

**Untersuchungen zur Pathogenese der
Mitochondriopathien anhand ausgesuchter
Patienten und eines Mausmodells für
den mitochondrialen Komplex I-Mangel**

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

Anja Brinckmann

geboren am 22.09.1976 in Waren/Müritz

August, 2009

Angefertigt zwischen Februar 2004 und August 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld in der Abteilung für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie und dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum (NWFZ) der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Gutachter:

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

2. Prof. Dr. rer. nat. Stephan Sigrist
Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Biologie
Takustr. 3
14195 Berlin

Disputation am 02.02.2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Mitochondrien | 6 |
| 1.1.1 | Ursprung, Struktur und Funktionen | 6 |
| 1.1.2 | Das mitochondriale Genom des Menschen | 7 |
| 1.1.3 | Mitochondriengenetik | 8 |
| 1.1.3.1 | <i>Mitochondrienanzahl und maternale Vererbung</i> | 9 |
| 1.1.3.2 | <i>Mutationsrate</i> | 10 |
| 1.1.3.3 | <i>Heteroplasmie, Heteroplasmiegrad und pathogene Schwellenwerte</i> | 10 |
| 1.1.3.4 | <i>Mitotische Segregation</i> | 11 |
| 1.2 | Mitochondriale Mutationen | 12 |
| 1.3 | Molekulare Interaktion von Zellkern und Mitochondrien | 13 |
| 1.4 | Die mitochondriale Atmungskette | 14 |
| 1.4.1 | Komponenten der Atmungskette | 15 |
| 1.4.1.1 | <i>Komplex I und Komplex I-Mangel</i> | 16 |
| 1.4.1.2 | <i>Die NDUFV1-Untereinheit des Komplexes I</i> | 18 |
| 1.5 | Mitochondriopathien | 20 |
| 1.5.1 | Das MERRF-Syndrom | 20 |
| 1.5.1.1 | <i>Molekulare Pathogenese des MERRF-Syndroms</i> | 21 |
| 1.6 | Mausmodelle | 22 |
| 1.7 | Ziele dieser Arbeit | 24 |
| 2 | Kasuistiken | 25 |
| 2.1 | Patientin A | 25 |
| 2.2 | Patient B | 26 |
| 2.3 | Patientin C | 27 |
| 3 | Material und Methoden | 29 |
| 3.1 | Material | 29 |
| 3.1.1 | Humanes Probenmaterial | 29 |
| 3.1.2 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 30 |
| 3.1.3 | Längen-, Konzentrations- und Größenstandards | 30 |
| 3.1.4 | Restriktionsendonukleasen | 30 |
| 3.1.5 | Oligonukleotide (Primer) | 30 |
| 3.1.6 | Plasmide und Bakterienstämme | 30 |
| 3.1.7 | Zelllinien | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.8 | Mausstämme | 32 |
| 3.1.9 | Antikörper und Konjugate..... | 32 |
| 3.1.10 | Puffer, Lösungen und Medien | 32 |
| 3.1.11 | Software..... | 35 |
| 3.2 | Methoden..... | 35 |
| 3.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 3.2.1.1 | <i>Präparation von DNA aus Zellen und Geweben.....</i> | 35 |
| 3.2.1.2 | <i>Präparation von Plasmid-DNA.....</i> | 37 |
| 3.2.1.3 | <i>Präparation von RNA.....</i> | 37 |
| 3.2.1.4 | <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels UV-Spektrophotometrie ...</i> | 37 |
| 3.2.1.5 | <i>cDNA-Synthese.....</i> | 37 |
| 3.2.1.6 | <i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i> | 38 |
| 3.2.1.7 | <i>long range PCR.....</i> | 38 |
| 3.2.1.8 | <i>RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)-Analyse</i> | 39 |
| 3.2.1.9 | <i>Klonierung von PCR-Produkten.....</i> | 39 |
| 3.2.1.10 | <i>Sequenzierung.....</i> | 40 |
| 3.2.1.11 | <i>Mutationsanalyse des PAX6-Gens</i> | 40 |
| 3.2.1.12 | <i>Pyrosequenzierung</i> | 40 |
| 3.2.1.13 | <i>Quantitative real-time PCR (TaqMan).....</i> | 42 |
| 3.2.1.14 | <i>Southern-Blot.....</i> | 43 |
| 3.2.2 | Zellbiologische Methoden..... | 45 |
| 3.2.2.1 | <i>ES-Zellkultur.....</i> | 45 |
| 3.2.2.2 | <i>Embryonale Mausfibroblasten</i> | 47 |
| 3.2.3 | Proteinbiochemische Methoden | 47 |
| 3.2.3.1 | <i>Proteinpräparation aus Geweben</i> | 47 |
| 3.2.3.2 | <i>Western-Blot</i> | 47 |
| 3.2.3.3 | <i>Messung der Aktivitäten der Atmungskettenenzyme.....</i> | 49 |
| 3.2.3.4 | <i>Laktat- und Glukose-Messungen</i> | 49 |
| 3.2.3.5 | <i>Polarographie.....</i> | 49 |
| 3.2.4 | Histologische Methoden | 50 |
| 3.2.4.1 | <i>Präparation von Maus-Gehirnen für die in situ-Hybridisierung.....</i> | 50 |
| 3.2.4.2 | <i>In situ-Hybridisierung</i> | 50 |
| 3.2.4.3 | <i>Histologie von Muskelbiopsien.....</i> | 51 |
| 3.2.5 | Transmissions-Elektronenmikroskopie | 51 |
| 3.2.6 | Haltung und Verpaarung der Versuchstiere..... | 52 |
| 4 | Ergebnisse | 53 |
| 4.1 | Studie Patientin A | 53 |
| 4.1.1 | Identifizierung der MERRF-Mutation m.8344A→G im <i>mt.tRNA^{Lys}</i> -Gen..... | 53 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.2 | Muskelhistologie..... | 54 |
| 4.1.3 | Quantifizierung der m.8344A→G Heteroplasmie..... | 55 |
| 4.1.4 | m.8344A→G Heteroplasmiegrad im Verhältnis zur mtDNA-Kopienzahl | 58 |
| 4.1.5 | Einfluss der m.8344A→G Mutation auf die mitochondriale Masse, Transkriptionsaktivität und die Translation nukleärer bzw. mitochondrial-kodierter Atmungskettenproteine in verschiedenen Geweben..... | 62 |
| 4.2 | Studie Patient B | 65 |
| 4.2.1 | Identifizierung der mitochondrialen <i>tRNA^{Lys}</i> -Mutation m.8347A→G..... | 65 |
| 4.2.2 | Quantifizierung der mitochondrialen m.8347A→G <i>tRNA^{Lys}</i> -Mutation | 67 |
| 4.2.3 | Identifizierung einer <i>PAX6</i> -Mutation | 67 |
| 4.3 | Studie Patientin C: Mausmodell für mitochondrialen Komplex I-Mangel | 70 |
| 4.3.1 | <i>NDUFV1</i> – Expression im Mausgehirn..... | 70 |
| 4.3.2 | Generierung Komplex I-defizienter Mäuse | 71 |
| 4.3.2.1 | <i>Ndufv1</i> -Targeting | 71 |
| 4.3.3 | Generierung von Mäusen mit <i>Ndufv1</i> -Mutation c.1022C→T | 73 |
| 4.3.4 | Analyse der Mäuse mit einer c.1022C→T <i>Ndufv1</i> – Mutation..... | 75 |
| 4.3.5 | Identifizierung einer zweiten Mutation im <i>Ndufv1</i> -Gen..... | 76 |
| 4.3.6 | Analyse von <i>Ndufv1^{mut/mut}</i> -Mausembryonen und primärer Zelllinien..... | 77 |
| 4.3.6.1 | <i>Morphologie der Ndufv1^{mut/mut}-Mausembryonen</i> | <i>78</i> |
| 4.3.6.2 | <i>Ultrastrukturelle Veränderungen der Zellen und Mitochondrien von Ndufv1^{mut/mut}-Embryonen.....</i> | <i>79</i> |
| 4.3.6.3 | <i>Isolierter Komplex I-Mangel in MEFs des Genotyps Ndufv1^{mut/mut}</i> | <i>82</i> |
| 4.3.6.4 | <i>Anaerobe Atmung in Ndufv1^{mut/mut}-Zellen als Antwort auf den Komplex I-Mangel. 87</i> | |
| 4.3.6.5 | <i>mtDNA-Kopienzahl in Ndufv1^{mut/mut}-Zellen.....</i> | <i>87</i> |
| 5 | Diskussion | 90 |
| 5.1 | Studie Patientin A | 90 |
| 5.1.1 | Interindividueller Schwellenwert für die Expression der <i>mt.tRNA^{Lys}</i> -Mutation m.8344A→G | 90 |
| 5.1.2 | Die regionale Pathologie des MERRF-Syndroms kann nicht durch einen gewebsspezifischen mtDNA-Heteroplasmiegrad erklärt werden | 91 |
| 5.1.3 | Die regionale Pathologie des MERRF-Syndroms ist mit gewebsspezifischen mtDNA-Kopienzahlen assoziiert..... | 94 |
| 5.1.4 | Gewebsspezifische Unterschiede in der Regulation der Mitochondrienbiogenese als Ursache der regionalen Pathologie?..... | 96 |
| 5.2 | Studie Patient B | 98 |
| 5.2.1 | Doppelmutation in <i>PAX6</i> und <i>mt.tRNA^{Lys}</i> verursacht atypische Aniridie mit Mitochondriopathie..... | 99 |
| 5.2.2 | Wahrscheinlichkeit der parallelen Entstehung der nukleären <i>PAX6</i> -Mutation und der mitochondrialen <i>tRNA^{Lys}</i> -Mutation | 101 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.2.3 | Koexistenz zweier pathogener Mutationen als individueller Einflussfaktor auf die klinische Variabilität von Mitochondriopathien | 103 |
| 5.3 | Studie Patientin C: Mausmodell für mitochondrialen Komplex I-Mangel | 104 |
| 5.3.1 | Die <i>Ndufv1</i> -Expression ist besonders stark in den für die klinische Ausprägung von mtDNA-Mutationen anfälligen Gehirnregionen des Menschen..... | 105 |
| 5.3.2 | Generierung der <i>knock-in</i> -Maus und Identifizierung einer zweiten <i>Missense</i> -Mutation im <i>Ndufv1</i> -Gen | 105 |
| 5.3.3 | Die Funktionsstörung der <i>Ndufv1</i> -Untereinheit verursacht ein Absterben der Zellen <i>in vivo</i> aber nicht <i>in vitro</i> | 107 |
| 5.3.4 | Isolierter Komplex I-Mangel als Folge des Funktionsverlustes des <i>Ndufv1</i> -Gens | 108 |
| 5.3.5 | Alternative Energiegewinnung über anaerobe Glykolyse als Folge einer Komplex I-Defizienz <i>in vitro</i> | 110 |
| 5.3.6 | Die Komplex I-Defizienz der kultivierten <i>Ndufv1</i> ^{mut/mut} -Zellen geht nicht mit einer Erhöhung der mtDNA-Kopienzahlen einher..... | 110 |
| 5.3.7 | Vorstellung der kürzlich entwickelten Mausmodelle für einen Komplex I-Mangel. | 111 |
| 6 | Zusammenfassung | 113 |
| 7 | Summary | 115 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 117 |
| 9 | Anhang | 130 |
| 9.1 | Ergänzungen zur Studie der Patientin A | 130 |
| 9.1.1 | Lokalisation einiger Gehirnstrukturen | 130 |
| 9.1.2 | Funktionen einiger Gehirnstrukturen | 131 |
| 9.1.3 | MtDNA-Kopienzahlen in verschiedenen Geweben der Patientin A im Vergleich zu Kontrollgeweben..... | 133 |
| 9.2 | Abkürzungsverzeichnis | 135 |
| 9.3 | Datenbanken/URLs | 137 |
| 9.4 | Firmenverzeichnis | 138 |
| 9.5 | Verwendete Oligonukleotide | 139 |
| 9.5.1 | Studie Patientin A..... | 139 |
| 9.5.2 | Studie Patient B | 140 |
| 9.5.3 | Studie Patientin C – Mausmodell | 141 |
| 9.6 | Lebenslauf..... | 143 |
| 9.7 | Publikationen | 144 |
| 9.8 | Danksagung | 145 |

1 Einleitung

Mitochondrien sind essentielle Bestandteile eukaryotischer Zellen. Sie werden häufig als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da ihre wichtigste biochemische Funktion die Produktion von Energie in Form von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) über die mitochondriale Atmungskette ist. Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels führen zu Mitochondriopathien, einer Gruppe klinisch heterogener Erkrankungen, bei denen sich ein bevorzugter Befall von Geweben und Organen mit hohem aeroben Energiebedarf (Muskeln, Sinnesorgane, Gehirn) zeigt. Mitochondriopathien kommen in der Bevölkerung mit einer Prävalenz von mindestens 1 pro 5.000 Individuen vor und weisen analog zu ihrer genetischen Heterogenität ein weites klinisches Spektrum bezüglich Manifestationsalter, Progressionsgeschwindigkeit und Prognose auf.¹⁻⁶ In den meisten Fällen genetisch determiniert, können sie durch Mutationen der nukleären (gDNA) oder der mitochondrialen DNA (mtDNA) verursacht werden, da die Mitochondrien einer dualen Kontrolle durch beide Genome unterliegen.

Mutationen in der mtDNA wurden erstmals im Jahr 1988 mit neurologischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht.^{7,8} Damit war das Zeitalter der Mitochondriengenetik eingeleitet. Das Wissen um die molekularen und biochemischen Pathogenesemechanismen der Mitochondriopathien hat sich seitdem enorm vergrößert; viele Fragen sind jedoch auch heute noch offen. Allein die Diagnose dieses Krankheitsbildes ist durch die variable Symptomatik und die Vielzahl potentiell betroffener Gene oft nicht einfach. Zudem weist die Mitochondriengenetik fundamentale Unterschiede zur klassischen Mendel-Genetik, welche inzwischen weitestgehend verstanden ist, auf. Neben der maternalen Vererbung von Mitochondrien seien an dieser Stelle nur die hohe Anzahl mitochondrialer DNA-Kopien pro Zelle (Polyplasmie) und damit verbunden das Vorkommen „gemischter“ Genotypen (Heteroplasmie) genannt.

Ideale Modellsysteme für genetische Erkrankungen des Menschen sind mutante Mäuse, da sie *in vivo* Studien zur Aufklärung der Pathomechanismen ermöglichen und die Entwicklung von Therapien voranbringen. Für das Krankheitsbild der Mitochondriopathie im Zusammenhang mit Störungen der Atmungskettenfunktion existieren verschiedene Mausmodelle (zusammengefasst in ⁹). Da ihnen jedoch in den meisten Fällen ein artifizieller Gendefekt zugrunde liegt, der zu einem vollständigen Funktionsverlust des entsprechenden Proteins führt (*knockout*), versterben die Tiere häufig noch während der Embryonalentwicklung oder kurz nach der Geburt. So ist die Untersuchung adulter Tiere kaum möglich und der Wunsch der *Scientific Community* nach einem geeigneten Tiermodell weiterhin groß.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, einige offene Fragen zu den grundlegenden pathogenetischen Mechanismen der Mitochondriopathien zu klären und Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zu liefern. Vorangestellt ist eine kurze Einführung in die Biologie der Mitochondrien.

1.1 Mitochondrien

1.1.1 Ursprung, Struktur und Funktionen

Mitochondrien sind runde oder längliche Zellorganellen im Zytoplasma eukaryotischer Zellen mit einem Durchmesser von 0,2-1 μm und einer Länge von bis zu 8 μm . Der „Endosymbiontentheorie“ zufolge sollen sie aus aeroben Proteobakterien hervorgegangen sein, die von primitiven Eukaryotenzellen aufgenommen wurden und mit diesen eine „Endo“-Symbiose eingegangen sind.¹⁰ Im Laufe der Evolution führte die gegenseitige Abhängigkeit schließlich zur Übertragung von Genen des Protomitochondriums ins Kerngenom der Wirtszelle¹¹ und zum Verlust der Autonomie beider Zellen. Merkmale, die Mitochondrien mit heutigen Prokaryoten gemein haben, z.B. die ringförmige DNA, das Fehlen eines Zellkerns und von Histonen sowie ein eigener Translationsapparat, stützen die Endosymbiontentheorie bis heute.

Ein Mitochondrium (Abbildung 1) ist von zwei Membranen, einer glatten äußeren und einer gefalteten inneren, umgrenzt. Zwischen beiden Membranblättern befindet sich der Intermembranraum, im Inneren die Matrix. Die zahlreichen septenartigen Falten (*Cristae*) der inneren Membran, ragen in den Matrixraum hinein und führen zu einer starken Vergrößerung der inneren Membranoberfläche. Je nach Energiebedarf eines Gewebes können sich die Anzahl und die Ausprägung der *Cristae* von Zelltyp zu Zelltyp stark unterscheiden.

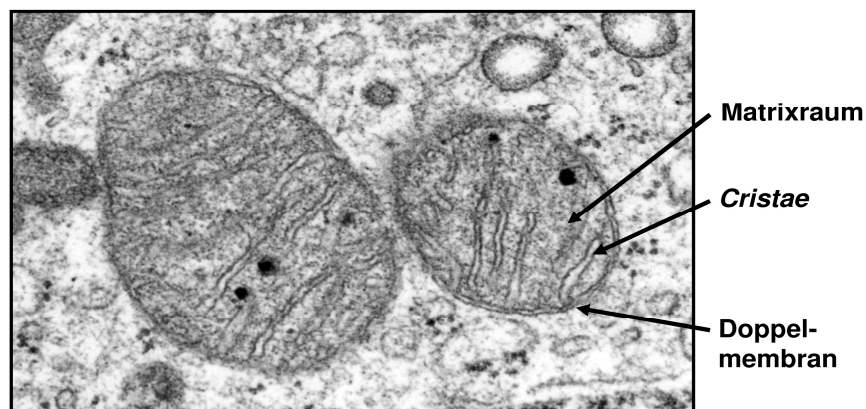


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mitochondrien aus der Niere einer Maus. (Zur Verfügung gestellt von Fr. Schrade, AG Prof. Bachmann, Abteilung für Elektronenmikroskopie, Charité).

Die beiden Mitochondrienmembranen weisen deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung und ihren biophysikalischen Eigenschaften auf. Die äußere Membran beinhaltet nur etwa 6% der mitochondrialen Proteine. In ihr sind unter anderem Porenbildner (Porine) verankert, die das Mitochondrium für Ionen und Metabolite bis zu einer Größe von 5 kDa permeabel machen. Die innere Membran, mit etwa 21% des mitochondrialen Proteingehalts, ist

für fast alle Moleküle außer O₂, CO₂ und H₂O undurchlässig. Hier erfolgt der Stoffaustausch über spezifische Translokatorproteine. Da der überwiegende Teil der funktionellen Systeme der Mitochondrien im Matrixraum lokalisiert ist, findet man hier auch den größten Proteinanteil mit etwa 67%.¹² Dazu zählen unter anderem Enzyme und Transportproteine des Harnstoffzyklus, der β -Oxidation und des Zitratzyklus. Andere Matrixproteine sind an der Synthese bzw. dem Metabolismus von Aminosäuren, Harnstoff, Ketonkörpern, Nukleotiden oder auch des Häm beteiligt. Die Komponenten der Atmungskette sind in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Hier erfolgt die Produktion des universellen Energieträgers ATP durch den Prozess der oxidativen Phosphorylierung. Neben ihrer Zentralstellung im zellulären Stoffwechsel, nehmen die Mitochondrien weitere elementare Funktionen in der Zelle ein, z.B. bei der Regulation des programmierten Zelltods (Apoptose),¹³ bei der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)¹⁴ oder auch als Calcium-Speicher¹⁵.

1.1.2 Das mitochondriale Genom des Menschen

Die mitochondriale DNA wurde 1963 anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Mitochondrien entdeckt.¹⁶ Vier Jahre später folgte die erste Strukturbeschreibung der menschlichen mtDNA durch Clayton und Vinograd¹⁷ und 1981 schließlich die maßgebliche Sequenzaufklärung durch Anderson und Mitarbeiter.¹⁸ Die damals ermittelte Sequenz bildet noch heute, in leicht modifizierter Form, die Grundlage der humanen mtDNA-Referenzsequenz (siehe MITOMAP-Datenbank).

Das Mitochondriengenom (Abbildung 2) besteht aus nur einem zirkulären DNA-Doppelstrang, der eine Länge von 16.569 Basenpaaren (bp) hat und in der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist. Die beiden Einzelstränge der mtDNA werden aufgrund ihrer Basenzusammensetzung als schwerer H (*heavy*)-Strang, mit einem hohen Guaninanteil, und als leichter L (*light*)-Strang, mit einem hohen Cytosinanteil, unterschieden. Die insgesamt 37 Gene, von denen sich 28 auf dem H-Strang und 9 auf dem L-Strang befinden, sind eng beieinander angeordnet und besitzen keine Introns. Sie kodieren 22 Transfer-RNAs (tRNAs) und 2 ribosomale RNAs (rRNAs) des mitochondrialen Proteinsyntheseapparates sowie 13 Polypeptiduntereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V. Die einzige längere mitochondriale Sequenz (1,1 kbp) ohne kodierende Funktion ist ein partiell dreisträngiger DNA-Abschnitt, der sogenannte *displacement-loop* (D-loop). Als Kontrollregion der mitochondrialen Replikation und Transkription beinhaltet der D-loop den Replikationsursprung des H-Strangs sowie die Promotoren zur Transkription des L- und H-Strangs. Der Replikationsursprung des L-Strangs befindet sich einige 100 Basenpaare stromabwärts des D-loops.

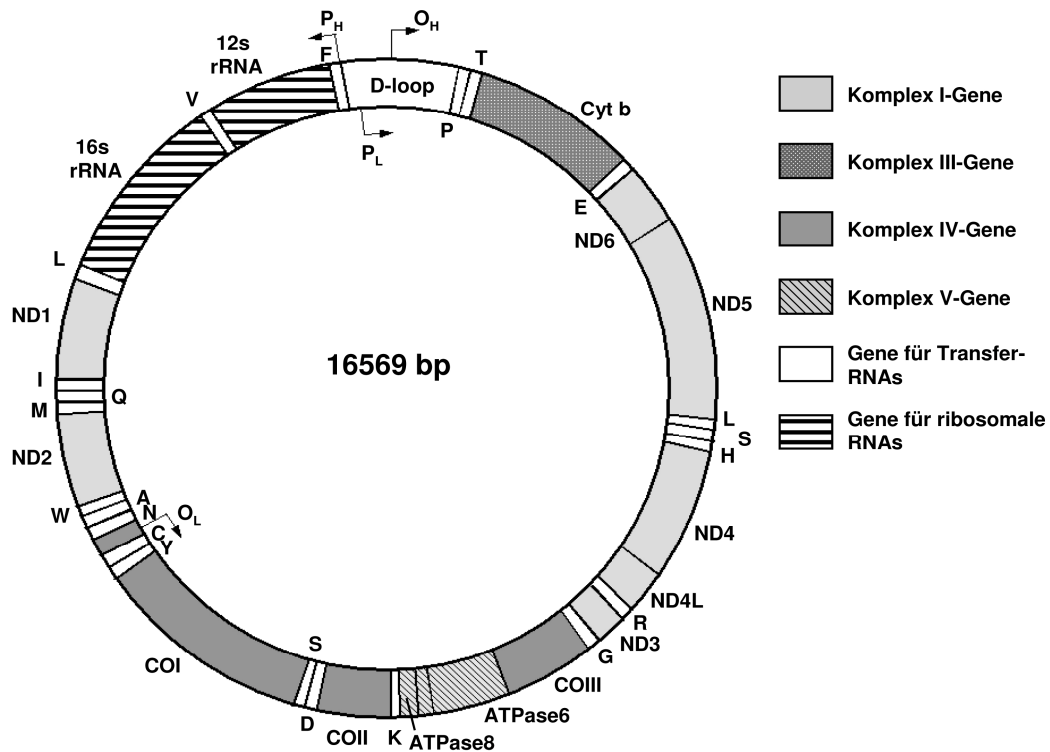


Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen Mitochondriengenoms. Gene, die vom H-Strang kodiert werden, sind außerhalb des Kreises dargestellt und die vom L-Strang kodierten Gene im Kreisinneren. O_H und O_L kennzeichnen die Startpunkte der Replikation des jeweiligen Strangs und P_H bzw. P_L die Transkriptionspromotoren; die Pfeile zeigen die Richtung der Replikation/Transkription an (Abbildung modifiziert nach MITOMAP-Datenbank).

Obwohl die mitochondriale DNA sehr anfällig für Mutationen ist (Abschnitt 1.1.3.2), findet man die mtDNA-Sequenz größtenteils evolutionär konserviert. Dennoch sind im Laufe der Zeit eine Reihe neutraler Nukleotidaustausche aufgetreten, die für die mitochondriale Sequenzvariabilität zwischen Populationen und Volksstämmen und die Entstehung mitochondrialer Haplotypen verantwortlich sind. Das phylogenetische Verteilungsbild dieser Polymorphismen dient der Erforschung der Evolution und Migration des neuzeitlichen Menschen.¹⁹

1.1.3 Mitochondriengenetik

Im Vergleich zur „Mendel’schen Genetik“ nukleärer DNA weist die Mitochondriengenetik elementare Unterschiede auf, die für das Verständnis von der Ätiologie und Pathogenese mitochondrialer Erkrankungen maßgeblich sind: **(1)** Mitochondrien werden normalerweise rein mütterlich (maternal) vererbt; **(2)** Zellen enthalten mehrere 100 Mitochondrien und zum Teil über 1.000 mitochondriale Genome; **(3)** die mtDNA weist im Vergleich zur gDNA eine erhöhte Mutationsrate auf; **(4)** Mutationen können zum Auftreten „gemischter“ Genotypen mit zwei oder mehreren mtDNA-Sequenzvarianten in einer Zelle, einem Organ oder einem Individuum führen; einem Zustand, welchen man als „Heteroplasmie“ bezeichnet; **(5)** der prozen-

tuale Anteil mutierter mtDNA-Kopien eines heteroplasmischen Organismus (Heteroplasmiegrad oder Mutationslast) beeinflusst den Schweregrad einer mitochondrialen Erkrankung; **(6)** die Aufteilung der Mitochondrien bei der Zellteilung erfolgt stochastisch (mitotische Segregation); **(7)** mitochondriale Mutationen manifestieren sich klinisch erst ab einem bestimmten Heteroplasmiegrad (pathogener Schwellenwert). Das komplexe Zusammenspiel dieser Faktoren, das bisher nur in Ansätzen verstanden ist, begründet unter anderem die Vielgestaltigkeit von Mitochondriopathien und die Problematik der Diagnosestellungen.

1.1.3.1 Mitochondrienanzahl und maternale Vererbung

Körperzellen enthalten zwischen 100 und 1.000 Mitochondrien, mit jeweils 2-10 mtDNA-Kopien, was einer durchschnittlichen mtDNA-Kopienzahl von etwa 10^3 - 10^4 pro Zelle entspricht. Davon abweichend findet man in Spermien nur etwa 100,²⁰ in reifen Eizellen sogar mehr als 50.000 mtDNA-Kopien.²¹ Die Gesamtzahl mitochondrialer Genome kann sich jedoch in Körperzellen verschiedener Zelltypen, Gewebe und zwischen Zellen unterschiedlicher Stoffwechselaktivität erheblich unterscheiden.^{22, 23} Morton *et al.* (2007) zeigten z.B. eine kontinuierliche Zunahme mitochondrialer DNA in der menschlichen Leber im Verlauf der ersten zwei Lebensjahre.²⁴ Mehrfach wurde auch ein Zusammenhang zwischen zunehmender mtDNA-Menge und oxidativem Stress in Zellen verschiedener Gewebe nachgewiesen.²⁵

Die Vererbung mitochondrialer DNA und der damit verbundenen genetischen Merkmale erfolgt bei Säugern normalerweise rein maternal, d.h. die mtDNA-Genome werden nur von den Müttern an ihre Nachkommen weitergegeben. Gründe für die fast ausschließliche Vererbung der mtDNA über die mütterliche Linie sind, neben dem Unterschied der Mitochondrienzahl von Spermien und Eizellen, physikalische und biochemische Barrieren der Eizellen, die eine Aufnahme und den Verbleib paternaler Mitochondrien weitestgehend verhindern. Kommt es dennoch bei der Befruchtung zum Eintritt von Spermienmitochondrien in die Eizelle, wird die ohnehin meist schon durch reaktive Sauerstoffmoleküle geschädigte väterliche mtDNA von Eizellproteinen aktiv abgebaut.²⁶ Vor einigen Jahren wurde die paternale Vererbung mitochondrialer DNA bei *Drosophila melanogaster* entdeckt.²⁷ Bei Säugern ist dies jedoch sehr selten, da die Rate väterlicher zu mütterlichen mtDNA-Kopien bei Mäusen nur etwa 1:10.000 beträgt.²⁸ Beim Menschen ist bisher nur ein einziger Fall bekannt, bei dem ein Vater eine mitochondriale Mutation an seinen Sohn vererbt hat. Während die mitochondriale DNA im Blut des Jungen der mtDNA seiner Mutter entsprach, wiesen 90% der mitochondrialen Genome seines Muskels die beim Vater identifizierte Mutation auf.²⁹ Da nachfolgende Untersuchungen von Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen keinen weiteren Fall paternaler Vererbung beim Menschen aufdecken konnten,³⁰⁻³² wird bisher davon ausgegangen, dass dieser einmalige Befund nicht grundsätzlich im Widerspruch zur generell maternalen Vererbung von mtDNA beim Menschen steht.

1.1.3.2 Mutationsrate

Mitochondriale DNA hat eine wesentlich höhere Mutationsrate als die DNA des Zellkerns.³³ In einigen Abschnitten des mtDNA-Moleküls erreicht diese sogar das 5-10fache der Rate nukleärer DNA und führt damit zu einem hohen Grad an Variabilität.^{34, 35} Die erhöhte Mutationsrate wird durch mehrere Faktoren erklärt: mtDNA ist im Gegensatz zur gDNA einer Vielzahl reaktiver Sauerstoffspezies (Peroxid, Sauerstoff- und Superoxidradikale) ausgesetzt, die im Zuge der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium entstehen und die freiliegende mtDNA leichter angreifen können als die von Histonen geschützte gDNA.³⁶ Zudem scheinen die DNA-Reparaturmechanismen in den Mitochondrien ineffizienter zu sein als die Mechanismen im Zellkern,³⁷ weshalb sich Mutationen schneller anreichern können. Die hohe Dichte genetischer Information, aufgrund fehlender Introns, bietet pathogenen Mutationen zusätzlich ein breites Angriffsfeld. Eine altersabhängige Anreicherung von mtDNA-Deletionen und Punktmutationen, besonders in der mitochondrialen Promotorregion (D-loop), wird bisher noch kontrovers diskutiert.³⁸⁻⁴⁰ Untersuchungen an mtDNA-„Mutator“-Mäusen sprechen jedoch dafür. Die fehlende *proof-reading* Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase γ führt in diesen Tieren zu einer Anhäufung von mtDNA-Mutationen und gleichzeitig zu einem vorzeitigen Altern (Progerie) und einem frühen Tod der Tiere.^{41, 42}

1.1.3.3 Heteroplasmie, Heteroplasmiegrad und pathogene Schwellenwerte

Mutationen in der nukleären DNA können in zwei Zuständen vorliegen: heterozygot (ein Allel eines Gens betreffend) oder homozygot (beide Allele eines Gens betreffend). Da eine menschliche Zelle aber eine Vielzahl von mtDNA-Kopien besitzt, ist diese Einteilung für mitochondriale Mutationen nicht anwendbar, und man verwendet eine andere Nomenklatur. Sind alle Kopien der mtDNA einer Zelle, eines Gewebes oder eines Individuums identisch, wird dies als „Homoplasmie“ bezeichnet. Von „Heteroplasmie“ spricht man hingegen, wenn zwei, oder selten auch mehrere, verschiedene mitochondriale Genotypen stabil koexistieren. Der Heteroplasmiegrad wird dann als prozentualer Anteil des mutierten Allels angegeben. MtDNA-Heteroplasmie wird entweder von der Mutter über die Keimbahn vererbt oder entsteht durch somatische Neumutationen.

Der Grad einer heteroplasmischen Mutation (auch Mutationslast genannt) kann zwischen 1 und 99% variieren. Diese Varianz findet sich nicht nur zwischen verschiedenen Individuen, sondern auch zwischen verschiedenen Geweben eines Menschen oder sogar zwischen den Zellen eines Gewebes.⁴³ Aus diesem Grund können Patienten mit gleichem mutanten Genotyp deutlich unterschiedliche Krankheitsverläufe bezüglich Manifestationsalter und Schweregrad der Erkrankung aufweisen.⁴⁴ Wie Weber *et al.* (1997) an einem Patienten mit einer Mutation im mitochondrialen *tRNA^{Leu}*-Gen zeigten, kann sich der Heteroplasmiegrad mit zunehmendem Alter erhöhen.⁴⁵ Eine solche Korrelation zwischen Heteroplasmie und Alter

würde zwar eine Erklärung für den progressiven Krankheitsverlauf bei vielen Patienten mit Mitochondriopathien liefern, ist jedoch nicht für alle mitochondrialen Mutationen nachweisbar.⁴⁶ Typischerweise geht ein höherer Heteroplasmiegrad mit einer schwereren Symptomatik einher. Dies wurde z.B. für das MERRF (*myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers*; OMIM 545000)- und das MELAS (*mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*; OMIM 540000)-Syndrom gezeigt.^{47, 48} Aber nicht alle Individuen mit einer heteroplasmischen Mutation entwickeln auch einen klinischen Krankheitsphänotyp, und nicht alle Gewebe mit dem gleichen Heteroplasmiegrad sind auch pathologisch verändert. Für verschiedene mtDNA-Mutationen wurde ein prozentualer, pathogener Schwellenwert (*threshold*) der Heteroplasmie ermittelt.⁴⁹ Erst wenn dieser überschritten ist, manifestiert sich der genetische Defekt aufgrund zunehmender Beeinträchtigung der mitochondrialen Energieproduktion. Gewebe mit hohem aeroben Energiebedarf, wie Muskeln oder das zentrale Nervensystem, sind somit besonders anfällig.⁵⁰ Pathogene Schwellenwerte liegen in der Regel zwischen 50 und 80% mutierter mtDNA-Kopien, wobei individuelle Faktoren und der genetische Hintergrund des Individuums einen großen Einfluss haben können.

1.1.3.4 Mitotische Segregation

Häufig werden schon zwischen Geschwistern große Unterschiede im Heteroplasmiegrad beobachtet.⁵¹ Ferner kann eine heteroplasmische Mutation oder Sequenzvariante innerhalb weniger Generationen homoplasmisch werden.⁵² Im Hinblick auf die vergleichsweise geringe Zahl an Zellteilungen in der mütterlichen Keimbahn ist diese rasche Entmischung heteroplasmischer Genotypen sehr erstaunlich. Erklärt wird dieses Phänomen mit Hilfe der *Bottleneck* (Flaschenhals)-Hypothese,⁵³ die besagt, dass es in der Keimzellentwicklung einen Prozess geben muss, der nur einer geringen Anzahl mitochondrialer DNA-Einheiten die Vererbung gewährt. Durch Untersuchungen an heteroplasmischen Mäusen konnten Jenuth *et al.* (1996) den *Bottleneck* auf das Stadium der primordialen Keimzellen in der frühen Oogenese zurückführen, währenddessen die Anzahl der mtDNA-Moleküle drastisch auf 200 pro Zelle reduziert wird. Im Verlauf der folgenden Zellteilungen sollen die Mitochondrien zufällig, zu gleichen Anteilen, an die Tochterzellen weitergegeben werden, wodurch die Unterschiede im Heteroplasmiegrad in den reifen Eizellen entstünden (Abbildung 3).⁵⁴ Die zufällige Verteilung der Mitochondrien ist allerdings umstritten. Schuelke *et al.* (1998) fanden in einer Familie mit einer Mutation im mitochondrialen *tRNA^{Ser(UCN)}*-Gen eine Zunahme des Heteroplasmiegrades innerhalb einer Generationsfolge von 4 auf 100%.⁵⁵ Mit einem *Bottleneck* von 200 mitochondrialen Einheiten und einer Zufallsverteilung wäre diese Zunahme extrem unwahrscheinlich. Andere Faktoren, die eine schnelle Entmischung heteroplasmischer mtDNA-Genome ermöglichen würden, wie eine positive Selektion mutierter mtDNA durch Replikati-

onsvorteile oder ein Clusterverhalten von Mitochondrien, werden diskutiert.^{43, 56} Nach neuesten Erkenntnissen von Cree *et al.* (2008)⁵⁷ ist der von Jenuth *et al.* postulierte *Bottleneck* in den ersten primordialen Keimzellen jedoch nicht in allen Zellen gleich. Sie ermittelten eine Varianz von 20-2.000 mtDNA-Kopien zwischen den einzelnen Zellen. Im Zusammenhang mit einer Zufallsverteilung der Mitochondrien würde dies wiederum die extremen innerfamiliären Unterschiede im Heteroplasmiegrad erklären können.

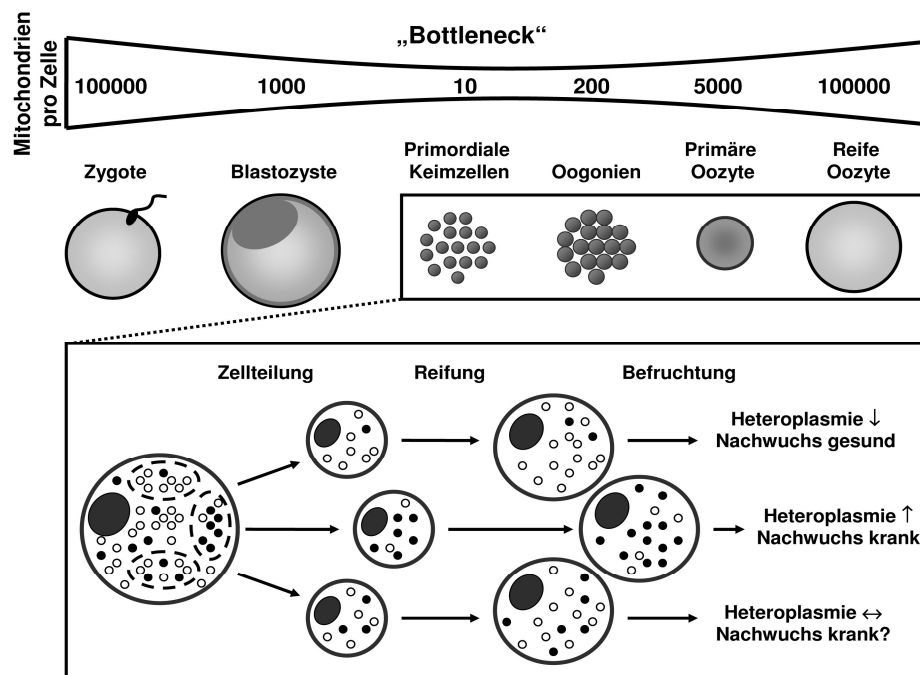


Abbildung 3: Vorstellung vom mitochondrialen *Bottleneck*. Während der Eizellenentwicklung (Oogenese) verändert sich die Anzahl der Keimzellen und der Mitochondrien pro Keimzelle erheblich. Ein drei Wochen alter weiblicher Embryo beherbergt etwa 50 Urkeimzellen (primordiale Keimzellen) mit je ~10 Mitochondrien. In der Folgezeit kommt es zu einer rapiden Zunahme der Zellzahl. So enthält der Embryo in der neunten Woche bereits über eine halbe Million Oogonien mit jeweils ~200 Mitochondrien. Es wird angenommen, dass sich der *Bottleneck* in einer sehr frühen Phase zwischen Urkeimzellen- und Oogonienstadium auswirkt, wenn eine geringe Zahl an Urkeimzellen in die Gonaden wandert. Die mutierten mtDNA-Moleküle werden dann durch eine Zufallsverteilung oder auch durch Selektion fixiert.

1.2 Mitochondriale Mutationen

Seit der Entdeckung der ersten mtDNA-Mutationen 1988,^{7, 8} sind über 100 verschiedene pathogene Mutationen der mitochondrialen DNA identifiziert worden (siehe MITOMAP-Datenbank). Diese können fast ausschließlich in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: ausgedehnte Genomveränderungen, wie große Deletionen oder Duplikationen, und Punktmutationen. Da ausgedehnte Genomveränderungen überwiegend sporadisch als Neumutationen auftreten, geht man davon aus, dass sie durch ein einzelnes Mutationsereignis in der mütterlichen Oozyte oder in der frühen Embryogenese entstehen.^{58, 59} Punktmutationen sind dagegen meistens von der Mutter vererbt. Aufgrund der hohen Polymorphismusrate der mtDNA

gestaltet sich ihre Bewertung in pathogene Mutation *versus* benigner Polymorphismus, im Gegensatz zu mtDNA-Deletionen oder -Duplikationen, oftmals schwierig. Die „kanonischen“ Kriterien, nach denen Punktmutationen als pathogen eingestuft werden, sind **(1)** eine hohe evolutionäre Konservierung und damit eine funktionell wichtige Position des betroffenen Nukleotids; **(2)** das Auftreten in heteroplasmischer Form, da die meisten pathogenen Mutationen (insbesondere mt.tRNA-Mutationen) in homoplasmischer Form mit dem Leben nicht vereinbar wären (wobei es hier zahlreiche Ausnahmen gibt, wie z.B. LHON^{*}-Mutationen); **(3)** eine Korrelation zwischen der Schwere des klinischen Phänotyps und dem Heteroplasmiegrad bei verschiedenen Familienangehörigen und **(4)** der fehlende Nachweis des jeweiligen Nukleotidaustausches in mindestens 100 gesunden Individuen des gleichen ethnischen Hintergrunds.⁶⁰

Über 50% der bisher identifizierten mitochondrialen Punktmutationen betreffen die mt.tRNA-Gene.⁶¹ Ein klassisches Beispiel ist das MERRF-Syndrom, welches durch Mutationen im *tRNA^{Lys}*-Gen verursacht wird. In Abhängigkeit von der Lage der Mutation im *tRNA^{Lys}*-Gen und dem jeweiligen Heteroplasmiegrad kann der klinische Phänotyp Betroffener jedoch vom klassischen MERRF-Syndrom (Abschnitt 1.5.1) bis hin zu isolierten Myopathien (Skelettmuskelmyopathie, Kardiomyopathien und **Progressiver Externer Ophthalmoplegie (PEO)**), Diabetes mellitus und Taubheit deutlich variieren. Diese Variabilität in der Ausprägung mitochondrialer Mutationen muss man zum Teil auch auf bisher nicht näher geklärte nukleäre Einflussfaktoren („genetischer Hintergrund“) zurückführen. So findet man z.B. bei der LHON-Erkrankung, die mit verschiedenen mtDNA-Mutationen assoziiert ist, überwiegend männliche Betroffene, was die Beteiligung mindestens eines geschlechtsspezifischen nukleär-kodierten Gens nahe legt.⁶² Nach der „Zwei-Locus-Hypothese“ könnten auch Polymorphismen in nukleär kodierten Proteinen der Atmungskette, die *per se* nicht pathogen sind, in Kombination mit einer mitochondrialen Mutation die klinische Symptomatik von Patienten mit Mitochondriopathien deutlich verstärken.⁶³

1.3 Molekulare Interaktion von Zellkern und Mitochondrien

Die meisten mitochondrialen Proteine werden vom Zellkern kodiert und müssen nach der Translation aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien transportiert werden. Zu diesen gehören zahlreiche Proteinuntereinheiten der Atmungskette (Abschnitt 1.4), alle Proteinbestandteile des mitochondrialen Translationssystems und alle Genprodukte die eine Rolle bei der Transkription und Replikation der mtDNA spielen.⁶⁴

Zwei verschiedene Klassen regulatorischer Proteine sind bei Säugern für die Interaktion zwischen Zellkern und Mitochondrien auf der Ebene der Transkription verantwortlich. Die erste

^{*} LHON, *leber hereditary optic neuropathy*, OMIM 535000

Klasse beinhaltet kernkodierte Faktoren, welche die Expression mitochondrialer Gene regulieren. Dazu zählt unter anderem der *mitochondrial transcription factor A* (TFAM; OMIM 600438). Zur zweiten Klasse gehören kernkodierte Faktoren, die die Expression kernkodierter Atmungskettenproteine steuern, wie z.B. der Transkriptionsfaktor *nuclear respiratory factor 1* (NRF1; OMIM 600879).⁶⁵

Anfang der 90er Jahre wurde in einem *in vitro* System gezeigt, dass TFAM stromaufwärts der mtDNA-Promotoren des L- bzw. H-Strangs bindet und dadurch die mtDNA-Transkription initiiert.^{66, 67} Inzwischen weiß man auch, dass er eine wichtige Funktion bei der Regulation der mtDNA-Menge in den Zellen hat.⁶⁸ Das Ausschalten des *Tfam*-Gens führt bei Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der mtDNA-Menge, die mit verringerten Atmungskettenaktivitäten und einem frühen Tod einhergeht.⁶⁸⁻⁷⁰

Der Transkriptionsfaktor NRF1 bindet hingegen an Promotorbereiche von nukleären Genen, die entweder direkt Untereinheiten der Atmungskette kodieren^{71, 72} oder deren Genprodukte an der Expression und der korrekten Zusammensetzung der Atmungskettenuntereinheiten beteiligt sind.⁶⁴ Er wirkt als positiver Transkriptionsregulator, wobei die Anlagerung an die Promotorenregionen über eine spezifische DNA-Bindedomäne und spezifische DNA-Erkennungssequenzen erfolgt.^{73, 74} Wird das *Nrf1*-Gen in Mäusen ausgeschaltet, ist dies bereits während der frühen Embryonalentwicklung (E3,5-E6,5) letal. Die *Nrf1*^{-/-}-Blastozysten weisen drastisch reduzierte mtDNA-Kopienzahlen auf und sind selbst in Kultur nicht mehr wachstumsfähig.⁷⁵ Im Gegenzug dazu beobachtete man in menschlichen Muskelzellen und kultivierten Myotuben, die eine erhöhte mitochondriale Proliferation aufwiesen, gleichzeitig eine Zunahme der *NRF1*-mRNA-Menge.⁷⁶⁻⁷⁸ Da NRF1 auch an die Promotorregion des *TFAM*-Gens binden kann,⁷⁹ scheint es eine Art übergeordnete Verwaltungsfunktion bei der „bigenomischen“-Expression von Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette zu haben.

1.4 Die mitochondriale Atmungskette

Der wichtigste eukaryotische Energieträger ATP wird bei Tieren hauptsächlich in den Mitochondrien über den Prozess der oxidativen Phosphorylierung gebildet. Dabei werden in einer Reihe von Redoxreaktionen Elektronen über verschiedene Enzymkomplexe und Trägerproteine von NADH[†] (reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotids) und FADH₂ (reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotids), die aus der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus hervorgehen, auf molekularen Sauerstoff (O₂) übertragen. Die Komponenten dieser sogenannten Atmungs- oder Elektronentransportkette sind in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Beim Transport der Elektronen durch die Membran entsteht

[†] Nomenklatur nach IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)/IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)

freie Energie, die zum größten Teil zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran und schließlich mit Hilfe eines weiteren Enzymkomplexes (F_1F_0 -ATPase) zur ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt wird. Einige der ATP-Moleküle werden für energieabhängige Reaktionen im mitochondrialen Matrixraum benötigt. Das meiste ATP wird jedoch vom Adenin-Nukleotid-Translokator im Austausch gegen zytosolisches ADP ins Zytoplasma der Zelle transportiert (Abbildung 4).

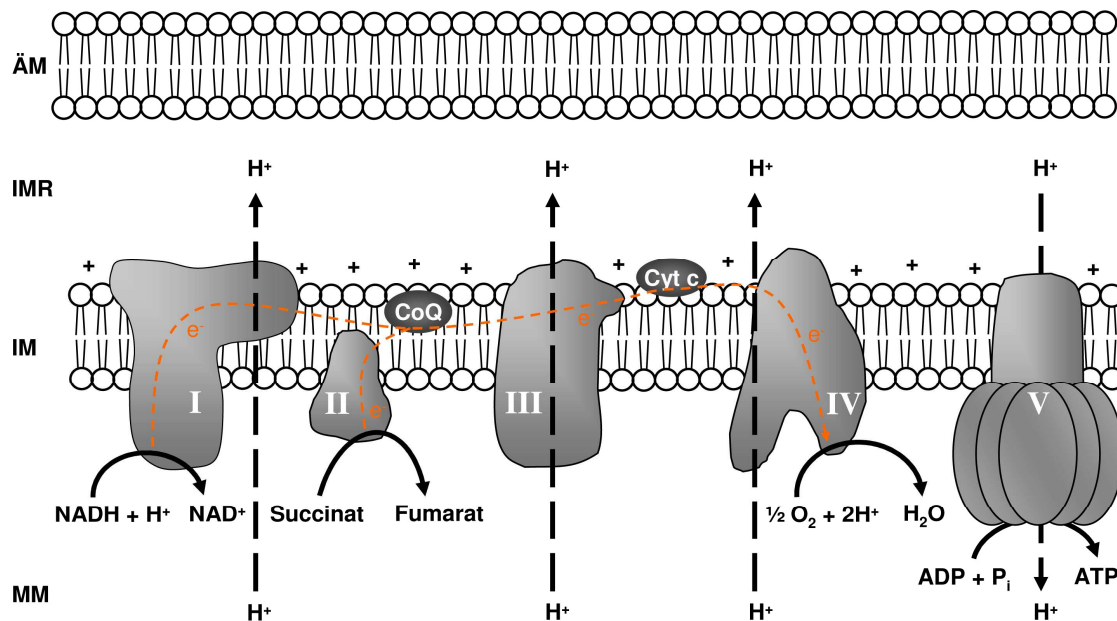


Abbildung 4: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Die Atmungskettenkomplexe sind in der inneren Mitochondrienmembran (IM) lokalisiert. Der Elektronentransport (orange Linie) beginnt an den Komplexen I und II und verläuft über Ubichinon, Komplex III und Cytochrom c bis zum Komplex IV, an dem die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Parallel fließen an den Komplexen I, III und IV Protonen (H^+) aus der Mitochondrienmatrix (MM) in den Intermembranraum (IMR) und führen dort zu einer Ansammlung positiver Ladungsträger und zur pH-Senkung. Der Rückfluss der Protonen durch den Komplex V in die MM erzeugt Energie, die zur Synthese von ATP aus ADP und Phosphat (P_i) genutzt wird. ÄM, äußere Membran.

1.4.1 Komponenten der Atmungskette

Die Atmungskette umfasst vier Multienzymkomplexe, Komplex I (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat: Ubichinon Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinol: Cytochrom c Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom c Oxidase), die in spezifischen Orientierungen in der inneren Mitochondrienmembran verankert sind. Zusätzlich gibt es zwei bewegliche Elektronenüberträger zwischen den Atmungskettenkomplexen: Ubichinon (Coenzym Q10) und Cytochrom c (Cyt c). Vervollständigt wird das System der oxidativen Phosphorylierung durch die ATP produzierende F_1F_0 -ATPase (auch ATP-Synthase genannt), mittels welcher die Protonen zurück in die Matrix gelangen und die häufig als Komplex V bezeichnet wird (Abbildung 4).

Einleitung

Die Atmungskettenkomplexe sind aus zahlreichen Polypeptiden aufgebaut und enthalten eine Reihe verschiedener Coenzyme und prosthetischer Gruppen, über die der schrittweise Elektronentransfer erfolgt. Zu diesen gehören unter anderem Flavine (Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)), Eisen-Schwefel-Zentren und Häm-Gruppen. Die Komplexe I und II übertragen zunächst Elektronen von NADH bzw. vom Succinat (*via* FADH₂) auf Ubichinon, welches in der Folge zu Ubichinol reduziert wird. Das in der Membran schnell diffundierende Ubichinol gibt ein Elektronenpaar an den Komplex III weiter, welcher es wiederum auf das kleine Häm-Protein Cyt c überträgt. Komplex IV überträgt dann das Elektronenpaar von Cyt c an den finalen Elektronenakzeptor molekularen Sauerstoff, der unter Bindung zweier Wasserstoffionen schließlich zu Wasser reagiert (Abbildung 4).

Im Gegensatz zum Proteinkomplex II reichen die Komplexe I, III und IV als Transmembrankomplexe durch die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum hinein. Parallel zum Elektronentransport pumpen sie pro übertragenem Elektron ein Proton aus der Matrix in den mitochondrialen Intermembranraum. Hierbei entsteht ein elektrochemischer Gradient (pH-Gradient und elektrisches Transmembranpotential) über der inneren Mitochondrienmembran, der in einer protonenmotorischen Kraft resultiert. Sobald Protonen durch die transmembranständige F₁F₀-ATPase in den Matrixraum zurückfließen, wird ATP gebildet. Dieses als „Chemiosmotische Kopplung“ bezeichnete Prinzip der ATP-Synthese wurde 1961 von Peter Mitchell postuliert (1978 Nobelpreis für Chemie)⁸⁰ und ist experimentell bis heute gestützt.

Bis auf Komplex II, der vollständig nukleär kodiert ist, enthalten alle Atmungskettenkomplexe sowohl nukleär, als auch mitochondrial kodierte Polypeptiduntereinheiten. Die insgesamt etwa 70 Untereinheiten, die vom Zellkern kodiert sind, werden im Zytoplasma als unreife Proteinvorstufen mit verlängerten aminoterminalen Peptidsequenzen (*Leader*-Sequenzen) synthetisiert, ins Mitochondrium transportiert und dort unter Abspaltung der *Leader*-Sequenzen als reife Polypeptide mit den anderen Untereinheiten zusammengesetzt.⁸¹ Das fein abgestimmte Zusammenspiel aller Untereinheiten ist für die Funktion der Atmungskette essentiell, und Mutationen, welche die Funktion einer Untereinheit beeinträchtigen, können sich nachhaltig auf die Aktivität des jeweiligen Komplexes und schließlich auf die gesamte Atmungskettenaktivität auswirken.

1.4.1.1 Komplex I und Komplex I-Mangel

Der Atmungskettenkomplex I ist mit 45 beschriebenen Untereinheiten, von denen 7 mitochondrial und 38 nukleär kodiert sind, der größte Komplex der mitochondrialen Atmungskette des Menschen. Obwohl dieser Proteinkomplex erstmalig im Jahre 1962 isoliert wurde,⁸² sind aufgrund der komplexen Zusammensetzung und Membranständigkeit seine enzymatischen Eigenschaften und seine molekulare 3D-Struktur noch immer nicht vollständig geklärt. Der

überwiegende Teil der heutigen Erkenntnisse zu seiner Struktur wurde von Walker und seinen Mitarbeitern anhand von Komplex I-Extrakten aus Rinderherzen gewonnen.^{83, 84} Bis auf die uncharakterisierte 46. Untereinheit konnten für alle Komplexuntereinheiten, die beim Rind gefunden wurden, Homologe beim Menschen identifiziert werden (Abbildung 5).

Die Größe des Komplexes I kann zurzeit nur geschätzt werden. Davon ausgehend, dass jede identifizierte Untereinheit nur einmal im Komplex vorkommt, sollte er nach Hirst *et al.* (2003) eine Größe von etwa 980 kDa haben.⁸⁵ Hochauflösende elektronenmikroskopische Analysen von Mitochondrien des Rinderherzens⁸⁶ sprechen zudem für eine L-förmige Komplexstruktur. Die L-Form ergibt sich aus zwei senkrecht zueinander stehenden Armen – ein hydrophober Arm, der in die innere Mitochondrienmembran eingebettet ist und ein hydrophiler Arm, der aus der Membran in die mitochondriale Matrix hineinragt (Abbildung 4; Abbildung 5). Biochemisch lässt sich der Komplex in vier Subkomplexe aufspalten.^{84, 87, 88} Die membranständigen hydrophoben Subkomplexe I β und I γ , enthalten unter anderem alle mitochondrial kodierten Untereinheiten (ND1-6, ND4L). Die peripheren, hydrophilen Subkomplexe I α und I λ beinhalten ein FMN, 8 Eisen-Schwefel-Cluster und die Bindestelle für das NADH, die zusammen das aktive Zentrum des Komplexes bilden.

Die eigentliche Bindestelle des NADH befindet sich in der 51 kDa großen Untereinheit des Subkomplexes I λ ,⁸⁹ die als NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Flavoprotein 1 (NDUFV1; OMIM 161015; Abbildung 5) bezeichnet wird. Evolutionär ist diese Untereinheit vom Säuger bis zu *Escherichia coli* (*E. coli*) hoch konserviert,⁹⁰ was ihre funktionelle Bedeutung unterstreicht. Da das NDUFV1-kodierende Gen in der vorliegenden Arbeit als Modellgen für atemungskettendefiziente mitochondriale Erkrankungen dienen soll, wird es im Abschnitt 1.4.1.2 eingehender beschrieben.

Ein isolierter Komplex I-Mangel (OMIM 252010) ist der häufigste Enzymdefekt bei Patienten mit Multisystemerkrankungen, die auf Störungen der Atmungskettenfunktion zurückzuführen sind.^{91, 92} Mutationen, die zum Komplex I-Mangel führen, sind bisher in sechs mitochondrial kodierten (ND1-6) und in diversen nukleär kodierten Untereinheiten beschrieben worden, wobei nukleäre Mutationen deutlich häufiger sind.^{93, 94} Auch die klinische Ausprägung eines Komplex I-Mangels kann in Abhängigkeit des jeweiligen Gendefekts stark variieren. Mutationen in nukleär kodierten Untereinheiten manifestieren sich in der Regel im Kleinkindalter oder in der frühen Kindheit und rufen charakteristische Symptome wie Kardiomyopathie, Laktat-Azidose oder das Leigh-Syndrom (OMIM 256000) hervor.⁹⁵ Patienten mit mtDNA-Mutationen werden hingegen oft erst in der späten Kindheit oder im Jugendalter klinisch manifest. Die klinischen Symptome können dabei auf ein Gewebe bzw. Organ beschränkt sein, wie bei der LHON, oder präsentieren sich multisystemisch, wie beim MELAS-Syndrom. Aufgrund dieser individuellen Phänotypenvariabilität ist die Pathogenese des Komplex I-Mangels, trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren, bisher nur in Ansätzen verstanden.

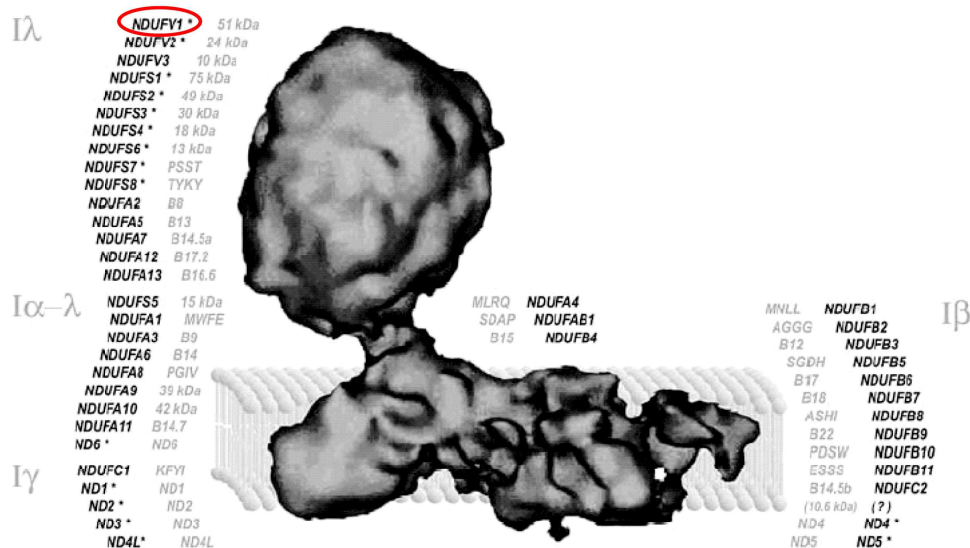


Abbildung 5: Vorstellung von der Zusammensetzung des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette. Die Untereinheiten, beim Menschen (schwarz) und beim Rind (grau), sind entsprechend ihrer Lokalisation angeordnet. Für Untereinheiten, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, wurden bereits pathogene Mutationen in Assoziation mit einem Komplex I-Mangel identifiziert. Das NADH-bindende NDUFV1 ist rot eingekreist (Abbildung modifiziert nach ⁹⁵).

1.4.1.2 Die NDUFV1-Untereinheit des Komplexes I

Das *NDUFV1*-Gen des Menschen, mit einer Größe von etwa 5,6 kbp, ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 an der Position 11q13 lokalisiert.⁹⁶ Es umfasst 10 Exons, mit einer kodierenden Sequenz von insgesamt 1392 bp. Spleiß-Isoformen sind nicht bekannt. Durch die Klonierung der *NDUFV1*-cDNA sowie der genomischen Gensequenz gelang es Schuelke *et al.* (1998) die Eisen-Schwefel-Cluster, die FMN- und die NADH-Bindungsstelle anhand konservierter Sequenzmotive zu identifizieren.⁹⁷ Ferner zeigten sie eine ubiquitäre Genexpression, wobei Gewebe mit hohem Energiebedarf, wie Herz, Muskel und bestimmte Hirnstrukturen, die meisten mRNA-Transkripte aufwiesen. Außerdem sprechen eine putative Bindestelle für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor NRF2 und die CpG-Insel im Promotorbereich von *NDUFV1* für seine Funktion als *Housekeeping*-Gen.

Das NDUFV1-Protein ist mit seiner Bindestelle für NADH das „Eingangstor“ des Komplexes I.⁸⁹ Seine Funktion ist für alle Organismen so essentiell, dass seine Sequenz in der Evolution hoch konserviert geblieben ist. Sogar beim Bakterium *E. coli* findet man ein homologes Gen (*NuoF*). Das homologe Gen der Maus (*Ndufv1*) hat eine Größe von 5,2 kbp und ist auf Chromosom 19 lokalisiert. Es umfasst ebenfalls 10 Exons und 1.392 bp kodierende Sequenz. Ein Vergleich der NDUFV1-Aminosäuresequenzen von Mensch (NP_009034.2) und Maus (NP_598427.1) offenbart eine Homologie von 96%, wobei die abweichenden Aminosäuren fast ausschließlich im N- und C-Terminus des Proteins zu finden sind (Abbildung 6).

Seit der ersten Beschreibung von *NDUFV1*-Mutationen als Ursache mitochondrialer Erkrankungen ⁹⁸ wurden bis heute rund 10 weitere Fälle publiziert.^{93, 99-102} Die Patienten wurden

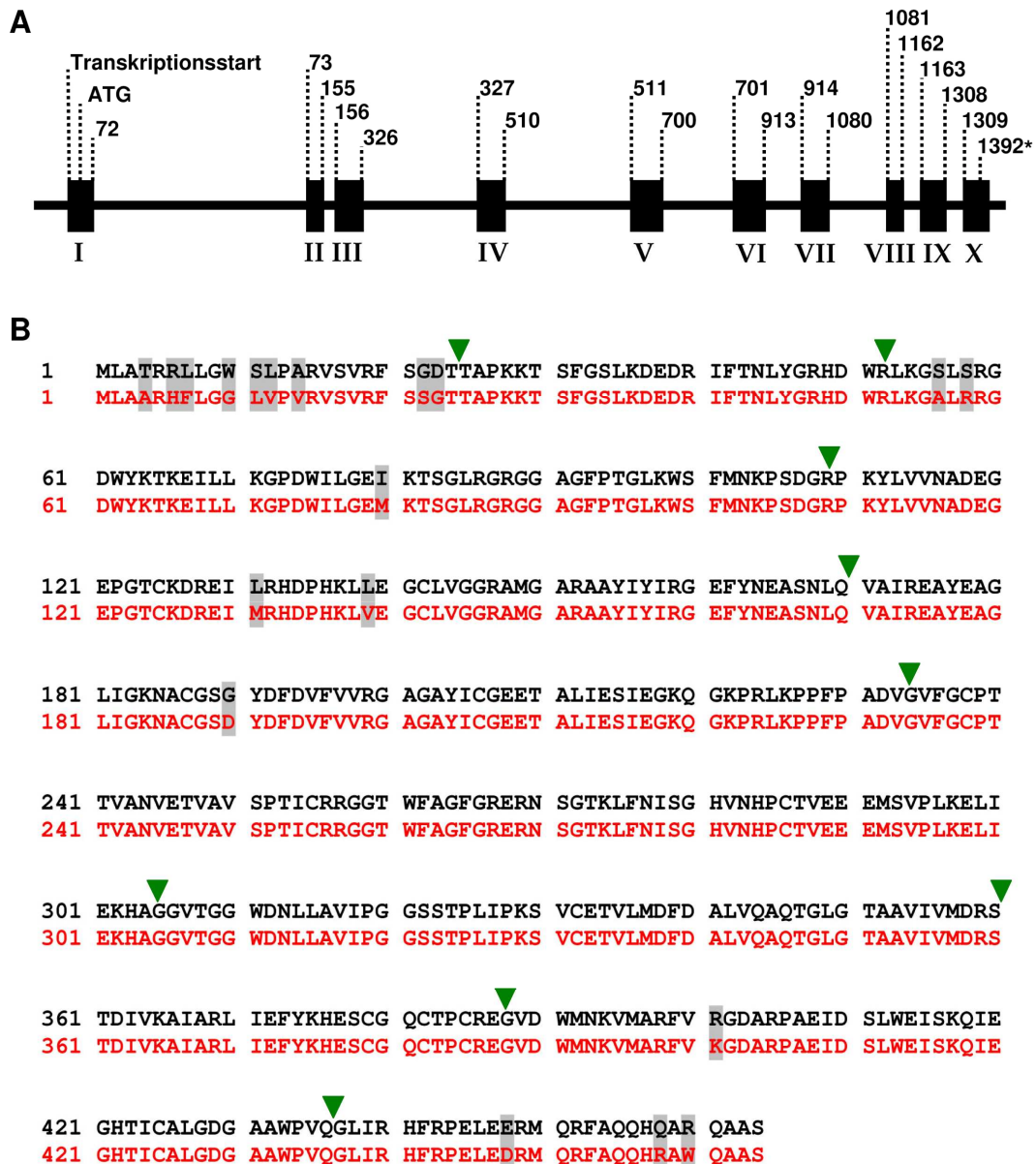


Abbildung 6: NDUFV1 von Mensch und Maus. (A) Genomische Struktur des *NDUFV1*-Gens beim Menschen. Dargestellt ist die Anordnung der 10 Exons mit 5' und 3'UTR, Transkriptionsstartpunkt und Stop-Codon (Stern). Die Zahlen kennzeichnen das offene Leseraster der cDNA-Sequenz. Die Struktur des homologen Maus-Gens ist, bis auf teilweise leicht verkürzte Intronbereiche, analog (Abbildung modifiziert nach ⁹⁷). **(B)** NDUFV1-Aminosäuresequenzen des Menschen (schwarz) und der Maus (rot). Beide Sequenzen umfassen je 464 Aminosäuren und sind zu 96% homolog. Die 19 divergenten Aminosäuren sind grau unterlegt und die Exon/ Exon-Grenzen mit grünen Pfeilen markiert.

alle augenscheinlich gesund geboren und entwickelten sich in den ersten Lebensmonaten normal. In den meisten Fällen begann die progressive Krankheitssymptomatik mit etwa einem halben Jahr, typischerweise mit Muskelschwäche, Myoklonusepilepsie, erhöhten Laktatwerten, psychomotorischer Entwicklungsretardierung und ausgedehnten Hirnatrophien, die zum Tod der Patienten innerhalb der ersten beiden Lebensjahre führten. Sofern biochemische Messungen an Muskelbiopsien durchgeführt wurden, konnte immer ein Komplex I-Mangel festgestellt werden, was seinerseits die Bedeutung von NDUFV1 für die Funktion der

Atmungskette zum Ausdruck bringt. Warum sich die beschriebenen Gendefekte jedoch erst vergleichsweise spät manifestierten und nicht schon im Verlauf der Ontogenese, ist bisher noch ungeklärt.

1.5 Mitochondriopathien

Genetische Ursachen der Mitochondriopathien umfassen ein weites Spektrum an Mutationen in verschiedenen Genen. Die Mutationen können unter anderem in mitochondrialen tRNAs, in Strukturproteinen und *Assembly*-Faktoren der Atmungskettenuntereinheiten oder auch in regulatorischen Proteinen des mitochondrialen Stoffwechsels und der Zellkern-Mitochondrien-Interaktion lokalisiert sein. Zusätzlich erschwert wird die Diagnostik der Mitochondriopathien durch das Fehlen klarer Genotyp-Phänotyp-Relationen. Während die gleiche Mutation bei zwei Menschen unterschiedliche klinische Phänotypen hervorbringen kann, können zwei unterschiedliche Mutationen wiederum zu sehr ähnlichen Phänotypen führen (Heterogenität der klinischen Symptomatik). Die mitochondriale Mutation mt.3243A→G *tRNA^{Leu}* verursacht z.B. das Leigh-Syndrom, das MELAS-Syndrom oder auch Diabetes mellitus.¹⁰³ Im Gegensatz dazu kann das Leigh-Syndrom auch infolge anderer mtDNA-Mutationen wie mt.8363G→A im *tRNA^{Lys}*-Gen¹⁰⁴ oder durch eine Mutation in der Komplex I-Untereinheit NDUFS4 (c.691C→G)¹⁰⁵ hervorgerufen werden. Dennoch existieren für einige Mitochondriopathien charakteristische Syndrome, nach denen eine Klassifikation von Krankheitsbildern möglich ist und die in dieser Arbeit zum Teil bereits mehrfach erwähnt wurden (MERRF, MELAS, Leigh, PEO oder LHON). Da ich in meiner Arbeit das MERRF-Syndrom als spezifisches Krankheitsbild eingehender untersucht habe, möchte ich es im folgenden Abschnitt ausführlicher darstellen.

1.5.1 Das MERRF-Syndrom

MERRF ist ein Akronym und steht für „**M**yoklonusepilepsie mit *ragged-red fibers*“. Diese Multisystemerkrankung ist, wie der Name schon sagt, vor allem durch myoklonische zerebrale Anfälle gekennzeichnet, die in der Regel nach einer normalen frühkindlichen Entwicklung erstmals im 2. bis 5. Lebensjahr auftreten. Vier klinische Merkmale dienen seit der Erstbeschreibung 1980 als diagnostische Marker des Syndroms: **1)** die myoklonischen Anfälle (hochfrequente, unwillkürliche Muskelzuckungen), **2)** die generalisierte Epilepsie (Epilepsie ohne fokalen Beginn), **3)** eine Ataxie (Störungen der Bewegungskoordination) und **4)** der Nachweis so genannter *ragged-red fibers* in der Muskelbiopsie.¹⁰⁶ *Ragged-red fibers* sind degenerierte, mit abnormalen Mitochondrien angefüllte Muskelfasern, die nach der Gomori-Trichrom-Färbung von Muskelschnittpräparaten im Mikroskop als rote, unregelmäßig be-

grenzte Strukturen erscheinen.¹⁰⁶ Die Krankheit verläuft progredient und in ihrem Verlauf treten häufig weitere Symptome wie Muskelschwäche, Innenohrschwerhörigkeit, Demenz oder auch Optikusatrophien (Degeneration der Sehnerven) hinzu.¹⁰⁷ Parallel sind in der Kernspintomographie des Gehirns oftmals zunehmende Verkalkungen der Basalganglien und eine Degeneration der weißen Substanz zu sehen.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Das MERRF-Syndrom ist bei mehr als 80% der Patienten mit der Mutation m.8344A→G im mitochondrialen *tRNA-Lysin*-Gen (*tRNA^{Lys}*) assoziiert.¹¹¹ Weitaus seltener sind andere Basenaustausche (m.8356T→C, m.8363G→A) im gleichen Gen. Die Prävalenz in der europäischen Bevölkerung liegt nach bisherigen Studien bei etwa 1,5:100.000,^{3, 4, 112} wobei auch hier der pathogene Schwellenwert der Heteroplasmie mitochondrialer Mutationen (Abschnitt 1.1.3.3) berücksichtigt werden muss. Biochemisch ist das MERRF-Syndrom vor allem durch einen Mangel des Atmungskettenkomplexes IV gekennzeichnet, der teilweise auch mit einem Komplex I-Mangel kombiniert sein kann.¹¹³ Die Behandlung der Patienten erfolgt zurzeit nur symptomorientiert; eine Heilung ist bisher nicht möglich.

1.5.1.1 Molekulare Pathogenese des MERRF-Syndroms

Trotz häufig beschriebener Assoziation des MERRF-Syndroms mit Punktmutationen im *tRNA^{Lys}*-Gen, im Besonderen mit der mt.8344A→G Mutation, ist bis heute unklar, über welche Mechanismen die Mutationen die Pathogenese der Erkrankung bewirken. Besonders die regionale Pathologie von speziellen Muskeln und Regionen des Gehirns wirft Fragen auf, da Mitochondrien zwar ubiquitär vorkommen, aber nicht alle Muskeln, Hirnbereiche und andere Organe in gleichem Umfang betroffen sind.

Eine kurze Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen soll den derzeitigen Kenntnisstand zur Pathogenese des MERRF-Syndroms dokumentieren. In einer Studie konnten Larsson *et al.* (1992) an drei Familien mit insgesamt 30 Mitgliedern zeigen, dass mindestens 92% mutanter mtDNA-Kopien erforderlich sind, damit MERRF-Patienten einen pathologischen Muskelphänotyp entwickeln.¹¹⁴ Chomyn *et al.* (1991) wiesen anhand von rho⁰-Zellen[‡], die mit mutierten Mitochondrien unterschiedlicher Heteroplasmiegrade angereichert waren (Cybride), eine Korrelation hoher Heteroplasmiegrade von mt.8344A→G mit einer herabgesetzten mitochondrialen Proteinsynthese, einem verringerten Sauerstoffverbrauch und einem Cytochrom c-Oxidase-Mangel nach.¹¹⁶ Da Proteine mit einem höheren Anteil der Aminosäure Lysin stärker betroffen waren als Proteine mit weniger Lysinresten, deuteten sie dies als direkte Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch die Mutation. Ähnlich zeigten differenzierte Myotuben (Vorläuferzellen der Skelettmuskelfasern) mit einer mt.8344A→G Heteroplasmie >85% eine Reduktion der Translation, die jedoch bei

[‡] rho⁰-Zellen = permanente menschliche Zelllinie, der die mtDNA durch Langzeitinkubation mit Ethidiumbromid, einem präferentiellen Inhibitor der mitochondrialen DNA-Replikation, entfernt wurde;¹¹⁵ die Mitochondrien sind dabei erhalten geblieben, so dass die Zellen in speziellen Medien wachsen können

den mitotisch aktiven Myoblasten (Vorläuferzellen der Myotuben) noch stärker ausgeprägt war. Hiernach scheint die pathogene Wirkung des, durch die MERRF-Mutation verursachten, Atmungskettendefekts unter anderem von der Teilungsaktivität der Zellen abhängig zu sein.¹¹⁷ Darauf basierend, wiesen Masucci *et al.* (1995) mittels kultivierter Cybride nach, dass zwei verschiedene MERRF-Mutationen (mt.8344A→G und mt.8356T→C) mit Heteroplasmiegraden von je 100% auf zellulärer Ebene identische biochemische und molekulargenetische Phänotypen (gestörte Atmungskettenaktivität, verminderte Proteinsynthese und ein herabgesetztes Grundniveau mitochondrialer Translationsaktivität) hervorrufen.¹¹⁸ Damit sehen sie als Hauptursache des Atmungskettendefekts bei Patienten mit mitochondrialen tRNA-Mutationen eine qualitativ und quantitativ verminderte Proteinsynthese in den Zellen.

1.6 Mausmodelle

Die *knockout* Technologie, für deren Entwicklung Mario R. Capecchi, Martin J. Evans und Oliver Smithies 2007 den Nobelpreis für Medizin erhielten, ermöglicht die Untersuchung spezifischer Genfunktionen und deren Rolle bei der Pathogenese genetischer Erkrankungen. Mit Hilfe dieser Technologie wurde in den letzten Jahren eine Reihe atmungskettendefizienter Mausmodelle etabliert, die zur Aufklärung der Pathomechanismen von Mitochondriopathien beitragen sollen. Diese Modelle basieren fast ausschließlich auf nukleären Genmodifikationen. Der *knockout* eines spezifischen mtDNA-kodierten Gens und dessen Fixierung in einer Mauslinie ist bisher noch nicht gelungen.⁹

Die existierenden Mausmodelle mit Atmungskettendefekten wurden in der Regel über homologe Rekombinationstechniken¹¹⁹⁻¹²¹ oder mittels *gene-trapping*, bei dem die Translation eines Zielgens durch die Integration eines viralen Konstruktes gestört wird,¹²² generiert. Allerdings wirkt der vollständige *knockout* von Genen, welche für Untereinheiten der Atmungskette kodieren, meistens noch während der Embryonalentwicklung letal, weshalb keine erwachsenen Tiere untersucht werden können. Aus diesem Grund findet man überwiegend Mausmodelle mit konditionellen Genveränderungen, bei denen das zu untersuchende Gen gezielt, zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung oder auch nur in speziellen Geweben ausgeschaltet werden kann.¹²³ Das Mausmodell von Kruse *et al.* (2008) beinhaltet zum Beispiel ein konditionelles Allel des *Ndufs4*-Gens, das für die 18 kDa Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I kodiert.¹²⁴ Das zweite Exon des *Ndufs4*-Gens ist von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert und somit durch Kreuzungen mit *Cre*-Rekombinase exprimierenden Tieren entfernbar. Die Kreuzung homozygoter konditioneller *Ndufs4*-Mäuse mit *Mox2cre*-Mäusen führt zum *knockout* von *Ndufs4* in der frühen Keimbahn.¹²⁵ Der klinische Phänotyp dieser Nachkommen, mit progressiver Ataxie, Blindheit, erhöhten Laktatwerten im Serum, einer verringerten Komplex I-Aktivität und einem frühen Tod im Alter von 7 Wochen, ähnelt

molekular, biochemisch und auch entwicklungsgemäß menschlichen Mitochondriopathien. Damit erscheint die *Ndufs4-knockout*-Maus als gutes genetisches Modell zur Untersuchung eines Komplex I-Mangels. Da es sich hier aber um einen konditionellen *knockout* handelt, ist nicht sicher, ob der Komplex I-Mangel in den Nachkommen nur auf bestimmte Zellen oder Gewebe beschränkt ist. Um feststellen zu können, zu welchen Zeitpunkten der Entwicklung und in welchen Zelltypen die Komplex I-Aktivität eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus spielt, müsste die konditionelle *Ndufs4*-Maus zusätzlich mit verschiedenen anderen *Cre*-exprimierenden Tieren gekreuzt werden.

Als Alternative zu Modellen mit Defekten in funktionellen Atmungskettenuntereinheiten dienen Mitochondriopathiemodelle auf der Basis modifizierter Regulatorproteine der mtDNA-Replikation oder -Transkription.^{41, 68} Die diesbezüglich bekannteste und bisher am besten untersuchte Maus stammt von Larsson *et al.* (1998) mit einem konditionellen Allel des *Tfam*-Gens (Abschnitt 1.3).⁶⁸ Hier flankieren zwei *loxP*-Sequenzen die Exons 6 und 7, wodurch der *Tfam-knockout* entwicklungs- und gewebsspezifisch induzierbar ist. Wird *Tfam* konstitutiv in allen Körperzellen der Maus ausgeschaltet, sterben die Tiere noch während der Embryonalentwicklung (E8-E10,5). Heterozygote *knockout*-Tiere werden hingegen mit der nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarteten Häufigkeit geboren. Sie weisen verringerte Mengen an mtDNA und mitochondrialen Proteinen auf; die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V sind jedoch nur im Herz signifikant reduziert. Im Gegensatz zu diesem konstitutiven Mausmodell präsentieren die konditionellen *Tfam-knockouts* (unter Verwendung der *Tfam^{loxP}*-Maus von Larsson *et al.*) in spezifischen Geweben wie Skelettmuskeln,⁷⁰ Herz,¹²⁶ oder Vorderhirn-Neuronen¹²⁷ klinische Symptomatiken nur in dem jeweiligen Gewebetyp.

Auch wenn die derzeit existierenden Mausmodelle für Störungen der Atmungskettenaktivitäten überwiegend auf artifiziellen Gendefekten oder der indirekten Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung beruhen, tragen sie erheblich zum Verständnis der mitochondrialen Erkrankungen bei. Dennoch werden zukünftig weitere Modelle benötigt, welche die Problematiken der embryonalen Letalität und der Beschränkung klinischer Phänotypen auf einzelne Gewebe überwinden.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Obwohl die Grundlagen der Mitochondriengenetik in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt wurden, ist die Pathogenese von Mitochondriopathien noch lange nicht vollständig verstanden. Speziell die klinische Heterogenität der Erkrankungen und die besondere Anfälligkeit von Organen mit hohem aerobem Energiebedarf werfen viele Fragen bezüglich der zellulären Mechanismen auf, die zur Entstehung der komplexen Krankheitsbilder führen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand zweier Patientenstudien Einblicke in die molekularen Pathomechanismen von Mitochondriopathien zu gewinnen und darüber hinaus ein Mausmodell zu generieren, welches zukünftigen *in vivo* Studien zur Untersuchung eines mitochondrialen Atmungskettendefekts dienen soll.

Im ersten Teil dieser Arbeit habe ich mich mit der regionalen Pathologie von Mitochondriopathien auseinandergesetzt. An verschiedenen Gewebeproben einer Patientin mit MERRF-Syndrom wollte ich untersuchen, ob gewebspezifische Unterschiede der Heteroplasmie oder der mtDNA-Kopienzahlen die selektive Anfälligkeit der Muskulatur und des Gehirns für die klinische Ausprägung mitochondrialer Mutationen erklären würden. Darüber hinaus sollte die Analyse weiterer zellulärer Faktoren Aufschluss darüber geben, ob regulatorische Mechanismen, die mit der Biogenese von Mitochondrien einhergehen, an der Entstehung der regionalen Pathologie beteiligt sind.

Mit dem zweiten Teil dieser Arbeit möchte ich verdeutlichen, dass die klinische Heterogenität von Mitochondriopathien unter anderem durch individuelle genetische Einflussfaktoren, wie der Koexistenz verschiedener Genmutationen, bedingt sein kann. Bei einem Patienten mit einem komplexen Phänotyp, welcher zum Teil, aber nicht ausschließlich auf einen mitochondrialen Defekt zurückgeführt werden konnte, war es möglich, das parallele Auftreten einer mitochondrialen und einer nukleären Mutation nachzuweisen.

Der dritte Teil meiner Arbeit diente der Etablierung eines Mausmodells für einen Komplex I-Mangel der mitochondrialen Atmungskette. An diesem wollte ich die Pathomechanismen von Komplex I-defizienten Mitochondriopathien *in vivo* untersuchen. Die Einführung einer *knock-in*-Mutation in die NADH-bindende Komplex I-Untereinheit Ndufv1 sollte gleichermaßen eine Charakterisierung der Ndufv1-Funktion im zellulären Stoffwechsel und bei der mitochondrialen Energiegewinnung ermöglichen.

Mit diesen drei Studien möchte ich dazu beitragen, einige offene Fragen zu den grundlegenden pathogenetischen Mechanismen von Mitochondriopathien zu klären und Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zu liefern, welche die Medizin in Diagnose und Therapie dieser Erkrankungen voranbringen sollen.

2 Kasuistiken

Im Folgenden stelle ich die klinischen Daten der beiden Patienten vor, anhand derer ich meine Untersuchungen zur Pathogenese von Mitochondriopathien durchgeführt habe (Patientin A, Patient B). Desgleichen präsentiere ich kurz den Krankheitsverlauf der Patientin C, die Trägerin der *Targeting*-Mutation ist, welche ich zur Generierung des Mausmodells verwendet habe.

2.1 Patientin A

Die Patientin war das zweite Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern (Stammbaum in Abbildung 14). Die ältere Schwester ist gesund. Schwangerschaft und Geburt verliefen normal und die postnatale Entwicklung war bis auf eine leichte Trinkschwäche unauffällig. Ab ihrem 4. Lebensjahr traten erste myoklonisch-astatische Anfälle auf, die durch plötzlichen Tonusverlust häufige Stürze verursachten. Zudem zeigte sie mit 6 Jahren eine auffallende Lernschwäche und eine starke Zitterigkeit, sowie eine von Zuckungen begleitete, zunehmende nächtliche Unruhe. Zur medikamentösen Einstellung ihrer Myoklonusepilepsie wurde das Mädchen im Alter von 9 Jahren stationär aufgenommen. Klinisch fanden sich eine Ataxie und eine Verlangsamung der Bewegungsabläufe als auch eine generelle Belastungsinsuffizienz. Die psychologische Testung ergab eine unterdurchschnittliche Intelligenz (HAWIK IQ = 76), ein gestörtes Kurzzeitgedächtnis und Konzentrationsschwäche. Die Laboruntersuchungen ergaben unter anderem eine für Mitochondriopathien typische Erhöhung der Laktatkonzentration im Serum und zahlreiche *ragged-red fibers* in einem Muskelbiopsat aus dem Oberschenkel. Die Echokardiographie und die Kernspintomographie (MRT) des Gehirns waren normal. Es bestand eine Innenohrschwerhörigkeit mit einer Hörschwelle von 65 dB. Aufgrund der Schlüsselsymptome Myoklonusepilepsie und dem Nachweis von *ragged-red fibers* in der Muskelbiopsie wurde bei der Patientin das MERRF-Syndrom diagnostiziert. In den folgenden Jahren konnten die myoklonischen Anfälle trotz Antiepileptikaeinnahme nicht vollständig unterdrückt werden und die Patientin klagte über zunehmende Kopfschmerzen. Ein im Alter von 14 Jahren erneut angefertigtes MRT (Abbildung 7) war aber abgesehen von einer leichten Erweiterung der inneren Liquorräume weitgehend normal. Die Anfallfrequenz blieb im Laufe der Zeit unverändert. Aufgrund sich verstärkender Symptomatik des körperlichen und geistigen Leistungsabbaus sowie inzwischen auftretender Schluckbeschwerden, erfolgten im Alter von 15 Jahren zwei weitere stationäre Aufnahmen, die jedoch zu keinen neuen Erkenntnissen führten. Mit knapp 16 Jahren verstarb die Patientin plötzlich. Da die Autopsie keinen eindeutigen Befund lieferte, wurde als Todesursache eine Herzrhythmusstörung vermutet.

Kasuistiken

Bei der Mutter der Patientin (Person 2_2 im Stammbaum), deren Schwester (Person 2_4) und Bruder (Person 2_7), sowie dem Onkel der Mutter mütterlicherseits liegen Lipome (gutartige Tumore der Fettgewebszellen) vor, von denen bekannt ist, dass sie im Rahmen des MERRF-Syndroms gehäuft auftreten. Zudem leidet die Schwester der Mutter (2_4) seit wenigen Jahren an einer Schwerhörigkeit. Die anderen Familienangehörigen der Patientin haben, mit Ausnahme des Neffen 2. Grades mütterlicherseits (Person 4_1), keine charakteristischen Symptome. Bei dem Neffen traten ab dem 9. Lebensmonat Krankheitssymptome wie kurzzeitige Bewusstseinsstrübungen, Schluckstörungen, Tachykardien (Herzrasen), Myoklonien (unwillkürliche Muskelzuckungen) und wiederholtes Erbrechen auf. Die Laktatkonzentration in seinem Serum war erhöht und im MRT fand sich im Bereich des mittleren Kleinhirns ein Verlust von Hirnsubstanz. Der Junge verstarb während eines *Status epilepticus* im 2. Lebensjahr.

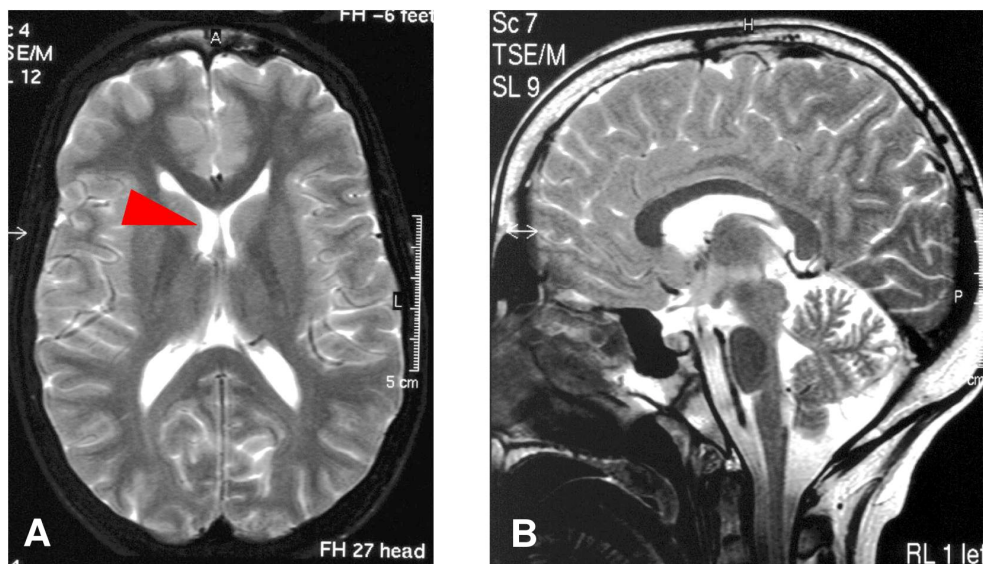


Abbildung 7: Die T₂-gewichteten Bilder der Kernspintomographie des Schädels der Patientin A mit MERRF-Syndrom im Alter von 14 Jahren. In der T₂-Wichtung erscheinen wassergefüllte Strukturen signalreich und damit hell. Sowohl im Transversalschnitt (A), als auch im Sagittalschnitt (B) sind die Gehirnstrukturen der Patientin weitgehend normal. Im Bereich des rechten Seitenventrikels (A; roter Pfeil) ist die Ventrikelweite des Vorderhorns im Vergleich zur Gegenseite minimal erhöht, was für eine beginnende Hirnatrophie in diesem Bereich sprechen kann.

2.2 Patient B

Der Patient wurde als erstes Kind nicht blutsverwandter türkischer Eltern geboren. Seine jüngere Schwester ist gesund (Stammbaum in Abbildung 21). Bald nach der Geburt traten die ersten Symptome in Form unkontrollierter Augenbewegungen (Nystagmus) und einer Sehschwäche auf. Die frühkindliche motorische Entwicklung verlief normal. Im Zuge eines stationären Klinikaufenthaltes im Alter von 14 Jahren wurden eine progressive Muskelschwäche, Belastungsintoleranz und das Herabhängen beider Augenlider (Ptosis) diagnos-

tiziert. Außerdem berichteten die Eltern von zunehmend schneller Ermüdbarkeit des Jungen und Schwierigkeiten bei der Bewältigung des schulischen Arbeitstempos. Die daraufhin durchgeführte MRT-Untersuchung des Gehirns, sowie die histologische und elektronenmikroskopische Analyse eines Oberschenkelmuskelbiopsats waren normal. Biochemische Messungen der Atmungskettenenzymaktivitäten im Muskelbiopsat ergaben keinen Atmungskettendefekt. Die Enzymaktivitäten lagen sogar im oberen Bereich der Norm. Eine Augenuntersuchung im Alter von 16 Jahren zeigte neben einer starken Sehschwäche, Nystagmus und der bilateralen Ptosis weitere Auffälligkeiten des Sehapparats, die zusammengefasst auch als Axenfeld-Rieger-Anomalie bezeichnet werden. An den seitlichen Rändern der Hornhaut waren atypische Blutgefäße ausgebildet, das rechte Auge wies eine Katarakt (polare Linsentrübung) auf und das linke eine untypische pigmentierte Linie an der seitlichen Linsenoberfläche. Außerdem fehlte der Pupillenreflex, was auf eine Minderentwicklung der Macula (gelber Fleck; höchste Dichte der Zapfen im Auge) deutet (Abbildung 8A-D). Zurzeit besucht der Patient eine Schule für sehbehinderte Jugendliche, wobei seine Schulleistungen und intellektuellen Fähigkeiten normal sind.

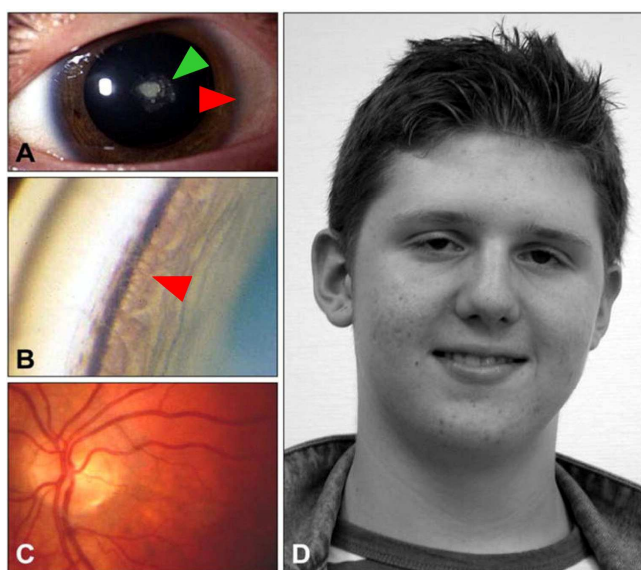


Abbildung 8: Augenbefund des Patienten B. (A) Auffälligkeiten am Cornea-Sklera Übergang (Limbus) mit verstärkter Vaskularisierung (roter Pfeil). Der grüne Pfeil kennzeichnet die posteriore polare Katarakt des rechten Auges. (B) Im Winkel der vorderen Augenkammer, zwischen Hornhaut und Iris, sind Irisfasern peripher ins Trabekelwerk (schwammartiges Gewebe, das dem Abfluss von Augenflüssigkeit dient) des Auges gewachsen. (C) Blinder Fleck des linken Auges. Eine leichte Abblassung dieser Region und Excavation stehen im Einklang mit der Kurzsichtigkeit des Patienten. (D) Photographie des Patienten im Alter von 16 Jahren mit bilateraler Ptosis.

2.3 Patientin C

Beide Eltern der Patientin sind gesund und nicht blutsverwandt. Schwangerschaft und Geburt verliefen normal. Im Alter von 6 Monaten wurde bei dem Mädchen erstmals eine myoklonische Epilepsie beobachtet. Die gleichzeitig aufgetretene Muskelschwäche nahm in den

folgenden Monaten stark zu und ging schließlich in eine Spastik über. Ab dem 12. Lebensmonat entwickelte sich das Kind psychomotorisch nicht weiter, und sie entwickelte einen Makrozephalus (überdurchschnittlich großer Kopf). Wiederholte MRT-Untersuchungen des Schädels ergaben eine progrediente Hirnatrophie mit zunehmender zystischer Degeneration der weißen Substanz (Abbildung 9A). Damit entsprach der klinische Krankheitsphänotyp der Patientin am ehesten einem *Morbus Alexander* (OMIM 203450). Eine Hirnbiopsie zum Nachweis charakteristischer Rosenthal-Fasern (Einschlüsse aus zusammen gelagerten Proteinen) wurde allerdings nicht durchgeführt. Die Laktatkonzentrationen in Blut und Urin der Patientin lagen im Normbereich. Im Gegensatz dazu war die Laktatkonzentration im Liquor (Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit) deutlich erhöht. Biochemische Untersuchungen einer Muskelbiopsie und kultivierter Fibroblasten wiesen einen isolierten Atmungskettenkomplex I-Mangel nach. Die Sequenzierung der genomischen DNA (Abbildung 9B) und der cDNA der Patientin, zur Klärung der molekulargenetischen Ursache ihres klinischen Phänotyps, ergab eine homozygote C→T Mutation an der Position nt1022 des *NDUFV1*-Gens (Abschnitt 1.4.1.2).⁹⁸ Diese Mutation führt zum Austausch von Alanin zu Valin an der Aminosäureposition 341 des NDUFV1-Proteins. Die Eltern und beide gesunde Geschwister der Patientin, ein Mädchen und ein Junge, tragen die Mutation heterozygot. Im Vergleich zu anderen *NDUFV1*-Mutationen, die häufig zum Tod der Betroffenen innerhalb der ersten beiden Lebensjahre führen,¹⁰⁰ scheint diese Mutation relativ „mild“ zu sein. Die Patientin ist heute, im Alter von 19 Jahren, stark spastisch und blind.

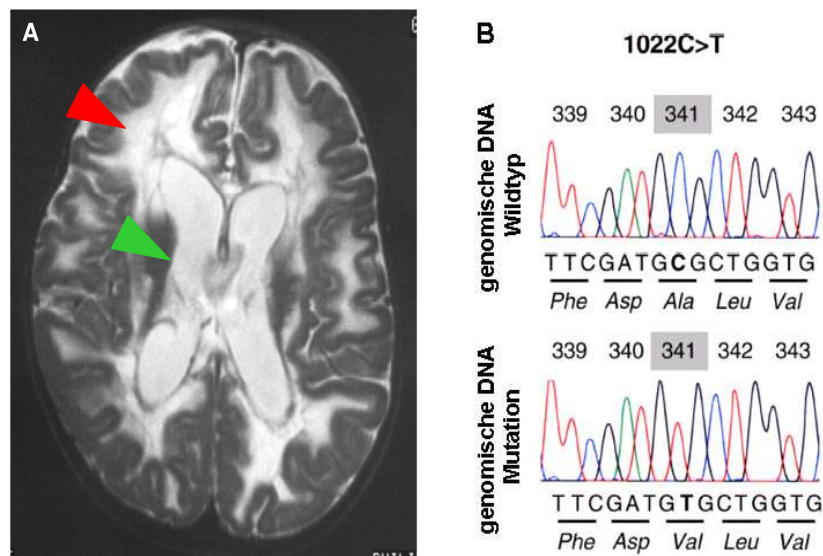


Abbildung 9: Schädel-MRT der Patientin C in der T₂-Wichtung und Identifizierung der Mutation c.1022C→T. (A) Die zystische Degeneration der weißen Substanz ist im Bereich des Vorderhirns (helle Region, die an die Großhirnrinde angrenzt, roter Pfeil) deutlich zu erkennen. Im rechten Frontallappen ist der Untergang der weißen Substanz besonders weit fortgeschritten. Beide Seitenventrikel sind infolge des Substanzverlustes stark erweitert (grüner Pfeil). **(B)** Der Basenaustausch C→T an der Position nt1022 der *NDUFV1*-cDNA führt bei der Patientin zum Austausch der Aminosäure Alanin zu Valin an der Position 341 des NDUFV1-Proteins (Abbildung modifiziert nach ⁹⁸).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Humanes Probenmaterial

Vor der Durchführung der Untersuchungen wurden alle involvierten Patienten und Kontrollpersonen, bzw. deren Erziehungsberechtigte oder Familienangehörige entsprechend der Deklaration von Helsinki (siehe Internetseiten der *World Medical Association*) über die jeweiligen Studienaspekte aufgeklärt und schriftliche Einverständniserklärungen eingeholt.

Studie Patientin A: Die DNA-Extrakte aus Blutproben der MERRF-Patientin und verschiedener Familienmitglieder, zur Analyse des Heteroplasmiegrades der m.8344A→G Mutation, wurden von Herrn Prof. Dr. med. Wilichowski (Abteilung Pädiatrie, Georg-August-Universität, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Die DNA-Extrakte aus den Gewebeproben der Patientin wurden nach der beschriebenen Methode (Abschnitt 3.2.1.1) präpariert. Ungefähr 6 Stunden nach dem Tod wurde die Leiche der Patientin in das Institut für Gerichtsmedizin der Charité (Direktor: Prof. Dr. med. Maxeiner) gebracht und dort bei 4°C in einem Kühlraum aufbewahrt. Es erfolgte eine Autopsie, in deren Verlauf zahlreiche Biopsien aus verschiedenen Organen, Geweben und Gewebsregionen (siehe Tabelle 12 und Anhang Abbildung 39) entnommen wurden. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Die entsprechenden Gewebeproben der Kontrollpatientinnen stammen von vier ursprünglich gesunden Frauen im Alter von 16 bis 32 Jahren, die durch Verkehrsunfälle ums Leben gekommen waren und im Institut für Gerichtsmedizin der Charité autopsiert wurden. Die Leichen der vier Frauen wurden ebenfalls zeitnah zum Todeszeitpunkt in das Institut für Gerichtsmedizin gebracht und dort bei 4°C aufbewahrt. Im Verlauf der Autopsien, innerhalb der folgenden zwei Tage, war es wiederum möglich, Proben der jeweiligen Gewebe (mit Ausnahme des *M. rectus superior* und des Innenohrs der Kontrollperson 1) zu entnehmen. Diese wurden anschließend bei -20°C gelagert und die DNAs wie beschrieben (Abschnitt 3.2.1.1) präpariert.

Studie Patient B: Zur Identifizierung und Charakterisierung der krankheitsverursachenden Mutation wurden Blut, Haarfollikel und Mundschleimhautzellen (Epithelabrieb) der Eltern, Blut der Schwester, sowie Blut, eine Muskelbiopsie und gezüchtete Hautfibroblasten des Patienten verwendet.

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Standardchemikalien zum Herstellen von Puffern, Lösungen und Medien mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck, Applichem und Gibco BRL (Firmenverzeichnis siehe Anhang Tabelle 14) bezogen. Gängige Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische und biochemische Methoden, wie z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Zentrifugenröhrchen wurden von den Firmen Eppendorf, BD Biosciences, Roth, Sarstedt, Greiner Bio-One und Brand verwendet. Sterile Einwegmaterialien für die Zellkultur, wie z.B. Kulturschalen und -flaschen, serologische Pipetten und Kryoröhrchen stammten aus den Firmen BD Biosciences und Nunc.

3.1.3 Längen-, Konzentrations- und Größenstandards

DNA-Standards: **M1**, TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); **M2**, TrackIt™ 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen); **M3**, Lambda-DNA/ *HindIII* geschnitten (Sigma-Aldrich); **M4**, Lambda-DNA/ *HindIII*+*PstI* geschnitten (Sigma-Aldrich), **M5**, SmartLadder (Eurogentec), ROX dye (TIB MOLBIOL); **Protein-Standard:** PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.1.4 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen für den enzymatischen Verdau von DNA wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. In der vorliegenden Arbeit richten sich die Bezeichnungen dieser Enzyme nach den Empfehlungen von Roberts *et al.* (2003).¹²⁸

3.1.5 Oligonukleotide (Primer)

Primer für die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, Klonierungs- und Sequenzierungsreaktionen wurden von den Firmen MWG Biotech AG, TIB MOLBIOL und Invitrogen synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Abschnitt 9.5 im Anhang zusammengefasst.

3.1.6 Plasmide und Bakterienstämme

Plasmide: pGEM®-T Easy (Promega), 576/1 (M. Schülke, siehe Abbildung 10), pIC-*Cre* (C. Birchmeier, MDC, Berlin)

Bakterienstämme: JM109 (Promega), EL350 (C. Birchmeier)¹²⁹

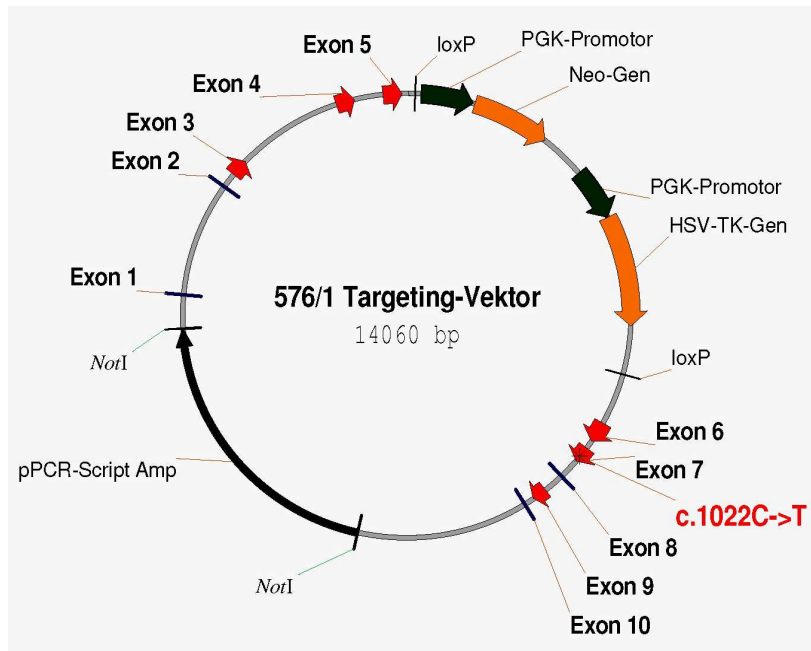


Abbildung 10: Targeting-Vektor 576/1. Der Vektor beinhaltet den linken Arm des *Ndufv1*-Gens, mit der 5'UTR (untranslatierte Region) und den Exons 1-5, eine *Neo*-/*TK*-Selektionskassette, den rechten Arm des *Ndufv1*-Gens, mit den Exons 6-10, der c.1022C→T Mutation und der 3'UTR, sowie die Sequenz des Plasmids pPCR-Script Amp der Firma Stratagene. Die Selektionskassette besteht aus dem bakteriellen Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen, welches Neomycinresistenz vermittelt (*Neo*) und dem Thymidin-Kinase-Gen (*TK*) des *Herpes simplex* Virus. Beiden Genen ist je ein Phosphoglycerat-Kinase (*PGK*)-Promotor vorgeschaltet, und sie werden von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert, welche eine spätere Entfernung der *Neo*-/*TK*-Kassette ermöglichen. Die *Targeting*-Sequenz lässt sich mit dem Restriktionsenzym *NotI* vom pPCR-Script-Vektor trennen.

3.1.7 Zelllinien

ES-Zellen (embryonic stem cells): Die embryonalen Stammzellen der Maus der Zelllinie E14.1, die ich zur Einführung der *Ndufv1*-Mutation c.1022C→T in die Maus verwendet habe, stammen vom Mausstamm SV129/Ola^{130, 131} und wurden von der Arbeitsgruppe C. Birchmeier (MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Feederzellen: Primäre embryonale Mausfibroblasten (Feederzellen) wurden aus Embryonen (Tag E13,5-E14,5) der Neomycin-resistenten Mauslinie *ros*^{ex 132} im Labor von C. Birchmeier gewonnen.

Embryonale Mausfibroblasten (MEFs, mouse embryonic fibroblasts): MEFs wurden aus Mausembryonen der Genotypen *Ndufv1*^{+/+}, *Ndufv1*^{+/mut} und *Ndufv1*^{mut/mut} am embryonalen Entwicklungstag E8,5 gewonnen. *Ndufv1*^{+/mut}-Mäuse wurden dafür terminiert miteinander verpaart, deren Embryonen präpariert und embryonales Gewebe zur Züchtung von MEFs in Rho0-Medium (Tabelle 5), versetzt mit 30% AmnioMax (Tabelle 5), kultiviert. Die Genotypen der Zellen wurde anschließend mittels PCR (Abschnitt 3.2.1.6) verifiziert.

3.1.8 Mäusstämme

C57BL/6 (*Charles River Laboratories, Inc.*), 129/Ola (C. Birchmeier, MDC, Berlin), DBA/2 und NMRI (*Transgenic Core Facility, MDC, Berlin*)

3.1.9 Antikörper und Konjugate

Primärantikörper: anti- β -Tubulin, Spezies: Kaninchen, polyklonal, Verdünnung: 1:8.000 (Abcam), anti-GAPDH, Spezies: Maus, monoklonal, Verdünnung: 1:20.000 (Applied Biosystems/ Ambion), anti-Porin (VDAC1), Spezies: Maus, monoklonal, Verdünnung: 0,2 μ g/ml (Calbiochem), anti-NRF1, Spezies: Kaninchen, polyklonal, Verdünnung: 1:1.500 (Santa Cruz Biotechnology), anti-mtTFA, Spezies: Kaninchen, polyklonal, Verdünnung: 1:350 (Santa Cruz Biotechnology), anti-CoxII, Spezies: Maus, monoklonal, Verdünnung: 1:2.500 (MitoSciences), anti-CoxIV, Spezies: Maus, monoklonal, Verdünnung: 1:2.500 (MitoSciences)

Sekundärantikörper: anti-Kaninchen-IgG-HRP (*horseradish peroxidase*), Verdünnung: 1:10.000 (Calbiochem), anti-Maus-IgG-HRP, Verdünnung: 1:5.000 (Calbiochem)

3.1.10 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 1: Allgemeine Puffer und Lösungen

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|-------------------|---|
| PBS (10x), pH 7,4 | 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 15 mM KH ₂ PO ₄ |
| TE (1x), pH 7,4 | 10 mM Tris, 1 mM Na ₂ -EDTA |
| TBE (5x), pH 8,0 | 0,5 M Tris-HCl, 0,5 M Borsäure, 10 mM Na ₂ -EDTA |
| SSC (20x), pH 7,0 | 3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O |

Tabelle 2: Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|-----------------------|---|
| Lysispuffer A, pH 7,5 | 50 mM Tris, 5 mM Na ₂ -EDTA, 100 mM NaCl |
| Lysispuffer B | 50 mM Tris (pH 8,5), 1 mM Na ₂ -EDTA, 0,5 % Tween 20 |
| Lysispuffer C | 10 mM Tris (pH 7,5), 10 mM Na ₂ -EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosin, 200 μ g/ml Proteinase K |
| Lysispuffer D | 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM Na ₂ -EDTA, 25 mM NaCl |

Tabelle 3: Puffer und Lösungen für Southern-Blots

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|----------------------|----------------------|
| Denaturierungslösung | 1 M NaCl, 0,5 M NaOH |
| Depurinierungslösung | 250 mM HCl |

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|---|--|
| Hybridisierungslösung (nach Church und Gilbert, 1984) ¹³³ , pH 7,2 | 0,4 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1 mM Na ₂ -EDTA, 1% (w/v) BSA*, 7% (w/v) SDS** |
| Waschlösung 1 | 1x SSC, 1% (w/v) SDS |
| Waschlösung 2 | 1x SSC, 0,1% (w/v) SDS |
| Waschlösung 3 | 0,5x SSC, 0,1% (w/v) SDS |

*BSA, *bovine serum albumin*; **SDS, *sodium dodecyl sulfate*

Tabelle 4: Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blots

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|-----------------------------------|---|
| Trenngelpuffer (4x, SDS-Page) | 1,5 M Tris-HCl (pH 8,7), 0,4% (w/v) SDS |
| Sammelgelpuffer (4x, SDS-Page) | 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS |
| Laufpuffer (10x, SDS-Page) | 0,25 M Tris, 1,9 M Glycin, 1% (w/v) SDS |
| SDS-Polyacrylamid- Sammelgel | 1x Sammelgelpuffer, 5% (v/v) Polyacrylamid (29 :1, Bio-Rad), 0,1% (v/v) APS*, 0,1% (v/v) TEMED** (Merck) |
| SDS-Polyacrylamid-Trenngel | 1x Trenngelpuffer, 12% (v/v) Polyacrylamid (29 :1), 0,1% (v/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED |
| Lysispuffer | 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Natrium- desoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) β-Mer-captoethanol, 1 mM PMSF***, 1 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Peps- tatin |
| TBS-T-Puffer (10x), pH 7,6 | 0,2 M Tris, 1,4 M NaCl, 1% (v/v) Tween 20 |
| Ponceaurot-Lösung (20x) | 2% (w/v) Ponceaurot S, 30% (w/v) Trichloressigsäure, 30% (w/v) Sulfosalicylsäure |
| Coomassie-Lösung (1x) | 0,25% (w/v) Brillant Blue, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Es- sigsäure |
| Coomassie-Entfärber-Lösung | 10% (v/v) Essigsäure |
| Blotpuffer (1x) | 70% 1x Laufpuffer, 30% (v/v) Methanol |
| Blockerlösung (1x) | 1x TBS-T-Puffer, 5% (w/v) Milchpulver |
| ECL-Reagenz A | 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,4 mM Coumarsäure, 2,5 mM Luminol |
| ECL-Reagenz B | 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,018% (v/v) H ₂ O ₂ |
| Ladepuffer (2x) | 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,025% (w/v) Bromphenolblau |

*APS, Amoniumpersulfat; **TEMED, Tetramethylethyldiamin; ***PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid

Tabelle 5: Puffer, Lösungen und Medien für die Zellkultur

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|---------------------|---|
| ES-Zell-Medium | 500 ml 1x Dulbecco's MEM (D-MEM) mit GlutaMAX™ I, 4500 mg/L D-Glukose und Natriumpyruvat (Gibco BRL), 90 ml FKS* (Sigma), 6 ml 100x NEAA** (Gibco BRL), 6 ml Pen/Strep*** (10000 U/ml PenG/10000 µg/ml Strep, Gibco BRL), 1,2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco BRL), 180 µl LIF ^Δ (500-1000 U/ml) |
| Feederzell-Medium | 500 ml 1x D-MEM/Glutamax (siehe oben), 60 ml FKS*, 5,7 ml 100x NEAA, 5,7 ml Pen/Strep, 1,2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol |
| Einfriermedium A | Feeder- bzw. ES-Zell-Medium + 20% FKS* |
| Einfriermedium B | FKS* + 20% DMSO ^{ΔΔ} (Applichem) |
| Einfriermedium 96 | ES-Zell-Medium + 20 % FKS* + 10% DMSO |
| Rho0-Medium | 500 ml 1x D-MEM ohne Phenolrot, mit 4500 mg/L D-Glucose, L-Glutamin und 25 mM HEPES, 50 ml FKS, 5 ml Pen/Strep, 5 ml Natriumpyruvat (Gibco BRL), 5 ml 100x NEAA, 0,5 ml 50 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 ml Uridin (50 mg/ml, Sigma) |
| AmnioMax | 450 ml 1x AmnioMax™-C100 Basal Medium (Gibco BRL), 75 ml AmnioMax™-C100 Supplement (Gibco BRL) |
| Einfriermedium C | 75 ml Rho0-Medium / 30% AmnioMax + 15 ml FKS + 10 ml DMSO |
| Gelatinelösung | 0,1% Gelatine (Sigma) in <i>Aqua bidest.</i> |
| Trypsin/EDTA-Lösung | 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA ohne Calcium und Magnesium (Gibco BRL) |
| PBS (1x) | ohne Calcium und Magnesium (PAA) |

*FKS, fetales Kälberserum; hitzeinaktiviert für 30 min bei 55°C; **NEAA, nicht-essentielle Aminosäuren; ***Pen/Strep, Penicillin/Streptomycin-Lösung; ^ΔLIF, *leukaemia inhibitory factor*; ^{ΔΔ}DMSO, Dimethylsulfoxid

Tabelle 6: Puffer und Lösungen für die Pyrosequenzierung

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|------------------------|--|
| B-Puffer (2x), pH 7,6 | 20 mM Tris-HCl, 4 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% Tween 20 |
| A-Puffer (1x), pH 7,6 | 20mM Tris-Acetat, 2 mM Magnesiumacetat |
| Denaturierungslösung | 0,2 M NaOH |
| W-Puffer (10x), pH 7,6 | 10 mM Tris-Acetat |

Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die Polarographie

| Puffer/ Lösung | Zusammensetzung |
|-------------------------|---|
| Puffer A | 20 mM HEPES (pH 7,1), 250 mM Saccharose, 10 mM MgCl ₂ |
| Respirationspuffer | 1 mM ADP, 2 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,1) in Puffer A |
| Digitoninstammlösung | 10 mg/ml in DMSO |
| Rotenonstammlösung | 2 mM Rotenon in 100% Ethanol |
| Antimycin A-Stammlösung | 4 mM Antimycin A in 100% Ethanol |
| TMPD-Lösung | 40 mM TMPD*-Dihydrochlorid in Puffer A |
| KCN-Lösung | 200 mM KCN** in Puffer A, pH 8,0 |

*TMPD, Tetramethylphenylendiamin; **KCN, Kaliumcyanid

3.1.11 Software

Tabelle 8: verwendete Software

| Programm | Hersteller/ Programmierer | Anwendung |
|--------------------------------|---|-----------------------------------|
| 7500 System SDS v1.4 Software | Applied Biosystems | <i>real-time</i> PCR |
| HaploPainter | Holger Thiele ¹³⁴ | Stammbaumerstellung |
| Image J | Wayne Rasband, National Institutes of Health | Bildbearbeitung, Bildverarbeitung |
| OxygraphPlus | Hansatech Instruments Ltd. | Polarographie |
| Clustal v2.04 | T. Gibson, J. Thompson, D. Higgins ¹³⁵ | Sequenz-Alignment |
| BioDocAnalyze | Biometra | Agarosegeldokumentation |
| Microsoft Office | Microsoft | |
| Statview | SAS Institute, Inc. | Statistische Analysen |
| Vector NTI | Invitrogen | Planung von Klonierungen |
| FileMaker | FileMaker, Inc. | Datenbank |
| Lasergene Software | DNASTAR, Inc. | Sequenzanalyse |
| Spot Software v4.6 | Diagnostik Instruments, Inc. | Fluoreszenzmikroskop |
| VISIONlite | Thermo Scientific | Spektrophotometer |
| Primer3 | Steve Rozen, Helen Skaletzky ¹³⁶ | Primerdesign |
| Pyrosequencing SNP Software AQ | Pyrosequencing (Biotage) | Allelquantifizierung |

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation von DNA aus Zellen und Geweben

Die Identifizierung und Charakterisierung der Mutationen in der genomischen und mitochondrialen DNA erfolgte mit menschlicher DNA aus Blutzellen, Muskelgeweben, Haarfollikeln, Mundschleimhautzellen, kultivierten Hautfibroblasten und verschiedenen Gewebebiopsaten. Für die Genotypisierung der Mäuse wurde aus Schwanzspitzenbiopsaten extrahierte DNA verwendet. Weitere molekulargenetische Untersuchungen an Mausgeweben erfolgten an ES-Zellen, MEFs, Embryonen und verschiedenen Organen der *knockout*-Mäuse.

DNA-Präparation aus Blut: Die Gesamt-DNA aus kernhaltigen Blutzellen wurde mit der Salzextraktionsmethode nach Miller ¹³⁷ extrahiert und in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

DNA-Präparation aus Muskel und kultivierten Hautfibroblasten: Zur Präparation von Muskel-DNA wurde die Salzextraktionsmethode modifiziert. Die Lysis des Muskelgewebes erfolgte über Nacht mit Lysispuffer A (50 µl/mg Gewebe), 1/10 Volumen Proteinase K (20 mg/ml; Qiagen) und 1% SDS bei 55°C. Die DNA wurde anschließend mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Invitrogen) extrahiert und aus der wässrigen Phase mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M NaAc über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation (10 min, 20.000 x g) wurde das Pellet in 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Kultivierte Hautfibroblasten wurden zur DNA-Präparation zweimal mit PBS gewaschen und im Weiteren wie Muskelgewebe aufgearbeitet.

DNA-Präparation aus Haarfollikeln: Die Freisetzung der DNA aus Haarfollikeln erfolgte mittels Lysispuffer B und 1/100 Volumen Proteinase K (20 mg/ml) bei 37°C in 5 h. Anschließend wurde die Proteinase K inaktiviert (95°C, 10 min) und die DNA-haltige Lösung bei 4°C aufbewahrt.

DNA-Präparation aus Mundschleimhautzellen: Zellen der Mundschleimhaut wurden von der Wangeninnenseite durch einen Abstrich mit einem Wattestäbchen gewonnen. Die Watte wurde zur Zelllyse in 600 µl 50 mM NaOH aufgenommen, das Gemisch 10 s gevortext und dann 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Entfernung der Watte und Zugabe von 60 µl 1 M Tris (pH 8,0) wurde nochmals für 10 s gevortext und 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

DNA-Präparation aus ES-Zellen: Gesamt-DNA aus ES-Zellen wurde in der 96-Well-Platte präpariert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und über Nacht bei 55°C in 50 µl Lysispuffer C inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µl kaltem Ethanol und 1,5 µl 3 M NaAc (pH 5,2) wurde die DNA gefällt, anschließend dreimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

DNA-Präparation aus verschiedenen Geweben, Organen und MEFs: Die DNA aus MEFs, Geweben und Organen wurde mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert.

DNA-Präparation aus Schwanzspitzen und embryonalem Gewebe: Zur Genotypisierung von Mäusen und Mausembryonen wurde Schwanzspitzengewebe bzw. embryonales Mausgewebe 30 min bei 37°C in Lysispuffer D und 1/20 Volumen Proteinase K (20 mg/ml) lysiert. Nach der Inaktivierung der Proteinase K (95°C, 10 min) wurde die DNA-haltige Lösung bei 4°C gelagert.

Von den reinen DNA-Proben wurde die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt, eine Verdünnung von 10 ng/µl in TE-Puffer hergestellt und üblicherweise je 1 µl in PCR-

Reaktionen eingesetzt. Bei DNA-haltigen Lösungen, die noch Salze und Peptide beinhalten, wurde je 1 µl direkt für eine PCR-Reaktion verwendet.

3.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Plasmid Mini Kit“ oder „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend. Plasmid-DNA wurde mit TE-Puffer auf Konzentrationen von etwa 10 ng/µl verdünnt und je 1 µl für einen PCR-Reaktionsansatz verwendet.

3.2.1.3 Präparation von RNA

RNA wurde mit Tri Reagent[®] (Sigma) aus je 2 mm³ Lebergewebe von Mäusen gemäß den Herstellerangaben isoliert und in DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser gelöst. Nach der Bestimmung der Konzentration wurden die RNA-Lösungen bei -80°C gelagert, um die hydrolytische Aktivität von Ribonukleasen zu minimieren.

3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels UV-Spektrophotometrie

Mit einem UV-Spektralphotometer (NanoDrop 1000 UV-Vis-Spektralphotometer bzw. Spektralphotometer Helios Alpha, Thermo Scientific) wurde die Extinktion der DNA- und RNA-Proben bei Wellenlängen von 260 und 280 nm gemessen. Aus den Absorptionswerten ließen sich die Konzentration und die Reinheit der Proben ermitteln: eine $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA) bzw. 40 µg/ml RNA; ein OD_{260}/OD_{280} -Quotient von mindestens 1,8 bei DNA-Proben und 2,0 bei RNA-Proben kennzeichnet weitestgehend proteinfreie Nukleinsäurelösungen.

3.2.1.5 cDNA-Synthese

Um die *Ndufv1*-Transkripte von *Ndufv1*^{+/^{mut}-Mäusen auf Vollständigkeit und Sequenzgenauigkeit zu überprüfen, wurde die *Ndufv1*-cDNA eines heterozygoten Tieres sequenziert und die ermittelte Sequenz mit der entsprechenden Sequenz eines Wildtyp-Tieres verglichen. Zur Herstellung von Gesamt-cDNA wurden je 2 µg RNA mittels „ThermoScript™ RT-PCR System“ (Invitrogen), welches die *AMV-Reverse Transcriptase* beinhaltet, und unter Verwendung von Oligo (dT)₂₀-Primern und *Random*-Hexameren gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers umgeschrieben. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde mittels PCR (siehe 3.2.1.6) des ubiquitär exprimierten *β-2-Mikroglobulin*-Gens der Maus und anschließender Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Amplifikationsreaktionen erfolgten mit je 1 µl cDNA als Matrize.}

3.2.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In einer Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) werden spezifische DNA-Sequenzabschnitte zyklisch nach einem definierten Temperatur-Zeit-Protokoll amplifiziert.¹³⁸ Die Sequenz und Länge eines DNA-Abschnitts, sowie die Länge und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide (Primer), welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt definieren, beeinflussen verschiedene Parameter einer PCR, wie z.B. *Annealing*-Temperatur (**AT**) und Elongationszeit (**EZ**). Für alle Reaktionen wurde, wenn nicht anders vermerkt, folgendes Standardprotokoll verwendet: 95°C für 5 min, 35-40 Zyklen mit 95°C für 30 s, **AT** für 30 s und 72°C für **EZ**, sowie abschließend 72°C für 10 min. Ein Standard-PCR-Ansatz mit einem Volumen von 25 µl setzte sich wie folgt zusammen: 0,5 U GoTaq-Flexi-DNA-Polymerase (Promega), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,1 µM Vorwärtsprimer, 0,1 µM Rückwärtsprimer, 1 µl DNA. Als Thermocycler wurden Geräte der Firmen Biometra (T3000), Eppendorf (Mastercycler gradient) und MJ Research (PTC-225 DNA Engine Tetrad) verwendet. Der Erfolg einer PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert, wobei die doppelsträngigen DNA-Fragmente durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden.

3.2.1.7 long range PCR

Die Amplifikation langer DNA-Fragmente, zur Überprüfung der *Ndufv1*-cDNA-Sequenz von *Ndufv1*^{+mut}-Mäusen oder zur Kontrolle der Rekombination zwischen *Ndufv1*-Gen und *Targeting*-Vektor in transfizierten ES-Zellen, erfolgte mittels *long range* PCRs. Hierbei kamen DNA-Polymerasen zum Einsatz, die eine *proof-reading* Aktivität und eine höhere Prozessivität als gängige *Taq*-Polymerasen aufweisen, wodurch eine qualitativ bessere Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit einer Länge über 1.000 bp möglich ist.

Die *Ndufv1*-cDNA, mit einer Länge von 1.465 bp, wurde mit der Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) in folgendem Reaktionsansatz amplifiziert: 1x Phusion HF-Puffer, 0,2 mM dNTPs, je 0,1 µM Primer (S782 und S783) und 1 U Enzym. Die Reaktion erfolgte bei 96°C für 1 min, 35 Zyklen mit 96°C für 10 s, 60°C für 20 s und 72°C für 45 s und abschließend 72°C für 10 min.

Zur Kontrolle der Rekombination zwischen *Ndufv1*-Gen und *Targeting*-Vektor in ES-Zellen wurde die TaKaRa LA *Taq*[™] DNA-Polymerase (TAKARA Bio Inc.) verwendet. Bei einer homologen Rekombination, die zur Integration der *Neo*-/*TK*-Selektionskassette in das *Ndufv1*-Gen führte, sollte mit dem Primerpaar S100/S101 ein DNA-Fragment mit einer Länge von 3.853 bp (linker Genarm) und mit dem Primerpaar S96/S99 ein DNA-Fragment mit einer Länge von 3.515 bp (rechter Genarm) mittels PCR amplifizierbar sein. Die Reaktionsansätze beinhalteten 1x LA-Puffer II, 2,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, je 0,2 µM Primer und 1 U LA-*Taq* und durchliefen folgendes PCR-Protokoll: 95°C für 3 min, 40 Zyklen mit 98°C für 10 s,

65°C bzw. 58°C für 30 s und 72°C für 4 min, sowie abschließend 72°C für 15 min. Als Positivkontrollen dienten *in vitro* erzeugte DNA-Fragmente, die neben der Sequenz des jeweiligen Genarms und der *Neo*-/*TK*-Selektionskassette, etwa 20-25 bp angrenzende genomische 5'- bzw. 3'-Sequenzabschnitte des *Ndufv1*-Gens enthielten.

3.2.1.8 RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)-Analyse

Die RFLP-Analyse diente in der vorliegenden Arbeit als Methode zur Identifizierung der *Ndufv1*-Mutation c.1022C→T in Plasmiden und Mäusen. Mit dem Primerpaar S1337 und S46 wurde ein 623 bp langes PCR-Produkt generiert, welches durch die Restriktionsendonuklease *RsaI* in Anwesenheit der Mutation in Fragmente der Längen 278, 177, 160 und 8 bp und in Abwesenheit der Mutation in Fragmente der Längen 455, 160 und 8 bp geschnitten wurde. Zur Ermittlung der Fragmentlängen wurden die Restriktionsfragmente im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.1.9 Klonierung von PCR-Produkten

Für Klonierungen wurden die PCR-Produkte zunächst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerprotokoll extrahiert. Die PCR-Produkte wurden mittels TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T Easy[®] eingebracht. Dieser Klonierungsvektor liegt in linearem Zustand vor und besitzt endständige Einzel-3'-Thymidin-Überhänge. Für eine effektive Ligation benötigten die zu klonierenden PCR-Produkte somit Einzel-3'-Adenin-Überhänge. Die, durch die DNA-Polymerase in der PCR, angefügten A-Nukleotide, gingen häufig durch die Gelextraktion (siehe oben) verloren, so dass die gereinigten Produkte vor der Ligation für 12 min bei 72°C mit 0,5 U Polymerase und 0,5 M dATPs (in 1x Puffer und mit 2,5 mM MgCl₂), zur Erzeugung neuer 3'-A-Überhänge, inkubiert wurden. Die Ligation erfolgte mit Hilfe des „LigaFast[™] Rapid DNA Ligation Systems“ (Promega) gemäß den Herstellerangaben und mit einem molaren Verhältnis zwischen PCR-Produkt und Vektor von 1:3.

Nach der Transformation der Ligationsprodukte durch Hitzeschock in den chemisch kompetenten *E. coli*-Stamm JM109, entsprechend dem Herstellerprotokoll, wurden die Zellen auf selektiven Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte mit Hilfe der *lacZ* / X-Gal-vermittelten Blau-Weiß-Selektion und mittels Kolonie-PCR, bei der einige Zellen eines Bakterienklons direkt zum PCR-Ansatz mit spezifischen Primern gegeben wurden. Positive Klone wurden in ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator vermehrt und einige Zellen in Glycerol bei -80°C konserviert. Anhand von Restriktionsanalysen (siehe 3.2.1.8) und/oder Sequenzierungen (siehe 3.2.1.10) wurden alle Konstrukte vor ihrer weiteren Verwendung geprüft.

3.2.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung nukleärer und mitochondrialer Gene zur Identifizierung der pathogenen Mutationen bzw. zur Überprüfung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger.¹³⁹ Hierfür wurde das „ABI PRISM BigDye Terminator Kit“ v1.1 (Applied Biosystems) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden verwendet. PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierungsreaktion durch Inkubation (37°C für 45 min, 80°C für 15 min) mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, Roche) und Exonuklease I (New England Biolabs) gereinigt. Die verwendeten Sequenzierprimer sind dem Abschnitt 9.5 im Anhang zu entnehmen. Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die synthetisierten Produkte mittels Sephadex™ G50 (GE Healthcare) gemäß Herstellerangaben von überschüssigen Nukleotiden und nicht eingebauten Primern befreit und im ABI Prism 3730 Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems) analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm SeqMan von DNASTAR®.

3.2.1.11 Mutationsanalyse des PAX6-Gens

Das PAX6-Gen wurde von Kathleen Williamson (MRC Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh, Großbritannien) wie beschrieben mittels DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) und Sequenzierung untersucht.¹⁴⁰ Die bei dem Patienten B identifizierte Mutation wurde anschließend in einer zweiten Sequenzierungsreaktion bestätigt und ihr Auftreten in der DNA von Eltern und Schwester geprüft.

3.2.1.12 Pyrosequenzierung

Um die mitochondrialen Mutationen m.8347A→G und m.8344A→G in den verschiedenen Zellen und Geweben der Patienten und ihrer Familienmitglieder genau zu bestimmen, habe ich für beide Mutationen quantitative Einzel-Nukleotid-Austausch-Analysen mittels Pyrosequenzierung etabliert. Das Prinzip der Pyrosequenzierung beruht auf der Detektion von freigesetztem Pyrophosphat (PP_i) während einer Sequenzierreaktion. Das PP_i wird in einer Kaskade enzymatischer Reaktionen in ein, zur Anzahl der inkorporierten Nukleotide proportionales, messbares Lichtsignal umgesetzt und dadurch in Form von *Peaks* in einem Pyrogramm graphisch darstellbar. Die Höhen der *Peaks* stellen hierbei die Anzahl der eingebauten Nukleotide dar (Abbildung 11).¹⁴¹

Für die Heteroplasmieanalyse wurden zunächst DNA-Fragmente mittels PCR (siehe 3.2.1.6) amplifiziert, welche die jeweilige Mutation einschlossen. Jeweils einer der beiden PCR-Primer war, zur späteren Isolierung des entsprechenden DNA-Strangs, am 5'-Ende mit Biotin markiert. Im Fall der m.8347A→G Mutation war der Vorwärtsprimer biotinyliert, wodurch bei der Pyrosequenzierung der 5'-3'-DNA-Strang als Matrize diente und die Sequenz des 3'-5'-

DNA-Strangs analysiert wurde. Damit erschien im Pyrogramm das Wildtyp-Nukleotid A als komplementäres T und das mutante Nukleotid G als komplementäres C.

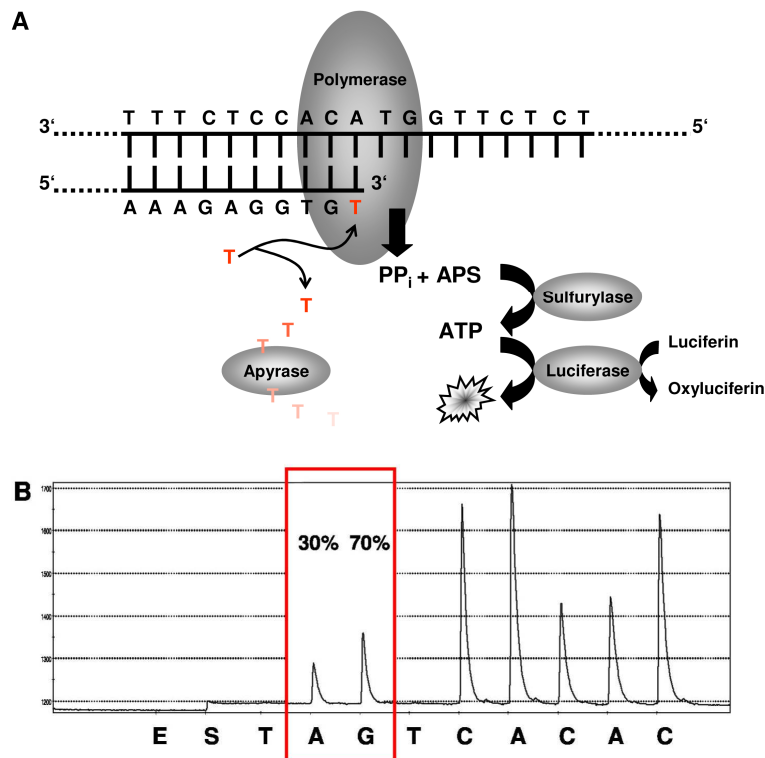


Abbildung 11: Prinzip der Pyrosequenzierung und Beispielpyrogramm. (A) Zu einem einzelsträngigen PCR-Produkt mit gebundenem Sequenzierprimer werden nacheinander, in einer zuvor definierten Reihenfolge, verschiedene Nucleotide (Desoxynucleosid-Triphosphate) gegeben. Sind sie komplementär zum Matrizenstrang, werden sie unter Abspaltung von PP_i durch die DNA-Polymerase eingebaut. Die ATP-Sulfurylase im Ansatz setzt das PP_i in Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat quantitativ in ATP um, welches der Luciferase die notwendige Energie zur Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin liefert. Das dabei entstehende Lichtsignal wird mit einer CCD-Kamera detektiert und als *peak* in einem Pyrogramm dargestellt. Vor der Zugabe des nächsten Nucleotids werden nicht eingebaute Nucleotide durch die Apyrase abgebaut. Damit ist je Reaktionsschritt das Lichtsignal direkt proportional zur Menge inkorporierter Nucleotide. Aufeinanderfolgende Nucleotide der gleichen Art werden durch die Polymerase in einem Reaktionsschritt eingebaut. Somit sind die entsprechenden *Peaks* im Pyrogramm doppelt oder mehrfach hoch. **(B)** Gezeigt ist beispielhaft ein Pyrogramm einer Eichprobe, mit 30% Wildtyp-mtDNA-Kopien und 70% mutierten mtDNA-Kopien, zur Quantifizierung der mitochondrialen m.8344A→G Mutation. Nach Zugabe von Enzymen (E) und Substraten (S) werden die Nucleotide in der durch die Sequenz vorgegebenen Reihenfolge zugefügt (X-Achse). An der Position der Mutation werden beide Nucleotidalternativen angeboten. Aus der Höhe der resultierenden *Peaks* (Y-Achse) berechnet die integrierte Software die prozentualen Anteile der beiden Allele im DNA-Gemisch. Die anderen Nucleotidzugaben fungieren als Negativ- und Positivkontrollen der Pyrosequenzierung.

Die Pyrosequenzierung erfolgte unter Verwendung des „SNP Reagent Kit 5 x 96“ (Biotage) mit dem PSQ™ HS 96 System (Biotage). Als erstes wurden die DNA-Stränge der PCR-Produkte mittels Streptavidin-gekoppelter Sepharose-*Beads* (GE Healthcare) und einer Vakuum-Apparatur (Biotage) getrennt: 15 μ l PCR-Produkt wurden mit 2 μ l Sepharose-*Beads*, 40 μ l 2 x B-Puffer und 28 μ l *Aqua bidest.* in einer 96-Well-Platte 5 min bei 1.000 upm geschüttelt, wodurch eine Anlagerung der DNA an die *Beads* erfolgte. Mit Hilfe einer Vakuum-

pumpe und einer Filtervorrichtung (PyroMark Vacuum Prep Tool, Biotage) wurden die DNA-*Beads* aus dem Reaktionsgemisch isoliert und nacheinander je 5 s in 70% Ethanol, Denaturierungslösung und W-Puffer überführt. Die *Beads*, nun mit gebundenen DNA-Einzelsträngen, wurden schließlich in eine 96-*Well*-Platte mit je 11,64 µl A-Puffer und 0,36 µl 10 µM Sequenzierprimer gegeben. Für die Hybridisierung des Sequenzierprimers, dicht vor der Position der Mutation, wurde die Platte 2 min bei 80°C inkubiert, dann auf RT abgekühlt und ins Sequenziergerät gestellt. Enzym und Substrat des „SNP Reagent Kits“ wurden in je 620 µl *Aqua bidest.* gelöst und mit je 200 µl der vier Desoxynukleosid-Triphosphate in die entsprechenden Ressorts der Kartusche des PSQ HS Systems gegeben. Im Verlauf der Sequenzierreaktion erfolgte zuerst die Zugabe von Enzym und Substrat und dann die Zugabe der Nukleotide in der Reihenfolge der entsprechenden DNA-Sequenz. An der Position der Mutationen wurden die beiden alternativen Nukleotide (Wildtyp/Mutation) nacheinander angeboten. Aus dem resultierenden Pyrogramm berechnete die integrierte System-Software anhand der *Peak*-Höhen den prozentualen Anteil von Wildtyp- und mutierten Allelen.

Für jede Probe wurden 4 unabhängige PCRs und Pyrosequenzierungen durchgeführt, deren Mittelwerte anhand einer Eichgerade normalisiert wurden. Die Eichgerade wurde aus definierten Mischungen klonierter PCR-Produkte, die homoplasmisch für Wildtyp bzw. Mutation waren, erstellt.

3.2.1.13 Quantitative real-time PCR (TaqMan)

Die Untersuchung der absoluten Anzahl mitochondrialer DNA-Kopien in Patienten- und Kontrollgeweben, sowie in verschiedenen Mausgeweben oder MEFs erfolgte mit Hilfe quantitativer *real-time* PCR. Unter Verwendung von TaqMan[®]-Sonden und des ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) wurde in den menschlichen Geweben die absolute Kopienzahl des mitochondrial kodierten Gens *MT-ND1* (NADH-Ubichinon Oxidoreduktase, Untereinheit 1) im Verhältnis zur Kopienzahl des ubiquitär exprimierten, kernkodierten Gens *MMP1* (Matrix Metalloproteinase 1) und in Mausgeweben bzw. MEFs die absolute Kopienzahl des mitochondrialen Gens *mt-Co1* (Cytochrom c-Oxidase, Untereinheit 1) im Verhältnis zur Kopienzahl des kernkodierten Gens *Ndufv1* (NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Flavoprotein 1) bestimmt. Die verwendeten Primer und fluoreszenzmarkierten Sonden stammten von den Firmen TIB MOLBIOL und Invitrogen.

Die *real-time* PCR-Ansätze mit 50 µl Gesamtvolumen beinhalteten 1x PCR-Puffer (Invitrogen), 3,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 1 µM ROX dye, 0,2 mM dNTPs (Promega), je 0,5 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,1 µM Sonde und 1U Platinum-*Taq*-Polymerase (Invitrogen). Für die Reaktionen wurde folgendes Temperatur-Zeit-Protokoll verwendet: 95°C für 10 min, 45 Zyklen mit 95°C für 30 s und 65°C für 1 min. Die Datenanalyse zur absoluten Quantifizierung der DNA-Kopien erfolgte anhand, aus klonierten PCR-Produkten erstellten, Standard-

kurven mit der ABI PRISM™ Sequence Detection Software v1.6 (Applied Biosystems). Die Quotienten aus mtDNA-Kopienzahl und gDNA-Kopienzahl ergeben schließlich die absolute mtDNA-Kopienzahl pro Einzelkopie des nukleären Gens.

3.2.1.14 Southern-Blot

ES-Zellen der Maus, die mit dem *Targeting*-Vektor 576/1 transfiziert wurden und anschließend eine Neomycinresistenz aufwiesen, wurden mittels Southern-Blot¹⁴² analysiert, um festzustellen, ob eine homologe Rekombination zwischen genomischer DNA und Vektor-konstrukt stattgefunden hatte. Dazu wurden zunächst alle ES-Zellklone mittels *Bam*HI-Restriktion und einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, die außerhalb des Vektor-konstrukts hybridisierte, getestet. Positiv identifizierte Klone wurden dann über drei weitere Blots mit unterschiedlichen Kombinationen von Restriktionsenzymen und Hybridisierungssonden untersucht, um sicherzustellen, dass die jeweilige Rekombination ohne Deletion oder Duplikation der Zielsequenz erfolgt war und die *Ndufv1*-Mutation c.1022C→T vorlag.

Nach der Entfernung der *Neo*-/*TK*-Kassette aus dem Zielgen wurden die ES-Zellen erneut mittels Southern-Blot auf die korrekte Länge der Gensequenz getestet. Die für die Blots verwendeten Enzyme und Sonden sind in den Tabelle 9 und 10 aufgeführt.

Tabelle 9: Restriktionsenzyme und Sonden für Southern-Blots zum Rekombinationsnachweis

| Enzym | Sonde | Sondenlänge | Lage der Sonde | Wildtyp-DNA-Fragmente (bzw. mit <i>loxP</i> -Sequenz nach Entfernung der Selektionskassette) | DNA-Fragmente nach homologer Rekombination |
|---------------|-------------------|-------------|--------------------------------------|--|--|
| <i>Bam</i> HI | <i>Ndufv1</i> -3' | 1301 bp | 3' von <i>Ndufv1</i> | 5027 bp (+ 33 bp) | 9174 bp |
| <i>Bam</i> HI | Neo | 283 bp | in <i>Neo</i> -/ <i>TK</i> -Kassette | - | 9174 bp |
| <i>Eco</i> RV | <i>Ndufv1</i> -5' | 369 bp | 5' von <i>Ndufv1</i> | 7915 bp (+ 33 bp) | 4676 bp |

Tabelle 10: Restriktionsenzym und Sonde für Southern-Blot zum Mutationsnachweis

| Enzym | Sonde | Sondenlänge | Lage der Sonde | Wildtyp-DNA-Fragment | DNA-Fragment mit Mutation c.1022C→T |
|--------------|-------|-------------|--|----------------------|-------------------------------------|
| <i>Rsa</i> I | Mut | 272 bp | <i>Ndufv1</i> Exon 6 und 7 (5' der Mutation) | 467 bp | 290 bp |

Sondengenerierung: Die Hybridisierungssonden *Ndufv1*-5', *Ndufv1*-3' und Mut wurden mittels PCR aus genomischer Leber-DNA einer C57BL/6-Maus generiert und die Neo-Sonde aus dem *Targeting*-Vektor 576/1. Die Sequenzen der verwendeten Primer S851/S852 (*Ndufv1*-5'), S853/S854 (*Ndufv1*-3'), S345/S346 (Neo) und S1337/S1338 (Mut) sind im Abschnitt 9.5 im Anhang aufgeführt. Die amplifizierten Produkte wurden mittels Agarosegel-

elektrophorese und dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) gereinigt und je 2 µl zur Konzentrationsabschätzung parallel zum DNA-Standard SmartLadder in einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

Kapillarblot: Je 3-10 µg ES-Zell-DNA wurden in einem 30 µl Reaktionsansatz bei 37°C über Nacht mit 10-20 U Restriktionsenzym verdaut. Die Auftrennung der Restriktionsprodukte erfolgte in einem 0,8% Agarosegel mit 1x TBE-Puffer bei 40 V über 17 Stunden. Als Molekulargewichtsmarker diente λ-DNA, die mit *HindIII* bzw. *HindIII/PstI* geschnitten war. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in Depurinierungslösung und anschließend 30 min in Denaturierungslösung auf dem Schüttler inkubiert, um eine optimale Transfereffizienz beim Blotten zu erreichen. Der Transfer der DNA auf die positiv geladene Nylonmembran Hybond™ XL (Amersham Biosciences) erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot. Nach dem Blotten wurde die Membran durch zweimaliges Spülen für je 5 min in 2x SSC-Puffer äquilibriert, anschließend getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

Hybridisierung: Die Membran wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung mindestens eine Stunde bei 65°C im Rollofen prähybridisiert. In dieser Zeit erfolgte die radioaktive Markierung ([α-³²P]dCTP, Hartmann Analytic GmbH) von 40 ng der jeweiligen Sonde mittels „Rediprime™ II Random Prime Labelling System“ (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers. Überschüssige Nukleotide wurden über ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences) abgetrennt. Nach Zugabe von 10 µg genomischer Maus-DNA und einer Inkubation für 10 min bei 95°C wurde die Sonde in 800 µl vorgewärmter Hybridisierungslösung bei 65°C für 30-60 min mit der Maus-DNA prähybridisiert. Die Hybridisierung von Sonde und membrangebundener DNA erfolgte über Nacht bei 65°C.

Stringentes Waschen und Detektion: Überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde wurde durch Waschen der Membran (68°C; 5 min Waschlösung 1, 30 min Waschlösung 2, ggf. 15 min Waschlösung 3) entfernt. Die Signaldetektion erfolgte durch Autoradiographie.

Die Methode des Southern-Blots wurde auch eingesetzt, um größere Deletionen in der mtDNA des Patienten B auszuschließen. Dazu wurde 1 µg genomischer Muskel-DNA mit 25 U Restriktionsendonuklease *PvuII* über Nacht bei 37°C verdaut und in einem 0,75% Agarosegel für 20 h bei 20 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Blotten der DNA-Fragmente sowie die Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Sonde erfolgten wie oben beschrieben. Als Sonde diente in diesem Fall linearisierte mitochondriale DNA einer gesunden Kontrollperson. Als Molekulargewichtsmarker wurde λ-DNA, geschnitten mit der Restriktionsendonuklease *HindIII*, verwendet.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen erfolgten an einer Sterilwerkbank mit sterilen Glas- und Plastikmaterialien, sowie sterilen, autoklavierten bzw. steril-gefilterten Lösungen, Puffern und Medien. Die Kultivierung der Zellen erfolgte stets im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Medien wurden vor ihrer Zugabe zu den Zellen auf 37°C erwärmt. Die verwendeten Kulturschalen wurden vor der Ausplattierung von Zellen mit Gelatine beschichtet (0,1%-Lösung; Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur).

3.2.2.1 ES-Zellkultur

Der Umgang mit ES-Zellen basierte auf den Protokollen von Joyner, 2000 in „*Gene Targeting: A Practical Approach*“.¹⁴³

Feederzellen: ES-Zellen benötigen zum Wachstum eine Schicht mitotisch-inaktivierter Feederzellen (primäre embryonale Mausfibroblasten). Die verwendeten Feederzellen stammten aus Mausembryonen (Embryonaltag 13,5-14,5) der Neomycin-resistenten Mauslinie *ros^{ex}*.¹³² Nach der Entfernung von Kopf, Herz und Leber wurde das restliche embryonale Gewebe mechanisch (Skalpell) und chemisch (Trypsin/EDTA, 30 min bei 37°C) zerkleinert und die Gewebestückchen auf Kulturschalen in Feeder-Medium ausplattiert. Es erfolgte ein zweitägiger Mediumwechsel. Waren die Zellen konfluent, wurden sie 1:3 gesplittet: Waschen mit 1x PBS, Ablösung von der Zellkulturschale mit Trypsin/EDTA bei 37°C, Deaktivierung des Trypsins durch Zugabe von FKS-haltigem Feeder-Medium, Vereinzeln der Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren im Medium, Zentrifugation (4 min, 200 x g), Resuspension in Feeder-Medium und Ausplattierung auf drei Kulturschalen. Feederzellen wurden bis zu dreimal passagiert und gegebenenfalls in Einfriermedium A+B (1:1) bei -80°C eingefroren und in Stickstoff gelagert.

Inaktivierung von Feederzellen mit Mitomycin C: Konfluent gewachsene Feederzellen der Passage 3 wurden zur Kultivierung von ES-Zellen verwendet. Um ein weiteres Wachstum der Feederzellen zu verhindern, wurde das Feeder-Medium mit Mitomycin C (10 µg/ml), einem Inhibitor der DNA-Synthese, versetzt und die Zellen darin 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen mit 1x PBS, Trypsinierung, Zentrifugation und erneuter Ausplattierung konnten die Feederzellen innerhalb von 2 Wochen für die ES-Zellkultur verwendet werden.

ES-Zellkultur: ES-Zellen wurden für zwei bis drei Tage, bis Kolonien zu sehen waren, auf einer Schicht inaktiver Feederzellen in ES-Medium kultiviert. Um die ES-Zellen in undifferenziertem Zustand zu halten, beinhaltete das verwendete Medium den *leukaemia inhibitory factor* (LIF)¹⁴⁴ und wurde täglich gewechselt. Beim Wachstum der ES-Zellen sollte eine Dichte von 5x10⁶ Zellen pro Kulturschale (Ø 10 cm) nicht überschritten werden, da sie in enger

Nachbarschaft schnell differenzieren können. Bei Bedarf wurden ES-Zellen nach dem gleichen Prinzip gesplittet wie Feederzellen (siehe oben).

Transfektion von ES-Zellen: Für die Transfektion der ES-Zellen mit dem *Targeting*-Vektor wurde eine dicht bewachsene 10 cm Kulturschale ($\sim 1,5 \times 10^7$ Zellen) benötigt. Die ES-Zellen sollten noch einzelne, scharf umrandete Einzelkolonien bilden, was für einen undifferenzierten Zustand der Zellen spricht. Nach Trypsinierung und Zentrifugation (4 min, 200 x g) der Zellen wurden sie in 1x PBS aufgenommen und eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro 800 μ l PBS eingestellt. Die Transfektion mit 20, 30 bzw. 40 μ g linearisiertem *Targeting*-Vektor erfolgte mittels Elektroporation (Impulsgenerator, Dr. L. Fischer) in Gene Pulser®-Kuvetten (Bio-Rad; 4 mm Elektrodenabstand) bei 300 V, 1200 μ F und einem rechteckigen Impuls mit einer Dauer von 2 ms. Vorsichtig wurden die elektroporierten Zellen in ES-Medium überführt und auf drei Feederzell-bewachsene Kulturschalen ausplattiert.

Selektion und Isolierung G418-resistenter ES-Zellklone: Zwei Tage nach der Elektroporation der Zellen wurde dem ES-Medium das Antibiotikum Geneticin (G418; 400 μ g/ml) zugesetzt und das Medium täglich gewechselt. Nach 6-8 Tagen sollten alle ES-Zellen ohne Neomycinresistenzgen abgestorben sein und die einzelnen kugelförmigen, scharf umrandeten resistenten ES-Zellklone isoliert werden. Die gepickten Einzelkolonien wurden zur Vereinzelung der Zellen trypsinisiert und in ES-Medium+G418 auf 96-Well-Platten, mit Feederzellschicht, kultiviert. Nach wenigen Tagen wurden die Zellen 1:2 gesplittet: eine 96-Well-Platte ohne Feederzellen für die Analyse der Zellen mittels Southern-Blot und eine 96-Well-Platte mit Feederzellen zum Einfrieren und Konservieren der Zellen bei -80°C in Einfriermedium 96.

Entfernung der Neo-/TK-Selektionskassette: Nach der Analyse der Zellen mittels Southern-Blot wurden rekombinante ES-Zellen zur Entfernung der Neo-/TK-Selektionskassette transient mit dem Cre-Rekombinase exprimierenden Plasmid-Vektor pIC-Cre transfiziert. Die Elektroporation von je $0,6 \times 10^7$ Zellen eines positiven ES-Zellklons mit 10 μ g pIC-Cre-Vektor erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurden je 10.000, 20.000 und 30.000 Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert, wobei aufgrund der fehlenden Neomycinresistenz der Zellen ab sofort ES-Medium ohne G418 verwendet wurde. Nach wenigen Tagen konnten wiederum ES-Zellklone isoliert werden, die im weiteren Verlauf 1:3 gesplittet wurden: eine 96-Well-Platte zum Einfrieren und Konservieren der Zellen bei -80°C , die zweite 96-Well-Platte ohne Feederzellen zur Analyse der Zellen mittels Southern-Blot und die dritte 96-Well-Platte mit ES-Medium+G418, zur negativen Selektion der Zellen.

Blastozysteninjektion und -transfer: Die Isolierung von Blastozysten aus B6D2F1-Mäusen (F1-Generation von C57BL/6 x DBA/2 Verpaarungen), die Injektion rekombinanter ES-Zellen (SV129/Ola-Hintergrund) in die Blastozysten und der Blastozystentransfer in den Uterus von

Ammenmäusen (NMRI-Stamm), zur Austragung potentiell chimärer Tiere, wurden als Auftragsleistung von der TCF (*Transgenic Core Facility*) am MDC in Berlin durchgeführt.

3.2.2.2 Embryonale Mausfibroblasten

Embryonale Mausfibroblasten (MEFs, *mouse embryonic fibroblasts*) der Genotypen *Ndufv1^{+/+}*, *Ndufv1^{+/-mut}* und *Ndufv1^{mut/mut}* wurden aus Embryonen (E6,5, E7,5 und E8,5) nach terminierter Verpaarung zweier *Ndufv1^{+/-mut}*-Mäuse gewonnen. Die trächtigen Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet, der Uterus für die Embryopräparation in 1x PBS überführt und die unter der Stereolupe präparierten Embryonen direkt in eine 24-Well-Zellkulturplatte mit Rho0-Medium und 30% AmnioMax, unter Auflage eines Deckgläschens, gegeben. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Deckgläser nach einer Woche abgenommen. Je nach Wachstumsverhalten erfolgten das Splitten und das Einfrieren der Zellen (Einfriermedium C) zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Proteinpräparation aus Geweben

Zur Minimierung der Proteolyse wurden alle experimentellen Schritte der Proteinpräparation auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Je nach vorhandener Gewebemenge wurden zu 100-300 mg gefrorenem Gewebe 500-1.000 µl Lysispuffer gegeben und die Gewebe zweimal je 10 s mit dem UltraTurrax (TP 18/10, IKA Labortechnik) mechanisch homogenisiert. Zum Aufschluss der Zellen folgten 5 Ultraschallbehandlungen à 10 s mit dem Sonikator (UP100H, Hielscher) bei 100% Geräteleistung. Die Gewebesuspension wurde 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand erneut 10 min bei 20.000 x g. Die Gewebeextrakte wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode (1976)¹⁴⁵ (Bio-Rad). Im Spektralphotometer (Helios α, Thermo Scientific) wurden die Absorptionen der Gewebeextrakte bei 595 nm Wellenlänge gemessen und die entsprechenden Proteinkonzentrationen anhand einer, aus definierten BSA-Verdünnungen erstellten, Eichreihe bestimmt.

3.2.3.2 Western-Blot

Die semi-quantitative Analyse der Proteine Porin, NRF1, TFAM, COX2 und COX4 aus verschiedenen Geweben der Patientin A und der Kontrollen erfolgte mittels Western-Blot.¹⁴⁶

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page): Zunächst wurden die Proteine der Gewebeextrakte im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Material und Methoden

Das im Gel und im Ladepuffer enthaltene anionische Detergens SDS bindet in stöchiometrischen Mengen an die Proteine, wodurch deren Eigenladung von einer negativen Gesamtladung, dessen Stärke letztlich von der Proteingröße abhängt, überlagert wird. Deshalb wandern die SDS-Proteinkomplexe im elektrischen Feld entsprechend ihrer molekularen Masse unterschiedlich schnell.

Im ersten Durchlauf wurden je 50 µg Protein der Gewebeextrakte mit 2x Laufpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert, 3 min bei 20.000 x g (4°C) zentrifugiert und in 12% SDS-Gelen mit 5% Sammelgelen im Midi Gelsystem SE 600 (Hoefer) mit 1x Laufpuffer (Laemmli (1970))¹⁴⁷ bei 35-65 mA und 4°C in etwa 3 h aufgetrennt. Nach Färbung der Gele mit Antikörpern gegen die Referenzproteine und densitometrischer Bestimmung der Proteinkonzentrationen variierten die eingesetzten Proteinmengen etwas gegenüber den ursprünglich eingesetzten Mengen.

Western-Blot: Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels *semi-dry-blotting* unter Verwendung der Fastblot B44-Apparatur (Biometra) und 1x Blotpuffer mit 0,8 mA pro cm² in 2 Stunden auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membranen (Roche) transferiert. Der Transfer wurde mit einer Ponceaurot-Färbung (5 min bei Raumtemperatur) überprüft und die Membran anschließend, zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen, für 30 min in Blockerlösung inkubiert. Die Inkubation mit dem primären, in Blockerlösung verdünnten, Antikörper (Abschnitt 3.1.9) erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen für je 6 min in TBS-T-Puffer wurden die Membranen für eine Stunde mit dem, ebenfalls in Blockerlösung verdünnten, sekundären Antikörper inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Mittels Chemilumineszenz (ECL-Reagenz A+B, 1:1; 5 min bei Raumtemperatur) wurden die Antikörpersignale auf Röntgenfilmen visualisiert. Bei der Filmexposition wurde darauf geachtet, dass die detektierten Signalintensitäten noch nicht den Sättigungsbereich des Films erreichten.

Die Elektrophorese-Bedingungen bei der Proteinauftrennung waren so gewählt, dass der Nachweis der Proteine Porin, NRF1 und TFAM, sowie β-Tubulin bzw. GAPDH als Ladekontrollen (Referenzproteine), für das jeweilige Gewebe der Patientin/Kontrollen auf jeweils der gleichen Membran erfolgen konnte, da die Proteinbanden für die densitometrische Auswertung genügend Abstand voneinander hatten. Desgleichen wurden COX2 und COX4 auf jeweils der gleichen Membran nachgewiesen.

Datenauswertung: Zur semi-quantitativen Bestimmung der relativen spezifischen Proteinkonzentrationen wurden die Röntgenfilme mit einem Durchlichtscanner (Epson Expression 1600Pro, Epson) eingelesen und die integrierten Dichten (=Bandenvolumen der relative Bildpartikel) der Proteinbanden mit Hilfe des Programms ImageJ berechnet. Die Bestimmung der relativen Proteinmengen von Porin, NRF1 und TFAM pro Referenzprotein erfolgte, indem für jedes Gewebe und jedes Protein der Mittelwert der Signalintensitäten von den Kontrollpro-

ben durch die Signalintensitäten der einzelnen Proben (Patientin und Kontrollen) dividiert wurde. Der Quotient jeder Probe für Porin, NRF1 und TFAM wurde anschließend ins Verhältnis zum Quotienten des Referenzproteins gesetzt, um die relativen Proteinmengen zu erhalten.

3.2.3.3 Messung der Aktivitäten der Atmungskettenenzyme

Um die Atmungskettenaktivität der kultivierten MEFs (siehe 3.2.2.2) abschätzen zu können, wurden die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I und IV mittels spektrophotometrischer Messungen ermittelt. Dazu wurden die kultivierten Zellen (mindestens 2×10^7) trypsinisiert, zweimal in 1x PBS gewaschen und als Pellet in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Aufarbeitung der Zellen und die Durchführung der Messungen erfolgten wie beschrieben in der Abteilung für Pädiatrie am „Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders“ in den Niederlanden.^{148, 149} Die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in Muskelzellen und kultivierten Hautfibroblasten des Patienten B und in drei nicht verwandten MERRF-Patienten wurden nach den publizierten Protokollen¹⁴⁸ ebenfalls in den Niederlanden bestimmt. Die dabei durchgeführten Messungen beruhen auf der Detektion von Extinktionswerten, die infolge von Komplexspezifisch induzierten Redoxreaktionen im Reaktionsansatz ab- bzw. zunehmen.

3.2.3.4 Laktat- und Glukose-Messungen

Zur Analyse des Energiestoffwechsels in den MEFs der Genotypen *Ndufv1*^{+/+}, *Ndufv1*^{+/mut} und *Ndufv1*^{mut/mut} wurden pro Zelllinie dreimal je 200.000 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und mit je 3 ml Rho0-Medium/30% AmnioMax für 48 h im Kulturschrank inkubiert. Nach jeweils 12 h (t=0, 12, 24, 36, 48h) wurden von jedem Well 150 µl Medium abgenommen und die Laktat- und Glukosekonzentrationen mit dem Radiometer ABL700 (Radiometer America Inc.) entsprechend Herstellerangaben bestimmt.

3.2.3.5 Polarographie

Mittels polarographischer Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurde die Atmungskettenfunktion kultivierter MEFs untersucht. Dazu wurden die konfluent gewachsenen Zellen ($0,25-1,00 \times 10^7$) trypsinisiert, pelletiert und mit Digitonin (50 µg/ml in Puffer A) für 2-8 min permeabilisiert. Die Permeabilisierung galt als erfolgreich, wenn sich 99% der Zellen eines Aliquots in der anschließenden Behandlung mit Trypanblau (0,4%, 5 min) blau färbten, da der Farbstoff nicht von nicht permeabilisierten Zellen aufgenommen wird. Nach dem Waschen mit Puffer A wurden die Zellen in 1 ml Respirationspuffer aufgenommen und in die Reaktionskammer (Oxygraph, Hansatech Instruments) überführt. Dort erfolgte unter Ausschluss von Umgebungsluft die Sauerstoffmessung bei 37°C gemäß dem Protokoll von Hofhaus *et al.*

(1996),¹⁵⁰ während dessen Substrate und Inhibitoren der verschiedenen Atmungskettenkomplexe sukzessiv in die Kammer injiziert wurden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Für die Polarographie verwendete Substrate und Inhibitoren der Atmungskettenkomplexe

| Atmungskettenkomplexe | Substrate (S)/ Inhibitoren (I) |
|-----------------------|--|
| I + III + IV | S: Glutamat (5 mM)/ Malat (5 mM) I: Rotenon (0,1 µM) |
| II + III + IV | S: Succinat (5 mM)/ Glycerol-3-Phosphat (5 mM) I: Antimycin A (0,02 µM) |
| IV | S: Ascorbat (10 mM)/ TMPD* (0,2 mM) I: KCN** (1 mM) |

*TMPD, Tetramethylphenylendiamin; **KCN, Kaliumcyanid

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Software OxygraphPlus (Hansatech Instruments Ltd.).

3.2.4 Histologische Methoden

3.2.4.1 Präparation von Maus-Gehirnen für die *in situ*-Hybridisierung

Die Expressionsuntersuchung des *Ndufv1*-Gens erfolgte an Gehirnen von 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen. Für die Gehirnpräparation wurden die Tiere betäubt (0,9% NaCl, 25 mg/ml Ketamin, 1,2 mg/ml Xylazine und 0,35 mg/ml Acepromazine) und dekapitiert. Die präparierten Gehirne wurden in 1x PBS gewaschen, für mindestens 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C fixiert, schock gefroren und bei -80°C gelagert. Axiale Kryostatschnitte (Kryostat HM5000M; Microm) von 20 µm Dicke wurden auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel) aufgenommen und in 4% PFA für 10 min fixiert, mit 1x PBS für 5 min gewaschen, dehydriert und in unvergälltem Ethanol bei 4°C gelagert.

3.2.4.2 *In situ*-Hybridisierung

Die Expression des *Ndufv1*-Gens im Mausgehirn wurde mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung untersucht. Das als *Antisense*-Sonde verwendete Oligonukleotid S797 (0,3 pmol; komplementär zur *Ndufv1*-mRNA) wurde gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von terminaler Transferase (Boehringer Mannheim) mit [α -³⁵S]dATP (DuPont NEN) radioaktiv endmarkiert. Der radioaktive Reaktionsansatz wurde über BioSpin6 Chromatography Säulen (Bio-Rad) gereinigt und anschließend 20 µl markierte Sonde mit 980 µl Hybridisierungslösung gemischt. Die Hybridisierung der Gehirnschnitte erfolgte mit je 50 µl Hybridisierungsgemisch, mit aufgelegtem Deckglas, innerhalb von 16 Stunden bei 42°C in einer feuchten Kammer. Als Negativkontrolle diente ein Gehirnschnitt, der mit einem 100fachen Überschuss

an unmarkiertem Oligonukleotid in der Hybridisierungslösung behandelt wurde. Die Schnitte wurden anschließend 60 min mit 0,1x SSC bei 65°C und 5 min mit 0,05x SSC bei Raumtemperatur gewaschen, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und getrocknet. Die Signaldetektion erfolgte mittels Autoradiographie (Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm, Kodak AG; Exposition für mehrere Tage). Nach der *in situ*-Hybridisierung wurden die Schnitte mit Nissl, zur Darstellung der Zellverteilung, gegengefärbt: Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe, Waschen in 1x PBS, Inkubation für 30 s mit einer 1% Toluidinblaulösung und erneute Dehydrierung. Zum Eindeckeln wurde Hypermount verwendet.

Datenauswertung: Die Autoradiographien und Nissl-gefärbten Gehirnschnitte wurden mittels Durchlichtscanner (Epson Expression 1600Pro, Epson) als Bilder in Adobe Photoshop CS2 eingelesen. Anschließend wurden die Bilder unter Zuweisung von Falschfarben (rot, *Ndufv1*-Expression; grün, Zellfärbung) zu Farbbildern übereinandergelegt, um die regionale Expression des *Ndufv1*-Gens zu ermitteln.

3.2.4.3 Histologie von Muskelbiopsien

Das Muskelbiopsat der Patientin A wurde mittels Gewebekleber (Kryotec®, Boehringer Mannheim) auf ein Korkplättchen aufgebracht, in 2-Methylbutan, welches in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, schock gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Anfertigung der Gewebeschnitte, deren Fixierung und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin und Gomori-Trichrom sowie die Darstellung der oxidativen Enzyme und die elektronenmikroskopische Analyse erfolgten durch Frau Prof. Dr. Stoltenburg-Didinger (Institut für Neuropathologie der Charité).

3.2.5 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Mausembryonen wurden nach terminierter Verpaarung zweier *Ndufv1*^{+/-mut}-Mäuse und Tötung des trächtigen Weibchens am Tag E8,5 präpariert, in 1x PBS gespült und mindestens 24 Stunden in 2% Cacodylat-gepufferter Glutaraldehydlösung bei 4°C fixiert. Die weitere Aufbereitung der Embryonen, sowie die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen erfolgten in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Charité am Campus Virchow-Klinikum (Leiter Prof. Dr. med. Bachmann) durch Frau Schrade. Hierbei wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Epon (Serva) eingebettet. Anschließend folgte die Herstellung von Ultradünnschnitten (70 nm) mittels Ultracut S (Leica), die Kontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat, sowie die Mikroskopie der Schnitte im Elektronenmikroskop EM906 (Zeiss).

3.2.6 Haltung und Verpaarung der Versuchstiere

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte, den ethischen Richtlinien des geltenden Tierschutzgesetzes (Fassung vom Mai 2006) entsprechend, in den tierexperimentellen Einrichtungen des Virchow-Klinikums und des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums der Charité nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (LaGeSo G0040/05, Berlin). Zur Minimierung der Infektionsgefahr für die Tiere, wurden die Mäuse in Käfigen mit individueller Luftversorgung (IVC-Käfige) gehalten. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch zervikale Dislokation, durch CO₂-Inhalation oder durch Dekapitation nach Anästhetika-Überdosierung.

Die Versuchstiere wurden zur Zucht von Nachkommen permanent miteinander verpaart. Die mit den ES-Zellen generierten chimären Mäuse wurden zur Erzeugung heterozygot-mutanter (*Ndufv1*^{+/*mut*}) Mäuse mit Tieren des Stamms C57BL/6 verpaart und braune (*agouti*) Nachkommen bezüglich der c.1022C→T Mutation genotypisiert. Die Nachkommen mit dem *Ndufv1*^{+/*mut*}-Genotyp wurden dann zur Erzeugung zweier congener Linien mit Mäusen der Stämme C57BL/6 und 129/Ola für 9 Generationen verpaart. *Ndufv1*^{+/*mut*}-Mäuse aus unterschiedlichen Tochtergenerationen beider Kreuzungslinien wurden untereinander verpaart und sollten der Zucht von Homozygoten (*Ndufv1*^{*mut/mut*}) dienen.

Zur Gewinnung von Mausembryonen definierten Alters erfolgten terminierte Verpaarungen der Versuchstiere. Am Tag nach der Verpaarung (E0,5) wurden die Versuchstiere wieder getrennt.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten grundlegende Mechanismen der Pathogenese von Mitochondriopathien anhand zweier Patientenstudien und eines Mausmodells für mitochondrialen Komplex I-Mangel untersucht werden. Ausgangspunkte der Untersuchungen waren Fragestellungen zur regionalen Pathologie von Mitochondriopathien (Studie Patientin A), zum Einfluss individueller Faktoren auf die phänotypische Ausprägung der Erkrankungen (Studie Patient B), sowie zur molekularen und biochemischen Auswirkung eines Atmungskettendefekts auf einzelne Zellen, Gewebe oder auch den gesamten Organismus (*knock-in* Mausmodell-Studie; Patientin C).

4.1 Studie Patientin A

Ein bisher wenig verstandener Aspekt bei der Pathogenese von Mitochondriopathien ist das Phänomen der regionalen Pathologie, das vor allem Gewebe mit hohem aerobem Energiebedarf betrifft. Obwohl Mitochondrien in allen Körperzellen, außer den Erythrozyten, vorkommen, findet man bei mitochondrialen Erkrankungen, wie z.B. dem MERRF-Syndrom, eine klinische Symptomatik fast ausschließlich in Muskeln und speziellen Gehirnregionen (*Hippocampus*, Basalganglien). Zur Erforschung molekularbiologischer und gewebspezifischer Mechanismen, die einen Einfluss auf die selektive Anfälligkeit einiger Gewebe für mitochondriale Mutationen haben können, diente die Studie der Patientin A, die an einem MERRF-Syndrom litt. Anhand verschiedener Gewebeproben der Patientin sollte untersucht werden, ob Unterschiede im Heteroplasmiegrad der Mutation zu finden sind und ob darüber hinaus gewebspezifische Regulationsmechanismen des mitochondrialen Energiestoffwechsels auf Ebene der mtDNA-Replikation, -Transkription oder -Translation die regionale Pathologie des MERRF-Syndroms im Speziellen und von Mitochondriopathien im Allgemeinen erklären können.

4.1.1 Identifizierung der MERRF-Mutation m.8344A→G im *mt.tRNA^{Lys}*-Gen

Aufgrund der klinischen Symptomatik der Patientin A mit Myoklonusepilepsie und *ragged-red fibers* in der Muskelbiopsie wurde bei ihr das MERRF-Syndrom diagnostiziert. Um die molekulargenetische Ursache der Erkrankung zu finden, erfolgte die Sequenzierung des mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Gens (*MTTK*), da Mutationen in diesem Gen die häufigste Ursache des MERRF-Syndroms darstellen.¹¹⁰ Bei der Patientin wurde an der Position m.8344 der Nukleotidaustausch A nach G identifiziert (Abbildung 12A). Die RFLP-Analyse, zur Verifizierung der Mutation mit einer zweiten Methode, zeigte bei der Patientin in Blutzellen und Zellen des Urinsediments einen sehr hohen Heteroplasmiegrad für das mutierte Allel. Wildtyp-Allele des

Ergebnisse

MTTK-Gens konnten kaum noch nachgewiesen werden. Bei der Mutter der Patientin war die Mutation ebenfalls nachweisbar, jedoch mit einem geringeren Heteroplasmiegrad (Abbildung 12B).

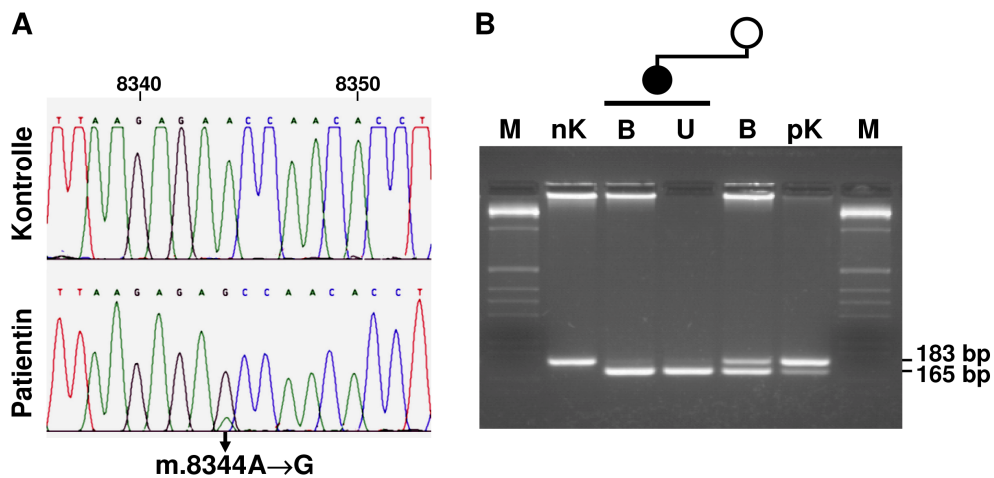


Abbildung 12: Mutationsanalyse bei der Patientin A. (A) Elektropherogramm der *tRNA*^{Lys}-Sequenzierung. (B) Die RFLP-Analyse zur Verifizierung der Mutation m.8344A→G wurde in der Neuropädiatrie der Georg-August-Universität in Göttingen (Prof. E. Wilichowski) durchgeführt. Wildtyp-Allel (183 bp); mutiertes Allel (165 bp); M, DNA-Längenstandard; nK, Negativkontrolle; pK, Positivkontrolle (Patient mit der MERRF-Mutation); B, Blut; U, Urin.

4.1.2 Muskelhistologie

Bei der Autopsie der Patientin wurden, nach Genehmigung durch die Angehörigen, aus 43 verschiedenen Geweben und Gewebsregionen Proben entnommen (Tabelle 12). Eine histologische Untersuchung der Muskelbiopsate sollte zunächst Auskunft über die Ausprägung degradierter Fasern in den einzelnen Muskeln geben. Diese *ragged-red fibers* sind ein Schlüsselcharakteristikum des MERRF-Syndroms und ihr Vorkommen in bestimmten Muskelgeweben lässt möglicherweise Rückschlüsse auf die Muskelgruppen-spezifische Symptomatik bei der Patientin zu. So deutete ihr klinischer Phänotyp mit einer progressiven Belastungsintoleranz zwar auf eine Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur, jedoch zeigte sie nicht wie viele andere MERRF-Patienten Auffälligkeiten der Augenmotilität (Schielen oder Doppelbilder), die eine Funktionsstörung der Augenmuskulatur vermuten ließen.

Die Gomori-Trichrom-Färbung von Gefrierschnitten der Skelettmuskeln ergab das klassische Bild einer Mitochondriopathie. Am stärksten ausgeprägt waren die *ragged-red fibers* im oberen geraden Augenmuskel (*M. rectus superior oculi*), wo der gesamte Querschnitt der Muskelfaser von fuchsinophilen Mitochondrien durchsetzt und in seiner Struktur aufgelockert erschien. Im Gegensatz dazu waren die fuchsinophilen Säume der *ragged-red fibers* im Brustmuskel (*M. pectoralis*), im Lendenmuskel (*M. iliopsoas*) und im geraden Bauchmuskel (*M. rectus abdominis*) überwiegend auf eine subsarkolemmale Lokalisation beschränkt (Abbildung 13A), wobei der *M. pectoralis* am stärksten betroffen war. Die Agglomeration von

Mitochondrien an den Rändern der Sarkomere ist in der Elektronenmikroskopie ebenfalls gut zu erkennen (Abbildung 13B). Hier lässt sich zudem die Erhaltung der mitochondrialen Ultrastruktur an der klaren Ausprägung der mitochondrialen Doppelmembran ablesen. Charakteristisch für eine Mitochondriopathie, wenn auch nicht spezifisch, fanden sich parakristalline Einschlüsse in der Mitochondrienmatrix (Abbildung 13B). Diese beruhen sehr wahrscheinlich auf einer übermäßigen Konzentration der mitochondrialen Kreatin-Kinase (mtCK), die aufgrund des zytosolischen Energiemangels in Muskelzellen kompensatorisch vermehrt synthetisiert wird, um energiereiche Phosphate aus dem Mitochondrium ins Zytosol zu liefern. Die akkumulierten mtCK-Moleküle aggregieren dann im Mitochondrium und führen zur Kristallbildung.^{151, 152}

Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur ergab die histologische Untersuchung der Herzmuskulatur keinerlei pathologische Auffälligkeiten (nicht gezeigt).

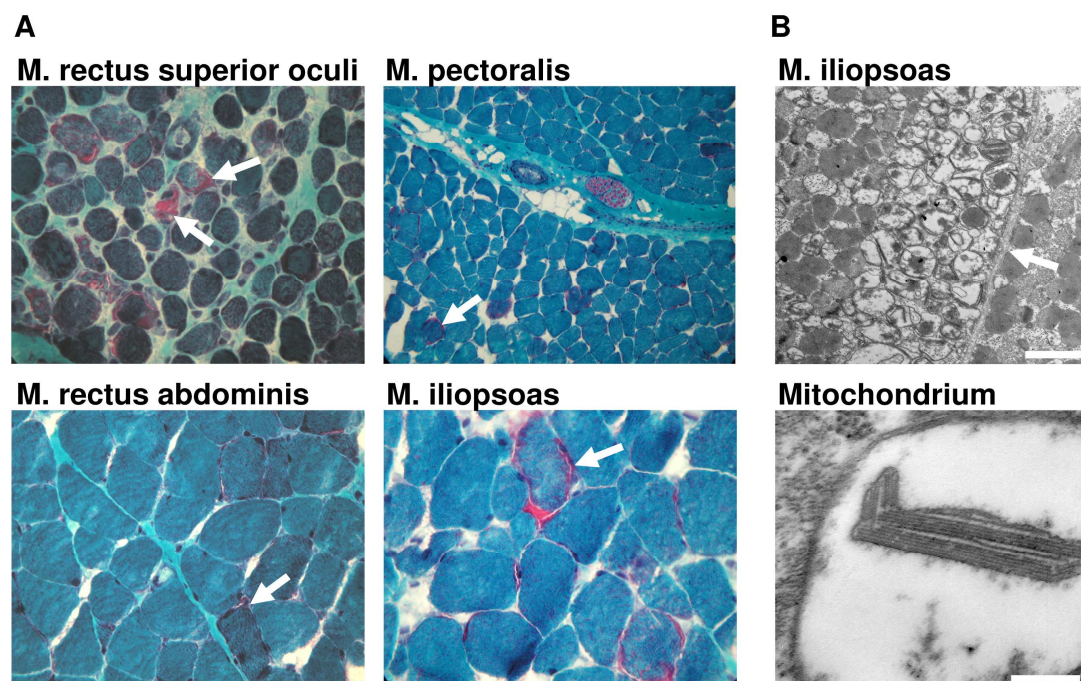


Abbildung 13: Muskelhistologie der Patientin A. (A) Gomori-Trichrom-Färbung von Gefrierschnitten vier verschiedener Muskeltypen. Die *ragged-red fibers* sind anhand ihrer fuchsinroten Säume aus angehäuften Mitochondrien zu erkennen (weiße Pfeile). **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des *M. iliopsoas*. Im oberen Bild ist die Mitochondrienagglomeration unterhalb der Sarkomerlamellen (weißer Pfeil) gezeigt und im unteren Bild ein Mitochondrium mit charakteristischer Doppelmembran und parakristallinem Einschluss. Maßbalken: oben 2 µm, unten 200 nm.

4.1.3 Quantifizierung der m.8344A→G Heteroplasmie

Mitochondriale Mutationen manifestieren sich klinisch in der Regel erst ab einem bestimmten Heteroplasmiegrad. Dieser sogenannte pathogene Schwellenwert liegt laut früherer Studien für die m.8344A→G MERRF-Mutation zwischen 73 und 98%.⁴⁹ Zur Abschätzung der Pathogenität der m.8344A→G Mutation bei der Patientin A habe ich die Heteroplasmie der Mutati-

Ergebnisse

on bei verschiedenen Familienmitgliedern der Patientin bestimmt. Dazu erfolgte eine quantitative Einzel-Nukleotid-Austausch-Analyse mittels Pyrosequenzierung. Die Pyrosequenzierung erlaubt eine präzise Allel-Quantifizierung mit einem Fehler $<1\%$.¹⁵³ Anhand einer Regressionsanalyse habe ich zunächst die Genauigkeit der Methode zur Quantifizierung der m.8344A→G Mutation mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0,9997$ ermittelt (Abbildung 14A). Die erhaltene Eichkurve diente anschließend zur Normalisierung der

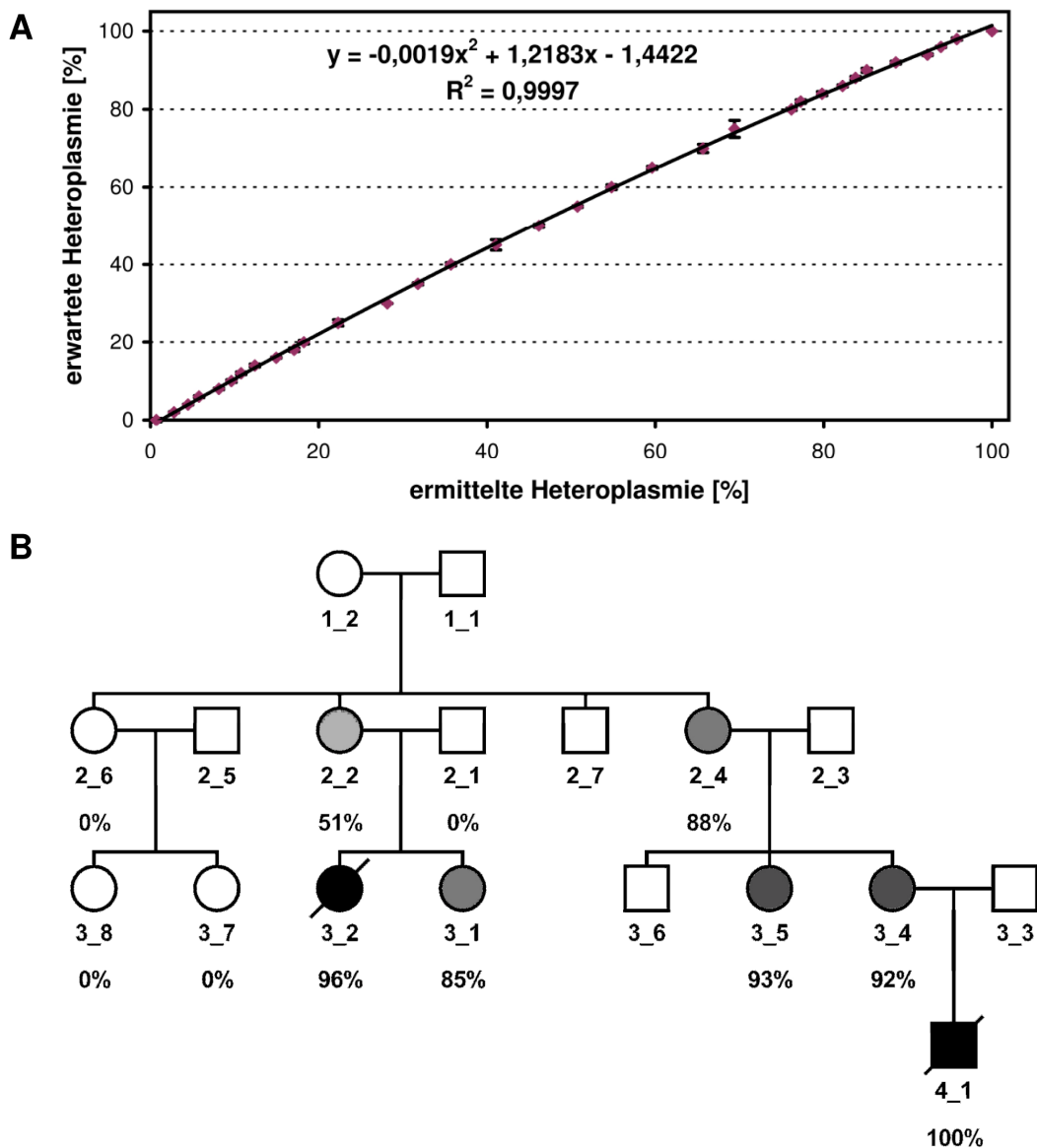


Abbildung 14: Quantifizierung der *mt.tRNA^{Lys}*-Mutation m.8344A→G mittels Pyrosequenzierung. (A) Anhand definierter Mischungen klonierter Wildtyp- bzw. mutierter Allele erfolgte eine quadratische Regressionsanalyse, wobei die erwarteten Allelhäufigkeiten (Heteroplasmie in %), die durch die Mischungsverhältnisse vorgegeben waren, gegen die jeweils gemessenen Werte aufgetragen wurden. Jeder Datenpunkt basiert auf drei unabhängigen PCR-Reaktionen und Pyrosequenzierungen derselben Probe. Die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) sind angegeben. **(B)** Stammbaum der Familie der Patientin A (3_2) mit ermittelten Heteroplasmiegraden der untersuchten Personen, die wiederum die Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen darstellen und anhand der Eichkurve normalisiert wurden. Die Grautöne der Symbole stellen die ermittelten Heteroplasmiegrade visuell dar.

Messwerte der untersuchten Personen. Wie in Abbildung 14 dargestellt, fand sich im Blut der Patientin (Person 3_2) ein Heteroplasmiegrad von 96% und bei ihrem ebenfalls betroffenen Cousin (Person 4_1), der im Alter von 2 Jahren verstorben war, sogar von 100%. Bei den nicht betroffenen weiblichen Familienangehörigen variierten die Häufigkeiten der mtDNA-Allele mit der m.8344A→G Mutation zwischen 0 und 93%.

Die anschließende Quantifizierung der m.8344A→G Heteroplasmiegrade in den 43 Gewebepbiopsaten der Indexpatientin habe ich durchgeführt, um herauszufinden, ob gewebsspezifische Unterschiede existieren, welche die regionale Pathologie des MERRF-Syndroms und möglicherweise auch anderer Mitochondriopathien erklären könnten. Wie ich in Abschnitt 4.1.2 gezeigt habe, waren bei der Patientin A unter anderem die Skelettmuskeln klinisch involviert. Zudem verwiesen die myoklonisch-astatischen Anfälle der Patientin auf pathologische Schädigungen des *Hippocampus* (siehe Anhang Abschnitt 9.1.2), obwohl das im Alter von 14 Jahren erstellte Schädel-MRT noch keine makrostrukturellen Auffälligkeiten dieser Gehirnstruktur erkennen ließ.

Die mittels Pyrosequenzierung erhaltenen Mittelwerte der drei Messungen für jedes Patientengewebe wurden auch hier anhand der Eichkurve normalisiert. Die Ergebnisse zeigten eine relativ uniforme Gewebsverteilung der Heteroplasmiegrade zwischen 89 und 100%, ohne Präferenz für einen speziellen Gewebetyp (Tabelle 12). Nur in Leber und Pankreas habe ich eine geringere Mutationslast von 66,7 bzw. 73,2% gefunden. Ein deutlicher Unterschied des Heteroplasmiegrades zwischen betroffenen und nicht betroffenen Geweben der Patientin A war somit nicht erkennbar.

Tabelle 12: Heteroplasmiegrade der Mutation m.8344C→T in den Geweben der Patientin A

| Gewebe/Organ | Heteroplasmie [%] |
|--|-------------------|
| Großhirn: | |
| <i>Arteria cerebri media</i> (mittlere Gehirnschlagader) | 98,4 ± 0,2 |
| <i>Chiasma opticum</i> (Sehnerv(en)kreuzung) | 97,0 ± 0,2 |
| <i>Corpora mamillaria</i> (Mamillarkörper) | 92,5 ± 0,3 |
| <i>Thalamus</i> | 89,2 ± 0,3 |
| <i>Nucleus caudatus</i> (Schweifkern, Teil der Basalganglien) | 94,9 ± 0,6 |
| <i>Globus pallidus</i> (Linsenkern, Teil der Basalganglien) | 93,5 ± 0,3 |
| <i>Putamen</i> (Teil der Basalganglien) | 95,1 ± 0,1 |
| <i>Capsula interna</i> (Nervenfaserbündel) | 95,1 ± 0,5 |
| <i>Hypothalamus</i> | 94,2 ± 0,2 |
| <i>Hippocampus</i> | 93,6 ± 0,2 |
| Sensomotorischer Kortex | 96,1 ± 0,2 |
| Visueller Kortex | 95,7 ± 0,2 |
| Weiße Substanz (Frontalhirn) | 95,1 ± 0,4 |
| <i>Plexus chorioideus</i> (Adergeflecht in den Ventrikeln) | 100,0 ± 0,0 |
| Kleinhirn: | |
| <i>Vermis cerebelli</i> (Wurm, Mittellinienstruktur des Kleinhirns) | 96,9 ± 0,3 |
| <i>Folia cerebelli</i> (Blätter der Kortexoberfläche des Kleinhirns) | 97,1 ± 0,7 |

| Gewebe/Organ | Heteroplasmie [%] |
|---|-------------------|
| <i>Medulla cerebelli</i> (Kleinhirnmare) | 93,2 ± 0,1 |
| Hirnstamm: | |
| <i>Pons</i> (Brücke) | 95,4 ± 0,0 |
| <i>Substantia nigra</i> (schwarze Substanz des Hirnstammes) | 91,2 ± 0,4 |
| Rückenmark | 93,2 ± 0,3 |
| Skelettmuskel: | |
| <i>M. rectus abdominis</i> (gerader Bauchmuskel) | 97,7 ± 0,2 |
| <i>M. iliopsoas</i> (Hüftlendenmuskel) | 96,8 ± 0,2 |
| <i>M. pectoralis</i> (großer Brustmuskel) | 98,4 ± 0,3 |
| <i>M. rectus superior</i> (oberer gerader Augenmuskel) | 95,1 ± 0,3 |
| Herzmuskel | 92,7 ± 1,3 |
| Herz (AV-Knoten) | 93,3 ± 0,2 |
| Innenohr | 96,4 ± 0,3 |
| Niere: | |
| Nierenrinde | 98,7 ± 0,6 |
| Nierenmark | 95,2 ± 0,1 |
| Nebennierenrinde | 100,0 ± 1,3 |
| Leber | 66,7 ± 0,7 |
| Pankreas | 73,2 ± 0,1 |
| Milz | 97,8 ± 0,3 |
| Lunge (Stroma) | 97,8 ± 0,4 |
| Magen (Antrum) | 97,7 ± 0,2 |
| Ileum (Hüftdarm) | 97,2 ± 0,4 |
| Blase | 100,0 ± 1,1 |
| Gebärmutter | 100,0 ± 0,2 |
| Eierstock | 100,0 ± 0,8 |
| Zwerchfell | 97,2 ± 1,0 |
| Fettgewebe (Bauch) | 98,9 ± 0,3 |
| Haut | 99,5 ± 0,3 |
| <i>Nervus tibialis</i> (Ober- und Unterschenkelner) | 97,5 ± 0,1 |

4.1.4 m.8344A→G Heteroplasmiegrad im Verhältnis zur mtDNA-Kopienzahl

Obwohl die Mutationslast der untersuchten Gewebe *per se* nicht die regionale Pathologie der MERRF-Patientin erklärt, wäre es denkbar, dass der Heteroplasmiegrad in Bezug auf die absolute Anzahl mtDNA-Kopien pro Zelle einen Hinweis darauf liefern könnte. So wäre möglicherweise bei einem Heteroplasmiegrad von 95% und angenommenen 100 mtDNA-Kopien pro Zelle der zelluläre Energiebedarf durch die verbleibenden 5 Wildtyp-Allele nicht gedeckt, während bei gleichem Heteroplasmiegrad und 1000 mtDNA-Kopien die absolute Zahl von 50 Wildtyp-Allelen zur Deckung des zellulären Energiebedarfs ausreichen könnte. Diesem Gedanken folgend, habe ich in allen Patientengeweben die absolute Anzahl der mtDNA-Kopien pro Zelle ermittelt. Mittels quantitativer *real-time* PCR (TaqMan) erfolgte dazu jeweils die Bestimmung der absoluten Kopienzahl des *MT-ND1* Gens (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, Untereinheit 1) in der mtDNA im Verhältnis zum nukleär kodierten *single copy*-Gen *MMP1*

(Matrix Metalloproteinase 1). Als Kontrollen dienten Gewebeproben vormals gesunder Frauen in vergleichbarem Alter, die durch Verkehrsunfälle ums Leben gekommen waren.

Das Pankreas wurde aufgrund potentiell zu erwartender fehlerhafter Ergebnisse (siehe unten) von dieser Analyse ausgeschlossen. Die Ergebnisse der *real-time* quantitativen PCR (qPCR) zeigten, dass die relative Menge der mtDNA-Kopien in den Geweben, die bei der MERRF-Patientin besonders betroffen waren (*Hippocampus*, *Nucleus caudatus*, *Putamen* und Skelettmuskeln) um das Ein- bis Siebenfache höher lagen als in den Kontrollgeweben. In den klinisch nicht betroffenen Geweben der Patientin, wie der Leber, der Niere oder den Verdauungsorganen, fand ich eine solche Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl nicht (Abbildung 15; Abbildung 40 im Anhang). Aus den Werten der Heteroplasmiegrade und den absoluten mtDNA-Kopienzahlen der Patientengewebe konnte ich nun die Anzahl der „verbleibenden“ Wildtyp-mtDNA-Kopien in den einzelnen Geweben berechnen (Abbildung 16; Abbildung 41 im Anhang). Bei etwa der Hälfte der untersuchten Gewebe lag diese Zahl unter 10 Wildtyp-Kopien pro Zelle. Mit 70 bis 140 Wildtyp-Kopien pro Zelle wiesen sowohl die betroffenen Gehirnregionen als auch die Augenmuskulatur, jedoch nicht die drei anderen untersuchten Skelettmuskeln, die vergleichsweise höchsten Anzahlen an Wildtyp-Allelen auf.

Die experimentell ermittelten Verhältnisse der mtDNA/gDNA-Kopienzahlen könnten durch einen ungleichen, nicht-proportionalen Abbau mitochondrialer zu nukleärer Gewebs-DNA, während der zweitägigen Lagerung der verstorbenen Patientin und der Kontrollindividuen in der Gerichtsmedizin bei 4°C, verfälscht sein. Foran (2006) fand bei Untersuchungen an Mausorganen eine verstärkte Degradation nukleärer DNA relativ zur mtDNA insbesondere in Lebern, die eine Woche bei 24 bzw. 37°C gelagert wurden.¹⁵⁴ Dies ist vermutlich auf die hohe enzymatische Aktivität der Nukleasen in der Leber zurückzuführen. Dabei könnte die nukleäre DNA zytosolischen Nukleasen möglicherweise stärker ausgesetzt sein als die mitochondriale DNA, die durch die Doppelmembran des Mitochondriums geschützt wird.

Um einen systematischen Fehler bei der Quantifizierung der mtDNA/gDNA-Kopienzahlen in den Patienten- und Kontrollgeweben auszuschließen, habe ich ein Mausexperiment unter etwa vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Nach zervikaler Dislokation der Maus und Lagerung für sechs Stunden bei Raumtemperatur entnahm ich sieben repräsentative Gewebe (Großhirn, Kleinhirn, Herz, Niere, Leber, Skelettmuskel und Pankreas) und teilte sie in je sechs Teile. Jeweils drei Gewebestücke lagerten anschließend bei 4°C und die anderen drei bei -20°C für 60 Stunden. Die Bestimmung der mtDNA/gDNA-Kopienzahl in den Mausgeweben erfolgte mittels *real-time* qPCR des mitochondrialen Gens *mt-Co1* (Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1) und des nukleär kodierten Gens *Ndufv1* (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Flavoprotein 1). Mit Ausnahme der Niere ($p < 0,05$) und des Pankreas ($p < 0,001$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der mtDNA/gDNA-Verhältnisse zwischen den Geweben, die bei 4 bzw. -20°C gelagert wurden (Abbildung 17). Dies spricht für einen fehlenden

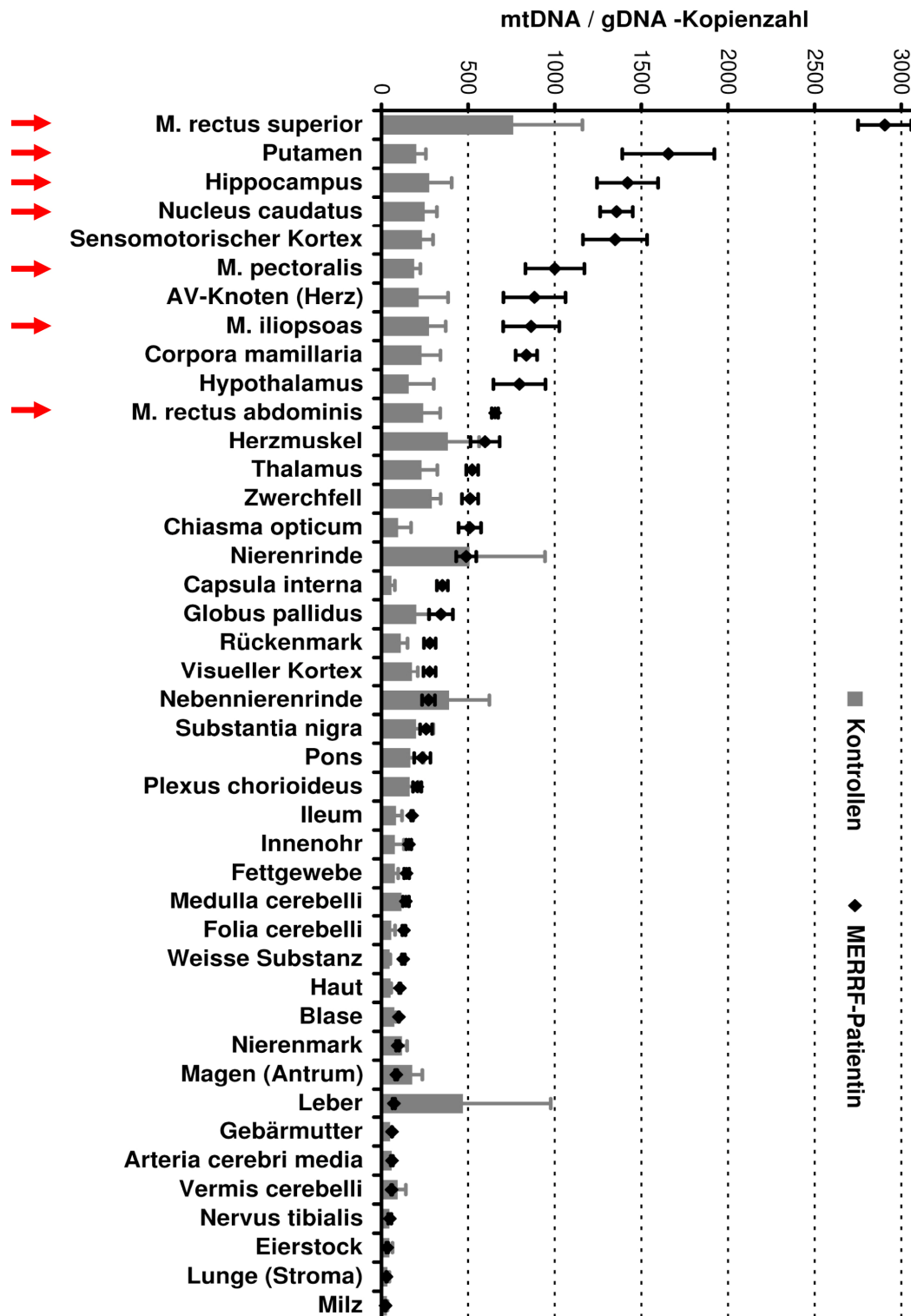


Abbildung 15: Absolute mtDNA-Kopienzahlen pro Zelle in den Geweben der Patientin A. Die Standardfehler der Mittelwerte (SEMs) berechnen sich aus je vier unabhängigen Messungen der Patientengewebe (schwarze Punkte) bzw. aus 16 unabhängigen Messungen der Kontrollgewebe (n=4; graue Balken). Die bei der Patientin klinisch am stärksten betroffenen Gehirnregionen und Muskeln, sowie der Augenmuskel sind durch rote Pfeile markiert. Für eine bessere Übersichtlichkeit habe ich die Messwerte entsprechend der mtDNA-Kopienzahlen in den Patientengeweben (von oben nach unten abnehmend) sortiert. Eine Darstellung der prozentualen Differenzen zwischen den mtDNA-Kopienzahlen der Patientin und der Kontrollen wird im Anhang gezeigt (Abbildung 40).

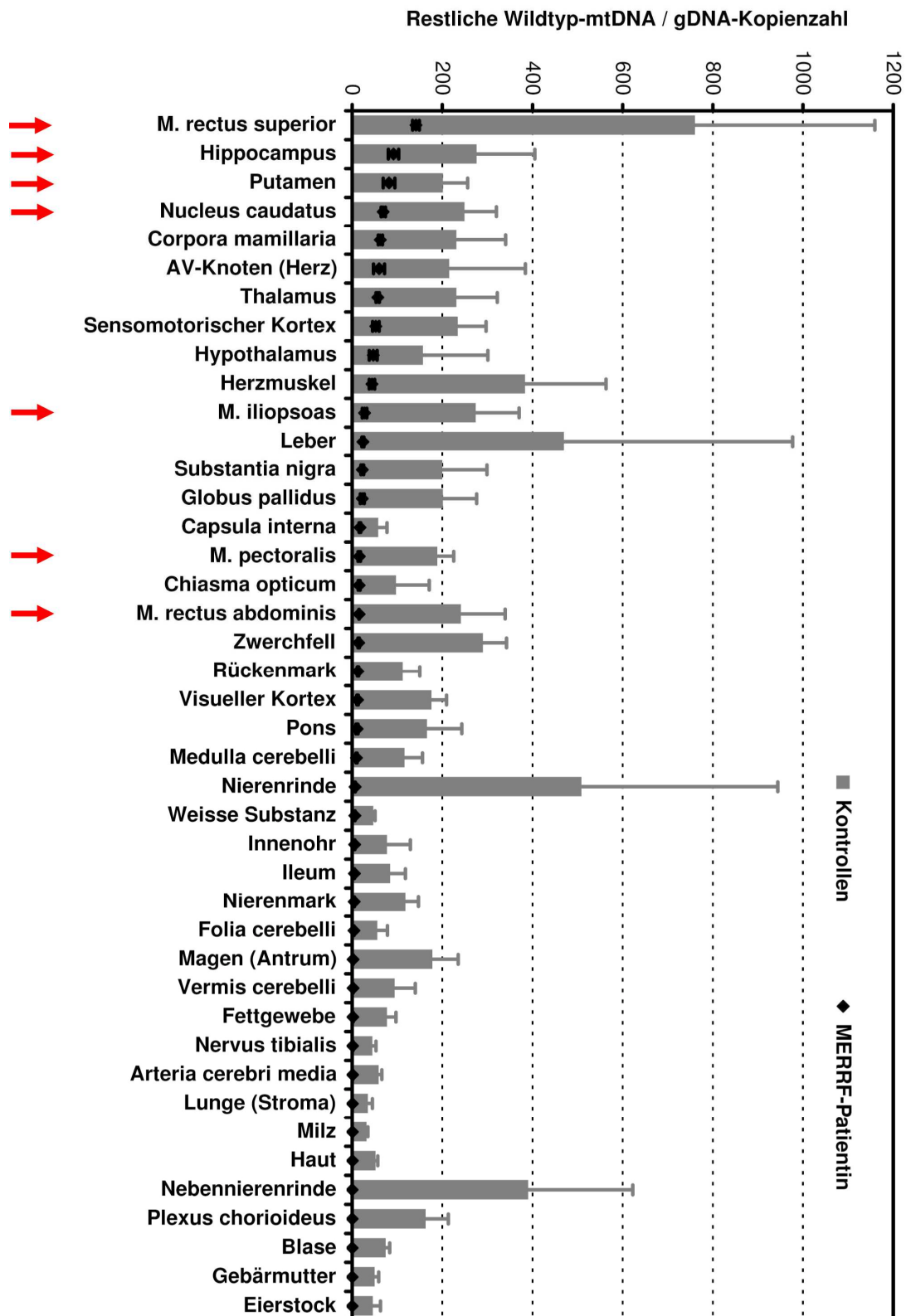


Abbildung 16: „Restliche“ Wildtyp-mtDNA-Kopienzahlen in den Geweben der Patientin A (schwarze Punkte) im Vergleich zu Wildtyp-mtDNA-Kopienzahl der Kontrollgewebe (graue Balken). Die SEMs berechnen sich wie in Abbildung 15 angegeben und die roten Pfeile markieren wiederum die bei der Patientin klinisch betroffenen Gehirnregionen und Muskeln sowie den Augenmuskel. Die Sortierung der Messwerte erfolgte hier entsprechend der Anzahl „restlicher“ Wildtyp-mtDNA-Kopien in den Patientengeweben (von oben nach unten abnehmend). Eine prozentuale Darstellung der Wildtyp-mtDNA-Kopien der Patientengewebe im Vergleich zu den Kontrolldaten ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 41).

Ergebnisse

bzw. proportionalen Abbau von nukleärer und mitochondrialer DNA in den meisten Geweben unter den gewählten Bedingungen. Somit sollten die ermittelten Verhältnisse der mtDNA/gDNA-Kopienzahlen der Patientengewebe die nativen DNA-Verhältnisse in den Geweben, mit Ausnahme des Pankreas (und mit Einschränkung der Niere), zuverlässig widerspiegeln.

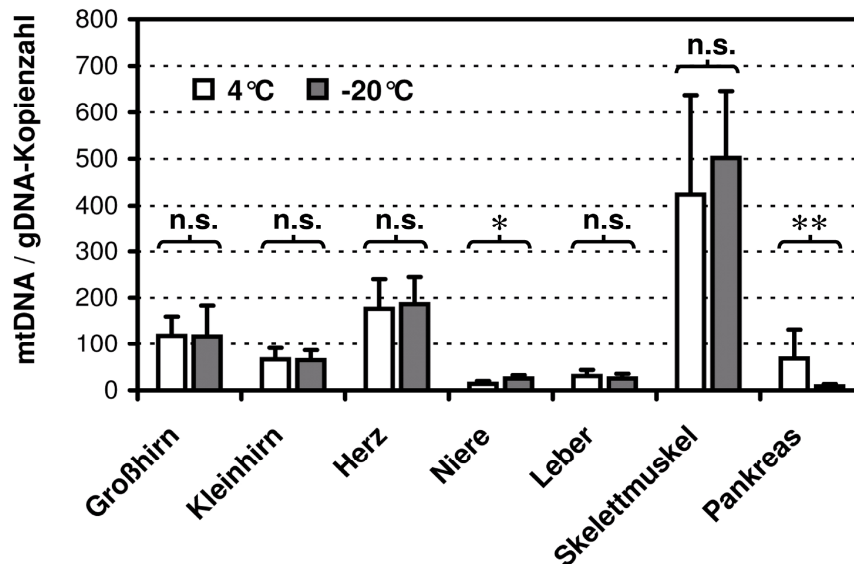


Abbildung 17: MtDNA/gDNA-Kopienzahl in Mausgeweben nach Lagerung bei 4 bzw. -20°C. Jeder Balken stellt den Mittelwert von 12 Messungen (drei Gewebestücke pro Temperatur mit je vier Messungen) dar. SEMs sind angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den mtDNA/gDNA-Ratios bei 4 und -20°C wurden mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. n.s., nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

4.1.5 Einfluss der m.8344A→G Mutation auf die mitochondriale Masse, Transkriptionsaktivität und die Translation nukleärer bzw. mitochondrial kodierter Atmungskettenproteine in verschiedenen Geweben

Die erhöhten mtDNA-Kopienzahlen in den klinisch betroffenen Geweben der Patientin könnten allein durch eine gesteigerte mtDNA-Replikation oder darüber hinaus durch eine Erhöhung der Mitochondrienzahl (d.h. der mitochondrialen Masse) in den Geweben bedingt sein. Im letzteren Fall müssten vornehmlich betroffene gegenüber nicht betroffenen Geweben auch eine höhere zelluläre Mitochondrienmasse aufweisen. Zur Bestimmung der **mitochondrialen Masse** habe ich aus den Gewebeproben von vier Gehirnregionen und dem Brustmuskel (*M. pectoralis*) der Patientin und den Kontrollen Gesamtprotein extrahiert und diese Proben über semiquantitative Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Porin (synonym: VDAC1; OMIM 604492), einem hoch exprimierten Protein in der äußeren Mitochondrienmembran, analysiert (Abbildung 18A). Aufgrund der geringen Mengen der mir zur Verfügung stehenden Gewebsbiopsate konnte ich allerdings nicht alle Gewebe mittels Western-Blot untersuchen. So dienten der *Hippocampus*, das *Putamen* und

der Brustmuskel als Repräsentanten stark betroffener Gewebe der MERRF-Patientin und die Weiße Substanz und die *Pons* als Repräsentanten der Gewebe, die nicht offensichtlich betroffen waren. Im *Hippocampus* und im *Putamen* der MERRF-Patientin fanden sich etwa die gleichen Mengen des Porin-Proteins wie bei den Kontrollen (Abbildung 19). Hingegen zeigten die *Pons* und die Weiße Substanz der Patientin eine mehr als doppelt so große Menge an Porin-Protein als normal. Einen generellen Zusammenhang (Parallelität) zwischen erhöhter Mitochondrienmasse und erhöhter mtDNA-Kopienzahl konnte ich somit in den untersuchten Regionen des Patientengehirns nicht nachweisen. Im Gegenteil, während die klinisch betroffenen Gehirnregionen eine Erhöhung mitochondrialer DNA aufwiesen, offenbarten die nicht betroffenen Regionen eine Erhöhung der mitochondrialen Masse. Im Brustmuskel der Patientin wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine mehr als dreifache Menge an Porin-Protein gefunden.

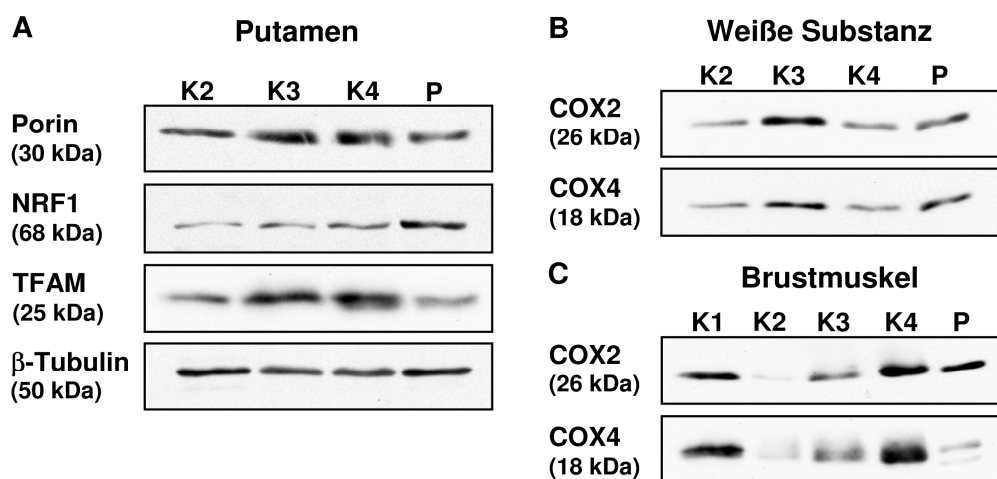


Abbildung 18: Western-Blots zum Nachweis zellulärer Proteinmengen. (A) Die Antikörperfärbungen der Proteine Porin, NRF1, TFAM und β -Tubulin als Referenzprotein für die untersuchten Gehirngewebe bzw. GAPDH als Referenzprotein für den Brustmuskel erfolgten für den jeweiligen Gewebetyp auf demselben Blot. Als Beispiel sind hier die Proteinuntersuchungen im *Putamen* dargestellt. Bedingung für die Durchführung der Western-Blots war ausreichend vorhandenes Probenmaterial von mindestens drei Kontrollen pro untersuchtem Gewebe (im gezeigten Beispiel: Kontrollen 2, 3 und 4). Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte densitometrisch. (B+C) Der Nachweis des mtDNA-kodierten Proteins COX2 und des nukleär-kodierten Proteins COX4 (beides Strukturproteine des Atmungskettenkomplexes IV) erfolgte für jeden Gewebetyp ebenfalls auf demselben Blot. Als Beispiele sind hier die Proteinnachweise in der Weißen Substanz (B) und im Brustmuskel (C) gezeigt.

Parallel zur Untersuchung der mitochondrialen Masse wollte ich ermitteln, ob die erhöhten mtDNA-Kopienzahlen der betroffenen Patientengewebe durch eine **Stimulation der Transkription und Translation** mitochondrialer Proteine erklärt werden könnten. Hierfür habe ich Western-Blots der fünf Gewebetypen mit Antikörpern gegen NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*; OMIM 600879) und TFAM (*mitochondrial transcription factor A*; OMIM 600438) durchgeführt (Abbildung 18A). NRF1 agiert in Zellen als Transkriptionsfaktor für nukleäre Gene, welche Untereinheiten der Atmungskette kodieren, während TFAM als Transkriptionsfaktor

Ergebnisse

mtDNA-kodierter Gene dient. Die semiquantitative Analyse der Gehirngewebe ließ keinen konsistenten Zusammenhang zwischen zellulären NRF1- und TFAM-Mengen und der klinischen Symptomatik oder der mtDNA-Kopienzahl erkennen (Abbildung 19). So war z.B. die NRF1-Menge im *Putamen* der Patientin im Vergleich zu den Kontrollen doppelt so hoch, aber im *Hippocampus* leicht vermindert, obwohl in beiden Geweben eine deutlich erhöhte mtDNA-Kopienzahl gefunden wurde. Auffallend war dennoch die drei- bis vierfache Menge TFAM-Protein im Brustmuskel der Patientin.

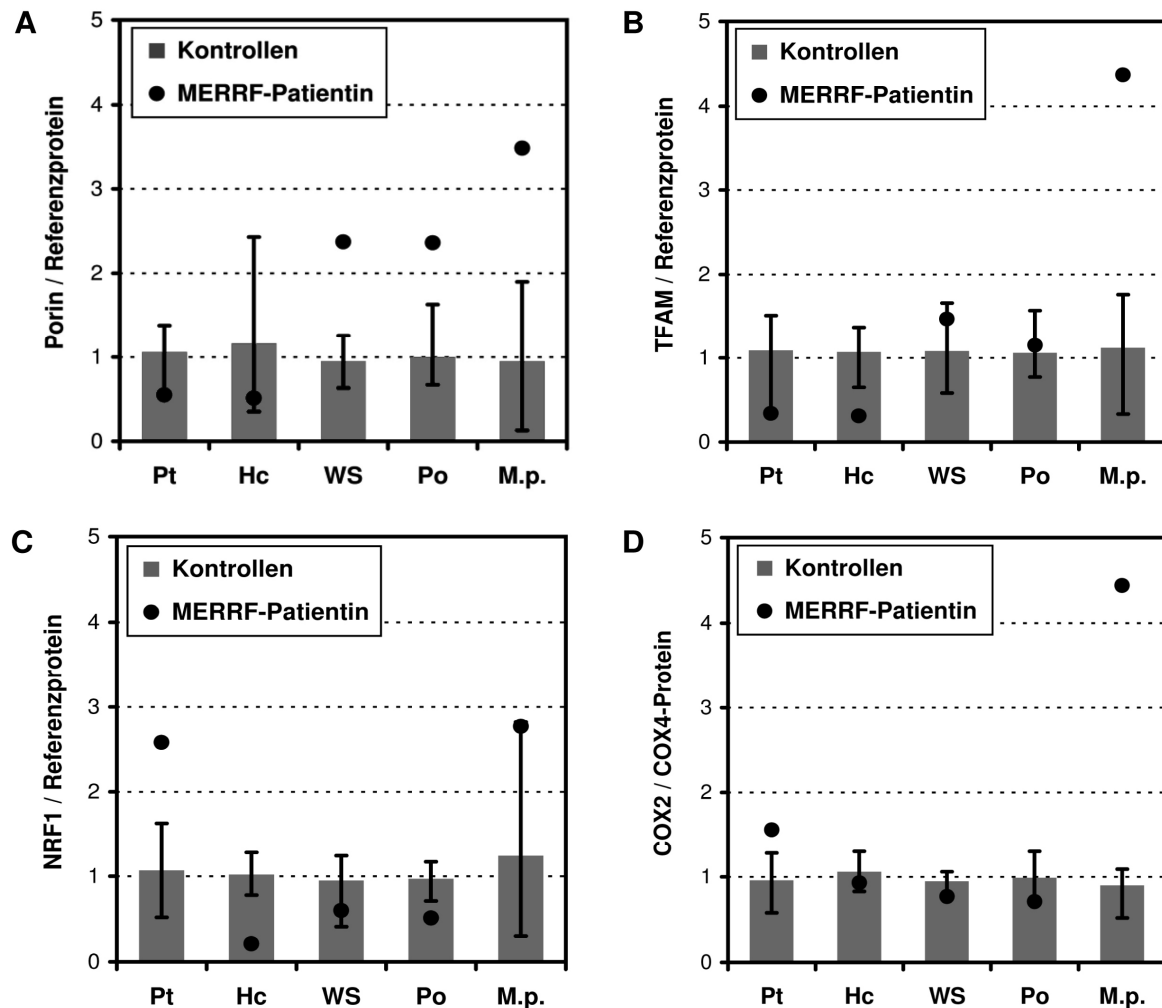


Abbildung 19: Ergebnisse der semiquantitativen Western-Blot-Analysen. Die Mengen der Proteine Porin (A), TFAM (B) und NRF1 (C) sind im Verhältnis zum jeweiligen Referenzprotein dargestellt. (D) Die Strukturproteine des Komplexes IV COX2 (mtDNA-kodiert) und COX4 (gDNA-kodiert) sind im Verhältnis zueinander dargestellt. Die jeweiligen Proteinmengen wurden pro Gewebetyp und Individuum (Patientin: schwarze Punkte) und mindestens drei Kontrollen (graue Balken) einmal analysiert. Bei den Mittelwerten der Kontrollen sind die minimal und maximal gemessenen Kontrollwerte als Abweichungsbalken angegeben. Pt, *Putamen*; Hc, *Hippocampus*; WS, *Weiße Substanz*; Po, *Pons*; M.p., *Musculus pectoralis* (Brustmuskel).

Mittels semiquantitativer Western-Blot-Analyse habe ich schließlich auch die **relativen Mengen** zwischen dem **mitochondrial kodierten Protein COX2** (Cytochrom c Oxidase, Untereinheit II; OMIM 516040) und dem **nukleär kodierten Proteins COX4** (Cytochrom c Oxida-

se, Untereinheit IV; OMIM 123864) in den Geweben der MERRF-Patientin bestimmt (Abbildung 18B). Beide Proteine sind strukturelle Untereinheiten des Atmungskettenkomplexes IV und sollten aufgrund ihrer zellulären Funktion im Verhältnis von etwa 1:1 zu finden sein. In den vier untersuchten Gehirnregionen der MERRF-Patientin konnte ich, genau wie in den Kontrollgeweben, COX2/COX4-Ratios von annähernd 1 ermitteln (Abbildung 19). Nur im Brustmuskel der Patientin fand sich im Verhältnis zum nukleären Protein eine 3,5fach höhere Menge der mitochondrial kodierten Untereinheit COX2.

Zusammengefasst habe ich bei der Untersuchung der 43 Gewebe der MERRF-Patientin eine nahezu einheitliche Verteilung des Heteroplasmiegrades für die Mutation m.8344A→G festgestellt. Die mtDNA-Kopienzahl war in den klinisch stark betroffenen Geweben deutlich erhöht, während im Gegensatz dazu die klinisch nicht oder wenig betroffenen Gewebe eine Erhöhung der mitochondrialen Masse aufwiesen. In den untersuchten Gehirnregionen variierten die Mengen mitochondrialer bzw. nukleärer Transkriptionsfaktoren der Mitochondrienprotein-kodierenden Gene nicht parallel zur klinischen Symptomatik; und hier wurde auch keine abnorme Proteinzusammensetzung des Atmungskettenkomplexes IV gefunden. Lediglich im Brustmuskel zeigte sich eine gleichzeitige Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl, der mitochondrialen Masse und der Mengen des mitochondrialen Transkriptionsfaktors TFAM, sowie des mitochondrial kodierten Proteins COX2.

4.2 Studie Patient B

Als Ursache der phänotypischen Variabilität „monogen“ vererbter Mitochondriopathien vermutet man individuelle genetische Einflussfaktoren, die summarisch als „genetischer Hintergrund“ bezeichnet werden. Ein solcher Faktor wäre z.B. das parallele Auftreten von weiteren Mutationen oder Polymorphismen in anderen mtDNA- oder nukleär-kodierten Genen, die in denselben klinisch betroffenen Geweben oder Organen aktiv sind. Zur Unterstützung dieser Hypothese möchte ich in der zweiten Studie einen Patienten mit einem komplexen Phänotyp vorstellen, bei dem zwei neue *de novo* Mutationen im mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Gen und im kernkodierten *PAX6*-Gen identifiziert werden konnten.¹⁵⁵

4.2.1 Identifizierung der mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Mutation m.8347A→G

Die klinische Symptomatik des 16 jährigen Patienten B, die unter anderem eine progressive Muskelschwäche, Belastungsintoleranz und beidseitige Ptosis umfasste, deutete zunächst auf das Vorliegen einer Erkrankung, die durch eine Mutation in der mtDNA bedingt sein könnte. Da mehr als 50% der bekannten krankheitsverursachenden mtDNA-Mutationen in

Ergebnisse

den mitochondrialen transfer RNAs (mt.tRNAs) lokalisiert sind,⁶¹ wurden zunächst alle 22 *mt.tRNA*-Gene des Patienten sequenziert. Dies führte zur Identifizierung des heteroplasmischen Nukleotidaustauschs (m.8347A→G) in der TΨC-Schleife des *mt.tRNA^{Lys}*-Gens (*MTTK*) (Abbildung 20). Dieser Nukleotidaustausch war zuvor noch nicht beschrieben worden. Da er in verschiedenen Geweben der Eltern, der Schwester und bei 105 untersuchten Kontrollen nicht nachweisbar war, handelte es sich um eine *de novo* Mutation. Zum Nachweis der maternalen Vererbung der Mutation erfolgte eine Sequenzanalyse des mitochondrialen D-loops aller Familienmitglieder des Patienten. Dabei zeigten sich drei identische Polymorphismen in der mtDNA der Mutter, der Schwester und des Patienten (16.172T, 16.296T, 151T), die in der väterlichen mtDNA nicht auftraten (16.172C, 16.296C, 151C). Die evolutionäre Konservierung des Adenin an der Position m.8347 ist schwer zu untersuchen, da sich bei verschiedenen Spezies die Länge der TΨC-Schleife zwischen fünf und acht Nukleotiden unterscheidet. Der Vergleich der TΨC-Schleife verschiedener Spezies mittels CLUSTAL-

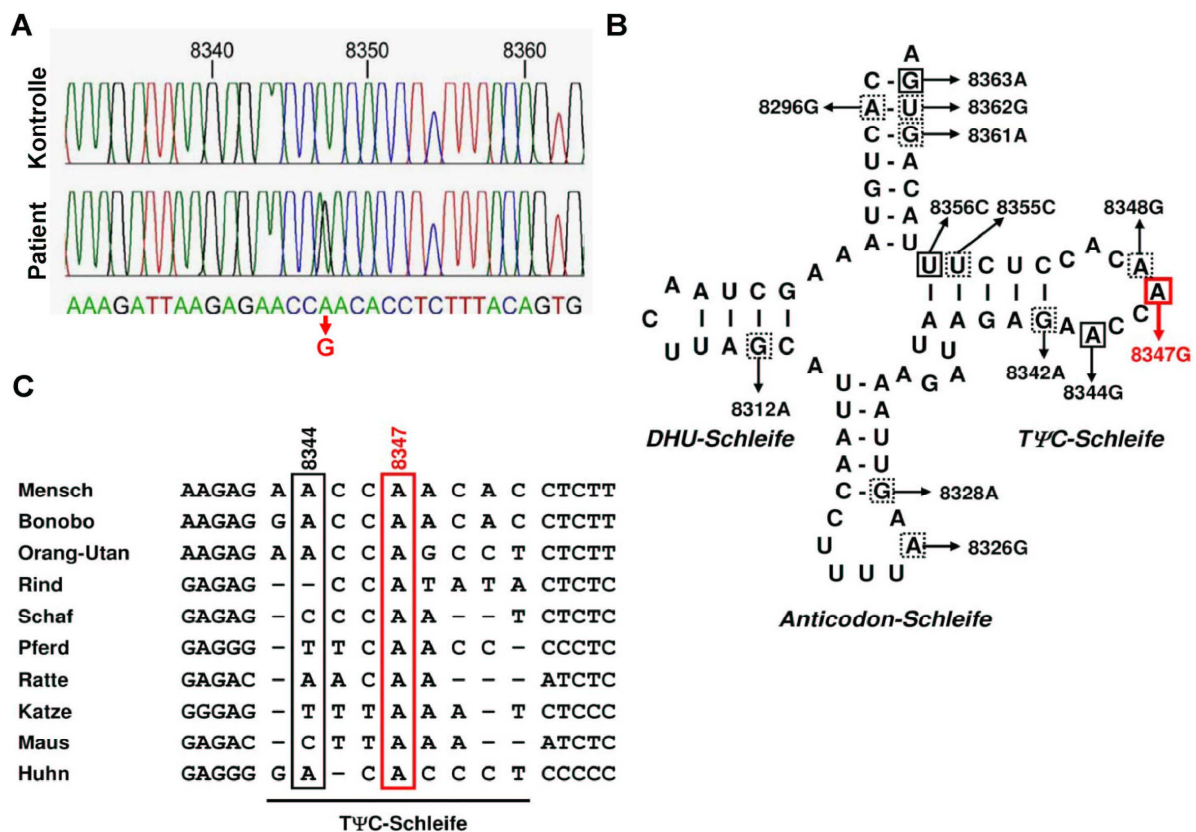


Abbildung 20: Mutationsanalyse der mt.tRNA^{Lys} beim Patienten B. (A) Elektropherogramm der *mt.tRNA^{Lys}*-Sequenzierung. An der Position m.8347 wurde der heteroplasmische Nukleotidaustausch A→G identifiziert. **(B)** Position der Mutation im TΨC-Loop der *mt.tRNA^{Lys}* im Vergleich zur Position einmalig (unterbrochene Kästchen) und mehrfach (durchgehende Kästchen) beschriebener *mt.tRNA^{Lys}*-Mutationen. **(C)** Das CLUSTAL-Alignment der mitochondrialen tRNA^{Lys}-TΨC-Schleife verschiedener Spezies. Gekennzeichnet sind die Positionen der mtDNA-Mutation des Patienten B (roter Rahmen) und der am häufigsten nachweisbaren MERRF-Mutation (m.8344A→G; schwarzer Rahmen).

Alignment-Software¹³⁵ spricht aber für eine Konservierung des Adenins bei evolutionär höher entwickelten Arten (Abbildung 20C). Die verwendeten CLUSTAL-Parameter wurden jedoch subjektiv gewählt und unter der Verwendung anderer Parameter könnten sich möglicherweise andere Konfigurationen des Sequenz-Alignments ergeben.

4.2.2 Quantifizierung der mitochondrialen m.8347A→G *tRNA*^{Lys}-Mutation

Wie schon bei der Studie der Patientin A ausgeführt, spricht für die Pathogenität einer mtDNA-Mutation ihr heteroplasmisches Auftreten.^{49, 156} Um den Heteroplasmiegrad und somit die Pathogenität der mitochondrialen m.8347A→G *tRNA*^{Lys}-Mutation beim Patienten B bewerten zu können, habe ich eine quantitative Sequenzierung mittels Pyrosequencing durchgeführt. Die Genauigkeit der Methode zur Quantifizierung der m.8347A→G Mutation zeigte sich in der Regressionsanalyse von mtDNA-Mischungen definierter Allelverhältnisse mit einem linearen Regressionskoeffizienten von $R^2=0,9986$ zwischen erwarteten und gemessenen Probenwerten (Abbildung 21A). Die erhaltene Eichgerade diente anschließend zur Normalisierung der Messwerte verschiedener Gewebeproben des Patienten, seiner Eltern und der Schwester. Beim Patienten wurden Heteroplasmiegrade zwischen 30 und 38% detektiert, wobei im Muskel die geringste Mutationslast zu finden war (Abbildung 21B). Das Fehlen der Mutation bei den Eltern und der Schwester konnte ich mit der Pyrosequenzierung bestätigen.

4.2.3 Identifizierung einer *PAX6*-Mutation

Obwohl beim Patienten B die m.8347A→G Mutation im *mt.tRNA*^{Lys}-Gen nachgewiesen werden konnte, war der klinische Phänotyp des Patienten durch diesen Befund nicht in vollem Umfang erklärbar. Vor allem war ein derart differenzierter Augenphänotyp mit atypischer Aniridie (Irisfehlbildung), Katarakt (Linsentrübung), Nystagmus (Augenzittern) und Hornhautfehlbildungen (Axenfeld-Rieger-Anomalie), wie ihn der Patient aufwies, im Zusammenhang mit mt.tRNA-Mutationen in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden. Es existiert jedoch eine Anzahl Publikationen, in denen ähnliche Augenfehlbildungen auf dominante Mutationen im *PAX6*-Gen zurückgeführt werden konnten.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ *PAX6* (*paired box 6*; OMIM 607108) gehört zu einer Familie hoch konservierter Transkriptionsregulatoren der Organogenese und seine Funktion ist essentiell für eine normale Entwicklung von Augen- und Nervengeweben. Aufgrund der Assoziation von *PAX6*-Mutationen und Augenfehlbildungen wie Aniridien, Katarakten und Hornhautanomalien erfolgte bei dem Patienten B eine Mutationsanalyse des *PAX6*-Gens. Dabei wurde eine heterozygote Deletion von 16 bp im Exon 10 gefunden (c.1252-1267del16AACCAATTCCACAACC; Abbildung 22A), die eine Verschiebung des Leserasters von *PAX6* verursacht. Entsprechend der mutierten Gensequenz sollte

Ergebnisse

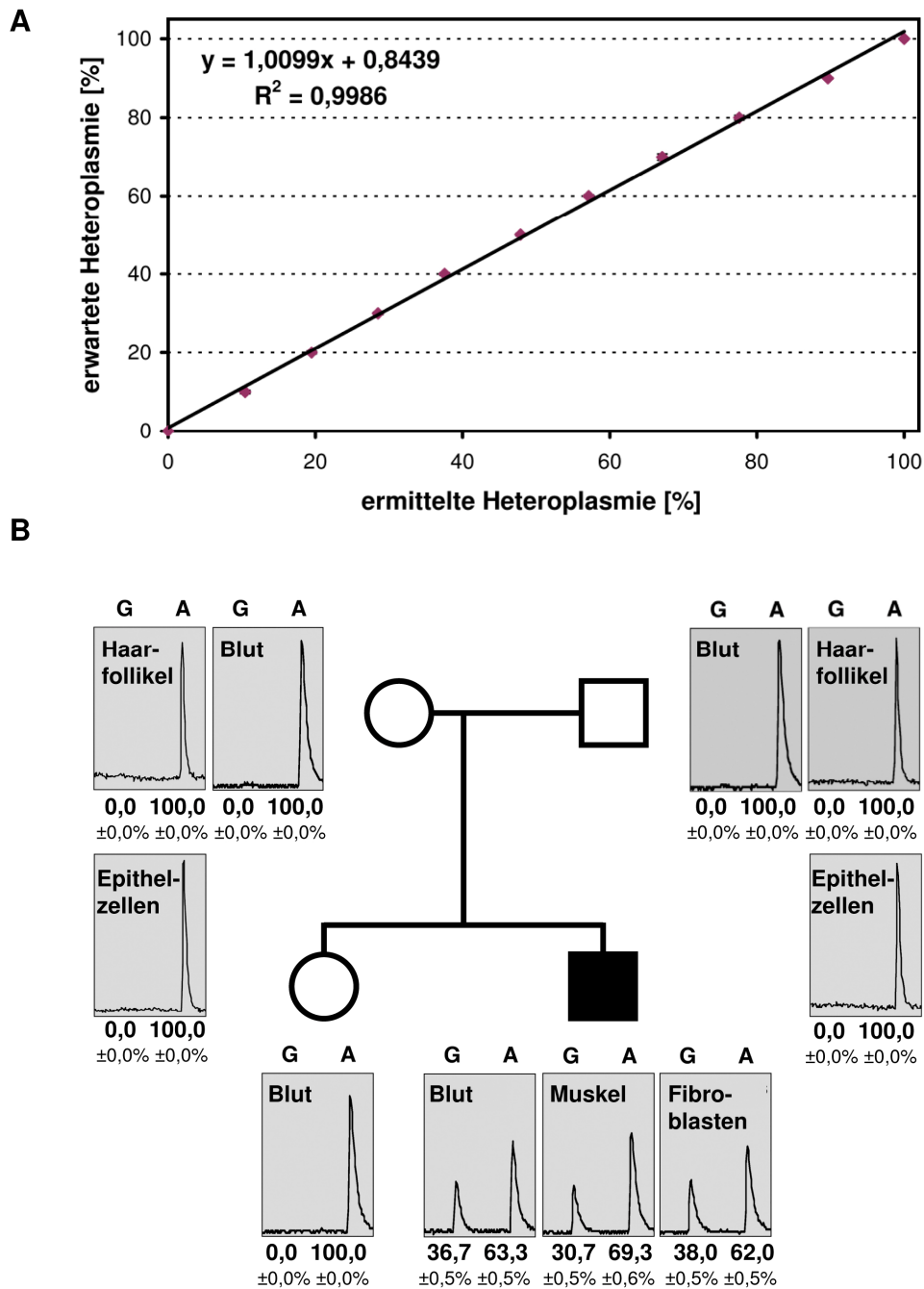


Abbildung 21: Quantifizierung der m.8347A→G *mt.tRNA^{Lys}*-Mutation. (A) Die Regressionsanalyse der Pyrosequenzierung erfolgte anhand definierter Mischungen aus klonierten Wildtyp- bzw. mutierten Allelen. Dargestellt ist die Eichgerade für das Wildtyp-Allel A, wobei der erwartete Heteroplasmiewert, der durch das Mischungsverhältnis der jeweiligen Probe vorgegeben ist, gegen den jeweils gemessenen Wert aufgetragen wurde. Jeder Datenpunkt basiert auf vier unabhängigen PCRs und Pyrosequenzierungen derselben DNA-Probe. SEMs sind aufgetragen, aber aufgrund der geringen Abweichungen nicht zu sehen. (B) Stammbaum der Familie und ermittelte Heteroplasmiegrade in verschiedenen Geweben des Patienten, seiner Eltern und der Schwester. Die angegebenen Heteroplasmiegrade stellen Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen dar und wurden anhand der Eichgeraden normalisiert.

diese Leserasterverschiebung zur Entstehung eines verkürzten, wahrscheinlich nicht funktionellen Proteins führen, welches ab der Aminosäure Tyr296 eine Peptidsequenz von 62 abweichenden Aminosäuren aufweist (Abbildung 22B), bevor es in einem Stopcodon mündet.

Die Analyse der cDNA oder des PAX6-Proteins des Patienten war leider nicht möglich, da kein Patientengewebe zur Verfügung stand, in dem *PAX6* natürlicherweise exprimiert wird.¹⁶⁰ Bei den Eltern und der gesunden Schwester des Patienten wurde die Mutation nicht gefunden, so dass es sich auch hierbei um eine Spontanmutation handelte.

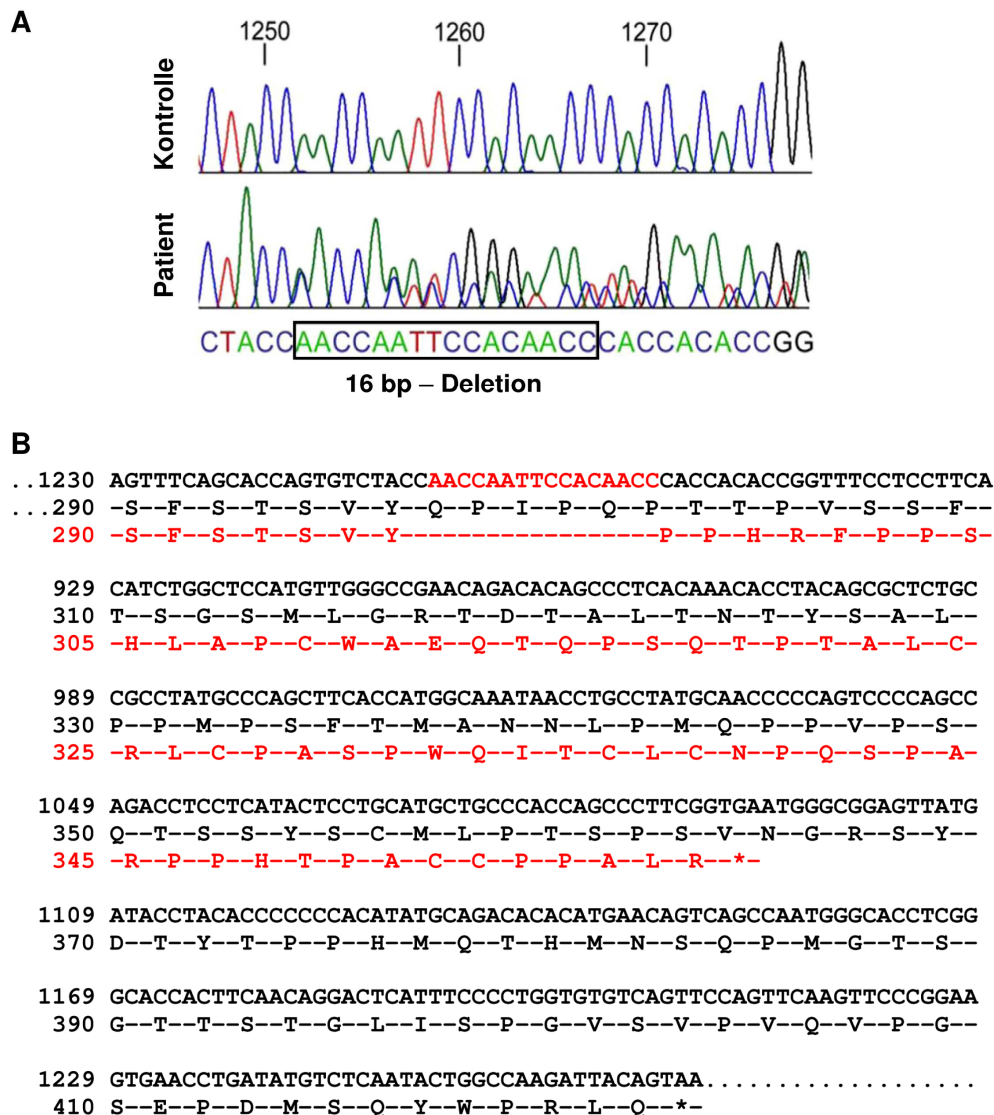


Abbildung 22: PAX6-Mutationsanalyse beim Patienten B. (A) Elektropherogramm der *PAX6*-Sequenzierung. Im Exon 10 wurde eine heterozygote Deletion von 16 bp identifiziert, die zur Verschiebung des Leserasters führt. **(B)** Die Leserasterverschiebung verursacht potentiell die Entstehung eines trinkierten, nicht funktionellen PAX6-Proteins. schwarz, Wildtyp-Sequenz; rot, mutierte Sequenz; (*) Stop-Codon.

Zusammenfassend wurden beim Patienten B zwei Sequenzabweichungen, eine dominant-heterozygote nukleäre und eine heteroplasmische mitochondriale Mutation identifiziert, die möglicherweise gemeinsam den klinischen Phänotyp des Patienten bewirken. Die Beurteilung der Pathogenität beider Mutationen und ihre mögliche Interaktion bleiben jedoch zu diskutieren.

4.3 Studie Patientin C: Mausmodell für mitochondrialen Komplex I-Mangel

Der Komplex I ist eines der beiden „Eingangstore“ für Elektronen in die mitochondriale Atmungskette und seine Funktion somit essentiell für die zelluläre ATP-Produktion. Mutationen in verschiedenen Untereinheiten des Komplexes führen zu einem Komplex I-Mangel und damit zur Entstehung von Mitochondriopathien.¹⁶¹ In der Studie der Patientin C wollte ich die Funktion der Komplex I-Untereinheit NDUFV1, die mit ihrer Bindestelle für NADH den Eintritt von Elektronen in den Komplex I sichert, untersuchen. Im Focus der Analysen sollte dabei vor allem die Rolle der NDUFV1-Untereinheit im zellulären Stoffwechsel und bei der Pathogenese von Komplex I-defizienten Mitochondriopathien stehen.

4.3.1 NDUFV1 – Expression im Mausgehirn

Die Patientin C, die Trägerin der *NDUFV1*-Mutation c.1022C→T ist, weist wie die meisten Mitochondriopathie-Patienten eine regionale Pathologie spezifischer Gehirnareale auf, wobei bei ihr aufgrund der zystischen Leukodystrophie vor allem die Weiße Substanz des Gehirns betroffen zu sein scheint (Abschnitt 2.3). Einen Hinweis auf die Ursache dieser regional betonten Schädigungen könnte die Expression des *NDUFV1*-Gens im Gehirn liefern. Um einen Überblick der *NDUFV1*-Expression verschiedener Gehirnareale zu erhalten, habe ich eine *in situ*-Hybridisierung mit einer *Ndufv1*-mRNA-Antisense-Sonde am erwachsenen Mausgehirn durchgeführt. Transversale Gehirnschnitte einer acht Wochen alten Maus der Linie C57BL/6 wurden dazu mit einer radioaktivmarkierten Oligonukleotid-Sonde, die spezifisch an die 3'UTR der *Ndufv1*-mRNA bindet, hybridisiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Anschließend habe ich zur Beurteilung der Zelldichte den Schnitt mit Toluidinblau gegengefärbt (Abbildung 23). Die Übersetzung der Signalintensitäten in Falschfarben und die anschließende Überlagerung der beiden Färbungen zeigten die stärksten Signale der *Ndufv1*-Expression in den Basalganglien, dem *Hippocampus*, den Schichten III-V der Großhirnrinde und in der Kleinhirnrinde (Körnerzellschicht).

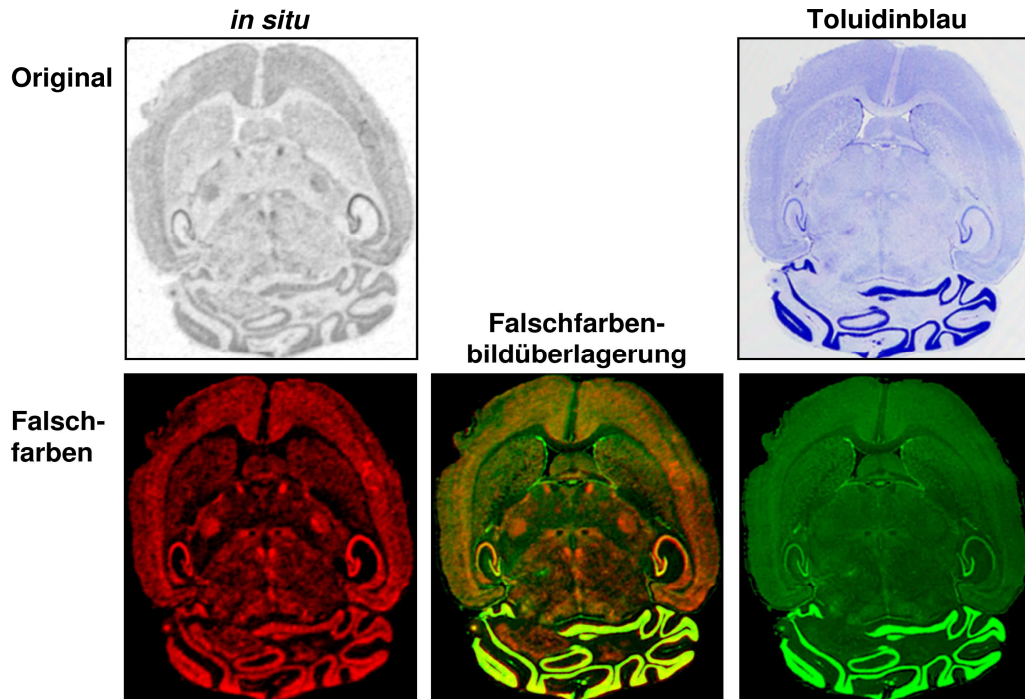


Abbildung 23: *Ndufv1*-Expression im Mausgehirn. In der oberen Reihe sind die Originalbilder der *in situ*-Hybridisierung (Autoradiographie; links) und der Toluidinblaufärbung (rechts) eines transversalen Mausgehirnschnittes gezeigt. Die Darstellungen in Falschfarben, entsprechend der jeweiligen Signalintensitäten, befinden sich darunter (rot, *in situ*-Hybridisierung; grün, Toluidinblaufärbung). Eine Überlagerung der Falschfarbenbilder (unten Mitte) lässt die stärksten Signalintensitäten der *Ndufv1*-Expression (orange) im *Hippocampus*, in den Basalganglien und in einigen Bereichen der Groß- und Kleinhirnrinde erkennen.

4.3.2 Generierung Komplex I-defizienter Mäuse

Durch die Einführung einer *Missense*-Mutation in die kernkodierte Atmungskettenuntereinheit *Ndufv1* sollte ein genetisch basierter Komplex I-Mangel in der Maus induziert werden, um dessen pathologische Folgen für den Organismus molekularbiologisch, biochemisch und histologisch untersuchen zu können. Aufgrund der evolutionären Konservierung der NDUFV1-Untereinheit und einer Homologie von 96% zwischen Mensch und Maus (Abschnitt 1.4.1.2) schien die Maus ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der NDUFV1-Funktion *in vivo* zu sein.

4.3.2.1 *Ndufv1*-Targeting

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe zur Etablierung eines Mausmodells für mitochondrialen Komplex I-Mangel wurde ein vollständiger *knockout* des *Ndufv1*-Gens durch Entfernung des Exons 1 erzeugt. Während heterozygote Tiere entwicklungsgemäß und histologisch völlig normal waren, starben homozygote Tiere noch im Verlauf der frühen Embryogenese und konnten postnatal nicht untersucht werden. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit kein vollständiger *Ndufv1*-*knockout* in die Maus eingeführt, sondern über eine konventionelle *gene targeting*-Strategie ein *knock-in* der bekannten Patientenmutation c.1022C→T im Exon 7 erreicht werden, welcher zum Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin an

Ergebnisse

der Position 341 führt und der Patientin C ein Überleben jenseits des 10. Lebensjahres ermöglichte. Der hierfür verwendete *Targeting*-Vektor 576/1 (Abschnitt 3.1.6) umfasste die gesamte genomische *Ndufv1*-Sequenz, die *Targeting*-Mutation im Exon 7 und eine im Intron 5 lokalisierte, von zwei *loxP*-Sequenzen flankierte Selektionskassette. Die Selektionskassette bestand aus einem Neomycin- und einem Thymidin-Kinase-Gen, mit jeweils separatem PGK-Promotor. Die *loxP*-Sequenzen ermöglichen eine spätere Entfernung der Selektionskassette aus dem *Ndufv1*-Gen mittels *Cre*-Rekombinase, so dass ein Einfluss der Kassette auf den Phänotyp der Mäuse sicher ausgeschlossen werden kann. Dabei verbleibt zwar ein *loxP*-Sequenzelement im Intron 5, der Leserahmen des *Ndufv1*-Gens ist jedoch erhalten (Abbildung 24).

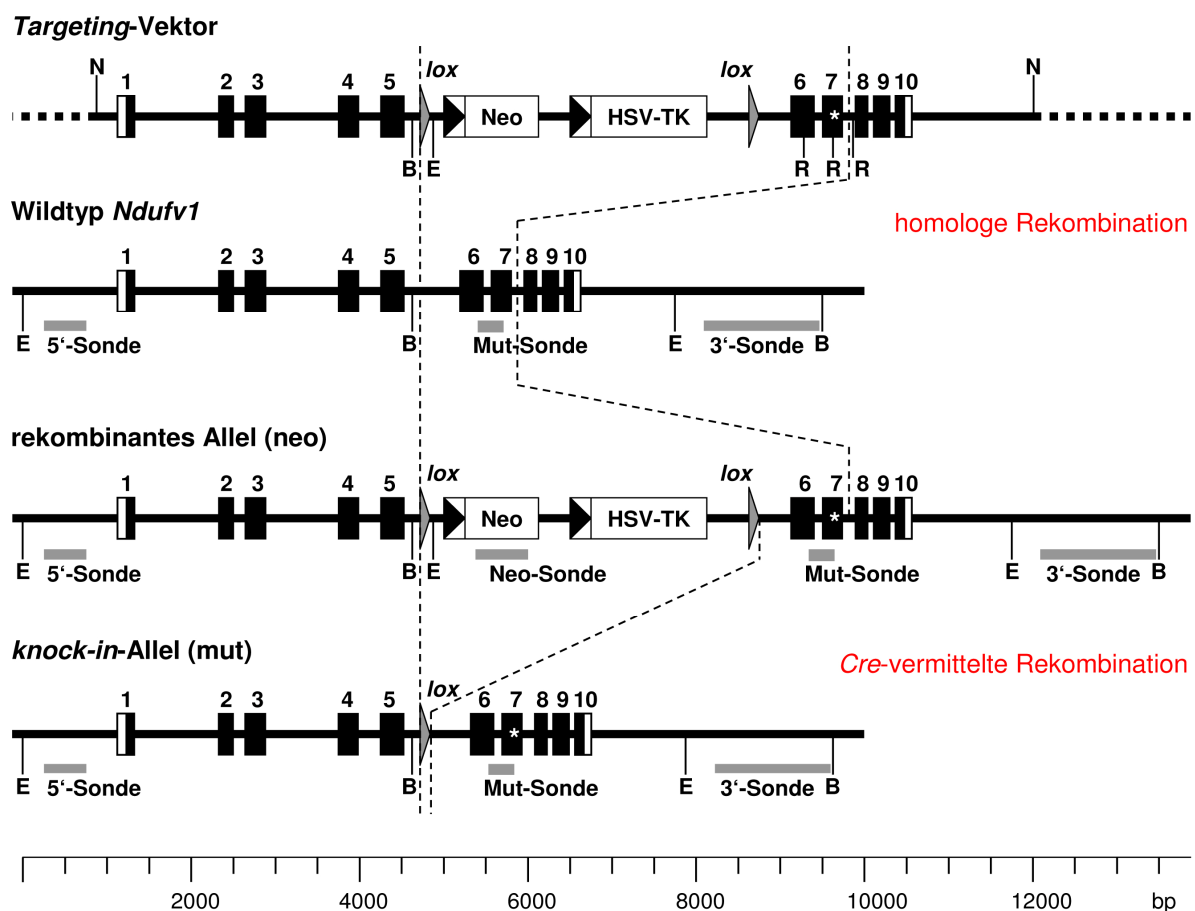


Abbildung 24: Targeting-Strategie für den *Ndufv1*-knock-in. Der *Targeting*-Vektor enthält die c.1022C→T *Ndufv1*-Mutation im Exon 7 (Stern) und eine Selektionskassette mit Neomycin- und HSV-TK-Gen im Intron 5. Durch homologe Rekombination am 5'-Ende der Kassette und 3' von der Mutation sollen zunächst beide Elemente ins Mausgenom integriert werden. Die *Cre*-vermittelte zweite Rekombination entfernt die Selektionskassette, wobei die *Targeting*-Mutation und eine *loxP*-Sequenz im Mausgenom verbleiben. Die Bindungsstellen der Southern-Blot-Sonden für das ES-Zell-Screening nach homologer und *Cre*-vermittelter Rekombination, sind als hellgraue Boxen dargestellt und die verwendeten Restriktionsschnittstellen (B, *Bam*HI; E, *Eco*RV) angegeben. Die *Rsa*I-Schnittstellen (R), zur Verwendung der Mut-Sonde im Southern-Blot sind aus Übersichtsgründen nur im *Targeting*-Vektor angegeben. Der *Targeting*-Vektor wurde mit *Not*I (N) linearisiert. NB: maßstabsgerechte Darstellung der Exons und Introns.

Ein Restriktionsverdau des *Targeting*-Vektors mit *NotI* und *HindIII* zeigte die richtigen Orientierungen und Größen der klonierten Vektor- und Gensequenzen (Abbildung 25A). Der Mutationsnachweis im Vektor mittels PCR und anschließendem *RsaI*-Restriktionsverdau war ebenfalls positiv (Abbildung 25B).

Vor der Verwendung des *Targeting*-Vektors wurde seine Sequenz durch eine Sequenzierung nach Sanger¹³⁹ vollständig überprüft, um sicherzustellen, dass während des Klonierungsprozesses keine unerwünschten Mutationen in kodierenden oder funktionell wichtigen nicht kodierenden Bereichen (Exon/Intron-Grenzen) aufgetreten sind. Bis auf einen in der Spendermaus SV129/Ola natürlich vorkommenden Einzelbasenpolymorphismus im Intron 2, der sehr wahrscheinlich keine funktionelle Bedeutung für die Expression des *Ndufv1*-Gens hatte, war die gesamte Gensequenz korrekt. Daher konnte der Vektor nun für das *Targeting* embryonaler Mausstammzellen zur Generierung der *knock-in*-Maus verwendet werden.

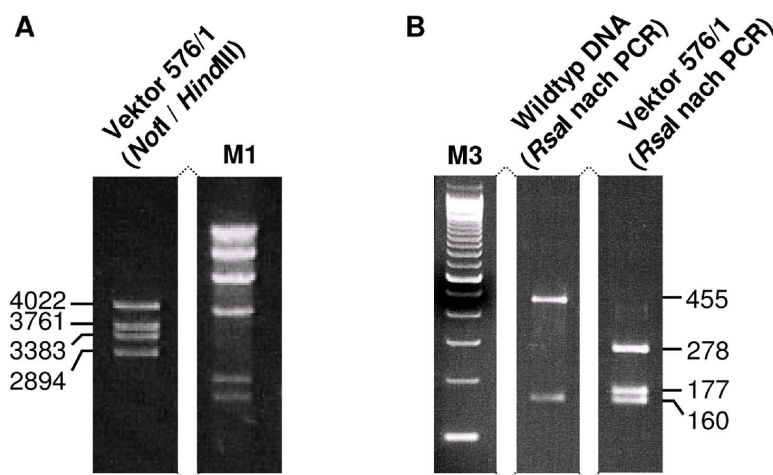


Abbildung 25: Überprüfung des *Targeting*-Vektors 576/1 auf Vollständigkeit und Mutation. (A) Der Restriktionsverdau des Vektors mit *NotI/HindIII* zeigte die erwarteten Fragmentgrößen von 4022, 3761, 3383 und 2894 bp. **(B)** Die Mutation c.1022C→T, die eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *RsaI* erzeugt, konnte ebenfalls mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau nachgewiesen werden. M1, M3, DNA-Längenstandards.

4.3.3 Generierung von Mäusen mit *Ndufv1*-Mutation c.1022C→T

Die embryonalen Mausstammzellen (ES-Zellen) wurden mittels Elektroporation mit dem linearisierten *Targeting*-Vektor 576/1 transfiziert. Das Neomycinresistenzgen in der Selektionskassette des Vektors diente dabei zur positiven Selektion rekombinanter Zellen. Die ES-Zellklone, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurden mittels Southern-Blot und PCR identifiziert (Abbildung 26). Von insgesamt 960 Neomycin-resistenten Klonen, aus drei Elektroporationen, wiesen nur drei eine vollständige *Ndufv1*-Rekombination mit Selektionskassette und Mutation auf. Aus der Injektion dieser ES-Zellen in Mausblastozysten gingen sechs männliche chimäre Mäuse hervor, bei denen sich jedoch auch nach bis zu 10 Verpaarungen mit weiblichen C57BL/6 Mäusen keine Keimbahngängigkeit der ES-Zellen zeigte.

Ergebnisse

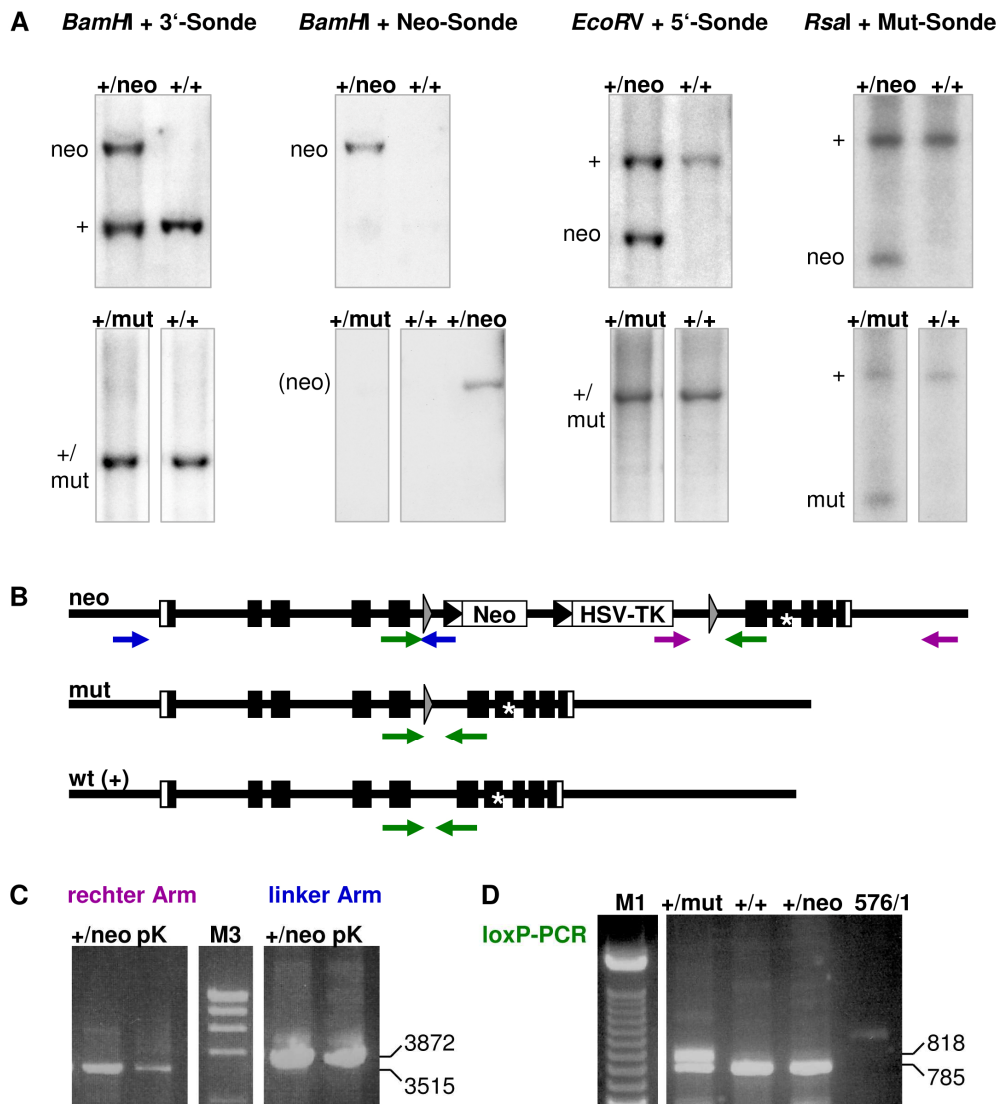


Abbildung 26: Analyse rekombinanter ES-Zellen. (A) Southern-Blots nach homologer Rekombination (obere Reihe) bzw. *Cre*-vermittelter Rekombination (untere Reihe) unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme und Sonden. Nach homologer Rekombination haben heterozygote ES-Zellen (+/neo) die Selektionskassette und die *knock-in*-Mutation ins Genom aufgenommen und weisen im Vergleich zum Wildtyp (+/+) je eine zusätzliche Bande auf (neo-Banden). Nach der *Cre*-vermittelten Rekombination entspricht das Bandenmuster der heterozygoten ES-Zellen (+/mut) unter Verwendung der 3'- bzw. 5'-Sonde dem Wildtyp plus 33 bp *loxP*-Sequenz (aufgrund des geringen Unterschieds der Fragmentlängen optisch nicht unterscheidbar); die Selektionskassette ist nicht mehr nachweisbar, die Mutation jedoch noch vorhanden. Die Fragmentlängen sind im Abschnitt 3.2.1.14 angegeben. (B) Lage der Primer zum Test der ES-Zellen nach homologer Rekombination mittels *long range*-PCR des linken (blau) bzw. rechten Gen-Arms (violett) bzw. nach *Cre*-vermittelter Rekombination mittels *loxP*-PCR (grün). (C + D) Größen der *long range*- und *loxP*-PCR-Produkte. Bei vorhandener Selektionskassette (neo-Allel) wurde mit den *loxP*-Primern, aufgrund des Primer-Abstandes und der gewählten PCR-Bedingungen, kein Produkt amplifiziert. pK, Positivkontrollen; M1, M3, DNA-Längenstandards.

Bei früheren Untersuchungen transgener Mäuse hatte man gelegentlich festgestellt, dass die Expression der HSV-Thymidin-Kinase (HSV-TK) in männlichen Keimzellen eine Störung der Spermienentwicklung bewirkte, was zur Unfruchtbarkeit der Männchen führen konnte oder

selektiv die HSV-TK in positiven Spermien inaktivierte.¹⁶² Aus diesem Grund habe ich die HSV-TK-Gen enthaltende Selektionskassette des *Targeting*-Vektors 576/1 vor einer weiteren Runde der Blastozysteninjektion *in vitro* aus den drei rekombinanten ES-Zellklonen entfernt, indem ich die Zellen transient mit dem Cre-Rekombinase exprimierenden Vektor pIC-Cre transfizierte. Die HSV-TK diente in diesem Fall als negativer Selektionsmarker der Rekombination. Von insgesamt 800 isolierten ES-Klonen wurden schließlich drei, die mittels Southern-Blot und PCR (Abbildung 26) positiv getestet waren, zur Blastozysteninjektion verwendet. Aus ihr gingen 21 chimäre Tiere hervor, bei denen sich nur ein einziger ES-Zellklon in zwei Tieren als keimbahngängig erwies. Die Identifizierung heterozygoter Nachkommen erfolgte anhand ihrer Genotypisierung mit DNA aus Schwanzspitzen mittels PCR und anschließendem *RsaI*-Verdau (analog Abbildung 25B).

Durch Southern-Blot und PCR konnte ich somit auf genomischer Ebene zeigen, dass die c.1022C→T *Ndufv1*-Mutation durch homologe Rekombination in das Mausgenom integriert war. Da die Selektionskassette infolge der Cre-vermittelten Rekombination wieder aus dem Mausgenom entfernt wurde, sollte der resultierende Phänotyp ausschließlich auf die Mutation zurückzuführen sein.

4.3.4 Analyse der Mäuse mit einer c.1022C→T *Ndufv1* – Mutation

Die heterozygoten Nachkommen der chimären Mäuse ohne Selektionskassette (*Ndufv1*^{+/*mut*}) wurden zur Erzeugung reiner Linien mit C57BL/6- bzw. 129/Ola-Mäusen verpaart. Aus Kreuzungen der heterozygoten F1-Tiere untereinander sollten homozygote *knock-in*-Mäuse zur Analyse gewonnen werden. Es gelang mir jedoch in keiner der beiden Linien, weder mit dem 129/Ola-, noch mit dem C57BL/6-Hintergrund, dass homozygot-mutante Nachkommen geboren wurden. Die Verteilung der Nachkommen-Genotypen bei Verpaarungen von *Ndufv1*^{+/*mut*}-Tieren mit Wildtyp-C57BL/6 bzw. Wildtyp-129/Ola (Tabelle 13) entsprach in etwa den Mendel'schen Regeln (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht), mit einem Verhältnis von 1 (*Ndufv1*^{+/*mut*}) zu 1 (*Ndufv1*^{+/+}). Bei der Genotypen-Verteilung der Nachkommen aus Heterozygoten-Verpaarungen fand ich hingegen ein Verhältnis von etwa 2 (*Ndufv1*^{+/*mut*}) zu 1 (*Ndufv1*^{+/+}). Entsprechend des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts spricht diese Aufteilung für die embryonale Letalität homozygoter Träger des mutanten *Ndufv1*-Allels (*Ndufv1*^{mut/*mut*}) und erklärt somit das Fehlen dieser Tiere in der Nachkommenschaft. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Nachkommenschaft von Heterozygoten-Verpaarungen wurden dabei nicht festgestellt, weshalb *Ndufv1* in der Maus keine geschlechtsspezifische Funktion auszuüben scheint.

Tabelle 13: Genotypverteilung der Nachkommen aus Verpaarungen der *Ndufv1*^{+/-mut}-Mäuse

| Verpaarung | Anzahl der Verpaarungen | Anzahl der Nachkommen | Nachkommen <i>Ndufv1</i> ^{+/+} | Nachkommen <i>Ndufv1</i> ^{+/-mut} |
|---|-------------------------|-------------------------------------|---|--|
| <i>Ndufv1</i> ^{+/-mut} x C57BL/6 | 27 | 169 (Ø 6,3 / Wurf; 84 ♀, 85 ♂) | 84 | 85 |
| <i>Ndufv1</i> ^{+/-mut} x 129/Ola | 18 | 114 (Ø 5,7 / Wurf; 59 ♀, 55 ♂) | 47 | 67 |
| <i>Ndufv1</i> ^{+/-mut} x <i>Ndufv1</i> ^{+/-mut} | 34 | 235 (Ø 6,9 / Wurf; 117 ♀, 118 ♂) | 74 | 161 |

4.3.5 Identifizierung einer zweiten Mutation im *Ndufv1*-Gen

Die *knock-in*-Mutation c.1022C→T im *Ndufv1*-Gen war ursprünglich so gewählt worden, dass sie – wie bei der Patientin C – in homozygotem Zustand erwartungsgemäß keine embryonale Letalität verursachen sollte. Daher stellte sich die Frage, ob andere Sequenzabweichungen in *Ndufv1* für das frühe Sterben der homozygot-mutanten Mausembryonen verantwortlich sein könnten. Die Sequenzierung der cDNA aus der Leber einer heterozygoten Maus, bei der die Mutation c.1022C→T bestätigt werden konnte (Abbildung 27B), führte schließlich zur Identifizierung eines zweiten, neu aufgetretenen Nukleotidaustauschs in der kodierenden Sequenz des *Ndufv1*-Gens. Dieser Nukleotidaustausch von T nach C an der Position c.100 verursacht den Austausch der Aminosäure Serin an der Position 34 gegen Prolin (Abbildung 27A). Die Abschätzung der Pathogenität dieser Mutation ist schwierig, da eine analoge Mutation beim Menschen bisher nicht beschrieben wurde und sie genau wie die Mutation im Exon 7, keine bekannte funktionelle Domäne der *Ndufv1*-Untereinheit betrifft. Unter Säugetieren ist die betroffene Aminosäure S34 ebenso wie die umliegende Peptidsequenz evolutionär hoch konserviert, was eine wichtige funktionelle Bedeutung vermuten lässt. Dennoch findet sich bei anderen Spezies an der Position p.34 durchaus die Aminosäure Prolin (Abbildung 27C). Die *Ndufv1*-Mutation c.1022C→T führt ebenfalls zum Austausch einer, innerhalb von Säugern, hoch konservierten Aminosäure (Abbildung 27C). Daher ist es letztendlich ungewiss, welche der beiden Mutationen das Absterben homozygoter Embryonen während der intrauterinen Entwicklung bewirkt, oder ob erst beide Mutationen gemeinsam eine derart schwere Entwicklungsstörung hervorrufen, dass diese mit dem Leben nicht vereinbar ist.

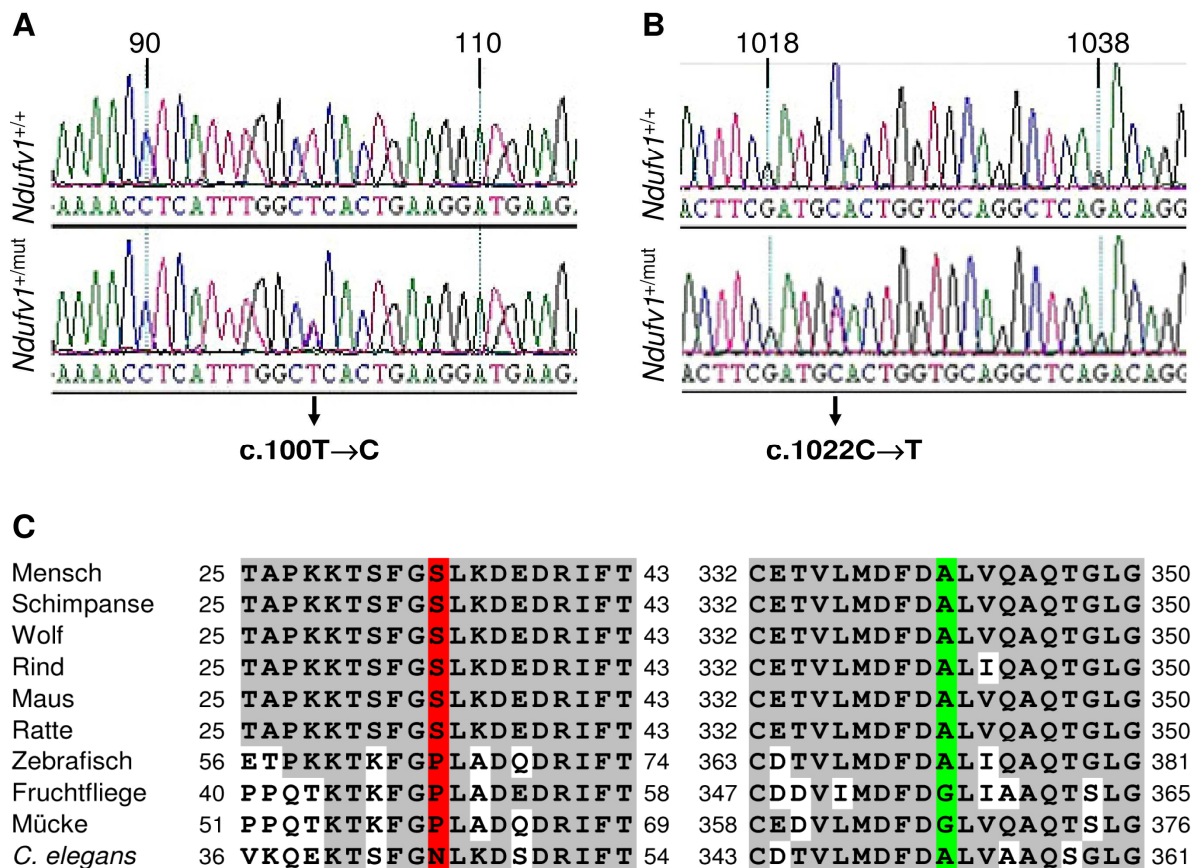


Abbildung 27: Mutationsanalyse des *Ndufv1*-Gens einer heterozygoten Maus. (A+B) Sequenzierung der *Ndufv1*-cDNA. Neben der *Targeting*-Mutation c.1022C→T im Exon 7 (B) wurde im Exon 2 die Mutation c.100T→C nachgewiesen (A). **(C)** *Alignment* der Proteinsequenzen verschiedener Spezies im Bereich der beiden *Ndufv1*-Mutationen. grau, evolutionär konservierte Aminosäuren; rot, Mutation c.100T→C (p.34S→P); grün, Mutation c.1022C→T (p.341A→V).

4.3.6 Analyse von *Ndufv1*^{mut/mut}-Mausembryonen und primärer Zelllinien

Es wäre denkbar, dass das alleinige Auftreten der c.1022C→T *Ndufv1*-Mutation im Exon 7 keine Letalität homozygoter Mausembryonen verursachen würde. Aus diesem Grund könnte die Trennung der Exon 7-Mutation von der Mutation im Exon 2 die Möglichkeit bieten, doch noch lebende homozygote *knock-in*-Mäuse zu erhalten. Der geringe Abstand beider Mutationen ließ jedoch eine zufällige Rekombination im Laufe weiterer Verpaarungen als extrem unwahrscheinlich erscheinen: Im Säuger-Genom entspricht ein genetischer Abstand von einem Centimorgan (cM) zwischen zwei Loci etwa einem physikalischen Abstand von 1.000.000 bp. Bei einem genetischen Abstand von einem cM rechnet man laut Definition mit einer Rekombinationswahrscheinlichkeit von 1%, d.h. alle 100 Meiosen sollte ein Rekombinationsereignis auftreten. Die beiden Mutationen im *Ndufv1*-Gen sind 922 bp voneinander getrennt, was ungefähr einem genetischen Abstand von 0,000922 cM entspräche. Legt man somit die Rekombinationswahrscheinlichkeit von 0,000922% zugrunde, wären über 108.000 Meiosen notwendig, um theoretisch eine einzige Trennung der beiden *Ndufv1*-Mutationen voneinander zu erreichen. Das entspräche bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 6,3

Ergebnisse

Nachkommen unserer Tiere (Tabelle 13) über 17.000 Mausverpaarungen. Da die Durchführung einer solchen Anzahl an Verpaarungen unrealistisch ist, wurde die experimentelle Strategie der vorliegenden Arbeit dahingehend geändert, dass weitere Untersuchungen der *Ndufv1*-Funktion auf embryonaler bzw. zellulärer Ebene erfolgen sollten. Eine Wiederholung des *Ndufv1-Targetings* mit dem hier verwendeten Vektor-Konstrukt erschien nicht sinnvoll, da in der Zwischenzeit wesentlich effizientere Vektor-Konstruktionen zur Generierung genetischer Modellorganismen entwickelt wurden.¹⁶³ Diese werden in zukünftigen Projekten der Arbeitsgruppe zur Generierung des Mausmodells für mitochondrialen Komplex I-Mangel verwendet werden.

4.3.6.1 Morphologie der *Ndufv1*^{mut/mut}-Mausembryonen

Im menschlichen Fetus wurde eine starke *Ndufv1*-Expression im Herz und in der Niere nachgewiesen.⁹⁷ Da besonders das Herz auf eine aerobe Energiegewinnung angewiesen ist, kann man vermuten, dass die Funktionsstörung von *Ndufv1* in der Maus sehr früh während der Embryonalentwicklung zum Tragen kommt. Um herauszufinden, zu welchem Entwicklungszeitpunkt noch homozygot-mutante *Ndufv1*-Mausembryonen zu finden waren, habe ich terminierte Verpaarungen heterozygoter *Ndufv1*^{+ / mut}-Tiere angesetzt, wobei der Tag nach der Verpaarung (bei positivem Plaque) als E0,5 gezählt wurde. Zu den Zeitpunkten E7,5, E8,5, E9,5 und E10,5 erfolgten Präparationen der Embryonen und sofern möglich, deren Genotypisierung hinsichtlich beider Mutationen. Bis auf den Tag E10,5 konnte ich in allen untersuchten Entwicklungsstadien Embryonen des Genotyps *Ndufv1*^{mut/mut} (für beide Mutationen) mittels PCR und *RsaI*-Verdau nachweisen (Abbildung 28). Zudem lag ihre Häufigkeit von der Gesamtheit präparierter Embryonen mit 26% im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Auffällig war jedoch, dass die *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryonen aller Entwicklungsstufen deutlich kleiner waren als die *Ndufv1*^{+ / mut} und *Ndufv1*^{+ / +}-Embryonen, und sie im Vergleich zu diesen so gut wie

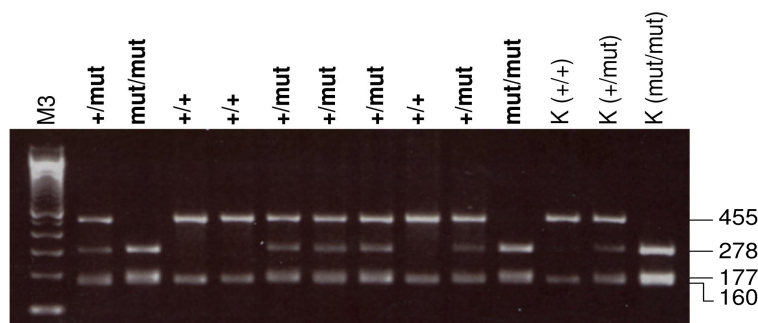


Abbildung 28: Beispiel der Genotypisierung von Mausembryonen (E8,5) aus einer *Ndufv1*^{+ / mut} x *Ndufv1*^{+ / mut}-Verpaarung. Die Genotypenverteilung der 10 gezeigten Embryonen (fettgedruckt) entspricht in etwa dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (30% *Ndufv1*^{+ / +} : 50% *Ndufv1*^{+ / mut} : 20% *Ndufv1*^{mut / mut}). K, Kontrollen; M3, DNA-Längenstandard.

keine entwicklungsspezifischen Strukturen zeigten (Abbildung 29). Zwischen *Ndufv1*^{+/mut} und *Ndufv1*^{+/+}-Embryonen konnte ich keine phänotypischen Unterschiede feststellen.

Im Stadium E10,5 war das embryonale Gewebe homozygoter Mutanten bereits vollständig resorbiert. Hier wurden neben normal entwickelten heterozygoten und Wildtyp-Embryonen nur noch Rückstände von Plazenten ohne embryonales Gewebe gefunden. Präparationen von Embryonen der Entwicklungsstadien vor E7,5 waren aufgrund der geringen Embryogrößen nicht möglich. Daher ist keine genaue Aussage über den Zeitpunkt der ersten Entwicklungsstörungen, die durch die fehlende Funktion des *Ndufv1*-Proteins hervorgerufen werden, möglich.

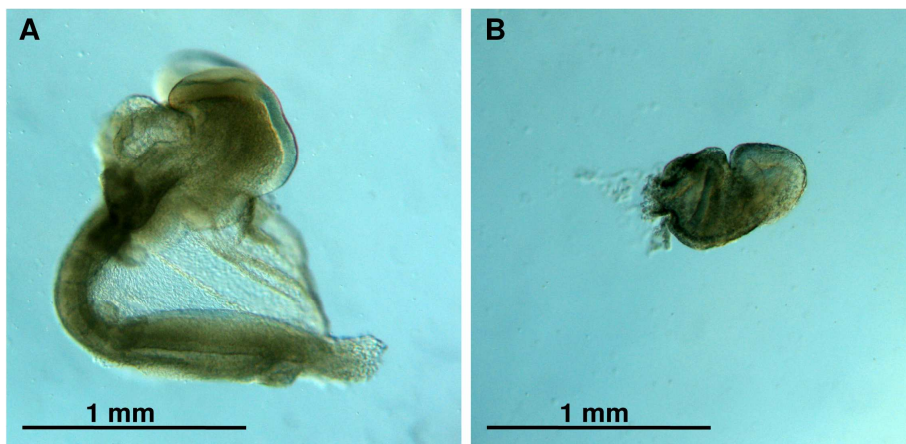


Abbildung 29: Embryonen der Genotypen (A) *Ndufv1*^{+/+} bzw. (B) *Ndufv1*^{mut/mut} am Tag E8,5. Der kaudale Teil des Wildtyp-Embryos ist noch nach dorsal gebogen und im Mikroskop sind einzelne Somiten und beide Hirnbläschen zu erkennen. Eine solche entwicklungsspezifische Strukturierung fehlt bei der homozygoten Mutante. Hier ist lediglich der Ansatz einer Kopf-Rumpf-Struktur zu vermuten.

4.3.6.2 Ultrastrukturelle Veränderungen der Zellen und Mitochondrien von *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryonen

Eine Analyse der *Ndufv1*^{mut/mut}-Mausembryonen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie sollte uns Hinweise auf Mechanismen liefern, durch welche der Funktionsverlust des *Ndufv1*-Proteins das frühe Sterben der Embryonen bewirkt haben könnte. So spielen die Mitochondrien in den Zellen z.B. eine wichtige Rolle bei der Regulation des programmierten Zelltods.¹⁶⁴ Wie unter anderem beim Leigh-Syndrom gezeigt wurde, gehen Mutationen in funktionellen Proteinen der Atmungskette häufig mit einem ausgedehnten Substanzverlust spezifischer neuronaler Gewebe einher, bei dem vor allem nekrotische,¹⁶⁵ aber auch apoptotische¹⁶⁶ Vorgänge involviert zu sein scheinen. Bei der Patientin C, der Trägerin der *Targeting*-Mutation, wurde ebenfalls eine Degeneration der Weißen Substanz (Leukodystrophie), mit einhergehendem Substanzverlust (zystische Degeneration) diagnostiziert. Dementsprechend könnte auch die Letalität der *Ndufv1*^{mut/mut}-Mausembryonen mit einem vorzeitigem Zelltod verbunden sein.

Ergebnisse

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Wildtyp- und mutanten Embryonen am Entwicklungstag E8,5 stellten zunächst klare Unterschiede im Zellverbund heraus. Wie man in den Abbildung 30A und C sieht, fanden sich im gesamten Wildtyp-Embryo intakte Zellstrukturen, mit abgerundeten Zellkernen, homogenem Zytoplasma und dicht beieinander liegenden Einzelzellen. Im Vergleich dazu erscheint die Zellmorphologie im gesamten *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryo nicht so gut erhalten (Abbildung 30B und D). Typische Anzeichen apoptotischen Zelltods, wie Chromatinkondensierung oder autolytische Vesikel, sind zwar nicht erkennbar, allerdings sind hier die Zell-Zell-Kontakte stark aufgelockert. Dies könnte auf einem Schrumpfen der Zellen – charakteristisch für das Anfangsstadium der Apoptose – beruhen.¹⁶⁷ Ein Anschwellen von Zellen, wie es oft beim nekrotischen Zelltod beobachtet wird, war hier nicht erkennbar.

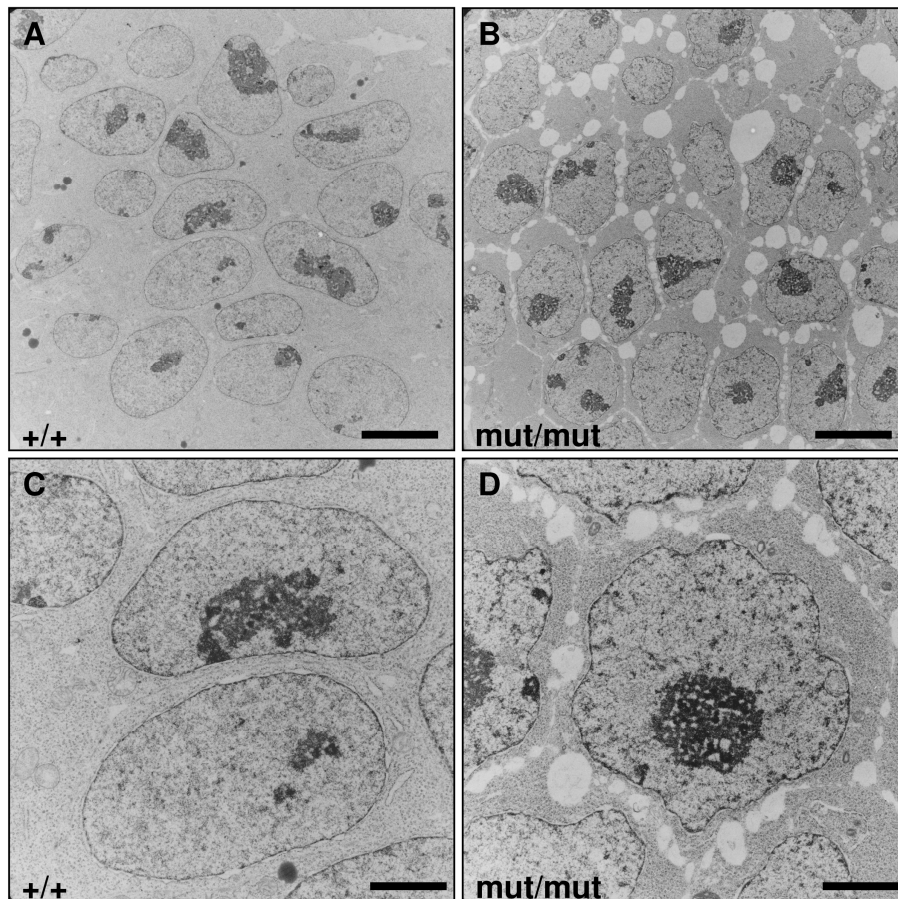


Abbildung 30: Transmissions-Elektronenmikroskopie transversaler Schnitte eines Wildtyp- (A+C) und eines mutanten (B+D) Mausembryos im Entwicklungsstadium E8,5. Maßbalken: A+B = 5,6 μ m; C+D = 2 μ m.

Das frühe Sterben der mutanten Embryonen scheint somit tatsächlich im Zusammenhang mit einem vorzeitigen Tod der einzelnen Zellen zu stehen. Dieser muss aber offenbar sehr langsam fortschreiten, da trotz des ausgedehnten Zerfalls der Zellstruktur noch vereinzelt mitotisch aktive Zellen im E8,5-Embryo identifiziert werden konnten (Abbildung 31) und *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryonen auch noch bis zum Tag E9,5 zu finden waren.

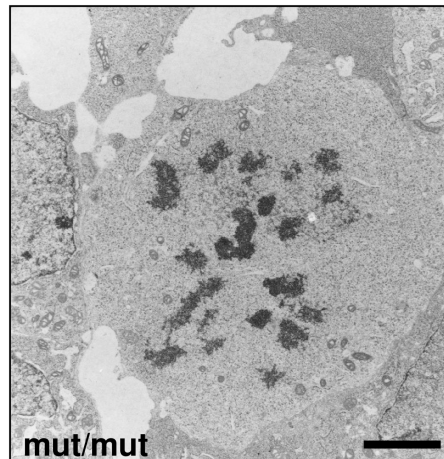


Abbildung 31: Eine Zelle des *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryos in der Prometaphase der Mitose. Das kondensierte Chromatin der vereinzelt liegenden Chromosomen ist deutlich zu erkennen, während sich die Kernmembranen bereits aufgelöst haben. Maßbalken: 2,6 μm .

Anhand der Abbildung 30A und B wird außerdem deutlich, dass der erhebliche Größenunterschied der *Ndufv1*^{+/+}- und *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryonen zum Zeitpunkt E8,5 (Abbildung 29), offensichtlich nicht mit einem entsprechenden Größenunterschied der embryonalen Zellen einhergeht. Die Querschnitte der Zellen erscheinen in beiden Embryos annähernd gleich groß. Dies bedeutet, dass die mutanten Zellen, infolge des Funktionsverlustes des *Ndufv1*-Proteins, im gleichen Entwicklungszeitraum weniger Zellteilungen durchlaufen haben als die Wildtyp-Zellen.

Gravierende Unterschiede zwischen den Embryonen fanden sich auch bezüglich der Ultrastruktur der Mitochondrien. Während beim Wildtyp ausschließlich intakte Mitochondrien, mit scharf abgegrenzten äußeren Membranen und septenartigen Einfaltungen der inneren Membran (*Cristae*) zu sehen waren (Abbildung 32A und C), zeigten sich die Mitochondrien im gesamten *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryo strukturell verändert (Abbildung 32B und D). Ein Großteil wies stark verdickte *Cristae* und einen deutlich reduzierten Matrixraum auf (Abbildung 32B). Darüber hinaus fehlte einigen Mitochondrien die äußere Membran und die Organellenstruktur begann sich aufzulösen (Abbildung 32D). Andere Mitochondrien besaßen statt langgezogener *Cristae* vesikelartige Strukturen, die ebenfalls die mitochondriale Matrix zu verdrängen schienen (Abbildung 32B). Derartige Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur sind im Zusammenhang mit dem Anfangsstadium der Apoptose zu finden.¹⁶⁸ Damit deuten auch diese Befunde darauf hin, dass der Funktionsverlust des *Ndufv1*-Proteins zu einem vorzeitigen Zelltod in den mutanten Embryonen führt, was augenscheinlich die Ursache ihrer frühen Letalität darstellt.

Eine regional betonte massive Zelldegeneration, wie sie bei der Patientin C in einigen Gehirnregionen nachgewiesen wurde, ist jedoch bei den *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryonen anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht zu erkennen. Zumindest zum Entwicklungs-

Ergebnisse

zeitpunkt E8,5 schienen alle embryonalen Zellen von den beschriebenen Degenerationsprozessen betroffen.

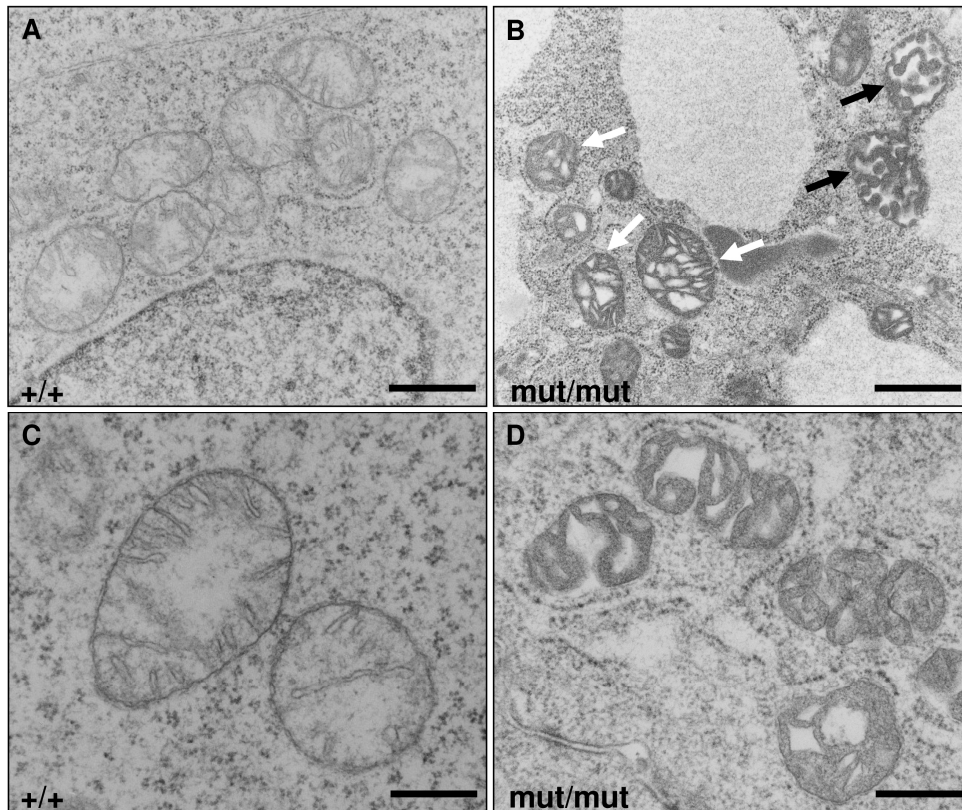


Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien aus $Ndufv1^{+/+}$ - und $Ndufv1^{mut/mut}$ -Mausembryonen. (A+C) Die intakten Wildtyp-Mitochondrien weisen durchgehende äußere Membranen und schmale, in den Matrixraum ragende *Cristae* auf. (B) Die *Cristae* der mutanten Mitochondrien sind stark verdickt (weiße Pfeile) oder bilden vesikelartige Strukturen (schwarze Pfeile). (D) Bei einigen mutanten Mitochondrien scheint die äußere Membran zu fehlen oder sich aufzulösen und die Organellenstruktur zu zerfallen. Maßbalken: A+B = 720 nm; C+D = 340 nm.

4.3.6.3 Isolierter Komplex I-Mangel in MEFs des Genotyps $Ndufv1^{mut/mut}$

Mutationen in nukleär kodierten, strukturellen Untereinheiten der Atmungskette gehen häufig mit einer reduzierten Aktivität des betroffenen Enzymkomplexes einher.¹⁶⁹ So wurde auch bei der Patientin C biochemisch ein Komplex I-Mangel in Muskel- und Fibroblastenzellen nachgewiesen. Ob die Abwesenheit einer funktionellen *Ndufv1*-Untereinheit in der Maus ebenfalls zur Reduktion der Komplex I-Aktivität führt, konnte ich aufgrund der zu geringen Gewebemengen nicht direkt an präparierten Embryonen untersuchen. Aus diesem Grund mußten die Messungen der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe an kultivierten Zellen der Mausembryonen erfolgen (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs). Hierfür habe ich für jeden Genotyp ($Ndufv1^{+/+}$, $Ndufv1^{+/mut}$ bzw. $Ndufv1^{mut/mut}$) mehrere primäre Zelllinien angelegt, wobei die Zellkulturbedingungen so gewählt waren, dass sie vor allem die Vermehrung von Fibroblastenzellen fördern sollten. Nach anfänglich geringem Wachstum der kultivierten Zellen bis zu

den Passagen 6-10, trat bei den meisten Zelllinien, unabhängig vom Genotyp, ein plötzlicher anhaltender Wachstumsschub auf, weshalb die weitere Kultivierung ohne chemische, physikalische oder genetische Immortalisierung möglich war.

Von den etablierten Zelllinien wurden zwei pro Genotyp (+/+ (#1) und (#2); +/-mut (#3) und (#4); mut/mut (#5) und (#6)) zur spektrophotometrischen Analyse der Aktivitäten des Atmungskettenkomplexes I an isolierten Mitochondrien eingesetzt (Abschnitt 3.2.3.3). Als mitochondriales Referenzenzym diente zunächst die matrixständige Citrat-Synthase (CS), da sie kein Bestandteil der Atmungskette ist und ihre Aktivität daher nicht von den *Ndufv1*-Mutationen beeinträchtigt sein sollte. Die Komplex I-Aktivität zeigte sich bei den homozygot-mutanten Zellen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt und betrug nur etwa 10 bzw. 17% der normalen Aktivität (Abbildung 33A). Bei den heterozygoten Zellen war die Komplex I-Aktivität ebenfalls vermindert, betrug aber immerhin noch 70 bzw. 81% der Wildtyp-Aktivität. Mit der Cytochrom c Oxidase (Cox)-Aktivität (Komplex IV) als Referenz ergab sich ein ähnliches Bild mit durchschnittlich 12 bzw. 56% Komplex I-Aktivität bei *Ndufv1*^{mut/mut}- bzw. *Ndufv1*^{+/-mut}-Zellen (Abbildung 33B). Die Aktivitätsmessungen des Komplexes IV ließen hingegen keine einheitlichen Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne Mutationen erkennen (Abbildung 33C). Die beiden heterozygoten Zelllinien und eine der homozygot-mutanten Linien (mut/mut (#5)) wiesen lediglich eine leichte Erhöhung der Komplex IV-Aktivität auf, anhand derer man eine kompensatorische Erhöhung der Komplex IV-Aktivität, infolge des vorliegenden Komplex I-Mangels in den Zellen, vermuten könnte. Die zweite homozygot-mutante Zelllinie zeigte jedoch gegenüber den Wildtyp-Zellen keine Erhöhung der Komplex IV-Aktivität.

Die Mutationen in *Ndufv1* führen also auf mitochondrialer Ebene zu einem ausgeprägten Komplex I-Mangel, wobei dessen Ausmaß von der *Ndufv1*-Dosis abhängig sein muss, da auch die heterozygoten Zellen eine erniedrigte Enzymaktivität aufwiesen. Zudem verursacht der Funktionsverlust des *Ndufv1*-Proteins scheinbar keine parallele Aktivitätsminderung der anderen Atmungskettenkomplexe, was an dieser Stelle zumindest für die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) gezeigt werden konnte.

Die erhaltenen Ergebnisse spiegeln jedoch lediglich die maximalen Enzymaktivitäten der untersuchten Komplexe wider. Sie wurden anhand isolierter Mitochondrien ermittelt, d.h. unter Bedingungen, die nicht dem physiologischen, zytosolischen Milieu entsprechen, in welchem die Mitochondrien natürlicherweise vorkommen. Ob der Funktionsverlust des *Ndufv1*-Proteins auch in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen selbst, unter annähernd physiologischen Bedingungen, einen isolierten Komplex I-Mangel hervorruft, sollte mittels polarographischer Messungen der Atmungskettenaktivitäten verifiziert werden. Die verwendete Methode nutzt die Kopplung mitochondrialer ATP-Produktion und aerober Atmung, um die Effizienz des oxidativen Phosphorylierungsprozesses anhand des Sauerstoffverbrauchs der Zellen zu

Ergebnisse

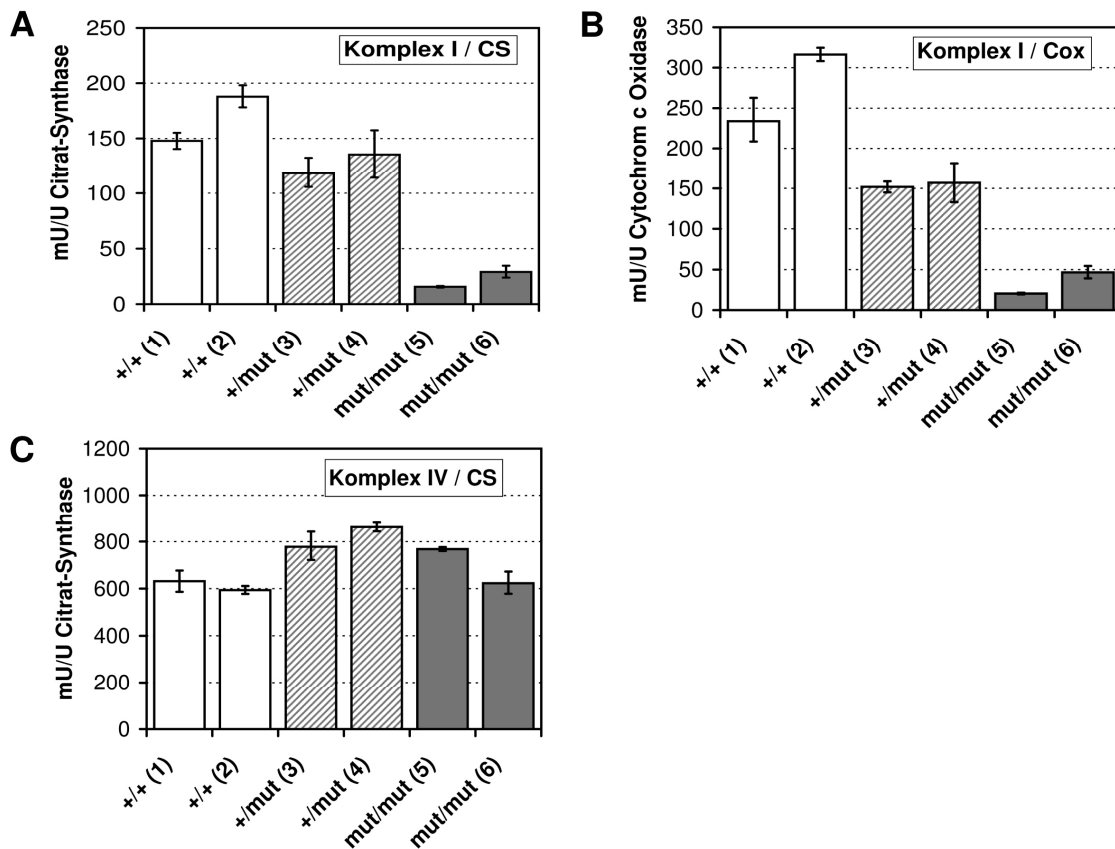


Abbildung 33: Spektrophotometrisch bestimmte Komplex I- und IV-Aktivitäten in isolierten Mitochondrien von MEFs der Genotypen *Ndufv1*^{+/+}, *Ndufv1*^{+/-mut}, *Ndufv1*^{mut/mut}. (A+B) Die Aktivität des Komplexes I ist in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen sowohl in Bezug auf die Aktivität der Citrat-Synthase (CS), als auch in Bezug auf die Aktivität des Komplexes IV (Cox) deutlich erniedrigt. Eine verminderte Komplex I-Aktivität findet sich auch in den heterozygoten *Ndufv1*^{+/-mut}-Zellen. (C) Im Vergleich zum Wildtyp ist die Komplex IV-Aktivität in einer *Ndufv1*^{mut/mut}-Zelllinie (mut/mut (#5)) als auch in beiden *Ndufv1*^{+/-mut}-Linien leicht erhöht. Die Abweichungsbalken zeigen das 99% Konfidenzintervall, das sich aus der Streuung der gemessenen Probenwerte errechnet. Signifikanzen wurden aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten pro Zelllinie und Komplexaktivität (n=2) nicht berechnet.

bestimmen.¹⁷⁰ Durch die Zugabe spezifischer Substrate und Inhibitoren der Komplexe I, II und IV zu den Zellen, ist zudem die Identifizierung funktionell beeinträchtigter Einzelkomplexe innerhalb eines Messvorgangs möglich.^{150, 171} Die Zugabe der Substrate Malat und Glutamat initiiert in den Zellen die Komplex I-abhängige oxidative Phosphorylierung (über die Komplexe I, III und IV), welche durch den Komplex I-Inhibitor Rotenon hochspezifisch gehemmt wird (Reaktion I). Im zweiten Schritt initiieren Succinat und Glycerol-3-Phosphat die Komplex II/III-abhängige oxidative Phosphorylierung (über die Komplexe II, III und IV), die nun unabhängig der Komplex I-Aktivität erfolgt (Reaktion II). Nachdem der Komplex III durch Antimycin A inhibiert wurde, wird die Komplex IV-abhängige mitochondriale Atmung schließlich durch die Zugabe von Ascorbat und TMPD gestartet und durch den Komplex IV-Inhibitor KCN wieder gehemmt (Reaktion III). Die Abbildung 34 zeigt beispielhaft die Sauerstoffverbrauchskurven von je zwei Messungen der Zelllinien +/-mut (#3) (rot und blau) und mut/mut (#5) (orange und grün).

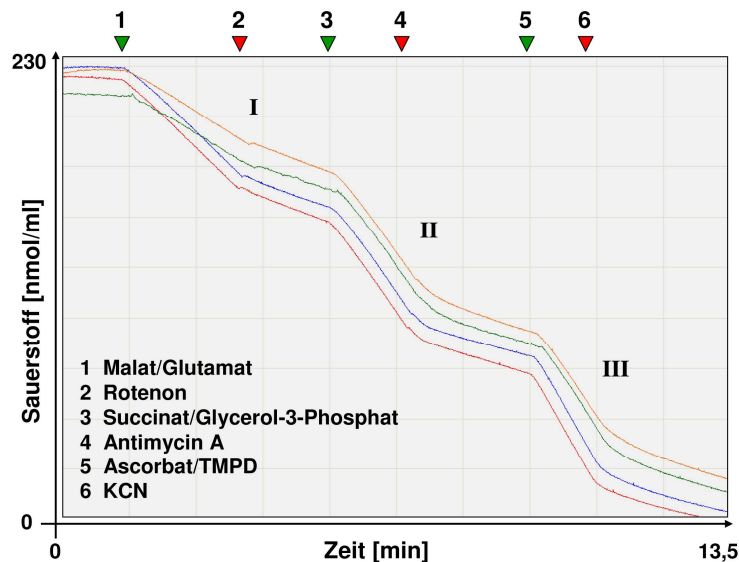


Abbildung 34: Polarographisch bestimmte Sauerstoffverbrauchskurven der Zelllinien +/-mut (#3) (rot + blau) und mut/mut (#5) (orange + grün) nach Zugabe spezifischer Substrate (grüne Pfeile) und Inhibitoren (rote Pfeile) der einzelnen Atmungskettenkomplexe. In der Reaktion I ist bei den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen ein flacherer Abfall der Sauerstoffverbrauchskurven zu erkennen als bei den *Ndufv1*^{+/mut}-Zellen. Dies kennzeichnet eine geringere Komplex I-abhängige Atmungseffizienz der *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen. Der parallele Verlauf aller vier Kurven über die Reaktionen II und III spricht für eine annähernd gleiche Komplex II/III-abhängige und Komplex IV-abhängige mitochondriale Atmung in beiden Zelllinien.

Die polarographischen Messungen sollten ebenfalls anhand der sechs zuvor ausgewählten Zelllinien (+/+ (#1) und (#2); +/-mut (#3) und (#4); mut/mut (#5) und (#6)) erfolgen. Aus technischen Gründen war es jedoch nicht möglich, die Zelllinie +/+ (#1) polarographisch zu analysieren, so dass Vergleichswerte nur anhand einer Wildtyp-Zelllinie ermittelt werden konnten. Für jede Messung wurden etwa $2-8 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Um bei der Datenauswertung den zwischen den Messproben variierenden Faktor der Zellzahl vernachlässigen zu können, wurde der Sauerstoffverbrauch der einzelnen Reaktionsschritte einer Messung im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch eines anderen Reaktionsschritts derselben Messung betrachtet. Ausgehend von der Vermutung, dass die *Ndufv1*-Mutationen nur die Aktivität des Komplexes I einschränken, sollten die Sauerstoffverbrauch-Ratios Reaktion I/Reaktion II, sowie Reaktion I/Reaktion III zumindest in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen vermindert sein. Dagegen sollten die Sauerstoffverbrauch-Ratios Reaktion II/Reaktion III in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen gegenüber dem Wildtyp keine Erniedrigung aufweisen, da beide Reaktionen unabhängig von der Komplex I-Aktivität ablaufen. Die Ergebnisse der Messungen zeigen, sowohl in den *Ndufv1*^{+/mut}- als auch in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen gegenüber dem Wildtyp, einen signifikant ($p < 0,05$) verringerten Sauerstoffverbrauch in der Reaktion I, jedoch nicht in den Reaktionen II und III (Abbildung 35). Dies spricht für einen isolierten Komplex I-Mangel infolge der Dysfunktion der *Ndufv1*-Untereinheit. Das war besonders in der Zelllinie mut/mut (#5) zu erkennen (Abbildung 35A und B). Im Gegenzug findet sich in den mut/mut (#5) Zellen auch der höchste Sauerstoffverbrauch in der Reaktion II (Abbildung 35C) mit ei-

Ergebnisse

ner signifikanten Erhöhung gegenüber dem Wildtyp. Dies würde die, anhand der spektrophotometrischen Analysen, aufgestellte Hypothese eines kompensatorischen Effekts in den Zellen unterstreichen. Dabei könnte dem, durch den Komplex I-Mangel verursachten, Energiemangel durch eine Steigerung der anderen Komplex-Aktivitäten entgegengewirkt werden. In der Zelllinie *mut/mut* (#6) ist der Sauerstoffverbrauch der Reaktion I ebenfalls signifikant geringer und der Sauerstoffverbrauch der Reaktion II deutlich höher als beim Wildtyp. Allerdings entsprechen die Werte überraschenderweise etwa denen der *Ndufv1^{+/mut}*-Zellen. Ein über die Norm erhöhter Sauerstoffverbrauch der Reaktion II ist in allen Zellen mit *Ndufv1*-Mutationen zu finden.

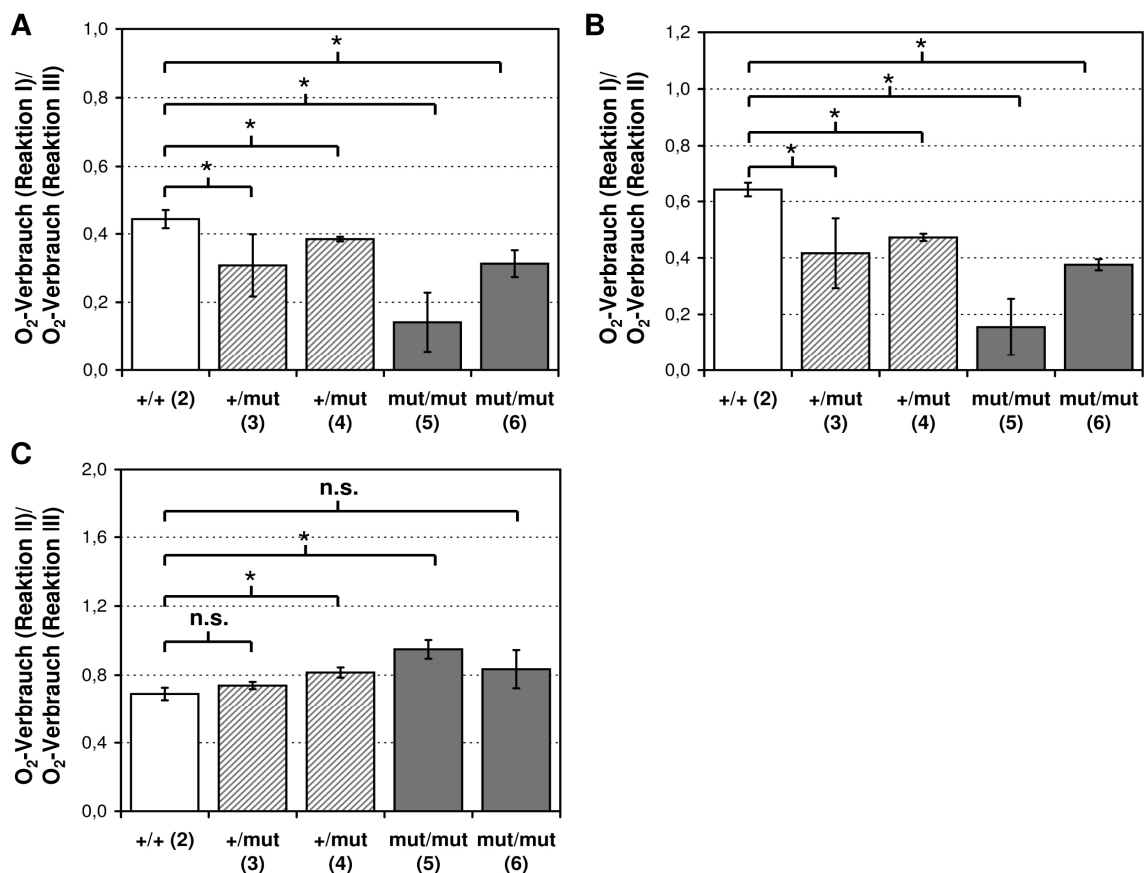


Abbildung 35: Ergebnisse der polarographischen Messungen an permeabilisierten MEFs der Genotypen *Ndufv1^{+/+}*, *Ndufv1^{+/mut}*, *Ndufv1^{mut/mut}*. (A+B) Die Sauerstoffverbrauch-Ratios Reaktion I/Reaktion III und Reaktion I/Reaktion II, welche die Komplex I-abhängige mitochondriale Atmung kennzeichnen, sind in den *Ndufv1^{+/mut}*- und *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen signifikant kleiner als beim Wildtyp. (C) Die erhöhten Ratios der Reaktion II/Reaktion III in den *Ndufv1^{+/mut}*- und *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen sprechen für eine Steigerung der Komplex II-Aktivität in beiden Zelllinien. SEMs sind angegeben. Die Signifikanzberechnungen erfolgten aufgrund der geringen Anzahl an Messungen pro Zelllinie (n=4) mittels nicht parametrischem Mann-Whitney-U-Test. *p<0,05; n.s., nicht signifikant.

Durch die polarographischen Messungen konnte ich einen isolierten Komplex I-Mangel in den mutanten Zelllinien bestätigen, auch wenn dieser in den einzelnen Zelllinien unterschiedliche Ausmaße annimmt. Die Aktivitätsminderung scheint jedoch unter annähernd physiolo-

gischen Bedingungen nicht so stark ausgeprägt, wie die spektrophotometrischen Messungen an isolierten Atmungskettenenzymkomplexen vermuten ließen.

4.3.6.4 Anaerobe Atmung in *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen als Antwort auf den Komplex I-Mangel

Da ich in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zelllinien einen isolierten Komplex I-Mangel als Folge der Funktionsstörung des *Ndufv1*-Proteins nachweisen konnte, eignen sich diese Zellen für zukünftige *in vitro* Untersuchungen zur Pathogenese des Komplex I-Mangels bzw. für Untersuchungen der Funktion des *Ndufv1*-Proteins. Um die Zellen zuvor noch besser zu charakterisieren, habe ich ihren Glukosemetabolismus eingehender untersucht. Obwohl die *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen eine erkennbare Störung der aeroben Atmungskapazität aufweisen, war ihre Wachstumsrate gegenüber *Ndufv1*^{+/+}- und *Ndufv1*^{+/mut}-Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen nicht eingeschränkt. Dies bedeutet, dass sie auf die alternative Strategie der Energiegewinnung über anaerobe Glykolyse ausweichen mussten. Bei diesem Stoffwechselweg wird normalerweise verstärkt Glukose verbraucht und Laktat als Stoffwechselendprodukt gebildet, was bei Patienten mit Mitochondriopathien häufig zu Laktatazidose, einem wegweisenden diagnostischen Kriterium dieser Erkrankungsgruppe, führt.¹⁷² Zur Bestimmung des Glukoseverbrauchs und der Laktatbildung in den kultivierten MEFs habe ich pro Zelllinie dreimal 200.000 Zellen in Zellkulturplatten ausgesät und nach 12, 24, 36 und 48 Stunden die Konzentrationen der beiden Metabolite im Medium gemessen. Wie erwartet, waren die Laktatproduktion und der Glukoseverbrauch über diese Zeit in den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen am höchsten (Abbildung 36). Aber auch die *Ndufv1*^{+/mut}-Zellen wiesen eine erhöhte Produktion an Laktat und einen verminderten Verbrauch an Glukose gegenüber den Wildtyp-Zellen auf.

4.3.6.5 mtDNA-Kopienzahl in *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen

Zur abschließenden Charakterisierung der *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen habe ich deren mtDNA-Kopienzahlen pro Zelle bestimmt. Wie die Studie der Patientin A in dieser Arbeit zeigt, beinhalten die Zellen verschiedener Gewebe eines Individuums unterschiedliche Mengen an mtDNA. Die Bestimmung der mtDNA-Kopienzahlen in den kultivierten MEFs könnte somit Hinweise dafür erbringen, ob in Abhängigkeit vom Genotyp und vom isolierten Komplex I-Mangel die mtDNA-Menge in den Zellen kompensatorisch erhöht wird. Wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben, wurde die mtDNA/gDNA-Kopienzahl in den Zellen mittels *real-time* qPCR des mitochondrialen Gens *mt-Co1* und des nukleär kodierten Gens *Ndufv1* ermittelt. Zwischen den sechs untersuchten Zelllinien zeigte sich eine starke Streuung der mtDNA-Kopienzahlen (Abbildung 37). Eine Tendenz der Werte in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Genotypen und des ermittelten Komplex I-Mangels war nicht zu erkennen. Folglich scheint die Menge an

Ergebnisse

mtDNA ein individueller Faktor der Zelllinien zu sein, der möglicherweise auf eine Zelltyp-spezifische Reaktion als Antwort auf einen Komplex I-Mangel zurückzuführen ist.

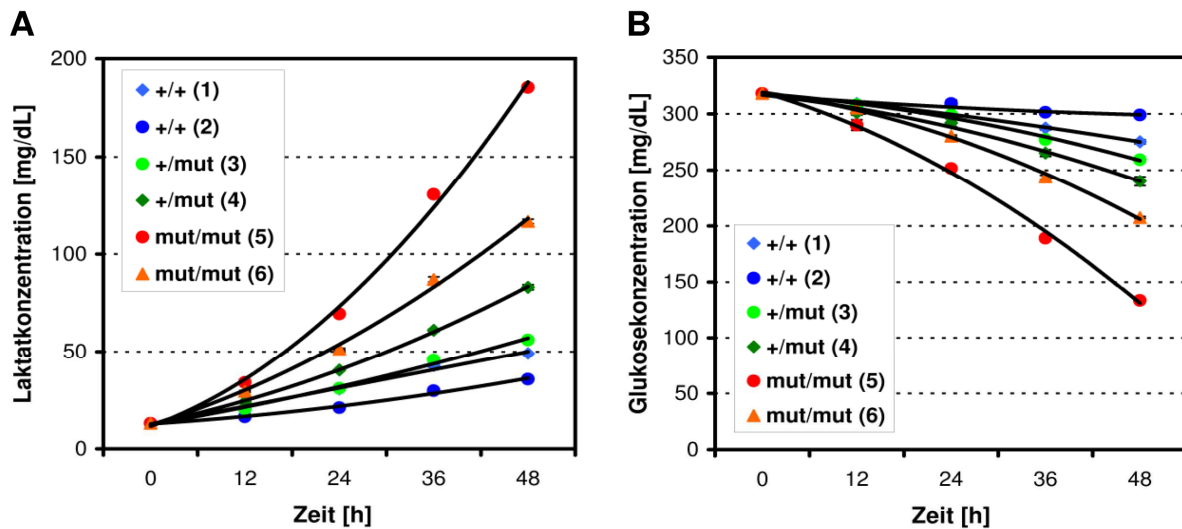


Abbildung 36: Erhöhte Laktatproduktion und verstärkter Glukoseverbrauch in *Ndufv1*-defizienten Zellen. (A) Die Laktatkonzentration nimmt im Medium der *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen am stärksten zu und ist bei den *Ndufv1*^{+/-mut}-Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen ebenfalls erhöht. (B) Im Gegenzug findet sich bei den *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen auch die stärkste Glukoseproduktion, während die *Ndufv1*^{+/-mut}-Zellen wiederum eine intermediäre Produktionsrate aufweisen. SEMs pro Zelllinie und Zeitpunkt sind angegeben (n=3), aber aufgrund der geringen Abweichungen nicht/kaum zu sehen. Aus Übersichtsgründen wurden die Konzentrationsverläufe mittels quadratischer Regressionskurven dargestellt.

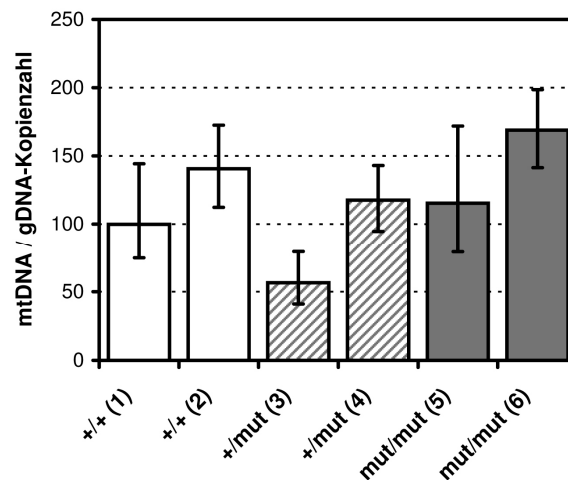


Abbildung 37: mtDNA-Kopienzahlen in MEFs der Genotypen *Ndufv1*^{+/+}, *Ndufv1*^{+/-mut} und *Ndufv1*^{mut/mut}. Zwischen den sechs Zelllinien ist keine klare Genotyp-spezifische Anhängigkeit der mtDNA-Kopienzahlen zu erkennen. Als Abweichungsbalken der Mittelwerte von je vier Messungen einer Probe sind die minimal und maximal gemessenen Verhältnisse von mtDNA- und gDNA-Kopien angegeben.

Zusammenfassend war es leider nicht möglich, ein lebendes *knock-in*-Mausmodell für den mitochondrialen Komplex I-Mangel zu etablieren. Dennoch konnte ich auf Zellebene nach-

weisen, dass homozygote Mutationen in der NADH-bindenden Untereinheit zu einer starken Reduktion der Komplex I-Aktivität führten. Diese ausgeprägte Aktivitätsminderung ist vermutlich auch der Grund für das massive Absterben betroffener Zellen *in vivo*, wie ich sie in den betroffenen Mausembryonen gefunden habe. *In vitro* sind die Zellen jedoch in der Lage den Komplex I-Mangel durch die Umstellung auf anaerobe Glykolyse zu kompensieren. Die beiden etablierten *Ndufv1*^{mut/mut}-Zelllinien können zukünftig für *in vitro*-Untersuchungen zur Pathogenese eines isolierten Komplex I-Mangels verwendet werden, wobei die Ergebnisse der Untersuchungen immer im Hinblick auf einen potentiell unterschiedlichen Ursprung der Zellen aus dem jeweiligen Embryo (verschiedene Keimblätter) betrachtet werden müssen.

5 Diskussion

5.1 Studie Patientin A

Bei Erkrankungen, die auf Mutationen in mitochondrialen Genen beruhen, sind in der Regel besonders das Nervensystem und die Muskulatur klinisch betroffen. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet sind die Ursachen dieser gewebsspezifischen Symptomatik bisher noch weitgehend ungeklärt. Die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen an 43 verschiedenen Gewebeproben der Patientin A ermöglichten mir die Identifizierung einiger gewebsspezifischer Faktoren, die im Zusammenhang mit der regionalen Pathologie bei der Patientin zu stehen scheinen. Die Ergebnisse dieser Studie liefern Hinweise auf zelluläre Mechanismen, welche zum einen spezifisch für das MERRF-Syndrom sind, aber möglicherweise auch allgemein für Mutationen der mtDNA gelten.

5.1.1 Interindividueller Schwellenwert für die Expression der *mt.tRNA^{Lys}*-Mutation m.8344A→G

Bei der Patientin A wurde aufgrund der Schlüsselsymptome „Myoklonusepilepsie“ und des Nachweises von *ragged-red fibers* in der Muskelbiopsie das MERRF-Syndrom diagnostiziert. Durch die Identifizierung der mtDNA-Mutation m.8344A→G im *mt.tRNA^{Lys}*-Gen der Patientin konnte diese Diagnose molekulargenetisch bestätigt werden. Der Heteroplasmiegrad der Mutation betrug im Blut der Patientin 96% (Stammbaum Abbildung 14; Person 3_2). Alle weiblichen Verwandten, die ebenfalls Träger der Mutation sind (Personen 2_2, 2_4, 3_1, 3_4 und 3_5), zeigen mit Heteroplasmiegraden zwischen 51 und 93% im Blut keine typischen neuromuskulären Symptome. Der kritische Schwellenwert der m.8344A→G Mutation zur Ausprägung einer neuromuskulären Symptomatik liegt in dieser Familie somit zwischen 93 und 96%. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien, in denen pathogene Schwellenwerte zwischen 73 und 98% im Blut oder Muskel von Patienten mit dieser MERRF-Mutation beschrieben wurden^{47,49,51,114} und verweist auf eine von der Gendosis abhängige klinische Ausprägung der Symptome. Der ebenfalls betroffene Neffe der Patientin (Person 4_1), der im Alter von 2 Jahren verstarb, wies eine Mutationslast von 100% der mtDNA-Allele auf. Homoplasmie der m.8344A→G Mutation galt lange Zeit als ein Zustand, der nicht mit dem Leben vereinbar schien, da die Aktivität des Atmungskettenkomplexes IV in kultivierten Muskelvorläuferzellen (Myotuben) mit 100% betroffenen mtDNA-Allelen massiv herabgesetzt war.¹¹⁷ In den letzten Jahren gab es dennoch zwei Fallstudien, in denen Patienten mit m.8344A→G Homoplasmie beschrieben wurden.^{173, 174} Allerdings sind beide Ergebnisse bezüglich ihrer Genauigkeit nicht sicher, da keine Angaben über die verwendeten Methoden

zur Identifizierung der Homoplasmie gemacht wurden. Nur wenige Techniken sind in der Lage, Allel-Frequenzen $\leq 1\%$ zu detektieren. Mit der Pyrosequenzierung ist dies jedoch möglich^{155, 175} und anhand der Regressionsanalyse konnte ich diese Genauigkeit auch für das in dieser Studie verwendete Primerset nachweisen. Nach meinem Kenntnisstand ist der Neffe der Patientin A somit der erste Fall, bei dem Homoplasmie der m.8344A→G Mutation quantitativ im Blut nachgewiesen wurde. In anderen, nicht untersuchten Organen des Jungen könnten jedoch noch geringe Mengen an Wildtyp-mtDNA-Allelen vorgelegen haben, die ihm ein Überleben bis zum zweiten Lebensjahr ermöglichten.

Die Ergebnisse der Heteroplasmiebestimmung in der Familie der Patientin A zeigten weitere Übereinstimmungen mit Erkenntnissen früherer Studien zum MERRF-Syndrom. Sowohl das Manifestationsalter der klinisch Betroffenen als auch der Schweregrad der Erkrankung korrelierten mit dem Heteroplasmiegrad der m.8344A→G Mutation. Während bei der Patientin A, mit einer Mutationslast von 96%, erste Symptome im Alter von 4 Jahren auftraten und sie 16 Jahre alt wurde, entwickelte ihr Neffe, mit einer Mutationslast von 100% bereits mit 9 Monaten erste deutliche Krankheitszeichen und verstarb bereits im Kleinkindalter. Obwohl bei Mitochondriopathien im Allgemeinen keine klaren Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu finden sind, wurde diese Tendenz beim MERRF-Syndrom bereits mehrfach nachgewiesen^{51,114,176, 177} und ist ein wichtiger Faktor für die Prognose des Krankheitsverlaufs. In den gleichen Studien zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zur Akkumulation mutanter mtDNA-Allele von einer Generation zur nächsten.^{51,114,176,177} Wie auch in der vorliegenden MERRF-Familie zu erkennen ist, weisen die Kinder von Müttern mit einem hohen Heteroplasmiegrad (>40%) der Mutation oft eine noch höhere Mutationslast als ihre Mütter auf. Sanger *et al.* (1996) vermuten als Ursache eine altersabhängige Zunahme mutanter mtDNA-Moleküle in den mütterlichen Oozyten, die dann an die Kinder weitergegeben werden.¹⁷⁷ Diese Vermutung basiert auf den Annahmen einer fortlaufenden mtDNA-Replikation in Oozyten und eines selektiven Vorteils mutanter mtDNA-Moleküle in mitotisch inaktiven Zellen. Chinnery *et al.* (1998) zeigten weiterhin, dass mit zunehmender Mutationslast (>40%) bei Frauen das Risiko, klinisch betroffene Kinder zu haben, stark ansteigt und ein Maximum von 78% bei Heteroplasmiegraden oberhalb von 80% erreicht.¹⁷⁸ Mit diesen Erkenntnissen ist die Risikoabschätzung in einer genetischen Beratung der betroffenen Frauen besser möglich als bei vielen anderen mitochondrialen Erkrankungen.

5.1.2 Die regionale Pathologie des MERRF-Syndroms kann nicht durch einen gewebsspezifischen mtDNA-Heteroplasmiegrad erklärt werden

Wesentlich bedeutender als die Familienanalyse waren für mich die Untersuchungen der 43 Proben verschiedener Gewebe der Patientin A, da es bisher keine Studien zur regionalen

Pathologie mit vergleichbarem Probenumfang gab. Einen überraschenden Befund lieferte zunächst die histologische Untersuchung verschiedener Muskeln der Patientin. Die progressive Belastungsintoleranz der Patientin wies auf eine Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur hin, was durch den Nachweis der *ragged-red fibers* bestätigt wurde. Hingegen zeigte die Patientin keinerlei Auffälligkeiten der Augenmotilität, obwohl die Biopsie aus dem *Musculus rectus superior oculi* (oberer gerader Augenmuskel) die stärkste Ausprägung an *ragged-red fibers* aufwies. Zum Nachweis dieser degenerierten Muskelfasern bei MERRF-Patienten werden in der Regel Biopsate der Oberarm- oder Oberschenkelmuskulatur verwendet,^{117,179,180} weshalb ich keine Vergleichsstudien von *ragged-red fibers* in der Augenmuskulatur finden konnte. Die Ursache für die fehlende pathologische Augensymptomatik bei der Patientin A liegt möglicherweise in der spezifischen Physiologie der Augenmuskeln. Obwohl sie zu den Skelettmuskeln zählen, sind die individuellen motorischen Einheiten (Motoneuron und innervierte Muskelfasern) der Augenmuskulatur um das 200fache kleiner als zum Beispiel beim Oberschenkelmuskel.¹⁸¹ Dadurch müsste das Verhältnis von intakten zu von *ragged-red fibers* geschädigten Einheiten erheblich größer sein, als bei den anderen Skelettmuskeln, was vielleicht zum längeren Erhalt der Augenmotilität bei der Patientin beigetragen haben könnte. Diese Überlegungen erklären jedoch nicht unbedingt die Muskelsymptomatik anderer mitochondrialer Erkrankungen. Bei der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO), welche durch größere mtDNA-Deletionen oder Punktmutationen in mt.tRNA-Genen verursacht werden kann^{182, 183} und häufig mit *ragged-red fibers* in der Skelettmuskulatur assoziiert ist, ist z.B. die Augenmuskulatur primär betroffen (externe Ophthalmoplegie und Ptosis).^{183, 184}

Lange Zeit vermutete man, dass die regionale Pathologie der Mitochondriopathien durch unterschiedliche Heteroplasmiegrade in den Geweben verursacht sein könnte.^{111, 185} Mit der quantitativen Analyse der Heteroplasmie in den 43 verschiedenen Geweben der Patientin A wollte ich überprüfen, ob diese Vermutung zutrifft. Bisher gab es nur wenige Studien, die eine solche Assoziation in anderen Geweben als Blut, Muskeln und Haarwurzeln untersucht haben.^{176,177,186-188} Die Ergebnisse dieser Studien decken sich mit den Resultaten meiner Untersuchungen. Diese besagen, dass es keine Beziehung zwischen den klinischen Symptomen einzelner Gewebe und dem Grad ihrer Heteroplasmie gibt. In allen Geweben der Patientin A zeigte sich eine einheitliche Verteilung m.8344A→G Heteroplasmie zwischen 89 und 100%, ohne Präferenz für einen speziellen Gewebetyp. Daher musste der pathogene Schwellenwert der m.8344A→G Mutation in einigen Gehirnregionen und Muskeln geringer sein als in anderen Geweben. Als Ursachen dieser ungleichen Suszeptibilität wären Unterschiede in der intrazellulären Verteilung mutanter mtDNA-Moleküle denkbar oder auch der Einfluss zelltypspezifischer Faktoren, welche den mutationsbedingten klinischen Phänotyp beeinflussen können. Hinweise auf den Einfluss nukleärer Faktoren auf die Ausprägung mi-

tochondrialer Mutationen lieferte die Studie von Hudson *et al.* (2005) an LHON-Patienten.¹⁸⁹ Sie identifizierten einen *high risk* Haplotype in einer X-chromosomalen Region, der mit der klinischen Ausprägung der zugrunde liegenden mtDNA-Mutationen assoziiert war und die variable Penetranz sowie den geschlechtsspezifischen Charakter der LHON-Erkrankung (Abschnitt 1.2) erklärbar macht. Andere, möglicherweise gewebsabhängig exprimierte nukleäre Faktoren wären somit als Ursache der regionalen Pathologie des MERRF-Syndroms oder weiterer Mitochondriopathien denkbar. Die Identifizierung solch ursächlicher Faktoren ist aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten und des komplexen zellulären Gefüges sehr schwierig. Die gewebspezifische Analyse der mtDNA-Kopienzahlen, der mitochondrialen Masse und der Menge mitochondrialer Struktur- und Regulatorproteine in meiner Studie hat jedoch zumindest Hinweise auf potentiell zugrunde liegende Mechanismen liefern können, die mit einer regionalen Pathologie einhergehen. Wie die Abbildung 38 verdeutlicht, ist das koordinierte Zusammenspiel der untersuchten Faktoren essentiell für die normale Biogenese der Mitochondrien.

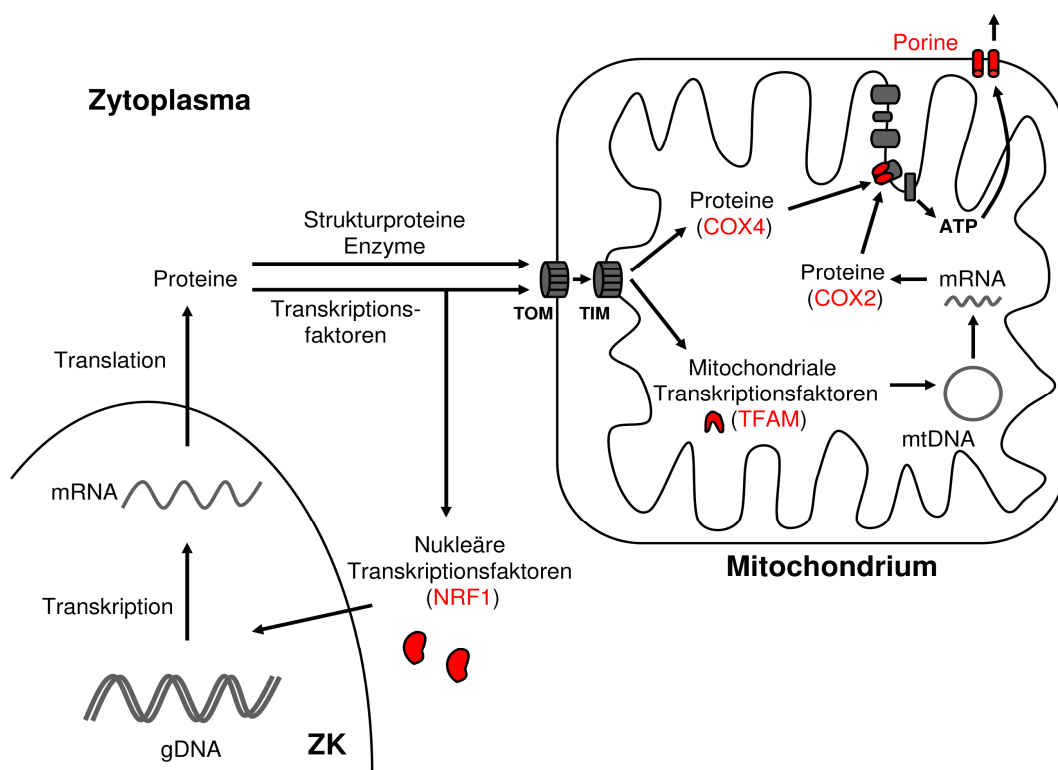


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Signal- und Transportwege der Mitochondrienbiogenese. Die in der Studie der Patientin A untersuchten Faktoren sind rot dargestellt. ZK, Zellkern; TFAM, mitochondrialer Transkriptionsfaktor A; NRF1, nukleärer respiratorischer Faktor 1; COX, Cytochrom c Oxidase; TOM, *translocase of the outer mitochondrial membrane*; TIM, *translocase of the inner mitochondrial membrane*.

5.1.3 Die regionale Pathologie des MERRF-Syndroms ist mit gewebsspezifischen mtDNA-Kopienzahlen assoziiert

Da der Heteroplasmiegrad in den Geweben der Patientin A die klinische, regionale Pathologie in den Skelettmuskeln und spezifischen Gehirnarealen *per se* nicht erklärt, wäre es denkbar, dass der Heteroplasmiegrad in Bezug auf die mtDNA-Kopienzahl in den einzelnen Geweben Hinweise auf zelluläre Mechanismen liefern kann, die an der Ausprägung einer gewebsspezifischen Symptomatik beteiligt sind. Eine höhere mtDNA-Kopienzahl pro Zelle sollte bei gleichem Heteroplasmiegrad in einer höheren absoluten Anzahl „restlicher“ Wildtyp-Kopien resultieren, welche möglicherweise noch in der Lage sein könnten, den mutationsbedingten mitochondrialen Defekt zu kompensieren.

In der Literatur wurde mehrfach gezeigt, dass Abweichungen der mtDNA-Kopienzahlen krankheitsassoziiert sein können. Die Depletion der mtDNA aufgrund verminderter Synthese oder übermäßigem Abbau ist z.B. mit einer frühkindlichen neurologischen Erkrankung assoziiert (*Mitochondrial Depletion Syndrome*), die durch Muskelschwäche, Hypotonie und Entwicklungsverzögerungen gekennzeichnet ist.¹⁹⁰ Bei Patienten mit Multipler Sklerose wurden variable mtDNA-Mengen im Gehirn nachgewiesen.¹⁹¹ Eine Verminderung der gewebsspezifischen mtDNA-Menge findet sich auch in Verbindung mit Diabetes Typ 2,¹⁹² Erkrankungen der Leber²⁴ und Kardiomyopathie.¹⁹³ Erhöhte mtDNA-Kopienzahlen sind im Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen weniger verbreitet, stehen aber in offensichtlichem Zusammenhang mit verstärktem oxidativen Stress in Zellen. Dies wurde zumindest im Zuge des Alterungsprozesses im menschlichen Gehirn,¹⁹⁴ in der Lunge¹⁹⁵ und im Skelettmuskel¹⁹⁶ nachgewiesen. Lee und Wei (2000) haben die Vermutung aufgestellt, dass die Erhöhung der mtDNA-Kopienzahlen in alternden Geweben Teil einer kompensatorischen Antwort auf eine zunehmend verminderte Atmungskettenfunktion oder auf eine zunehmende Anzahl mutierter mtDNA-Moleküle sein könnte.¹⁹⁷

In meiner Studie zeigten mir zunächst die Ergebnisse der Quantifizierung der mtDNA/gDNA-Kopienzahlen in den 42 Geweben der Kontrollindividuen und in den untersuchten Mausgeweben, dass verschiedene Gewebe schon natürlicherweise sehr unterschiedliche mtDNA-Kopienzahlen aufweisen. Beide Organismen enthalten die meisten mtDNA-Kopien vornehmlich in den Skelettmuskeln, dem Herzen und dem Großhirn, d.h. Organen mit einem sehr hohen aeroben Energiebedarf. Bei Säugern scheint es somit eine generelle Beziehung zwischen der mtDNA-Menge und dem zellulären Energiebedarf zu geben.

Die im Gegensatz zur Maus beim Menschen nachgewiesenen hohen mtDNA-Kopienzahlen in der Niere und der Leber, welche eine große Schwankungsbreite zwischen den vier Kontrollindividuen zeigten, könnten auf einen starken, individuell variablen mtDNA-Umsatz (Verhältnis von Synthese und Degradation) in beiden Geweben hinweisen. Gross *et al.* (1969) untersuchten die mtDNA-Umsatzraten in verschiedenen Geweben von Ratten mit Hilfe von

pulse chase-Experimenten, bei denen sie den Umsatz von ^3H -Methylthymidine in der mtDNA bestimmt haben.¹⁹⁸ Anhand ihrer Untersuchungen ermittelten sie deutlich höhere mtDNA-Umsatzraten in den Lebern und Nieren der Tiere als in deren Gehirnen. Dieser erhöhte mtDNA-Umsatz in den beiden Organen basiert möglicherweise auf der metabolischen Funktion der Leber und der Niere als Entsorger giftiger Stoffe und könnte in Abhängigkeit bestimmter Lebens- und Ernährungsgewohnheiten variieren.

Die Quantifizierung der mtDNA/gDNA-Kopienzahlen in den Geweben der Patientin A führte zu zwei wichtigen Erkenntnissen. Zum einen zeigte sich eine Korrelation zwischen dem klinischen Phänotyp der Gewebe und der Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen. Entgegen meiner ursprünglichen Vermutung waren die mtDNA-Kopienzahlen jedoch nicht in den symptomfreien, sondern in den klinisch betroffenen Geweben (Muskeln, *Putamen*, *Hippocampus* und *Nucleus caudatus*) im Vergleich zu den Kontrollen besonders stark erhöht. Zum zweiten machten die Ergebnisse deutlich, dass die mit der Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen einhergehende Erhöhung der „restlichen“ WT-Kopien in den betroffenen Geweben, ihnen offensichtlich keinen Vorteil zur Kompensation des mutationsbedingten mitochondrialen Defekts verschaffen konnte. In den Skelettmuskeln fanden sich durch die Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen noch etwa 7-10% der Wildtyp-Mengen, die ich in den Kontrollgeweben nachweisen konnte. Boulet *et al.* (1992) haben in kultivierten Muskelzellen, welche die m.8344A→G Mutation heteroplasmisch trugen, festgestellt, dass etwa 15% Wildtyp-mtDNA-Kopien zur Aufrechterhaltung einer nahezu normalen mitochondrialen Translation und Komplex IV-Aktivität benötigt werden.¹¹⁷ Falls dieses Erkenntnis auf native Muskeln übertragbar ist, wäre dies eine Erklärung für die klinische Symptomatik der Skelettmuskeln der Patientin. Da ihr Augenmuskel immerhin noch 18% der normalen Wildtyp-Kopienzahlen aufwies, könnte dies zudem ein weiteres Argument für dessen uneingeschränkte Funktionalität bei der Patientin sein. Verglichen mit anderen Organen enthalten die symptomatischen Gehirnregionen (*Putamen*, *Nucleus caudatus*, *Hippocampus*) der Patientin durch die Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen noch die meisten Wildtyp-Kopien mit 20 bis 40% der Normalwerte. Dementsprechend scheint das zur Aufrechterhaltung eines normalen mitochondrialen Energiestoffwechsels essentielle Minimum an Wildtyp-mtDNA-Kopien in den klinisch betroffenen Gehirnregionen der Patientin deutlich höher zu sein, als dies von Boulet *et al.* für kultivierte Muskelzellen gezeigte.

In ihrer Gesamtheit betrachtet, zeigen die Ergebnisse der mtDNA-Quantifizierung, dass die Erhöhung der mtDNA-Kopienzahlen und damit verbunden die Erhöhung der Wildtyp-mtDNA-Menge, zumindest beim MERRF-Syndrom, ein zelltypspezifischer Mechanismus ist. Dieser schützt jedoch nicht bestimmte Gewebe vor der Ausprägung eines klinischen Phänotyps, sondern ist vielmehr in den klinisch betroffenen Geweben selbst zu finden. Die Zunahme der mtDNA-Kopienzahl ist, offenbar in Abhängigkeit vom aeroben Energiebedarf der Zellen, in

den einzelnen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt und dient den Zellen wahrscheinlich als (vergeblicher?) Versuch, den mitochondrialen Defekt zu kompensieren. Ob diese Erkenntnisse jedoch auch auf andere Mitochondriopathien zutreffen, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

5.1.4 Gewebsspezifische Unterschiede in der Regulation der Mitochondrienbiogenese als Ursache der regionalen Pathologie?

Auch der Nachweis erhöhter mtDNA-Kopienzahlen in den verschiedenen Geweben der Patientin A konnte nicht erklären, aufgrund welcher zellulärer Mechanismen bestimmte Gehirnareale und die Muskeln in der Regel anfälliger für die Ausprägung von Symptomen sind als andere Gewebe. Aus diesem Grund habe ich weitere Faktoren in den Geweben betrachtet, die im Zusammenhang mit der Biogenese der Mitochondrien stehen und somit potentiell in gewebsspezifische Regulationsmechanismen als Antwort auf mitochondriale Defekte involviert sein können (Abbildung 38). Die Quantifizierung der mitochondrialen Masse (*via* Porin-Protein), der Transkriptionsfaktoren TFAM und NFR1 sowie der mitochondrialen Strukturproteine COX2 und COX4 ergab für die untersuchten Gewebe sehr unterschiedliche Befunde, weshalb ich diese im Folgenden teilweise unabhängig voneinander diskutieren muss.

In den Muskeln der Patienten mit MERRF-Syndrom, CPEO oder dem Kearns-Sayre-Syndrom sind häufig *ragged-red fibers* zu finden, welche aus einer übermäßigen Proliferation abnormer Mitochondrien und deren subsarkolemmaler Anhäufung resultieren. Diese verstärkte Mitochondrienproliferation zeigte sich auch bei der Untersuchung der mitochondrialen Masse in den Geweben der Patientin A mittels Western-Blot-Analyse und steht im Einklang mit der von mir nachgewiesenen Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen in den Skelettmuskeln der Patientin. Im Zuge eines Regulationsmechanismus zur Kompensation des mitochondrialen Defekts sollte man nun vermuten, dass weitere Faktoren, die im Zusammenhang mit der Mitochondrienbiogenese stehen, hochreguliert sind. Tatsächlich konnte ich zeigen, dass der mitochondriale Transkriptionsfaktor TFAM im Brustmuskel der Patientin verstärkt exprimiert wird. TFAM ist ein Schlüsselregulator der mtDNA-Kopienzahl, und in transgenen Mäusen, die *Tfam* in unterschiedlichen Mengen exprimieren, gibt es eine direkte Proportionalität zwischen der Menge an *Tfam*-Protein und mtDNA-Kopienzahlen.¹⁹⁹ Eine solche Beziehung fand sich auch im Brustmuskel der MERRF-Patientin. Im Vergleich zu den Kontrollgeweben habe ich hier sowohl eine etwa vierfach erhöhte Anzahl von mtDNA-Kopien als auch eine fast ebenso erhöhte Menge an TFAM-Protein gefunden. Die gleiche Mengenzunahme der mitochondrial kodierten Komplex IV-Untereinheit COX2 im Verhältnis zur nukleär kodierten Untereinheit COX4 verweist dabei auf die Funktionalität des hochregulierten TFAMs.

Für eine funktionelle Atmungskette ist die koordinierte und stöchiometrisch korrekte Anordnung der einzelnen Komplex-Untereinheiten essentiell. Ein Missverhältnis in der Expression zwischen COX2- und COX4-Protein im Muskel der Patientin A lässt daher schwerwiegende Probleme für die Biogenese der Mitochondrien vermuten und kennzeichnet möglicherweise ein generelles Missverhältnis von mitochondrial zu nukleär kodierten Untereinheiten im Muskel der Patientin. Mutationen in nukleär kodierten Komplex IV *Assembly*-Faktoren sind eine häufige Ursache mitochondrialer Erkrankungen, die wie das MERRF-Syndrom mit einer Komplex IV-Defizienz einhergehen.²⁰⁰ Einer dieser *Assembly*-Faktoren ist SURF1. Alle bisher publizierten Mutationen in diesem Gen führen zu einem vollständigen Verlust des SURF1-Proteins und damit verbunden zu einer massiven Reduktion des nativen Komplexes IV, während sich Subkomplex-Intermediate in den Mitochondrien akkumulieren.²⁰¹⁻²⁰³ Die Überexpression des COX2 im Muskel der Patientin A könnte dementsprechend auch ein Zeichen für eine Akkumulation dieses Proteins in deren Muskelmitochondrien sein. Eine Akkumulation einzelner oder mehrerer Atmungskettenuntereinheiten beeinträchtigt möglicherweise gewebsspezifisch die Gesamtkapazität der Atmungskettenfunktion, trotz verstärkter Mitochondrienbiogenese.

Diese Hypothese wurde durch die Befunde, die ich in meinen Untersuchungen an klinisch nicht betroffenen Gehirngeweben der Patientin erhalten habe, unterstützt. Hier zeigte sich zwar auch eine Zunahme der mitochondrialen Masse, was für eine verstärkte Mitochondrienproliferation spricht, aber es fand sich kein Missverhältnis zwischen mitochondrial und nukleär kodierten Komplex IV-Untereinheiten. Die balancierte, verstärkte Mitochondrienproliferation ist vielleicht einer der Gründe, warum diese Gewebe meist keine klinische Symptomatik entwickeln. Erstaunlicherweise gab es in den nicht betroffenen Gehirnregionen der Patientin parallel zur verstärkten Mitochondrienproliferation keine ebenso starke Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl. Eine Erklärung, warum diese Gewebe in der Lage sind, trotz der wenigen Wildtyp-mtDNA-Kopien ausreichend funktionelle mitochondriale Proteine zu synthetisieren und die Atmungskettenfunktion aufrechtzuerhalten, konnte ich durch meine Untersuchungen jedoch nicht finden.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen an den klinisch betroffenen Gehirnregionen der Patientin A lassen sich nicht mit den Muskelbefunden in Einklang bringen. Im *Putamen* und dem *Hippocampus* war eine massive Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen festzustellen. Eine parallele Erhöhung der mitochondrialen Masse, der Menge an Transkriptionsfaktoren oder spezifischen Strukturproteinen der Mitochondrien fand sich aber nicht. Diese scheinbar unabhängige Erhöhung der mtDNA-Kopienzahl könnte ein Hinweis auf einen unausgeglichene mtDNA-Umsatz in beiden Geweben sein. Der mtDNA-Umsatz ist, wie bereits erwähnt, im postmitotischen Gehirn der Ratte geringer als z.B. in deren Leber oder der Niere.¹⁹⁸ Während man aufgrund früherer Erkenntnisse eines koordinierten mtDNA-Umsatzes²⁰⁴

vermutete, dass dieser Prozess nur der Eliminierung geschädigter mtDNA-Kopien dient, fanden Kai *et al.* (2006) jedoch keine präferentielle Degradation geschädigter mtDNA-Moleküle.²⁰⁵ Sie nahmen an, dass bereits eine geringe Zellschädigung zum Anstieg der Synthese-/ Degradationsrate mitochondrialer DNA führen kann. Wie es jedoch in deren Verlauf zu einer Akkumulation der mtDNA-Menge in den Zellen kommt, ist bisher unklar. Regulationsstörungen des mtDNA-Umsatzes sind aber auch mit anderen neurologischen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson oder dem Morbus Alzheimer assoziiert,^{206, 207} und scheinen daher wichtige Ansatzpunkte zur Untersuchung neuronaler Schädigungen zu sein.

Zusammenfassend konnte ich in dieser Studie keine konsistenten Befunde erheben, welche die regionale Pathologie der Patientin A oder von Mitochondriopathien generell erklären würden. Allerdings konnte ich gewebsspezifische Veränderungen in den klinisch betroffenen und klinisch nicht betroffenen Geweben identifizieren, die in offensichtlichem Zusammenhang mit der regionalen Pathologie stehen. Dabei wurde deutlich, dass gewebsspezifische Mechanismen, die an der Regulation der Mitochondrienbiogenese und im Besonderen an der Regulation der mtDNA-Kopienzahl beteiligt sind, eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des klinischen Phänotyps spielen. Außerdem habe ich zeigen können, dass eine Hochregulierung der mtDNA-Kopienzahl nicht zwangsläufig mit einer Erhöhung der mitochondrialen Masse einhergeht. Beide Regulationsmechanismen scheinen in den Zellen zumindest teilweise unabhängig voneinander zu bestehen. Künftige Studien von Patienten und Tiermodellen mit mitochondrialen Defekten müssen nunmehr weitere Bausteine dieses komplexen Gefüges identifizieren, damit sich ein umfassendes Bild zur Pathologie von Mitochondriopathien ergeben kann, auf dessen Grundlage die Entwicklung neuer Verfahren zur Erhaltung gesunder Mitochondrien möglich sein wird.

5.2 Studie Patient B

Die phänotypische Variabilität „monogener“ Mitochondriopathien soll unter anderem durch nukleäre Einflussfaktoren bedingt sein. Der Fund einer nukleären *PAX6*-Mutation beim Patienten B, parallel zu einer mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Mutation, scheint diese Hypothese zu unterstützen. Ob jedoch tatsächlich beide Mutationen zur Ausprägung des Patientenphänotyps beigetragen haben, möchte ich hier diskutieren.

5.2.1 Doppelmutation in *PAX6* und *mt.tRNA^{Lys}* verursacht atypische Aniridie mit Mitochondriopathie

Der Patient B wurde klinisch mit einer ungewöhnlichen klinischen Symptomatik auffällig, die einerseits eine progressive Muskelschwäche mit Belastungsintoleranz und andererseits einen pathologisch differenzierten Augenphänotyp mit atypischer Aniridie, Katarakt, Nystagmus, Ptosis und Hornhautmissbildungen umfasste. Molekulargenetisch wurden bei dem jungen Mann der heteroplasmische Nukleotidaustausch m.8347A→G im mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Gen und eine heterozygote 16 bp-Deletion im Exon 10 des *PAX6*-Gens nachgewiesen. Beide DNA-Varianten wurden zuvor noch nicht beschrieben, könnten jedoch durch das gemeinsame Auftreten den klinischen Phänotyp erklären. Der ursächliche Anteil der *PAX6*-Mutation lässt sich dabei recht eindeutig belegen. Obwohl Aniridien, mit einer Populationshäufigkeit von etwa 1:60.000 bis 1:100.000, zu den selteneren Augenerkrankungen zählen,²⁰⁸ gibt es zahlreiche Publikationen über Aniridie-Patienten mit heterozygoten Mutationen in *PAX6*.²⁰⁸⁻²¹⁰ Der dominante Effekt der *PAX6*-Mutationen ist in diesen Fällen durch *PAX6*-Haploinsuffizienz hervorgerufen, was bedeutet, dass das jeweilig betroffene Allel nicht mehr funktionstüchtig ist und ein gesundes Allel zur Aufrechterhaltung der Genfunktion allein nicht ausreicht.²¹⁰⁻²¹² Heterozygote Aniridien sind darüber hinaus häufig mit anderen Störungen des Sehapparates, wie Sehschwäche, Katarakt, Nystagmus und Hornhauttrübung assoziiert,²¹³ die in dieser Form auch beim Patienten B zu finden waren.

PAX6 ist evolutionär konserviert und fungiert unter anderem bei vielen Spezies, von der Qualle bis hin zum Menschen, als Regulator der Augenentwicklung.²¹⁴ Die 16 bp-Deletion des Patienten B ist in einer der drei hoch konservierten Domänen von *PAX6* lokalisiert: in der C-terminalen PST-Domäne. Diese ist reich an Prolin, Serin und Threonin und ist der Teil des Proteins, welcher als starker Transkriptionsaktivator wirkt.²¹⁵ Wenngleich die kritischen Zielgene von *PAX6* noch nicht identifiziert sind, zeigten Singh *et al.* (1998), dass Mutationen, die zur Trunkierung der PST-Domäne führen, in transfizierten Zellen in einer herabgesetzten bis fehlenden Transaktivierungsaktivität des Proteins resultieren.²¹⁶ Die verkürzten Proteine agieren zudem dominant-negativ gegenüber dem Wildtyp-Protein, indem sie durch eine verstärkte DNA-Bindungskapazität die Bindung des Wildtyp-*PAX6* an die DNA blockieren. Die 16 bp-Deletion des Patienten B im N-terminalen Bereich der PST-Domäne, die eine Leserasterverschiebung zur Folge hat, führt erwartungsgemäß ebenfalls zu einem in der PST-Domäne trunkierten Protein. Daher ist der Augenbefund des Patienten B wahrscheinlich hauptsächlich auf eine Fehlfunktion des mutanten *PAX6*-Proteins zurückzuführen.

Von den 494 in der *Human PAX6 Allelic Variant Database* eingetragenen *PAX6*-Mutationen sind nur zwei mit einem Phänotyp assoziiert, der eine Axenfeld-Rieger-Anomalie einschließt. Beides sind *Missense*-Mutationen und betreffen die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (*paired domain*) des *PAX6*-Proteins. Somit ist der Patient B der erste Fall mit einer Axenfeld-

Rieger-Anomalie, bei dem die molekulare Ursache eine Leserasterverschiebung im C-Terminus des PAX6-Proteins ist.²¹⁷

Im Gegensatz zur *PAX6*-Mutation lässt sich die Pathogenität des mitochondrialen Nukleotidaustausches m.8347A→G hinsichtlich des Phänotyps des Patienten B schwerer beurteilen. Bisher gibt es keine Veröffentlichungen von *PAX6*-Mutationen in Assoziation mit progressiver Muskelschwäche. Da fortschreitende Muskelhypotonie jedoch ein charakteristisches Symptom von Patienten mit Mitochondriopathien ist, scheint der klinische Muskelphänotyp des Patienten durch die mitochondriale DNA-Variante verursacht zu sein. Ebenso legt die Ptosis, also die Lähmung oder Schwäche eines äußeren Augenmuskels, des Patienten einen Einfluss der mitochondrialen Mutation auf die klinische Symptomatik nahe. Eine *PAX6*-Funktionsstörung könnte zwar ebenfalls durch eine Fehlentwicklung der äußeren Augenmuskeln eine Ptosis hervorrufen,²¹⁸ da aber die Ptosis beim Patienten B noch nicht zur Geburt, sondern erst in der späteren Entwicklung parallel zur Belastungsintoleranz auftrat, spricht dies eher für eine „mitochondriale“ Ursache.

Zur Beurteilung der Pathogenität der mitochondrialen m.8347A→G Mutation betrachte ich diese im Folgenden hinsichtlich der „kanonischen“ Pathogenitätskriterien: Heteroplasmie, Konservierung, Häufigkeit in der Bevölkerung und funktionelle Bedeutung.⁵⁰

- 1)** Die *de novo* Mutation m.8347A→G wurde nur bei dem Patienten, dessen Symptomatik für eine mitochondriale Erkrankung (progressive Muskelschwäche und Ptosis sowie Belastungsintoleranz) spricht, gefunden, und die Mutation ist heteroplasmisch. Der Heteroplasmiegrad in den untersuchten Geweben beträgt jedoch nur zwischen 30 und 38%, was deutlich unterhalb des durchschnittlichen Schwellenwerts (>60%) für die klinische Ausprägung mitochondrialer Punktmutationen liegt.⁴⁹ Da die mtDNA-Mutation des Patienten in mehreren Geweben ekto- und mesodermalen Ursprungs nachweisbar war, müsste sie noch während der Oogenese oder in der frühen Embryogenese entstanden sein.
- 2)** Die evolutionäre Konservierung des Nukleotids nt8347 ist aufgrund unterschiedlicher Längen der TΨC-Schleife in verschiedenen Spezies schwer zu bestimmen. Dennoch kann anhand der durchgeführten CLUSTAL-Analyse eine Konservierung, zumindest bei Säugern, im Laufe der Evolution angenommen werden.
- 3)** In der *Human Mitochondrial Genome Database*, die auf Sequenzdaten von 2704 mitochondrialen Genomen basiert, werden zwei Fälle angegeben, in denen die mtDNA-Variante G8347 gefunden wurde. Dies würde bedeuten, dass diese Variante als seltener Polymorphismus in der Bevölkerung auftritt. Jedoch wurde auch das unzweifelhaft pathogene MERRF-Allel G8344 mit einer Häufigkeit von 1 auf 2704 normale mitochondriale Genome angegeben.
- 4)** Funktionell spielt die TΨC-Schleife der mitochondrialen tRNA^{Lys} eine wichtige Rolle bei der Codon-Erkennung und bei der Interaktion mit dem Elongationsfaktor EF-Tu.²¹⁹ Zurzeit sind drei weitere Mutationen (m.8342G→A, m.8344A→G und m.8348A→G) in der TΨC-Schleife bekannt, die Erkrankungen wie das klassische MERRF-Syndrom, progressive

externe Ophthalmoplegie oder isolierte Kardiomyopathie verursachen.⁶¹ In der Summe lassen die „kanonischen“ Kriterien offensichtlich keine eindeutige Beurteilung der Pathogenität der m.8347A→G Mutation beim Patienten B zu.

Der histologische Befund eines Muskelbiopsats und die biochemischen Messwerte der mitochondrialen Atmungsaktivitäten in kultivierten Fibroblasten des Patienten B waren weitgehend normal. Fehlende Genotyp-Phänotyp-Relationen stellen jedoch ein generelles Problem bei Mitochondriopathien dar. Da das Ausmaß der Ptosis beim Patienten keine Operation erforderte, bestand keine Möglichkeit die Atmungskettenaktivitäten in dem klinisch am stärksten betroffenen Lidhebermuskel des Auges zu messen, in dem der Heteroplasmiegrad der Mutation möglicherweise höher wäre als in den mir für Untersuchungen zur Verfügung stehenden Geweben. Darüber hinaus wurde für andere mitochondriale Erkrankungen gezeigt, dass der Schwellenwert der Heteroplasmie für die Ausprägung eines biochemischen Phänotyps höher liegen kann als der Schwellenwert für die Entwicklung einer klinischen Symptomatik.²²⁰ Eine solche Diskrepanz konnte in meiner Arbeitsgruppe auch bei symptomatischen MERRF-Patienten mit der m.8344A→G Mutation nachgewiesen werden. Die Atmungskettenaktivitäten im Muskelbiopsat eines MERRF-Patienten lagen trotz einer hohen Heteroplasmie von 87% im Normalbereich und sogar oberhalb der Aktivitäten, die bei einem Patienten mit nur 40% Heteroplasmie gemessen wurden (Daten nicht gezeigt).

In Abwägung aller Argumente für bzw. gegen den Anteil der *PAX6*-Deletion und der mitochondrialen Mutation m.8344A→G am Phänotyp des Patienten B scheint die *PAX6*-Mutation die Hauptursache seiner klinischen Symptomatik zu sein. Sehr wahrscheinlich hat die mitochondriale Punktmutation jedoch zumindest einen modifizierenden Einfluss auf den „*PAX6*“-Phänotyp. Ich kann jedoch nicht mit Gewissheit ausschließen, dass der mitochondriale Nucleotid austausch nur einen sehr seltenen Polymorphismus darstellt und der Patientenphänotyp ausschließlich auf der Mutation im *PAX6*-Gen beruht.

5.2.2 Wahrscheinlichkeit der parallelen Entstehung der nukleären *PAX6*-Mutation und der mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Mutation

Das parallele Auftreten der beiden *de novo* Mutationen beim Patienten B wirft die Frage auf, ob ihre gleichzeitige Entstehung bloßer Zufall ist, oder ob es einen Zusammenhang zwischen den Mutationen geben könnte. Zu deren Beantwortung ist es zunächst wichtig, die *PAX6*-Mutationsrate zu kennen. Eine Berechnung der Mutationsraten nukleär kodierter Gene ist über die Formel $\mu = q \times S$ möglich, wobei q die Häufigkeit des mutanten Allels und S den Selektionskoeffizienten angibt. Für die Berechnung der Mutationsrate von *PAX6* kann man die Assoziation von Aniridien und *PAX6*-Mutationen nutzen. Wenn man davon ausgeht, dass Aniridien, die mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 1:75.000 (entspricht q bei autosom-

mal-dominanten Erkrankungen) vorkommen, ausschließlich durch *PAX6*-Mutationen verursacht werden und ein Selektionsnachteil betroffener Patienten von ~20% ($S = 1/5$) für Aniridie-Patienten angenommen wird, ergibt sich für die Mutationsrate von *PAX6* (μ) folgende Berechnung: $\mu = q \times S \approx 3,00 \times 10^{-6}$ Mutationen/Generation.²²¹ Für *de novo* Nukleotidsubstitutionen in der mtDNA ist unter Ausschluss von Selektion in der Literatur eine Mutations-/Fixierungsrate von $19,21 \times 10^{-6}$ Mutationen/Nukleotid/Generation angegeben.²²² Damit ergibt sich eine *de novo*-Mutationsrate von $1,34 \times 10^{-3}$ Mutationen/Generation für das 70 bp-lange mitochondriale *tRNA^{Lys}*-Gen. Wenn nun beide Mutationen unabhängig voneinander wären, würde die Wahrscheinlichkeit für ein gleichzeitiges Auftreten bei $4,02 \times 10^{-9}$ pro Generation liegen, was bedeutet, dass ein solches Ereignis nur bei einem Individuum in der Weltbevölkerung ($6,45 \times 10^9$) innerhalb von 16 Jahren zu finden sein sollte. Allerdings ist die publizierte Mutations-/Fixierungsrate von Nukleotidaustauschen in der mtDNA auf den D-loop bezogen, der einem deutlich geringeren Selektionsdruck ausgesetzt ist als die funktionell wichtigen *tRNA*-Gensequenzen.²²² Somit wäre die Wahrscheinlichkeit der unabhängigen Entstehung beider Mutationen beim Patienten B sogar noch weitaus geringer als die oben berechnete. Wenn ein unabhängiges Auftreten der Patienten-Mutationen also sehr unwahrscheinlich ist, wäre es denkbar, dass eine funktionelle Verbindung zwischen ihnen existiert. Die parallele Existenz mehrerer *de novo* Mutationen ließe z.B. einen vererbten Defekt im DNA-Reparatursystem vermuten. Im vorliegenden Fall erscheint dies jedoch unwahrscheinlich, da es innerhalb der Familie des Patienten B keinen Hinweis für eine erhöhte Frequenz von Krebserkrankungen gab, die auf solch einen Reparaturdefekt hinweisen würden. Außerdem war bereits in früheren Untersuchungen anhand von Mikrosatellitenmarkern die Instabilität repetitiver Sequenzen, die ein Hauptmerkmal für Mutationen in „Mutator“-Genen sind,²²³ beim Patienten und seiner Familie ausgeschlossen worden. Es wäre jedoch möglich, dass die *PAX6*-Mutation einen indirekten Einfluss auf die Entstehung der mitochondrialen Mutation gehabt haben könnte. Der Transkriptionsfaktor *PAX6* aktiviert z.B. den Promotor des in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Entkoppler-Proteins *UCP2*.²²⁴ Wie an *UCP2-knockout*-Mäusen gezeigt wurde, ist *UCP2* in der Lage, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, welche die mitochondriale DNA schädigen können, zu hemmen.^{225, 226} Eine Reduktion des *PAX6*-Proteins könnte möglicherweise die Synthese des *UCP2* herabsetzen und somit die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies fördern, die wiederum eine erhöhte Mutationsrate der mtDNA zur Folge hätte. Eine Studie, die den Effekt der *UCP2*-Inaktivierung auf die Mutationsrate der mtDNA untersucht hat, habe ich nicht gefunden. Zukünftig wäre es jedoch sinnvoll bei Patienten mit bekannten *PAX6*-Mutationen nach einer erhöhten Mutationsrate der mtDNA zu forschen.

5.2.3 Koexistenz zweier pathogener Mutationen als individueller Einflussfaktor auf die klinische Variabilität von Mitochondriopathien

Als eine Ursache fehlender Genotyp-Phänotyp-Relationen bei Mitochondriopathien werden individuelle Einflussfaktoren vermutet, welche die klinische Ausprägung mitochondrialer Mutationen modifizieren können. Wie ich in dieser Studie zeigen konnte, wäre ein denkbarer Faktor das parallele Auftreten von Mutationen in anderen Genen, nukleären oder auch mitochondrialen Ursprungs. Während die Muskelhypotonie, die Belastungsintoleranz und die Ptosis des Patienten B auf den ersten Blick für eine mitochondriale Erkrankung sprachen, wurde dies durch den untypischen Augenphänotyp in Frage gestellt, was zur weiteren Identifizierung der nukleären *PAX6*-Mutation führte. In der Literatur wurden bereits einige parallel auftretende gDNA- und mtDNA-Mutationen bei Mitochondriopathien beschrieben. Diese stellen jedoch vornehmlich sich wechselseitig bedingende Mutationsereignisse dar. So entstehen multiple mtDNA-Deletionen, die sehr heterogene Phänotypen verursachen können, häufig sekundär durch Mutationen in nukleären Genen, wie *ANT1* (kodiert den Adenosin-Nukleosid-Translokator), *PEO1* (kodiert die *Twinkle*-Helikase), oder *POLG* (kodiert die katalytische Untereinheit der mtDNA Polymerase γ), die alle wichtige Funktionen bei der mtDNA-Replikation haben.^{227, 228} In diesen Fällen sind die nukleären Mutationen also keine *Modifier* eines mitochondrial bedingten Phänotyps sondern vielmehr die Ursache des mtDNA-Genotyps.

Die parallele Existenz einer mitochondrialen Punktmutation (m.12.313T→C) in der mt.tRNA^{Leu(CUN)} und einer partiellen Deletion des nukleären, repetitiven D4Z4-Elements wurde bei einem Patienten mit Fazioskapulohumeraler Muskeldystrophie (FSHD; Muskelschwäche im Gesicht und Schultergürtelbereich) und einem für Mitochondriopathien typischen Muskelphänotyp mit *ragged-red fibers* gefunden.²²⁹ Die mtDNA-Mutation wurde von den Autoren hinsichtlich der kanonischen Kriterien als pathogen eingestuft. Darüber hinaus sind D4Z4-Deletionen generell mit FSHD assoziiert und führen zur transkriptionellen Derepression von Genen, unter anderem von *ANT1*, die stromaufwärts der D4Z4-Region liegen.²³⁰ Es wäre daher möglich, dass auch in diesem Fall die nukleäre Mutation einen Einfluss auf die Entstehung der mtDNA-Mutation hatte. Dennoch scheinen beide Mutationen an der Ausprägung der klinischen Symptomatik des Patienten beteiligt gewesen zu sein.

Die Koexistenz zweier pathogener Punktmutationen in der mitochondrialen DNA (nt11.778, nt14.484) wurde bei vier Familien mit LHON-Syndrom gezeigt.²³¹⁻²³³ Jeweils eine der beiden Mutationen, 11.778 oder 14.484, war bei allen betroffenen Patienten homoplasmisch, während die andere stets heteroplasmisch vorlag. Nach Howell *et al.* (2002) ist zumindest bei zwei dieser Familien der klinische Befund nicht schwerer und die Penetranz der LHON-Erkrankung nicht höher als bei LHON-Familien mit nur einer mtDNA-Mutation.²³³ Somit scheinen sich die beiden parallel auftretenden Mutationen in ihrer klinischen Ausprägung

nicht zu beeinflussen oder zu verstärken. Grundsätzlich werden für die Entstehung des LHON-Syndroms jedoch Phänotyp-modifizierende nukleäre Gene vermutet, weil Patienten mit der gleichen homoplasmischen mtDNA-Mutation oftmals sehr unterschiedliche Symptome entwickeln können.²³⁴ Diese sind möglicherweise auf dem X-Chromosom lokalisiert,⁶² denn die Penetranz der LHON-Mutationen ist bei männlichen Individuen höher als bei weiblichen.²³⁵

In der Summe wurden bisher nur wenige Fälle mitochondrialer Erkrankungen beschrieben, bei denen nachweislich zwei pathogene Mutationen den Phänotyp eines Patienten bedingen. Die Identifizierung solcher Mutationen ist aufgrund der Vielzahl potentiell betroffener Gene sehr schwierig und eigentlich nur dann möglich, wenn die klinische Symptomatik wie beim Patienten B Hinweise auf die beeinträchtigte Genfunktion liefern kann. Mit der Identifizierung der *PAX6*-Mutation wurde in der vorliegenden Arbeit das *PAX6*-Gen als ein weiterer möglicher *Modifier* von Mitochondriopathien beschrieben.

5.3 Studie Patientin C: Mausmodell für mitochondrialen Komplex I-Mangel

Trotz der bedeutenden Funktion von Mitochondrien im zellulären Stoffwechsel und der Vielzahl an Erkrankungen, die durch Störungen der mitochondrialen Atmungsfunktion hervorgerufen werden, gibt es bisher nur wenige genetische Tiermodelle für Mitochondriopathien. Zu Beginn dieser Studie existierten zwar bereits Mausmodelle, die eine indirekte Beeinträchtigung der Komplex I-Aktivität aufwiesen,^{68, 236, 237} jedoch lag keinem dieser Modelle eine spezifische Mutation im Komplex I zugrunde. Ziel dieser Studie war es, ein Mausmodell mit einer Mutation in der NADH-bindenden Untereinheit (*Ndufv1*) des Komplexes I zu generieren, um die Pathogenese eines Komplex I-Mangels *in vivo* untersuchen zu können und dabei die funktionelle Bedeutung von *Ndufv1* genauer zu erforschen.

Der in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe in Mäusen generierte *knockout* des *Ndufv1*-Gens, bei dem das Exon 1 entfernt wurde, stellte sich für homozygote Mausmutanten noch während der Embryogenese als letal heraus. Heterozygote Mäuse waren hingegen histologisch und phänotypisch völlig normal. Dies entsprach den Befunden von *NDUFV1*-Mutationen beim Menschen, bei denen die heterozygoten Eltern betroffener Kinder immer normal entwickelt und gesund waren.⁹⁸⁻¹⁰⁰ In der vorliegenden Arbeit wollte ich nun ein *knock-in*-Mausmodell mit der *Ndufv1*-Punktmutation c.1022C→T erzeugen, bei dem die Wahrscheinlichkeit lebende homozygote Mutationsträger zu erhalten, relativ hoch war. Die Patientin C, bei der diese *Missense*-Mutation erstmalig beschrieben wurde, ist heute 19 Jahre alt.⁹⁸ Andere Patienten mit Mutationen im *NDUFV1*-Gen starben oft noch im Laufe der ersten drei Lebensjahre.¹⁰⁰

5.3.1 Die *Ndufv1*-Expression ist besonders stark in den für die klinische Ausprägung von mtDNA-Mutationen anfälligen Gehirnregionen des Menschen

Anhand des Mausmodells wollte ich, wie schon in der Studie der Patientin A, Untersuchungen zur regionalen Pathologie von Mitochondriopathien durchführen. Die Patientin C, die Trägerin der *Targeting*-Mutation im *NDUFV1*-Gen ist, weist wie die meisten Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen ebenfalls regional betonte Schädigungen spezifischer Gehirnareale auf. Bei ihr scheint aufgrund der zystischen Leukodystrophie vor allem die Weiße Substanz des Gehirns betroffen zu sein. Zudem verweist die myoklonische Epilepsie des Mädchens auf eine Schädigung des *Hippocampus* und der Basalganglien. Die Untersuchung der *Ndufv1*-Expression am Gehirn einer erwachsenen Wildtyp-C57BL/6-Maus sollte zunächst zeigen, ob lokale Unterschiede in der Expression existieren, die im Zusammenhang mit der Ausprägung einer regionalen Pathologie beim Menschen stehen könnten.

Die stärksten Signale der *Ndufv1*-Expression konnte ich in den Basalganglien, dem *Hippocampus*, den Schichten III-V der Großhirnrinde und in der Kleinhirnrinde (Körnerzellschicht) nachweisen. Obwohl nicht alle dieser Gehirnstrukturen bei der Patientin C offensichtlich betroffen schienen, sind sie dennoch bei einer Vielzahl von Patienten mit Mitochondriopathien klinisch involviert. So findet man z.B. beim Leigh- und beim Leigh-ähnlichen-Syndrom, welche unter anderem mit Mutationen im *NDUFV1*-Gen assoziiert sein können,^{98, 99} meist bilateral symmetrische Läsionen der Basalganglien, Groß- und Kleinhirnatrophien sowie Fehlbildungen des Kortex (Großhirnrinde).¹⁶⁵ Die Basalganglien, der *Hippocampus* oder der Kortex sind aber auch oft bei anderen spezifischen mitochondrialen Erkrankungen wie dem MERRF- oder dem MELAS-Syndrom pathologisch auffällig.^{110, 238, 239} Einerseits scheint es also einen direkten Zusammenhang zwischen dem klinischen Phänotyp distinkter Gehirnareale und der *NDUFV1*-Expression zu geben. Andererseits spricht dieser Befund für einen generellen Zusammenhang zwischen der regionalen Pathologie und der Expression von mitochondrialen Strukturproteinen und Genen. Dies wäre jedoch in zukünftigen Untersuchungen experimentell zu beweisen. Ein solcher Zusammenhang basiert vermutlich auf dem aeroben Energiebedarf der verschiedenen Gehirngewebe und auf unterschiedlichen Regulationsmechanismen, welche zur Kompensierung des Atmungskettendefekts in den jeweiligen Zellen initiiert werden.

5.3.2 Generierung der *knock-in*-Maus und Identifizierung einer zweiten *Missense*-Mutation im *Ndufv1*-Gen

Für die Generierung der *Ndufv1*-*knock-in*-Maus habe ich ein Vektor-Konstrukt verwendet, welches die gesamte genomische Sequenz des *Ndufv1*-Gens mit einer Länge von etwa 5,2 kbp, die Mutation c.1022C→T und eine *Neo/TK*-Selektionskassette beinhaltet. Die Effi-

Effizienz der homologen Rekombination zwischen Vektor und *Ndufv1*-Gen in den ES-Zellen lag bei 3 zu 960. Bei den meisten Zellen ist die zufällige Integration von Vektorsequenzen ins Genom über 1000-mal häufiger als eine homologe Rekombination mit dem Zielgen.²⁴⁰ Aus diesem Grund hängt die Effizienz der homologen Rekombination sehr stark von der Homologie zwischen der im Vektor verwendeten Gensequenz und der Gensequenz in den ES-Zellen ab. Udy *et al.* (1997) zeigten z.B. anhand eines Konstrukts Schwankungen in der Rekombinationseffizienz von 1:189 in R1-Zellen bis 1:1561 in E14.7-Zellen.²⁴¹ Die Rekombinationseffizienz meines verwendeten *Ndufv1-Targeting*-Konstrukts, schien somit im Normbereich zu liegen.

Da ich zunächst vermutete, dass das Ausbleiben heterozygoter Nachkommen nach der homologen Rekombination wahrscheinlich auf die Anwesenheit des *TK*-Gens im rekombinanten *Ndufv1*-Gen zurückzuführen war,¹⁶² habe ich die Selektionskassette mittels *Cre*-vermittelter Rekombination *in vitro* aus den ES-Zellen entfernt. Die Rekombinationseffizienz lag hier mit etwa 1:20 erwartungsgemäß deutlich höher als bei der homologen Rekombination.²⁴²

Aus einer rekombinanten ES-Zelllinie nach *Cre*-Rekombination gingen heterozygote Mäuse hervor. Obwohl die *Targeting*-Mutation beim Menschen keine embryonale Letalität hervorruft, wurden dennoch keine homozygot-mutanten Tiere geboren. Wie der frühere *knockout* des *Ndufv1*-Gens gezeigt hatte, sind Mäuse mit einem vollständigen Funktionsverlust des *Ndufv1*-Gens nicht lebensfähig. Die Überprüfung der rekombinanten *Ndufv1*-mRNA-Sequenz auf Vollständigkeit und Sequenzabweichungen führte zur Identifizierung einer weiteren, unerwünschten *Missense*-Mutation c.100T→C im Exon 2. Diese ist auf dem gleichen Allel wie die *Targeting*-Mutation lokalisiert und war in den ursprünglichen ES-Zellen noch nicht vorhanden. Nach bisherigen Kenntnissen betrifft der verursachte Aminosäureaustausch von Serin gegen Prolin an der Position 34 keine der drei funktionellen Domänen des *Ndufv1*-Proteins (FMN-, Eisen-Schwefel- und NADH-Bindestelle) und auch nicht dessen vorhergesagte mitochondriale Importsequenz.⁹⁷ Ob das Serin eine andere elementare Position im Wildtyp-*Ndufv1* einnimmt, lässt sich derzeit nicht beurteilen, da die Kristallstruktur des Proteins noch nicht bekannt ist. Die evolutionäre Konservierung des Serins und der umgebenden Peptidsequenz bei Säugern spricht jedoch für eine wichtige Funktion dieses Proteinabschnitts. Die *Targeting*-Mutation, die zum Austausch von Alanin gegen Valin an der Position 341 führt, ist ebenfalls evolutionär hoch konserviert und außerhalb der putativen Funktionsdomänen von *Ndufv1* lokalisiert. Doch im Gegensatz zu den Aminosäuren Serin und Prolin, die sich in ihrer Struktur und Reaktivität erheblich unterscheiden, haben Alanin und Valin sehr ähnliche chemische Eigenschaften. Beide tragen unpolare Seitenketten, sind hydrophob und wirken, durch ihre Neigung sich zusammenzulagern, stabilisierend auf die dreidimensionale Struktur wasserlöslicher Proteine. Prolin hingegen nimmt durch seine Ringstruk-

tur eine Sonderstellung innerhalb der Aminosäuren ein und übt in der Regel einen starken Einfluss auf die Architektur von Proteinen aus. Dies lässt vermuten, dass die *Ndufv1*-Mutation im Exon 2 „pathogener“ ist als die *Targeting*-Mutation.

Beim Menschen wurden homozygote Doppelmutationen im *NDUFV1*-Gen bisher nicht beschrieben. Die dokumentierten Patienten wiesen entweder homozygote bzw. *compound*-heterozygote *Missense*-Mutationen auf oder waren *compound*-heterozygot für je eine *Missense*- und eine Protein-trunkierende (Spleiß-Mutation, *Nonsense*-Mutation oder *Frameshift*-Deletion) Mutation.^{93, 98-101} Die trunkierenden Mutationen führten in allen Fällen zum fast vollständigen Abbau der entsprechenden *NDUFV1*-mRNA (NMD, *nonsense mediated messenger RNA decay*) und zum Tod der Patienten innerhalb der ersten drei Lebensjahre.^{98, 100} Patienten mit zwei von *Missense*-Mutationen betroffenen *NDUFV1*-Allelen haben offensichtlich eine höhere Lebenserwartung (≥ 7 Jahre).^{98, 99} Ein Zusammenhang zwischen Schweregrad der klinischen Symptomatik und der Art der Aminosäureaustausche, der Rückschlüsse auf die Pathogenität der beiden Mutationen in den *knock-in*-Mäusen zulassen würde, ist jedoch nicht erkennbar.^{93, 98-101}

Unabhängig von der Frage, welche der beiden *Ndufv1*-Mutationen „pathogener“ für die Mäuse ist, wird die embryonale Letalität der *Ndufv1*^{mut/mut}-Tiere vermutlich durch die Kombination beider Mutationen verursacht. Die cDNA-Sequenzdaten der heterozygoten Maus sprechen dabei gegen den Abbau des betroffenen mRNA-Allels durch NMD. Jedoch konnte erst die Untersuchung der Komplex I-Aktivität in den embryonalen Mauszellen Auskunft über das Ausmaß der Funktionsstörung des *Ndufv1*-Proteins geben. Es bestand jedenfalls weiterhin, zumindest theoretisch, die Möglichkeit, dass die *Targeting*-Mutation alleine lebensfähige Mäuse hervorbringt. Die Wahrscheinlichkeit eines natürlichen Rekombinationsereignisses, welches beide Mutationen voneinander trennen würde, ist mit 1:100.000 Nachkommen allerdings sehr gering und trat innerhalb der 518 genotypisierten Nachkommen nicht auf. Es war mir in dieser Arbeit daher nicht möglich, ein lebensfähiges *knock-in*-Mausmodell für einen mitochondrialen Komplex I-Mangel zu generieren. Anhand des embryonalen Mausgewebes wollte ich nun zumindest stabile Zelllinien (MEFs) mit mutantern Genotyp etablieren, an welchen zukünftig Untersuchungen zur Pathogenese eines Komplex I-Mangels *in vitro* durchgeführt werden können.

5.3.3 Die Funktionsstörung der *Ndufv1*-Untereinheit verursacht ein Absterben der Zellen *in vivo* aber nicht *in vitro*

Die heterozygoten Mausembryonen waren im Vergleich zu den Wildtyp-Embryonen normal entwickelt und wiesen keine morphologischen Auffälligkeiten auf, was den funktionell rezessiven Charakter von *NDUFV1*-Mutationen beim Menschen unterstreicht.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Homozygote Mutanten zeigten bereits am Tag E7,5 deutliche Entwicklungsdefizite und am Tag E8,5

konnte ich elektronenmikroskopisch ein Anfangsstadium zellulären Zerfalls anhand der Auflösung der Zell-Zell-Kontakte beobachten. Somit muss die Funktion des Ndufv1-Proteins für die Zellen schon in dieser Phase der Embryonalentwicklung essentiell sein. Dies würde auch begründen, warum homozygote *Nonsense*-Mutationen im *NDUFV1*-Gen beim Menschen bisher nicht beschrieben wurden. Wahrscheinlich ist der vollständige Funktionsverlust des Proteins nicht mit dem Leben vereinbar und führt auch beim Menschen zu einem frühzeitigen Abort.

Wie ich nachweisen konnte, verursacht der Funktionsverlust des Ndufv1-Proteins in den Mausembryonen eine massive Strukturveränderung der Mitochondrien. Derartige Strukturveränderungen gehen typischerweise mit dem Prozess des programmierten Zelltods einher. Es wird vermutet, dass sie für die Freisetzung spezifischer Signale aus den Mitochondrien notwendig sind, die den Zelltod weiter vorantreiben sollen, sobald er einmal initiiert wurde.¹⁶⁸ Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *Ndufv1^{mut/mut}*-Embryonen sprachen für einen beginnenden Zelltod in allen embryonalen Zellen, unabhängig von ihrer Lokalisation und damit verbunden von ihrer potentiellen Funktion im sich entwickelnden Embryo. Dennoch war es mir möglich, aus den Embryonen MEFs zu kultivieren. Unter Kulturbedingungen, mit Zusätzen von Uridin und Pyruvat im Kulturmedium, zeigten die *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen gegenüber dem Wildtyp keinerlei Wachstumsdefizite, welche man aufgrund des Gen-Defekts vermuten könnte.

5.3.4 Isolierter Komplex I-Mangel als Folge des Funktionsverlustes des *Ndufv1*-Gens

Die spektrophotometrischen biochemischen Messungen an isolierten Mitochondrien wiesen einen ausgeprägten Komplex I-Mangel in den *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen nach. Überraschenderweise fand sich jedoch trotz der beiden *Ndufv1*-*Missense*-Mutationen kein vollständiger Aktivitätsverlust des Komplexes I, sondern eine Restaktivität von etwa 10-15% der in den Wildtyp-Mitochondrien gemessenen Komplex I-Aktivität.

Beim Menschen resultieren *Missense*-Mutationen im *NDUFV1*-Gen oft in einer Restaktivität des Komplexes I im Skelettmuskel. Hingegen lassen kultivierte Hautfibroblasten und Lymphozyten der jeweiligen Patienten zum Teil keine Beeinträchtigung der Komplex I-Aktivität erkennen.^{99, 100} Diese Diskrepanz reflektiert möglicherweise auch hier die selektive Anfälligkeit verschiedener Zelltypen für Mutationen, welche die Atmungskettenfunktion beeinträchtigen. Nach Loeffen *et al.* (2000) könnte sich die Stöchiometrie einzelner Komplex-Untereinheiten gewebsspezifisch unterscheiden, was zum Erhalt verschiedener Restaktivitäten der mutanten Komplexe in den jeweiligen Geweben beitragen mag.⁹³ Andererseits ist es ebenso denkbar, dass die Zellkulturbedingungen den mutanten Fibroblasten und Lymphozyten einen Vorteil gegenüber nativen Geweben verschaffen, die Komplex I-Funktion aufrecht

zu erhalten. Benit *et al.* (2001) konnten z.B. in kultivierten Hautfibroblasten von Patienten mit *NDUFV1*-Mutationen in der FMN-Bindestelle der Untereinheit ebenfalls keine Komplex I-Defizienz feststellen, obwohl diese in den Muskeln der Patienten deutlich ausgeprägt war.¹⁰⁰

Sie vermuten, dass die hohe Konzentration an Riboflavin (FMN-Vorläufer) im Fibroblastenmedium die Komplex I-Aktivität verbessert.

Grundsätzlich stellte sich durch meine Ergebnisse heraus, dass biochemische Messungen der Atmungskettenaktivitäten immer im Hinblick auf den experimentellen Hintergrund betrachtet werden müssen. Diese Überlegung wird durch die polarographischen Untersuchungen an intakten *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen bestätigt. Unter diesen annähernd physiologischen Bedingungen konnte ich indirekt ebenfalls einen Komplex I-Mangel nachweisen. Dieser war jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als der an den isolierten Mitochondrien mit dem Verfahren der Spektrophotometrie gemessene. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die hohe, kompensatorisch verstärkte, unspezifische NADH:Ubichinon Oxidoreduktase-Aktivität in den Zellen, die unabhängig von der mitochondrialen Atmung Sauerstoff verbraucht. In kultivierten Hautfibroblasten des Menschen kann diese bis zu 90% der gemessenen NADH-Oxidationsrate ausmachen.²⁴³ Darüber hinaus wiesen die beiden *Ndufv1^{mut/mut}*-Zelllinien einen unterschiedlich stark ausgeprägten Komplex I-Mangel auf. Dies ist möglicherweise auf den Ursprung der MEFs in den einzelnen Zelllinien zurückzuführen. Die kultivierten Zellen könnten sich z.B. aus unterschiedlichen Keimblättern der Mausembryos entwickelt haben, in welchen die Aktivitäten unspezifischer Oxidasen unter Umständen variieren.

Anhand der polarographischen Messungen konnte ich weiterhin zeigen, dass es sich in den *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen um einen isolierten Komplex I-Mangel handelt. Etwa 25% aller Störungen der oxidativen Phosphorylierung beim Menschen gehen mit kombinierten Atmungskettenkomplex-Defizienzen einher.⁹³ Ein Komplex I-Mangel kann dabei mit einem Komplex III- oder IV-Mangel assoziiert sein.^{93, 244, 245} Wie Bentlage *et al.* (1996) feststellten, kann sich diese Assoziation auch gewebsspezifisch unterscheiden.²⁴⁵ Sie fanden bei drei Patienten mit einem isolierten Komplex I-Mangel in Fibroblasten verminderte Aktivitäten der Komplexe I und IV im Muskel. Da zukünftig, anhand der *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen, die molekulargenetischen und biochemischen Grundlagen eines Komplex I-Mangels spezifisch untersucht werden sollen, war es für mich wichtig, Störungen anderer Komplexaktivitäten in diesen Zellen ausschließen zu können.

Parallel zum Komplex I-Mangel deuteten die Polarographie-Ergebnisse in den *Ndufv1^{mut/mut}*-Zellen auf eine leichte Steigerung der Komplex II- und III-Aktivität. Obwohl ich analoge Befunde in der Literatur nicht finden konnte, vermute ich, dass diese Aktivitätssteigerungen die Folge eines Kompensationsmechanismus in den Zellen sind, durch welchen die Zellen dem vorliegenden Energiemangel entgegenwirken.

Durch welchen Mechanismus beiden Mutationen im *Ndufv1*-Gen der Maus einen Komplex I-Mangel hervorrufen, ist unklar. Nach bisherigem Kenntnisstand betreffen sie jedoch keine der vorhergesagten funktionellen Domänen des Gens.⁹⁷ Eine fehlerhafte Faltung des Proteins infolge der beiden Aminosäureaustausche könnte jedoch die korrekte Zusammensetzung des Komplexes I oder dessen Stabilität beeinträchtigen. Neuere Untersuchungen zum *Assembly* des Komplexes I verweisen auf einen sehr komplexen Prozess, der eine eng koordinierte Interaktion aller beteiligten Faktoren verlangt.²⁴⁶

5.3.5 Alternative Energiegewinnung über anaerobe Glykolyse als Folge einer Komplex I-Defizienz *in vitro*

Da die Wachstumsrate der *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen trotz stark herabgesetzter Komplex I-Aktivität gegenüber den Wildtyp-Zellen nicht eingeschränkt war, schienen die mutanten Zellen offensichtlich auf eine alternative Strategie der Energiegewinnung ausgewichen zu sein. Bei der Gewinnung von ATP über die anaerobe Glykolyse wird verstärkt Glukose verbraucht und Laktat produziert. Erhöhte Laktatkonzentrationen (Laktatazidose) im Blutserum oder der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit sind ein Schlüsselsymptom der Patienten mit Komplex I-Defizienz und mit mitochondrialen Erkrankungen im Allgemeinen.^{93, 98-101, 247} Ebenso kommt es in kultivierten Hautfibroblasten des Menschen unter Steigerung des oxidativen Stresses und während des Alterungsprozesses zu einer Zunahme der Laktatkonzentration.^{248, 249}

Im Medium der kultivierten MEFs konnte ich in Abhängigkeit von der *Ndufv1*-„Dosis“ und dem Ausmaß des Komplex I-Mangels eine erhöhte Laktatproduktion und einen verminderten Glukoseverbrauch feststellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der durch die Funktionsstörung der *Ndufv1*-Untereinheit verursachte Komplex I-Mangel zu einem Anstieg der anaeroben Glykolyse in den mutanten Zellen führt. Dieser alternative Stoffwechselweg muss also offensichtlich für kultivierte Zellen mit einem Komplex I-Mangel ausreichend sein, während die Zellen der Mausembryonen, die sich in einem festen Zellverbund befinden, mit diesem Stoffwechselweg über längere Zeit nicht überleben können. Den entscheidenden Vorteil liefert den kultivierten Zellen höchstwahrscheinlich die im Kulturmedium enthaltene Glukose, da sie das Substrat der Glykolyse ist und den Zellen eines festen Zellverbandes nur beschränkt zur Verfügung steht.

5.3.6 Die Komplex I-Defizienz der kultivierten *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen geht nicht mit einer Erhöhung der mtDNA-Kopienzahlen einher

Obwohl die kultivierten *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen scheinbar ausreichend Energie aus der anaeroben Glykolyse beziehen konnten, wäre es dennoch denkbar, dass es in den Zellen zu einer parallelen Erhöhung der mtDNA-Kopienzahlen gekommen war. Wie ich in der Studie der

Patientin A gezeigt habe, könnte die Zunahme der mtDNA-Menge ein Hinweis auf einen zellulären Mechanismus zur Kompensation des Atmungskettendefekts sein. Die ermittelten mtDNA-Kopienzahlen in den *Ndufv1*^{+/+}, *Ndufv1*^{+mut}- und *Ndufv1*^{mut/mut}-Zellen zeigten allerdings keine einheitliche Tendenz bezüglich der Genotypen und dementsprechend auch nicht bezüglich des ermittelten Komplex I-Mangels. Dementsprechend scheint die mtDNA-Menge ein individueller Faktor der einzelnen Zelllinien zu sein, der möglicherweise mit dem Ursprung der MEFs aus unterschiedlichen embryonalen Keimblättern zusammenhängt, in welchen verschiedene Regulationsmechanismen die mtDNA-Kopienzahlen beeinflussen könnten. Bisher ist noch weitgehend unklar, wie die mtDNA-Kopienzahl in nativen Zellen reguliert wird. Einige zelluläre Faktoren, wie der mitochondriale Transkriptionsfaktor TFAM oder das mitochondriale Einzelstrang-Bindungs-Protein mtSSB wurden zwar mit der Regulation der mtDNA-Menge in Verbindung gebracht,^{199, 250} ansonsten gibt es jedoch nur hypothetische Modelle bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen. Eine Hypothese besagt, dass der zelluläre Energiebedarf die mtDNA-Kopienzahl bestimmt.²⁵¹ Meine Ergebnisse der Studie der Patientin A, welche eine hohe mtDNA-Menge in Muskeln und im Gehirn vormals gesunder Individuen (Kontrollpersonen) anzeigten, würden diese Vermutung stützen. Anderen Hypothesen zufolge könnten die Verfügbarkeit von Nukleotiden oder die Verwendung unterschiedlicher Replikationsursprünge der mtDNA entscheidende Einflüsse auf die mtDNA-Replikation haben.^{252, 253} Es wäre also wichtig, in zukünftigen Studien die mtDNA-bindenden Proteine zu untersuchen, um potentiell limitierende Faktoren der mtDNA-Synthese zu identifizieren.

5.3.7 Vorstellung der kürzlich entwickelten Mausmodelle für einen Komplex I-Mangel

Gegen Ende meiner Studie wurden zwei Mausmodelle mit mitochondrialem Komplex I-Mangel publiziert. Bei dem ersten Modell wurde die Komplex I-Untereinheit *Ndufs4* durch die Entfernung des zweiten Exons in der Keimbahn der Maus inaktiviert.¹²⁴ Das zweite Modell beinhaltet eine Punktmutation im letzten Exon des *Ndufs4*-Gens, die in einem um 10-15 Aminosäure verkürzten Protein resultiert und mehrfach bei Patienten mit Leigh-Syndrom gefunden wurde.²⁵⁴ Obwohl beide Strategien zur Inaktivierung der *Ndufs4*-Untereinheit führen sollten, brachten sie sehr unterschiedliche Phänotypen hervor. Beim ersten Modell wurden die homozygoten Mutanten gesund geboren und entwickelten im Alter von fünf Wochen eine für Mitochondriopathien typische Symptomatik mit Ataxie, eingeschränktem Wachstum und progressivem Verlust der motorischen Fähigkeiten, an deren Folgen sie im Alter von sieben Wochen verstarben. Heterozygote Mutanten waren hingegen völlig normal. Im zweiten Modell starben die homozygoten Mutanten noch während der Embryogenese. Heterozygote Tiere waren phänotypisch normal, zeigten aber deutliche biochemische Veränderungen des mitochondrialen Metabolismus'. Bei beiden Modellen wurde biochemisch ein Komplex I-Mangel und eine verstärkte Laktat-Akkumulation nachgewiesen. Damit eignen sich beide

Diskussion

Modelle zur Untersuchung der zellulären Mechanismen eines Komplex I-Mangels. Allerdings wird hier deutlich, dass jede Mutation, die einen Komplex I-Mangel verursacht, unterschiedliche phänotypische Auswirkungen haben kann und möglicherweise verschiedene Mechanismen an deren Ausprägung involviert sind. Dementsprechend sind zukünftige Studien an kultivierten Zellen, aber auch die Generierung weiterer Mausmodelle sinnvoll, um ein umfassendes Verständnis für diesen Atmungskettendefekt zu erhalten, auf dem die Entwicklung neuer Therapien für Patienten mit Mitochondriopathien aufbauen kann.

6 Zusammenfassung

Mitochondriopathien sind eine Gruppe meist genetisch bedingter Multisystemerkrankungen, die durch Störungen des mitochondrialen Energiemetabolismus infolge von Mutationen in der mitochondrialen oder nukleären DNA auftreten. Ihre Klinik ist sehr heterogen und umfasst ein weites Symptomenspektrum, wobei das Gehirn und die Muskeln aufgrund ihres hohen aeroben Energiebedarfs besonders häufig involviert sind (Epilepsie, Ataxie, Myopathie). Die genaue Pathogenese der Mitochondriopathien ist bisher nur in Ansätzen verstanden. Diese Arbeit widmete sich der Untersuchung der charakteristischen regionalen Pathologie einzelner Organe und Gewebe sowie der Suche nach individuellen genetischen Faktoren, die einen Einfluss auf die klinische Variabilität der Erkrankungen haben könnten. Darüber hinaus sollte ein Mausmodell für *in vivo* Studien zur Pathogenese einer bestimmten Mitochondriopathie (Komplex I-Defizienz) generiert werden.

Die Untersuchungen zur regionalen Pathologie der Mitochondriopathien erfolgten exemplarisch an einer Patientin mit der m.8344A→G MERRF-Mutation. An den Biopsieproben 43 verschiedener Gewebe der Patientin konnte ich durch quantitative Pyrosequenzierung der mtDNA, gewebsspezifische Unterschiede der Mutationslast als Ursache der bevorzugten Betroffenheit ihrer Muskulatur und einzelner Gehirnareale ausschließen. Anhand von Untersuchungen mittels quantitativer *real-time* PCR zeigte sich jedoch, dass betroffene Gehirnregionen und Muskeln gegenüber symptomfreien Geweben eine massive Erhöhung der mtDNA-Kopienzahlen aufwiesen. Eine solche Erhöhung könnte im Zusammenhang mit einer verstärkten Mitochondrienbiogenese stehen, welche den mutationsbedingten Energiemangel in den Zellen kompensieren könnte. Bestätigung fand diese Hypothese jedoch nur in der klinisch betroffenen Skelettmuskulatur, in welcher ich eine parallele Erhöhung der Mitochondrienmasse sowie der Mengen des mitochondrialen Transkriptionsfaktors TFAM und des mitochondrial kodierten Proteins COX2 nachweisen konnte. Die dennoch gestörte Muskelfunktion erklärt sich vermutlich durch das von mir nachgewiesene Ungleichgewicht zwischen mitochondrial und nukleär kodierten Strukturproteinen der Mitochondrien. In den betroffenen Gehirnregionen fand ich keine konsistenten Hinweise auf eine verstärkte Mitochondrienbiogenese.

Den Einfluss individueller genetischer Faktoren auf die klinische Ausprägung mitochondrialer Mutationen habe ich in dieser Arbeit an einem Patienten mit einem komplexen Phänotyp dargestellt. Die progressive Muskelschwäche und Belastungsintoleranz des Patienten sprachen zunächst für einen mitochondrialen Ursprung der Erkrankung. Dies schien durch die Identifizierung einer heteroplasmischen Mutation (m.8347A→G) im mitochondrialen *tRNA^{Lys}*-Gen bestätigt. Untypisch für mitochondriale Mutationen war jedoch der pathologisch differenzierte Augenphänotyp des Patienten mit atypischer Aniridie, Katarakt, Nystagmus, Ptosis

Zusammenfassung

und Hornhautmissbildungen, was darüber hinaus zur Identifizierung einer heterozygoten 16 bp-Deletion im kernkodierten *PAX6*-Gen führte. Beide Mutationen wurden zuvor noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit diskutiere ich die Pathogenität der beiden Mutationen, die Wahrscheinlichkeit für ihr paralleles Auftreten und einen möglichen Einfluss der *PAX6*-Mutation auf die mtDNA-Mutationsrate.

Die Generierung eines Mausmodells mit einer Defizienz des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes I sollte *in vivo* Untersuchungen zur Pathogenese von Mitochondriopathien in dieser Arbeit ermöglichen. Über eine konventionelle *gene targeting*-Strategie habe ich die *Missense*-Mutation c.1022C→T in das *Ndufv1*-Gen, welches die NADH-bindende Untereinheit des Komplexes I kodiert, eingeführt. Diese Mutation war zuvor bei einer Patientin gefunden worden, die mit ihrer Krankheit bis in das jugendliche Alter überlebte. In den manipulierten embryonalen Mausstammzellen kam es jedoch unbeabsichtigt zur Entstehung einer zweiten *Missense*-Mutation auf demselben Allel. Homozygote Mausmutanten starben noch während der Embryonalentwicklung, und elektronenmikroskopisch konnte ich am Tag E8,5 eine beginnende Auflösung der Zell-Zell-Kontakte sowie abnorme Mitochondrienstrukturen identifizieren. Heterozygote Tiere waren hingegen phänotypisch völlig normal. Die Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten aus den *Ndufv1*^{mut/mut}-Embryonen ermöglichten *in vitro* die Identifizierung eines isolierten Komplex I-Mangels als Folge der gestörten *Ndufv1*-Funktion, welche eine Umstellung des zellulären Energiestoffwechsels von aerober auf die anaerobe Glykolyse mit erhöhter Laktatproduktion nach sich zog. Die kultivierten Zellen können dementsprechend zukünftigen Studien zur Pathogenese eines Komplex I-Mangels dienen.

7 Summary

Mitochondriopathies are a group of predominantly inherited multisystem disorders that occur as a result of a dysfunctional oxidative energy metabolism of the mitochondria due to mutations of mtDNA or gDNA encoded mitochondrial proteins. The clinical phenotype of the patients comprises a wide symptom spectrum. Because of their high energy demand, brain and muscle tissues are primarily affected (epilepsy, ataxia, myopathy). Until now the pathogenic mechanisms of mitochondriopathies are poorly understood. This work describes the investigations aimed to uncover the mechanisms leading to the characteristically regionalized pathology in specific organs and tissues. Furthermore it describes the discovery of an individual genetic factor that influenced the clinical phenotype of a patient with a mitochondrial tRNA mutation. Finally, I report on the generation of a knock-in mouse model that should enable us to study the pathogenesis of mitochondriopathies *in vivo*.

The investigations of the regionalized pathology of mitochondriopathies were done in the organs of a female patient with a *MTTK* m.8344A→G mutation who had died from MERRF syndrome. By quantitative pyrosequencing of the mtDNA of 43 *post mortem* biopsy specimens of different tissues, I detected no tissue specific differences in the mutation load (degree of heteroplasmy) for the *MTTK* mutation. Thus I could exclude varying mutation loads as a reason for the selective affection of her skeletal muscles and specific brain regions. However, in contrast to asymptomatic tissues, the affected organs showed a massive increase of mtDNA copy numbers as determined by quantitative real-time PCR. Such an increase could be associated with an increase of mitochondrial mass through *de novo* biogenesis aiming to compensate for the ATP deficiency caused by the mutation. I was able to confirm this hypothesis only for the skeletal muscle of the patient. There the increase of mtDNA copy number was paralleled by an increase of the mitochondrial mass, higher protein levels of the mitochondrial transcription factor A (TFAM) and of the mtDNA encoded structural protein COX2. Nevertheless, the muscle did not entirely compensate the OXPHOS deficiency, possibly through an imbalance between mtDNA and gDNA encoded structural proteins. Within the affected brain regions I did not find a consistent evidence for an increased mitochondrial biogenesis.

The influence of individual genetic factors on the clinical phenotype caused by mtDNA mutations was illustrated by the description of a patient with a complex phenotype. The progressive muscle weakness and exercise intolerance of the patient argued in favour of a mitochondrial cause of his disease. This seemed to be vindicated by the discovery of a heteroplasmic mutation (m.8347A→G) in the mitochondrial *tRNA^{Lys}* gene. However, the eye-phenotype of the patient with atypical aniridia, cataract, nystagmus, ptosis and corneal malformation led to the discovery of a heterozygous 16 bp deletion of the nuclear encoded *PAX6* gene. Both mutations had not been described before. In this thesis I discuss the pathogenic-

Summary

ity of both mutations, the probability of their joint occurrence and a potential influence of the *PAX6* mutation on the mtDNA mutation rate.

Finally, I describe the generation of a knock-in mouse model for complex I deficiency which should enable us to investigate the pathogenesis of mitochondrialopathies *in vivo*. By a conventional gene targeting strategy I introduced the c.1022C→T missense mutation into the murine *Ndufv1* gene, which encodes the NADH binding subunit of complex I and which had been described in a patient with complex I deficiency. Unfortunately, in the process arose a second *Ndufv1* missense mutation while handling the mouse embryonic stem cells. Homozygous mouse mutants died during early embryonic development. By electron microscopy I identified early dissolution of the cell-cell contacts as well as abnormal mitochondrial structures on embryonic day E8.5. In contrast, heterozygous animals had a normal phenotype and were fertile. The culture of embryonic mouse fibroblasts (MEFs) from the *Ndufv1*^{mut/mut} embryos allowed the identification of an isolated complex I deficiency *in vitro* as a result of the *Ndufv1* dysfunction. This complex I deficiency caused a switch in the energy metabolism of the MEF^{-/-} cells from oxidative to anaerobic/glycolytic with the consequence of increased lactate production. In conclusion, the cultured *Ndufv1*^{mut/mut} cells could be used in the future to study the pathogenesis of mitochondrial complex I deficiency.

8 Literaturverzeichnis

1. Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003; **126**:1905-1912.
2. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S *et al.* Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* 1998; **63**:447-454.
3. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM *et al.* The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000; **48**:188-193.
4. Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001; **49**:377-383.
5. Uusimaa J, Moilanen JS, Vainionpaa L *et al.* Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. *Ann Neurol* 2007; **62**:278-287.
6. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL *et al.* Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 2008; **63**:35-39.
7. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; **331**:717-719.
8. Wallace DC, Singh G, Lott MT *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; **242**:1427-1430.
9. Vempati UD, Torrace A, Moraes CT. Mouse models of oxidative phosphorylation dysfunction and disease. *Methods* 2008; **46**:241-247.
10. Margulis L. Symbiosis in cell evolution. 1 ed. Freeman, San Francisco; 1981.
11. Gray MW. Origin and evolution of organelle genomes. *Curr Opin Genet Dev* 1993; **3**:884-890.
12. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4 ed. Garland Publishing Inc., New York; 2002.
13. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; **60**:619-642.
14. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**:2478-2503.
15. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000; **529**:57-68.
16. NASS MM, NASS S. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 1963; **19**:593-611.
17. Clayton DA, Vinograd J. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *J Pers* 1967; **35**:652-657.
18. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; **290**:457-465.
19. Watson E, Forster P, Richards M, Bandelt HJ. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am J Hum Genet* 1997; **61**:691-704.
20. Hecht NB, Liem H, Kleene KC, Distel RJ, Ho SM. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Dev Biol* 1984; **102**:452-461.
21. Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 1987; **123**:364-374.

22. Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1974; **249**:7991-7995.
23. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 1988; **136**:507-513.
24. Morten KJ, Ashley N, Wijburg F *et al.* Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. *Mitochondrion* 2007; **7**:386-395.
25. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**:822-834.
26. Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K *et al.* Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:1382-1387.
27. Kondo R, Satta Y, Matsuura ET, Ishiwa H, Takahata N, Chigusa SI. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 1990; **126**:657-663.
28. Gyllenstein U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 1991; **352**:255-257.
29. Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002; **347**:576-580.
30. Taylor RW, McDonnell MT, Blakely EL *et al.* Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol* 2003; **54**:521-524.
31. Schwartz M, Vissing J. No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J Neurol Sci* 2004; **218**:99-101.
32. Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C *et al.* Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 2003; **54**:524-526.
33. Khrapko K, Coller HA, Andre PC, Li XC, Hanekamp JS, Thilly WG. Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:13798-13803.
34. Brown WM, George M, Jr., Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**:1967-1971.
35. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; **325**:31-36.
36. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**:6465-6467.
37. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem* 1997; **66**:409-435.
38. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 1992; **2**:324-329.
39. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999; **286**:774-779.
40. Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Brown DT, Parsons TJ, Turnbull DM. Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains. *Am J Hum Genet* 2001; **68**:529-532.
41. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; **429**:417-423.
42. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; **309**:481-484.

43. Shoubridge EA. Mitochondrial DNA diseases: histological and cellular studies. *J Bioenerg Biomembr* 1994; **26**:301-310.
44. de VD, de W, I, Ruitenbeek W *et al.* Extreme variability of clinical symptoms among sibs in a MELAS family correlated with heteroplasmy for the mitochondrial A3243G mutation. *J Neurol Sci* 1994; **124**:77-82.
45. Weber K, Wilson JN, Taylor L *et al.* A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997; **60**:373-380.
46. Frederiksen AL, Andersen PH, Kyvik KO, Jeppesen TD, Vissing J, Schwartz M. Tissue specific distribution of the 3243A->G mtDNA mutation. *J Med Genet* 2006; **43**:671-677.
47. Huang CC, Kuo HC, Chu CC, Liou CW, Ma YS, Wei YH. Clinical phenotype, prognosis and mitochondrial DNA mutation load in mitochondrial encephalomyopathies. *J Biomed Sci* 2002; **9**:527-533.
48. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 1997; **120**:1713-1721.
49. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 2003; **370**:751-762.
50. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001; **106**:18-26.
51. Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M *et al.* The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A-->G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain* 1993; **116**:617-632.
52. Koehler CM, Lindberg GL, Brown DR *et al.* Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* 1991; **129**:247-255.
53. Ashley MV, Laipis PJ, Hauswirth WW. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**:7325-7331.
54. Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1996; **14**:146-151.
55. Schuelke M, Bakker M, Stoltenburg G, Sperner J, von MA. Epilepsia partialis continua associated with a homoplasmic mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) mutation. *Ann Neurol* 1998; **44**:700-704.
56. Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O, Attardi G. Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:11164-11168.
57. Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC *et al.* A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 2008; **40**:249-254.
58. Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S. A direct repeat is a hot-spot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 1989; **244**:346-349.
59. Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* 1995; **57**:239-247.
60. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2003; **16**:585-594.
61. Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC *et al.* MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**:D611-D613.
62. Bu XD, Rotter JI. X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:8198-8202.

Literaturverzeichnis

63. Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003; **19**:257-262.
64. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1147**:321-334.
65. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2006; **97**:673-683.
66. Parisi MA, Clayton DA. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 1991; **252**:965-969.
67. Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA. Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J Mol Biol* 1995; **249**:11-28.
68. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 1998; **18**:231-236.
69. Wang J, Wilhelmsson H, Graff C *et al.* Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* 1999; **21**:133-137.
70. Wredenberg A, Wibom R, Wilhelmsson H *et al.* Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**:15066-15071.
71. Evans MJ, Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 1990; **4**:1023-1034.
72. Chau CM, Evans MJ, Scarpulla RC. Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem* 1992; **267**:6999-7006.
73. Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 1993; **7**:2431-2445.
74. Gugneja S, Scarpulla RC. Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem* 1997; **272**:18732-18739.
75. Huo L, Scarpulla RC. Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol* 2001; **21**:644-654.
76. Hoppeler H, Fluck M. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 2003; **35**:95-104.
77. Baar K. Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *Proc Nutr Soc* 2004; **63**:269-273.
78. Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Holloszy JO. Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J* 2003; **17**:675-681.
79. Cam H, Balciunaite E, Blais A *et al.* A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* 2004; **16**:399-411.
80. MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 1961; **191**:144-148.
81. Schatz G. 17th Sir Hans Krebs lecture. Signals guiding proteins to their correct locations in mitochondria. *Eur J Biochem* 1987; **165**:1-6.
82. HATEFI Y, HAAVIK AG, GRIFFITHS DE. Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem* 1962; **237**:1676-1680.

83. Walker JE, Arizmendi JM, Dupuis A *et al.* Sequences of 20 subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. Application of a novel strategy for sequencing proteins using the polymerase chain reaction. *J Mol Biol* 1992; **226**:1051-1072.
84. Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2003; **2**:117-126.
85. Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker JE. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1604**:135-150.
86. Grigorieff N. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol* 1998; **277**:1033-1046.
87. Carroll J, Shannon RJ, Fearnley IM, Walker JE, Hirst J. Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification of two new subunits. *J Biol Chem* 2002; **277**:50311-50317.
88. Sazanov LA, Peak-Chew SY, Fearnley IM, Walker JE. Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry* 2000; **39**:7229-7235.
89. Deng PS, HATEFI Y, Chen S. N-arylazido-beta-alanyl-NAD⁺, a new NAD⁺ photoaffinity analogue. Synthesis and labeling of mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochemistry* 1990; **29**:1094-1098.
90. Fearnley IM, Walker JE. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1140**:105-134.
91. McFarland R, Kirby DM, Fowler KJ *et al.* De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. *Ann Neurol* 2004; **55**:58-64.
92. Kirby DM, Salemi R, Sugiana C *et al.* NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *J Clin Invest* 2004; **114**:837-845.
93. Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM *et al.* Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* 2000; **15**:123-134.
94. Triepels RH, van den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet* 2001; **106**:37-45.
95. Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 2006; **29**:499-515.
96. Ali ST, Duncan AM, Schappert K *et al.* Chromosomal localization of the human gene encoding the 51-kDa subunit of mitochondrial complex I (NDUFV1) to 11q13. *Genomics* 1993; **18**:435-439.
97. Schuelke M, Loeffen J, Mariman E, Smeitink J, van den HL. 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* 1998; **245**:599-606.
98. Schuelke M, Smeitink J, Mariman E *et al.* Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 1999; **21**:260-261.
99. Laugel V, This-Bernd V, Cormier-Daire V, Speeg-Schatz C, de Saint-Martin A, Fischbach M. Early-onset ophthalmoplegia in Leigh-like syndrome due to NDUFV1 mutations. *Pediatr Neurol* 2007; **36**:54-57.
100. Benit P, Chretien D, Kadhom N *et al.* Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet* 2001; **68**:1344-1352.
101. Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S *et al.* Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1659**:136-147.

Literaturverzeichnis

102. Brenningstall GN, Shoffner J, Patterson RJ. Siblings with leukoencephalopathy. *Semin Pediatr Neurol* 2008; **15**:212-215.
103. Koga Y, Akita Y, Takane N, Sato Y, Kato H. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Arch Dis Child* 2000; **82**:407-411.
104. Shtilbans A, Shanske S, Goodman S *et al.* G8363A mutation in the mitochondrial DNA transfer ribonucleic acidLys gene: another cause of Leigh syndrome. *J Child Neurol* 2000; **15**:759-761.
105. Martin MA, Blazquez A, Gutierrez-Solana LG *et al.* Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene. *Arch Neurol* 2005; **62**:659-661.
106. Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 1980; **47**:117-133.
107. Hirano M, DiMauro S. Clinical features of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. In: Lane RJM, editor. Handbook of Muscle Disease. 1 ed. Marcel Dekker Inc., New York; 1996 p. 479-504.
108. Federico A, Cornelio F, Di DS *et al.* Mitochondrial encephalo-neuro-myopathy with myoclonus epilepsy, basal nuclei calcification and hyperlactacidemia. *Ital J Neurol Sci* 1988; **9**:65-71.
109. Fabrizi GM, Cardaioli E, Grieco GS *et al.* The A to G transition at nt 3243 of the mitochondrial tRNA_{Leu}(UUR) may cause an MERRF syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; **61**:47-51.
110. DiMauro S, Hirano M, Kaufmann P *et al.* Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. *Adv Neurol* 2002; **89**:217-229.
111. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990; **61**:931-937.
112. Remes AM, Majamaa-Voltti K, Karppa M *et al.* Prevalence of large-scale mitochondrial DNA deletions in an adult Finnish population. *Neurology* 2005; **64**:976-981.
113. Zeviani M, Di DS. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004; **127**:2153-2172.
114. Larsson NG, Tulinius MH, Holme E *et al.* Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys) A-->G(8344) mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet* 1992; **51**:1201-1212.
115. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989; **246**:500-503.
116. Chomyn A, Meola G, Bresolin N, Lai ST, Scarlato G, Attardi G. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol* 1991; **11**:2236-2244.
117. Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; **51**:1187-1200.
118. Masucci JP, Davidson M, Koga Y, Schon EA, King MP. In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys)gene: two genotypes produce similar phenotypes. *Mol Cell Biol* 1995; **15**:2872-2881.
119. Lobe CG, Nagy A. Conditional genome alteration in mice. *Bioessays* 1998; **20**:200-208.
120. Marth JD. Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination. *J Clin Invest* 1996; **97**:1999-2002.
121. Rajewsky K, Gu H, Kuhn R *et al.* Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 1996; **98**:600-603.

122. Abuin A, Hansen GM, Zambrowicz B. Gene trap mutagenesis. *Handb Exp Pharmacol* 2007;(178):129-147.
123. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001; **24**:71-80.
124. Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, Kapur RP, Schenkman KA, Palmiter RD. Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab* 2008; **7**:312-320.
125. Tallquist MD, Soriano P. Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis* 2000; **26**:113-115.
126. Li H, Wang J, Wilhelmsson H *et al*. Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:3467-3472.
127. Sorensen L, Ekstrand M, Silva JP *et al*. Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci* 2001; **21**:8082-8090.
128. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T *et al*. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**:1805-1812.
129. Lee EC, Yu D, Martinez d, V *et al*. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 2001; **73**:56-65.
130. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 1991; **254**:707-710.
131. Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 1987; **326**:292-295.
132. Sonnenberg-Riethmacher E, Walter B, Riethmacher D, Godecke S, Birchmeier C. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes Dev* 1996; **10**:1184-1193.
133. Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**:1991-1995.
134. Thiele H, Nurnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics* 2005; **21**:1730-1732.
135. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; **23**:2947-2948.
136. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; **132**:365-386.
137. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**:1215.
138. Saiki RK, Scharf S, Faloona F *et al*. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**:1350-1354.
139. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**:5463-5467.
140. Morrison D, FitzPatrick D, Hanson I *et al*. National study of microphthalmia, anophthalmia, and coloboma (MAC) in Scotland: investigation of genetic aetiology. *J Med Genet* 2002; **39**:16-22.
141. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001; **11**:3-11.
142. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**:503-517.
143. Joyner AL. Gene Targeting: A Practical Approach. Oxford University Press; 2nd Edition; 2000.

Literaturverzeichnis

144. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; **336**:688-690.
145. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.
146. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**:4350-4354.
147. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**:680-685.
148. Janssen AJ, Trijbels FJ, Sengers RC *et al.* Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin Chem* 2007; **53**:729-734.
149. COOPERSTEIN SJ, LAZAROW A. A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 1951; **189**:665-670.
150. Hofhaus G, Shakeley RM, Attardi G. Use of polarography to detect respiration defects in cell cultures. *Methods Enzymol* 1996; **264**:476-483.
151. Stadhouders AM, Jap PH, Winkler HP, Eppenberger HM, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a major constituent of pathological inclusions seen in mitochondrial myopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**:5089-5093.
152. Eppenberger-Eberhardt M, Riesinger I, Messerli M *et al.* Adult rat cardiomyocytes cultured in creatine-deficient medium display large mitochondria with paracrystalline inclusions, enriched for creatine kinase. *J Cell Biol* 1991; **113**:289-302.
153. Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 2002; **23**:4072-4079.
154. Foran DR. Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach. *J Forensic Sci* 2006; **51**:766-770.
155. Brinckmann A, Ruther K, Williamson K *et al.* De novo double mutation in PAX6 and mtDNA tRNA(Lys) associated with atypical aniridia and mitochondrial disease. *J Mol Med* 2007; **85**:163-168.
156. DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005; **37**:222-232.
157. Glaser T, Walton DS, Maas RL. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 1992; **2**:232-239.
158. Sisodiya SM, Free SL, Williamson KA *et al.* PAX6 haploinsufficiency causes cerebral malformation and olfactory dysfunction in humans. *Nat Genet* 2001; **28**:214-216.
159. van H, V, Williamson KA. PAX6 in sensory development. *Hum Mol Genet* 2002; **11**:1161-1167.
160. Simpson TI, Price DJ. Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 2002; **24**:1041-1051.
161. Petruzzella V, Papa S. Mutations in human nuclear genes encoding for subunits of mitochondrial respiratory complex I: the NDUFS4 gene. *Gene* 2002; **286**:149-154.
162. Braun RE, Lo D, Pinkert CA *et al.* Infertility in male transgenic mice: disruption of sperm development by HSV-tk expression in postmeiotic germ cells. *Biol Reprod* 1990; **43**:684-693.
163. Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 2003; **13**:476-484.
164. Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 2008; **41**:11-22.
165. Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol* 2008; **39**:223-235.

166. Formichi P, Malandrini A, Battisti C *et al.* DNA end labelling (TUNEL) in a 3 year old girl with Leigh syndrome and prevalent cortical involvement. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; **75**:930-932.
167. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; **146**:3-15.
168. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K *et al.* A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002; **2**:55-67.
169. van den HL, Smeitink J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetic diseases. *Bioessays* 2001; **23**:518-525.
170. Villani G, Attardi G. Polarographic assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 2007; **80**:121-133.
171. Wenchich L, Drahota Z, Honzik T *et al.* Polarographic evaluation of mitochondrial enzymes activity in isolated mitochondria and in permeabilized human muscle cells with inherited mitochondrial defects. *Physiol Res* 2003; **52**:781-788.
172. Robinson BH. Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 2006; **89**:3-13.
173. Vallance HD, Jeven G, Wallace DC, Brown MD. A case of sporadic infantile histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation. *Pediatr Cardiol* 2004; **25**:538-540.
174. Tsao CY, Herman G, Boue DR *et al.* Leigh disease with mitochondrial DNA A8344G mutation: case report and brief review. *J Child Neurol* 2003; **18**:62-64.
175. White HE, Durston VJ, Seller A, Fratter C, Harvey JF, Cross NC. Accurate detection and quantitation of heteroplasmic mitochondrial point mutations by pyrosequencing. *Genet Test* 2005; **9**:190-199.
176. Lombes A, Diaz C, Romero NB, Ziegler F, Fardeau M. Analysis of the tissue distribution and inheritance of heteroplasmic mitochondrial DNA point mutation by denaturing gradient gel electrophoresis in MERRF syndrome. *Neuromuscul Disord* 1992; **2**:323-330.
177. Sanger TD, Jain KD. MERRF syndrome with overwhelming lactic acidosis. *Pediatr Neurol* 1996; **14**:57-61.
178. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. MELAS and MERRF. The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain* 1998; **121**:1889-1894.
179. Wiedemann FR, Bartels C, Kirches E, Mawrin C, Wallesch CW. Unusual presentations of patients with the mitochondrial MERRF mutation A8344G. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; **110**:859-863.
180. Seibel P, Degoul F, Bonne G *et al.* Genetic biochemical and pathophysiological characterization of a familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF). *J Neurol Sci* 1991; **105**:217-224.
181. Klaus Golenhofen. Basislehrbuch Physiologie. 4 ed. Elsevier, Urban&Fischer; 2006.
182. Seibel P, Lauber J, Klopstock T, Marsac C, Kadenbach B, Reichmann H. Chronic progressive external ophthalmoplegia is associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Asn) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **204**:482-489.
183. Cardaioli E, Da PP, Malfatti E *et al.* Chronic progressive external ophthalmoplegia: a new heteroplasmic tRNA(Leu(CUN)) mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol Sci* 2008; **272**:106-109.
184. Laforet P, Lombes A, Eymard B *et al.* Chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers: clinical, morphological and genetic investigations in 43 patients. *Neuromuscul Disord* 1995; **5**:399-413.

185. Graf WD, Sumi SM, Copass MK *et al.* Phenotypic heterogeneity in families with the myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease point mutation in mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 1993; **33**:640-645.
186. Oldfors A, Holme E, Tulinius M, Larsson NG. Tissue distribution and disease manifestations of the tRNA(Lys) A-->G(8344) mitochondrial DNA mutation in a case of myoclonus epilepsy and ragged red fibres. *Acta Neuropathol* 1995; **90**:328-333.
187. Lertrit P, Noer AS, Byrne E, Marzuki S. Tissue segregation of a heteroplasmic mtDNA mutation in MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers) encephalomyopathy. *Hum Genet* 1992; **90**:251-254.
188. Tanno Y, Yoneda M, Tanaka K *et al.* Uniform tissue distribution of tRNA(Lys) mutation in mitochondrial DNA in MERRF patients. *Neurology* 1993; **43**:1198-1200.
189. Hudson G, Keers S, Yu Wai MP *et al.* Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *Am J Hum Genet* 2005; **77**:1086-1091.
190. Macmillan CJ, Shoubridge EA. Mitochondrial DNA depletion: prevalence in a pediatric population referred for neurologic evaluation. *Pediatr Neurol* 1996; **14**:203-210.
191. Blokhin A, Vyshkina T, Komoly S, Kalman B. Variations in mitochondrial DNA copy numbers in MS brains. *J Mol Neurosci* 2008; **35**:283-287.
192. Choi YS, Kim S, Pak YK. Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; **54** Suppl 2:S3-S9.
193. Bai RK, Wong LJ. Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. *J Mol Diagn* 2005; **7**:613-622.
194. Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Estivill X, Urbano-Marquez A, Nunes V. Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; **52**:284-289.
195. Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YH. Aging- and smoking-associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS Lett* 1998; **441**:292-296.
196. Barrientos A, Casademont J, Cardellach F *et al.* Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process. *Biochem Mol Med* 1997; **62**:165-171.
197. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 2000; **7**:2-15.
198. Gross NJ, Getz GS, Rabinowitz M. Apparent turnover of mitochondrial deoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat. *J Biol Chem* 1969; **244**:1552-1562.
199. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 2004; **13**:935-944.
200. Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J, Houstek J. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly. *Physiol Res* 2004; **53** Suppl 1:S213-S223.
201. Tiranti V, Galimberti C, Nijtmans L, Bovolenta S, Perini MP, Zeviani M. Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions. *Hum Mol Genet* 1999; **8**:2533-2540.
202. Williams SL, Valnot I, Rustin P, Taanman JW. Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem* 2004; **279**:7462-7469.
203. Stiburek L, Vesela K, Hansikova H *et al.* Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1. *Biochem J* 2005; **392**:625-632.

204. Berk AJ, Clayton DA. Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *J Mol Biol* 1974; **86**:801-824.
205. Kai Y, Takamatsu C, Tokuda K, Okamoto M, Irita K, Takahashi S. Rapid and random turnover of mitochondrial DNA in rat hepatocytes of primary culture. *Mitochondrion* 2006; **6**:299-304.
206. Dagda RK, Zhu J, Kulich SM, Chu CT. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy* 2008; **4**:770-782.
207. Hirai K, Aliev G, Nunomura A *et al.* Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; **21**:3017-3023.
208. Prosser J, van H, V. PAX6 mutations reviewed. *Hum Mutat* 1998; **11**:93-108.
209. Jordan T, Hanson I, Zaletayev D *et al.* The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1992; **1**:328-332.
210. Hanson IM, Seawright A, Hardman K *et al.* PAX6 mutations in aniridia. *Hum Mol Genet* 1993; **2**:915-920.
211. Ton CC, Hirvonen H, Miwa H *et al.* Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 1991; **67**:1059-1074.
212. Vincent MC, Pujo AL, Olivier D, Calvas P. Screening for PAX6 gene mutations is consistent with haploinsufficiency as the main mechanism leading to various ocular defects. *Eur J Hum Genet* 2003; **11**:163-169.
213. Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, Margo CE, Jackson L. Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol* 1984; **28**:621-642.
214. Callaerts P, Halder G, Gehring WJ. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 1997; **20**:483-532.
215. Glaser T, Jepeal L, Edwards JG, Young SR, Favor J, Maas RL. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet* 1994; **7**:463-471.
216. Singh S, Tang HK, Lee JY, Saunders GF. Truncation mutations in the transactivation region of PAX6 result in dominant-negative mutants. *J Biol Chem* 1998; **273**:21531-21541.
217. Tzoulaki I, White IM, Hanson IM. PAX6 mutations: genotype-phenotype correlations. *BMC Genet* 2005; **6**:27.
218. Malandrini A, Mari F, Palmeri S *et al.* PAX6 mutation in a family with aniridia, congenital ptosis, and mental retardation. *Clin Genet* 2001; **60**:151-154.
219. Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ohta S, Watanabe K. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J* 2001; **20**:4794-4802.
220. Corona P, Lamantea E, Greco M *et al.* Novel heteroplasmic mtDNA mutation in a family with heterogeneous clinical presentations. *Ann Neurol* 2002; **51**:118-122.
221. Spencer HG. Mutation-selection balance. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group; 2001 p. 1-5.
222. Santos C, Montiel R, Sierra B *et al.* Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol Biol Evol* 2005; **22**:1490-1505.
223. Levitt NC, Hickson ID. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med* 2002; **8**:179-186.
224. Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R *et al.* A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans. *Diabetes* 2002; **51**:3331-3335.

225. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C *et al.* Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 2000; **26**:435-439.
226. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; **227**:671-682.
227. Naimi M, Bannwarth S, Procaccio V *et al.* Molecular analysis of ANT1, TWINKLE and POLG in patients with multiple deletions or depletion of mitochondrial DNA by a dHPLC-based assay. *Eur J Hum Genet* 2006; **14**:917-922.
228. Agostino A, Valletta L, Chinnery PF *et al.* Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* 2003; **60**:1354-1356.
229. Filosto M, Tonin P, Scarpelli M *et al.* Novel mitochondrial tRNA Leu(CUN) transition and D4Z4 partial deletion in a patient with a facioscapulohumeral phenotype. *Neuromuscul Disord* 2008; **18**:204-209.
230. Gabellini D, Green MR, Tupler R. Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 2002; **110**:339-348.
231. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da CJ, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain* 1995; **118**:319-337.
232. Brown MD, Allen JC, Van Stavern GP, Newman NJ, Wallace DC. Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am J Med Genet* 2001; **104**:331-338.
233. Howell N, Miller NR, Mackey DA *et al.* Lightning strikes twice: Leber hereditary optic neuropathy families with two pathogenic mtDNA mutations. *J Neuroophthalmol* 2002; **22**:262-269.
234. Gropman A, Chen TJ, Perng CL *et al.* Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. *Am J Med Genet A* 2004; **124A**:377-382.
235. Mroczek-Tonska K, Kisiel B, Piechota J, Bartnik E. Leber hereditary optic neuropathy--a disease with a known molecular basis but a mysterious mechanism of pathology. *J Appl Genet* 2003; **44**:529-538.
236. Park CB, sin-Cayuela J, Camara Y *et al.* MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell* 2007; **130**:273-285.
237. Vahsen N, Cande C, Briere JJ *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 2004; **23**:4679-4689.
238. Sproule DM, Kaufmann P. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1142**:133-158.
239. Filosto M, Tomelleri G, Tonin P *et al.* Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep* 2007; **27**:23-30.
240. Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:8403-8410.
241. Udy GB, Parkes BD, Wells DN. ES cell cycle rates affect gene targeting frequencies. *Exp Cell Res* 1997; **231**:296-301.
242. Yu Y, Bradley A. Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* 2001; **2**:780-790.
243. Chretien D, Benit P, Chol M *et al.* Assay of mitochondrial respiratory chain complex I in human lymphocytes and cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **301**:222-224.

244. Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ *et al.* Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**:63-68.
245. Bentlage HA, Wendel U, Schagger H, ter Laak HJ, Janssen AJ, Trijbels JM. Lethal infantile mitochondrial disease with isolated complex I deficiency in fibroblasts but with combined complex I and IV deficiencies in muscle. *Neurology* 1996; **47**:243-248.
246. Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M. Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**:78-88.
247. DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985; **17**:521-538.
248. Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J* 2009; **32**:113-132.
249. Zwerschke W, Mazurek S, Stockl P, Hutter E, Eigenbrodt E, Jansen-Durr P. Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* 2003; **376**:403-411.
250. Schultz RA, Swoap SJ, McDaniel LD *et al.* Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1998; **273**:3447-3451.
251. Clay Montier LL, Deng JJ, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics* 2009; **36**:125-131.
252. Tang Y, Schon EA, Wilichowski E, Vazquez-Memije ME, Davidson E, King MP. Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDNA): new insights into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. *Mol Biol Cell* 2000; **11**:1471-1485.
253. Tang Y, Manfredi G, Hirano M, Schon EA. Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines. *Mol Biol Cell* 2000; **11**:2349-2358.
254. Ingraham CA, Burwell LS, Skalska J *et al.* NDUFS4: Creation of a Mouse Model Mimicking a Complex I Disorder. *Mitochondrion* 2009.
255. Love J, Axton R, Churchill A, van Heyningen V, Hanson I. A new set of primers for mutation analysis of the human PAX6 gene. *Hum Mutat* 1998; **12**:128-134.

9 Anhang

9.1 Ergänzungen zur Studie der Patientin A

9.1.1 Lokalisation einiger Gehirnstrukturen

Die folgende Abbildung soll die Komplexität des Gehirns verdeutlichen und zeigt die ungefähre Lage einiger Gehirnstrukturen, die ich in der Studie der Patientin A untersucht habe.

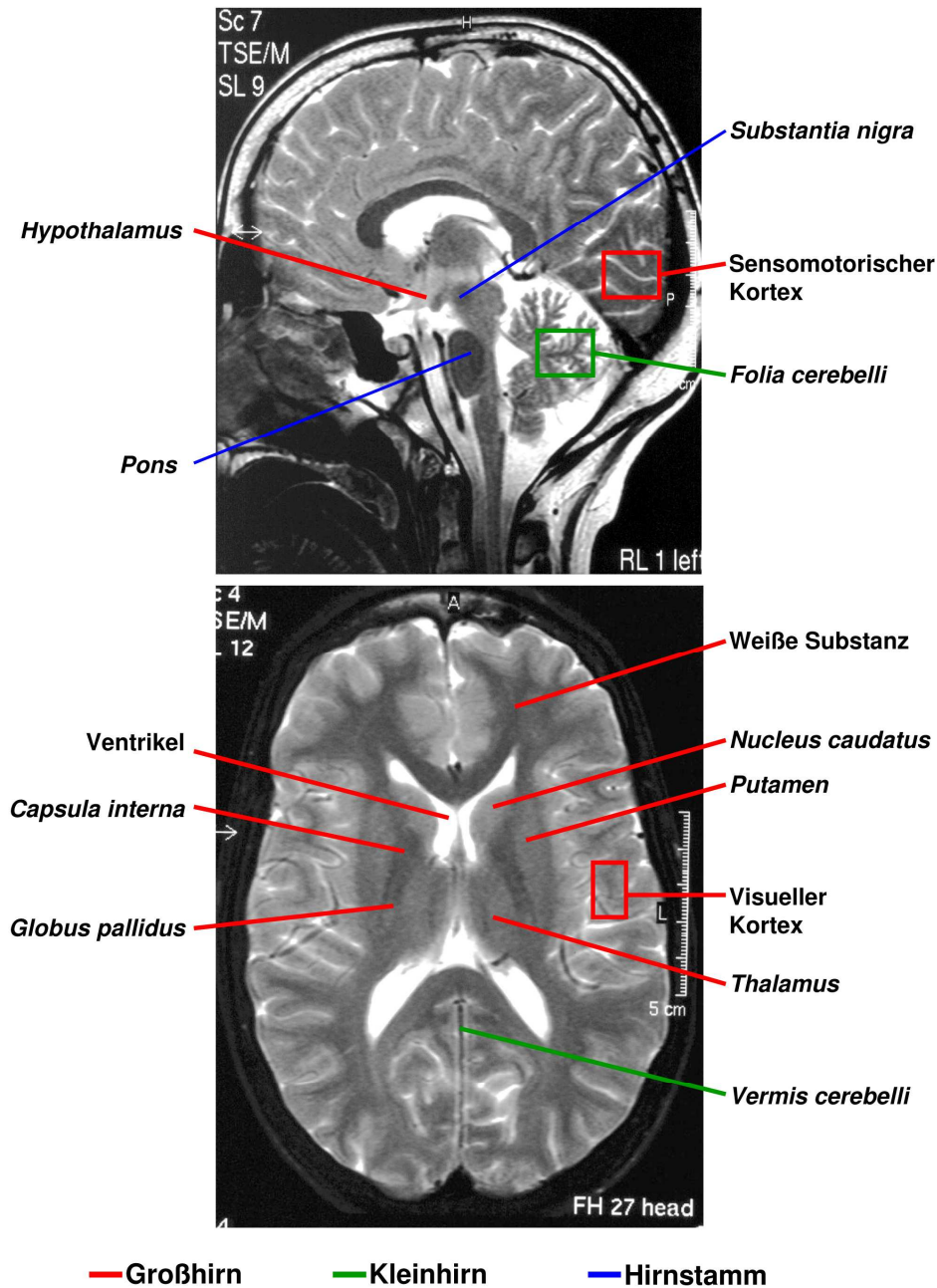


Abbildung 39: Darstellung der ungefähren Lage einiger Gehirnstrukturen am Beispiel der T₂-gewichteten Bilder des MRTs vom Schädel der Patientin A. oben: Transversalschnitt, unten: Sagittalschnitt.

9.1.2 Funktionen einiger Gehirnstrukturen

Für ein besseres Verständnis von der funktionellen Bedeutung der untersuchten Gehirngewebe, habe ich nachfolgend die wichtigsten Funktionen der einzelnen Strukturen aufgeführt.

Großhirn

Arteria cerebri media: Die *A. cerebri media* (lat. mittlere Gehirnschlagader) ist das größte Gehirnversorgende Gefäß beim Menschen. Die von ihr abgehenden kleineren Äste versorgen Teile des Großhirns und des Zwischenhirns mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Chiasma opticum: Das *Chiasma opticum* (griech.; Sehnerv(en)kreuzung) repräsentiert die Kreuzungsstelle der Sehnerven vom rechten und linken Auge.

Corpora mamillaria: Der Mamillarkörper ist beim Menschen eine kleine paarige Gehirnstruktur, die eine Schaltstelle des limbischen Systems (Steuerung übergeordneter vegetativer Funktionen) bildet.

Thalamus: Der *Thalamus* (griech.) bildet den größten Teil des Zwischenhirns. Er ist ein großes Integrations-, Koordinations- und Modulationszentrum für alle Signale, die zum Kortex (Gehirnrinde) gelangen bzw. davon ausgehen und übernimmt somit eine Schlüsselfunktion für die Sensorik, Motorik und Regulation des Bewusstseins.

Nucleus caudatus: Der *Nucleus caudatus* (lat. Schweifkern) ist ein paariges Kerngebiet im Inneren der Großhirnhemisphären. Er gehört zu den Basalganglien und ist für die Kontrolle willkürlicher Bewegungen mitverantwortlich.

Globus pallidus: Der *Globus pallidus* liegt ebenfalls als Kerngebiet paarig angeordnet im Inneren des Großhirns. Da auch er vor allem der Motorik dient, wird er funktionell den Basalganglien zugeordnet.

Putamen: Das *Putamen* (lat. Schale) gehört wie der *Nucleus caudatus* und der *Globus pallidus* zu den paarigen Kerngebieten des Großhirns. Als weiterer Teil der Basalganglien spielt auch er eine wichtige Rolle bei Kontrolle von Bewegungsabläufen.

Capsula interna: Die *Capsula interna* besteht aus weißer Substanz und einigen wichtige Nervenfaserverbindungen (z.B. Pyramiden- und Hörbahn), die von der Großhirnrinde zu tiefer liegenden Strukturen wie der Pons und dem Rückenmark verlaufen.

Hypothalamus: Der Hypothalamus dient als wichtigstes Regulationszentrum für alle vegetativen und endokrinen Vorgänge. Er steuert unter anderem Atmung, Kreislauf, Körpertemperatur, Wasser- und Nahrungsaufnahme.

Hippocampus: Der *Hippocampus* ist eine paarige, zeldichte Struktur im Großhirn. Er stellt eine zentrale Schaltstelle des limbischen Systems dar und ist hauptsächlich an der Gedächtnisbildung beteiligt. Darüber hinaus spielt er eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Epilepsien.

Sensomotorischer Kortex: Der sensomotorische Kortex ist ein umschriebener Anteil der Großhirnrinde, welcher der zentralen Verarbeitung von Reizsignalen wie Berührung, Druck, Temperatur und zum Teil auch Schmerz dient.

Visueller Kortex: Im visuellen Kortex, welcher auch als Sehrinde bezeichnet wird, werden visuell wahrgenommene Signale zentral verarbeitet.

Weißer Substanz: Als weiße Substanz werden die Teile des Zentralnervensystems (ZNS) bezeichnet, die aus Nervenfasern (Axonen und Neuronen) bestehen. Die Zellkörper der Nerven präsentieren hingegen die graue Substanz des ZNS. Im Gehirn liegt die weiße Substanz innen und wird von der grauen Substanz umgeben.

Plexus chorioideus: Der *Plexus chorioideus* ist ein verzweigtes Adergeflecht im Ventrikelsystem des Gehirns. Es bildet die Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit durch Ultrafiltration des Blutes.

Kleinhirn

Das Kleinhirn hat eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Motorik und ist zuständig für Koordination, Feinabstimmung, unbewusste Planung und das Erlernen von Bewegungsabläufen. Strukturell kann es in verschiedene Bereiche untergliedert werden:

Vermis cerebelli: Als *Vermis cerebelli* (lat.: Kleinhirnwurm) wird der gesamte Mittelbereich zwischen den beiden Kleinhirnhemisphären bezeichnet.

Folia cerebelli: Die Kleinhirnrinde, oder auch *Folia cerebelli* genannt, setzt sich aus zahlreichen blattförmigen Windungen zusammen, die eine starke Oberflächenvergrößerung bewirken.

Medulla cerebelli: Als *Medulla cerebelli* wird das Kleinhirnmark bezeichnet, welches die myelinhaltigen Nervenfasern und Oligodendrozyten beinhaltet.

Hirnstamm

Pons: Der *Pons* (Brücke) wird von zahlreichen Nervenfasern durchzogen und enthält einige Ansammlungen von Nervenzellkörpern, welche als Umschaltstation der Verbindungen zwischen Groß- und Kleinhirn fungieren.

Substantia nigra: Die *Substantia nigra* ist ein Kernkomplex im Bereich des Mittelhirns und vermittelt Signale, die besonders auf die Planung und den Beginn einer Bewegung wirken.

9.1.3 MtDNA-Kopienzahlen in verschiedenen Geweben der Patientin A im Vergleich zu Kontrollgeweben

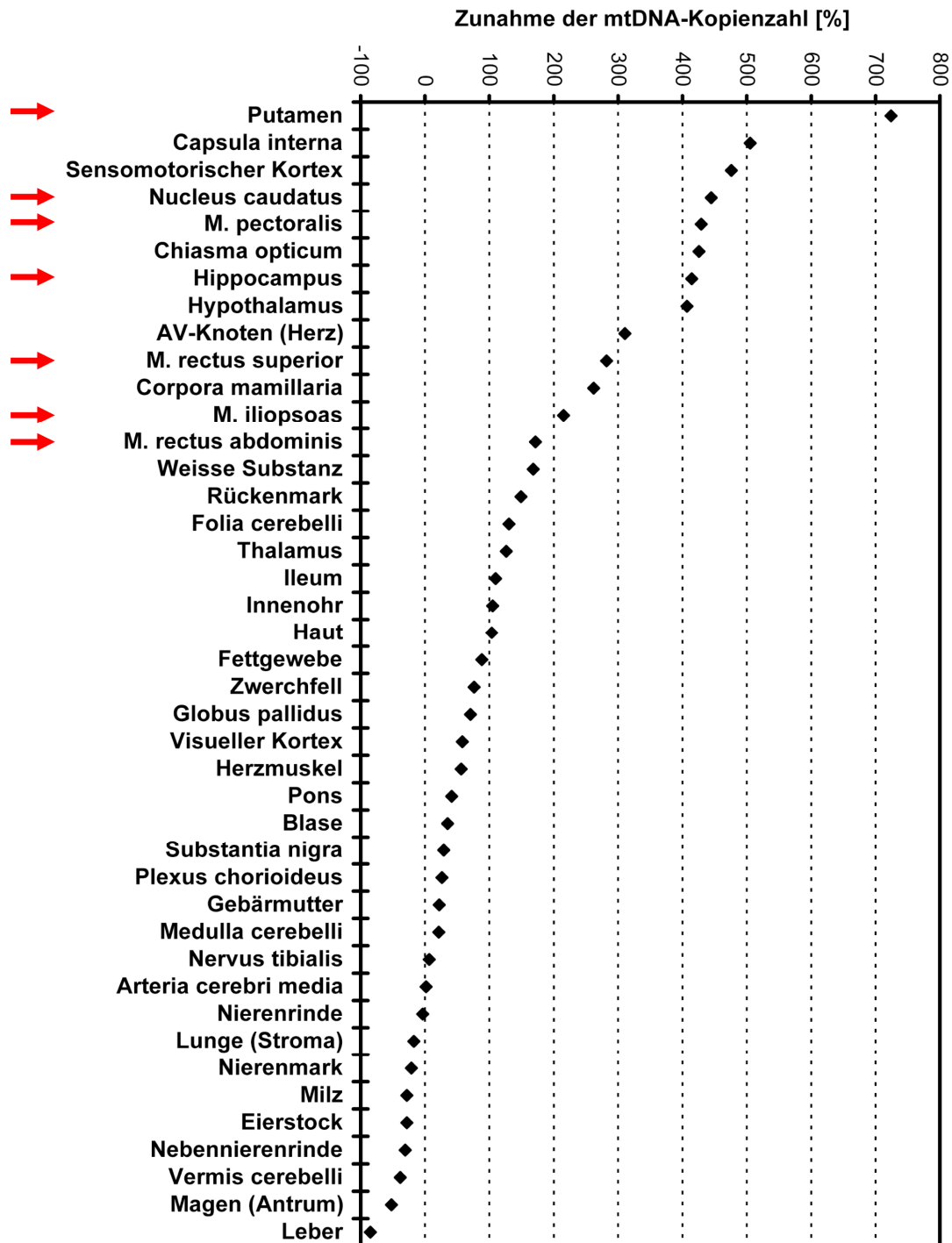


Abbildung 40: Prozentuale Zu- bzw. Abnahme der absoluten mtDNA-Kopienzahlen pro Zelle in den Geweben der Patientin A im Vergleich zu den Kontrollgeweben. Der 0-Wert kennzeichnet die ermittelten mtDNA-Mengen in den Geweben der Kontrollindividuen. Die am stärksten betroffenen Gehirnregionen und Muskeln, sowie der Augenmuskel der Patientin sind durch rote Pfeile markiert. Aus Übersichtsgründen habe ich die Messwerte entsprechend der Zunahme der mtDNA-Kopienzahlen (von oben nach unten abnehmend) sortiert.

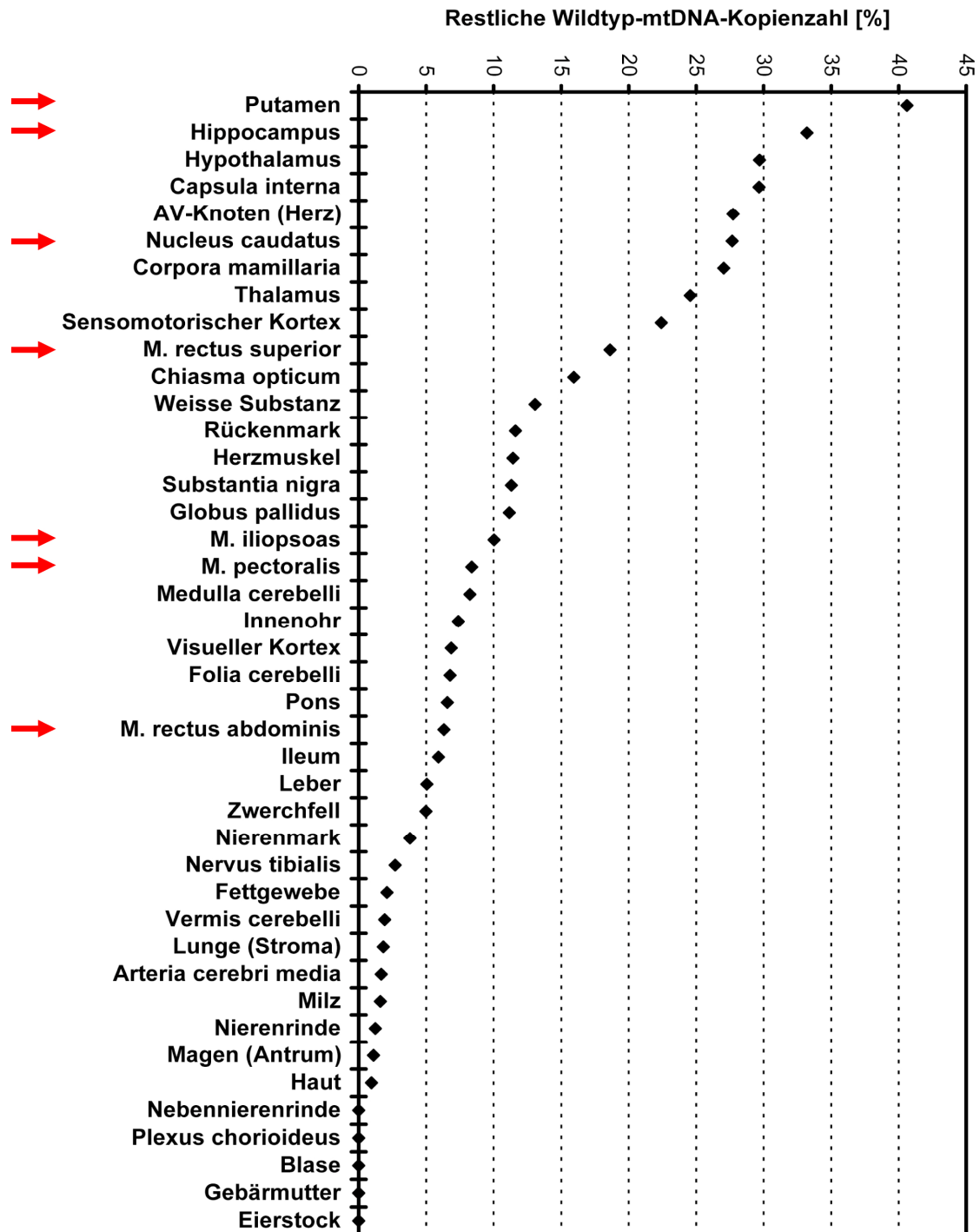


Abbildung 41: Darstellung der „restlichen“ Wildtyp-mtDNA-Kopien in den Geweben der Patientin A, prozentual zu den, in den Kontrollgeweben ermittelten mtDNA-Kopienzahlen. Die roten Pfeile kennzeichnen wiederum die klinisch am stärksten betroffenen Gehirnregionen und die untersuchten Muskeln der Patientin. Die Sortierung der Werte erfolgte hier entsprechend der Prozentzahlen „restlicher“ Wildtyp-mtDNA-Kopien in den Patientengeweben (von oben nach unten abnehmend).

9.2 Abkürzungsverzeichnis

Neben den gängigen Abkürzungen der geschriebenen deutschen Sprache und naturwissenschaftlichen Einheiten wurden die nachfolgenden Abkürzungen verwendet. Genbezeichnungen erfolgten gemäß der internationalen Konvention kursiv und Proteinbezeichnungen nicht kursiv.

| | |
|-------------------|--|
| ADP | Adenosin-5'-Diphosphat |
| AMV | engl.: avian myeloblastosis virus |
| ANT1 | Adenin-Nukleotid-Translokator 1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserum Albumin (engl.: bovine serum albumin) |
| CCD | engl.: charge-coupled device |
| cDNA | komplementäre DNA (engl.: complementary DNA) |
| cM | Centimorgan |
| Co1 | Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1 |
| COX | Cytochrom c Oxidase |
| CPEO | Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie |
| Cre | eng.: causes recombination |
| CS | Citrat-Synthase |
| Cyt c | Cytochrom c |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-Triphosphat |
| dB | Dezibel |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-Triphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid) |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| ECL | elektrochemische Lumineszenz |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraacetat |
| ES-Zellen | embryonale Stammzellen |
| <i>et al.</i> | und andere (lat.: et alterae) |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FADH ₂ | reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FKS | fetales Kälberserum |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| FSHD | Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| gDNA | nukleäre (genomische) DNA |

| | |
|--------|---|
| HRP | Meerrettich Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase) |
| HSV | Herpes Simplex Virus |
| IQ | Intelligenzquotient |
| kbp | Kilobasenpaare |
| KCN | Kaliumcyanid |
| kDa | Kilodalton |
| KSS | Kearns-Sayre-Syndrom |
| LHON | Leber's hereditäre Optikusneuropathie |
| LIF | engl.: leukemia inhibitory factor |
| MEFs | embryonale Mausfibroblasten (engl.: embryonic mouse fibroblasts) |
| MELAS | Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktat-Azidose und schlaganfallähnliche Episoden |
| MERRF | Myoklonusepilepsie mit „ragged-red“-Fasern |
| MMP1 | Matrixmetalloproteinase 1 |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| mRNA | Boten-RNA (engl.: messenger RNA) |
| mtCK | mitochondriale Kreatin-Kinase |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| MTTK | mitochondriale Transfer-RNA Lysin |
| µm | Mikrometer |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NADH | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NB | beachte wohl (lat.: nota bene) |
| ND1 | NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Untereinheit 1 |
| NDUFS4 | NADH Dehydrogenase (Ubichinon) Fe-S Protein 4 |
| NDUFV1 | NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Flavoprotein 1 |
| Neo | Neomycin |
| nK | Negativkontrolle |
| nm | Nanometer |
| NMD | engl.: nonsense mediated messenger RNA decay |
| NRF1 | nukleärer respiratorischer Faktor 1 |
| NRF2 | nukleärer respiratorischer Faktor 2 |
| nt | Nukleotid |
| OD | optische Dichte |
| PAX6 | engl.: paired-box gene 6 |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction) |
| Pen | Penicillin |
| PEO | Progressive externe Ophtalmoplegie |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pK | Positivkontrolle |

| | |
|-----------------|--|
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PP _i | Pyrophosphat |
| qPCR | quantitative PCR |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid) |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate) |
| SEM | Standardabweichung der Mittelwerte (engl.: standard error of the mean) |
| SNP | Einzelnukleotidpolymorphismus (engl.: single nucleotide polymorphism) |
| SSC | Citratpuffer (engl.: saline-sodium citrate) |
| Strep | Streptomycin |
| SURF1 | Surfeit 1 |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TFAM | mitochondrialer Transkriptionsfaktor A |
| TK | Thymin-Kinase |
| TMPD | Tetramethylphenyldiamin |
| Tris | Tri(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNA | Transfer-RNA |
| UCP2 | engl.: uncoupling protein 2 |
| URL | engl.: uniform resource locator |
| UTR | untranslatierte Region |
| VDAC1 | engl.: voltage-dependent anion channel 1 |
| Wt | Wildtyp |

9.3 Datenbanken/URLs

| | |
|-------------------------------------|---|
| MITOMAP | http://www.mitomap.org |
| WORLD MEDICAL ASSOCIATION | http://www.wma.net |
| HUMAN PAX6 ALLELIC VARIANT DATABASE | http://lsdb.hgu.mrc.ac.uk |
| CLUSTAL | http://www.clustal.org |
| HUMAN MITOCHONDRIAL GENOME DATABASE | http://www.genpat.uu.se/mtDB/ |

9.4 Firmenverzeichnis

Tabelle 14: Firmenverzeichnis

| Firma | Stadt | Land |
|---|------------------|-------------|
| Abcam | Cambridge | UK |
| Applichem | Darmstadt | Deutschland |
| Applied Biosystems (Ambion) | Darmstadt | Deutschland |
| BD Biosciences | Heidelberg | Deutschland |
| Biometra | Göttingen | Deutschland |
| Bio-Rad | München | Deutschland |
| Biotage (Pyrosequencing) | Uppsala | Schweden |
| Brand | Wertheim | Deutschland |
| Carl Roth | Karlsruhe | Deutschland |
| Charles River Laboratories, Inc. | Sulzfeld | Deutschland |
| Diagnostic Instruments, Inc. | Sterling Heights | USA |
| DNASTAR, Inc. | Madison | USA |
| Dr. L. Fischer | Heidelberg | Deutschland |
| DuPont NEN | Bad Homburg | Deutschland |
| Eppendorf | Hamburg | Deutschland |
| Epson | Meerbusch | Deutschland |
| Eurogentec | Köln | Deutschland |
| Fermentas GmbH | St. Leon-Rot | Deutschland |
| FileMaker, Inc. | Unterschleißheim | Deutschland |
| Finnzymes | Espoo | Finnland |
| GE Healthcare (Amersham Biosciences) | München | Deutschland |
| GMI, Inc. (MJ Research) | Ramsey | USA |
| Greiner Bio-One | Frickenhausen | Deutschland |
| Hartmann Analytic GmbH | Braunschweig | Deutschland |
| Hielscher | Teltow | Deutschland |
| Hofer | Holliston | USA |
| IKA Labortechnik | Staufen | Deutschland |
| Invitrogen (Life Technologies, Gibco BRL) | Karlsruhe | Deutschland |
| Kodak AG | Stuttgart | Deutschland |
| Menzel | Braunschweig | Deutschland |
| Merck (Calbiochem) | Darmstadt | Deutschland |
| Microm | Walldorf | Deutschland |
| MitoSciences | Eugene | USA |
| MWG Biotech AG | Ebersberg | Deutschland |
| New England Biolabs | Frankfurt a. M. | Deutschland |
| PAA | Pasching | Österreich |
| Promega | Mannheim | Deutschland |
| Qiagen | Hilden | Deutschland |
| Roche (Boehringer Mannheim) | Grenzach-Wyhlen | Deutschland |
| Santa Cruz Biotechnology | Heidelberg | Deutschland |

| Firma | Stadt | Land |
|--|-------------|-------------|
| Sarstedt | Nürnberg | Deutschland |
| SAS Institute, Inc. | Cary | USA |
| Sigma-Aldrich (Sigma) | Taufkirchen | Deutschland |
| Stratagene | La Jolla | USA |
| TAKARA Bio Inc. | Otsu | Japan |
| Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific, Nunc) | Dreieich | Deutschland |
| TIB MOLBIOL | Berlin | Deutschland |

9.5 Verwendete Oligonukleotide

9.5.1 Studie Patientin A

Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung der *mt.tRNA^{Lys}*

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|------|-----------------------|--------------|----------|--------------------|
| S721 | TTTCATGCCCATCGTCCTAGA | mt.8200-8220 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S779 | ATGCCCATCGTCCTAGAAT | mt.8204-8222 | Seq | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S722 | TTTGGTGAGGGAGGTAGGTGG | mt.8464-8484 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |

Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide für die Pyrosequenzierung (m.8344A→G)

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|------|-----------------------------|--------------|-------------------|--------------------|
| S848 | CCCTATAGCACCCCCTCTAC | mt.8262-8281 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S849 | Biotin-TGGGCCATACGGTAGTATTT | mt.8377-8396 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S850 | TAAGTTAAAGATTAAGAGA | mt.8325-8343 | Pyrosequenzierung | <i>mt.tRNA Lys</i> |

Tabelle 17: Verwendete Oligonukleotide für die quantitative *real-time* PCR (TaqMan)

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|-------|---|-----------------|----------|-----------------------|
| S879 | GCCAGGGTACTGCACTAGCATG | Intron 7 | PCR | <i>MMP1</i> (gDNA) |
| S880 | GAGGCCCTAACATTCTCTGCACT | Intron 8 | PCR | <i>MMP1</i> (gDNA) |
| S407 | FAM-TGTGCTACACGGATACCCCAAGG ACATC-TAMRA | Exon 8 | Sonde | <i>MMP1</i> (gDNA) |
| S1110 | CTACAACCCTTCGCTGACGC | mt.3442-3461 | PCR | <i>MT-ND1</i> (mtDNA) |
| S1111 | ACGGCTAGGCTAGAGGTGGC | mt.3625-3644 | PCR | <i>MT-ND1</i> (mtDNA) |
| S1243 | FAM-CCATCACCCCTCTACATCACCGCC C-Dabcyl | mt.3506-3529 | Sonde | <i>MT-ND1</i> (mtDNA) |
| S790 | CTTCCCCACTGGCCTCAAG | Exon 3 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S791 | CCAAAACCCAGTGATCCAGC | Intron 3 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S792 | FAM-AGCCCTCAGATGGCAGGTTTGT GG-TAMRA | Exon 3/Intron 3 | Sonde | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S787 | TGCTAGCCGCAGGCATTAC | 5929-5947 | PCR | <i>mt-Co1</i> (mtDNA) |
| S788 | GGGTGCCCAAAGAATCAGAAC | 6029-6049 | PCR | <i>mt-Co1</i> (mtDNA) |
| S789 | FAM-AACCTAAACACAACCTTTCTTTGAT CCCGCTGG-TAMRA | 5967-5998 | Sonde | <i>mt-Co1</i> (mtDNA) |

9.5.2 Studie Patient B

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Analyse des *PAX6*-Gens verwendet wurden, sind in den Publikationen von Love *et al.* (1998)²⁵⁵ und Morrison *et al.* (2002)¹⁴⁰ aufgeführt.

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung der mitochondrialen tRNAs

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|------|-------------------------------|----------------|-----------|---|
| S168 | CCCATCCTACCCAGCACACACA | mt.500-521 | PCR | <i>mt.tRNA Phe</i> |
| S169 | GGGTGAACTCACTGGAACGG | mt.707-726 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNA Phe</i> |
| S172 | CAAGTATACTTCAAAGGACATT | mt.1500-1521 | PCR | <i>mt.tRNA Val</i> |
| S175 | CGCCTATACTTTATTTGGGTAA | mt.1729-1750 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNA Val</i> |
| S719 | CCGGAGTAATCCAGGTCGGT | mt.3077-3096 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNA Leu1</i> |
| S720 | GCATTAGGAATGCCATTGCG | mt.3351-3370 | PCR | <i>mt.tRNA Leu1</i> |
| S428 | CCAGCATTCCCCCTCAAACCTA | mt.4280-4301 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Ile, Gln, Met</i> |
| S197 | AAGATGGTAGAGTAGATGACGG | mt.4489-4510 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Ile, Gln, Met</i> |
| S203 | CGCTACTCCTACCTATCTCC | mt.5470-5489 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr</i> |
| S210 | AGAATAGTCAACGGTCGGCG | mt.5909-5928 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr</i> |
| S723 | AACCTGGAGTGACTATATGGATGCC | mt.7374-7398 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Ser1, Asp</i> |
| S724 | TGAAAGGTGATAAGCTCTTCTATGATAGG | mt.7628-7656 | PCR | <i>mt.tRNAs Ser1, Asp</i> |
| S721 | TTTCATGCCCATCGTCCTAGA | mt.8200-8220 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S779 | ATGCCCATCGTCCTAGAAT | mt.8204-8222 | Seq. | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S722 | TTTGGTGAGGGAGGTAGGTGG | mt.8464-8484 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| S256 | GAAGCCGCCGCCTGATACTG | mt.9912-9931 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Gly, Arg</i> |
| S265 | GAGGATATGAGGTGTGAGCG | mt.10536-10555 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Gly, Arg</i> |
| S280 | GGACTTCAAACCTACTCCC | mt.11798-11817 | PCR | <i>mt.tRNAs His, Ser2, Leu2</i> |
| S281 | TTCTCCTCCTATCCCTCAAC | mt.12090-12109 | Seq. | <i>mt.tRNAs His, Ser2, Leu2</i> |
| S287 | AGGGTTAGGGTGGTTATAGT | mt.12352-12371 | Seq. | <i>mt.tRNAs His, Ser2, Leu2</i> |
| S288 | AACTTCTTGGTCTAGGCACA | mt.12500-12519 | PCR | <i>mt.tRNAs His, Ser2, Leu2</i> |
| S304 | CACACCCGACCACACCGCTA | mt.14553-14572 | PCR | <i>mt.tRNA Glu</i> |
| S311 | AGGTCGATGAATGAGTGGTT | mt.14767-14786 | Seq. | <i>mt.tRNA Glu</i> |
| S312 | TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG | mt.14790-14816 | PCR | <i>mt.tRNA Glu</i> |
| S324 | GCATCCGTA CTATACTTCAC | mt.15806-15825 | PCR, Seq. | <i>mt.tRNAs Thr, Pro</i> |
| S327 | GAGTCAATACTTGGGTGGTA | mt.16050-16069 | PCR | <i>mt.tRNAs Thr, Pro</i> |

Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotide für die Pyrosequenzierung (m.8347A→G)

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|----------|-------------------------------|--------------|----------|--------------------|
| mtDNA1 F | Biotin-TTTACCCTATAGCACCCCCTCT | mt.8258-8279 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|----------|-------------------------|--------------|-------------------|--------------------|
| mtDNA1 R | CGGTAGTATTTAGTTGGGGCATT | mt.8365-8387 | PCR | <i>mt.tRNA Lys</i> |
| mtDNA1 S | ATTTCACTGTAAAGAGGTGT | mt.8348-8367 | Pyrosequenzierung | <i>mt.tRNA Lys</i> |

9.5.3 Studie Patientin C – Mausmodell

Tabelle 20: Verwendetes Oligonukleotid für die *in situ*-Hybridisierung

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|------|---|--------------|--------------------------------|----------------------|
| S797 | TGTCCAGTTTCCCAAAGGGATGA-GAAATTGTCAGGCTAGGGTGTGG | Exon 10 | <i>in situ</i> -Hybridisierung | <i>Ndufv1</i> (mRNA) |

Tabelle 21: Verwendete Oligonukleotide zur Überprüfung der *Ndufv1*-Sequenz des Targeting-Vektors

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|-------|---------------------------|-----------------|---------------|----------------------|
| S64 | GGTATCTGTGCGTTTCAGCGGCG | Exon 1 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S782 | TCGGAGTTGTGAAGGTGACA | Exon 1 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1887 | AGTTTTTATCCAGACCG | Intron 1 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S66 | CCCAAGAAAACCTCATTTGGCTC | Exon 2 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1710 | TGAAGGAGAAGTCCTGCTCTG | Intron 2 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S31 | AAGTGGAGCTTCATGAATAAGCC | Exon 3 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1471 | TGCCATCTGAGGGCTTATTC | Exon 3 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1888 | ACGACCAAGAACTGAAT | Intron 3 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S30 | TTCACCACCAGATACTTGGGCCTGC | Intron 3/Exon 4 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S32 | CAGGCCCAAGTATCTGGTGG | Intron 3/Exon 4 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1732 | ACAGTAGGGCTGGGGAACCT | Intron 4 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S87 | AGGACATCCACTAACAAGAGTCAT | Intron 5 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1404 | CTCCAAAGGGCACAGAAAAA | Intron 5 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1733 | GGCATCCAAACACTCCTTCA | Intron 5/Exon 6 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S53 | ACAAGTGTGGCCAAYGTGGAGA | Exon 6 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S56 | ACTTCGATGCACTGGTGCAGGC | Exon 7 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S43 | GTGGCCAGTGTACCCCATG | Exon 8 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S74 | GCTTTTCTGCCCTCCATACCTCAC | 3'-UTR | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S76 | AAAGGGCAGACTCCGAGCTGG | 3'-UTR | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S82 | GCTGTGCCAGGTCATAGTCCCA | 3'-UTR | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S84 | CGGACAAAGGGTCTGAGTAGCCATT | 3'-UTR | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |

Tabelle 22: Verwendete Oligonukleotide zur Überprüfung der *Ndufv1*-cDNA-Sequenz der Maus

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|------|-----------------------|--------------|-------------------------|---------------------------------|
| S780 | GGGAAGCCGAACATACTGAA | Exon2 | Kontrolle cDNA-Synthese | β -2-Mikroglobulin (cDNA) |
| S781 | TGCTTGATCACATGTCTCGAT | Exon 3 | Kontrolle cDNA-Synthese | β -2-Mikroglobulin (cDNA) |
| S782 | TCGGAGTTGTGAAGGTGACA | Exon 1 | PCR, Seq. | <i>Ndufv1</i> (cDNA) |
| S783 | ATTGTCAGGCTAGGGTGTGG | Exon 10 | PCR, Seq. | <i>Ndufv1</i> (cDNA) |

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|-----|-------------------------|--------------|---------------|----------------------|
| S31 | AAGTGGAGCTTCATGAATAAGCC | Exon 3 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (cDNA) |
| S53 | ACAACGTGGCCAAAYGTGGAGA | Exon 6 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (cDNA) |
| S56 | ACTTCGATGCACTGGTGCAGGC | Exon 7 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (cDNA) |

Tabelle 23: Verwendete Oligonukleotide zum Nachweis der c.1022C→T *Ndufv1*-Targeting-Mutation und der c.100T→C *Ndufv1*-Mutation

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|-------|-----------------------|--------------|-------------------|----------------------|
| S1337 | AACATCTCTGGCCATGTCAAC | Exon 6 | PCR (für RFLP) | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S46 | CATGGGGTACACTGGCCA | Exon 8 | PCR (für RFLP) | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1715 | TAAATGGTGGTCGGGAGCTA | Intron 1 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1716 | TTCATCTCACCCAAGATCCA | Exon 3 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1710 | TGAAGGAGAAGTCCTGCTCTG | Intron 2 | Sequenzierung | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |

Tabelle 24: Verwendete Oligonukleotide zur Kontrolle der homologen bzw. *Cre*-vermittelten Rekombination

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| S100 | TATTGAATATGATC- GGAATTCCTGCAGCCC | 5' des <i>Ndufv1</i> - Gens | <i>long range</i> PCR | rekombinantes <i>Ndufv1</i> |
| S101 | GTAATTCTCCAAGGCACACG- GATGCTCA | Neo-/TK- Kassette | <i>long range</i> PCR | rekombinantes <i>Ndufv1</i> |
| S96 | TACTTGTCTGACATGAGCAG- CAAACCCTTC | 3' des <i>Ndufv1</i> - Gens | <i>long range</i> PCR | rekombinantes <i>Ndufv1</i> |
| S99 | GAAGCGGTCGACTA- GAGCTTGCGGAACCCCT | Neo-/TK- Kassette | <i>long range</i> PCR | rekombinantes <i>Ndufv1</i> |
| S36 | GGCCTACATCTGTGGAGAGG | Exon 5 | loxP-PCR | rekombinantes <i>Ndufv1</i> |
| S54 | GTKGTTGACRTGGCCAGAGATGTT | Exon 6 | loxP-PCR | rekombinantes <i>Ndufv1</i> |

Tabelle 25: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der Southern-Blot-Sonden

| Nr. | Sequenz (5'-3') | Lokalisation | Funktion | Ziel |
|-------|----------------------------|--------------------------------|----------|--------------------------|
| S851 | TTTGTTCTAGAGCTGGGTTCTGAAG | 5' des <i>Ndufv1</i> - Gens | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S852 | GAGAAAATTAGTTGGACTACAGCGGA | Intron 1 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S853 | TCCACTGCCTGGCAGACCATC | 3' des <i>Ndufv1</i> - Gens | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S854 | CACGCACTGTTGAGGCACC | 3' des <i>Ndufv1</i> - Gens | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S345 | CTTGGGTGGAGAGGCTATTC | Neo-/TK- Kassette | PCR | <i>Targeting</i> -Vektor |
| S346 | AAGGTGAGATGACAGGAGAT | Neo-/TK- Kassette | PCR | <i>Targeting</i> -Vektor |
| S1337 | AACATCTCTGGCCATGTCAAC | Exon 6 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |
| S1338 | AAGTCCATTAGCACGGTCTCA | Exon 7 | PCR | <i>Ndufv1</i> (gDNA) |

Die verwendeten Oligonukleotide für die quantitative *real-time* PCR (TaqMan) zur Untersuchung der mtDNA-Kopienzahl in kultivierten MEFs sind der Tabelle 17 zu entnehmen (Nr.: S790, S791, S792, S787, S788, S789).

9.6 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Dissertation nicht veröffentlicht.

9.7 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Brinckmann, A., Weiss, C., Zwirner, A., Stoltenburg-Didinger G, Wilichowski, E., Schuelke, M. (2009) Organ specific increase of mtDNA copy numbers in myoclonic epilepsy with ragged-red fibers (MERRF-syndrome). – in Bearbeitung

Brinckmann, A., Rütter, K., Williamson, K., Lorenz, B., Lucke, B., Nürnberg, P., Trijbels, F., Janssen, A., Schuelke, M. (2007) De novo double mutation in PAX6 and mtDNA tRNA(Lys) associated with atypical aniridia and mitochondrial disease. *J Mol Med* 85: 163–168.

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Posterpräsentation vorgestellt:

Brinckmann, A., Weiss, C., Zwirner, A., Wilichowski, E., Schuelke, M. (2008) The effect of the MERRF mutation (8344A→G) on mtDNA copy numbers in different organs. *The seventh European Meeting on Mitochondrial Pathology (EUROMIT 7)*.

Weitere Publikationen:

Märschenz, S., **Brinckmann, A.**, Nürnberg, P., Krüger, D.H., Günther, S., Meisel, H. (2008) Co-replication analysis of naturally occurring defective hepatitis B virus variants with wild-type. *Virology* 372: 247-259.

Brinckmann, A., Mischung, C., Bässmann, I., Kühnisch, J., Schuelke, M., Tinschert, S., Nürnberg, P. (2007) Detection of novel NF1 mutations and rapid mutation prescreening with Pyrosequencing. *Electrophoresis* 28: 4295-4301.

Märschenz, S., Endres, A.S., **Brinckmann, A.**, Heise, T., Kristiansen, G., Nürnberg, P., Krüger, D.H., Günther, S., Meisel, H. (2006) Functional analysis of complex hepatitis B virus variants associated with development of liver cirrhosis. *Gastroenterology* 131: 765-780.

Ruf, N., Dünzinger, U., **Brinckmann, A.**, Haaf, T., Nürnberg, P., Zechner, U. (2006) Expression profiling of uniparental mouse embryos is inefficient in identifying novel imprinted genes. *Genomics* 87: 509-519.

Yue, Y., Stout, K., Grossmann, B., Zechner, U., **Brinckmann, A.**, White, C., Pilz, D.T., Haaf, T. (2006) Disruption of TCBA1 associated with a *de novo* t(1;6)(q32.2;q22.3) presenting in a child with developmental delay and recurrent infections. *J Med Genet* 43: 143-147.

Uhlmann, K.*, **Brinckmann, A.***, Toliat, M.R., Ritter, H., Nürnberg, P. (2002) Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 23: 4072-4079.

* Die Autoren haben zu gleichen Teilen zur Arbeit/ Veröffentlichung beigetragen.

9.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die mich auf unterschiedliche Weise bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Die Patienten und ihre Familien haben durch ihr Einverständnis zur Teilnahme an den vorliegenden Studien die durchgeführten Untersuchungen ermöglicht.

Ein besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Markus Schülke-Gerstenfeld für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die fachliche Betreuung der Arbeit sowie seine wertvollen Anregungen beim Verfassen der Promotionsschrift.

Herrn Prof. Dr. Stephan Sigrist danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schülke möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie die kleineren und größeren Hilfestellungen und Tipps im Laboralltag bedanken. Vor allem bin ich Barbara Lucke für die vielen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und ihren unvergleichlichen, motivierenden Optimismus dankbar.

Angelika Zwirner danke ich aus tiefstem Herzen für die exzellente technische Unterstützung, ihr joviales Engagement und die vergnüglichen Mittagspausen in der „heißen“ Schreibphase der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich zudem bei allen Kooperationspartnern, die durch ihre Arbeit wesentlich zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben: bei Frau Dr. Elvira Rohde (Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) für die überaus freundliche Einführung in die „Welt“ embryonaler Mausstammzellen, bei Frau Prof. Dr. Anja Bräuer (Institut für Zell- und Neurobiologie, Charité, Berlin) für die Unterstützung bei der Durchführung der *in situ* Hybridisierung, bei Frau Petra Schrade (Abteilung für Elektronenmikroskopie, Charité, Berlin) für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Mausembryonen, bei Herrn Prof. Dr. Ekkehard Wili-chowski (Abteilung für Neuropädiatrie, Georg-August-Universität, Göttingen) für die zur Verfügung gestellten DNA-Proben der Familienmitglieder der Patientin A, bei Dr. Antoon Janssen und Dr. Richard Rodenburg (Abteilung für Pädiatrie, Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders, Nijmegen, Niederlande) für die Durchführung der spektrophotometrischen Messungen der Atmungskettenaktivitäten an isolierten Mitochondrien, bei Dr. Hagen Wende (Abteilung für Entwicklungsbiologie und Signaltransduktion, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) für die überaus hilfreichen Anregungen und Tipps bei der Generierung des Maus-Modells sowie bei Frau Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger (Abteilung für Neuropathologie, Charité, Berlin) für die Durchführung der Muskelhistologie im Rahmen der Studie der Patientin A.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern für ihre fortwährende, unersetzliche Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit, Alexander Hoff, der mich mit unermüdlicher Geduld durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre begleitet hat und meinen Freunden, die mir trotz weniger gemeinsamer Zeit treu geblieben sind.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Berlin, den

Anja Brinckmann