehirnentwicklung zwischen Labortieren und dem Menschen vergleichen zu können, haben Clancy *et al.* (2007) ein statistisch-basiertes Modell entworfen, mit dem es möglich ist, wichtige neurologische Entwicklungsstadien in unterschiedlichen Spezies zu korrelieren (Clancy *et al.* 2007). Während frühe Entwicklungsereignisse wie Einnistung, Gastrulation und Differenzierung der Keimblätter in Säugern ungefähr die gleiche Zeit beanspruchen (Finlay und Darlington 1995), ergeben sich im weiteren Verlauf der Entwicklung aufgrund der unterschiedlichen Größe des Gehirns (z.B. limbische Regionen und kortikale Gebiete) sowie Spezies-spezifischen Eigenheiten größere zeitliche Unterschiede. Nachfolgend schließt sich ein Über-

blick über die Spezies-spezifische Gehirnentwicklung der Maus und der des Menschen an (Caviness 1982; Rice *et al.* 1985; Robinson und Dreher 1990; Bayer *et al.* 1993; Finlay und Darlington 1995; Clancy *et al.* 2007). Die Darstellung beruht auf der statistisch-basierten Methode von Clancy *et al.* (2007).

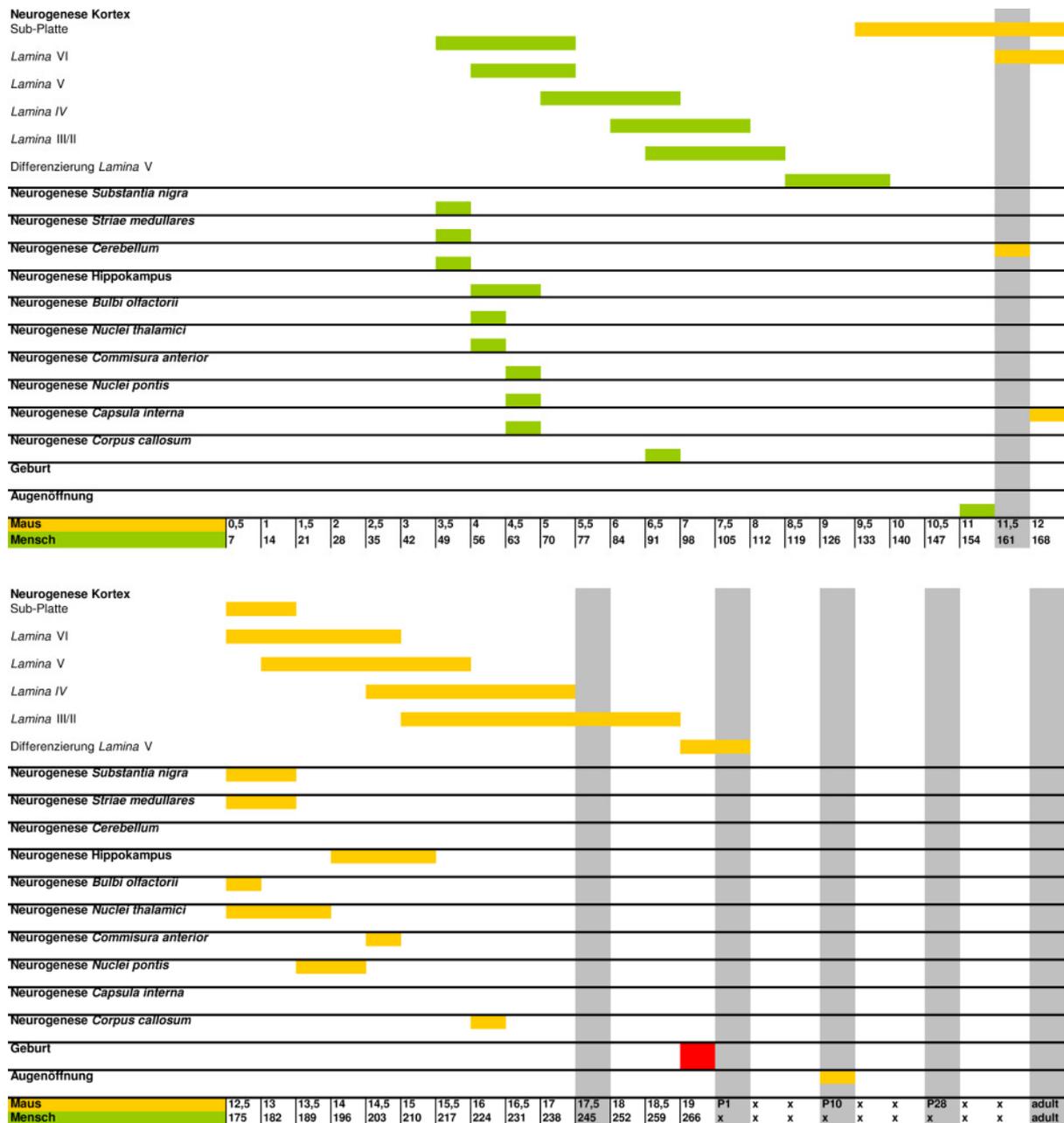


Abb. 1.11: Vergleichende Hirnentwicklung bei Maus und Mensch. Dargestellt sind die wichtigsten Ereignisse der neuronalen Entwicklung bei der Maus (gelb) und beim Menschen (grün). Der rote Balken markiert das Ende der Gestationszeit mit der Geburt. Die grauen Längsbalken repräsentieren diejenigen Zeitpunkte, zu denen ich die Expression der Komplex I-Untereinheiten in den einzelnen Hirnregionen in der Maus untersucht habe.

Die Maus zählt mit einer Gestationszeit von 18,5 Tagen zu einer sich schnell entwickelnden Spezies. Der Mensch hat eine vergleichsweise lange Gestationszeit von 270 Tagen. Im Gegensatz zur Maus zeigt der Mensch einen etwas anderen zeitlichen Verlauf der Gehirnentwicklung. In Primaten (einschließlich des Menschen) ist der zerebrale Kortex sehr viel größer und das limbische System mit den Riechkolben verhältnismäßig sehr viel kleiner ausgeprägt als bei anderen Säugern mit ähnlichem Hirnvolumen. Kortikale Entwicklungsstufen treten daher etwas früher auf und sind verlängert, während die Entwicklung des limbischen Systems in komprimierter Form etwas später einsetzt (Finlay *et al.* 1998, 2001; Clancy *et al.* 2000). Im Gegensatz zur Maus ist das menschliche Gehirn zum Zeitpunkt der Geburt relativ weit entwickelt. Bereits schon zwei Monate vor der Geburt entspricht die Hirnentwicklung des Menschen derjenigen einer etwa zwei Wochen alten Maus. Dies lässt sich damit erklären, dass beim Menschen etwa 88% der neuronalen Entwicklungsereignisse im ersten Drittel der Gestation stattfinden. Nur 1% finden im letzten Drittel statt (Lemire *et al.* 1975). Bei der Maus hingegen sind zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht alle Differenzierungsprozesse abgeschlossen und auch die Augenlider öffnen sich erst am Tag P10-P11.

1.6 *Knockout*-Modelle: Gezieltes Ausschalten von Genen durch homologe Rekombination

Tiermodelle eignen sich sehr gut, um Gendefekte im Rahmen eines komplexen Modellorganismus zu untersuchen. Durch gezieltes Ausschalten von Genen in sogenannten *knockout*-Mäusen lassen sich Kenntnisse über die Pathogenese bestimmter Krankheiten gewinnen, die durch *in vitro* Systeme nur unzulänglich aufgeklärt werden können und für die keine bekannten genetischen Krankheiten beim Menschen existieren.

Konventionelle *knockout*-Verfahren führen zum gezielten Ausschalten von Genen oder Genabschnitten. Durch homologe Rekombination zwischen einem linearisierten Konstrukt und einer homologen Genregion können Genabschnitte durch genetisch manipulierte Genloci ausgetauscht und somit inaktiviert werden (Smithies *et al.* 1985; Capecchi 1989a, 1989b). Der genetisch veränderte Sequenzabschnitt (*targeting vector*) wird über Elektroporation in embryonale Stammzellen der Maus eingeschleust, wo er in seltenen Fällen über homologe Rekombination in das Zielgen inseriert wird. Die erforderliche Selektion der Zellen nach homologer Integration erfolgt mittels eines Selektionsmarkers, der beispielsweise eine Resistenz der Zellen gegen ein bestimmtes Antibiotikum (z.B. Neomycin) vermittelt. Positive Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, werden in Blastozysten injiziert. Dort

integrieren sie sich in die embryonale Zellmasse und tragen zur Entwicklung des Embryos bei. Die genetisch veränderten ES-Zellen können eine Keimbahntransmission durchlaufen, und durch die Verkreuzung von Tieren der F₁-Generation kann man in der F₂-Generation eine homozygote Mauslinie mit der gewünschten Mutation erzeugen. Nachteilig bei der konventionellen *knockout*-Strategie wirkt sich aus, dass das Zielgen von der Embryonalentwicklung an in allen Zellen des Organismus inaktiviert ist. Zum einen kann diese ubiquitäre Geninaktivierung bei homozygoten Tieren schon im Embryonalstadium letal sein, so dass man keine Effekte in späteren Entwicklungsstadien oder am adulten Tier untersuchen kann. Zum anderen können die Effekte der Geninaktivierung in den einzelnen Zellsubpopulationen interferieren, so dass sich für gewisse Fragestellungen die Funktion des zu untersuchenden Gens in speziellen Zelltypen nicht genau definieren lässt.

Um eine weitgehend gewebspezifische Geninaktivierung zu erzielen, werden konditionelle *knockout*-Verfahren eingesetzt, die auf der Cre/loxP-Technologie basieren (Gu 1993; Kuhn *et al.* 1995; Nagy 2000). Diese Technik nutzt das Cre/loxP-Rekombinasesystem des Bakteriophagen P1. Das 38 kDa große Rekombinase-Protein Cre bindet spezifisch an eine 34 bp lange Erkennungssequenz (loxP-Stelle). DNA-Abschnitte zwischen zwei flankierenden, gleichgerichteten loxP-Stellen („gefloxt“) können auf diese Weise eliminiert werden, wodurch eine der beiden loxP-Stellen im Genom verbleibt (Abremski und Hoess 1984; Hoess und Abremski 1985). Zur Aktivierung des *knockouts* werden die „gefloxten“ Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die das *Cre*-Gen unter einem gewebspezifischen Promotor exprimieren. Das auszuschaltende Gen mitsamt dem Resistenzmarker wird somit nur in der gewünschten Region, bzw. dem gewünschten Zelltyp entfernt. Durch die Verwendung induzierbarer Cre-Expressionssysteme (z.B. Tet-*on*) kann man außerdem einen relativ genauen Startzeitpunkt der Cre-Expression definieren (Hayashi und McMahon 2002).

Für einen isolierten Komplex I-Mangel existieren bislang nur *knockout*-Modelle für das Gen *Ndufs4* (Kruse *et al.* 2008; Ingraham *et al.* 2009). Ein Defekt dieses Gens, das für eine *accessory*-Untereinheit des Komplexes I kodiert, führt beim Menschen zu einem Leigh-ähnlichen Syndrom (van den Heuvel *et al.* 1998).

2 Zielsetzung

Der Großteil mitochondrialer Dysfunktionen wird durch Defekte in der mitochondrialen Atmungskette verursacht (Filosto *et al.* 2007; Torraco *et al.* 2009). Der häufigste klinische Phänotyp ist hierbei das Leigh Syndrom, eine progressive Neurodegeneration der subkortikalen grauen Substanz, dem häufig ein isolierter Komplex I-Mangel zu Grunde liegt (Rahman *et al.* 1996; Smeitink *et al.* 2001). Aus klinischer Sicht manifestiert sich das Leigh Syndrom innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Finsterer 2008). Es gibt aber auch Studien, die belegen, dass Atmungskettendefekte bereits antenatal auftreten können (von Kleist-Retzow *et al.* 2003). Die Neuropathologie mitochondrialer Krankheiten ist dabei oft sehr regionspezifisch, wie am Beispiel der Hypoplasie des *Corpus callosum* bei einem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex-Mangel (PDHc) oder der beidseitigen Gewebsuntergänge des Hirnstammes, des *Striatums* und des Kleinhirns bei einem Komplex I-Mangel (Lebre *et al.* 2010) deutlich wird. Meine Promotionsarbeit beschäftigt sich daher mit der Fragestellung, ob das Auftreten solch charakteristischer regionaler Muster betroffener Hirnstrukturen durch den gewebsspezifischen zeitlichen Verlauf der Genexpression wichtiger funktioneller Komponenten der Atmungskette während der embryonal-fetalen Entwicklung erklärt werden kann. Über die antenatale Genexpression der Atmungskettenkomponenten in Mensch und Tier ist wenig bekannt. Auf enzymatischer Ebene haben Minai *et al.* (2008) die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-V in verschiedenen Geweben abgetriebener menschlicher Feten untersucht. Sie konnten zeigen, dass bereits in den frühen Stadien der fetalen Entwicklung die Atmungskettenkomplexe enzymatisch aktiv sind, obwohl die absoluten Aktivitäten niedriger als nach der Geburt sind (Minai *et al.* 2008). Verschiedene tierexperimentelle Studien belegen eine erhöhte Regulierung mitochondrialer Biogenese und Genexpression im postnatalen Stadium (Izquierdo *et al.* 1990; Kim *et al.* 1995). Im Gegensatz zu diesen hauptsächlich biochemischen Untersuchungen und globalen Genexpressionsstudien wurden dem Entwicklungsverlauf und der Regionenspezifität der Komplex I-Genexpression bisher kaum Beachtung geschenkt. Daher wollte ich mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (ISH) die entwicklungspezifische Expression der Strukturgene des mitochondrialen Komplexes I untersuchen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Genexpressionsmuster der Komplex I-Untereinheiten in der Maus und der Neuropathologie zu finden, die im Gehirn der Patienten mit einem Komplex I-Mangel zu beobachten ist. Der mitochondriale Komplex I-Mangel beim Menschen verläuft zu einem hohen Prozentsatz letal. Bisher existieren keine evaluierten The-

rapien, deren Wirksamkeit in einer doppel-blind-kontrollierten Studie nachgewiesen wäre. Um den Effekt einer nukleären Komplex I-Mutation auf den klinischen Phänotyp zu untersuchen und um verschiedene kausale und palliative Therapieschemata am lebenden Organismus zu testen, wäre ein konditionelles Mausmodell für einen ZNS-spezifischen isolierten Komplex I-Mangel hilfreich. Ich habe mich entschlossen, für dieses Projekt das *Ndufv1*-Gen zu inaktivieren, da dieses als *hotspot* für Mutationen gilt, die bei Patienten zu einem isolierten Komplex I-Mangel führen. In meiner Arbeit wollte ich daher eine Maus generieren, bei der das Exon 5 des *Ndufv1*-Gens von zwei loxP-Stellen flankiert ist („geflochte“ Maus). Das Exon 5 kann dann nachfolgend durch Verpaarung mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase gewebspezifisch, z.B. im ZNS exprimieren, entfernt werden.

3 Material

3.1 Geräte

3.1.1 Geräte für molekularbiologische und biochemische Arbeiten

Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammern	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporator	BioRad, München, Deutschland
Filmentwicklermaschine X-OMAT	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Geigerzähler	EG&G Berthold, Bundoora, Australien
Hybridisierungsöfen <i>Personal Hyb</i>	Stratagene, Amsterdam-Zuidoost, Niederlande
Kapillarsequenzierungsgerät ABI PRISM 3100, bzw. 3730	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Küvetten	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikrowellengerät	Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
	Finnpipette, Dreieich, Deutschland
Rotationsschüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Schüttelinkubator	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Spannungsgeräte	BioRad, München, Deutschland
Spektrometer <i>NanoDrop</i>	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Spektrophotometer <i>Helios α</i>	Thermo Spectronic, Wuppertal, Deutschland
Sterilbank <i>HeraSafe</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler <i>Mastercycler Gradient</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waage BP 3100 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5804R, 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

3.1.2 Geräte für histologische Arbeiten

Chirurgische Scheren	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Gekühlte CCD-schwarz-weiß Digitalkamera SPOT RT3	Visitron Systems, Puchheim, Germany
Kryostat	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Aufrechtes Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop Leica DMLB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Pinzetten	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland

3.1.3 Geräte für zellbiologische Arbeiten

CO ₂ -Inkubator <i>Hera cell</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Einfriergerät Nalgene® <i>Mr. Frosty</i>	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Elektroporator	BioRad, München, Deutschland
Invertmikroskop TELAVAL 31	Zeiss, Jena, Deutschland
Küvetten	BioRad, München, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

3.2 Chemikalien

2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
ADP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Albumin aus Rinderserum	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampizillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antimyzin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Arabinose	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ascorbat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Azeton	Merck, Darmstadt, Deutschland
BM <i>Purple</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
di-Natriumphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fikoll 400	Applichem, Darmstadt, Deutschland
FKS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Formamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Genetizin (G418)	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin-3-Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glyzin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heringsspermien-DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hydro-Matrix Eindeckelmedium	Micro Tech Lab, Graz, Österreich
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumcyanid	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
Kanamyzin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LIF	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Malat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MEM	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
β -Merkaptoethanol	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Mitomyzin C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazetat-Trihydrat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumzitat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NES	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland

PBS Dulbecco	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Penizillin/Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PVP	Applichem, Darmstadt, Deutschland
RNaseZap	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sarkosyl (N-Lauroylsarkosin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sephadex G-50	GE Healthcare, München, Deutschland
Succinat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sukrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TMPD	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triethanolamin	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
<i>Tri Reagent</i> TM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

3.3 Enzyme und Kitsysteme

<i>BigDye</i> [®] <i>Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
<i>DIG RNA Labeling Kit</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
<i>DNeasy Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNaseI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>GenScript TissueDirect</i> TM <i>Multiplex PCR System</i>	GenScript Corporation, Piscataway, NJ, USA
<i>GoTaq</i> TM DNA-Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>HiSpeed Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>LigaFast</i> TM <i>Rapid DNA Ligation System</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>Phusion</i> TM DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Proteinase K	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<i>QIAprep</i> [®] <i>Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>QIAquick</i> [®] <i>Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>QIAquick</i> [®] <i>PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Rediprime</i> TM <i>II Labeling System</i>	GE Healthcare, München, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
<i>Riboprobe</i> [®] <i>in vitro Transcription System</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
SP6 RNA-Polymerase	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim, Deutschland
T7 RNA-Polymerase	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
<i>TaqMan</i> [®] <i>Kit</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
<i>ThermoScript</i> TM <i>RT-PCR System</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

3.4 Antikörper

anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragment	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
-----------------------------------	-------------------------------------

3.5 Molekulargewichtsstandards

1 kb-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 bp-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
λ HindIII-DNA-Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
SmartLadder [®] -DNA-Leiter	Eurogentec, Köln, Deutschland

3.6 Nukleotide

dNTPs (je 100 mM)	Promega, Mannheim, Deutschland
[α ³² P]dCTP (3.000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland

3.7 Verbrauchsmaterialien

Plastik-Einwegmaterialien für die Zellkultur wurden über die Firma BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische Arbeiten wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Handschuhe, etc. wurden über die Firma VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Deckgläschen	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Hybond-XL TM Transfermembran	GE Healthcare, München, Deutschland
Objektträger Superfrost [®]	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Sephadex-Säulen ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare, München, Deutschland
Röntgenfilm Super RX	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Whatman Filterpapier	Whatman GmbH, Göttingen, Deutschland

3.8 Plasmide

<i>pCR-Script-AMP SK (+)</i>	Stratagene, Amsterdam-Zuidoost, Niederlande
<i>pGEM[®]-T Easy</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
PL451	National Cancer Institute, Rockville, MD, USA
PL452	National Cancer Institute, Rockville, MD, USA

3.9 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 recA gyrA thi hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) relA1 supE44</i> <i>Δ(lac-proAB, [F⁺, traD36, pro AB laqI^qZΔM15])</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>E. coli</i> SW105	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ΔlacX74 deoR endA1</i> <i>araD139 Δ(ara, leu) 7697 rpsL recA1 nupGφ</i> <i>80dlacZΔM15 galU galK [λc1857 (cro-bioA) <> Tet]</i> <i>galK⁺ gal490 (cro-bioA) <> araC-P_{BAD} Flpe gal⁺ ΔgalK</i>	National Cancer Institute, Rockville, MD, USA
<i>E. coli</i> SW106	<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ΔlacX74 deoR endA1</i> <i>araD139 Δ(ara, leu) 7697 rpsL recA1 nupGφ</i> <i>80dlacZΔM15 galU galK [λc1857 (cro-bioA) <> Tet]</i> <i>galK⁺ gal490 (cro-bioA) <> araC-P_{BAD} Cre gal⁺ ΔgalK</i>	National Cancer Institute, Rockville, MD, USA

3.10 Zelllinien

E14.1	ES-Zelllinie aus Blastozysten des 129/p2OlaHsd-Mausstammes
ICSBP ^{-/-} -MEF (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)	Neomycin-resistente Mausfibroblasten-Zellen

3.11 Mausstämme

C57BL/6J	Inzuchtstamm, schwarz	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
129/p2OlaHsd	Inzuchtstamm, agouti	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
BDF 1	Hybridzuchtstamm, schwarz	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
NMRI	Auszuchtstamm, albino	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
FLPe-deleter	Inzuchtstamm mit 129/p2OlaHsd-Hintergrund	AG Birchmeier, MDC-Berlin, Deutschland

3.12 Primer

Alle verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) oder TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Eine Übersicht aller verwendeten Primer findet sich im Anhang (Tabelle A.1-A.5).

3.13 Oligonukleotidsonden

Eine Übersicht aller generierten Oligonukleotidsonden findet sich im Anhang (Tabelle A.6).

3.14 Software

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
ABI PRISM <i>Sequencing Analysis</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland	Sequenzierungsauswertung
<i>Gene Cluster</i> v3.0	Michiel de Hoon	Clusteranalyse
<i>ImageJ</i> v1.14	Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institute of Health	Quantifizierung von Bilddateien
<i>Lasergene6</i>	DNA Star, Madison, USA	Sequenzierungsauswertung
SDS v1.9.1	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland	quantitative PCR
MS Office	Microsoft, Redmond, USA	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Präsentation, Datenbankverwaltung
SPOT RT3	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland	Kamerasoftware
<i>StatView</i> v5.0	SAS Institute Inc., Cary, USA	Statistik
<i>TreeView</i> v1.1.3	Alok Saldanha	Dendrogramme
<i>Vector NTI</i>	Invitrogen Karlsruhe, Deutschland	Klonierungen

4 Methoden

4.1 Methoden zur Untersuchung der Expression nukleärer Komplex I-Gene in unterschiedlichen Hirnregionen der Maus

Die Untersuchung der entwicklungspezifischen mRNA-Expression der 33 Strukturgene des mitochondrialen Komplexes I der Atmungskette der Maus umfasste folgende Arbeitsschritte: (1) Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden für die einzelnen Komplex I-Untereinheiten; (2) *in situ* Hybridisierung (ISH) der Sonden auf Schnittpräparaten von murinen Gehirnen unterschiedlichen Alters; (3) mikroskopische Aufnahme der Hybridisierungintensitäten mit einer schwarz-weiß Kamera; (4) statistische Auswertung der Expressionsergebnisse.

4.1.1 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Die Arbeitsschritte für die Generierung der zur ISH eingesetzten RNA-Sonden umfassten: (1) RNA-Extraktion aus der Mausleber; (2) Aufarbeitung, sowie die Herstellung der DNA-Matrizen mit spezifischen Primern für die einzelnen Komplex I-Untereinheiten; (3) Klonierung in einen entsprechenden Vektor als Ausgang für die *in vitro* Transkription, die als Markierung der Sonden mit Digoxigenin dient; (4) Aufreinigung der generierten RNA-Sonden.

Als Ausgangsmaterial diente Gesamt-RNA aus dem Lebergewebe des Mausstammes C57BL/6J, die in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA wurde zur PCR-Amplifikation der etwa 300 nt langen *templates* für die ISH-Sonden mit spezifischen cDNA-Primern der jeweiligen Komplex I-Gene eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor *pGEM[®]-T Easy* (Promega, Mannheim, Deutschland) unter Kontrolle des starken Bakteriophagen-Promotors T7, bzw. SP6 eingebracht. Es folgte die Identifizierung der Klone, welche die inserierte DNA in *antisense*-Orientierung aufgenommen hatten. Das 5' Ende wurde dabei durch den Promotor definiert und am 3' Ende befand sich eine singuläre Restriktionsstelle, welche für die Linearisierung des Plasmids zur *in vitro* Transkription benutzt wurde. Die entsprechenden Klone wurden kontrollsequenziert, linearisiert, zur Entfernung möglicher kontaminierender RNasen mit Phenol-Chloroform extrahiert, gefällt und *in vitro* transkribiert. Die entstandenen RNA-Sonden wurden aufgereinigt und anschließend für die *in situ* Hybridisierung auf murinen Gehirnschnitten eingesetzt.

4.1.1.1 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Protokoll des *Tri Reagents*TM der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). 50-100 mg zerkleinertes Gewebe wurden unter Zugabe von 1 ml *Tri Reagent*TM homogenisiert. Um eine vollständige Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu gewährleisten, wurde das Homogenat 5 min bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,2 ml Chloroform versetzt und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 15 min bei 14.000 x g zentrifugiert, wobei sich drei Phasen ausbildeten: eine organische Protein-haltige Phase, eine DNA-haltige Interphase und eine RNA-haltige wässrige Phase. Letztere wurde abgenommen, mit einem Volumen Isopropanol versetzt und für 2 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation wurde die sedimentierte RNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 100-200 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Der Einsatz von DEPC-H₂O beim Arbeiten mit RNA dient der Eliminierung von RNasen. Zur Herstellung wurde 0,1%ige DEPC-Lösung zu ddH₂O gegeben und über Nacht schüttelnd inkubiert. Das giftige DEPC wurde durch anschließendes 20-minütiges Autoklavieren zerstört, was dessen Hydrolyse bewirkte.

4.1.1.2 Reverse PCR (RT-PCR)

Die aufgereinigte RNA wurde durch das Enzym reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und diese anschließend über PCR mit für die einzelnen Komplex I-Untereinheiten sequenzspezifischen Primern amplifiziert. Die RT-PCR wurde mittels *ThermoScript*TM *RT-PCR System* der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Im ersten Schritt erfolgte die Denaturierung der RNA und Anlagerung von *random* Hexamer- und Oligo (dT)-Primern für 5 min bei 65°C in folgendem 10 µl-Reaktionsansatz: Primer: je 100 ng; RNA: 10 pg-5 µg; DEPC-H₂O: ad 10 µl.

Im zweiten Schritt erfolgte die cDNA-Synthese. Den Proben wurde folgender Synthese-Mix zugesetzt und erst für 60 min bei 55°C, anschließend für 5 min bei 85°C inkubiert: 5x cDNA-Synthesepuffer: 4 µl; 0,1 M DTT: 1 µl; *RNaseOUT*TM (40U/µl): 1 µl; 10 mM dNTP-Mix: 2 µl; *ThermoScript*TM RT (15 U/µl): 1 µl; DEPC-H₂O: 1 µl.

Im dritten Schritt wurde zur Entfernung der RNA-Matrize 1 µl RNase H zugegeben und der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert.

Die cDNA wurde als Matrize für die nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt.

4.1.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die DNA in Einzelstränge getrennt. Es folgt das *annealing*, wobei sich die Primer sequenzspezifisch an die freigelegten DNA-Stränge anlagern. Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert von der Matrize ausgehend nun komplementäre Doppelstränge (Elongation). Als Polymerase wurde die *Phusion*TM DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) mit Korrekturlesefunktion (*proof-reading* Polymerase) verwendet oder die *GoTaq*TM DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) ohne Korrekturlesefunktion. Ein Standard-Reaktionsansatz in einem 25 µl-Reaktionsvolumen zur Amplifikation der Maus-cDNA beinhaltete folgende Komponenten: 5x Puffer: 25 µl; MgCl₂: 1-4 mM; dNTPs: 0,2 mM; *forward* und *reverse* Primer: 0,1-1 µM; Polymerase: 1,25 U; *template*-DNA: 0,5-100 ng; *ad* 25 µl mit ddH₂O.

Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 95°C, 5 min; 25-35 x (95°C, 30-60 sec; 42-65°C, 30-60 sec; 72°C, 1 min/kb); 72°C, 10 min.

4.1.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren

Die Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte in einem horizontalen Agarosegel. Dazu wurde je nach Größe der zu trennenden Fragmente 0,8-1,5% Agarose in 0,5x TBE-Puffer (1x TBE-Puffer: 10,78 g Tris-Base; 5,5 g Borsäure; 0,75 g EDTA; *ad* 1 l mit H₂O; pH 8,0) durch Aufkochen vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde der Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugesetzt und die Lösung in einen Gelschlitten gegossen. Die Nukleinsäure-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau; 15% Fikoll 400) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Parallel wurde ein Größenstandard mitgeführt. Die Proben wurden bei 80-120 V in 0,5x TBE-Puffer aufgetrennt. Die aufgetrennten Nukleinsäure-Fragmente wurden durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids nach Anregung mit UV-Strahlung detektiert und zur Dokumentation fotografiert.

4.1.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurden diese bei einer Wellenlänge von 366 nm visualisiert und das Gelstück mit dem entsprechenden Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem

QIAquick[®] Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

4.1.1.6 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Vor dem Einsatz der Nukleinsäuren für Klonierungsreaktionen oder für die *in vitro* Transkription wurde ihre Konzentration bestimmt. Dies erfolgte spektrometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Probe 1:50-1:100 mit ddH₂O verdünnt und die Absorption in einer Quarzküvette in einem UV/VIS Spektrometer bei 260 nm vermessen. Die Konzentration wurde folgendermaßen berechnet: $c = OD_{260} \times V \times F$ (c : Konzentration der Probe (µg/ml); OD_{260} : optische Dichte bei 260 nm; V : Verdünnungsfaktor; F : Multiplikationsfaktor, 50 für dsDNA, 40 für RNA).

4.1.1.7 Klonierung der DNA-Fragmente

Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden zur Generierung der ISH-Matrizen in den Vektor *pGEM[®]-T Easy* (Promega, Mannheim, Deutschland) über die sogenannte TA-Klonierung eingebracht. Hierunter versteht man die Klonierung von PCR-Fragmenten mit einem Adenosin-Überhang in einen Vektor mit einem Thymin-Überhang. Die *blunt end* PCR-Fragmente, die durch die *proof-reading* Polymerase *Phusion[™]* DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) generiert wurden, wurden mittels *GoTaq[™]* DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) und dATP durch zwölfminütige Inkubation bei 72°C mit einem Adenosin-Überhang versehen und dann direkt mit dem Vektor *pGEM[®]-T Easy*, der einen Thymin-Überhang trägt, ligiert. Dazu wurden in einem 10 µl-Reaktionsvolumen Vektor-DNA und das zu klonierende DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 mittels *LigaFast[™] Rapid DNA Ligation System* (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers ligiert. Die Ligation erfolgte dabei für 1 h bei Raumtemperatur oder speziell bei größeren Fragmenten über Nacht bei 4°C. Für die anschließende Transformation wurden 50 µl kompetente Bakterienzellen *E. coli* JM109 auf Eis aufgetaut und mit 5 µl des Ligationsansatzes vermischt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, für 45 sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900 µl SOC-Medium (0,5% Hefeextrakt; 2% Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂;

10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose) zugegeben und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 50-200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.1.1.8 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung, ob der Vektor das inserierte DNA-Fragment in *antisense*-Orientierung aufgenommen hat, wurde eine Kolonie-PCR mit den entsprechenden richtungssensitiven Primern durchgeführt. Diese Art der PCR dient der direkten Amplifikation der DNA aus einer gewachsenen Bakterienkultur. Dabei wurden mit einem Zahnstocher Bakterienzellen aus der Kolonie entnommen, in 16,4 µl ddH₂O resuspendiert und zu den Komponenten eines Standard-Reaktionsansatzes pipettiert. Um eine vollständige Denaturierung der DNA in den Bakterienzellen zu erlangen, wurde der initiale Denaturierungsschritt der PCR-Reaktion auf 10 min verlängert. Positive Klone wurden in einer Übernachtskultur angezogen.

4.1.1.9 Isolierung der Plasmid-DNA

Analytischer Maßstab („Minipräparation“)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die zu Grunde liegende Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (modifiziert nach Birnboim und Doly 1979), Neutralisierung des Lysats und anschließender Aufreinigung über Silika-Gel-Säulchen. Die Isolierung erfolgte dabei aus einer 5 ml Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers.

Präparativer Maßstab („Midipräparation“)

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen wurde das *HiSpeed Plasmid Midi Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte durch alkalische Lyse und Bindung der Plasmid-DNA an Anionen-Austauscher-Säulen unter Niedrigsalz-Bedingungen. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution der gebundenen Plasmid-DNA in einem Hochsalz-Puffer. Nachfolgend wurde die DNA durch Isopropanol-Präzipitation konzentriert und entsalzt. Die Isolierung erfolgte aus einer 100-150 ml Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers.

4.1.1.10 DNA-Sequenzierung

Die korrekte Sequenz der Klone wurde durch die nach Sanger und Mitarbeitern (Sanger *et al.* 1977) modifizierte Sequenzierung verifiziert. Die Methode beruht auf der Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide im Reaktionsansatz, die zu einem basenspezifischen Kettenabbruch bei der DNA-Synthese führen. Die daraus resultierenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente können getrennt und dem entsprechenden Didesoxynukleotid zugeordnet werden. So lässt sich die Abfolge der Nukleotide eines DNA-Abschnittes ermitteln. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Reaktionsansätze enthielten 1 µl *BigDye[®]* Mix, 200-400 ng DNA, 25 ng Primer und 2 µl 5x Sequenzierungspuffer in einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Das PCR-Programm für die Sequenzierung sah folgendermaßen aus: 32 x, 1°C/sec (96°C, 10 sec; 50°C, 5 sec; 60°C, 4 min). Die aufgereinigten Produkte wurden an den Kapillarsequenzierungsgeräten ABI 3100 oder ABI 3730 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) analysiert.

4.1.1.11 Restriktionsverdau der DNA

Die kontrollsequenzierte DNA der positiven Klone wurde für die *in vitro* Transkription linearisiert, indem die 3' vom *insert* liegende Restriktionsstelle benutzt wurde. Die Spaltung (Restriktion) der DNA erfolgt dabei durch Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen spezifische DNA-Sequenzmotive und spalten sie hydrolytisch. Als Restriktionsenzyme wurden *SpeI*, *SalI* und *NcoI* eingesetzt, wobei zuvor sicher gestellt wurde, dass die gewählten Enzyme nicht im zu transkribierenden *insert*, sondern nur im Vektor schnitten. Die Restriktionsbedingungen für die jeweiligen Restriktionsenzyme entsprachen den Angaben des Herstellers New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland). Ein analytischer Restriktionsverdau wurde in einem Volumen bis 20 µl durchgeführt. Pro µg eingesetzter DNA wurden 2-10 U Enzym zugesetzt, sowie der entsprechende Restriktionspuffer in 1x Endkonzentration und je nach Enzym BSA in 1x Endkonzentration. Der Ansatz wurde für 1-2 h bei 37°C inkubiert und die entstandenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der präparative Verdau erfolgte in einem Volumen von bis zu 200 µl mit DNA-Mengen bis 25 µg. Die vollständige Restriktion erfolgte über Nacht bei 37°C.

4.1.1.12 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen, insbesondere von RNasen, wurden die geschnittenen DNA-Fragmente mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Die Nukleinsäurelösung wurde dazu nacheinander mit jeweils einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform ausgeschüttelt. In den dazwischen liegenden Zentrifugationsschritten wurde die obere wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthielt, in ein neues Gefäß überführt und somit von Verunreinigungen, die sich in der organischen Phase und der Interphase ansammelten, getrennt. Verbleibende Phenolreste wurden mit einer Alkoholfällung entfernt.

4.1.1.13 Fällung der Nukleinsäuren

Zur Fällung der Nukleinsäuren verwendet man ein monovalentes Salz und Alkohol. Als Salz wurde 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat-Lösung oder 4 M Lithiumchlorid-Lösung zu der Nukleinsäurelösung gegeben und mit 2,5 Volumen Ethanol oder einem Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung erfolgte für 1 h bei -20 °C. Die durch die Zentrifugation sedimentierten Nukleinsäuren wurden durch Waschen mit 70%igem Ethanol von Salz- und Alkoholresten gereinigt. Die so aufgereinigte DNA konnte für die *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

4.1.1.14 Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde zur relativen Quantifizierung der mtDNA-Kopienzahl eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Amthor *et al.* (2007). Die mtDNA wurde aus schockgefrorenem Gewebe mittels Phenol-Chloroform-Extraktion nach Proteinase K-Verdau isoliert und mit 1x TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,5) auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Die relative Quantifizierung der mtDNA-Kopienzahl erfolgte über eine vergleichende Quantifizierung des mtDNA-kodierten Gens *Mtco1* (GenBank accession number NC_001807) mit dem kernkodierten Gen *Ndufv1* (GenBank accession number NM_133666) mit Hilfe des *TaqMan*[®] Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Die Amplifikationskurven wurden mit der Software SDS v1.9.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) analysiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Verhältnis der absoluten Konzentrationen der [mtDNA]/[nukleären]-Gene, welche aus den Standardkurven der Messung mit bekannten DNA-Konzentrationen abgeleitet wurden.

4.1.1.15 *In vitro* Transkription der DNA in RNA

Die *in vitro* Transkription der DNA in RNA erfolgte mit dem *DIG RNA Labeling Kit* der Firma Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Methode basiert auf dem Einbau Digoxigenin (DIG)-markierter Nukleotide während der Neusynthese eines RNA-Stranges, wobei linearisierte, gereinigte DNA als Matrize dient. Die DIG-Markierung kann nach Bindung eines markierten Antikörpers und anschließender Farbreaktion nachgewiesen werden. Der Reaktionsansatz beinhaltet folgende Komponenten: 1 µg linearisierte, gereinigte Matrizen-DNA; 2 µl 10x NTP *labeling*-Mix (10 mM ATP, CTP, GTP; 6,5 mM UTP; 3,5 mM DIG-11-UTP); 2 µl 10x Transkriptionspuffer; 1 µl RNase-Inhibitor (10 U); 2 µl T7 RNA-Polymerase (40 U); *ad* 20 µl mit DEPC-H₂O.

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Zum Abbau der DNA-Matrize wurden 2 µl DNase (20 U) hinzugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt und durch Zugabe von 100 µl DEPC-H₂O, 10 µl 4 M LiCl und 300 µl 100%igem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurden die Sonden in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bei -80°C gelagert.

4.1.2 *In situ* Hybridisierung auf Schnittpräparaten

Die *in situ* Hybridisierung dient dem direkten Nachweis der RNA in Gewebeschnitten. Hierbei wird die mit Digoxigenin markierte *antisense*-RNA als Sonde eingesetzt. Diese bindet an die entsprechende homologe kodierende *sense*-mRNA im Gewebeschnitt. Die an die RNA gekoppelten Digoxigeninmoleküle können mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht werden. Als Enzym wurde die alkalische Phosphatase (AP) benutzt. Diese setzt ein zugegebenes farblores Substrat in einen blau-violetten Farbstoff um, der kovalent im Gewebe gebunden bleibt und dort die entsprechende mRNA sichtbar macht.

4.1.2.1 Gewebepräparation

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Kryostatschnitte von Mausgehirnen und Mausembryonen des Stammes C57BL/6J (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verschiedener Altersstufen eingesetzt. Für eine zeitlich festgelegte Verpaarung wurden acht Wochen alte C57BL/6J-Mäuse verkreuzt und der Morgen des vaginalen *plugs* als E0.5 gezählt. Tragende Weibchen wurden zum Zeitpunkt E11.5, bzw. E17.5 durch atlantoaxiale Dislokation getötet und die

Embryonen entfernt. Postnatale Tiere wurden durch atlantoaxiale Dislokation zu den Zeitpunkten P1, P11, P28 und adult (zwölf Wochen) getötet. Die Gehirne wurden sofort entfernt, in 1x PBS (10x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 18,05 g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 2,4 g KH₂PO₄; ad 1 l mit H₂O; pH 7,2) gewaschen und danach direkt bei -80°C eingefroren. Von den Geweben wurden axiale Kryoschnitte einer Dicke von 20 µm angefertigt und auf *Superfrost*[®] Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgefroren. Diese wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Objektträger wurden für die ISH-Färbungen, sowie die DAPI-Gegenfärbungen der Zellkerne eingesetzt. Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Kommission und des LaGeSo (Tierversuchsgenehmigung G0040/05) gehalten und getötet.

4.1.2.2 *In situ* Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte aufgetaut und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine zehnmünütige Fixierung in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung und dreimaliges Waschen in 1x PBS. Als nächstes schloss sich ein Azetylierungsschritt an, um eine unspezifische Bindung der Probe zu verhindern. Hierzu wurden die Schnitte 10 min in Azetylierungspuffer (4 ml Triethanolamin; 0,5 ml 37% HCl; 0,75 ml Essigsäureanhydrid; ad 300 ml mit DEPC-H₂O) geschwenkt und anschließend dreimal in 1x PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit 700 µl Hybridisierungspuffer (5 ml 100% Formamid; 25 ml 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Zitrat; pH 7,0); 10 ml 50x Denhardts Lösung (1% BSA; 1% Polyvinylpyrrolidon; 1% Fikoll 400); 1,5 ml tRNA (10 mg/ml); 0,5 ml Heringssperma-DNA (10 mg/ml); ad 100 ml mit DEPC-H₂O) für 3-4 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer prähybridisiert. Währenddessen wurden die DIG-markierten RNA-Sonden für die Hybridisierung vorbereitet, indem sie in Hybridisierungspuffer (1 µg Sonde/100 µl Hybridisierungspuffer) verdünnt und für 5 min bei 80°C denaturiert wurden. Nach Abkühlen auf Eis wurden 150 µl Sondengemisch auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 60°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Alle oben aufgeführten Schritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurden die Schnitte wie folgt gewaschen: 5x SSC: 5 min bei Raumtemperatur; 0,2x SSC: 4 x 5 min bei 60°C, 1 x 5 min bei Raumtemperatur; Puffer B1 (0,1 M Tris, pH 7,5; 0,15 M NaCl): 5 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden anschließend 3-4 h bei Raumtemperatur mit 1 ml Blockierlösung (5% NGS in Puffer B1) inkubiert. Dann wurden 150 µl anti-DIG-Antikörper (1:2.500 in Puffer B1) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht

bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden am folgenden Tag dreimal 5 min in Puffer B1 und für weitere 5 min in NTMT (0,1 M Tris, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂; 0,1% Tween) gewaschen. Die Enzym-katalysierte Färbereaktion erfolgte durch Inkubation mit 200 µl BM *Purple* Reagenz (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) für 24-48 Stunden. Die Schnitte wurden nach Detektion des Signals zweimal kurz in H₂O gewaschen und mit DAPI gegengefärbt. Dazu wurden sie 5 min bei Raumtemperatur in DAPI-Lösung (DAPI-Stocklösung: 1 mg/ml in H₂O, verdünnt 1:2.000 in 1x PBS) inkubiert und anschließend dreimal in 1x PBS gespült. Die gefärbten Schnitte wurden in Hydro-Matrix Eindeckelmedium (Micro Tech Lab, Graz, Österreich) eingedeckelt und mikroskopisch ausgewertet. Die Computer-gestützte Analyse erfolgte mit dem Programm *ImageJ* v1.14 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.1.3 Statistische Methoden

Zur Auswertung und Analyse der Komplex I-Expressionsdaten kamen folgende unten aufgeführte statistische Methoden zum Einsatz:

4.1.3.1 Z-Transformation

Anhand statistischer Kennwerte kann man die allgemeinen Eigenschaften von Variablen miteinander vergleichen. Z-Transformation bezeichnet in der mathematischen Statistik die Transformation einer Zufallsvariablen. Sie dient der Standardisierung von Messwerten, so dass die resultierende Variable den mittleren Erwartungswert von null und die Varianz von eins besitzt. Diese Standardisierung ist notwendig, um unterschiedlich verteilte Zufallsvariablen miteinander vergleichen zu können. Die Verwendung von Standardabweichungen zur Standardisierung von Messwerten wird herangezogen, um einen Messwert relativ zu seiner Verteilung als hoch oder niedrig einzustufen, je nachdem wie viele Standardabweichungen er über oder unter dem Durchschnitt liegt. Dabei gilt: $Z_i = X_i - MW / SD$ (Z_i : standardisierter Messwert; X_i : Messwert; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung).

Ein Z_i -Wert ist demnach ein standardisierter Messwert und gibt an, wie viele Standardabweichungen und in welche Richtung ein Messwert X_i in einer Stichprobe vom Mittelwert abweicht. Im Falle der Expressionsstudien der Komplex I-Untereinheiten in verschiedenen Hirnregionen zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen wurden die Messwerte für die Expressionsstärke Z-transformiert, um vergleichende Aussagen über relative Intensitätsunterschiede

in verschiedenen Hirnregionen innerhalb eines Schnittes zu ermöglichen. Diese Methode ergibt Maßzahlen, die unabhängig von der absoluten Färbeintensität des Schnittes sind, welche von zahlreichen, zum Teil unbeeinflussbaren oder schwer konstant zu haltenden Faktoren abhängt.

4.1.3.2 Hierarchische Clusteranalyse

Die Clusteranalyse dient der Analyse von Daten ohne Klassenzugehörigkeit. Objekte, deren Eigenschaften bestimmte Ähnlichkeiten aufweisen, werden dahingehend zu Gruppen (Clustern) zusammengefasst, dass die Objekte innerhalb eines Clusters möglichst ähnlich und zwischen den Clustern möglichst unähnlich sind. Das hierarchische Clusterverfahren nutzt die schrittweise Aggregation von Objekten zu Clustern und diese dann zu größeren Gruppen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Dendrogrammen. Die zu untersuchenden Objekte werden als Zufallsvariablen aufgefasst und in Form von Vektoren in einem n-dimensionalen Raum dargestellt. Die Gruppierung erfolgt über Ähnlichkeitsmerkmale, welche in der Regel Abstandsdaten sind. Die Ähnlichkeit ist hoch, wenn die Objekte in dem n-dimensionalen Vektorraum einen möglichst geringen Abstand voneinander haben. Als Maß für den Abstand wurden Euklidische Distanzvektoren benutzt. Mit Hilfe der Clusteranalyse wurden die Expressionsdaten der Komplex I-Expressionsstudie zu Gruppen geordnet, um allgemeine Tendenzen zu finden und hervorzuheben. Für die Clusteranalyse wurde die Software *Gene Cluster* v3.0 (Michiel de Hoon, <http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster>) verwendet. Die Darstellung der Dendrogramme erfolgte mit dem Programm *TreeView* v1.1.3 (Alok Saldanha, <http://jtreeview.sourceforge.net>).

4.1.3.3 Mann-Whitney U-Test

Der Mann-Whitney U-Test ist ein parameterfreier Signifikanztest zum Vergleich der Mediane zweier Stichproben auf ordinalem Skalenniveau. Voraussetzung zur Anwendung ist zwar keine Gaußverteilung, aber eine stetige Verteilung. Zur Berechnung werden die Einzelwerte der Stichproben in eine Reihenfolge gebracht und jedem Einzelwert entsprechend seiner Position in der Reihenfolge ein Rang zugeordnet. Die Ränge werden für die einzelnen Stichproben gesondert summiert (Rangsumme) und der Prüfwert U berechnet. Ist der Prüfwert U kleiner als der kritische Wert für die Verteilung der Teststatistik U_{\min} wird die Nullhypothese zugunsten der Arbeitshypothese abgelehnt. Dabei gilt für die Signifikanzwerte $p: 0,01 < p < 0,05$: „sig-

nifikant“; $0,001 < p < 0,01$: „hoch signifikant“; $p < 0,001$: „sehr hoch signifikant“. Liegen zwei Stichproben x_i , $i = 1, 2, \dots, m$ und y_j , $j = 1, 2, \dots, n$ vor, gilt: $U_x = m \times n + 1/2 (m (m + 1)) - R_x$ und $U_y = m \times n + 1/2 (m (m + 1)) - R_y$ (U : Prüfgröße; m , n : Einzelmesswerte; R : Rangsumme). Der Mann-Whitney U-Test wurde angewandt, um die Signifikanz der Unterschiede der relativen Komplex I-Expressionsintensitäten während des Entwicklungsverlaufs in den einzelnen Hirnregionen zu bestimmen. Ein parameterfreier Test war nötig, da nicht zwangsläufig von einer Normalverteilung der ermittelten Expressionsdaten ausgegangen werden konnte. Der Mann-Whitney U-Test für die Z-transformierten Expressionsintensitäten wurde mit dem Programm *StatView* v5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) durchgeführt.

4.2 Methoden zur Herstellung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus für einen gewebsspezifischen konditionellen *knockout*

Um die entwicklungspezifischen Aspekte eines ZNS-spezifischen isolierten Komplex I-Mangels *in vivo* untersuchen zu können, habe ich eine Maus generiert, bei der das Exon 5 des *Ndufv1*-Gens von zwei loxP-Sequenzen flankiert ist („geflochten“ Allel). Für die Erzeugung des *targeting vectors* wurde ein genomischer Klon des *Ndufv1*-Gens der Maus aus einer λ 51.1 Phagenbibliothek isoliert und ein 10 kbp großes Genfragment in einen *Bluescript* Vektor kloniert. Über die Methode des *recombineering* wurde Exon 5 des *Ndufv1*-Gens mit zwei loxP-Stellen flankiert und eine Neo-Selektionskassette eingeführt ($Ndufv1^{lox5}$), die wiederum von zwei *frt*-Erkennungssequenzen flankiert war. Nach Identifizierung positiver Klone, welche den *targeting vector* trugen, wurde das linearisierte und aufgereinigte *targeting* Konstrukt in SV129/OLA-ES-Zellen elektroporiert und positive Klone über einen Southern Blot mit einer 5' und einer 3' Sonde analysiert. Die Neo-Selektionskassette wurde durch Verpaarung derjenigen Tiere, bei denen das „geflochte“ Allel in die Keimbahn aufgenommen worden war, mit *FLPe-deleter*-Mäusen, welche die FLP-Rekombinase konstitutiv ubiquitär exprimieren, entfernt. *FLPe-deleter*-Stämme zeigen sowohl in Keim- als auch in somatischen Zellen eine hohe Effizienz bei der Exzision des *targeting* Konstrukts (Rodriguez *et al.* 2000). Die *FLPe*-Rekombinase, die sich gegenüber der Wildtyp-FLP-Rekombinase um vier Aminosäuren unterscheidet, zeigt dabei eine vier- bis zehnfach höhere Aktivität als der Wildtyp (Buchholz *et al.* 1998). Um letztlich eine ZNS-spezifische Inaktivierung des *Ndufv1*-Gens zu erzielen, können die $Ndufv1^{lox5}$ -Mäuse mit NEX-Cre-Mäusen gekreuzt werden. Diese exprimieren die Cre-Rekombinase unter Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des *Nex*-Gens, welches für ein neuronales basisches Helix-loop-Helix (bHLH) Protein kodiert, das an der neuronalen

Entwicklung beteiligt ist. Ein hohes Expressionsniveau der NEX-Cre-Rekombinase findet sich vor allem in den glutamatergen Prinzipalneuronen des dorsalen Telenzephalons. Dazu zählen pyramidale Neuronen, Moosfaserzellen des *Hilus* und Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Goebbels *et al.* 2006). Für einen muskelspezifischen *knockout* können die *Ndufv1*^{flox5}-Mäuse mit Myf5-Cre-Mäusen verpaart werden, die Cre unter dem skelettmuskelspezifischen Promotor des *Myf5*-Gens (*myogenic factor 5*) exprimieren (Braun *et al.* 1992).

4.2.1 Herstellung des *targeting vectors*

4.2.1.1 *Recombineering*

Die Erzeugung des *targeting vectors* erfolgte über *recombineering* (Copeland *et al.* 2001; Muyrers *et al.* 2001; Liu *et al.* 2003). Dazu wurden eine Neomycin-Selektionskassette (Neo-Kassette) und loxP-Stellen an geeigneter Stelle in einen Vektor, der die genomische Sequenz des *Ndufv1*-Gens trug, eingebracht. *Recombineering* (*recombination-mediated genetic engineering*) ist eine innovative Methode zur gezielten *in vivo* Manipulation der DNA in *E. coli*. Sie dient unter anderem der Konstruktion von DNA-Vektoren für Manipulationen im Mausgenom und in Zellkultur-Experimenten. Die Problematik der Erzeugung des *targeting vectors* nach herkömmlichen Klonierungsmethoden, bei denen Selektionskassette und loxP-Stellen über sequenzspezifische Restriktion und nachfolgende Ligation eingefügt werden, besteht in der Limitierung passender Restriktionsschnittstellen, so dass besonders bei langen Konstrukten loxP-Stellen oft nicht an beliebiger Stelle eingefügt werden können. Das *recombineering* nutzt die homologe Rekombination in *E. coli* zur Einführung linearer DNA in ein Zielplasmid, sofern eine ausreichende Homologie zum 5' und 3' Ende der Ziel-DNA vorliegt (Copeland *et al.* 2001; Muyrers *et al.* 2001; Liu *et al.* 2003). Selektionskassetten und loxP-Stellen können auf diese Weise sehr effizient in den *targeting vector* eingebracht werden. Die für die Rekombination verantwortlichen Proteine werden von einem replikationsdefektiven λ Phagen zur Verfügung gestellt, der in das Bakteriengenom integriert ist. Die durch die *Red*-Gene *exo*, *bet* und *gam* kodierten Proteine erlauben die Insertion doppelsträngiger DNA-Fragmente in Plasmide, BACs (*bacterial artificial chromosomes*) oder PACs (*P1-derived artificial chromosomes*) über homologe Rekombination (Zhang *et al.* 1998; Muyrers *et al.* 1999; Yu *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001). *Exo* kodiert für eine 5'-3' Exonuklease, welche Doppelstrangbrüche in linearisierter DNA erkennt und die DNA-Stränge an den 5' Enden abbaut. An die entstandenen 3' Einzelstrang-Überhänge bindet das durch *bet* kodierte Einzelstrang-bindende

Protein, welches die Zusammenlagerung von homologen DNA-Strängen fördert, was zur homologen Rekombination führt (Stahl 1998; Poteete 2001). Das durch *gam* kodierte Protein nimmt an dem Rekombinationsereignis selbst nicht teil, verhindert aber die Degradation linearer DNA, indem es die bakterieneigene RecBCD-Exonuklease-Aktivität inhibiert. Dies ist notwendig, da die über *recombineering* zu integrierende DNA meist in Form linearer PCR-Fragmente vorliegt, die in *E. coli* durch das RecBCD-System sofort abgebaut werden würden. Die Expression der *Red*-Gene unterliegt der Kontrolle des starken λP_L Promotors, der sich selbst wiederum unter der Kontrolle des temperatursensitiven $\lambda cI857$ Repressors befindet. Bei einer Temperatur von 32°C wird die Expression der *Red*-Gene unterdrückt, erst bei einer 15-minütigen Erhöhung auf 42°C kommt es zu einer Induktion der Expression. Die Herstellung des Vektors mit der genomischen *Ndufv1*-Sequenz erfolgte über Standard-Klonierungsmethoden. Die Selektion positiver Klone wurde mittels Kolonie-Filterhybridisierung durchgeführt. Die dafür notwendigen Sonden, die definierte DNA-Bereiche sequenzspezifisch erkennen, wurden über PCR hergestellt, radioaktiv markiert und für die Hybridisierung eingesetzt. Die Homologiebereiche des *targeting vectors* zur Ziel-DNA wurden über Standard-PCR-Methoden (s. 4.1.1.3) und Ligation der aufgereinigten, restringierten PCR-Fragmente hergestellt. Der linarisierte und aufgereinigte *targeting vector* wurde zur homologen Rekombination in ES-Zellen eingebracht. Die einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung des *targeting vectors* sind im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

4.2.1.2 Herstellung der Kolonie-Filter

Transformierte Bakterienzellen wurden unter Selektionsdruck mit dem entsprechenden Antibiotikum auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Hybridisierung wurde eine Nylonmembran auf die Bakterienkolonien gelegt und asymmetrisch im Verhältnis zur Kulturplatte markiert. Die mit den Kolonien hybridisierte Membran wurde nach erneuter Inkubation für 6-12 h bei 37°C für 10 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) geschwenkt, anschließend 10 min in Neutralisationslösung (0,5 M Tris-HCL, pH 7,4; 1,5 M NaCl) inkubiert und danach 5 min in 2x SSC gespült. Anschließend wurde sie getrocknet und für die Hybridisierung bei 4°C aufbewahrt. Die Kolonie-Filterhybridisierung kommt häufig dann zum Einsatz, wenn eine große Zahl von Bakterienkolonien überprüft wird.

4.2.1.3 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *Rediprime*TM II Labeling System (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. *Random* Hexamere dienen dabei als Primer für die DNA-Synthese an denaturierter Matrizen-DNA. Der sich bildende Primer-*template*-Komplex bildet das Substrat für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$) aus dem Reaktionsgemisch wird der gesamte neu synthetisierte DNA-Strang radioaktiv markiert. In einem 50 μl -Reaktionsvolumen wurden 10-25 ng DNA für 5 min bei 95°C denaturiert, zum *Rediprime*TM Mix zugesetzt und 50 μCi $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der markierten DNA erfolgte über Sephadex-Säulen (*ProbeQuant G-50 Micro Columns*, GE Healthcare, München, Deutschland). Für die Hybridisierung wurde die markierte Sonde mit 10 μg genomischer Maus-DNA versetzt, um unspezifische Bindungen zu verhindern, und bei 95°C denaturiert.

4.2.1.4 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Detektion spezifischer DNA-Fragmente wurde die Membran mit der entsprechenden $[\alpha^{32}\text{P}]$ -markierten DNA-Sonde hybridisiert. Dazu wurde die Membran in 30 ml Hybridisierungspuffer für 1 h bei 65°C im Hybridisierungsöfen präinkubiert. Die markierte Sonde wurde nach ihrer Denaturierung mit 1 ml Hybridisierungspuffer (nach Church und Gilbert, 1984: 0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 1 mM EDTA; 1% BSA; 7% SDS; pH 7,2) versetzt und ebenfalls für 1 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml spezifische Sonden-DNA zu der Membran pipettiert und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die Membran wurde bei 60°C je nach Stärke der radioaktiven Signale nach folgendem Ablauf gewaschen: 1x SSC/1% SDS: 5 min; 1x SSC/0,1% SDS: 30 min; 0,5x SSC/0,1% SDS: 15 min; 0,5x SSC/0,1% SDS: 15 min; 2x SSC/0,1% SDS: 15 min; 0,1x SSC/0,1% SDS: 15 min. Die verbleibende Radioaktivität wurde per Handmonitor vermessen. Das Waschen wurde beendet, als die gebundene Radioaktivität nur noch unwesentlich über der radioaktiven Hintergrundstrahlung lag. Die Membran wurde luftdicht in Folie verpackt und mit einem Röntgenfilm bei -80 °C mit Verstärkerfolien exponiert.

4.2.1.5 Ligation restringierter DNA-Fragmente

Für die Ligation wurden DNA-Fragmente und Vektoren restriktionsenzymatisch gespalten und aufgereinigt. Um die Religation des Vektors nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden pro μg Vektor-DNA 10 U *Shrimp* alkalische Phosphatase (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) eingesetzt und der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 15 min bei 65°C. Die Ligationsreaktion mittels *LigaFastTM Rapid DNA Ligation System* (Promega, Mannheim, Deutschland) erfolgte wie unter 4.1.1.7 beschrieben.

4.2.1.6 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für das recombineering

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen für das *recombineering* wurden 10 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (*E. coli* SW105 und *E. coli* SW106) in 500 ml LB-Medium inokuliert und bei 32°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ inkubiert. Zur Aktivierung der Rekombinationsenzyme wurden die Zellen für 15 min bei 42°C inkubiert und anschließend durch vorsichtiges Schwenken auf Eis abgekühlt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 5.300 x g zentrifugiert, dreimal mit eiskaltem H₂O und einmal mit eiskaltem 15%igem Glycerin gewaschen. Anschließend wurden sie in 4 ml 15%igem Glycerin resuspendiert, als 50 μl -Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Expression der Cre-Rekombinase zur Exzision der loxP-flankierten Neo-Selektionskassette wurde durch Wachstum der Bakterien in Arabinose-haltigem Medium induziert. Dazu wurden 10 ml einer Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium inokuliert und bei 32°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,4$ inkubiert. Anschließend wurde Arabinose in einer Endkonzentration von 0,1% zugegeben und für 1 h bei 32°C inkubiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben weiterbehandelt.

4.2.1.7 Elektroporation kompetenter Bakterienzellen

Für das Einbringen der DNA in elektrokompente Zellen wurde das Bakterien-DNA-Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Breite: 0,1 cm) überführt und die Elektroporation unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Spannung: 1,65 kV; Kapazität: 25 μF ; Widerstand: 200 Ω . Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt, 1h bei 32°C inkubiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Für die Einführung der Selektionskassette in den zu generierenden *targeting*

vector wurden 10 ng Plasmid-Vektor-DNA und 100 ng linearisierte DNA zu 50 µl hitzeinduzierten, elektrokompenten Zellen gegeben. Für die Exzision der Selektionskassette wurde 1 ng Plasmid-DNA zu 50 µl Arabinose-induzierten, elektrokompenten Zellen gegeben.

4.2.2 Methoden der ES-Zellkultur

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen und dann in permanente Zellkultur überführt werden. Für die Kultivierung von ES-Zellen ist es wichtig, diese in einem undifferenzierten Zustand zu halten. Dies wird durch Zugabe von LIF (*leukemia inhibitory factor*) und Kultivierung auf sogenannten *feeder*-Zellen erreicht. Mittels ES-Zellen können spezifische Mutationen gezielt in das Mausgenom eingebracht werden. Dazu wird ein *targeting vector* mit der gewünschten Mutation mittels Elektroporation in ES-Zellen eingeschleust. Als seltenes Ereignis kann es dabei zur homologen Rekombination zwischen Mausgenom und Vektor kommen. Die genetisch veränderten ES-Zellen dienen der Erzeugung mutanter Mäuse.

4.2.2.1 Feeder-Zellkultur

Als *feeder*-Zellen dienen murine embryonale Fibroblasten (E10.5-E14.5) aus dem Mausstamm ICSBP^{-/-}. Diese sind Neomycin-resistent, so dass eine Selektion der ES-Zellklone über ihre Neo-Kassette erfolgen konnte, ohne dass die *feeder*-Zellen ebenfalls abstarben. Die Kultivierung erfolgte im *feeder*-Medium (500 ml 1x DMEM; 60 ml FKS; 5,7 ml 100x MEM; 5,7 ml 100x Pen/Strep; 1,2 ml 50 mM Merkaptoethanol) auf mit 0,1%iger Gelatine-Lösung beschichteten Platten. Die auf 15 cm-Kulturschalen konfluent gewachsenen Fibroblasten wurden mit 1x PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA ad 1 l mit ddH₂O) 5 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml *feeder*-Medium gestoppt. Die Zellen wurden 5 min bei 270 x g abzentrifugiert, in 9 ml *feeder*-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 aufgeteilt. Für die Inaktivierung der *feeder*-Zellen wurden diese für 2 h bei 37°C in *feeder*-Medium inkubiert, dem Mitomycin C in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugesetzt worden war. Die Verhinderung der Zellteilung der Fibroblasten war erforderlich, damit diese nicht in die ES-Zellen überwuchsen. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturplattenboden abgelöst und auf neue Zellkulturplatten ausgesät, bzw. für die spätere Verwendung eingefroren.

4.2.2.2 ES-Zellkultur

Die Kultivierung der ES-Zellen erfolgte auf Zellkulturschalen mit inaktivierten *feeder*-Zellen in ES-Medium (500 ml 1x DMEM; 90 ml FKS; 6 ml 100x MEM; 6 ml 100x Pen/Strep; 1,2 ml 50 mM Merkaptoethanol; 180 µl LIF). Dazu wurde das *feeder*-Medium von den Zellkulturschalen abgesaugt und durch ES-Medium ersetzt. Die aufgetauten ES-Zellen wurden 4 min bei 270 x *g* zentrifugiert, in 2 ml ES-Medium resuspendiert und auf vorbereitete *feeder*-Schalen ausplattiert. Das ES-Medium wurde täglich gewechselt. Bei Bedarf wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 aufgeteilt. Hierzu wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturplattenboden gelöst, in frischem ES-Medium vereinzelt und auf neue *feeder*-Schalen aufgeteilt. Die Zellen wuchsen zwei bis drei Tage, ehe sie erneut geteilt oder elektroporiert wurden. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

ES-Zellen wurden zur Lagerung eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturplattenboden abgelöst und 4 min bei 270 x *g* zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium A (*feeder*- oder ES-Medium; 20% FKS) resuspendiert und anschließend mit 1 ml Einfriermedium B (*feeder*- oder ES-Medium; 20% DMSO) vermischt. Die Zellen wurden auf Kryoröhrchen verteilt und im Einfriergerät Nalgene® *Mr.Frosty* (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad erwärmt, in ES-Medium resuspendiert und auf *feeder*-Zellkulturschalen ausgesät.

4.2.2.4 Elektroporation der ES-Zellen

Für die Elektroporation wurden ES-Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm-Kulturschale eingesetzt. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturplattenboden abgelöst und anschließend mit 5 ml ES-Medium versetzt. Nach Waschen mit 1x PBS und Zentrifugation bei 270 x *g* für 4 min wurde das Zellpellet in 1x PBS resuspendiert und auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^7$ Zellen/800 µl eingestellt. Zu der Zellsuspension wurden 20-30 µg linearisierter *targeting vector* gegeben, gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation fand unter folgenden Bedingungen statt: Impulsdauer: 2 ms; Kapazität:

1.200 μF ; Spannung: 300 V. Nach der Elektroporation wurden die Zellen zur Erholung auf Eis inkubiert, anschließend in 10 ml ES-Medium überführt und auf drei 10 cm-Kulturschalen ausgesät.

4.2.2.5 Selektion der ES-Klone

Die Selektion der ES-Klone erfolgte 24-48 Stunden nach der Elektroporation durch Zugabe von ES-Medium, dem das Antibiotikum G418 in einer Endkonzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt war. Nur Zellen, die das durch den *targeting vector* eingebrachte Neomycin-Resistenzgen trugen, sollten unter diesen Bedingungen überleben. Die Selektion erstreckte sich über 8-14 Tage.

4.2.2.6 Ernten der ES-Klone

G418-resistente ES-Zellklone, die im Selektionsmedium große, scharf begrenzte Kolonien gebildet hatten, wurden geerntet. Dazu wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Zu jedem Einzelklon wurde 30 μl Trypsin-EDTA-Lösung gegeben und die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl ES-Medium gestoppt und die Zellen auf *feeder*-Platten ausgesät. Zwei bis drei Tage nach dem Ernten wurden die Zellen geteilt. Ein Teil wurde zum Erhalt der Zelllinie auf *feeder*-Platten umgesetzt und weggefroren. Die restlichen Zellen wurden zur DNA-Extraktion auf Gelatine-beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt und 7-10 Tage kultiviert.

4.2.2.7 DNA-Extraktion aus ES-Zellen

Für die DNA-Extraktion wurden die ES-Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 50 μl Lysis-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5% Sarkosyl (N-Lauroylsarkosin); 10 mM NaCl), dem Proteinase K in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt wurde, über Nacht bei 60°C inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Inkubation mit 100 μl Ethanol-Salz-Lösung (1,5 ml 3M Natriumazetat, *ad* 100 ml mit 96%igem Ethanol) für mindestens 3 h bei 4°C. Die DNA wurde anschließend dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei 4°C gelagert. Sie wurde eingesetzt, um mittels Southern Blot eine erfolgreiche homologe Rekombination des Vektors an der gewünschten Stelle zu detektieren.

4.2.3 Southern Blot Analyse

Der Southern Blot ist eine Methode, bei der DNA-Fragmente, die zuvor durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf einer Membran fixiert werden, um anschließend durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch nachgewiesen zu werden. Das Agarosegel mit der aufgetrennten DNA wurde 10 min in Depurinierungslösung (250 mM HCl) geschwenkt, wodurch längere DNA-Stränge in kleinere Fragmente zerbrachen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1 M NaCl), wobei beide DNA-Stränge voneinander getrennt wurden. Das Gel wurde dann auf eine in Denaturierungslösung getränkte Filterpapierbrücke gelegt. Darauf wurde luftblasenfrei eine Nylon- oder PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran, drei in Denaturierungslösung getränkte Whatman-Filterpapiere und mehrere Lagen trockener Zellstoff gelegt und der Aufbau mit einem Gewicht beschwert. Aufgrund der durch Kapillarkräfte entstehenden Flüssigkeitsströmung gelangt die DNA an die geladene Membran und bindet dort. Nach 12-16 Stunden wurde die Blotapparatur abgebaut und die Membran zweimal für 5 min in 2x SSC-Puffer gespült. Anschließend wurde die Membran getrocknet und bis zur Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden (siehe 4.2.1.4) bei -20°C aufbewahrt. Die Hybridisierung wurde mit 1 μl spezifischer Sonde und 60 μl Marker-spezifischer Sonde (λ Phagen-DNA) durchgeführt.

4.2.4 Blastozysteninjektion und Herstellung chimärer Mäuse

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die nach Injektion in Blastozysten und Integration in deren innere Zellmasse an der Entwicklung des entstehenden Embryos beteiligt sind. Da die eingesetzten ES-Zellen und die Blastozysten aus unterschiedlichen Mausstämmen kommen, setzt sich die entwickelnde Maus aus Zellen zweier unterschiedlicher Organismen zusammen und wird deshalb als Chimäre bezeichnet. Durch die Wahl zweier Mausstämmen mit unterschiedlicher Fellfarbe können die Chimären anhand ihres unregelmäßig gefleckten Fells erkannt werden (Fellfarbenschimären). Positive ES-Klone, die durch die Southern Blot Analyse verifiziert worden sind, wurden drei bis vier Tage vor der Injektion aufgetaut und auf *feeder*-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Am Injektionstag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Zellkulturplattenboden abgelöst und für 4 min bei $270 \times g$ zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 μl ES-Medium resuspendiert, in einer Vertiefung einer 12-Loch-Mikrotiterplatte ausplattiert und für 30-45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt war nötig, um ES-Zellen von *feeder*-Zellen zu trennen, welche sich innerhalb von 30 min am Boden absetzen. Der Überstand mit den ES-Klonen wurde

vorsichtig abgenommen, mit 1x PBS gewaschen und bis zur Injektion auf Eis gehalten. Die so vorbereiteten ES-Klone wurden in Blastozysten der superovulierten C57BL/6J-Spendermäuse, die mit BDF 1-Männchen verpaart worden waren, injiziert. Als Ammentiere wurden NMRI-Mäuse eingesetzt. Die Mikroinjektion wurde von Frau Katja Becker (*Small Animal Facility*, MDC-Berlin) durchgeführt.

4.2.5 Generierung „gefloxter“ *Ndufv1*-Mäuse

Die chimären Tiere wurden zur Keimbahntransmission des „gefloxten“ Allels mit Mäusen des Stammes C57BL/6J verpaart. Tiere der F₁-Generation mit brauner Fellfarbe, die das Allel in ihre Keimzellen integriert hatten, wurden einerseits zur Rückkreuzung mit 129/p20laHsd-Mäusen verpaart, andererseits mit FLPe-*deleter*-Mäusen. Letztere exprimieren die FLPe-Rekombinase konstitutiv in allen Körperzellen, so dass im Genom der Nachkommen die Neo-Selektionskassette entfernt wurde. Alle Nachkommen der F₁- und F₂-Generation wurden mittels Schwanzspitzenbiopsie genotypisiert.

4.2.6 Genotypisierung der Mäuse

Die zur Genotypisierung eingesetzte genomische DNA wurde aus den Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse gewonnen. Die Isolierung aus dem Gewebe erfolgte über das *GenScript TissueDirectTM Multiplex PCR System* (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, USA) nach Angaben des Herstellers. Durch Lyse wurde die genomische DNA dabei direkt aus dem Gewebe freigesetzt und konnte ohne weitere Aufreinigungsschritte für die PCR-Amplifikation mit den entsprechenden sequenzspezifischen Primern eingesetzt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Expression nukleärer Komplex I-Gene in unterschiedlichen Hirnregionen der Maus

Das Expressionsmuster aller bekannten kernkodierten Strukturuntereinheiten des murinen Komplexes I wurde mittels *in situ* Hybridisierung in verschiedenen Hirnregionen zu den Entwicklungszeitpunkten E11.5, E17.5, P1, P11, P28 und adult (zwölf Wochen) untersucht.

5.1.1 Generierung Komplex I-spezifischer mRNA-Sonden

Für die *in situ* Expressionsstudien wurden *antisense*-RNA-Sonden generiert, die durch *in vitro* Transkription für den spezifischen Nachweis der jeweiligen mRNA mit Digoxigenin markiert wurden (Abb. 5.1). Die *antisense*-Orientierung ist ausschlaggebend dafür, dass die Sonde an die entsprechende mRNA-Sequenz, die *in situ* in *sense*-Orientierung vorliegt, hybridisieren kann. Der Einsatz von RNA-Sonden bietet gegenüber DNA-Sonden den Vorteil, dass RNA-RNA-Komplexe eine höhere Stabilität aufweisen, was letztlich zu einer besseren und spezifischeren Signaldetektierbarkeit führt. Um sowohl eine adäquate Spezifität, als auch eine gute Hybridisierungseffizienz und Gewebepenetranz zu gewährleisten, wurden Sonden mit einer Länge von etwa 300 Nukleotiden generiert. Die detaillierte Vorgehensweise zur Sondenherstellung findet sich im Methodenteil dieser Arbeit.

5.1.2 Expression der kernkodierten Untereinheiten des Komplexes I

Die entwicklungsspezifische Expression der 33 kernkodierten Untereinheiten des mitochondrialen Komplexes I wurde in verschiedenen Hirnregionen der Maus mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) untersucht. Dazu wurden Gehirnschnitte von C57BL/6J-Mäusen der Entwicklungsstufen E11.5, E17.5, P1, P11, P28 und adult mit spezifischen RNA-Sonden hybridisiert (Abb. 5.2). Das Vorhandensein der entsprechenden spezifischen mRNA kann durch einen Farbniederschlag detektiert werden. Die Färbeintensität der Schnitte war somit ein Maß für die Menge spezifischer mRNA der jeweiligen Komplex I-Untereinheiten.

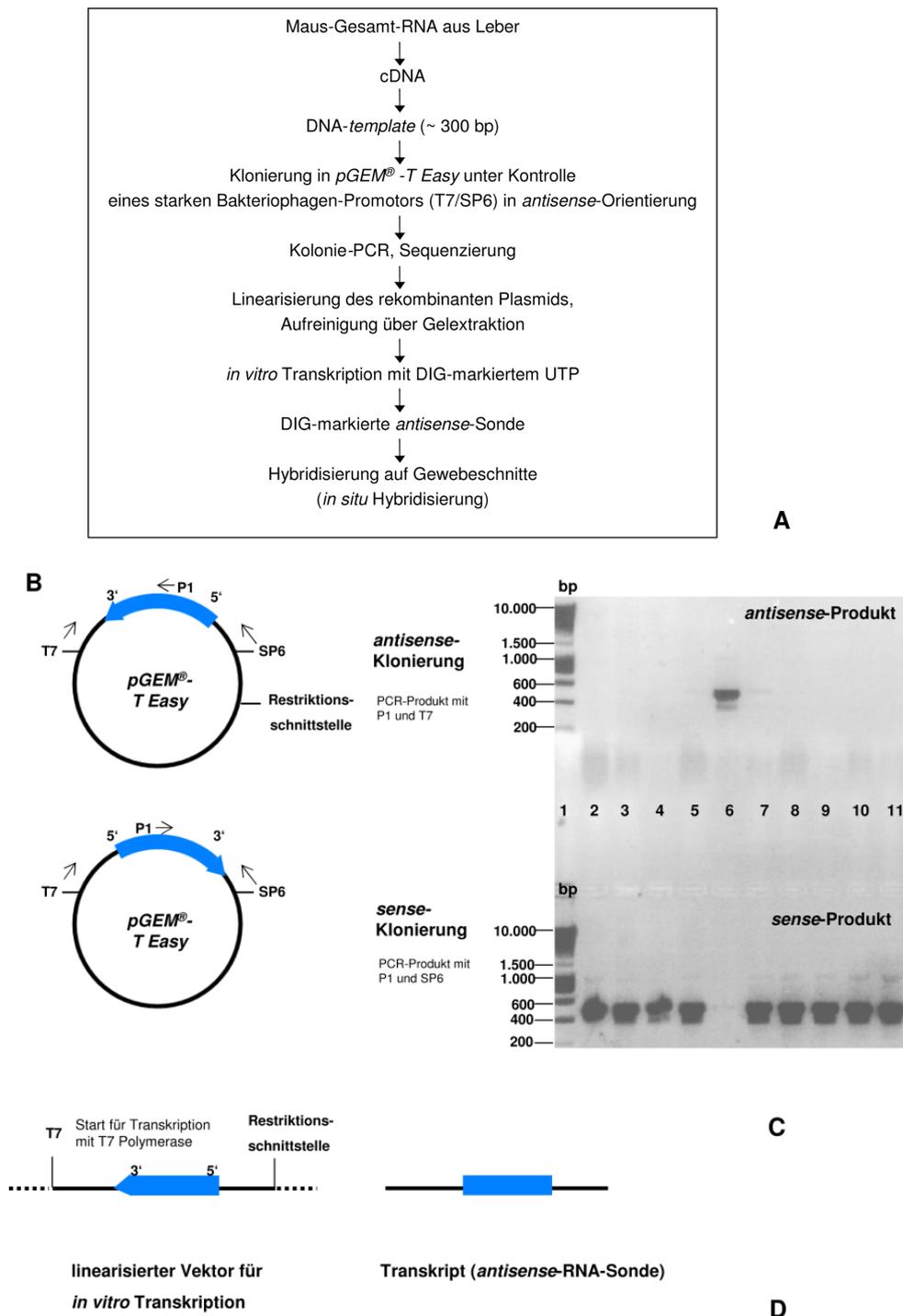


Abb. 5.1: Herstellung Komplex I-spezifischer mRNA-Sonden. (A) Flussdiagramm zur Generierung der ISH-Sonden. (B) Schematische Darstellung des Klonierungsvektors *pGEM*[®]-*T Easy* mit *insert* jeweils in *antisense*- und *sense*-Orientierung, Bindungsstellen der Primer T7, SP6 und des *insert*-spezifischen Primers P1, sowie der für die *in vitro* Transkription notwendigen Restriktionsschnittstelle. (C) Kolonie-PCR zur Überprüfung der *insert*-Orientierung am Beispiel von Klonen mit dem *Ndufv1*-*insert*. 5 μ l PCR-Produkt wurden in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: 3 μ l *SmartLadder*[®]-DNA-Leiter; Spur 2-11: *Ndufv1*-Klone. Wurde das *insert* in *antisense*-Orientierung eingebaut, zeigt sich mit den Primern P1 und T7 eine Bande (obere Spur), wurde es in *sense*-Orientierung eingebaut, zeigt sich mit den Primern P1 und SP6 eine Bande (untere Spur). Für die nachfolgende *in vitro* Transkription wurden nur Plasmide eingesetzt, die das *insert* in *antisense*-Orientierung trugen. (D) Darstellung des für die *in vitro* Transkription linearisierten Vektors, sowie des entstandenen Transkripts (RNA-Sonde), welches für die ISH eingesetzt wurde.

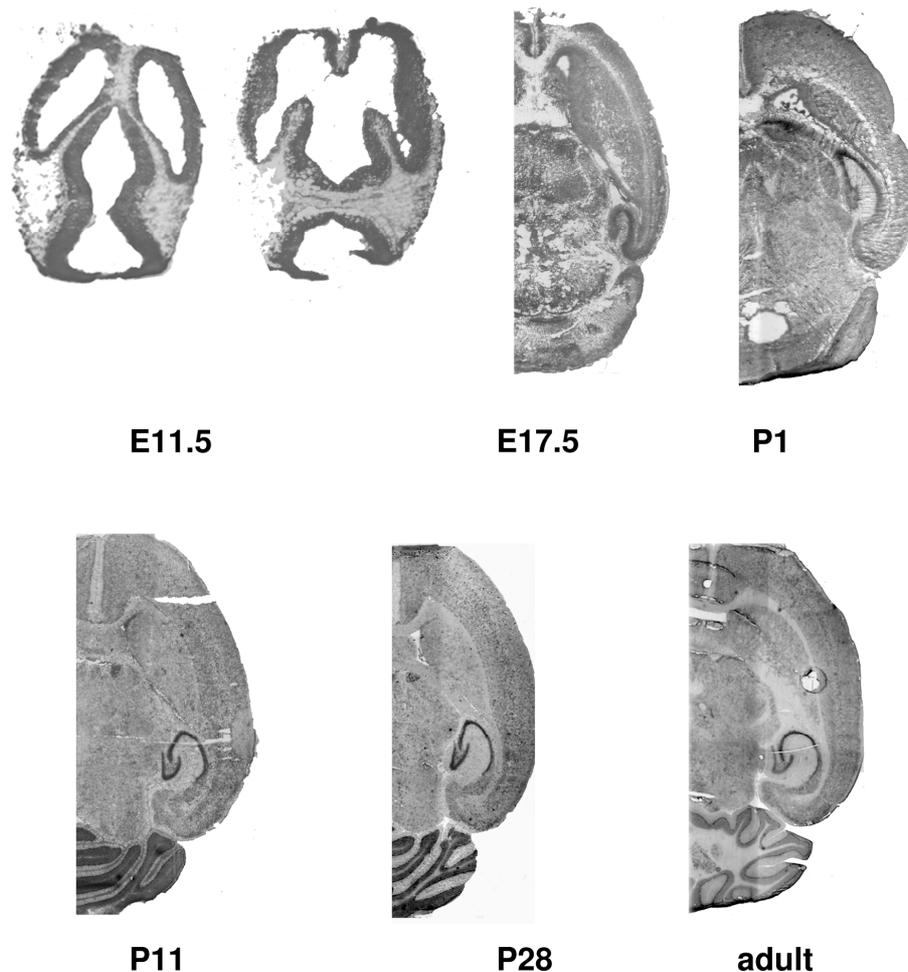


Abb. 5.2: Komplex I-Expression während der murinen Hirnentwicklung. ISH-Färbungen der Ndufa9-Untereinheit an murinen Hirnschnitten zu den Entwicklungszeitpunkten E11.5, E17.5, P1, P11, P28 und adult.

5.1.3 Bestimmung der Expressionsstärke der Komplex I-Untereinheiten anhand der relativen ISH-Intensitäten

Zur Bestimmung der relativen Expressionsintensitäten der Komplex I-Untereinheiten wurden die angefärbten ISH-Gewebeschnitte im Durchlicht als schwarz-weiß Bilder mit einem x 63 Objektiv fotografiert und die Graustufen als Dichten über densitometrische Messung mit Hilfe des Programms *ImageJ* quantifiziert. Zur sorgfältigen Quantifizierung wurden für alle Schnitte die äußeren Rahmenbedingungen wie optische Einstellungen und Belichtungszeiten konstant gehalten. Im Programm *ImageJ* wurden die Bilder weitergehend prozessiert. Die schwarz-weiß Bilder wurden invertiert und die entsprechenden, zu untersuchenden Hirnregionen (ROIs, *regions of interest*) markiert. Die mittleren Dichten der Färbungen in der jeweiligen Fläche wurden densitometrisch vermessen und die integrierten ISH-Dichten bestimmt.

Die integrierte Dichte eines ungefärbten Gewebeschnittes bei identischer Belichtung wurde als nicht-spezifische Hintergrundintensität abgezogen. Um die relativen Expressionsintensitäten der ISH-Signale (ISH-Signal pro Kern) in verschiedenen Hirnregionen miteinander vergleichen zu können, mussten die ISH-Signale zur Normalisierung auf die nukleäre Packungsdichte bezogen werden. Eine Normalisierung war deshalb notwendig, da kernreichere Regionen, die automatisch mehr mRNA aufwiesen, auch ein stärkeres Signal zeigten, ohne dass tatsächlich eine erhöhte Expression des Proteins in den Zellen der jeweiligen Region vorlag. Zur Bestimmung der nukleären Packungsdichte wurde die DNA der Zellkerne in den einzelnen Regionen durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) visualisiert, die Signale unter UV-Beleuchtung bei einer Anregung von 380 ± 10 nm fotografiert und die entstandenen Bilder in *ImageJ* prozessiert. Für die Auswertung der relativen Signalintensitäten und der nukleären Packungsdichte wurden zwei alternative Methoden angewandt: **(1)** Zum einen wurde eine Bildanalyse durchgeführt, bei der die Ermittlung der nukleären Packungsdichte über eine direkte Zählung der Zellkerne erfolgte (Abb. 5.3 A-E). Diese wurden dabei entweder manuell oder mit Hilfe des *watershed* Algorithmus des Programms *ImageJ* ausgezählt, welcher einzelne Kerne voneinander separieren kann, auch wenn diese sehr nahe beieinander lokalisiert sind oder sich teilweise überlappen. **(2)** Zum zweiten wurde eine Bildanalyse durchgeführt, welche die Packungsdichte densitometrisch über die Intensität der DAPI-Signalstärke in exakt derselben ROI wiedergab, in der die ISH-Signale gemessen wurden (Abb. 5.3 F-J). Da die ISH-Signaldichten nicht linear skalieren, wurden die relativen Signalintensitäten Z-transformiert und die Z-Werte als *heat scale* Abbildungen dargestellt, bei denen die Expressionsintensitäten und ihre Extrema farblich kodiert sind. Hohe Z-Werte stehen für eine hohe Expression und sind in rot dargestellt, niedrige Werte stehen für eine niedrige Expression und sind in blau dargestellt (Abb. 5.3 und Abb. 5.4). Aufgrund der vermuteten natürlichen Abweichungen der Expressionsintensitäten einzelner Untereinheiten während einer einmaligen Messung und der Ungenauigkeit der semi-quantitativen Densitometrie wurden für die statistische Analyse nur die gemittelten Durchschnittsintensitäten (arithmetisches Mittel) aller kernkodierte Untereinheiten gemeinsam betrachtet.

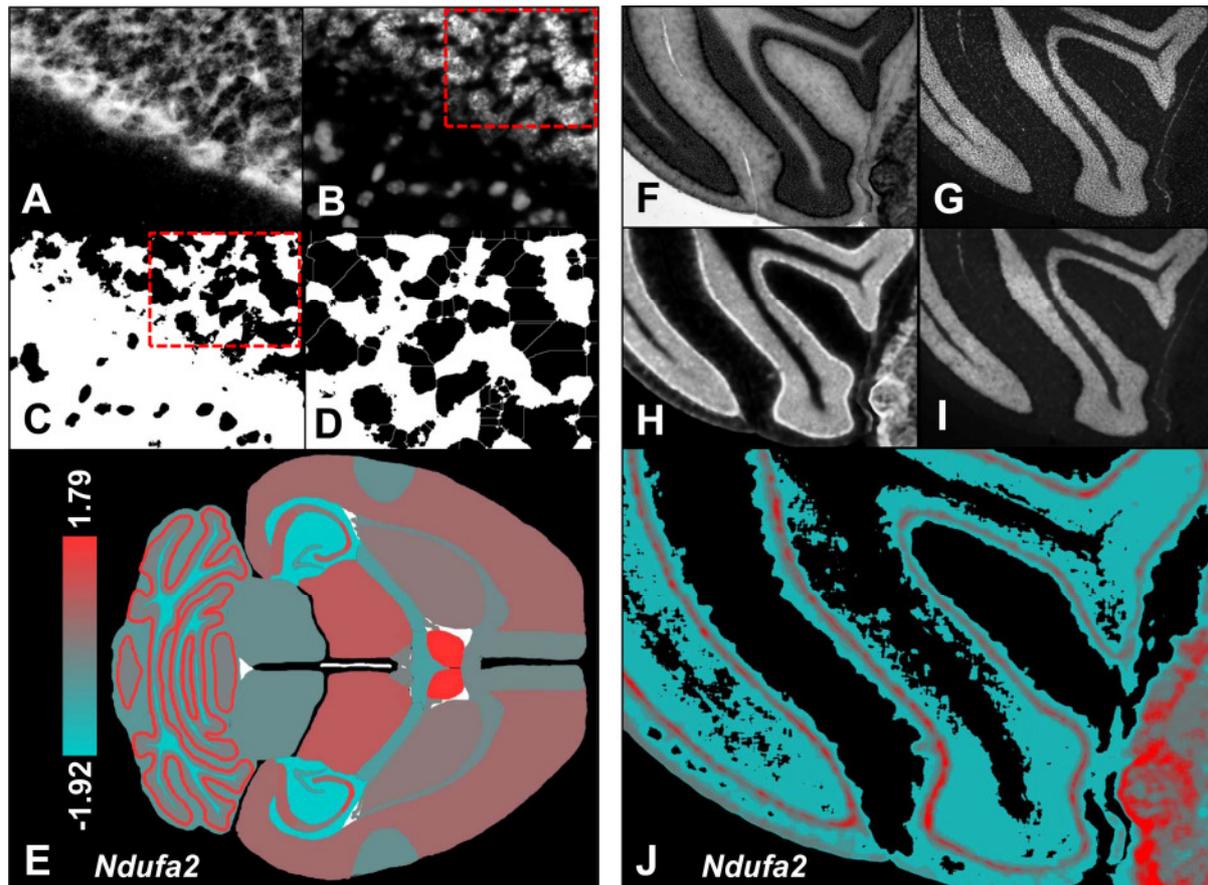


Abb. 5.3: Densitometrische quantitative Auswertung der ISH-Signale und Normalisierung auf die nukleäre Packungsdichte. (A) Invertiertes Bild des ISH-Signals einer DIG-markierten Sonde (*Ndufa2*) zur Bestimmung der integrierten lokalen ISH-Dichte. (B) Gleiche ROI mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI zur Bestimmung der nukleären Packungsdichte angefärbt. (C) Bild B nach automatischer Bildprozessierung mit dem Programm *ImageJ* zur Zellzählung. (D) Ergebnisse des *watershed* Algorithmus zum automatischen Zählen nah beieinander liegender Zellen. Bild D entspricht dem rot markierten Bereich in B und C. (E) *Heat scale* Abbildung der spezifischen *Ndufa2*-Signalintensität, bezogen auf die nukleären Dichten im gesamten Gehirn. Die Signalintensitäten sind farbkodiert. Die Zahlen beschreiben die Extrema der Z-transformierten Signalintensitäten im Kleinhirn. **Bildmathematisch-densitometrische Analyse und Normalisierung.** (F) ISH-Signal der DIG-markierten *Ndufa2*-Sonde im Kleinhirn. (G) Gleiche ROI mit DAPI angefärbt. (H) Bild F nach Inversion und Interpolation der Dichte von 20 Pixeln. (I) Bild G nach Interpolation der Dichte von 20 Pixeln. (J) Ergebnis der mathematischen Bildberechnung (Division von Bild H durch Bild I). Die Grauwerte des resultierenden schwarz-weiß Bildes wurden mit der gleichen Farbgebung wie in E kodiert (Wirtz und Schuelke 2011).

5.1.4 Entwicklungsabhängige Unterschiede in Expressionsmustern

Die ISH-Studien zeigten ein hoch regionalisiertes Expressionsmuster der einzelnen Komplex I-Untereinheiten, welches sich nach Z-Transformation bis zu vier Standardabweichungen zwischen den einzelnen Hirnregionen unterschied. Die durchschnittlichen Dichten aller 33 ISH-Sonden in den untersuchten Stadien der prä- und postnatalen Gehirnentwicklung wurden als *heat scale* Abbildungen dargestellt (Abb. 5.4). Die *heat scale* Grafiken der durchschnittlichen Expression aller einzelnen Komplex I-Untereinheiten zu den jeweils fünf verschiedenen

Untersuchungszeitpunkten finden sich im Anhang (Abb. A.3). Wie anhand der Zunahme der untersuchten Strukturen deutlich wird, unterliegen die einzelnen Hirngebiete einer altersabhängigen Entwicklung von Vorläufer-Regionen zu differenzierteren Strukturen (Jacobowitz und Abbott 1998, s. Abb. 5.5). Für eine detaillierte graphische Darstellung der Signaldichten der einzelnen Sonden wurden zusätzlich Clustergramme (*heat maps*) angefertigt (Abb. 5.6). Eine rote Einfärbung signalisiert hierbei eine hohe Expressionsintensität, grün eine niedrige.

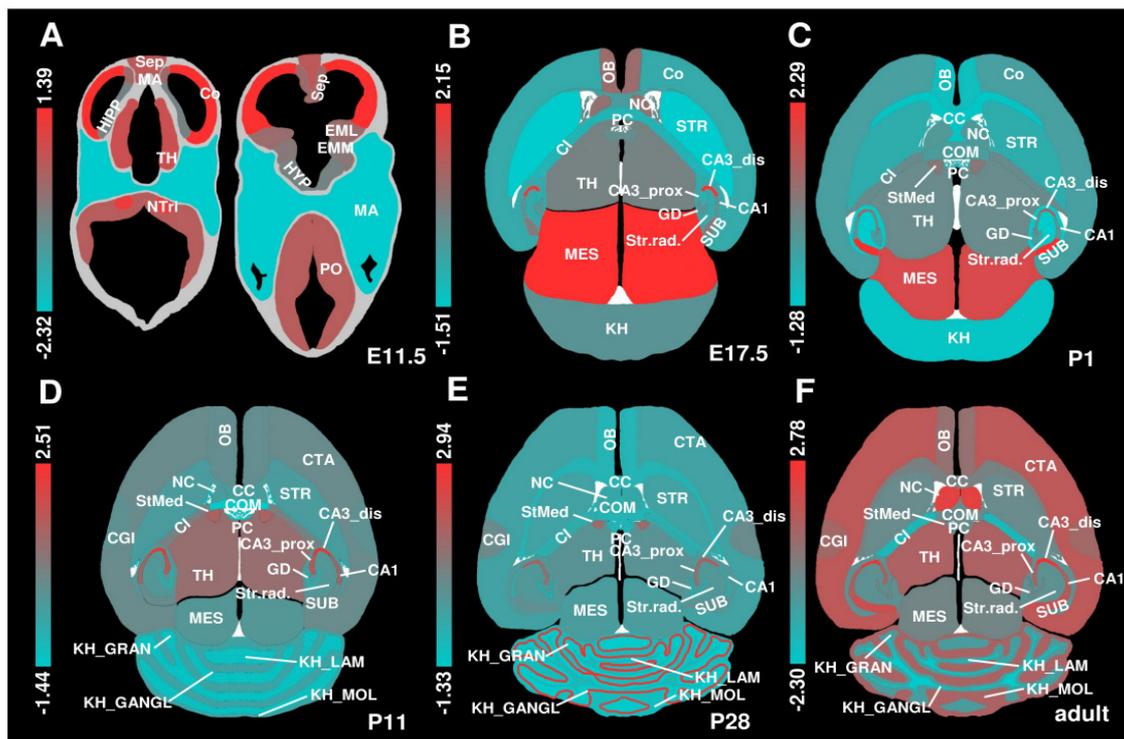


Abb. 5.4: Arithmetischer Mittelwert der Expressionsintensitäten der 33 strukturellen Komplex I-Untereinheiten während der murinen Gehirnentwicklung. (A-F) Farblich kodierte mittlere Expressionsintensitäten für die Zeitpunkte der pränatalen (E11.5, E17.5) und postnatalen (P1, P11, P28, adult) Hirnentwicklung. Die Farbskalierung stellt die Abweichungen zwischen den Extrema der Z-transformierten Intensitäten (als Zahlen angegeben) dar. Eine rote Farbgebung gibt ein hohes Expressionsniveau wieder, eine blaue Farbgebung ein niedriges. Die Abkürzungen für die verschiedenen Hirnregionen finden sich zusammen mit ihren Entwicklungsstufen in Abb. 5.5 (Wirtz und Schuelke 2011).

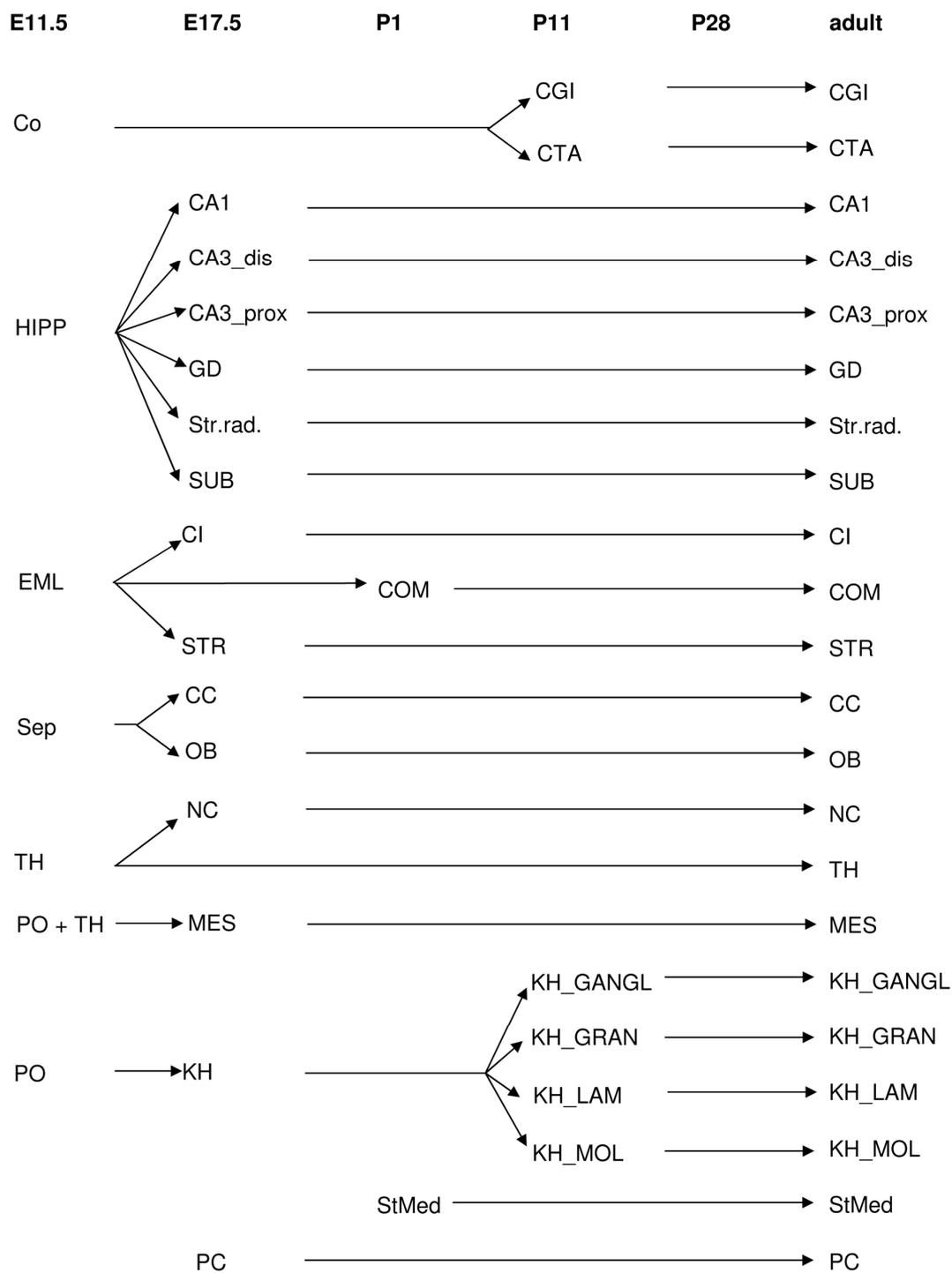


Abb. 5.5: Entwicklungsschema der untersuchten Hirnregionen zu verschiedenen Zeitpunkten der murinen Hirnentwicklung. Abkürzungen (in alphabetischer Reihenfolge): **CA1**, CA1 Region; **CA3_dis**, distaler Teil der CA3 Region; **CA3_prox**, proximaler Teil der CA3 Region; **CC**, *Corpus callosum*; **CI**, *Capsula interna*; **CGI**, *Cortex granular insular*; **Co**, Kortex; **COM**, *Commissura anterior*; **CTA**, *Cortex temporal anterior*; **EML**, *Eminentia lateralis*; **EMM**, *Eminentia medialis*; **GD**, *Gyrus dentatus*; **HIPP**, Hippokampusanlage; **HYP**, Hypothalamus; **KH**, Kleinhirnanlage; **KH_GANGL**, Kleinhirn, *Stratum ganglionare*; **KH_GRAN**, Kleinhirn, *Stratum granulosum*; **KH_LAM**, Kleinhirn, *Laminae medullares*; **KH_MOL**, Kleinhirn, *Stratum moleculare*; **MA**, Matrix; **MES**, Mesenzephalon; **NC**, *Nucleus caudatus*; **NTri**, *Nucleus trigeminalis*; **OB**, *Bulbi olfactorii*; **PC**, *Plexus choroideus*; **Po**, Pons; **Sep**, *Septum*; **SepMA**, Matrix des *Septums*; **StMed**, *Striae medullares*; **Str.rad.**, Hippokampus, *Stratum radiatum lacunosum moleculare*; **STR**, *Striatum*; **SUB**, *Subiculum*; **TH**, Thalamus (Wirtz und Schuelke 2011).

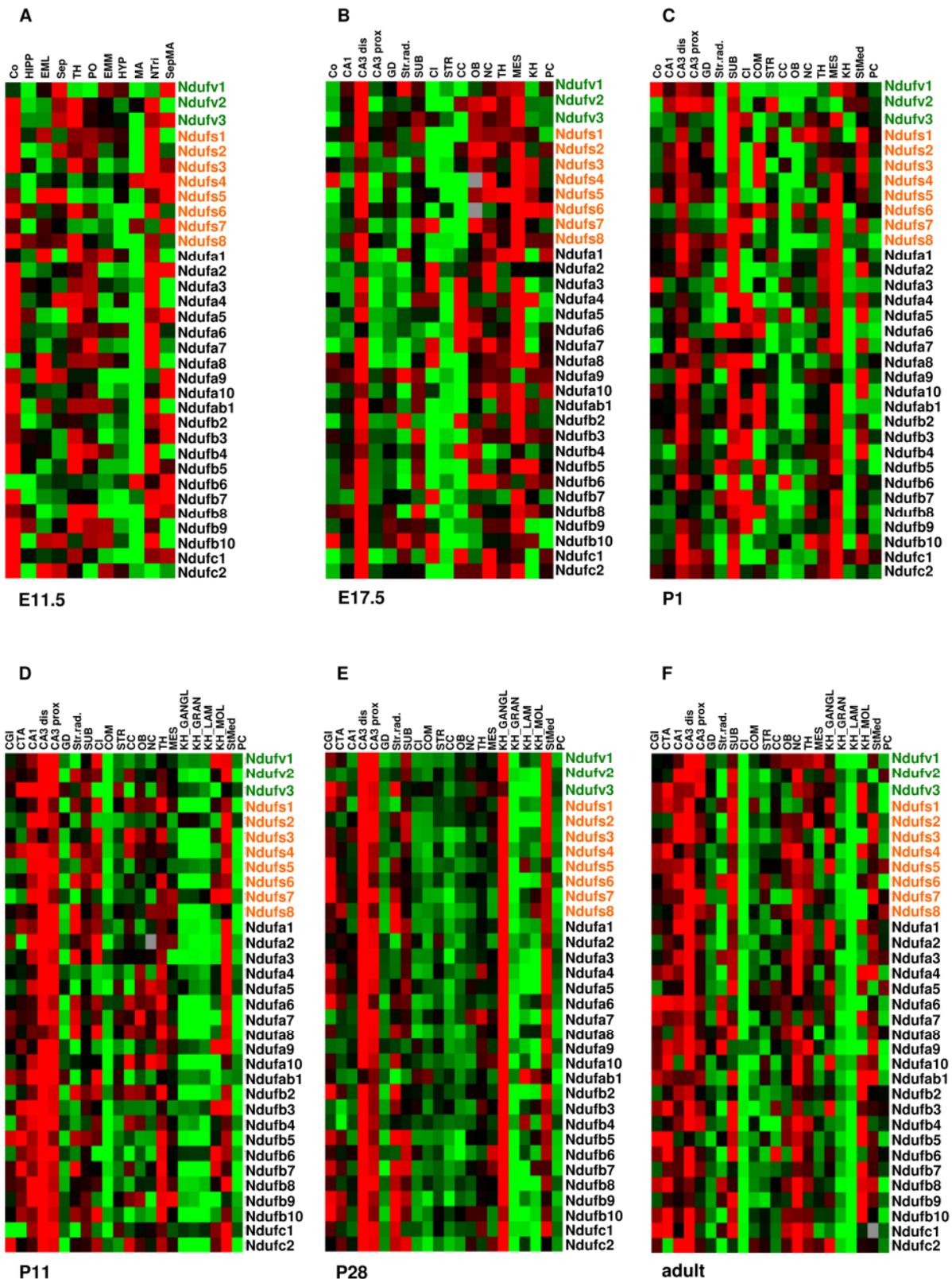


Abb. 5.6: Clustergramme für alle 33 kernkodierte Untereinheiten des Komplexes I während der prä- und postnatalen murinen Hirnentwicklung. (A-F) Dendrogramme der Z-transformierten Expressionsintensitäten zu den Entwicklungszeitpunkten E11.5, E17.5, P1, P11, P28 und adult. Eine rote Farbgebung signalisiert eine hohe Expression, eine grüne Farbgebung eine niedrige. Grün: Untereinheiten der Flavoprotein-Fraktion (FP), orange: Untereinheiten der Eisen-Schwefel-Fraktion (IP), schwarz: Untereinheiten der hydrophoben Fraktion (HP). Die Abkürzung der Hirnstrukturen entspricht derjenigen aus Abb. 5.5 (Wirtz und Schuelke 2011).

Nachfolgend werden die Expressionsmuster der nukleären Komplex I-Untereinheiten besonders in denjenigen Hirnregionen betrachtet, die bei Mitochondriopathien hauptsächlich betroffen sind und signifikante entwicklungspezifische Besonderheiten aufzeigen. Dies sind Hippokampus, Kleinhirn, zerebraler Kortex and Mesenzephalon. Abb. 5.7 zeigt den zeitlichen Verlauf der wichtigsten neuronalen Entwicklungsschritte wie Neurogenese, Differenzierung/Migration, Synaptogenese und Reifung in den jeweiligen Hirnregionen (Pokorny und Yamamoto 1981a, 1981b; Allendoerfer und Shatz 1994; Del Rio 1996; Del Rio *et al.* 2000; Matoba *et al.* 2000; Mody *et al.* 2001; Lim *et al.* 2004; Ullian *et al.* 2004; Rakic 2006; Han *et al.* 2009; Yin *et al.* 2009). Der Zeitverlauf aller Z-transformierten relativen Signalintensitäten in den obengenannten Regionen wurde für jede Probe und Region gegen das Alter des Tieres aufgetragen (Abb. 5.8; Abb. 5.10-Abb. 5.12).

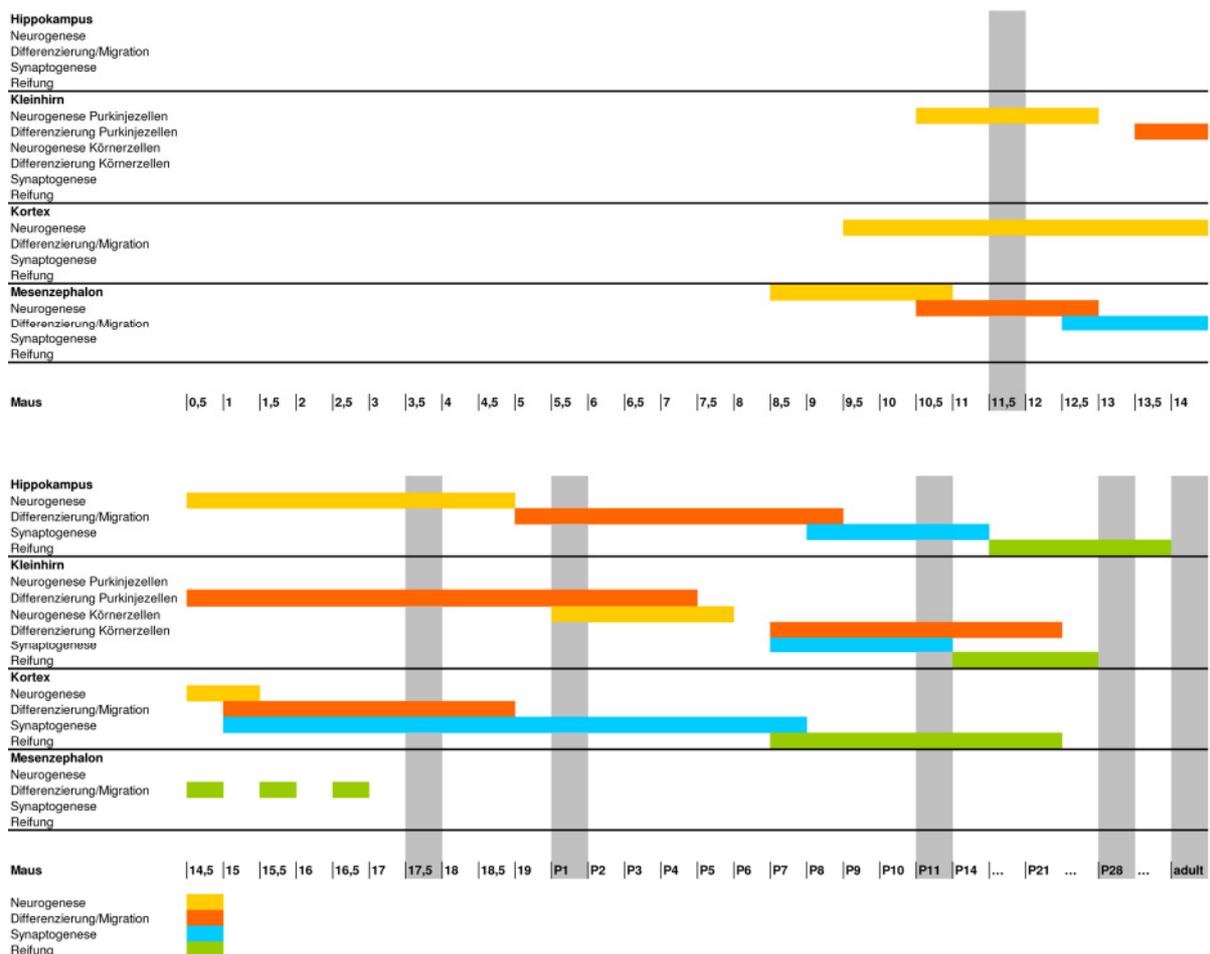


Abb. 5.7. Zeitschema der neuronalen Entwicklung. Dargestellt sind die wichtigsten Ereignisse in der neuronalen Entwicklung des Hippokampus, Kleinhirns, Kortex und Mesenzephalons: Neurogenese (gelb), Neuronendifferenzierung und Migration (orange), Synaptogenese (blau), Reifung (grün). Die grauen Längsbalken repräsentieren diejenigen Zeitpunkte, zu denen ich die Expression der Komplex I-Untereinheiten in den einzelnen Hirnregionen untersucht habe.

5.1.5 Komplex I-Genexpression im Hippokampus

Der Hippokampus zeigt ein hoch spezifisches Expressionsmuster während der Hirnentwicklung für alle Komplex I-Untereinheiten in den vier untersuchten hippocampalen Regionen: CA1 Region, distaler und proximaler Teil der CA3 Region und *Gyrus dentatus* (Abb. 5.8). Um den Embryonaltag E11.5 werden die höchsten Intensitäten im distalen Teil der CA3 Region gefunden, gefolgt vom proximalen Teil der CA3 Region und der CA1 Region. Die relativen Expressionsintensitäten aller drei *Cornu ammonis* Regionen haben ihr Maximum bei P11 ($p < 0,0001$), was in die Zeit intensiver Synaptogenese fällt (Pokorny und Yamamoto 1981a, 1981b; Mody *et al.* 2001). Darüber hinaus findet man um den Embryonaltag E17.5 im distalen Teil der CA3 Region ein zusätzliches Expressionsmaximum, was mit einer Zeit intensiver Neurogenese zusammenfällt (Pokorny und Yamamoto 1981a, 1981b; Mody *et al.* 2001). Der *Gyrus dentatus* dagegen zeigt ein völlig anderes Expressionsmuster mit niedrigen relativen Expressionsintensitäten und ohne signifikante Änderungen des Expressionsniveaus während der Entwicklung, abgesehen von einem leichten Abfall der Expressionsintensitäten zwischen den postnatalen Tagen P1 und P11 ($p < 0,001$).

5.1.6 Expressionsunterschiede innerhalb der hippocampalen Subregionen

Aufgrund des interessanten Expressionsverlaufs im Hippokampus wurden die relativen Intensitäten in den CA Regionen und im *Gyrus dentatus* im adulten Gehirn noch einmal gesondert betrachtet und nur auf die Hippokampusformation bezogen ausgewertet, ohne die Expressionsintensitäten der restlichen Gehirnstrukturen mit einzubeziehen. Abb. 5.9 zeigt das Ergebnis der Komplex I-Expression im adulten Hippokampus. Der Vollständigkeit halber ist die gesamte Hippokampusformation einschließlich des *Subiculum*s und des *Stratum radiatum lacunosum moleculare* dargestellt. Für die meisten der 33 Untereinheiten zeigt sich folgendes Verteilungsmuster (von hoher zu niedriger Intensität): CA3 (distaler Teil) > CA3 (proximaler Teil) = CA1 > *Gyrus dentatus*. Beispiele für in der CA3 Region besonders hoch exprimierte Untereinheiten sind die Flavoproteine Ndufv1 und Ndufv2, die Eisen-Schwefel-Proteine Ndufs1-Ndufs8, sowie Ndufa1, Ndufa2, Ndufa10 und Ndufb7 aus der Gruppe der hydrophoben Proteinfraction. Parallel zur Expressionsstudie der kernkodierten Untereinheiten des Komplexes I wurde die Anzahl der zellulären mtDNA-Kopien in den entsprechenden Hippokampus Regionen über quantitative PCR-Methoden bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bereichen, so dass die gemessenen hohen Signalintensitäten, vor allem im distalen Teil der CA3 Region, ausschließlich auf eine erhöhte

mRNA-Expression zurückzuführen sind und sehr wahrscheinlich nicht auf eine Zunahme der Mitochondrienzahl oder der mitochondrialen Masse (Kann *et al.* 2011a).

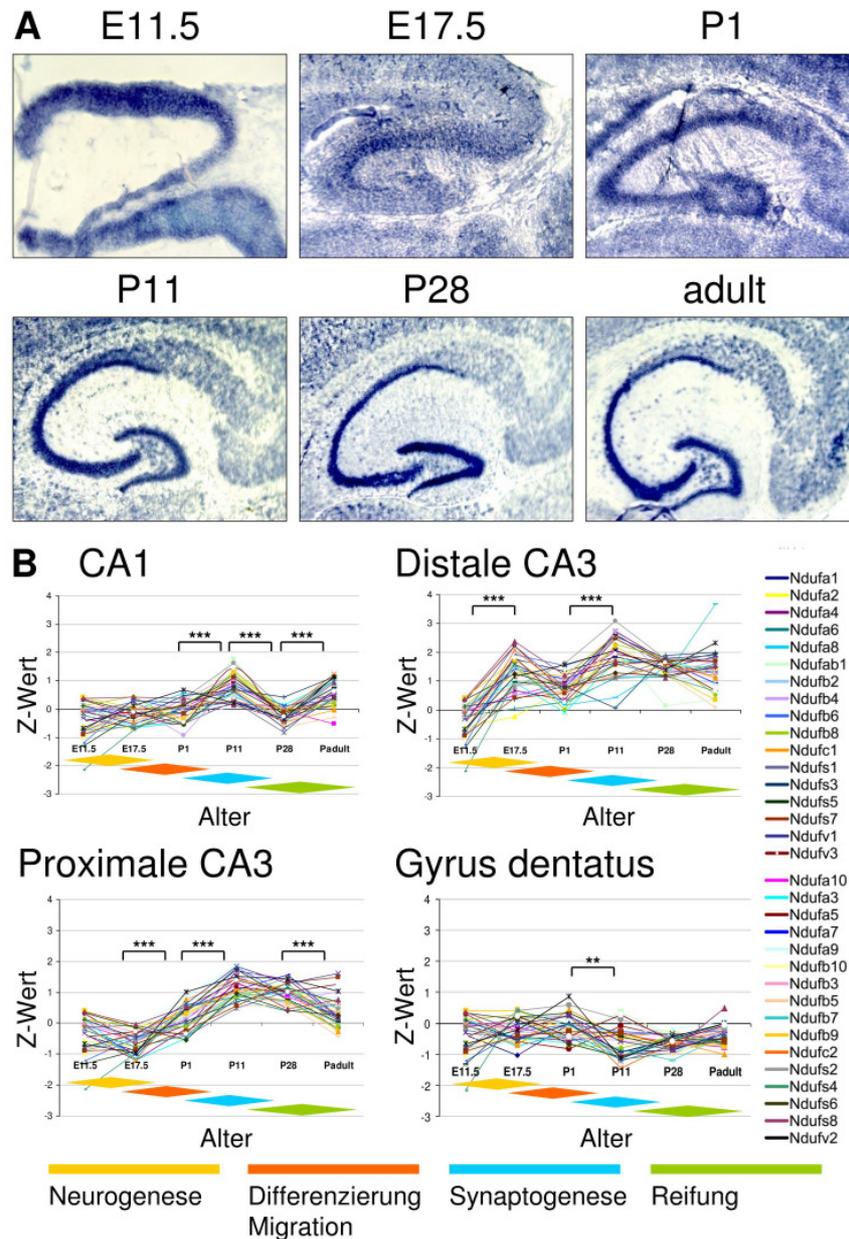


Abb. 5.8: Komplex I-Expression im murinen Hippokampus. (A) ISH-Bilder der Komplex I-Sonde *Ndufb2* im Hippokampus während der prä- und postnatalen Entwicklung. Die Bilder wurden mit einer x 10 Vergrößerung aufgenommen. Zum Zeitpunkt E11.5 haben sich die hippocampalen Substrukturen noch nicht abgegrenzt, weshalb hier die Expression für die gesamte Hippokampus Region untersucht wurde. (B) Die Z-transformierten Expressionsintensitäten wurden für jede Sonde in den vier hippocampalen Subregionen gegen das Entwicklungsalter aufgetragen. Die rautenförmigen Farbfelder veranschaulichen die regionenspezifischen Stadien der neuronalen Entwicklung. Signifikante Änderungen des Expressionsniveaus zu den einzelnen Entwicklungszeitpunkten sind durch das Signifikanzniveau p bezeichnet (***) ($p < 0,0001$; **) ($p < 0,001$) (Wirtz und Schuelke 2011).

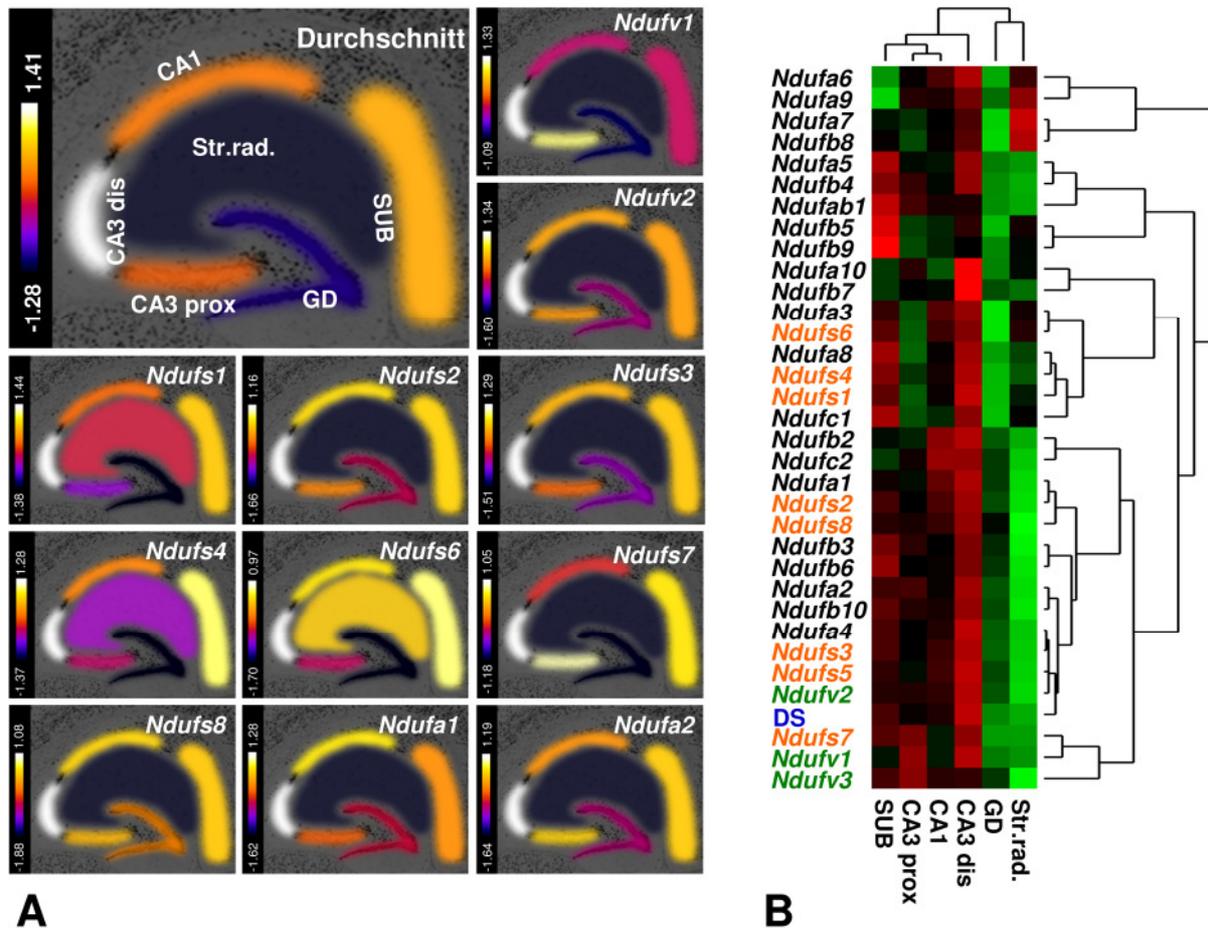


Abb. 5.9: Komplex I-Expression im adulten murinen Hippokampus. (A) ISH-Durchschnittsintensitäten, sowie Expressionsintensitäten der Komplex I-Untereinheiten, in denen beim Menschen Mutationen im Zusammenhang mit einem Komplex I-Mangel gefunden wurden. Für alle Untereinheiten sind die relativen Signalintensitäten im distalen Teil der CA3 Region am höchsten. (B) Dendrogramm der lokalen Intensitäten aller 33 Komplex I-Untereinheiten. Grün: Untereinheiten der Flavoprotein-Fraktion (FP), orange: Untereinheiten der Eisen-Schwefel-Fraktion (IP), schwarz: Untereinheiten der hydrophoben Fraktion (HP), blau: DS = Durchschnittsintensität (Kann *et al.* 2011a).

5.1.7 Komplex I-Genexpression im Kleinhirn

Im Kleinhirn wurde die Komplex I-Expression im *Stratum ganglionare* (Purkinjenzellschicht), dem *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), den *Laminae medullares* (Kleinhirnmantel) und dem *Stratum moleculare* (Molekularschicht) untersucht (Abb. 5.10). Da diese einzelnen Kleinhirnstrukturen nicht vor dem postnatalen Tag P1 unterschieden werden können, beziehe ich mich bei meiner Expressionsanalyse im pränatalen Entwicklungszeitraum auf die Kleinhirnanlage (KH) im Allgemeinen. In der Purkinjenzellschicht findet sich ein Expressionsmaximum bei P28, einer Zeit hoher Synaptogenese und Reifungsprozesse im Kleinhirn (Altman 1972a, 1972b, 1972c; Goldowitz und Hamre 1998). Interessanterweise sind dies die höchsten relativen Intensitäten, nicht nur im Kleinhirn, sondern im gesamten Gehirn, selbst

im Vergleich mit denen im distalen Teil der hippokampalen CA3 Region. Im Gegensatz dazu fallen die Expressionsintensitäten in der Körnerzellschicht und dem Kleinhirnmantel kontinuierlich ab und zwar in dem Maße, in dem sich diese Strukturen aus der undifferenzierten Kleinhirnanlage entwickeln. Die Expressionsintensitäten bleiben die niedrigsten im gesamten Gehirn. Die Molekularschicht zeigt einen größtenteils konstanten Expressionsverlauf. Aufgrund der geringen Zahl an Zellkörpern variieren die Expressionsintensitäten der einzelnen Sonden stark.

5.1.8 Komplex I-Genexpression im zerebralen Kortex

Im *Cortex granular insular* und im *Cortex temporal anterior* werden die höchsten Expressionsintensitäten in den frühen Stadien der zerebralen Entwicklung um den Embryonaltag E11.5 verzeichnet (Abb. 5.11). Hierbei handelt es sich um die höchsten Intensitäten im gesamten Gehirn überhaupt. Danach fällt die Expressionskurve ab und unterliegt bis zur adulten Phase keinen größeren Schwankungen.

5.1.9 Komplex I-Genexpression im Mesenzephalon

Die Expressionsintensitäten der Komplex I-Untereinheiten haben im Mesenzephalon ihr Maximum in der späten embryonalen und frühen postnatalen Phase. Die höchsten Intensitäten werden dabei zwischen E17.5 und P1 gefunden. Bei E17.5 sind die relativen Komplex I-mRNA-Niveaus im Mesenzephalon die höchsten im gesamten Gehirn. Kurz nach der Geburt nehmen die Signalintensitäten ab und bleiben bis zum Erwachsenenalter konstant (Abb. 5.12).

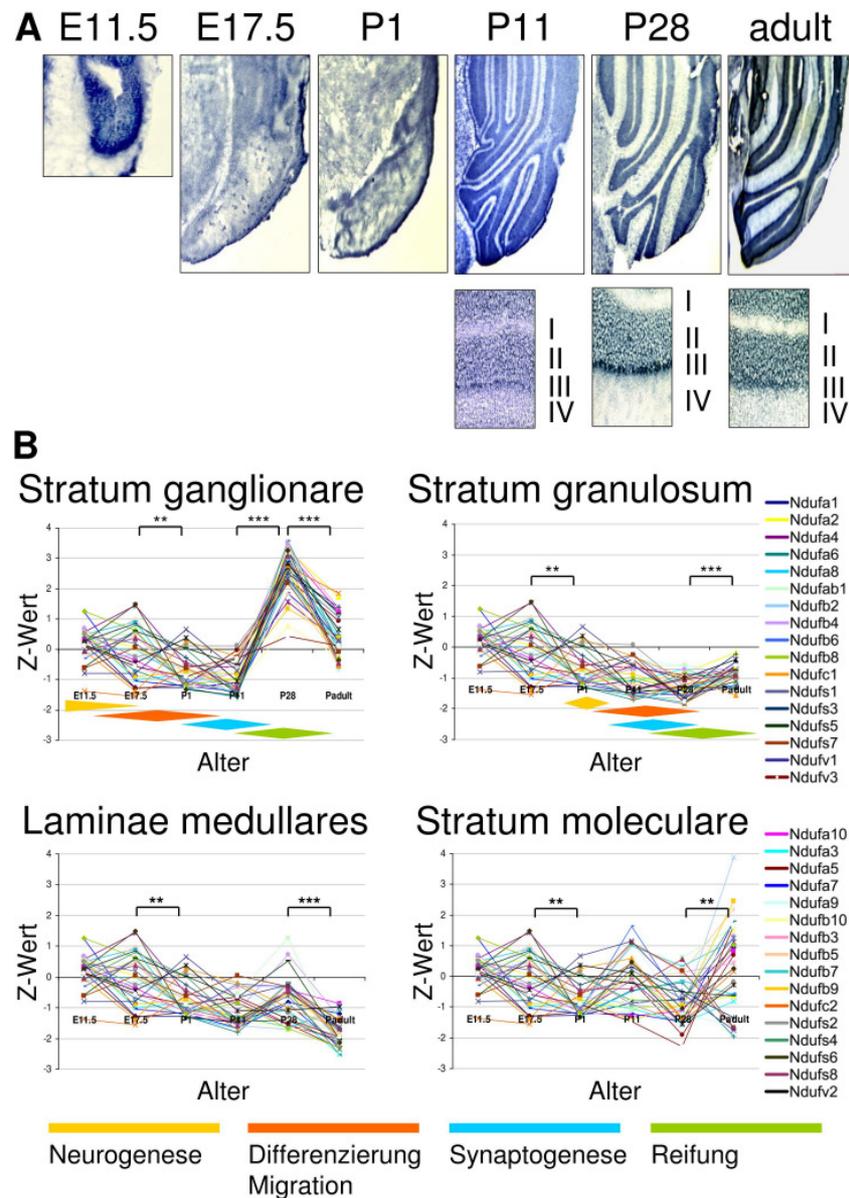


Abb. 5.10: Komplex I-Expression im murinen Kleinhirn. (A) ISH-Bilder der Komplex I-Sonde *Ndufb2* im Kleinhirn während der prä- und postnatalen Entwicklung. Die Bilder wurden mit einer x 2,5 Vergrößerung, in den detaillierten Ausschnitten mit einer x 10 Vergrößerung aufgenommen. Die römischen Zahlen bezeichnen die einzelnen Kleinhirnschichten: (I) *Laminae medullares*, (II) *Stratum granulosum* (Körnerzellen), (III) *Stratum ganglionare* (Purkinjezellen) und (IV) *Stratum moleculare*. Zwischen E17.5 und P1 wurde die Genexpression nur in der Kleinhirnanlage (KH) beobachtet, bei E11.5 im dorsalen Bereich der Rautengrube. (B) Die Z-transformierten Expressionsintensitäten wurden für jede Sonde in den vier Kleinhirnschichten, bzw. in der Kleinhirnanlage gegen das Entwicklungsalter aufgetragen. Die rautenförmigen Farbfelder veranschaulichen die regionspezifischen Stadien der neuronalen Entwicklung. Signifikante Änderungen des Expressionsniveaus zu den einzelnen Entwicklungszeitpunkten sind durch das Signifikanzniveau p bezeichnet (***) = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,001$) (Wirtz und Schuelke 2011).

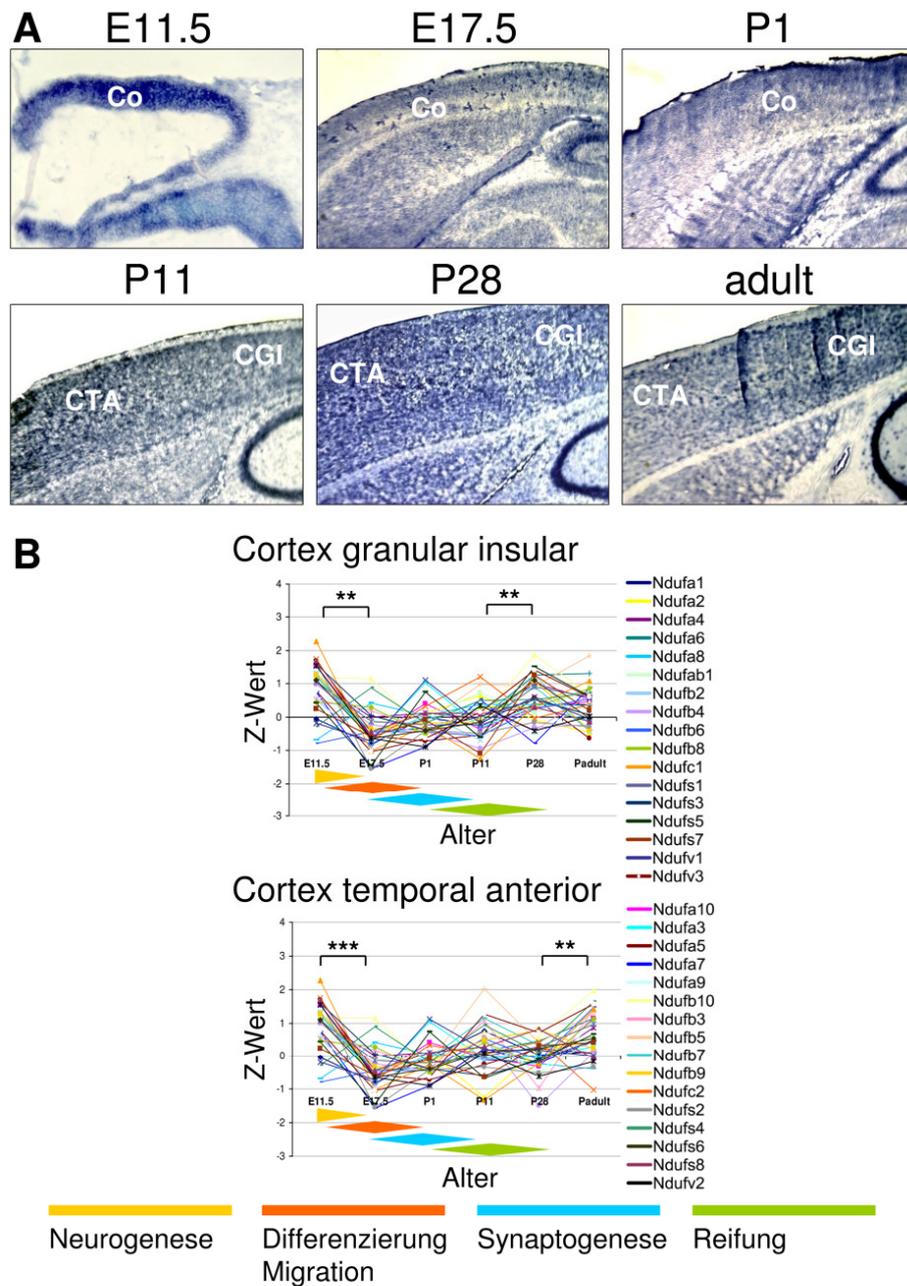


Abb. 5.11: Komplex I-Expression im murinen zerebralen Kortex. (A) ISH-Bilder der Komplex I-Sonde *Ndufb2* im zerebralen Kortex während der prä- und postnatalen Entwicklung. Die Bilder wurden mit einer x 10 Vergrößerung bei E11.5 und danach mit einer x 2,5 Vergrößerung aufgenommen. (B) Die Z-transformierten Expressionsintensitäten wurden für jede Sonde in zwei Abschnitten des zerebralen Kortex gegen das Entwicklungsalter aufgetragen. Die rautenförmigen Farbfelder veranschaulichen die regionenspezifischen Stadien der neuronalen Entwicklung. Signifikante Änderungen des Expressionsniveaus zu den einzelnen Entwicklungszeitpunkten sind durch das Signifikanzniveau p bezeichnet (** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$) (Wirtz und Schuelke 2011).

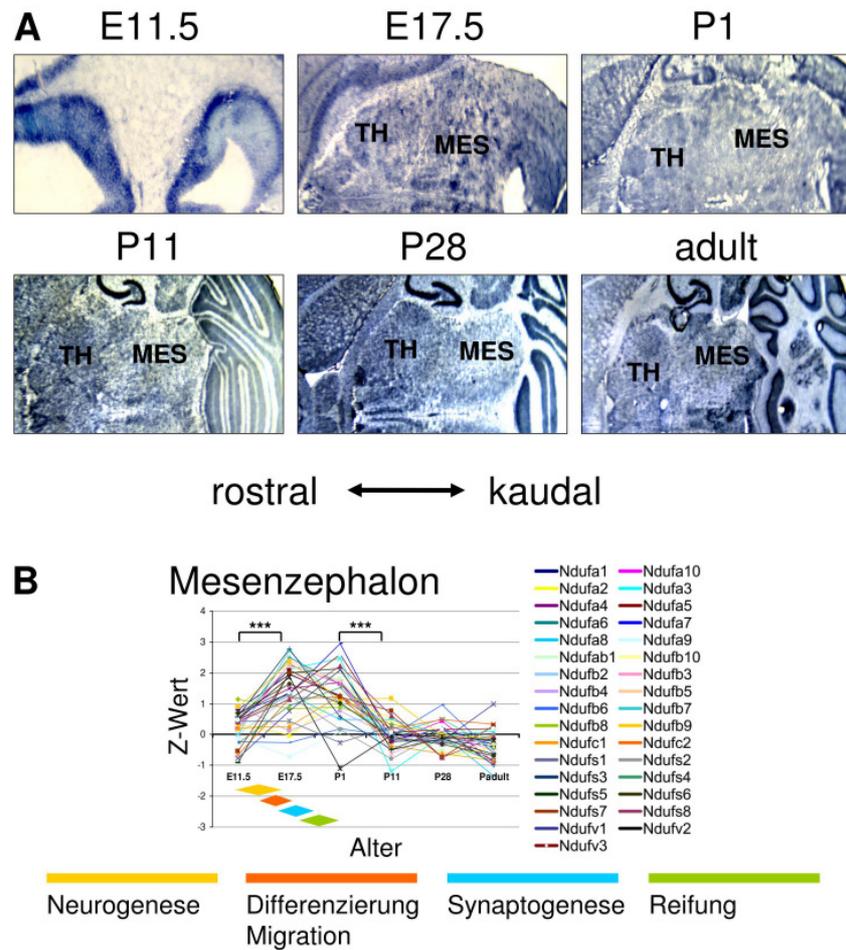


Abb. 5.12: Komplex I-Expression im murinen Mesenzephalon. (A) ISH-Bilder der Komplex I-Sonde *Ndufb2* im Mesenzephalon während der prä- und postnatalen Entwicklung. Die Bilder wurden mit einer x 10 Vergrößerung bei E11.5 und danach mit einer x 2,5 Vergrößerung aufgenommen. Bei E11.5 ist die Expression im Thalamus und in der *Pons*, den Vorläufern des Mesenzephalons, gezeigt. (B) Die Z-transformierten Expressionsintensitäten wurden für jede Sonde gegen das Entwicklungsalter aufgetragen. Die rautenförmigen Farbfelder veranschaulichen die regionenspezifischen Stadien der neuronalen Entwicklung. Signifikante Änderungen des Expressionsniveaus zu den einzelnen Entwicklungszeitpunkten sind durch das Signifikanzniveau p bezeichnet (***) ($p < 0,0001$; **) ($p < 0,001$) (Wirtz und Schuelke 2011).

5.2 Herstellung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus für einen gewebsspezifischen konditionellen *knockout*

Die einzelnen Schritte zur Herstellung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus werden nachfolgend genauer dargestellt (Abb. 5.13). Die experimentelle Vorgehensweise findet sich im Methodenteil dieser Arbeit. Abb. 5.14 zeigt die Klonierungsstrategie für einen gewebsspezifischen konditionellen *knockout* des *Ndufv1*-Gens. Die Vektorkarte des generierten *targeting vectors* findet sich im Anhang dieser Arbeit (Abb. A.1).

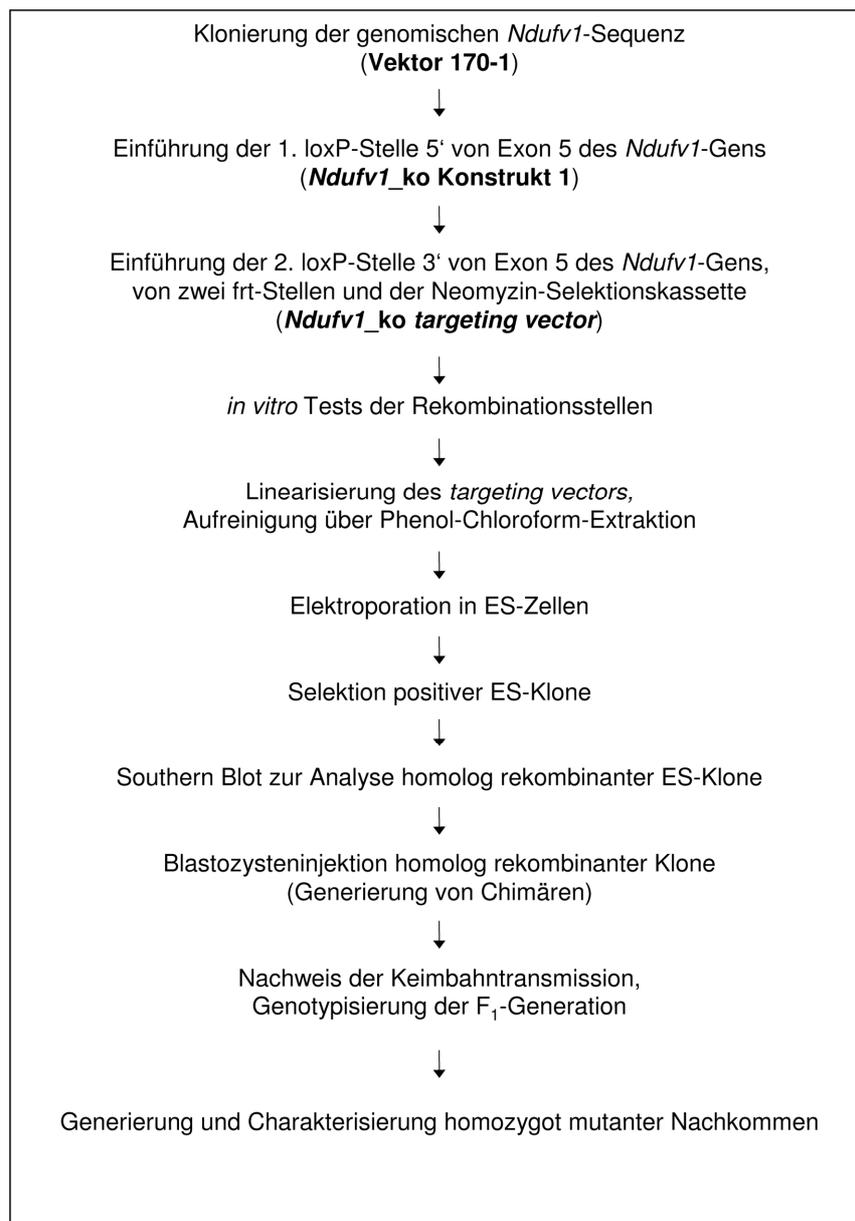


Abb. 5.13: Flussdiagramm zur Generierung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus zum Zwecke eines konditionellen gewebsspezifischen *knockouts*. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise zur Erzeugung der „geflochten“ *Ndufv1*-Maus findet sich im nachfolgenden Textabschnitt.

5.2.1 Klonierung der genomischen *Ndufv1*-DNA in einen *Bluescript* Vektor

Für die Erzeugung des Plasmids mit der genomischen Sequenz von *Ndufv1*, in die über *recombineering* die Neo-Selektionskassette und loxP-Stellen eingeführt werden sollten, wurde der entsprechende λ 51.1 Klon restringiert und in den Vektor *pCR-Script-AMP SK (+)* (Stratagene, Amsterdam-Zuidoost, Niederlande) kloniert. Da die Klonierung von sehr großen DNA-Sequenzen problematisch ist, erfolgte die Herstellung in zwei Schritten. **(1)** Zum einen wurde der λ 51.1 Klon mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und das Genfragment, welches die Exons 1-5 des *Ndufv1*-Gens umfasst (linker Arm des Konstrukts), in *pCR-Script-AMP SK (+)* subkloniert (Vektor 395, Abb. 5.15 A). **(2)** Des Weiteren wurde der λ 51.1 Klon mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RV geschnitten und das entstandene Genfragment, welches die Exons 6-10 des *Ndufv1*-Gens umfasst (rechter Arm des Konstrukts), ebenfalls in *pCR-Script-AMP SK (+)* subkloniert (Vektor 396, Abb. 5.15 B). Beide Teilvektoren standen mir zu Beginn meiner Arbeit zur Verfügung.

Für die Klonierung des Vektors, der die gesamte genomische Sequenz des *Ndufv1*-Gens enthält, wurde aus dem als Spenderplasmid fungierenden Vektor 395 das *insert* (linker Arm des Konstrukts) mit *Bam*HI ausgeschnitten und über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Der als Empfänger dienende Vektor 396 wurde mit *Bam*HI linearisiert und anschließend mit dem *insert* aus 395 ligiert, so dass ein Vektor entstand, der die gesamte genomische Sequenz von *Ndufv1* (rechter und linker Arm) enthielt (Vektor 170-1, Abb. 5.15 C).

Da die Transformationseffizienz großer Konstrukte meist sehr gering ist, musste eine große Anzahl von Kolonien untersucht werden. Die Analyse erfolgte über Kolonie-Filterhybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden, die sowohl gegen das *insert*, als auch gegen das Empfängerplasmid gerichtet waren. Nur bei Klonen, die gegenüber beiden Sonden ein Signal zeigten, ist das *insert* erfolgreich in das Empfängerplasmid inseriert worden (Abb. 5.15 D, markierte Kolonien). Da die Klonierung über die Restriktionsschnittstelle *Bam*HI ungerichtet erfolgte, wurde die richtige Orientierung des *inserts* über PCR kontrolliert (Abb. 5.15 E, Spur 2, 5-8, 12, 14, 15). Der generierte Vektor 170-1 diente als Ausgangskonstrukt für die Herstellung des *targeting vectors Ndufv1_ko*.

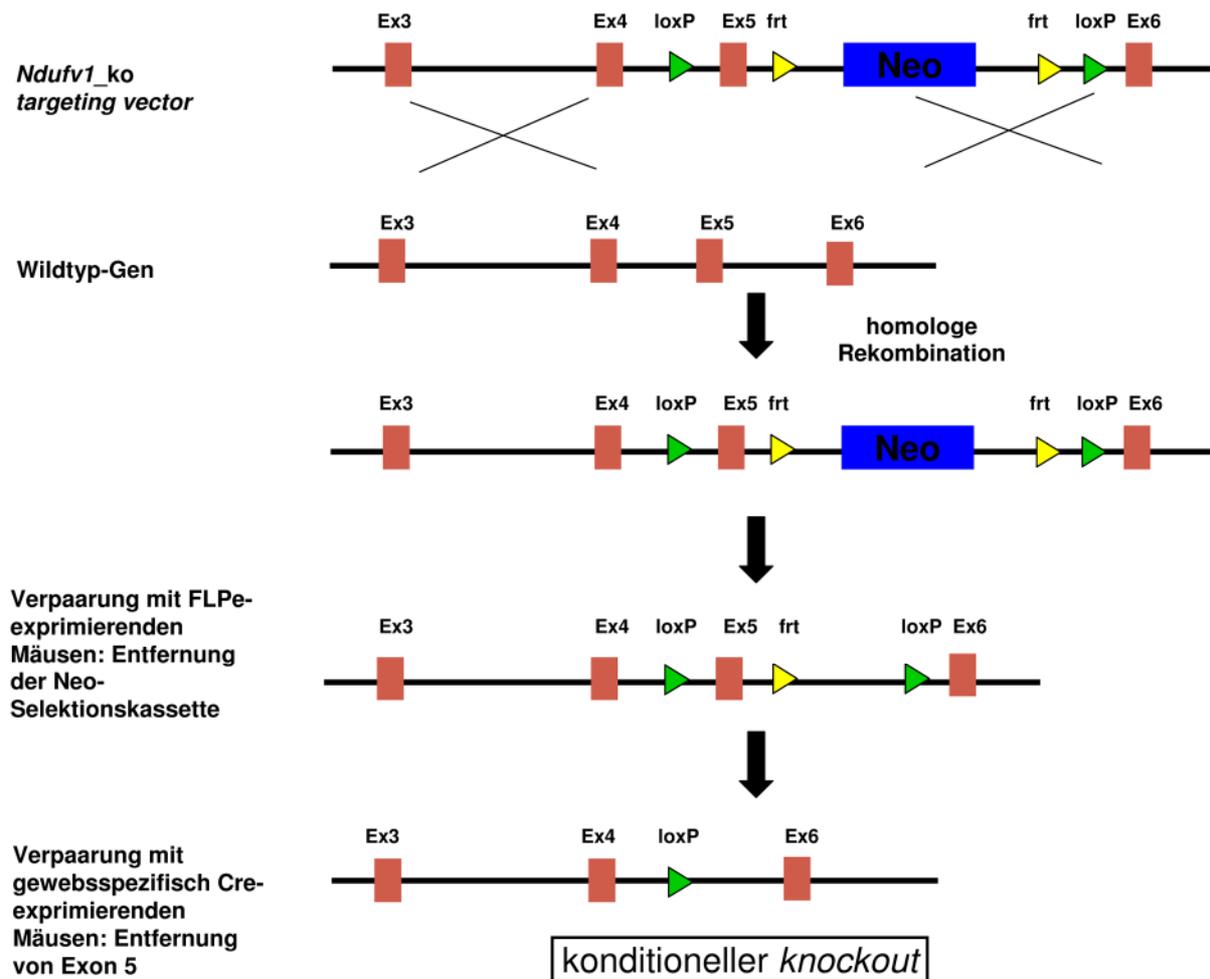


Abb. 5.14: Klonierungsstrategie zur Generierung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus zum Zwecke eines konditionellen gewebsspezifischen *knockouts*. Schematisch dargestellt sind die Struktur des *targeting vectors*, des *Ndufv1*-Wildtyp-Gens, sowie des Allels nach erfolgter homologer Rekombination mit dem *targeting vector*. Exons sind als Rechtecke dargestellt, loxP- und frt-Stellen als Dreiecke. Der Selektionsmarker Neomycin wird durch die FLPe-Rekombinase entfernt. Das Exon 5 kann dann durch Verpaarung mit den entsprechenden gewebsspezifisch Cre-exprimierenden Mäusen z.B. im ZNS entfernt werden.

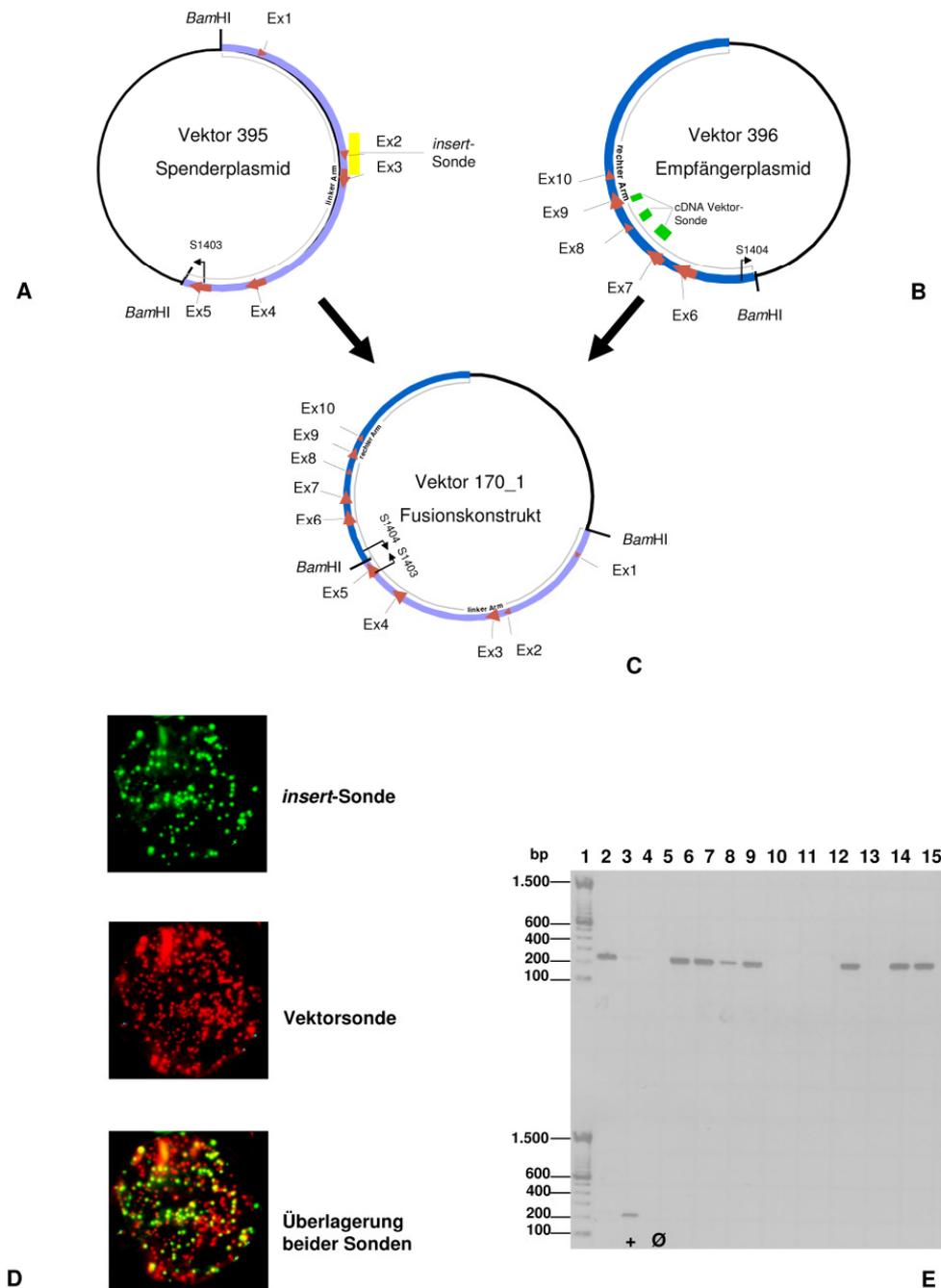


Abb. 5.15: Klonierung der genomischen *Ndufv1*-Sequenz. (A) Spenderplasmid 395. Das *insert* (linker Arm) wurde aus dem Vektor 395 über eine *Bam*HI-Schnittstelle entfernt und mit dem geschnittenen Vektor 396 ligiert. In gelb dargestellt ist die genomische DNA-Sonde für die Kolonie-Filterhybridisierung. (B) Empfängerplasmid 396 und cDNA-Sonde für die Kolonie-Filterhybridisierung (grün). (C) Vektor 170_1 mit der vollständigen genomischen *Ndufv1*-Sequenz und den Bindestellen für die Primer S1403 und S1404 zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation über PCR. (D) Filterhybridisierung. In Falschfarben sind diejenigen Kolonien dargestellt, die gegenüber der *insert*-Sonde ein positives Signal zeigen (grün), sowie die Kolonien, die gegenüber der Vektorsonde ein positives Signal zeigen (rot). Es wurden jeweils 250 ng Sonde eingesetzt. Nur diejenigen Kolonien, die gegenüber beiden Sonden ein Signal zeigen, enthalten die vollständige *Ndufv1*-Sequenz (Überlagerung, gelb). Die richtige Orientierung des *inserts* wurde mittels PCR untersucht. (E) PCR zur Überprüfung der *insert*-Orientierung. Es können nur Banden bei Klonen detektiert werden, bei denen das *insert* aus dem Vektor 395 in der richtigen Orientierung eingebracht wurde. Mit den Primern S1403 und S1404 entsteht dabei ein Produkt der Größe von 208 bp. 5 µl PCR-Produkt wurden in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: 3 µl 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2-15: 170-1 PCR-Produkte; Wildtyp-DNA als Positivkontrolle (+); Leerwert (Ø)

5.2.2 Herstellung des *Ndufv1_ko targeting* Konstrukts

Für die Generierung des *Ndufv1_ko targeting* Konstrukts wurde 5' von Exon 5 des *Ndufv1*-Gens eine einzelne loxP-Stelle in den Vektor 170-1 eingeführt. Am 3' Ende des Exons 5 wurde eine Neo-Selektionskassette, die von zwei *frt*-Stellen flankiert war, und eine zweite loxP-Stelle eingeführt. Die Selektionskassetten, sowie die Erkennungssequenzen wurden von den Plasmiden PL451 und PL452 bezogen. Die dazugehörigen Vektorkarten befinden sich im Anhang (Abb. A.1).

5.2.3 Einführung der ersten loxP-Stelle

Der erste Schritt bei der Konstruktion des *targeting vectors* bestand in der Einführung einer loxP-Stelle 5' von Exon 5. Dies erfolgte über die Insertion einer „geflochten“ Neo-Selektionskassette aus dem Plasmid PL452 über homologe Rekombination in den Vektor 170-1 und anschließender Entfernung der Neo-Kassette über Cre-Rekombinase, so dass eine einzelne loxP-Erkennungssequenz an der Zielstelle übrig blieb (Abb. 5.16).

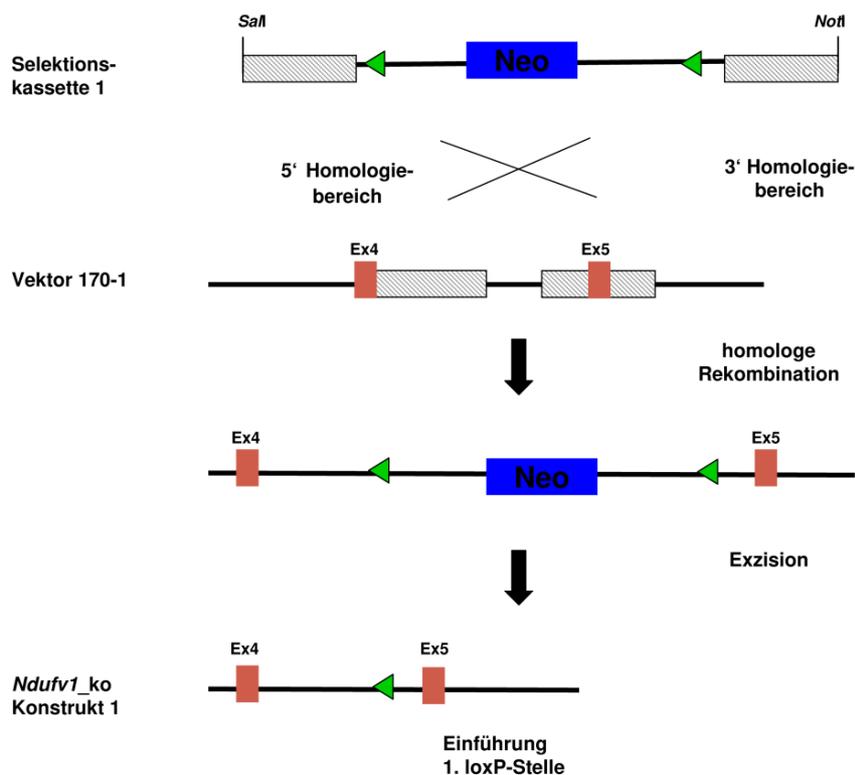


Abb. 5.16: Schematische Darstellung zur Einführung der ersten loxP-Stelle. Die loxP-Stellen sind als grüne Dreiecke dargestellt, die Homologiebereiche zur Rekombination zwischen Selektionskassette 1 und dem Vektor 170-1 als schraffierte Boxen.

Für die Generierung der Selektionskassette (Abb. 5.17) wurden ausgehend von der ES-DNA der Zelllinie E14.1 aus dem Mausstamm 129/p2OlaHsd zur *Ndufv1*-Zielsequenz homologe Arme über PCR-Amplifikation hergestellt, die eine Länge von 200-350 bp hatten. Der 5' Arm wurde mit einer *SalI*- und einer *EcoRI*-Schnittstelle versehen, der 3' Arm mit einer *BglII*- und einer *NotI*-Schnittstelle. Über Restriktion und anschließende Ligation wurden die homologen Arme in den Vektor PL452 derart eingeführt, dass sie die Neo-Selektionskassette mit den loxP-Stellen flankierten (Mini *targeting vector* 1). Die Selektionskassette wurde mit *SalI* und *NotI* aus dem Vektor PL452 ausgeschnitten, über Gelextraktion aufgereinigt und mit dem Vektor 170-1 in zehnfachem Überschuss in elektrokompente *E. coli* SW106 Zellen ko-elektroporiert, die zuvor durch 15-minütiges Wachstum bei 42°C für die Rekombination induziert wurden (Abb. 5.16).

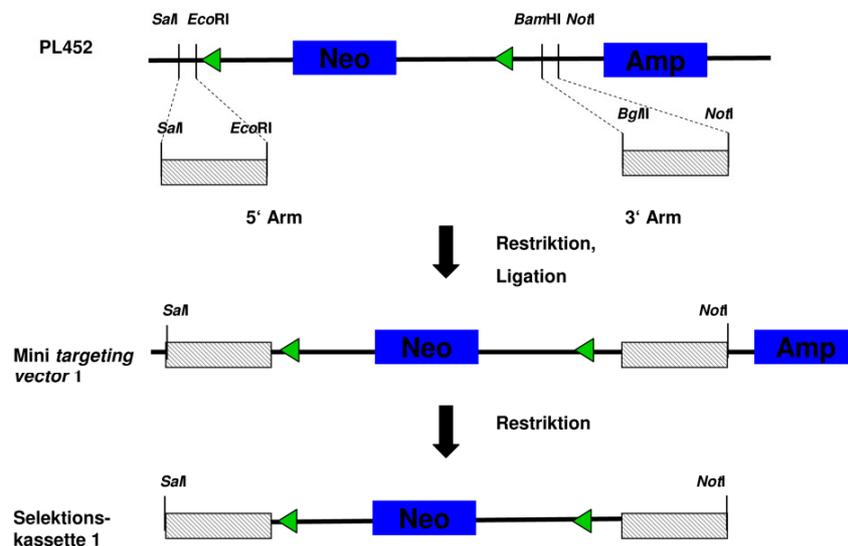


Abb. 5.17: Herstellung der Selektionskassette 1. Erläuterungen siehe Text. Die loxP-Stellen sind als grüne Dreiecke dargestellt, die zum Zielgen *Ndufv1* homologen Arme als schraffierte Boxen.

Die Selektion der Klone, welche die Neo-Selektionskassette über homologe Rekombination aufgenommen hatten, erfolgte über Kanamycin-Resistenz. Positive Klone wurden über PCR und nachfolgende Sequenzierung bestätigt und aus Gründen der Stabilität in *E. coli* JM109 Zellen umtransformiert. Zur Exzision der Neo-Kassette wurde die DNA in elektrokompente *E. coli* SW106 Zellen transformiert, bei denen zuvor die Cre-Expression durch Wachstum in Arabinose-haltigem Medium induziert worden war. Das resultierende Konstrukt enthielt die erste loxP-Sequenz an der gewünschten Stelle (*Ndufv1*_ko Konstrukt 1, Abb. 5.16).

5.2.4 Einführung der zweiten loxP-Stelle und der Neo-Selektionskassette

Die Einführung der zweiten loxP-Stelle 3' von Exon 5 in das *Ndufv1_ko* Konstrukt 1 erfolgte über homologe Rekombination einer weiteren Neo-Selektionskassette aus dem Plasmid PL451, die zusätzlich von zwei *frt*-Stellen flankiert war und eine weitere loxP-Stelle aufwies. (Abb. 5.18).

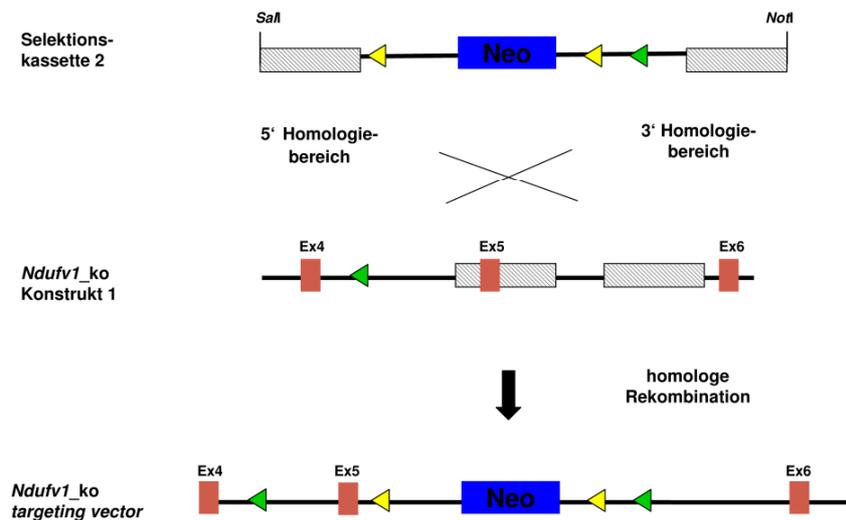


Abb. 5.18: Schematische Darstellung zur Einführung der zweiten loxP-Stelle. Die loxP-Stellen sind als grüne Dreiecke dargestellt, die *frt*-Stellen als gelbe Dreiecke und die Homologiebereiche zur Rekombination zwischen Selektionskassette 2 und dem *Ndufv1_ko* Konstrukt als schraffierte Boxen.

Analog zur Einführung der ersten loxP-Stelle wurde ein zweiter Mini *targeting vector* generiert, der homologe Arme zur *Ndufv1*-Zielsequenz aufwies. Die Herstellung der Arme erfolgte über PCR-Amplifikation, wobei der 5' Arm mit einer *SalI*- und einer *HindIII*-Schnittstelle versehen wurde, der 3' Arm mit einer *BglII*- und einer *NotI*-Schnittstelle. Die Arme wurden in den Vektor PL451 ligiert, die Kassette mit *SalI* und *NotI* ausgeschnitten und über Gelextraktion aufgereinigt (Abb. 5.19). Die Einführung der Kassette in das *Ndufv1_ko* Konstrukt 1 erfolgte über Koelektroporation in hitzeinduzierte *E. coli* SW106 Zellen und Selektion über Kanamycin. Im resultierenden *Ndufv1_ko targeting vector* ist somit das Exon 5 „gefloxt“ und enthält eine Neo-Selektionskassette, die von zwei *frt*-Stellen flankiert ist. Dieser Vektor wurde für die Elektroporation in ES-Zellen eingesetzt.

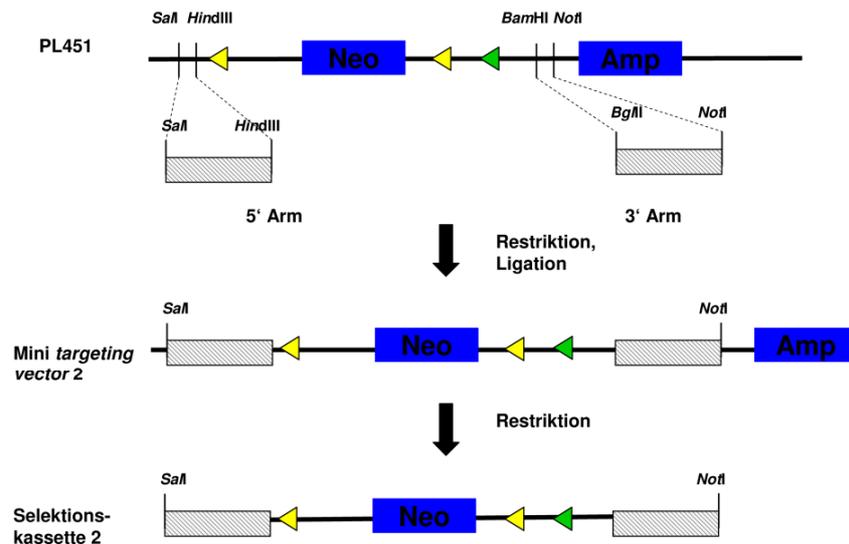


Abb. 5.19: Herstellung der Selektionskassette 2. Erläuterungen siehe Text. Die loxP-Stellen sind als grüne Dreiecke dargestellt, die frt-Stellen als gelbe Dreiecke und die homologen Arme als schraffierte Boxen.

5.2.5 Funktionelle Tests des *Ndufv1_ko targeting* Konstrukts *in vitro*

Die Flankierung der Neo-Kassette mit frt-Stellen erlaubt nach Selektion mit Kanamycin die Entfernung der Kassette über die FLPe-Rekombinase, ohne dass die loxP-Stellen zerstört werden. Hierbei verbleiben beide loxP-Stellen und eine frt-Stelle im Genom (funktioneller Test 1, Abb. 5.20). Die nachfolgende Exzision durch die Cre-Rekombinase entfernt das komplette Exon 5 zwischen den loxP-Stellen, so dass nur eine einzige loxP-Stelle im Genom verbleibt (funktioneller Test 2, Abb. 5.20). Da die Exzision sowohl durch die FLPe- als auch durch die Cre-Rekombinase erst nach Rekombination in den Keimzellen, bzw. nur in bestimmten somatischen Zellen der Maus stattfindet, ist es notwendig, die Erkennungssequenzen vorher *in vitro* zu testen. Zum Test auf die Funktionalität der frt-Stellen wurde der *Ndufv1_ko targeting vector* in *E. coli* SW105 Zellen elektroporiert, bei denen zuvor die FLPe-Expression durch Wachstum in Arabinose-haltigem Medium induziert wurde. Zur Analyse wurden die Klone über PCR auf die richtige Größe hin überprüft. Die Funktionalität der loxP-Stellen wurde durch Elektroporation in *E. coli* SW106 Zellen überprüft, bei denen die Cre-Expression durch Wachstum in Arabinose-haltigem Medium induziert wurde. Die Analyse erfolgte ebenfalls über PCR. Nach Bestätigung der Funktionalität der Erkennungssequenzen wurde der *Ndufv1_ko targeting vector* kontrollsequenziert, für die Elektroporation in ES-Zellen mit *NotI* linearisiert und über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

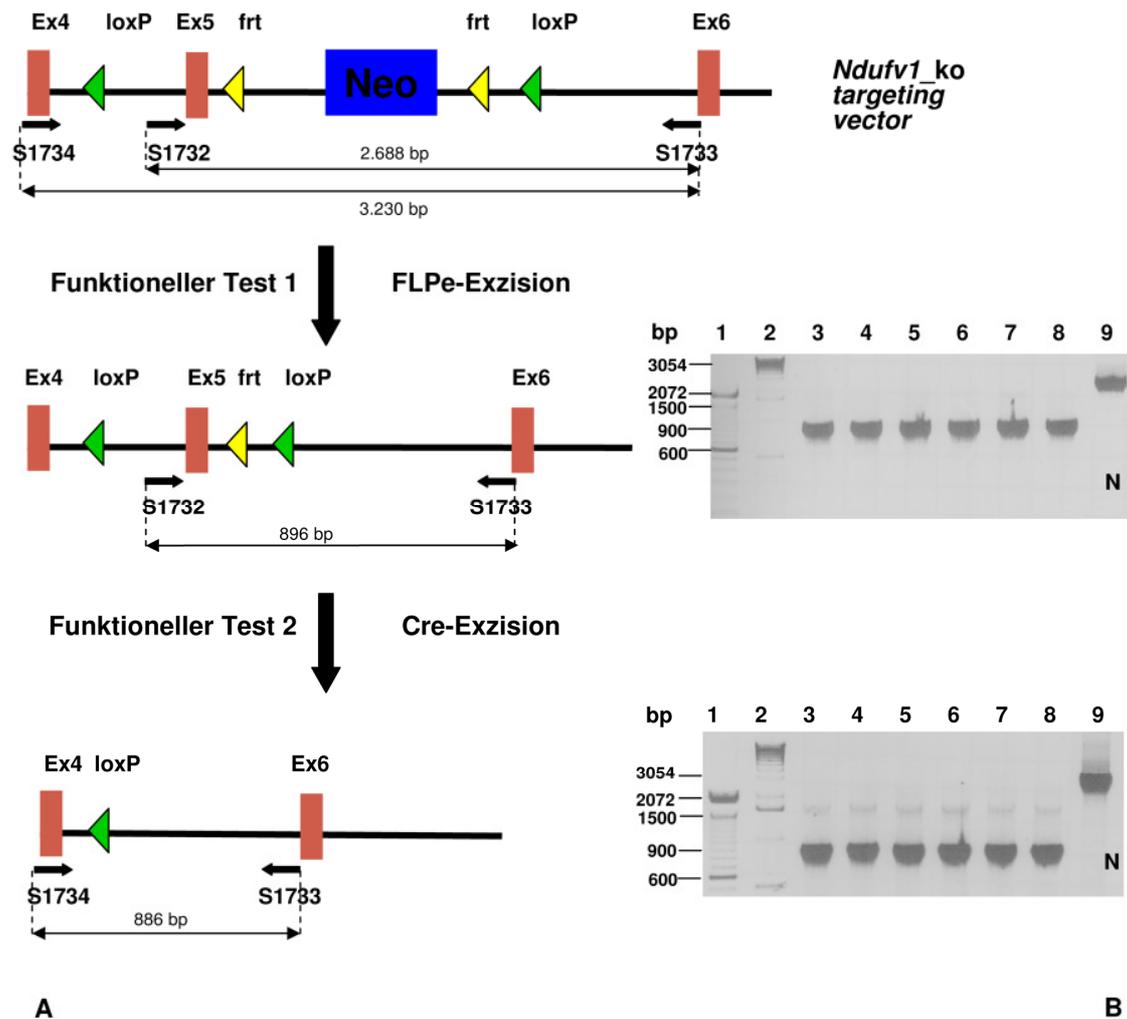


Abb. 5.20: Funktionelle Tests zur *in vitro* Überprüfung der Funktionalität von *frt*- und *loxP*-Stellen. (A) Schematische Übersicht. Dargestellt sind die Plasmide nach erfolgter Exzision der Neo-Selektionskassette über FLPe-Rekombinase, wodurch zwei *loxP*-Stellen und eine *frt*-Stelle im Plasmid verbleiben (funktioneller Test 1). Nach darauffolgender Exzision von Exon 5 über Cre-Rekombinase verbleibt eine singuläre *loxP*-Stelle im Plasmid (funktioneller Test 2). (B) PCR zur Überprüfung der Funktionalität von *frt*- und *loxP*-Stellen. **Funktioneller Test 1** (Überprüfung der *frt*-Stellen): Die PCR auf die *Ndufv1_ko targeting vector*-DNA mit den Primern S1732 und S1733 ergibt bei erfolgreicher Exzision der Neo-Kassette eine Bande in Höhe von 896 bp. Verbleibt die Neo-Kassette im Vektor, findet sich eine Bande von 2.688 bp. Spur 1: 3 μ l 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2: 3 μ l 1 kb-DNA-Leiter; Spur 3-8: 5 μ l *Ndufv1_ko targeting vector*-DNA nach FLPe-Exzision; Spur 9: 5 μ l *Ndufv1_ko targeting vector*-DNA als Negativkontrolle (N). **Funktioneller Test 2** (Überprüfung der *loxP*-Stellen): Die PCR auf die *Ndufv1_ko targeting vector*-DNA mit den Primern S1733 und S1734 ergibt bei erfolgreicher Exzision von Exon 5 eine Bande in Höhe von 886 bp. Verbleibt Exon 5 im Vektor, findet sich eine Bande von 3.230 bp. Spur 1: 3 μ l 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2: 3 μ l 1 kb-DNA-Leiter; Spur 3-8: 5 μ l *Ndufv1_ko targeting vector*-DNA nach Cre-Exzision; Spur 9: 5 μ l *Ndufv1_ko targeting vector* DNA als Negativkontrolle (N).

5.2.6 Elektroporation embryonaler Stammzellen und Selektion homolog rekombinanter Klone

Die Einführung des *targeting vectors* in ES-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dabei wurde für einige Millisekunden ein starker Strom durch die DNA-haltige Zellsuspension geleitet, so dass sich die Oberfläche der Zellmembran veränderte und kleine reversible Poren entstanden. Durch diese konnte der linearisierte Vektor in die Zellen eindringen.

Als embryonale Stammzellen wurde die ES-Zelllinie E14.1 verwendet, die aus der Mauslinie 129/p2OlaHsd isoliert wurde (präpariert von Ralf Kühn, AG Carmen Birchmeier, MDC-Berlin). Die positive Selektion rekombinanter Klone erfolgte durch Zellwachstum in G418-haltigem Medium, in dem alle Zellen abstarben, denen eine durch die Selektionskassette eingeführte Neomycin-Resistenz fehlte.

500 Klone wurden isoliert, in 96-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert und die DNA über die Methode des Southern Blots auf eine erfolgreiche homologe Rekombination an der gewünschten Stelle hin untersucht.

5.2.7 Southern Blot Analyse homolog rekombinanter ES-Klone

Für die Southern Blot Analyse wurden mittels PCR jeweils eine Sonde für das 5' und das 3' Ende des homolog rekombinanten Konstrukts generiert (Abb. 5.21). Beide Sonden lagen außerhalb des Konstrukts, nutzten aber interne Schnittstellen für die Analyse. Für die 5' Sonde (Abb. 5.21 A) wurde eine *EcoRV*-Schnittstelle genutzt, die im Falle einer homologen Rekombination ein 9.923 bp großes Fragment ergibt, für den Wildtyp ein 7.915 bp großes Fragment. Für die 3' Sonde (Abb. 5.21 B) wurde eine *BamHI*-Schnittstelle genutzt, die im Falle einer homologen Rekombination ein 6.937 bp großes Fragment ergibt, für den Wildtyp ein 5.027 bp großes Fragment.

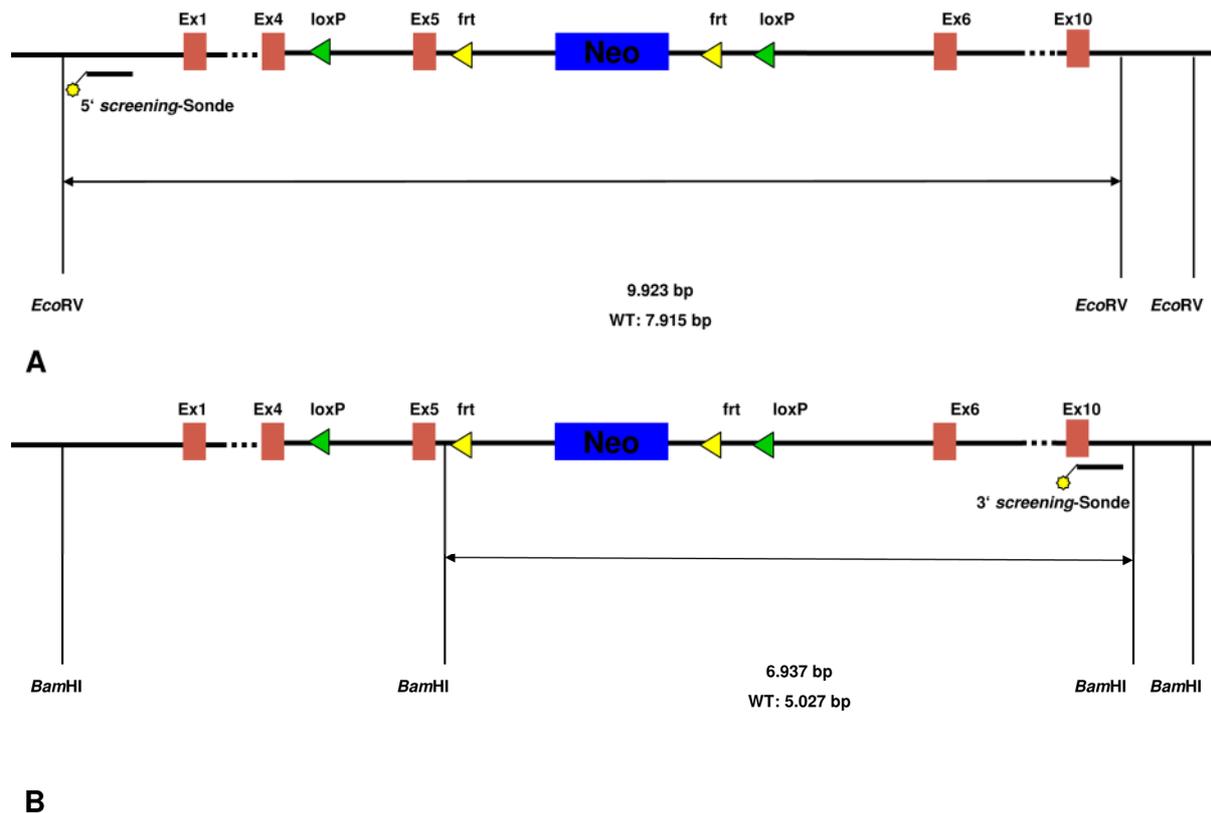


Abb. 5.21: Schematische Darstellung zum Nachweis der homologen Rekombination mittels *screening*-Sonden. (A) Die 5' *screening*-Sonde bindet 5' von Exon 1 und erkennt ein *EcoRV*-Fragment, was bei erfolgreicher homologer Rekombination eine Größe von 9.923 bp aufweist. (B) Die 3' *screening*-Sonde bindet 3' von Exon 10 und erkennt ein *BamHI*-Fragment, was bei erfolgreicher homologer Rekombination eine Größe von 6.937 bp aufweist.

Alle 500 geernteten ES-Klone wurden auf homologe Rekombination an der gewünschten Stelle hin zuerst mit der 3' Sonde untersucht. 10 µg ES-DNA wurde im 30 µl-Reaktionsansatz mit dem Enzym *BamHI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit der [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten 3' Sonde. Da die homologe Rekombination nur auf einem Allel erfolgt, zeigt sich im Southern Blot neben der Bande für das veränderte Allel (6.937 bp) auch eine Bande für den Wildtyp (5.027 bp). Drei Klone (S2, S6, S12) zeigten das gewünschte Bandenmuster (Abb. 5.22 A, Spur 3, 6, 8). Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden die Klone im Southern Blot zusätzlich mit der 5' Sonde untersucht. Dazu wurde die genomische DNA in einem analogen Reaktionsansatz mit dem Enzym *EcoRV* verdaut und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierten 5' Sonde hybridisiert. Neben der Wildtyp-Bande von 7.915 bp sollten positive Klone zusätzlich eine Bande von 9.923 bp für das veränderte Allel zeigen. Insgesamt konnten die drei Klone S2, S6, S12 bestätigt werden, die das gewünschte Bandenmuster zeigten (Abb. 5.22 B, Spur 3, 6, 8).

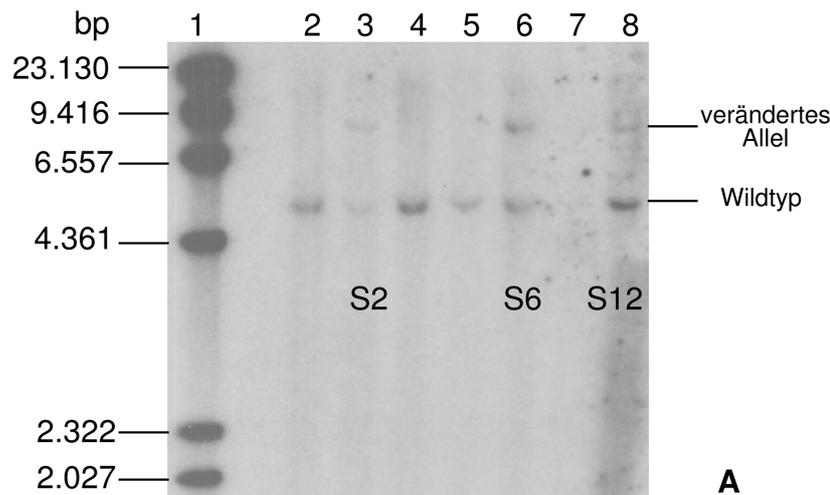
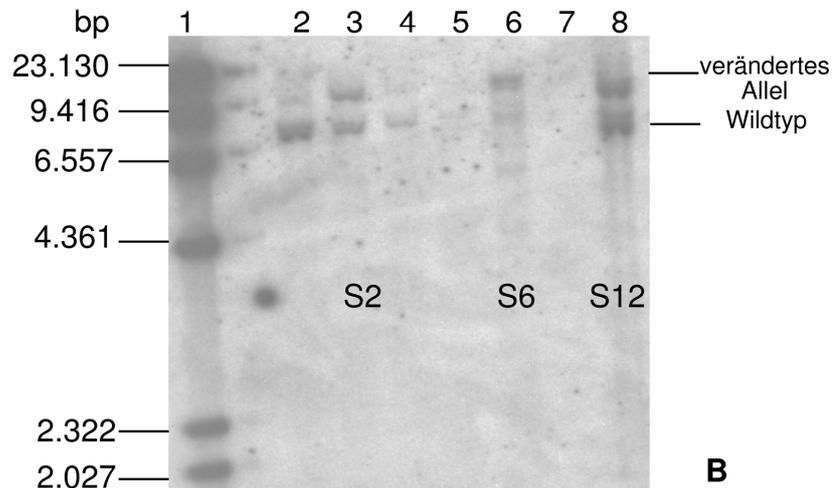
3' Sonde**5' Sonde**

Abb. 5.22: Nachweis der homologen Rekombination mittels Southern Blot. 10 µg restriktionsverdaute genomische ES-DNA wurde über ein 0,8%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. **(A)** Detektion der spezifischen Fragmente über die [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierte 3' *screening*-Sonde. Bei erfolgreicher homologer Rekombination tritt neben der Wildtyp-Bande (5.027 bp) eine Bande für das genetisch veränderte Allel in Höhe von 6.937 bp auf. Spur 1: 5 µl $\lambda\text{HindIII}$ -Marker; Spur 3, 6, 8: ES-Klone, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat (Klone S2, S6 und S12); Spur 2, 4, 5, 7: Wildtyp-ES-Klone. **(B)** Detektion der Fragmente über die [$\alpha^{32}\text{P}$]-markierte 5' *screening*-Sonde. Bei erfolgreicher homologer Rekombination tritt neben der Wildtyp-Bande (7.915 bp) eine Bande für das genetisch veränderte Allel in Höhe von 9.923 bp auf. Spur 1: 5 µl $\lambda\text{HindIII}$ -Marker; Spur 3, 6, 8: ES-Klone, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat (Klone S2, S6 und S12); Spur 2, 4, 5, 7: Wildtyp-ES-Klone.

5.2.8 Generierung chimärer Mäuse durch Blastozysteninjektion homolog rekombinanter ES-Klone

Die homolog rekombinanten Klone S2, S6 und S12 aus der embryonalen Stammzelllinie E14.1 wurden in Blastozysten der Mauslinie C57BL/6J injiziert. Pro Blastozyste wurden

zwölf ES-Zellen injiziert. 12-14 Blastozysten wurden jeweils in ein Ammentier transferiert. Pro Klon wurden zwei bis drei Transfers durchgeführt. Es wurden elf Chimären geboren, deren Organismus zum Teil aus 129/p2OlaHsd-Stammzellen (agouti Fellfarbe), zum Teil aus C57BL/6J-Stammzellen (schwarze Fellfarbe) hervorgegangen ist. Aus den Klonen S2 und S6 gingen jeweils drei Chimären hervor, aus dem Klon S12 fünf Tiere. Die Fellfarbenschimären (Abb. 5.23) wurden mit C57BL/6J-Mäusen zwecks Keimbahntransmission weiterverpaart.



Abb. 5.23: Fellfarbenschimäre. Dargestellt ist eine chimäre Maus im Alter von sechs Wochen. Die Chimären wurden mit C57BL/6-Mäusen verpaart, um eine Keimbahntransmission zu erreichen.

5.2.9 Nachweis der Keimbahntransmission: Genotypisierung der F₁-Generation

Die homolog rekombinanten ES-Zellen, die zur Erzeugung der chimären Mäuse geführt haben, können in deren Keimbahn übergehen. Die in die ES-Zellen eingebrachte Mutation kann so an die Nachkommen weitergegeben werden. Zur Analyse der Keimbahntransmission wurden sechs Wochen alte Chimären mit C57BL/6J-Mäusen verpaart. Anhand der Fellfarbe der Nachkommen kann auf eine Keimbahneteiligung der injizierten ES-Zellen geschlossen werden. Wenn sich die genetischen Hintergründe der Mausstämme 129/p2OlaHsd und C57BL/6J in den Nachkommen vereint haben, entstehen Jungtiere mit brauner Fellfarbe. Hat keine Keimbahntransmission stattgefunden, haben die Nachkommen eine schwarze Fellfarbe. Die braunen Jungtiere sollten im Verhältnis 1:1 entweder Wildtyp oder für die *targeting* Neo-Selektionskassette heterozygote Tiere sein. Zur Überprüfung einer Keimbahntransmission wurden die Jungtiere mittels Schwanzspitzenbiopsie und PCR genotypisiert. Heterozygote

Nachkommen sollten in der PCR neben der Wildtyp-Bande von 478 bp eine Bande in Höhe von 1.388 bp für das *targeting* Allel aufweisen (Abb.5.24). Eine Keimbahntransmission fand nur bei Tieren statt, die aus dem ES-Klon S12 hervorgegangen sind.

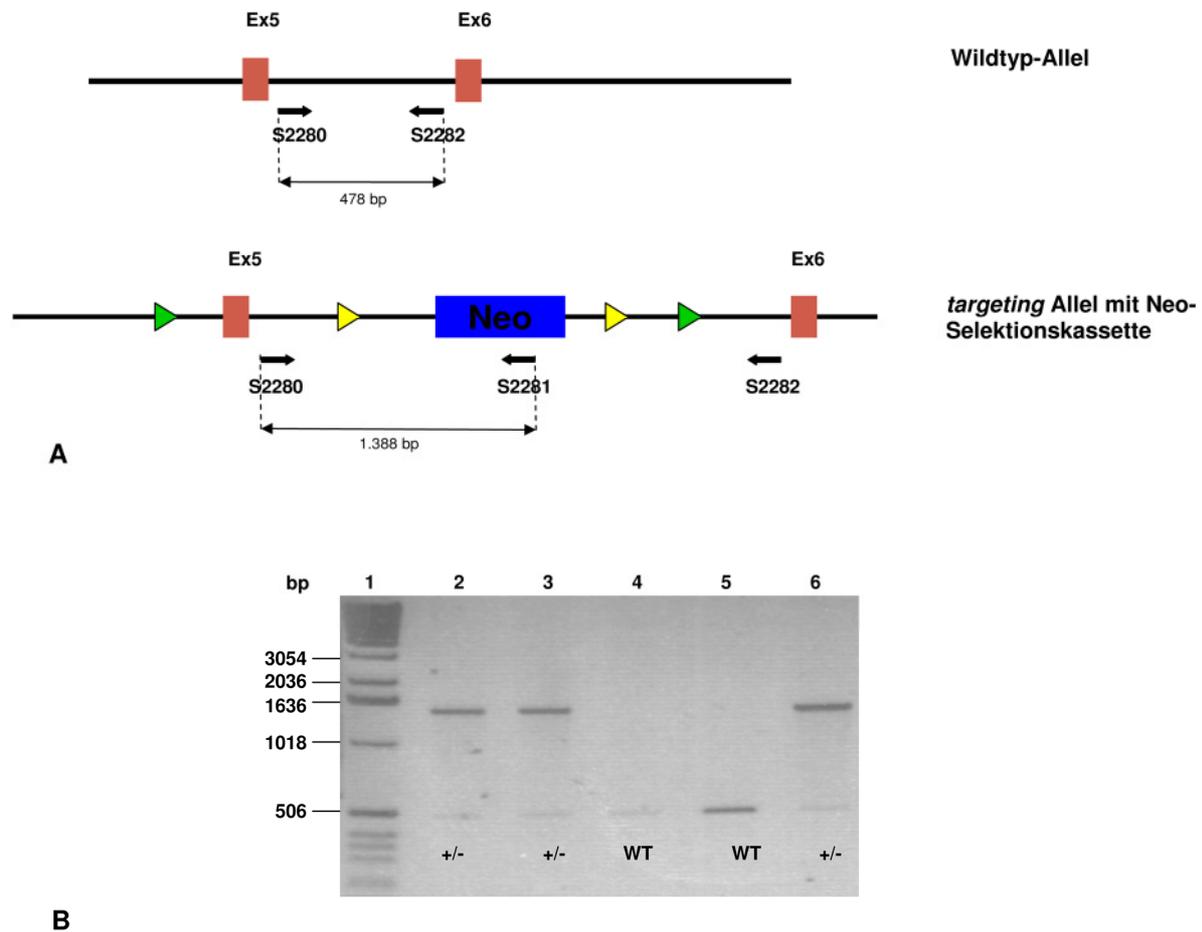


Abb. 5.24: Genotypisierung der F₁-Generation auf erfolgte Keimbahntransmission. (A) 3-Primer-PCR mit den Primern S2280, S2281, S2282. Primer S2280 und S2282 befinden sich außerhalb der Selektionskassette, Primer S2281 bindet im Neo-Resistenzgen. Bei Wildtyp-Tieren wird ein Fragment von 478 bp generiert, bei heterozygoten F₁-Tieren findet sich zusätzlich zur Bande des Wildtyp-Fragments eine Bande bei 1.388 bp. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente in einem 1%igem Agarosegel. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt. Spur 1: 3 µl 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2, 3: heterozygoter Genotyp (+/-); Spur 4: Wildtyp (WT); Spur 5: Wildtyp-Kontrolle (WT); Spur 6: ES-DNA als Positivkontrolle (+/-).

5.2.10 Entfernung der Neo-Selektionskassette: Genotypisierung der F₂-Generation

Tiere, bei denen das *targeting* Konstrukt in die Keimbahn eingebracht worden war, wurden mit *FLPe-deleter*-Mäusen verpaart. Diese exprimieren ubiquitär die *FLPe*-Rekombinase, die in den Nachkommen ab dem Entwicklungszeitpunkt E10.5 die Gensequenzen zwischen zwei *frt*-Stellen entfernt (Rodriguez *et al.* 2000). In den für den *Ndufv1-knockout* relevanten Nachkommen wurde die Neo-Selektionskassette auf diese Weise entfernt und vererbte nicht weiter

im Genom. Zur Überprüfung wurden die Jungtiere mittels Schwanzspitzenbiopsie und PCR genotypisiert. Tiere, bei denen die Selektionskassette entfernt wurde, zeigten neben dem Wildtyp-Allel (478 bp), eine Bande in Höhe von 594 bp. Dies entspricht dem Allel, bei welchem die Neo-Kassette zusammen mit einer *frt*-Stelle entfernt wurde. Zusätzlich lieferte die PCR eine dritte Bande in Höhe von 1.388 bp, welche dem vollständigen *targeting* Konstrukt (Neo-Selektionskassette mit zwei *frt*- und zwei *loxP*-Stellen) entspricht (Abb. 5.25). Diese Mosaikstruktur lässt sich dadurch erklären, dass die Expression der FLPe-Rekombinase erst um den Embryonaltag E6-E10 angeschaltet wird und deshalb nicht in allen Körperzellen die Neo-Selektionskassette entfernt wurde. Das Exon 5 kann dann nachfolgend durch Verpaarung mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase gewebsspezifisch exprimieren, entfernt werden.

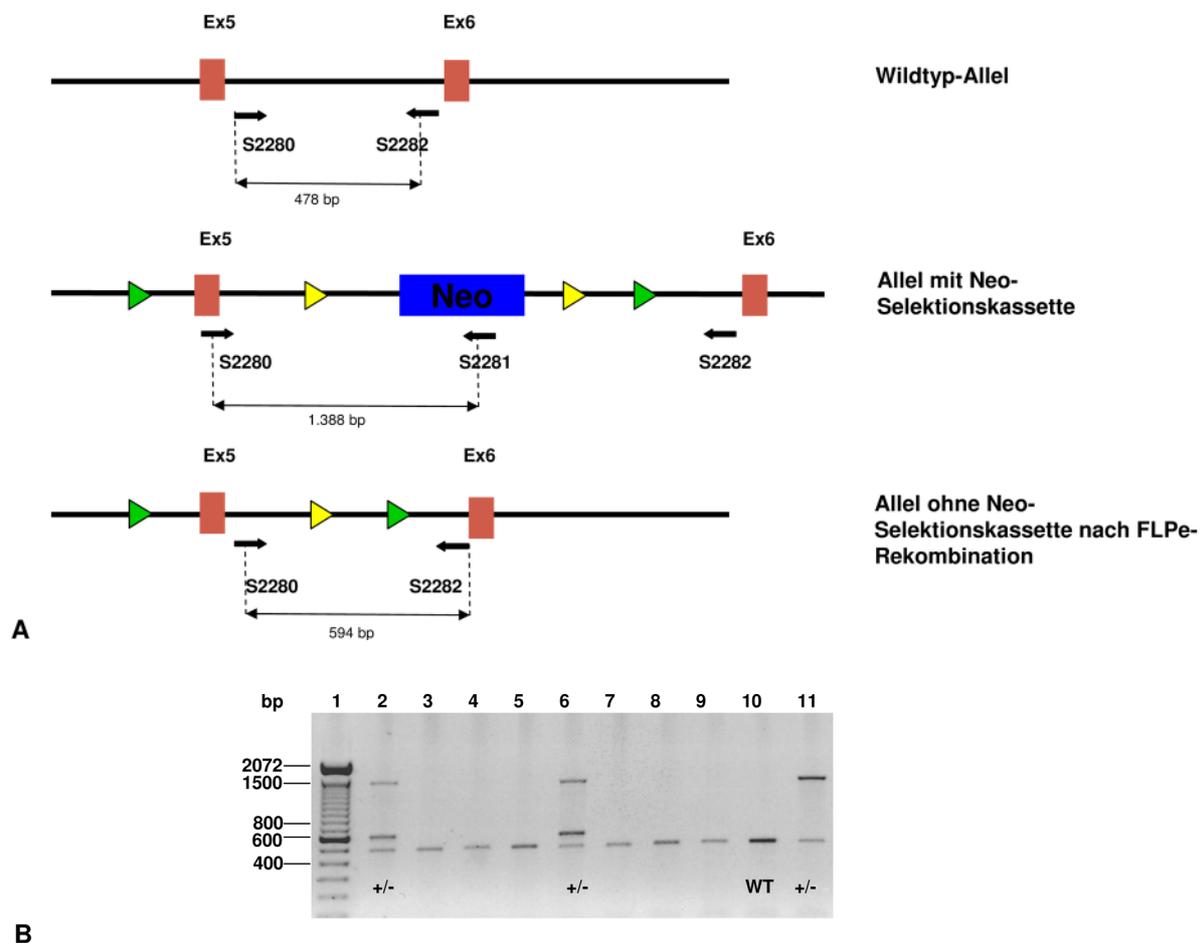


Abb. 5.25: Genotypisierung der F₂-Generation nach erfolgter Entfernung der Neo-Selektionskassette. (A) 3-Primer-PCR mit den Primern S2280, S2281, S2282. Primer S2280 und S2282 befinden sich außerhalb der Selektionskassette, Primer S2281 bindet im Neo-Resistenzgen. Bei Wildtyp-Tieren wird ein Fragment von 478 bp generiert, bei heterozygoten F₂-Tieren, bei denen die Neo-Selektionskassette mitsamt einer *frt*-Stelle entfernt wurde, entsteht eine Bande bei 594 bp. Die Bande bei 1.388 bp repräsentiert das komplette *targeting* Konstrukt. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente in einem 1%igem Agarosegel. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt. Spur 1: 3 µl 100 bp-DNA-Leiter; Spur 2, 6: heterozygoter F₂-Genotyp (+/-); Spur 3-5, 7-9: Wildtyp; Spur 10: Wildtyp-Kontrolle (WT); Spur 11: Positivkontrolle für das gesamte *targeting* Konstrukt (+/-).

6 Diskussion

6.1 Untersuchung der Expression nukleärer Komplex I-Gene in unterschiedlichen Hirnregionen der Maus

In meiner Promotionsarbeit habe ich die entwicklungspezifische Expression der 33 kernkodierten Untereinheiten des mitochondrialen Komplexes I im Gehirn der Maus mittels *in situ* Hybridisierung untersucht und beschrieben. Das Expressionsniveau der Komplex I-Untereinheiten erfährt im Verlauf der Entwicklung in Abhängigkeit von der untersuchten Hirnregion starke Veränderungen. Die neuronale Entwicklung im Gehirn durchläuft mehrere Stadien: (1) Neurogenese, (2) neuronale Differenzierung und Migration, (3) Synaptogenese und (4) Reifung. Der Zeitablauf der einzelnen Stadien ist dabei zwischen den einzelnen Hirnregionen sehr unterschiedlich (Finlay und Darlington 1995). Um diese wichtigen Stationen der neuronalen Entwicklung abzudecken, hatte ich für meine Untersuchungen die Zeitpunkte E11.5, E17.5, P1, P11, P28 und adult (zwölf Wochen) gewählt.

6.1.1 Quantifizierung der ISH-Signale

Die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung ist eine leistungsfähige Methode zur Bestimmung unterschiedlicher Expressionsniveaus von mRNAs (Larsson *et al.* 1991; Larsson und Hougaard 1993). Im Gegensatz zu mRNA-*array* Analysen sind ISH-Signale bekanntermaßen schwierig zu quantifizieren, da eine Reihe von Störfaktoren die Signalstärke negativ beeinflussen können (Kimura *et al.* 2004). Andererseits bietet die ISH den großen Vorteil, die Genexpression auf zellulärer Ebene zu beurteilen. Ein Problem bei der Quantifizierung der ISH-Signale ist die Nicht-Linearität zwischen Signalstärke und mRNA-Konzentration. Larsson und Hougaard (1994) haben sich eingehend mit dieser Problematik beschäftigt. Dazu haben sie Oligonukleotide auf Aminoalkylsilan-beschichteten Glasobjektträgern immobilisiert und mit Hilfe dieses „idealen“ Modellsystems ein annähernd logarithmisches Verhältnis zwischen der optischen Dichte der Sonde und der zu bestimmenden Oligonukleotidkonzentration im Bereich von zwei bis drei Größenordnungen gefunden (Larsson und Hougaard 1994). Ein weiterer Punkt, der bei der Quantifizierung der ISH-Signale berücksichtigt werden muss, ist die unterschiedliche zelluläre Packungsdichte in den einzelnen Hirnregionen, die in der adulten Maus zwischen 0,381 relativen Einheiten (Kleinhirn, *Stratum moleculare*) und 4,453 relativen Einheiten (Hippokampus, *Gyrus dentatus*) variiert. Aus diesem Grund habe ich die An-

zahl der DAPI-markierten Zellkerne in jeder ROI bestimmt und deren ISH-Signalintensität durch die nukleäre Packungsdichte dividiert. Alle korrigierten Signalintensitäten eines Gewebeschnittes wurden Z-transformiert, um dem Problem der Nicht-Linearität und einer fehlenden Normalverteilung gerecht zu werden, was es mir letztlich ermöglichte, die verschiedenen Hirnregionen auf einem Schnitt miteinander zu vergleichen. Eine Alternative zur kernbezogenen Standardisierung beschreiben Tsukasaki *et al.* (2000). Hierbei wird das Verhältnis spezifischer mRNA-Kopien zur 28S rRNA bestimmt. 28S rRNA ist ubiquitär in allen Zellen exprimiert und ihre Anzahl variiert zwischen den verschiedenen Zellen recht wenig (de Leeuw *et al.* 1989). Die 28S rRNA-Menge dient somit als interner Marker für die Menge an zu detektierender mRNA. Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass ISH-Signale nur relative Änderungen in den mRNA-Kopienzahlen widerspiegeln und daher nur eine relative Beurteilung der Signalstärke in jedem Schnitt erlauben (Kimura *et al.* 2004). Meine Studie ist daher nicht geeignet, eine Gesamtzunahme der mitochondrialen Genexpression nach der Geburt nachzuweisen, wie sie bereits von anderen Wissenschaftlern beschrieben wurde (Izquierdo *et al.* 1990; Kim *et al.* 1995; Minai *et al.* 2008). Die Stärke der von mir verwendeten Methode besteht aber darin, bestimmte relative *hotspots* der Genexpression während der Embryogenese nachzuweisen. Außerdem sollte man bei der Interpretation von Expressionsstudien die Tatsache berücksichtigen, dass die mRNA-Konzentrationen nicht zwangsläufig mit den Proteinkonzentrationen korrelieren müssen, welche oftmals den physiologischen Zellstatus besser widerspiegeln (Zhang *et al.* 2002).

6.1.2 Komplex I-Genexpression im Hippokampus

Die Neurone des Hippokampus proliferieren pränatal, gefolgt von Wachstum und Differenzierung in der neonatalen Phase, sowie gesteigerter Synaptogenese in der ersten postnatalen Woche. In der zweiten postnatalen Woche werden erste synaptische Verbindungen gebildet. Die dritte postnatale Woche ist gekennzeichnet durch gesteigerte synaptische Aktivität. Am Ende des ersten Lebensmonats findet eine weitere Reifung der Neuronen statt (Isaacson und Pribram 1975; Pokorny und Yamamoto, 1981a, 1981b; Jacobson 1991; Mody *et al.* 2002). Die Differenzierung der hippocampalen Neuronen ist dabei durch Änderungen der Genexpression charakterisiert. In meiner Arbeit habe ich die unterschiedlichen Expressionsmuster und -dynamiken im Hippokampus zwischen (1) den *Cornu ammonis* (CA) Regionen und (2) dem *Gyrus dentatus* beschrieben. Unterschiedliche Expressionsniveaus in den hippocampalen Subregionen sind durchaus zu erwarten, da zwischen den einzelnen Regionen anatomi-

sche, zytoarchitektonische und neurochemische Unterschiede bestehen (Tole *et al.* 1997; Grove und Tole 1999).

Die hohe Expressionsintensität in der CA3 Region, besonders um den postnatalen Tag P11 herum, könnte den erhöhten Energiebedarf der Pyramidenneuronen aus der CA3 Region, den größten Neuronen im Hippokampus mit ihren zahlreichen synaptischen Kontakten, im Vergleich zu den wesentlich kleineren Neuronen der anderen Subregionen erklären (Zhao *et al.* 2001; Lein *et al.* 2004). Interessanterweise geht auch in adulten Mäusen eine Übungsinduzierte Entstehung von Synapsen der dendritischen *spines* im *Stratum radiatum* der CA1 Region mit einer Hochregulation der Mitochondrienanzahl und oxidativen Kapazität in diesen Neuronen einher (Dietrich *et al.* 2008). Übereinstimmende Beobachtungen wurden von Lein *et al.* (2004) gemacht, die mittels mRNA-Expressionsstudien und *high-throughput in situ* Hybridisierung zeigen konnten, dass sechs von sieben exemplarisch ausgewählte Gene, die am hippokampalen Energiemetabolismus beteiligt sind, hauptsächlich in der CA3 Region angereichert sind. Darüber hinaus zeigten genomweite mRNA-Expressionsstudien im sich entwickelnden Hippokampus eine erhöhte Expression von Genen, die an der Glykolyse, dem oxidativen Metabolismus und der Fettsäure-Synthese beteiligt sind. Darunter befinden sich auch die Komplex I-Untereinheiten Ndufb2 und Ndufs2, deren Expressionsmuster mit demjenigen von Proteinen, die eine Rolle bei der synaptischen Funktion, Signaltransduktion und Ionenkanal-Aktivitäten spielen, korreliert (Mody *et al.* 2001). Einige Komplex I-Untereinheiten, die für den reinen Elektronen- und Wasserstoffionentransport entbehrlich scheinen (Janssen *et al.* 2006), könnten somit eine funktionelle Verbindung zu anderen Energieerzeugenden Stoffwechselwegen liefern. Ndufab1 beispielsweise ist mit den Acyl-Carrier-Proteinen eng verwandt und kann so eine Verknüpfung zwischen der Atmungskette und der *de novo* Fettsäure-Synthese herstellen (Cronan *et al.* 2005). Die distale CA3 Region weist ein weiteres frühes Expressionsmaximum um den Embryonaltag E17.5 auf, welches mit einer Phase aktiver neuronaler Proliferation einhergeht (Isaacson und Pribram 1975; Pokorny und Yamamoto 1981a, 1981b; Jacobson 1991; Mody *et al.* 2001). Damit scheint sich die distale CA3 Region hinsichtlich ihrer Entwicklungsdynamik und ihres Energiemetabolismus von den anderen Subregionen des *Cornu ammonis* abzugrenzen.

Das mRNA-Expressionsmuster der Komplex I-Untereinheiten im *Gyrus dentatus* ist gleichmäßig, abgesehen von einem leichten Abfall der Expressionsintensitäten um den postnatalen Tag P11, der bis zur adulten Phase anhält. Die Unterschiede zu den CA Regionen könnten sich dadurch erklären lassen, dass beide Regionen unterschiedliche Neuronentypen ausbilden, die ihrerseits eine unterschiedliche Entwicklungsdynamik aufweisen. Während das Ammons-

horn hauptsächlich aus exzitatorischen Pyramidenneuronen besteht, finden sich im *Gyrus dentatus* Körnerzellen (Lorente de No 1934; Lein *et al.* 2004), welche zeitlebens in geringem Maße neue Neuronen bilden können (Altman und Das 1965; Kempermann *et al.* 1997; Zhao *et al.* 2001). Aus diesem Grund gibt es vermutlich kein Expressionsmaximum, welches auf eine Phase besonders starker Neurogenese beschränkt ist (Altman und Das 1965; Zhao *et al.* 2001).

Den Expressionsabfall um den postnatalen Tag P11 könnte man durch die besondere Morphogenese des *Gyrus dentatus* erklären (Li und Pleasure 2005). Neurogenese und Neuronenmigration erfolgen in zwei Schritten. Während der ersten Migrationswelle (E14.5-P5) wandern erste mitotische und postmitotische Zellen in die Anlage des *Gyrus dentatus* ein und differenzieren zu reifen Körnerzellen. Während der zweiten Migrationswelle wandern die Neuronen auch in die *Hilus* Region und bilden eine sogenannte sekundäre neurogene Nische. Diese wird spätestens bis zum postnatalen Tag P10 reorganisiert, wodurch sich die Lage der Progenitorzellen aus der *Hilus* Region in die Subgranularschicht verschiebt, in der die Proliferation undifferenzierter Vorläuferzellen erhalten bleibt (Li und Pleasure 2005). Hier findet dann bis in die adulte Phase hinein in geringem Maße weiterhin Neurogenese statt.

6.1.2.1 Die Stärke der Komplex I-Genexpression im Hippokampus korreliert mit der power der Gamma-Oszillationen

Gamma-Oszillationen sind schnelle, neuronale Netzwerk-Oszillationen in einem Frequenzbereich zwischen 30 und 90 Hz, die der Synchronisation räumlich getrennter neuronaler Netzwerke dienen. Sie wirken damit als temporale Matrix für komplexe Gehirnfunktionen wie Schmerzwahrnehmung, Gedächtnisbildung und kognitive Funktionen (Buzsaki und Draguhn 2004; Uhlhaas *et al.* 2008). Im Hippokampus entstehen Gamma-Oszillationen durch Aktionspotentiale, ausgelöst durch das genaue Zusammenspiel von exzitatorischen, glutamatergen Pyramidenneuronen und inhibitorischen GABAergen Interneuronen (Hajos *et al.* 2004; Gloveli *et al.* 2005; Bartos *et al.* 2007). Na^+/K^+ ATPasen sind notwendig, um den Ionengradienten wieder aufzubauen und somit die Erregbarkeit aufrechtzuerhalten (Attwell und Iadecola 2002). Dieser Prozess benötigt ATP, das durch mitochondriale Atmungskettenenzyme bereitgestellt wird. Interessanterweise sind Gamma-Oszillationen höchst sensitiv gegenüber dem hochspezifischen Komplex I-Inhibitor Rotenon. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Kann (Institut für Neurophysiologie, Charité Berlin) untersuchten wir im Rahmen eines gemeinsamen SFB 665 Projekts (A6) diesen Zusammenhang eingehender und konnten

eine Assoziation persistierender Gamma-Oszillationen mit einer erhöhten Komplex I-Expression nachweisen. Die Expressionsstärke der Komplex I-Untereinheiten im adulten Hippokampus entsprach dabei exakt der örtlichen Verteilung der *power* der Gamma-Oszillationen, die im Hippokampus vier Wochen alter Mäuse gemessen wurden: Die höchste *power* fand sich im distalen Teil der CA3 Region, gefolgt vom proximalen Teil und der CA1 Region. Die Verteilung in den einzelnen Subregionen reflektiert vermutlich Unterschiede in der Spontanaktivität und damit verbunden im Energiebedarf (Kann *et al.* 2011a, 2011b). Die besonders hohe Genexpression in der CA3 Region kann daher für eine schnelle neuronale Netzwerk-Aktivität relevant sein. Gamma-Oszillationen scheinen sich demnach vornehmlich in der CA3 Region zu finden und nach CA1 auszubreiten (Fishan *et al.* 1998).

6.1.3 Komplex I-Genexpression im Kleinhirn

Die Kleinhirnentwicklung der Maus beginnt mit der Neurogenese der Purkinjezellen um den Embryonaltag E10.5, deren Proliferation kurz nach der Geburt endet. Postnatal finden weiteres Wachstum, Synapsenbildung und Reifung statt. Der zweite vorherrschende Zelltyp im Kleinhirn sind die Körnerzellen. Ihr Proliferationsmaximum wird in der ersten postnatalen Woche verzeichnet, Zellmigration und Elongation schließen sich in der darauffolgenden Woche an. Die dritte postnatale Woche ist durch Synapsenbildung gekennzeichnet, gefolgt von weiteren Reifungsprozessen (Altman 1972a, 1972b, 1972c; Goldowitz und Hamre 1998). In meiner Studie habe ich stark abweichende Expressionsniveaus in den einzelnen Kleinhirnschichten und unterschiedliche Expressionsdynamiken zwischen Purkinje- und Körnerzellen gefunden.

In den Purkinjezellen zeigen nahezu alle Komplex I-Untereinheiten einen starken Anstieg der Expressionsintensitäten um den postnatalen Tag P28 herum. Wie in den CA1 und CA3 Regionen auch fällt das Maximum der Komplex I-Genexpression mit einer Phase intensiver Synaptogenese und synaptischer Plastizität in der zweiten und dritten postnatalen Woche zusammen. Diese Schlussfolgerung wird zum einen durch *live cell imaging* Experimente gestützt, welche die Bedeutung von Mitochondrien in den dendritischen *spines* für die synaptische Plastizität hervorheben (Li *et al.* 2004). Weitere Hinweise bieten Genexpressionsstudien während der Entwicklung des gesamten Kleinhirns, bei denen eine erhöhte Expression von Genen gefunden wurde, die für die synaptische Aktivität und Plastizität unentbehrlich sind (Lim *et al.* 2004). Im Gegensatz zu Expressionsstudien am gesamten Kleinhirn bietet die ISH die Möglichkeit, Unterschiede in der Expression auf zellulärer Ebene zu bestimmen. Hier

konnte ich einen beachtlichen Unterschied zwischen Purkinje- und Körnerzellen feststellen. Die Purkinjezellen besitzen aufgrund ihres weitverzweigten Dendritenbaumes eine außerordentlich große Anzahl synaptischer Verbindungen, welche einen verhältnismäßig hohen Energiebedarf für die Bildung exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen und für die nachfolgende Aufrechterhaltung ihrer Ionengradienten haben. Ein hoher Energiebedarf für die Funktionalität der Mitochondrien geht konform mit einer hohen Spontanaktivität dieser Zellen (Womack und Khodakhah 2002). Die Bedeutung der mitochondrialen Funktion für die Entwicklung der Purkinjezellen zeigt sich auch in der *pcd* (*Purkinje cell degeneration*)-Maus, die eine Mutation im Gen der mitochondrialen Zink-Carboxypeptidase *Nna1* trägt. Homozygote Mutanten verlieren >99% ihrer Purkinjezellen zwischen den postnatalen Tagen P15 und P35 (Mullen *et al.* 1976). Dieser zeitliche Ablauf entspricht exakt der Hochregulation der Komplex I-Gentranskripte während der postnatalen Entwicklung (Abb. 5.10).

6.1.4 Komplex I-Genexpression im zerebralen Kortex

Die pränatale Phase der kortikalen Entwicklung der Maus ist gekennzeichnet durch Neurogenese, Proliferations- und Differenzierungsprozesse, sowie Neuronenmigration. Die postnatale Phase ist geprägt durch Axon- und Dendritenwachstum, sowie Synaptogenese und Reifung (Semeralul *et al.* 2006). In der vierten postnatalen Woche hat der Kortex schließlich sein adultes Profil erreicht (Semeralul *et al.* 2006; Han *et al.* 2009). In meiner Studie habe ich die höchsten Expressionsintensitäten zu Beginn der kortikalen Entwicklung um den Embryonaltag E11.5 herum gefunden, was in eine Zeit intensiver Neurogenese fällt und dann wiederum später beim Übergang in den adulten Zustand (Abb. 5.11). Die Komplex I-Genexpression in den kortikalen Regionen ist signifikant niedriger als in den CA1 und CA3 Regionen des Hippokampus und der Purkinjezellschicht des Kleinhirns, was einen kontinuierlicheren und eher verlängerten Verlauf der synaptischen Reifung und Plastizität vermuten lässt.

6.1.5 Komplex I-Genexpression im Mesenzephalon

Das Mesenzephalon und der Hirnstamm sind diejenigen Strukturen, die beim Leigh Syndrom und anderen mitochondrialen Erkrankungen am häufigsten und stärksten betroffen sind (Leigh 1951). Die zentralen Strukturen dieser Hirngebiete sind die mesenzephalen dopaminergen (mDA) Neurone der *Substantia nigra*, die selektiv bei der Parkinsonschen Krankheit degeneriert sind, und die mDA Neurone der *Nuclei ruber, pontinus* und *olivaris*,

welche häufig beim MELAS oder Leigh Syndrom betroffen sind (Onishi *et al.* 1998; Devi *et al.* 2008). Die Entwicklung des murinen Mesenzephalons und des Hirnstammes beginnt um den Embryonaltag E8.5 herum mit der Bildung von mDA Vorläuferneuronen. Es schließen sich Spezifizierung, frühe Differenzierung und Migration der Neurone an (E10.5-E12.5). Die späte Entwicklungsphase (E12.5-E14) ist gekennzeichnet durch endgültige Differenzierung, Synaptogenese und Reifungsprozesse (Prakash und Wurst 2006; Yin *et al.* 2009). Eine besonders hohe Komplex I-Genexpression habe ich zwischen dem Embryonaltag E17.5 und der Geburt beobachten können. Danach fällt das Expressionsniveau ab und erfährt bis zur adulten Phase keine größeren Schwankungen. Gestützt werden meine Beobachtungen durch mehrere genomweite Genexpressionsstudien, die erhöhte Expressionsintensitäten ebenfalls zumeist pränatal detektieren konnten (Greco *et al.* 2009; Yin *et al.* 2009).

Erwiesenermaßen schädigen Komplex I-Inhibitoren wie Rotenon oder MPP⁺ selektiv mDA Neurone und führen zur Parkinsonschen Krankheit (Singer *et al.* 1993). Der resultierende Rückgang an Dopamin beruht dabei vermutlich auf einer energieabhängigen Störung in den präsynaptischen Endigungen der mDA Neurone und ihrer Dendriten (Alam und Schmidt 2002; Cannon *et al.* 2009). Diese Hypothese wird durch Forschungsergebnisse gestützt, die nach Gabe von Komplex I-Inhibitoren eine Hochregulation von Genen nachwiesen, welche an der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse beteiligt sind. Vermutlich antworten mDA Neurone auf eine Rotenonzugabe mit einer Expressionserhöhung als Kompensationsmechanismus ihres Energiemetabolismus (Greene *et al.* 2010). Diese selektive Sensitivität der Neuronen des Mesenzephalons und des Hirnstammes gegenüber einer Komplex I-Inhibition könnte das erhöhte Vorkommen des Leigh Syndroms bei Patienten mit einer genetischen Komplex I-Defizienz erklären (Rahman *et al.* 1996).

6.1.6 Schlussfolgerung

Entgegen meiner Ausgangshypothese, dass eine generell hohe Komplex I-Expression vor allem in denjenigen Hirnstrukturen auftritt, die beim Leigh Syndrom hauptsächlich betroffen sind, trifft dies nur für das Mesenzephalon zu. Die Expressionsintensitäten im *Striatum* und den Basalganglien lagen nur im Durchschnitt und blieben im Entwicklungsverlauf relativ konstant, so dass die Expressionsunterschiede keine allgemeine Erklärung für die außerordentliche Anfälligkeit dieser Strukturen gegenüber mitochondrialer Defekte liefern konnten. Bezüglich des Entwicklungsverlaufs und der relativen Intensitäten der Komplex I-Genexpression habe ich sehr unterschiedliche Expressionsmuster im sich entwickelnden mu-

rinen Gehirn gefunden. Hohe durchschnittliche Komplex I-Genexpressionsniveaus wurden dabei in Phasen intensiver Neurogenese beobachtet (Finlay und Darlington 1995). Ein weiteres Expressionsmaximum wurde in den Purkinjezellen des Kleinhirns und den hippocampalen CA1 und CA3 Regionen während der Synaptogenese und Reifung gefunden, was die Tatsache verdeutlicht, dass 81% des zerebralen Energieverbrauchs auf Aktionspotentialen und postsynaptischen Effekten des Neurotransmitters Glutamat beruhen (Attwell und Laughlin 2011). Allerdings sind weitere Studien nötig, um die Funktion des mitochondrialen Komplexes I auf die Gehirnentwicklung und Funktionalität, besonders im *Striatum* und den Basalganglien, aufzuklären.

6.2 Herstellung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus für einen gewebsspezifischen konditionellen *knockout*

Ein weiteres Ziel meiner Promotionsarbeit war die Generierung einer „geflochten“ *Ndufv1*-Maus, die für einen gewebsspezifischen konditionellen *knockout* eingesetzt werden soll. Hierzu habe ich das Exon 5 des *Ndufv1*-Gens mit zwei loxP-Stellen flankiert. Die Exzision des Exons 5 des *Ndufv1*-Gens kann nun nachfolgend mittels gewebsspezifischer Cre-Rekombinase erfolgen, was einen konditionellen *knockout* nach sich zieht, der sich nur in einem bestimmten Gewebe manifestiert.

6.2.1 Konditioneller *knockout* für eine gewebsspezifische Geninaktivierung

Der konditionelle *knockout* hat gegenüber dem konventionellen *knockout* den Vorteil, dass die gewünschte Geninaktivierung gewebsspezifisch erfolgt. Dies ist besonders dann wichtig, wenn die auf konventionellem Wege hergestellte *knockout*-Maus aufgrund einer in allen Geweben auftretenden kompletten Geninaktivierung nicht lebensfähig ist. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Einführung einer homozygoten Punktmutation in das *Ndufv1*-Gen, welches beim Menschen einen klinisch auffälligen, aber durchaus lebensfähigen Phänotyp aufweist, bei der Maus letal verläuft (Brinckmann 2011). Die für die *Ndufv1*-Mutation homozygoten Embryonen wurden bereits am Embryonaltag E9 resorbiert. Aufgrund dieses Ergebnisses habe ich mich entschieden, eine „geflochte“ Maus zu generieren, bei der durch Exzision des Exons 5 des *Ndufv1*-Gens dieses konditionell im ZNS, bzw. im Skelettmuskel ausgeschaltet werden kann, um so eine Möglichkeit zu erhalten, den Funktionsausfall des Gens dennoch im Tiermodell untersuchen zu können. Für eine ZNS-spezifische Entfer-

nung des Exons 5 würden Mäuse, bei denen zuvor die in die Keimzellen eingebrachte Neo-Selektionskassette entfernt wurde, mit Tieren verpaart werden, welche die Cre-Rekombinase in den Neuronen des Großhirns und des Hippokampus unter dem Promotor des *Nes*-Gens exprimieren. Diese kann in den Tieren der F₃-Generation die Gensequenzen zwischen zwei loxP-Stellen entfernen, wodurch das Exon 5 des *Ndufv1*-Gens eliminiert wird (Goebbels *et al.* 2006). Alternativ könnte man das Exon 5 des *Ndufv1*-Gens auch spezifisch im Skelettmuskel entfernen. Dazu würde man Mäuse einsetzen, welche die Cre-Rekombinase im Muskel unter dem Promotor des *Myf5*-Gens exprimieren. Ein weiterer Vorteil des konditionellen *knockouts* besteht neben dem gezielten Ausschalten in einem bestimmten Gewebe oder in einem bestimmten Zelltyp auch darin, dass man den Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem das Gen ausgeschaltet werden soll, durch Wahl eines geeigneten Promotors, unter dem die Cre-Rekombinase exprimiert wird, bestimmen kann (Hayashi und McMahon 2002). Neben all den positiven Aspekten, die ein konditioneller *knockout* aufweist, muss man aber auch feststellen, dass diese Art der Geninaktivierung gegenüber dem konventionellen Verfahren mit einem deutlich höheren Zeit-, Zucht- und Arbeitsaufwand verbunden ist. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass der Promotor, unter welchem die Cre-Rekombinase exprimiert wird, meist nicht zu 100% für das entsprechende Zielgewebe spezifisch ist und es demnach auch in anderen Geweben zu Effekten kommen kann (*off-target* Effekte) oder die Geninaktivierung im Zielgewebe nicht vollständig ist und man eine gewisse Restaktivität (hypomorphe Phänotypen) nachweisen kann (Hirasawa *et al.* 2001). Außerdem können Mosaikstrukturen aus Zellen auftreten, die teils Wildtyp sind und teils den Gendefekt aufweisen.

6.2.2 Auswirkungen eines *Ndufv1*-*knockouts*

Das *Ndufv1*-Gen kodiert für die NADH-H⁺-bindende Untereinheit des Komplexes I und ist somit das „Eingangstor“ zur mitochondrialen Atmungskette. Ein Defekt dieses Gens manifestiert sich bei Patienten in Form einer zystischer Leukodystrophie oder einem Leigh Syndrom (Schuelke *et al.* 1999, 2001; Benit *et al.* 2001). Durch das Ausschalten des Exons 5 im Mausmodell wird die FMN-Bindestelle des Proteins vollständig entfernt und das Leseraster verschiebt sich, da die Anzahl der in Exon 5 vorhandenen Nukleotide mit 190 bp kein Vielfaches von drei ist. Daher kann man in Folge eines *knockouts* des Exons 5 von einem vollständigen Funktionsverlust der *Ndufv1*-Untereinheit ausgehen.

Mit allen Vorbehalten bezüglich einer Parallelisierung der Phänotypen des Menschen und der Maus gehen wir davon aus, dass die Maus wahrscheinlich eine ähnliche Symptomatik des

Gendefekts aufweist. Diese umfasst eine wahrscheinliche Degeneration der Basalganglien und der *Substantia alba*, sowie schwere Epilepsie und eventuelle zerebrale Anfälle (Leigh 1951; Tsuji *et al.* 2003). Bei der muskelspezifischen Mausvariante erwarten wir eine generalisierte Muskelschwäche und eine Kardiomyopathie. Den phänotypischen Auswirkungen liegt dabei eine Minderung der Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes I zugrunde (Rahman *et al.* 1996). Einen *knockout*-Phänotyp kann man sehr wahrscheinlich erst im homozygot deletierten Tier sehen, da sowohl in der Maus als auch beim Menschen heterozygot mutierte Individuen vollständig normal sind (klinische Daten der Arbeitsgruppe Schülke, NeuroCure Clinical Research Center, Charité Berlin). Es ist anzunehmen, dass eine Gendosis von 50% zur Kompensation des Gendefekts ausreicht. Unklar ist bisher, bis auf welche Aktivitäten die normale Funktion des Komplexes I reduziert werden muss, bis klinische Symptome in Erscheinung treten. Polarographische Untersuchungen der oxidativen Phosphorylierung erlauben die Untersuchung des Einflusses jedes einzelnen Komplexes der mitochondrialen Atmungskette auf die Gesamtaktivität der oxidativen Phosphorylierung (Villani und Attardi 1997; Villani *et al.* 1998). Demnach hat der Defekt eines einzelnen Atmungskettenkomplexes erst dann einen Einfluss auf die Abnahme der endogenen Atmung, wenn dessen Aktivitätsverlust einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat (Villani und Attardi 2001). Somit lässt sich eventuell die Tatsache erklären, dass heterozygote Träger einer Komplex I-Mutation phänotypisch gesund erscheinen, da die Funktionsfähigkeit der Atmungskette durch nur eine fehlerhafte Kopie des betroffenen Gens nicht dramatisch herabgesetzt wird. Inwieweit allerdings dieses Erscheinungsbild beim Menschen auf die Maus übertragbar ist, lässt sich natürlich nicht sicher vorhersagen.

7 Zusammenfassung

Mitochondriale Dysfunktionen bilden die pathophysiologische Grundlage einer äußerst heterogenen Gruppe verschiedener Krankheitsbilder und werden oftmals durch Defekte in der mitochondrialen Atmungskette verursacht. Der häufigste klinische Phänotyp ist das Leigh Syndrom, eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die durch den Untergang spezifischer Hirnareale (Basalganglien, *Putamen*, Thalamus, Mesenzephalon und Hirnstamm) charakterisiert ist. Aus biochemischer Sicht liegt dem Leigh Syndrom meist ein isolierter Komplex I-Mangel (NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase) zu Grunde. Die Ursache der Regionspezifität dieser Veränderungen ist bislang ungeklärt. In meiner Arbeit habe ich daher die Fragestellung untersucht, ob ein solch charakteristisches Muster spezifisch betroffener Hirnregionen durch den gewebsspezifischen zeitlichen Verlauf der Genexpression wichtiger funktioneller Komponenten der Atmungskette während der embryonal-fetalen Entwicklung erklärt werden kann. Mittels ISH habe ich die relative Expression der 33 nukleär-kodierten Untereinheiten des Komplexes I in verschiedenen Hirnregionen der Maus zu den Zeitpunkten E11.5, E17.5, P1, P11, P28 und adult (zwölf Wochen) untersucht. Ich konnte zeigen, dass die relativen Expressionsintensitäten der Komplex I-Untereinheiten während des Entwicklungsverlaufs in Abhängigkeit der untersuchten Hirnregion starke Veränderungen erfahren. Hohe durchschnittliche Expressionsintensitäten konnte ich in Zeiten intensiver Neurogenese nachweisen. In den Purkinjezellen des Kleinhirns und in den hippokampalen CA1 und CA3 Pyramidenneuronen konnte ich ein weiteres Expressionsmaximum während der Synaptogenese und Neuronenreifung nachweisen. Die Bedeutung dieser Strukturen für die Komplex I-Aktivität während der Synaptogenese deckt sich mit neueren Forschungsergebnissen, dass Gamma-Oszillationen, die mit höheren kognitiven Funktionen des Säugergehirns assoziiert sind, stark von der Komplex I-Aktivität abhängig sind. Mit Ausnahme des Mesenzephalons lagen die Expressionsintensitäten des *Striatums* und der Basalganglien allerdings nur im Durchschnitt und können demnach keine Erklärung für die deutliche Anfälligkeit dieser Strukturen gegenüber mitochondrialen Erkrankungen liefern.

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war die Generierung eines konditionellen Mausmodells für einen gewebsspezifischen Komplex I-Mangel zur *in vivo* Untersuchung der Pathogenese von Atmungskettendefekten. Über die Methode des *recombineering* habe ich das Exon 5 des *Ndufv1*-Gens mit zwei loxP-Stellen flankiert („gefloxtes Allel“) und eine Neomycin-Selektionskassette eingeführt. Bei denjenigen Mausmutanten, die das „gefloxte Allel“ in die

Keimbahn aufgenommen hatten, wurde die Selektionskassette durch Verpaarung mit FLPe-*deleter*-Mäusen entfernt. Die Exzision des Exons 5 kann bei diesen „geflochten“ Mäusen nun nachfolgend mittels gewebsspezifisch exprimierter Cre-Rekombinase erfolgen, die entweder in den Neuronen des Großhirns und Hippokampus unter dem Promotor des *Nes*-Gens exprimiert wird oder muskelspezifisch unter dem Promotor des *Myf5*-Gens. Durch das Ausschalten des Exons 5 im Mausmodell wird die FMN-Bindestelle des Ndufv1-Proteins vollständig entfernt. Außerdem verschiebt sich das Leseraster, so dass als Folge des *knockouts* von einem vollständigen Funktionsverlust der Ndufv1-Untereinheit ausgegangen werden kann.

8 Summary

Dysfunction of the mitochondria is the pathophysiological basis of a heterogeneous group of different diseases, most of them caused by malfunction of the respiratory chain. The most frequent clinical phenotype is Leigh syndrome, a progressive, neurodegenerative disorder, characterized by bilateral symmetric brain lesions, particularly in the basal ganglia, putamen, thalamus, mesencephalon and brainstem. The most common biochemical defect leading to Leigh syndrome is isolated complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) deficiency. Little is known about the cause of this region specificity. This work is about the question whether such characteristic lesional patterns could be explained by the tissue specific time course of gene expression for important functional components of the respiratory chain during the embryonic-fetal period. Using ISH I investigated the relative expression of 33 nuclear encoded complex I subunits in different brain regions in mice at E11.5, E17.5, P1, P11, P28 and adult (12 weeks). With respect to timing and relative intensity of complex I gene expression I found a highly variant pattern in different regions during development. High average expression levels were detected in periods of intense neurogenesis. In cerebellar Purkinje and in hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons I found a second expression peak during the period of synaptogenesis and maturation. The dependence of these structures on the complex I gene expression during synaptogenesis is in accord with recent findings that gamma oscillations, known to be associated with higher cognitive functions of the mammalian brain, strongly depend on complex I activity. Except of the mesencephalon the expression intensities of the striatum and the basal ganglia were only average, so they cannot explain the vulnerability of these structures in mitochondrial diseases.

Another aim of this work was the generation of a conditional mouse model for tissue specific inactivation of the *Ndufv1*-gene to study the pathogenesis of complex I deficiency *in vivo*. By recombineering I generate a construct by flanking exon 5 of the *Ndufv1*-gene with two loxP sites ("floxed" allele) and inserting a neomycin cassette. Mouse mutants which inserted the construct by germline transmission were mated with FLPe-deleter mice to remove the selection cassette. In order to obtain tissue specific excision of exon 5 the *Ndufv1*^{fllox5} mice will be crossed with transgenic mice which express the Cre recombinase either in the neurons of the telencephalon and the hippocampus under the promotor of the *Nes*-gene or in muscle under the promotor of the *Myf5*-gene. The knockout of exon 5 in the mouse model leads to a frame shift and the total removal of the FMN binding site of the *Ndufv1*-protein. Thus I can assume a complete loss of function of the *Ndufv1*-subunit.

9 Literaturverzeichnis

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schägger, H., Kersch, S. and Brandt, U. (2004) Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 148-156
- Abremski, K. and Hoess, R. (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* **259**, 1509-1514
- Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T. and Enriquez, J.A. (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* **13**, 805-815
- Alam, M. and Schmidt, W.J. (2002) Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res* **136**, 317-324
- Ali, S.T., Duncan, A.M., Schappert, K., Heng, H.H., Tsui, L.C., Chow, W. and Robinson, B.H. (1993) Chromosomal localization of the human gene encoding the 51-kDa subunit of mitochondrial complex I (NDUFV1) to 11q13. *Genomics* **18**, 435-439
- Allendoerfer, K.L. and Shatz, C.J. (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* **17**, 185-218
- Altman, J. and Das, G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319-335
- Altman, J. (1972a) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J Comp Neurol* **145**, 353-397
- Altman, J. (1972b) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol* **145**, 399-463
- Altman, J. (1972c) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat III. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol* **145**, 465-513
- Altman, J. (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Exp Brain Res* **6**, 8-49
- Altman, J. and Bayer, S.A. (1985) Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. *J Comp Neurol* **231**, 1-26

- Altman, J. and Bayer, S.A. (1990) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol* **301**, 325-342
- Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntioni, F., Vrbova, G., Partridge, T., Zammit, P., Bungler, L. and Patel, K. (2007) Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1835-1840
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465
- Angell, J.E., Lindner, D.J., Shapiro, P.S., Hofmann, E.R. and Kalvakolanu, D.V. (2000) Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach. *J Biol Chem* **275**, 33416-33426
- Angevine, J.B. and Sidman, R.L. (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**, 766-768
- Antonicka, H., Ogilvie, I., Taivassalo, T., Anitori, R.P., Haller, R.G., Vissing, J., Kennaway, N.G. and Shoubridge, E.A. (2003) Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* **278**, 43081-43088
- Attwell, D. and Iadecola, C. (2002) The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci* **25**, 621-625
- Attwell, D. and Laughlin, S.B. (2011) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1133-1145
- Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495
- Bartos, M., Vida, I. und Jonas, P. (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* **8**, 45-56
- Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J. and Zhang, X. (1993) Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* **14**, 83-144

- Belogradov, G. and Hatefi, Y. (1994) Catalytic sector of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase): subunit stoichiometry and substrate-induced conformation changes. *Biochemistry* **33**, 4571-4576
- Benit, P., Chretien, D., Kadhom, N., de Lonlay-Debeney, P., Cormier-Daire, V., Cabral, A., Peudenier, S., Rustin, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2001) Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet* **68**, 1344-1352
- Benit, P., Beugnot, R., Chretien, D., Giurgea, I., De Lonlay-Debeney, P., Issartel, J.-P., Corral-Debrinski, M., Kerscher, S., Rustin, P., Rötig, A. and Munnich, A. (2003) Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat* **21**, 582-586
- Benit, P., Slama, A., Cartault, F., Giurgea, I., Chretien, D., Lebon, S., Marsac, C., Munnich, A., Rötig, A. and Rustin, P. (2004) Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome. *J Med Genet* **41**, 14-17
- Berger, I., Hershkovitz, E., Shaag, A., Edvardson, S., Saada, A. and Elpeleg, O. (2008) Mitochondrial complex I deficiency caused by a deleterious NDUF11 mutation. *Ann Neurol* **63**, 405-408
- Berry, M. and Rogers, A.W. (1965) The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat* **99**, 691-709
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523
- Brand, M.D. (1994) The stoichiometry of proton pumping and ATP synthesis in mitochondria. *Biochemist* **16**, 7-41
- Brandt, U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* **1318**, 79-91
- Brandt, U., Kerscher, S., Drose, S., Zwicker, K. and Zickermann, V. (2003) Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett* **545**, 9-17
- Braun, T., Rudnicki, M.A., Arnold, H.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**, 369-382

- Brinckmann, A. (2011) Untersuchungen zur Pathogenese der Mitochondriopathien anhand ausgesuchter Patienten und eines Mausmodells für den mitochondrialen Komplex I-Mangel (Dissertation), Freie Universität Berlin, Deutschland
- Brini, M., Pinton, P., King, M.P., Davidson, M., Schon, E.A. and Rizzuto, R. (1999) A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat Med* **5**, 951-954
- Buchholz, F., Angrand, P.-O. and Stewart, A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* **16**, 657-662
- Calvo, S.E., Tucker, E.J., Compton, A.G., Kirby, D.M., Crawford, G., Burt N.P., Rivas, M., Guiducci, C., Bruno, D.L., Goldberger, O.A., Redman, M.C., Wiltshire, E., Wilson, C.J., Altshuler, D., Gabriel, S.B., Daly, M.J., Thorburn, D.R. and Mootha, V.K. (2010) High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet* **42**, 851-858
- Cannon, J.R., Tapias, V.M., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E. and Greenamyre, J.T. (2009) A highly reproducible model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **34**, 279-290
- Capecchi, M.R. (1989a) Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-1292
- Capecchi, M.R. (1989b) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trend Genet* **5**, 70-76
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., van Beeumen, J., Matagne, R.F. and Remacle, C. (2004) Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1658**, 212-224
- Carroll, J., Shannon, R.J., Fearnley, I.M., Walker, J.E. and Hirst, J. (2002) Definition of the nuclear-encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification of two new subunits. *J Biol Biochem* **277**, 50311-50317
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J. and Walker, J.E. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **2**, 117-126
- Caviness Jr., V.S. (1973) Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* **151**, 113-120

- Caviness Jr., V.S. (1982) Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [³H]thymidine autoradiography. *Brain Res* **256**, 293-302
- Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolite, R.F. and Attardi, G. (1985) Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* **314**, 592-597
- Chomyn, A., Cleeter, M.W., Ragan, C.I., Riley, M., Doolite, R.F. and Attardi, G. (1986) URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* **234**, 614-618
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic Sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1991-1995
- Clancy, B., Darlington, R.B. and Finlay, B.L. (2000) The course of human events: predicting the timing of primate neural development. *Dev Sci* **3**, 57-66
- Clancy, B., Kersh, B., Hyde, J., Darlington, R.B., Anand, K.J. and Finlay, B.L. (2007) Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics* **5**, 79-94
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Court, D.L. (2001) Mouse genomic technologies recombining: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* **2**, 769-779
- Cronan, J.E., Fearnley, I.M. and Walker, J.E. (2005) Mammalian mitochondria contain a soluble acyl carrier protein. *FEBS Lett* **579**, 4892-4896
- Darlington, R.B., Dunlop, S.A. and Finlay, B.L. (1999) Neural development in metatherian and eutherian mammals: variation and constraint. *J Comp Neurol* **411**, 359-368
- Degli Esposti, M. (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 222-235
- de Leeuw, W.J., Slagboom, P.E. and Vijg, J. (1989) Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucl Acid Res* **17**, 10137-10138
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G. and Anandatheerthavarada, H.K. (2008) Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* **283**, 9089-9100

- Dietrich, M.O., Andrews, Z.B. and Horvath, T.L. (2008) Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. *J Neurosci* **28**, 10766-10771
- Distelmaier, F., Koopman, W.J., van den Heuvel, L.P., Rodenburg, R.J., Maytepek, E., Willems, P.H. and Smeitink, J.A. (2009) Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* **132**, 833-842
- Earley, F.G.P., Patel, S.D., Ragan, C.I. and Attardi, G. (1987) Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [³H]dihydrorotenone. *FEBS Lett* **219**, 108-113
- Edmondson, J.C. and Hatten, M.E. (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* **7**, 1928-1934
- Efremov, R.G., Baradaran, R. and Sazanov, L.A. (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**, 441-445
- Fato, R., Bergamini, C., Bortolus, M., Maniero, A.L., Leoni, S., Ohnishi, T. and Lenaz, G. (2009) Differential effects of mitochondrial complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 384-392
- Fearnley, I.M. and Walker, J.E. (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim Biophys Acta* **1140**, 105-134
- Fearnley, I.M., Carroll, J., Shannon, R.J., Runswick, M.J., Walker, J.E. and Hirst, J. (2001) GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* **276**, 38345-38348
- Fernandez-Moreira, D., Ugalde, C., Smeets, R., Rodenburg, R.J., Lopez-Laso, E., Ruiz-Falco, M.L., Briones, P., Martin, M.A., Smeitink, J.A. and Arenas, J. (2007) X-linked NDUFA1 gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Neurol* **61**, 73-83
- Filosto, M., Tomelleri, G., Tonin, P., Scarpelli, M., Vattemi, G., Rizzuto, N., Padovani, A. and Simonati, A. (2007) Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep* **27**, 23-30
- Finlay, B.L. and Darlington, R.B. (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* **268**, 1578-1584
- Finlay, B.L., Hersman, M.N. and Darlington, R.B. (1998) Patterns of vertebrate neurogenesis and the paths of vertebrate evolution. *Brain Behav Evol* **52**, 232-242

- Finlay, B.L., Darlington, R.B. and Nicastro, N. (2001) Developmental structure in brain evolution. *Behav Brain Sci* **24**, 263-307
- Finsterer, J. (2008) Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol* **39**, 223-35
- Fishan, A., Pike, F.G., Buhl, E.H. and Paulsen, O. (1998) Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* **394**, 186-189
- Fridovic, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880
- Friedrich, T., Weidner, U., Nehls, U., Fecke, W., Schneider, R. and Weiss, H. (1993) Attempts to define distinct parts of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Bioenerg Biomembranes* **25**, 331-337
- Friedrich, T., Van Heek, P., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzsch-Kienast, W., Höfle, G., Reichenbach, H. and Weiss, H. (1994) Two binding sites of inhibitors in NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Eur J Biochem* **219**, 691-698
- Friedrich, T. (2001) Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J Bioenerg Biomembr* **33**, 169-177
- Friedrich, T. and Bottcher, B. (2004) The gross structure of the respiratory complex I: a lego system. *Biochim Biophys Acta* **1608**, 1-9
- Gabaldon, T., Rainey, D. and Huynen, M.A. (2005) Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol* **348**, 857-870
- Galante, Y.M. and Hatefi, Y. (1979) Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **192**, 559-568
- Galkin, A. and Brandt, U. (2005) Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **280**, 30129-30135
- Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G. and Lenaz, G. (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* **505**, 364-368
- Gloveli, T., Dugladze, T., Saha, S., Monyer, H., Heinemann, U., Traub, R.D., Whittington, M.A. and Buhl, E.H. (2005) Differential involvement of oriens/pyramidale interneurons in hippocampal network oscillations in vitro. *J Physiol* **562**, 131-147

- Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M.H. and Nave, K.-A. (2006) Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* **44**, 611-621
- Goldowitz, D. and Hamre, K. (1998) The cells and molecules that make a cerebellum. *TINS* **21**, 375-382
- Greco, D., Volpicelli, F., Di Lieto, A., Leo, D., Perrone-Capano, C., Auvinen, P. and di Porzo, U. (2009) Comparison of gene expression profile in embryonic mesencephalon and neuronal primary cultures. *PLoS One* **4**, e4977
- Green, D.R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674
- Greene, J.G., Dingledine, R. and Greenamyre, J.T. (2010) Neuron-selective changes in RNA transcripts related to energy metabolism in toxic models of parkinsonism in rodents. *Neurobiol Dis* **38**, 476-481
- Grigorieff, N. (1999) Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr Opin Struct Biol* **9**, 476-483
- Grove, E.A. and Tole, S. (1999) Patterning events and specification signals in the developing hippocampus. *Cereb Cortex* **9**, 551-561
- Grossman, L.I. and Lomax, M. (1997) Nuclear genes for cytochrom c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **352**, 174-192
- Gu, H. (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-1164
- Han, X., Wu, X., Chung, W.-Y., Li, T., Nekrutenko, A., Altman, N.S., Chen, G. and Ma, H. (2009) Transcriptome of embryonic and neonatal mouse cortex by high-throughput RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 12741-12746
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann Rev Biochem* **54**, 1015-1069
- Hausmann, B. and Sievers, J. (1985) Cerebellar external granule cells are attached to the basal lamina from the onset of migration up to the end of their proliferative activity. *J Comp Neurol* **241**, 50-62
- Hayashi, S. and McMahon, A.P. (2002) Efficient recombination in diverse tissues by tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* **244**, 305-318

- Hirasawa, M., Cho, A., Sreenath, T., Sauer, B., Julien, J.P. and Kulkarni, A.B. (2001) Neuron-specific expression of Cre recombinase during the late phase of brain development. *Neurosci Res* **40**, 125-132
- Hirawake, H., Wang, H., Kuramochi, T., Kojima, S. and Kita, K. (1994a) Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a cDNA cloning of the flavoprotein (Fp) subunit of liver mitochondria. *J Biochem* **116**, 211-217
- Hirawake, H., Taniwaki, M., Tamura, A., Kojima, S. and Kita, K. (1994b) Cytochrome b in complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of components in liver mitochondria and chromosomal assignment of the genes for the large (SDHC) and small (SDHD) subunits to 1q21 and 11q23. *Cytogenet Cell Genet* **79**, 132-138
- Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J. and Walker, J.E. (2003) The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1604**, 135-150
- Hoefs, S.J., Dieteren, C.E., Distelmaier, F., Janssen, R.J., Epplen, A., Swarts, H.G., Forkink, M., Rodenberg, R.J., Nijtmans, L.G., Willems, P.H., Smeitink, J.A. and van den Heuvel, L.P. (2008) NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease. *Am J Hum Genet* **82**, 1306-1315
- Hoess, R.H. and Abremski, K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J Biol Chem* **181**, 351-362
- Huang, G., Lu, H., Hao, A., Ng, D.C., Ponniah, S., Guo, K., Lufei, C., Zeng, Q. and Cao, X. (2004) GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. *Mol Cell Biol* **24**, 8447-8456
- Ingledeu, W.J. and Ohnishi, T. (1980) An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria. *Biochem J* **186**, 111-117
- Isaacson, R.L. and Pribram, K.H. (1975) The Hippocampus. *Plenum, New York*
- Izquierdo, J.M., Luis, A.M. and Cuezva, J.M. (1990) Postnatal mitochondrial differentiation in rat liver. Regulation by thyroid hormones of the beta-subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex. *J Biol Chem* **265**, 9090-9097
- Jacobowitz, D.M. and Abbott, L.C. (1998) Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. *CRC Press LLC*
- Jacobsen, M. (1991) Developmental Neurobiology. *Plenum, New York*
- Janssen, R.J., Nijtmans, L.G., van den Heuvel, L.P. and Smeitink, J.A. (2006) Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* **29**, 499-515

- Joza, N., Oudit, G.Y., Brown, D., Benit, P., Kassiri, Z., Vahsen, N., Benoit, L., Patel, M.M., Novikowsky, K., Vassault, A., Backx, P.H., Wada, T., Kroemer, G., Rustin, P. and Penninger, J.M. (2005) Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol* **25**, 10261-10272
- Kann, O., Huchzermeyer, C., Kovacs, R., Wirtz, S. and Schuelke, M. (2011a) Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain* **134**, 345-358
- Kann, O., Huchzermeyer, C., Kovacs, R., Wirtz, S. and Schuelke, M. (2011b) Reply: Impaired mitochondrial function abolishes gamma oscillations in the hippocampus through an effect on fast-spiking interneurons. *Brain*, doi:10.1093/brain/awr019
- Kaufman, M.H. and Bard, J.B. (1999) The anatomical basis of mouse development. *Academic Press*
- Kashani-Poor, N., Zwicker, K., Kerscher, S. and Brandt, U. (2001) A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *J Biol Chem* **276**, 24082-24087
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. and Gage, F.H. (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10409-10414
- Kim, K., Lecordier, A. and Bowman, L.H. (1995) Both nuclear and mitochondrial cytochrome c oxidase mRNA levels increase dramatically during mouse postnatal development. *Biochem J* **306**, 353-358
- Kimura, T., Kosaka, J., Nomura, T., Yamada, T., Miki, Y., Takagi, K., Kogami, T. and Sazaki, J. (2004) Quantification of in situ hybridization signals in rat testes. *J Histochem Cytochem* **52**, 813-820
- Kirby, D.M., Crawford, M., Cleary, M.A., Dahl, H.H., Dennett, X. and Thornburn, D.R. (1999) Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* **52**, 1255-1264
- Kirby, D.M., Salemi, R., Sugiana, C., Ohtake, A., Parry, L., Bell, K.M., Kirk, E.P., Boneh, A., Taylor, R.W., Dahl, H.-H.M., Ryan, M.T. and Thornburn, D.R. (2004) NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *J Clin Invest* **114**, 837-845
- Kita, K., Oya, H., Gennis, R.B., Ackrell, B.A.C. and Kasahara, M.N. (1990) Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning for iron sulfur (Ip) subunit of liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **616**, 101-108

- Koopman, W.J., Verkaart, S., Visch, H.J., van der Westhuizen, F.H., Murphy, M.P., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A. and Willems, P.H. (2005) Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C1440-C1450
- Kostovic, I. and Rakic, P. (1980) Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol* **9**, 219-242
- Kostovic, I. and Rakic, P. (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* **297**, 441-470
- Krishnamoorthy, G. and Hinkle, P.C. (1988) Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *J Biol Chem* **263**, 17566-17575
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewky, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. and Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**, 545-553
- Kussmaul, L. and Hirst, J. (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7607-7612
- Lambert, A.J. and Brand, M.D. (2004) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* **279**, 39414-39420
- Larsson, L.I., Traasdahl, B. and Hougaard, D.M. (1991) Quantitative non-radioactive in situ hybridization. Model studies and studies on pituitary proopiomelanocortin cells after adrenalectomy. *Histochemistry* **95**, 209-215
- Larsson, L.I. and Hougaard, D.M. (1993) Sensitive detection of rat gastrin mRNA by in situ hybridization with chemically biotinylated oligodeoxynucleotides: validation, quantitation, and double-staining studies. *J Histochem Cytochem* **41**, 157-163
- Larsson, L.I. and Hougaard, D.M. (1994) Glass slide models for immunocytochemistry and in situ hybridization. *Histochemistry* **101**, 325-331

- Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D.R. and Ryan, M.T. (2007) Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol Cell Biol* **27**, 4228-4237
- Lebre, A.S., Rio, M., Faivre d'Arcier, L., Vernerey, D., Landrieu, P., Slama, A., Jardel, C., Laforet, P., Rodriguez, D., Dorison, N., Galanaud, D., Chabrol, B., Paquis-Flucklinger, V., Grevent, D., Edvardson, S., Steffann, J., Funalot, B., Villeneuve, N., Valayannopoulos, V., de Lonlay, P., Desguerre, I., Brunelle, F., Bonnefont, J.P., Rötig, A., Munnich, A. and Boddaert, N. (2010) A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *J Med Genet* **48**, 16-23
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2001) A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**, 56-65
- Leif, H., Weidner, U., Berger, A., Spehr, V., Braun, M., van Heek, P., Friedrich, T., Ohnishi, T. and Weiss, H. (1993) *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I, a minimal form of mitochondrial complex I. *Biochem Soc Trans* **21**, 998-1001
- Leigh, D. (1951) Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **14**, 216-212
- Lein, E.S., Zhao, X. and Gage, F.H. (2004) Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput *in situ* hybridization. *J Neurosci* **24**, 3879-3889
- Lemire, R.J., Loeser, J.D., Leech, R.W. and Alvord, E.J. (1975) Normal and abnormal development of the human nervous system. *Harper and Row, Hagerstown, MD*
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M.L., Bergamini, C., Bianchi, C. and Biondi, A. (2006) Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1406-1420
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. and Sheng, M. (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **119**, 873-887
- Li, G. and Pleasure, S.J. (2005) Morphogenesis of the dentate gyrus: what we are learning from mouse mutants. *Dev Neurosci* **27**, 93-99
- Lim, C.R., Fukakusa, A. and Matsubara, K. (2004) Gene expression profiling of mouse post-natal cerebellar development using cDNA microarrays. *Gene* **333**, 3-13

- Liu, Y., Fiskum, G. and Schubert, D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**, 780-787
- Liu, P., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2003) A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Research* **13**, 476-484
- Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., Sengers, R., Trijbels, F., Hamel, B., Mullaart, R. and van den Heuvel, L. (1998) The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* **63**, 1598-1608
- Loeffen, J., Smeitink, J., Trijbels, F., Janssen, J.M., Triepels, R., Sengers, R. and van den Heuvel, L. (2000) Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Human Mutat* **15**, 123-134
- Loeffen, J., Elpeleg, O., Smeitink, J., Smeets, R., Stockler-Ipsiroglu, S., Mandel, H., Sengers, R., Trijbels, F. and van den Heuvel, L. (2001) Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol* **49**, 195-201
- Lorente de No, R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol (Lpz)* **46**, 113-177
- Luskin, M.B. and Shatz, C.J. (1985) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones. *J Neurosci* **5**, 1062-1065
- Marin-Padilla, M. (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* **152**, 109-126
- Martin, M.A., Blazquez, A., Gutierrez-Solana, L.G., Fernandez-Moreira, D., Briones, P., Andreu, A.L., Garesse, R., Campos, Y. and Arenas, J. (2005) Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene. *Arch Neurol* **62**, 659-661
- Mathiesen, C. and Hägerhäll, C. (2002) Transmembrane topology of the NuoL, M and N subunits of NADH:quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters. *Biochim Biophys Acta* **1556**, 121-132
- Matoba, R., Kato, K., Kurooka, C., Maruyama, C., Sakakibara, Y. and Matsubara, K. (2000) Correlation between gene functions and developmental expression patterns in the mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* **12**, 1357-1371
- Minai, L., Martinovic, J., Chretien, D., Dumez, F., Razavi, F., Munnich, A. and Rötig, A. (2008) Mitochondrial respiratory chain complex assembly and function during human fetal development. *Mol Genet Metab* **94**, 120-126

- Mody, M., Cao, Y., Cui, Z., Tay, K.-Y., Shyong, A., Shimizu, E., Pham, K., Schultz, P., Welsh, D. and Tsien, J.Z. (2001) Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8862-8867
- Morris, A.A., Farnsworth, L., Ackrell, B.A., Turnbull, D.M. and Birch-Machin, M.A. (1994) The cDNA sequence of the flavoprotein subunit of human heart succinate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1185**, 125-128
- Mullen, R.J., Eicher, E.M. and Sidman, R.L. (1976) Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 208-212
- Munnich, A., Rustin, P., Rötig, A., Chretien, D., Bonnefort, J.P., Nuttin, C., Vormier, V., Vassault, A., Parvy, P., Bardet, J. *et al.* (1992) Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* **15**, 448-455
- Muyrers, J.P., Zhang, Y., Testa, G. and Stewart, A.F. (1999) Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res* **27**, 1555-1557
- Muyrers, J.P., Zhang, Y. and Stewart, A.F. (2001) Techniques: recombinogenic engineering – new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci* **26**, 325-331
- Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99-109
- Ogilvie, I., Kennaway, N.G. and Shoubridge, E.A. (2005) A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* **115**, 2784-2792
- Ohnishi, T., Ragan, C.I. and Hatefi, Y. (1985) EPR studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J Biol Chem* **260**, 2782-2788
- Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 186-206
- Ohnishi, S.T., Ohnishi, T., Muranaka, S., Fujita, H., Kimura, H., Uemura, K., Yoshida, K. and Utsumi, K. (2005) A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembranes* **37**, 1-15
- Okun, J.G., Lümmen, P. and Brandt, U. (1999) Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J Biol Chem* **274**, 2625-2630
- Onishi, Y., Yamazaki, M., Shibuya, H., Tanno, Y. and Tsuji, S. (1998) MERFF/MELAS overlap syndrome associated with 3243 tRNA^{Leu}(UUR) mutation of mitochondrial DNA. *Neuropathology* **18**, 321-327

- Ostergaard, E., Hansen, F.J., Sorensen, N., Duno, M., Vissing, J., Larsen, P.L., Faeroe, O., Thorgrimsson, S., Wibrand, F., Christensen, E. and Schwartz, M. (2007) Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain* **130**, 853-861
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A. and Mootha, V.K. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* **134**, 112-123
- Patel, S.D., Aebersold, R. and Attardi, G. (1991) cDNA-derived amino acid sequence of the NADH-binding 51-kDa subunit of the bovine respiratory NADH dehydrogenase reveals striking similarities to a bacterial NAD(+)-reducing hydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4225-4229
- Pitkanen, S., Feigenbaum, A., Laframboise, R. and Robinson, B. H. (1996) NADH-coenzyme Q reductase (complex I) deficiency: heterogeneity in phenotype and biochemical findings. *J Inherit Metab Dis* **19**, 675-686
- Pokorny, J. and Yamamoto, T. (1981a) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain Res Bul* **7**, 113-120
- Pokorny, J. and Yamamoto, T. (1981b) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. II. Development of ultrastructure in stratum lacunosum and moleculare. *Brain Res Bul* **7**, 121-130
- Poteete, A.R. (2001) What makes a bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett* **201**, 9-14
- Prakash, N. and Wurst, W. (2006) Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* **575**, 403-410
- Procaccio, V. and Wallace, D.C. (2004) Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* **62**, 1899-1901
- Rabier, D., Diry, C., Rötig, A., Rustin, P., Heron, B., Bardet, J., Parvy, P., Ponsot, G., Marsac, C., Saudubray, J.M., Munnich, A. and Kamoun, P. (1998) Persistent hypocitrullinaemia as a marker for mtDNA NARP T 8993 G mutation? *J Inherit Metab Dis* **21**, 216-219
- Ragan, C.I. (1987) Structure of NADH-ubiquinone reductase (complex I). *Top Bioenerget* **15**, 1-36

- Raha, S. and Robinson, B. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* **25**, 502-508
- Rahman, S., Blok, R.B., Dahl, H.H., Danks, D.M., Kirby, D.M., Chow, C.W., Christodoulou, J. and Thorburn, D.R. (1996) Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* **39**, 343-351
- Rakic, P. (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* **33**, 471-476
- Rakic, P. (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* **145**, 61-84
- Rakic, P. (1974) Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* **183**, 425-427
- Rakic, P. (2006) A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex* **16**, Suppl 1: i3-17
- Rice, F.L., Gomez, C., Barstow, C., Brunet, A. and Sands, P. (1985) A comparative analysis of the development of the primary somatosensory cortex: interspecies similarities during barrel and laminar development. *J Comp Neurol* **236**, 477-495
- Robinson, S.R. and Dreher, B. (1990) The visual pathways of eutherian mammals and marsupials develop according to a common timetable. *Brain Behav Evol* **36**, 177-195
- Robinson, B.H. (1993) Lacticacidemia. *Biochim Biophys Acta* **1182**, 231-244
- Robinson, B.H. (1998) Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 271-286
- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F. and Dymecki, S.M. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* **25**, 139-140
- Saada, A., Edvardson, S., Rapoport, M., Shaag, A., Amry, K., Miller, C., Lorberboum-Galski, H. and Elpeleg, O. (2008) C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am J Hum Genet* **82**, 32-38
- Saada, A., Vogel, R.O., Hoefs, S.J., van den Brand, M.A., Wessels, H.J., Willems, P.H., Venselaar, H., Shaag, A., Barghuti, F., Reish, O., Shohat, M., Huynen, M.A., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P. and Nijtmans, L.G. (2009) Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* **84**, 718-727

- Sanger, F., Nicklin, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467
- Saraste, M. and Walker, J.E. (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett* **144**, 250-254
- Sazanov, L.A. and Walker, J.E. (2000a) Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arm. *J Mol Biol* **302**, 455-464
- Sazanov, L.A., Peak-Chew, S.Y., Fearnley, I.M. and Walker, J.E. (2000b) Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry* **39**, 7229-7235
- Sazanov, L.A. and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-1436
- Schägger, H., Brandt, U., Gencic, S. and von Jagow, G. (1995) Ubiquinol cytochrome c reductase from human and bovine mitochondria. *Meth Enzymol* **260**, 82-96
- Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* **19**, 1777-1783
- Schägger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 154-159
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. and Brandt, U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **279**, 36349-36353
- Schilling, B., Aggeler, R., Schulenberg, B., Murray, J., Row, R.H., Capaldi, R.H. and Gibson, B.W. (2005) Mass spectrometric identification of a novel phosphorylation site in subunit NDUFA10 of bovine mitochondrial complex I. *FEBS Lett* **579**, 2485-2490
- Schuelke, M., Loeffen, J., Mariman, E., Smeitink, J. and van den Heuvel, L. (1998) Cloning of the human mitochondrial 51 kDa subunit (NDUFV1) reveals a 100% antisense homology of its 3'UTR with the 5'UTR of the gamma-interferon inducible protein (IP-30) precursor: is this a link between mitochondrial myopathy and inflammation? *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 599-606
- Schuelke, M., Smeitink, J., Mariman, E., Loeffen, J., Plecko, B., Trijbels, F., Stöckler-Ipsiroglu, S. and van den Heuvel, L. (1999) Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet* **21**, 260-261

- Schuelke, M., Detjen, A., van den Heuvel, L., Korenke, C., Janssen, A., Smits, A., Trijbels, F. and Smeitink, J. (2002) New nuclear encoded mitochondrial mutation illustrates pitfalls in prenatal diagnosis by biochemical methods. *Clin Chem* **48**, 772-775
- Schulte, U., Haupt, V., Abelmann, A., Fecke, W., Brors, B., Rasmussen, T., Friedrich, T. and Weiss, H. (1999) A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex. *J Mol Biol* **292**, 569-580
- Semeralul, M.O., Boutros, P.C., Likhodi, O., Okey, A.B., Van Tol, H.H.M. and Wong, A.H.C. (2006) Microarray analysis of the developing cortex. *J Neurobiol* **66**, 1646-1658
- Senior, A.E. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol Rev* **68**, 177-230
- Senior, A.E. (1990) The proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *Annu Rev Biophys Chem* **19**, 7-41
- Sharpley, M.S., Shannon, R.J., Draghi, F. and Hirst, J. (2006) Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria. *Biochemistry* **45**, 241-248
- Singer, T.P., Ramsay, R.R., Sonsalla, P.K., Nicklas, W.J. and Heikkila, R.E. (1993) Biochemical mechanisms underlying MPTP-induced and idiopathic parkinsonism. New vistas. *Adv Neurol* **60**, 300-305
- Skladal, D., Halliday, J. and Thorburn, D.R. (2003a) Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* **126**, 1905-1912
- Skladal, D., Sudmeier C., Konstantopoulou, V., Stockler-Ipsiroglu, S., Plecko-Starting, B., Bernert, G., Zeman, J. and Sperl, W. (2003b) The clinical spectrum of mitochondrial disease in 75 pediatric patients. *Clin Pediatr (Phila)* **42**, 703-710
- Smeitink, J., van den Heuvel, L. and DiMauro, S. (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* **2**, 342-352
- Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A. and Kucherlapati, R.S. (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**, 230-234
- Soriano, E., Del Rio, J.A., Martinez, A. and Super, H. (1994) The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J Comp Neurol* **342**, 571-595

- Stahl, F.W. (1998) Recombination in phage λ : one geneticist's historical perspective. *Gene* **223**, 95-102
- Sugiana, C., Pagliarini, D.J., McKenzie, M., Kirby, D.M., Salemi, R., Abu-Amero, K.K., Dahl, H.H., Hutchison, W.M., Vascotto, K.A., Smith, S.M., Newbold, R.F., Christodoulou, J., Calvo, S., Mootha, V.K., Ryan, M.T. and Thorburn, D.R. (2008) Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* **83**, 468-478
- Super, H., Soriano, E. and Uylings, H.B. (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Rev* **27**, 40-64
- Tavi, P., Hansson, A., Zhang, S.J., Larsson, N.G. and Westerblad, H. (2005) Abnormal Ca_2^+ release and catecholamine-induced arrhythmias in mitochondrial cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* **14**, 1069-1076
- Theiler, K. (1972) The mouse house. *Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York*
- Tole, S., Christian, C. and Grove, E.A. (1997) Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. *Development* **124**, 4959-4970
- Torraco, A., Diaz, F., Vempati, U.D. and Moraes, C.T. (2009) Mouse models of oxidative phosphorylation defects: powerful tools to study the pathobiology of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 171-180
- Triepels, R.H., van den Heuvel, L.P., Loeffen, J.L., Buskens, C.A., Smeets, R.J., Rubio Gosalbo, M.E., Budde, S.M., Mariman, E.C., Wijburg, F.A., Barth, P.G., Trijbels, J.M. and Smeitink, J.A. (1999) Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* **45**, 787-790
- Trijbels, J.M., Scholte, H.R., Ruitenbeek, W., Sengers, R.C., Janssen, A.J. and Busch, H.F. (1993) Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial (encephalo-) myopathies. *Eur J Pediatr* **152**, 178-184
- Tsuji, M., Kuroki, S., Maeda, H., Yoshika, M., Maihara, T., Fujii, T. and Ito, M. (2003) Leigh syndrome associated with West syndrome. *Brain Dev* **25**, 245-250
- Tsukasaki, S., Miyazaki, M., Koji, T., Abe, K., Furusu, A., Shin, M., Suzuki, D., Harada, T., Ozono, Y., Sakai, H. and Kohno, S. (2000) Semi-quantitative non-radioactive *in situ* hybridization and its clinical application. *Acta Histochem Cytochem* **33**, 39-47
- Tsuneoka, M., Teye, K., Arima, N., Soejima, M., Otera, H., Ohashi, K., Koga, Y., Fujita, H., Shirouzu, K., Kimura, H. and Koda, Y. (2005) A novel Myc-target gene, mimitin, that is involved in cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. *J Biol Chem* **280**, 19977-19985

- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344
- Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J. and Nijtmans, L. (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* **13**, 2461-2472
- Ugalde, C., Moran, M., Blazquez, A., Arenas, J. and Martin, M.A. (2009) Mitochondrial disorders due to nuclear OXPHOS gene defects. *Adv Exp Med Biol* **652**, 85-116
- Uhlhaas, P.J., Haenschel, C., Nikolic, D. and Singer, W. (2008) The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophr Bull* **34**, 927-934
- Ullian, E.M., Christopherson, K.S. and Barres, B.A. (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* **47**, 209-216
- Uylings, H.B., Van Eden, C.G., Parnavelas, J.G. and Kalsbeek, A. (1999) The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex, in: Kolb, E. and Tees, R.C., The cerebral cortex of rat. *MIT Press, Cambridge, MA*
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., Feraud, O., Debili, N., Wissing, S., Engelhardt, S., Madeo, F., Piacentini, M., Penninger, J.M., Schägger, H., Rustin, P. and Kroemer, G. (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* **23**, 4679-4689
- Valverde, F., Facal-Valverde, M.V., Santacana, M. and Heredia, M. (1989) Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat: a correlated Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol* **290**, 118-140
- van den Heuvel, L., Ruitenbeek, W., Smeets, R., Gelman-Kohan, Z., Elpeleg, O., Loeffen, J., Trijbels, F., Mariman, E., de Bruijn, D. and Smeitink, J. (1998) Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet* **62**, 262-268
- van den Heuvel, L. and Smeitink, J. (2001) The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *BioEssays* **23**, 518-525
- Videira, A. (1998) Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 89-100

- Villani, G. and Attardi, G. (1997) *In vivo* control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1166-1171
- Villani, G., Greco, M., Papa, S. and Attardi, G. (1998) Low reserve of cytochrome c oxidase capacity *in vivo* in the respiratory chain of a variety of human cell types. *J Biol Chem* **273**, 31829-31836
- Villani, G. and Attardi, G. (2001) *In vivo* measurements of respiration control by cytochrome c oxidase and *in situ* analysis of oxidative phosphorylation. *Meth Cell Biol* **65**, 119-131
- Vinogradov, A.D. and Grivennikova, V.G. (2005) Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 120-127
- Visch, H.J., Rutter, G.A., Koopman, W.J., Koenderink, J.B., Verkaart, S., de Groot, T., Varadi, A., Mitchell, K.J., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A. and Willems, P.H. (2004) Inhibition of mitochondrial Na⁺-Ca₂⁺ exchange restores agonist-induced ATP production and Ca₂⁺ handling in human complex I deficiency. *J Biol Chem* **279**, 40328-40336
- Vogel, R.O., Janssen, R.J., Ugalde, C., Grovenstein, M., Huijbens, R.J., Visch, H.J., van den Heuvel, L.P., Willems, P.H., Zeviani, M., Smeitink, J.A. and Nijtmans, L.G. (2005) Human mitochondrial complex I assembly is mediated by NDUFAF1. *FEBS J* **272**, 5317-5326
- Vogel, R.O., Smeitink, J.A. und Nijtmans, L.G. (2007a) Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 1215-1227
- Vogel, R.O., Janssen, R.J., van den Brand, M.A., Dieteren, C.E., Verkaart, S., Koopman, W.J., Willems, P.H., Pluk, W., van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A. and Nijtmans, L.G. (2007b) Cytosolic signaling protein Ecsit also localizes to mitochondria where it interacts with chaperone NDUFAF1 and functions in complex I assembly. *Genes Dev* **21**, 615-624
- von Kleist-Retzow, J.C., Cormier-Daire, V., Viot, G., Goldenberg, A., Mardach, B., Amiel, J., Saada, P., Dumez, Y., Brunelle, F., Saudubray, J.M., Chretien, D., Rötig, A., Rustin, P., Munnich, A. and De Lonlay, P. (2003) Antenatal manifestations of mitochondrial respiratory chain deficiency. *J Pediatr* **143**, 208-212
- Walker, J.E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the respiratory chain. *Quart Rev Biophys* **25**, 253-324

- Walker, J.E. and Dickson, V.K. (2006) The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 286-296
- Wierenga, R.K., Terpstra, P. and Hol, W.G. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**, 101-107
- Willems, P.H., Smeitink, J.A. and Koopman, W.J. (2009) Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1773-1782
- Wirtz, S. and Schuelke, M. (2011) Region-specific expression of mitochondrial complex I genes during murine brain development. *PLoS One* **6**, e18897
- Womack, M. and Khodakhah, K. (2002) Active contribution of dendrites to the tonic and tri-modal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* **22**, 10603-10612
- Yin, M., Liu, S., Yin, Y., Li, S., Li, Z., Wu, X., Zhang, B., Ang, S.-L., Ding, Y. and Zhou, J. (2009) Ventral mesencephalon-enriched genes that regulate the development of dopaminergic neurons *in vivo*. *J Neurosci* **29**, 5170-5182
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Court, D.L. (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 5978-5983
- Zeviani, M., Tiranti, V. and Piantadosi, C. (1998) Mitochondrial diseases. *Medicine* **77**, 59-72
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P. and Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* **20**, 123-128
- Zhang, Y., Mei, P., Lou, R., Zhang, M.Q., Wu, G., Qiang, B., Zhang, Z. and Shen, Y. (2002) Gene expression profiling in developing human hippocampus. *J Neurosci Res* **70**, 200-208
- Zhao, X., Lein, E.S., He, A., Smith, S.C., Aston, C. and Gage, F.H. (2001) Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J Comp Neurol* **441**, 187-196

10 Abkürzungsverzeichnis

Neben den gängigen Abkürzungen der deutschen Sprache und naturwissenschaftlichen Maßeinheiten wurden folgende Abkürzungen benutzt:

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampizillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bHLH	basisches Helix-loop-Helix Motiv
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CA1	CA1 Region
CA3_dis	distaler Teil der CA3 Region
CA3_prox	proximaler Teil der CA3 Region
CC	<i>Corpus callosum</i>
cDNA	komplementäre DNA
CGI	<i>Cortex granular insular</i>
CI	<i>Capsula interna</i>
Co	Kortex
COM	<i>Commissura anterior</i>
CTA	<i>Cortex temporal anterior</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ds	doppelsträngig
E	Embryonaltag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKZ	externe Körnerzellschicht
EML	<i>Eminentia lateralis</i>
EMM	<i>Eminentia medialis</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Ex	Exon

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	fötales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
FP	Flavoprotein-Fraktion
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G418	Genetizin 418
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
h	Stunde
HIPP	Hippokampus
HP	hydrophobe Fraktion
HYP	Hypothalamus
IKZ	innere Körnerzellschicht
IP	Eisen-Schwefel-Fraktion
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
IZ	intermediäre Zone
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH	Kleinhirnanlage
KH_GANGL	Kleinhirn, <i>Stratum ganglionare</i>
KH_GRAN	Kleinhirn, <i>Stratum granulosum</i>
KH_LAM	Kleinhirn, <i>Laminae medullares</i>
KH_MOL	Kleinhirn, <i>Stratum moleculare</i>
ko	<i>knockout</i>
KP	kortikale Platte
KZ	Körnerzellzone
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MA	Matrix
mDA Neurone	mesenzephalische dopaminerge Neurone
MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenyl-pyridin
MERFF	Myoklonus-Epilepsie mit <i>ragged red fibres</i>
MES	Mesenzephalon
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MS	Molekularschicht
mtDNA	mitochondriale DNA
MZ	Marginalzone, Molekularzone
NADH-H ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NC	<i>Nucleus caudatus</i>
Neo	Neomycin
NES	nicht-essentielle Aminosäuren
NGS	Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
nt	Nukleotid
NTMT	Natriumchlorid-Tris-Magnesiumchloridlösung mit Tween 20

NTri	<i>Nucleus trigeminalis</i>
OB	<i>Bulbi olfactorii</i>
OD _{260, 600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260, 600 nm
PAC	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
PBS	NaCl-Phosphatpuffer (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	<i>Plexus choroideus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penizillin/Streptomycin
Po	<i>Pons</i>
Prä./Migr. Z	prä migratorische und migratorische Zone
Prol. Z.	proliferative Zone
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PZ	Purkinjezellen, Purkinjezellzone
RL	Rautenlippe
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROI	relevante Bildbereiche (<i>region of interest</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse PCR
sec	Sekunde
Sep	<i>Septum</i>
SepMA	Matrix des <i>Septums</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
SSC	Zitratpuffer (<i>saline sodium citrate</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFB	Sonderforschungsbereich
SP	Sub-Platte
STMD	Transmembranhelix (<i>single transmembrane domain</i>)
StMed	<i>Striae medullares</i>
STR	<i>Striatum</i>
Str.or.	<i>Stratum oriens</i>
Str.pyr.	<i>Stratum pyramidale</i>
Str.rad.	<i>Stratum radiatum lacunosum moleculare</i>
SUB	<i>Subiculum</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TH	Thalamus
TMPD	Tetramethylphenyldiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
tRNA	Transfer-RNA
TS	Theiler-Stadium
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV/VIS	Ultraviolettes/sichtbares (<i>visible</i>) Licht
VZ	ventrikuläre Zone, Ventrikelzone
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

11 Anhang

11.1 Primer

Tabelle A.1: Primer für die Herstellung der *antisense*-Sonden zum Einsatz für die ISH

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Ndufa1-f	GGAAGAGAGGTAAAGCCGGGT
Ndufa1-r	TCAGCCAGGAAAATGCTTCCT
Ndufa2-f	TTCACTTATGCCAGCGTTCC
Ndufa2-r	CCTCAGTGTTGCGCAGTAAG
Ndufa3-f	CCGCCAAGAACAAGATGG
Ndufa3-r	ATTGGAGAGCAACAGGGGAAG
Ndufa4-f	CTCAGCCAGGTTGCAGAAG
Ndufa4-r	AGTGGAAAATTGTGCGGATG
Ndufa5-f	GGTTGGAGCCAAGAGTGTTTC
Ndufa5-r	TCAACATTTTCCCTTGCCAGA
Ndufa6-f	CAGCCAGTACCTCGGTGAAG
Ndufa6-r	GGGTCATGGCCCATATAGAA
Ndufa7-f	CCAGTCACAAGCTGTCCAAC
Ndufa7-r	TTAGGTCACACTCTCCCCAGA
Ndufa8-f	TGGAGGAGGTGAAAGTCAGC
Ndufa8-r	CTCTGGCCTTGCTCTTGAGT
Ndufa9-f	AGCTGGGGTTGAGAGATTCA
Ndufa9-r	TAAGGGATGAAGGTCCGATG
Ndufa10-f	AGGCCCTCGACATAGAGTT
Ndufa10-r	CCTGGAGATAGGCAGAGGTG
Ndufab1-f	GGAAGACGAATTTGGGTTTG
Ndufab1-r	ACGCATCCAGAGTGATGTGA
Ndufb2-f	TGGGAAGTGCAGTCTTGCTA
Ndufb2-r	ATCAGGAGGGATTCCCAGTT
Ndufb3-f	GTCTCCGGCTGTAAGGTGA
Ndufb3-r	ATCACCATTCTGGGAATCCA
Ndufb4-f	CAAGATGTCGGGTTCCAAGT
Ndufb4-r	TTTCTTTTCTGTCCCTGTCTG
Ndufb5-f	CTCCAAAGGCAACTCCTGAC
Ndufb5-r	GTCCCAAATAAGCCCCATCT
Ndufb6-f	AGTGACCGGTCCTGTGTAGG
Ndufb6-r	TATCCTGGGCTTCGAGCTAA
Ndufb7-f	TGACCCCGGCTACTAAAGAA
Ndufb7-r	CGCTCACGTTCAAACCTCCTT
Ndufb8-f	CGGAGAGCCTTCCATATGAC
Ndufb8-r	TGAAAACCATGAAAGCCACA
Ndufb9-f	GCCCGGTTTGAAGAACATAA
Ndufb9-r	GCAAGTCACCTTCCCTTCTG
Ndufb10-f	CTACGACCTCGTCGTGGACT
Ndufb10-r	ATAGGCTCCCAGGTCCAAGT
Ndufc1-f	AGCCTGCGGAACAAGATGG
Ndufc1-r	CGTCACTGAGGGTGAATCCAG
Ndufc2-f	CTGCCTCAAGATGATGAACG
Ndufc2-r	ACTGGATGGAATGGCTCAAG
Ndufs1-f	CATGCAAATCCCTCGATTCT
Ndufs1-r	TGCAATCTCACTTGCAAACC
Ndufs2-f	CAGGCCCTTCCATACTTTGA
Ndufs2-r	GTCAGCATCTCCTCCACCTC
Ndufs3-f	GATGAGCTGACACCCATTGA
Ndufs3-r	CCTTAGGTGAGGCCTTTTCC

Ndufs4-f	AAGCTGGCAGACAACCAGAC
Ndufs4-r	CTTGGGTTTTCGGAACCTTCT
Ndufs5-f	ACAGAAAAAGCTGGGCATCA
Ndufs5-r	TCTCTCCAGGGGAAAACAGA
Ndufs6-f	GGAAAAGATCACGCATACCG
Ndufs6-r	CACCATTACAGAGCAGTGG
Ndufs7-f	CCAGGCTGATGTGATGATTG
Ndufs7-r	TCACAAGGGATTCTGGGATT
Ndufs8-f	AATGCAGCTCGGATTCTGAT
Ndufs8-r	CTCCACAATGGCATCAACAG
Ndufv1-f	ATCGCTCGACAGACATTGTG
Ndufv1-r	TGGAGAGTGGACAGCACTTG
Ndufv2-f	CTACCCAGAAGGGCATCAAG
Ndufv2-r	TCCTTGGGTGTCAGATCCTC
Ndufv3-f	GACTCTGATGGGGAGGAACA
Ndufv3-r	CGCTTTCCTTTCCTGTCTTG

Tabelle A.2: Primer für die Klonierung der genomischen *Ndufv1*-Sequenz (Herstellung des Vektors 170-1)

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
Ndufv1-44-f	GGATCAGACCCTGCACAGG	Vektorsonde <i>for</i>
Ndufv1-56-r	ACTTCGATGCACTGGTGCAGGC	Vektorsonde <i>rev</i>
Ndufv1-1403-f	GGCCTACATCTGTGGAGAA	<i>insert</i> -Orientierung
Ndufv1-1404-r	CTCCAAAGGGCACAGAAAA	<i>insert</i> -Orientierung
Ndufv1-1470-f	CCGGATCTTTACCAACCTGT	<i>insert</i> -Sonde <i>for</i>
Ndufv1-1471-r	TGCCATCTGAGGGCTTATTC	<i>insert</i> -Sonde <i>rev</i>

Tabelle A.3: Primer für die Herstellung des *targeting vectors*

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
S1697	GGAGGAGTCGACGAGGCCTCCAATTTGCAGG	Mini <i>targeting vector</i> 1, 5' Arm (PL452)
S1698	GGAGGAGAATTCTTGTGATGGATGCAGGAATG	Mini <i>targeting vector</i> 1, 5' Arm (PL452)
S1699	GGAGGAAGATCTCATGACCTGGGCCAGAGTT	Mini <i>targeting vector</i> 1, 3' Arm (PL452)
S1700	GGAGGAGCGGCCGCCCTTCAATGGATTCAATAAGTGCC	Mini <i>targeting vector</i> 1, 3' Arm(PL452)
S1701	GGAGGAGTCGACCCTTGTCCCACAGGTAGCTATCC	Mini <i>targeting vector</i> 2, 5' Arm (PL451)
S1702	GGAGGAAAGCTTAAAAATACTGCAAGAACCACCCAG	Mini <i>targeting vector</i> 2, 5' Arm (PL451)
S1703	GGAGGAAGATCTCTGTGCCCTTTGGAGAGGAG	Mini <i>targeting vector</i> 2, 3' Arm (PL451)
S1704	GGAGGAGCGGCCGCTCCTGGCCCACACTGTACC	Mini <i>targeting vector</i> 2, 3' Arm (PL451)
S1711	CGGCCAGTGAATTGTAATACG	Überprüfung Ligation der Arme
S1712	CGGTGGATGTGGAATGTGT	Überprüfung Ligation der Arme
S1713	GGGAGGATTGGGAAGACAAT	Überprüfung Ligation der Arme
S1714	TGTGGAATTGTGAGCGGATA	Überprüfung Ligation der Arme
S1732	ACAGTAGGGCTGGGGAACCT	2. loxP-Stelle
S1733	GGCATCCAAACACTCCTTCA	Funktioneller Test 1
S1734	ACAGGCCCAAGTATCTGGTG	2. loxP-Stelle
S1735	ACTGCAAGAACCACCCAGAA	Funktioneller Test 1, 2
		1. loxP-Stelle
		Funktioneller Test 2
		1. loxP-Stelle

Tabelle A.4: Primer für die Herstellung der Southern Blot-Sonden

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
Ndufv1-851-f	TTTGTCTAGAGCTGGGTTCTGAAG	5' Sonde
Ndufv1-852-r	GAGAAAATTAGTTGGACTACAGCGGA	5' Sonde
Ndufv1-853-f	TCCACTGCCTGGCAGACCATC	3' Sonde
Ndufv1-854-r	CACGCACTGTTTCGAGGCACC	3' Sonde

Tabelle A.5: Genotypisierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Verwendungszweck
S2280	TCTGTGGGATCCTGGATC	Genotypisierung der F ₁ -Generation und F ₂ -Generation
S2281	GCCACAGTCGATGAATCCAG	Genotypisierung der F ₁ -Generation und F ₂ -Generation
S2282	GACTGGTGGATTTCCAGGAA	Genotypisierung der F ₁ -Generation und F ₂ -Generation

Für Sequenzierreaktionen wurden oben genannte Primer als Sequenzierprimer in einer 1:40-Verdünnung eingesetzt.

11.2 Oligonukleotidsonden

Tabelle A.6: Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Sonden, sowie der jeweiligen Primer zu ihrer Generierung und der Sondenlänge

Name	Primer	Länge	Funktion
Ndufa1-Sonde	Ndufa1-f	303 nt	ISH-Sonde
	Ndufa1-r		
Ndufa2-Sonde	Ndufa2-f	400 nt	ISH-Sonde
	Ndufa2-r		
Ndufa3-Sonde	Ndufa3-f	314 nt	ISH-Sonde
	Ndufa3-r		
Ndufa4-Sonde	Ndufa4-f	394 nt	ISH-Sonde
	Ndufa4-r		
Ndufa5-Sonde	Ndufa5-f	397 nt	ISH-Sonde
	Ndufa5-r		
Ndufa6-Sonde	Ndufa6-f	349 nt	ISH-Sonde
	Ndufa6-r		
Ndufa7-Sonde	Ndufa7-f	299 nt	ISH-Sonde
	Ndufa7-r		
Ndufa8-Sonde	Ndufa8-f	404 nt	ISH-Sonde
	Ndufa8-r		
Ndufa9-Sonde	Ndufa9-f	399 nt	ISH-Sonde
	Ndufa9-r		
Ndufa10-Sonde	Ndufa10-f	403 nt	ISH-Sonde
	Ndufa10-r		
Ndufab1-Sonde	Ndufab1-f	400 nt	ISH-Sonde
	Ndufab1-r		
Ndufb2-Sonde	Ndufb2-f	328 nt	ISH-Sonde
	Ndufb2-r		
Ndufb3-Sonde	Ndufb3-f	357 nt	ISH-Sonde
	Ndufb3-r		
Ndufb4-Sonde	Ndufb4-f	344 nt	ISH-Sonde
	Ndufb4-r		

Ndufb5-Sonde	Ndufb5-f	353 nt	ISH-Sonde
	Ndufb5-r		
Ndufb6-Sonde	Ndufb6-f	344 nt	ISH-Sonde
	Ndufb6-r		
Ndufb7-Sonde	Ndufb7-f	355 nt	ISH-Sonde
	Ndufb7-r		
Ndufb8-Sonde	Ndufb8-f	349 nt	ISH-Sonde
	Ndufb8-r		
Ndufb9-Sonde	Ndufb9-f	355 nt	ISH-Sonde
	Ndufb9-r		
Ndufb10-Sonde	Ndufb10-f	340 nt	ISH-Sonde
	Ndufb10-r		
Ndufs1-Sonde	Ndufs1-f	400 nt	ISH-Sonde
	Ndufs1-r		
Ndufs2-Sonde	Ndufs2-f	398 nt	ISH-Sonde
	Ndufs2-r		
Ndufs3-Sonde	Ndufs3-f	398 nt	ISH-Sonde
	Ndufs3-r		
Ndufs4-Sonde	Ndufs4-f	348 nt	ISH-Sonde
	Ndufs4-r		
Ndufs5-Sonde	Ndufs5-f	352 nt	ISH-Sonde
	Ndufs5-r		
Ndufs6-Sonde	Ndufs6-f	353 nt	ISH-Sonde
	Ndufs6-r		
Ndufs7-Sonde	Ndufs7-f	339 nt	ISH-Sonde
	Ndufs7-r		
Ndufs8-Sonde	Ndufs8-f	342 nt	ISH-Sonde
	Ndufs8-r		
Ndufc1-Sonde	Ndufc1-f	316 nt	ISH-Sonde
	Ndufc1-r		
Ndufc2-Sonde	Ndufc2-f	366 nt	ISH-Sonde
	Ndufc2-r		
Ndufv1-Sonde	Ndufv1-f	396 nt	ISH-Sonde
	Ndufv1-r		
Ndufv2-Sonde	Ndufv2-f	393 nt	ISH-Sonde
	Ndufv2-r		
Ndufv3-Sonde	Ndufv3-f	352 nt	ISH-Sonde
	Ndufv3-r		
5' Sonde	Ndufv1-851-f	510 nt	<i>screening</i> -Sonde für Southern Blot
	Ndufv1-852-r		
3' Sonde	Ndufv1-853-f	1442 nt	<i>screening</i> -Sonde für Southern Blot
	Ndufv1-854-r		
Vektorsonde	Ndufv1-44-f	306 nt	<i>screening</i> -Sonde für Kolonie-Hybridisierung
	Ndufv1-56-r		
<i>insert</i> -Sonde	Ndufv1-1470-f	282 nt	<i>screening</i> -Sonde für Kolonie-Hybridisierung
	Ndufv1-1471-r		

11.3 Vektorkarten

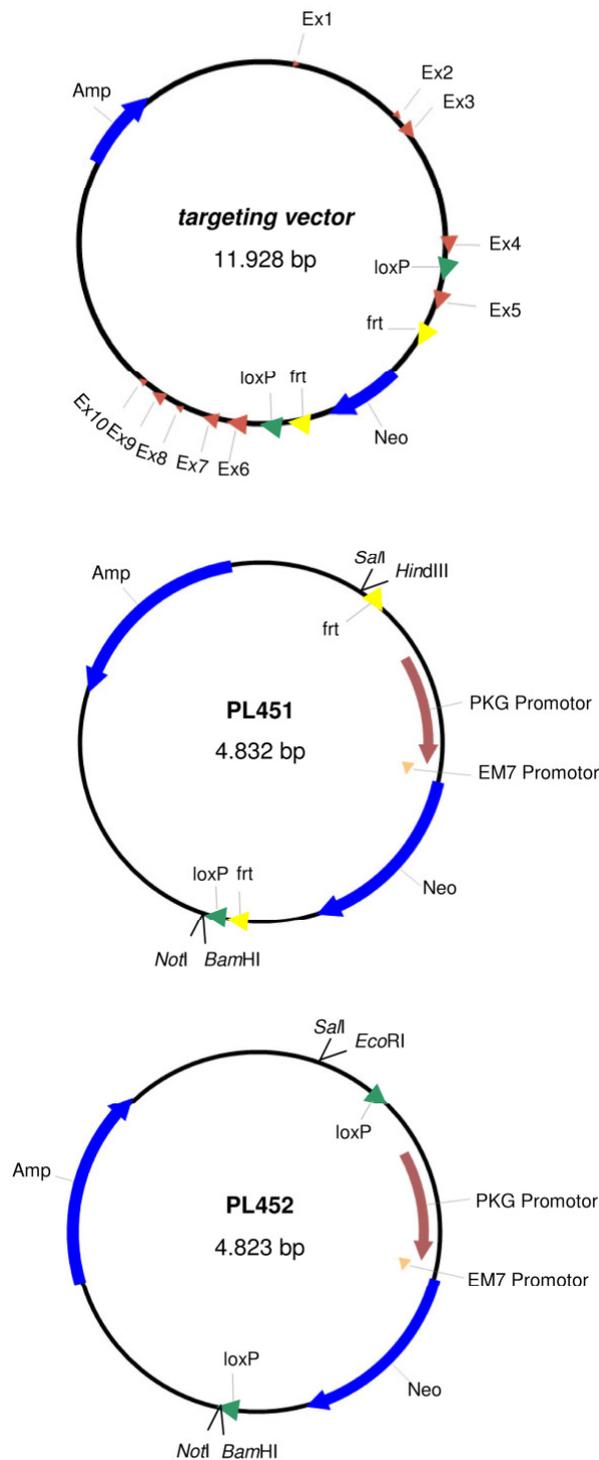


Abb. A.1: DNA-Vektorkarten. Dargestellt sind die in der Promotionsarbeit eingesetzten DNA-Vektoren. In blau dargestellt sind die für die Vektoren spezifischen Antibiotika-Resistenzen, in gelb frt-Stellen, in grün loxP-Stellen. Im *targeting vector* sind zusätzlich die Positionen der Exons 1-10 des *Ndufv1*-Gens aufgeführt. Bei den Plasmiden PL451 und PL452, von denen die Selektionskassetten für die Herstellung des *targeting vectors* bezogen wurden, sind zusätzlich die Schnittstellen für die Erzeugung der zur *Ndufv1*-Zielsequenz homologen Arme eingezeichnet.

11.4 Untereinheiten des mitochondrialen Komplexes I

Tabelle A.7: Übersicht der einzelnen Untereinheiten des humanen mitochondrialen Atmungskettenkomplexes I

Gen	<i>E. coli</i> Homolog	Zugehörigkeit	Funktio- nelle Gruppe	Sub- kom- plex	biochemische Merkmale
<i>ND1</i>	<i>nuoH</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I γ	Ubiquinon-Bindestelle
<i>ND2</i>	<i>nuoN</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I γ	
<i>ND3</i>	<i>nuoA</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I γ	
<i>ND4</i>	<i>nuoM</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I β	
<i>ND4L</i>	<i>nuoK</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I γ	
<i>ND5</i>	<i>NuoL</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I β	
<i>ND6</i>	<i>nuoJ</i>	hydrophobe <i>core</i> -Untereinheit	HP	I α	
<i>NDUFB1</i>	<i>nuoF</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	FP	I λ	NADH-H ⁺ -Bindestelle FMN; [4Fe-4S] (N3)
<i>NDUFB2</i>	<i>nuoE</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	FP	I λ	[2Fe-2S] (N1a)
<i>NDUFB3</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	FP	I λ	
<i>NDUFS1</i>	<i>nuoG</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	IP	I λ	[2Fe-2S] (N1b); [4Fe-4S] (N4); [4Fe-4S] (N5)
<i>NDUFS2</i>	<i>nuoCD</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	IP	I λ	Ubiquinon-Bindestelle
<i>NDUFS3</i>	<i>nuoCD</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	IP	I λ	
<i>NDUFS4</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	IP	I λ	reversible Phosphorylie- rung
<i>NDUFS5</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	IP	I α	Cystein-reiches Motiv
<i>NDUFS6</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	IP	I λ	
<i>NDUFS7</i>	<i>nuoB</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	IP	I λ	[4Fe-4S] (N2)
<i>NDUFS8</i>	<i>nuoI</i>	hydrophile <i>core</i> -Untereinheit	IP	I λ	[4Fe-4S] (N6a); [4Fe-4S] (N6b)
<i>NDUFA1</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	STMD, reversible Phosphorylierung
<i>NDUFA2</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I λ	
<i>NDUFA3</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	STMD
<i>NDUFA4</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	STMD
<i>NDUFA5</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I λ	
<i>NDUFA6</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	
<i>NDUFA7</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I λ	
<i>NDUFA8</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	Cystein-reiches Motiv
<i>NDUFA9</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	reversible Phosphorylie- rung, NADPH-H ⁺ - Bindestelle
<i>NDUFA10</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	Homologie zur mito- chondrialen Thymidin- Kinase
<i>NDUFA11</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α	Homologie zu TIM- Proteinen
<i>NDUFA12</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I λ	
<i>NDUFA13</i> (<i>GRIM-19</i>)		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I λ	STMD, Homologie zu proapoptotischen Faktoren
<i>NDUFB1</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	STMD
<i>NDUFB2</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	STMD
<i>NDUFB3</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	STMD
<i>NDUFB4</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I α + I β	STMD
<i>NDUFB5</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	STMD
<i>NDUFB6</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	STMD
<i>NDUFB7</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	Cystein-reiches Motiv
<i>NDUFB8</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	STMD
<i>NDUFB9</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	
<i>NDUFB10</i>		<i>accessory</i> -Untereinheit	HP	I β	Cystein-reiches Motiv

<i>NDUFB11</i>	accessory-Untereinheit	HP	I β	STMD, reversible Phosphorylierung,
<i>NDUFAB1</i>	accessory-Untereinheit	HP	I α + I β	Phosphopantethein-Gruppe
<i>NDUFC1</i>	accessory-Untereinheit	HP	I λ	STMD
<i>NDUFC2</i>	accessory-Untereinheit	HP	I β	

11.5 Aminosäuresequenz des humanen NDUFV1-Proteins

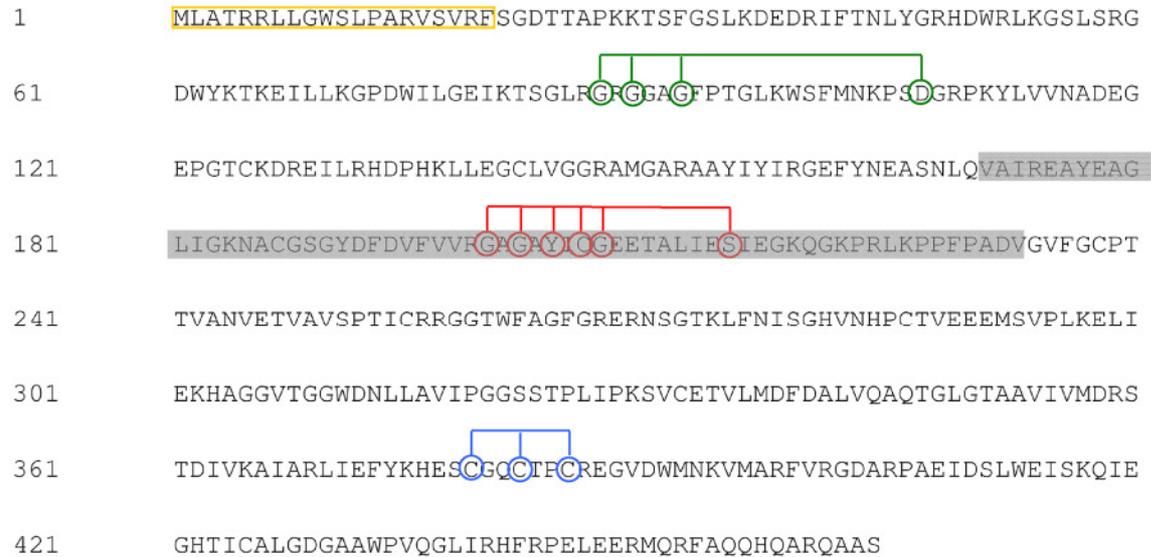
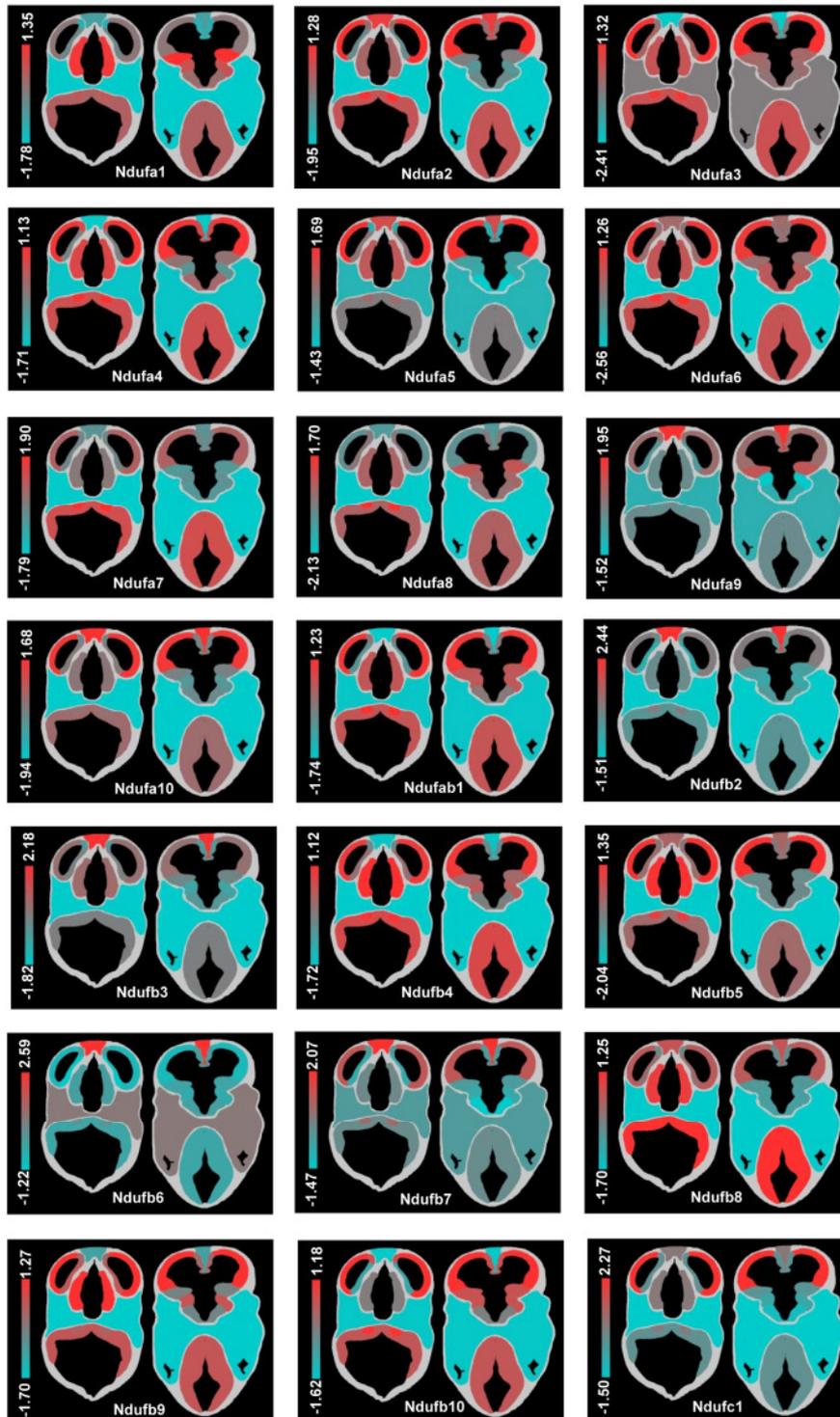
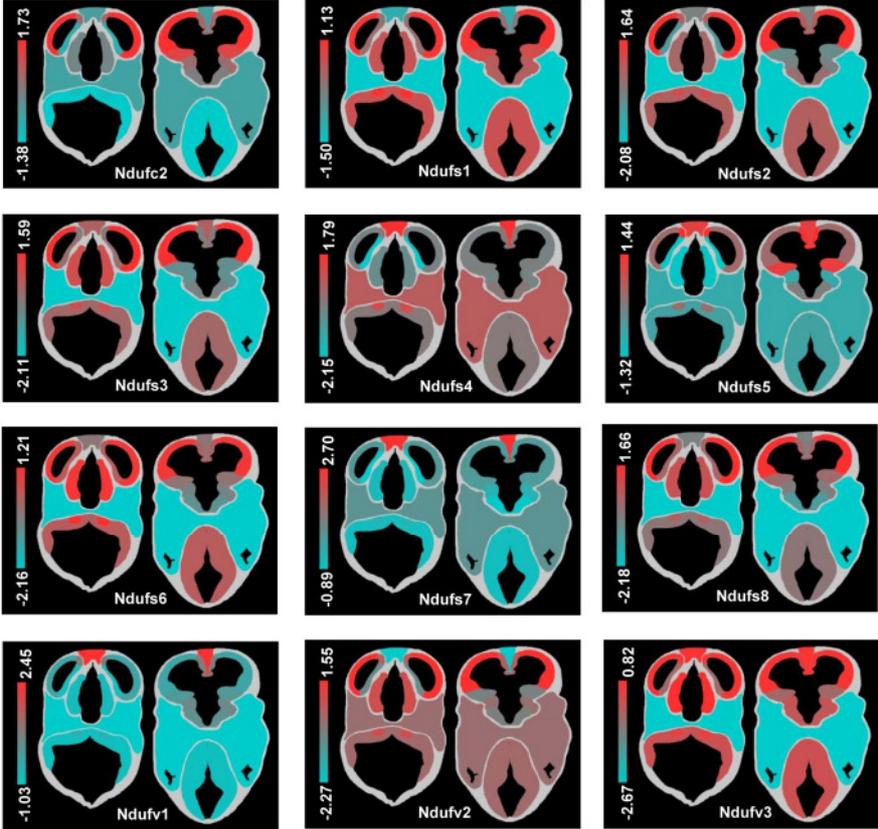


Abb. A.2: Aminosäuresequenz des humanen NDUFV1-Proteins. Die in gelb eingerahmten Aminosäuren bezeichnen die putative Mitochondrien-Import-Sequenz. In grün dargestellt sind die *fingerprint* Motive für die putativen Bindestellen von NADH-H⁺, in rot für FMN und in blau für die Eisen-Schwefel-Cluster. Grau hinterlegt ist die Aminosäuresequenz des Exons 5. Die Nummern indizieren die jeweilige Position der Aminosäure. Die Aminosäuresequenz wurde von GenBank (*accession number* NP 009034.2) bezogen.

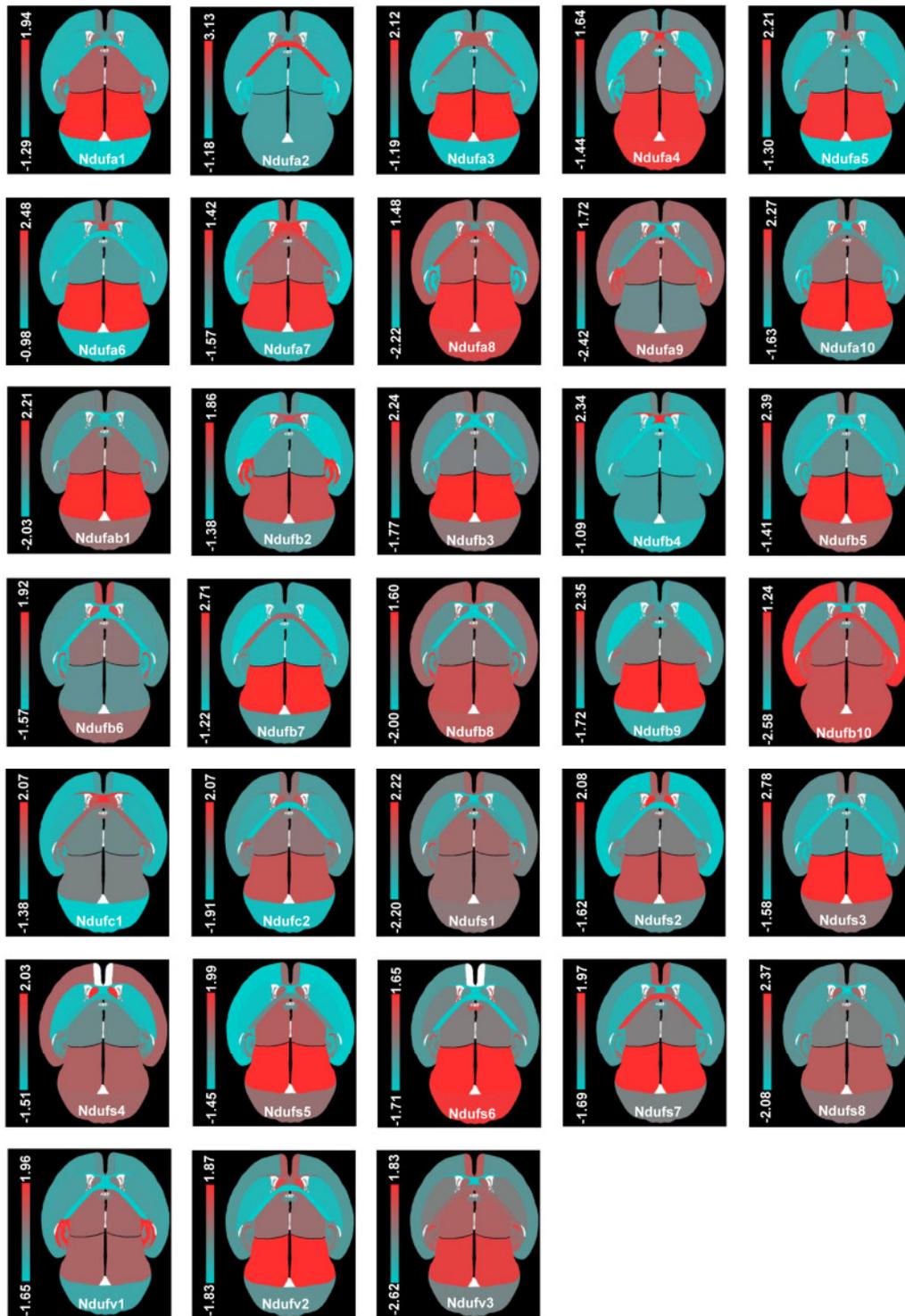
11.6 Heat scale Abbildungen der Komplex I-Expressionsintensitäten

E11.5

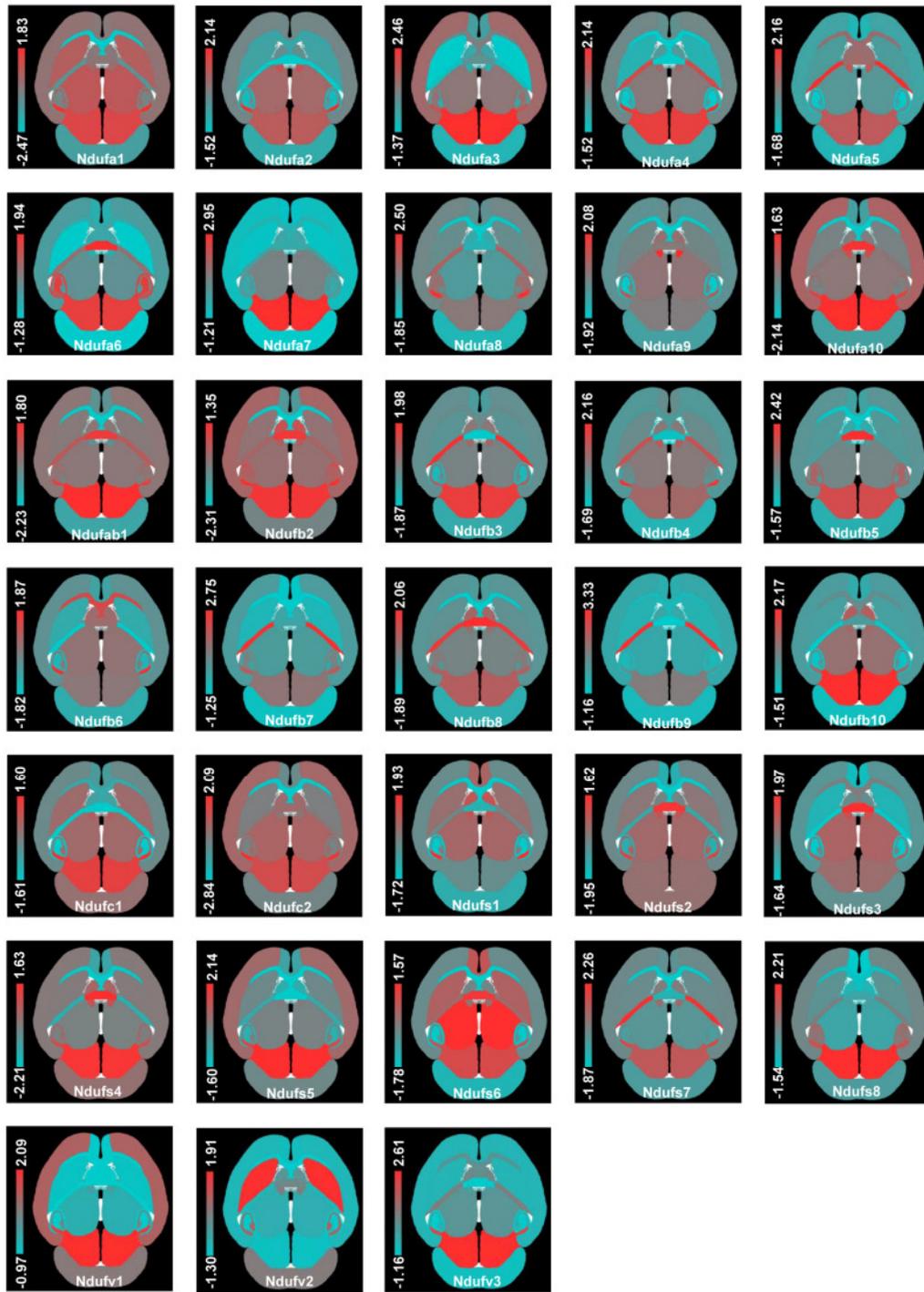




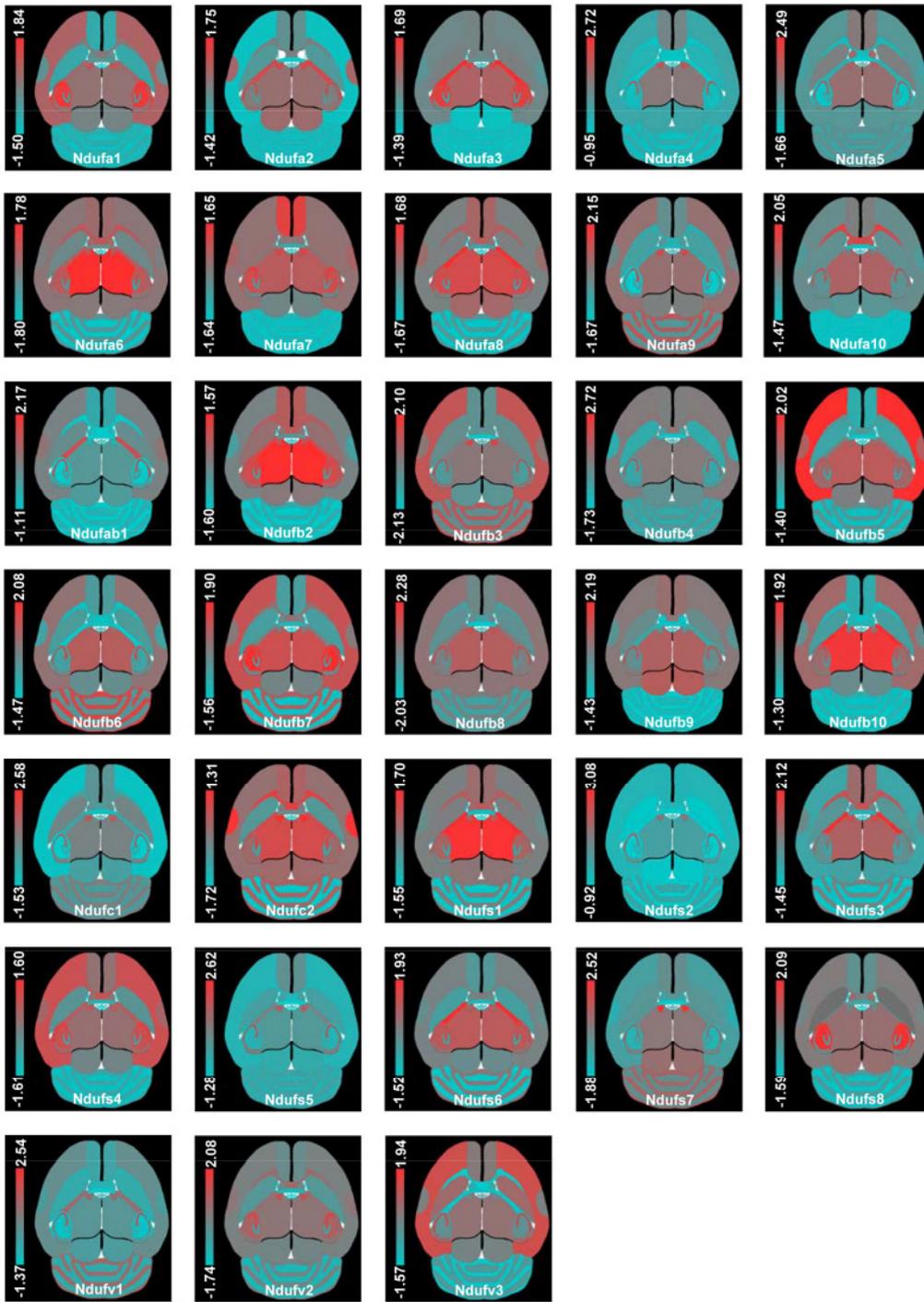
E17.5



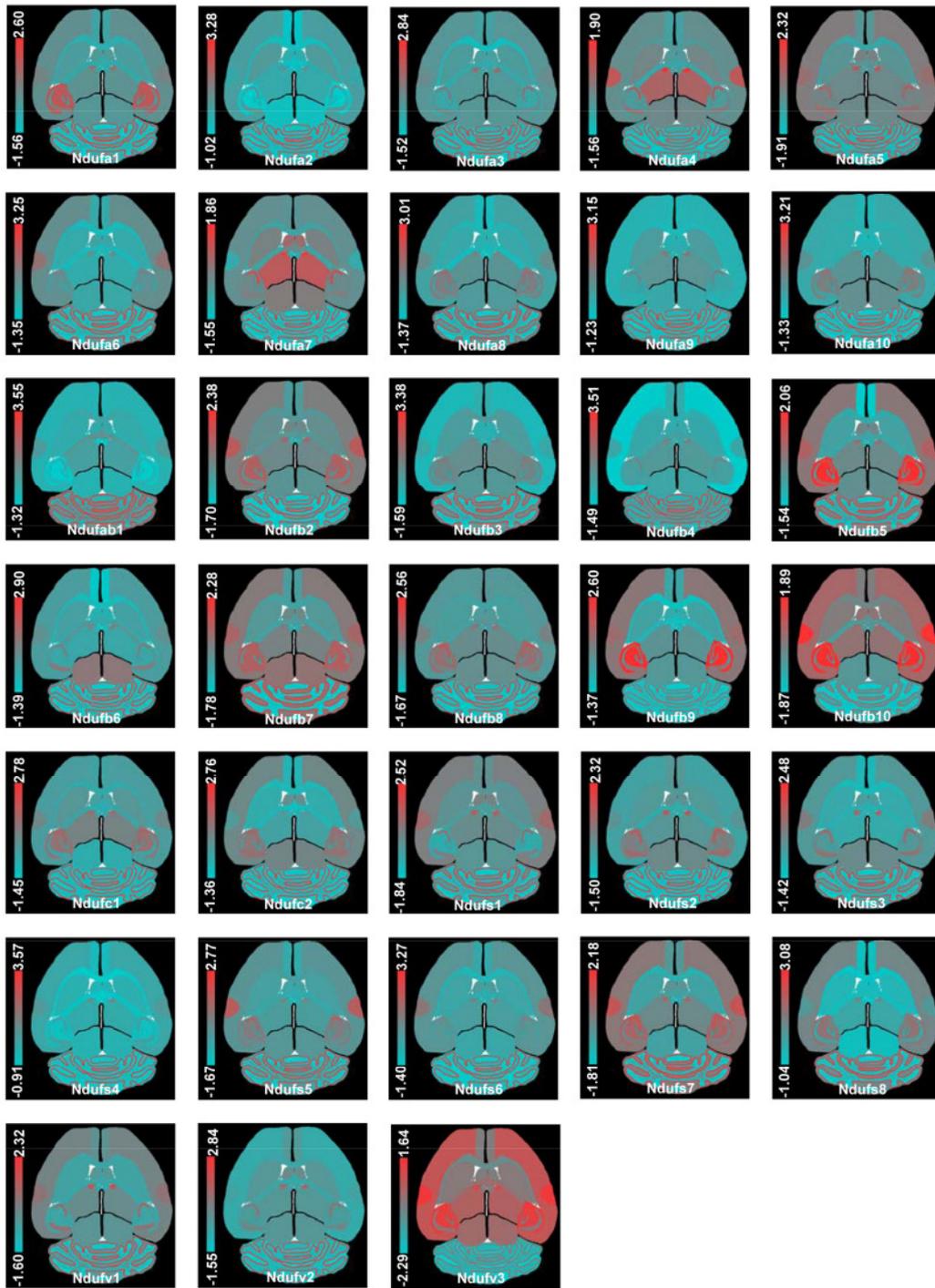
P1



P11



P28



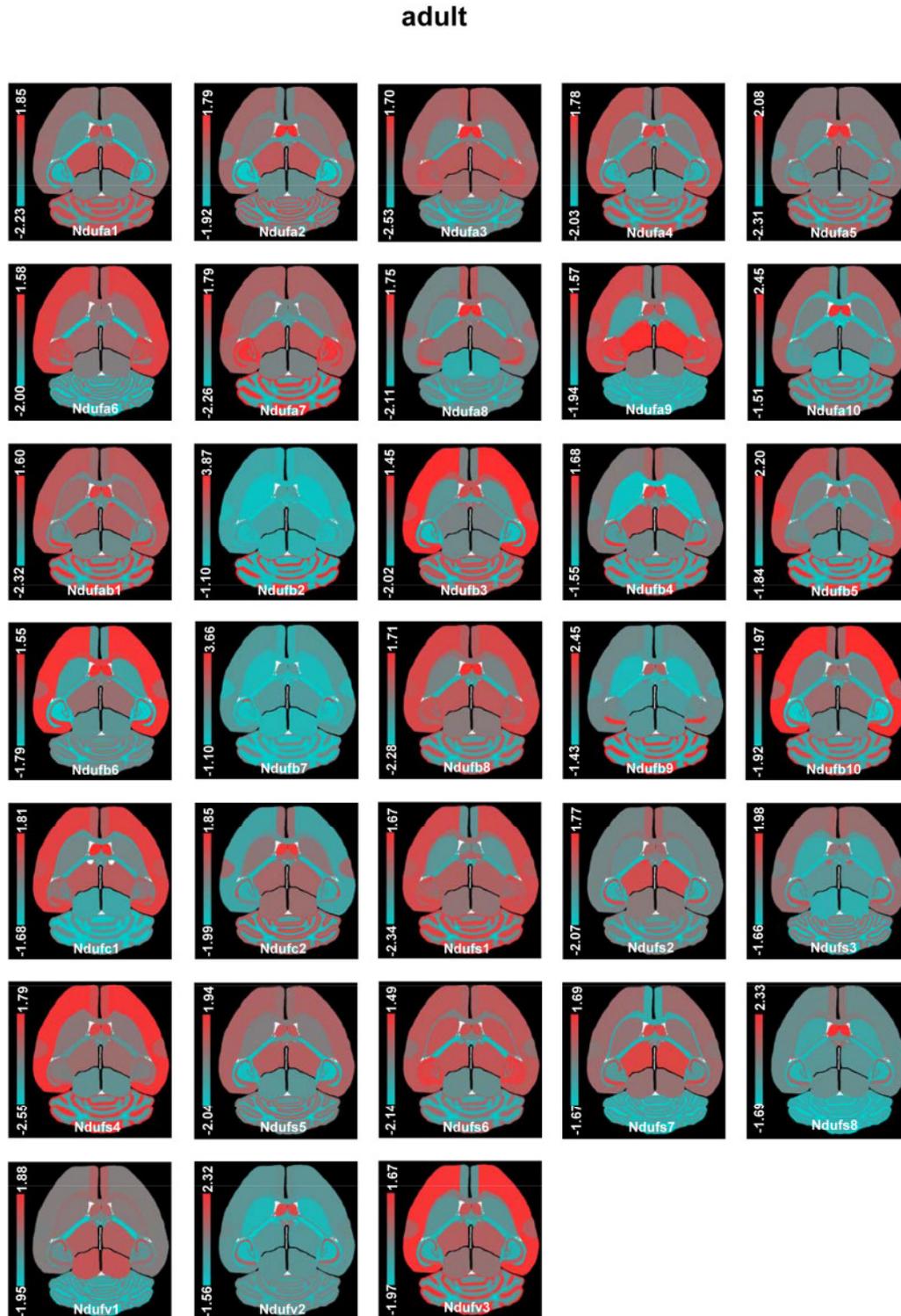


Abb. A.3: Heat scale Abbildungen der Komplex I-Expressionsintensitäten. Die *heat scale* Grafiken zeigen die Intensitätsverteilung der Z-transformierten Intensitäten in räumlicher Auflösung für alle einzelnen Sonden während der untersuchten Stadien prä- und postnataler Entwicklung (Wirtz und Schuelke 2011).

11.7 Publikationen

Veröffentlichungen:

Wirtz, S. and Schuelke, M. (2011) Region-specific expression of mitochondrial complex I genes during murine brain development. *PLoS One* **6**, e18897

Kann, O., Huchzermeyer, C., Kovacs, R., **Wirtz, S.** and Schuelke, M. (2011a) Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain* **134**, 345-358

Kann, O., Huchzermeyer, C., Kovacs, R., **Wirtz, S.** and Schuelke, M. (2011b) Reply: Impaired mitochondrial function abolishes gamma oscillations in the hippocampus through an effect on fast-spiking interneurons. *Brain*, doi:10.1093/brain/awr019

Posterbeiträge:

Wirtz, S. and Schuelke, M. (2008) Topical expression of mRNAs from nuclear encoded complex I subunits in the mouse brain. *The seventh European Meeting on Mitochondrial Pathology (EUROMIT 7)*, Stockholm, Schweden, 11.-14.06.2008

11.8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die sehr gute fachliche Betreuung und das damit verbundene Interesse an meiner Arbeit, sowie sein kontinuierliches Engagement und seine Unterstützung während der letzten Jahre.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Volker Haucke für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre, den wissenschaftlichen Austausch und die vielen Tipps und Tricks im Labor bedanken. Besonders danke ich Barbara Lucke für ihre prompten und zuverlässigen vielen, vielen Sequenzierungen, die sie für mich durchgeführt hat.

Dr. Oliver Kann vom Institut für Neurophysiologie der Charité Berlin danke ich für eine äußerst fruchtsame Zusammenarbeit im Rahmen des gemeinsamen SFB 665 Projekts A6.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Elvira Rohde (AG Prof. Dr. Carmen Birchmeier, MDC-Berlin) für ihre Einführung in die ES-Zellkultur, ihre exzellente technische Unterstützung und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Dr. Sigmar Stricker und Norbert Brieske (AG Prof. Dr. Stefan Mundlos, Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin) danke ich für die Einführung und Hilfestellung beim Erlernen der *in situ* Hybridisierung.

Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Carmen Birchmeier aus dem MDC-Berlin danke ich für die Bereitstellung der FLPe-*deleter*-Mäuse.

Bei Katja Becker (*Small Animal Facility*, MDC-Berlin) bedanke ich mich für die Blastozysteninjektion.

Weiterhin möchte ich mich beim National Cancer Institute, Rockville, MD, USA bedanken, welches mir freundlicherweise die für das *recombineering* benötigten Plasmide und Bakterienstämme zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonders herzlicher Dank gilt letztlich meinen Eltern für ihre großzügige und liebevolle Unterstützung.