

Charakterisierung einer neuen Form der
Mitochondriopathie mit funktioneller Analyse
des auslösenden mutanten Gens *YME1L1*

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

Bianca Hartmann
aus Brandenburg/Havel

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2013 bis März 2017 unter der Anleitung von Prof. Dr. Angela M. Kaindl am Institut für Zell- und Neurobiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Frau Hartmann wurde zur Durchführung ihrer Forschungsarbeiten durch Promotionsstipendien der Sonnenfeld Stiftung und der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM) gefördert. Zudem wurden die Arbeiten durch eine Forschungsförderung (Sachmittel) durch die DGM gefördert.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Angela M. Kaindl

2. Gutachterin: Prof. Dr. Constance Scharff

Disputation am: 04.10.2017

Dank

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Mentorin Frau Prof. Dr. Angela M. Kaindl für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas sowie für die ausgezeichnete, intensive, motivierende und kompetente wissenschaftliche Betreuung im Verlauf der vergangenen Jahre.

Ich danke Frau Prof. Dr. Constance Scharff für die Begutachtung meiner Doktorarbeit und die konstruktive Kritik an den Experimenten und Ergebnissen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Langer für die enge Kooperation und die Ermöglichung mehrerer Forschungsaufenthalte sowie Herrn Dr. Timothy Wai für die erfolgreiche Zusammenarbeit an unserer Publikation. Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner, Herrn Prof. Dr. Thomas Wienker, Herrn Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers, Herrn Prof. Dr. Werner Stenzel und Herrn Prof. Dr. Ralph Gräf für die angenehmen Kooperationen sowie Herrn Dr. Björn Fischer-Zirnsak für die wunderbare Zusammenarbeit und ermunternden Gespräche.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe Kaindl – Sylvie Picker-Minh, Kathrin Bläsius, Ethiraj Ravindran, Sami Zaquot, Lina Issa-Jahns und Olaf Ninnemann – für die wissenschaftlichen Diskussionen und freundschaftlichen Momente im Laboralltag. Weiterhin danke ich Kristina Schierhorn und Sylvie Picker-Minh für die konstruktiven Korrekturen meiner Arbeit.

Ich möchte meinen Eltern, Kerstin und Peter Hartmann, meiner Schwester Antje Kusstatscher sowie Fabian und Johann Kusstatscher für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion danken. Euer unerschütterlicher Glaube in mich war über all die Jahre ein großer Rückhalt.

Ich danke meinen Freundinnen und Freunden für ihre moralische Unterstützung und dass sie mir den Mangel an Zeit nie übelnahmen. Ich danke Emil Haase für seine kindliche Freude an den kleinen Dingen des Lebens, die er an mich übertrug. Zuletzt danke ich Stefan Jankowski dafür, dass er in den vergangenen Jahren stets an meiner Seite stand, in stressigen Zeiten zurücksteckte und meine Entscheidung nie hinterfragte.

Zusammenfassung

Mitochondriopathien sind Erkrankungen mit heterogenem Phänotyp, die auf Störungen der Energiegewinnung der Mitochondrien beruhen. Sie treten meist als Multiorganerkrankungen auf und betreffen dabei hauptsächlich Organe mit hohem Energiebedarf. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir eine neue Form der Mitochondriopathie bei vier erkrankten Kindern einer konsanguinen Familie aus Saudi-Arabien. Hauptmerkmale der Erkrankung sind eine Intelligenzminderung, eine motorische Entwicklungsstörung bei generalisierter Muskelschwäche und Ataxie, eine Schwerhörigkeit, eine Atrophie des *Nervus opticus* und eine Leukenzephalopathie. Mittels Whole-Exom-Sequenzierung identifizierten wir eine Missense-Mutation im *Yeast-mitochondrial-escape-1-like-1*-Gen (*YME1L1*) an Position c.616C>T als Ursache der Erkrankung. Diese hat den Aminosäureaustausch p.R149W innerhalb der hoch konservierten mitochondrialen Erkennungssequenz zur Folge. YME1L1 ist eine nukleär kodierte, ATP-abhängige Metalloprotease der inneren Mitochondrienmembran. Die Mutation ist mit einer deutlichen Reduktion des YME1L1-Proteinsignals verbunden, welche durch eine ausbleibende Prozessierung zum reifen, aktiven Protein und einer partialen autokatalytischen Degradierung des unreifen Proteins verursacht wird. Das abnorme YME1L1-Protein assembliert in einen proteolytischen Komplex, welcher mit seiner Restaktivität seine Substrate PRELID1 und OPA1 nur unzureichend prozessiert. Als zelluläres Korrelat fanden wir in Patientenzellen eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks und einen schweren Proliferations- und Wachstumsdefekt. Das fragmentierte Mitochondriennetzwerk der Patientenzellen belegt die enge regulatorische Beziehung zwischen YME1L1 und OPA1 und deren Bedeutung für den Ablauf der mitochondrialen Fusion. Dies scheint maßgeblich für die Pathogenese der Erkrankung zu sein. Unsere Ergebnisse weisen auf eine entscheidende Rolle von YME1L1 für die mitochondriale Funktion im Menschen hin. Zukünftige Untersuchungen bezüglich der Rolle YME1L1s für den mitochondrialen Lipidhaushalt und für dynamische Prozesse stellen einen Ansatz dar, therapeutische Angriffspunkte für Patienten mit einer YME1L1-Mitochondriopathie zu identifizieren.

Abstract

Mitochondriopathies typically present clinically as multisystem disorders secondary to disturbances in the energy production of mitochondria. Mostly high-energy consuming tissues are affected. Here, we report a new mitochondriopathy form in four affected children of a consanguineous family of Saudi Arabian descent. Main clinical features include intellectual disability, motor delay associated with muscle weakness and ataxia, deafness, optic nerve atrophy and leucencephalopathy. Using a whole-exome-sequencing approach, we detected a homozygous missense mutation (c.616C<T) in the *yeast-mitochondrial-escape-1-like-1-gene* (*YME1L1*). This mutation results in the amino acid exchange p.R149W in the highly conserved mitochondrial targeting sequence. YME1L1 is a nuclear encoded, ATP-dependent metalloprotease, embedded in the inner mitochondrial membrane. The mutation causes a severe reduction of YME1L1-protein signal in patient cells, due to a lack of maturation into an active protein and subsequent partial autocatalytic degradation of the premature protein. The abnormal protein is still able to assemble into a high-molecular complex and maintains residual activity. As a cellular correlate, we detected a significant fragmentation of the mitochondrial network, and a severe proliferation- and cell growth-defect in patient cells. Furthermore, processing of YME1L1-substrates such as PRELID1 and OPA1 was disturbed. The fragmentation phenotype points towards a close regulatory relationship between YME1L1 and OPA1 and the importance for the maintenance of mitochondrial fusion processes. This appears to be a possible explanation for the pathomechanism of the disease. Our results ascribe YME1L1 an important role for the overall mitochondrial function in the human organism. Future studies regarding YME1L1 function in mitochondrial lipid homeostasis and dynamical processes may uncover a therapeutic target for patients with YME1L1-mitochondriopathy.

Inhaltsverzeichnis

Dank.....	4
Zusammenfassung	5
Abstract	6
Inhaltsverzeichnis	7
1 Einleitung	11
1.1 Das Mitochondrium.....	12
1.2 Das mitochondriale Qualitätskontrollsystem (mtUPR).....	16
1.2.1 mtUPR auf molekularer Ebene	16
1.2.2 mtUPR auf zellulärer Ebene	20
1.3 YME1L1, der i-AAA ⁺ -Komplex	22
1.3.1 <i>yme1</i> in der Hefe	22
1.3.2 YME1L1 im humanen und murinen Organismus	23
1.4 Mitochondriopathien - das dysfunktionale Mitochondrium.....	25
2 Zielstellung.....	29
3 Materialien und Methoden.....	31
3.1 Materialien	32
3.1.1 Geräte	32
3.1.2 Chemikalien	33
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.4 Puffer und Lösungen	36
3.1.5 Antikörper.....	41
3.1.6 Primer und Sonden	42
3.1.7 siRNAs	43
3.1.8 Biologische Proben	44
3.2 Methoden	45
3.2.1 Zellkulturen.....	45
3.2.2 Nukleinsäurebasierte Methoden	46
3.2.3 Untersuchungen der Zellfunktionen	53
3.2.4 Immunfluoreszenz- und Histochemische Färbungen	55
3.2.5 Dreidimensionale Darstellung der mitochondrialen Netzwerke	58
3.2.6 Mikroskopie	58

3.2.7	Proteinbiochemische Methoden	59
3.2.8	Statistik.....	65
4	Ergebnisse	67
4.1	Indexpatienten mit einer neuen Form der Mitochondriopathie.....	68
4.2	Identifizierung einer Missense-Mutation im <i>YME1L1</i> -Gen der Patienten..	73
4.2.1	<i>YME1L1</i> ^{R149W} betrifft die hoch konservierte MTS-Domäne	77
4.2.2	<i>YME1L1</i> ^{R149W} wird innerhalb des Mitochondriums degradiert	79
4.3	<i>YME1L1</i> ^{R149W} als aktive Protease	83
4.3.1	<i>YME1L1</i> ^{R149W} kann zu einem Proteinkomplex assemblieren	83
4.3.2	<i>YME1L1</i> ^{R149W} prozessiert seine Substrate OPA1 und PRELID1	85
4.3.3	<i>YME1L1</i> ^{R149W} verursacht eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks.....	86
4.3.4	<i>YME1L1</i> ^{R149W} blockiert Zellwachstum und Zellproliferation	89
4.3.5	<i>YME1L1</i> ^{R149W} hat keinen Einfluss auf den Apoptoseprozess	91
4.3.6	<i>YME1L1</i> ^{R149W} verursacht Reduktion mitochondrialer Proteine	93
4.3.7	OMA1-Aktivität hat keinen Einfluss auf den zellulären <i>YME1L1</i> ^{R149W} -Phänotyp	94
5	Diskussion	97
5.1	<i>YME1L1</i> ^{R149W} als Auslöser einer Mitochondriopathie	98
5.2	Die Folgen von <i>YME1L1</i> ^{R149W} für den i-AAA ⁺ -Komplex.....	99
5.2.1	<i>YME1L1</i> ^{R149W} wird zum Schutz der Mitochondrien degradiert.....	102
5.3	Die proteolytische Aktivität des <i>YME1L1</i> ^{R149W} Proteins	104
5.4	<i>YME1L1</i> ^{R149W} blockiert den mitochondrialen Fusionsprozess	107
5.5	<i>YME1L1</i> ^{R149W} und OMA1 in proteolytischer Interaktion	108
6	Ausblick	111
7	Literaturverzeichnis.....	115
8	Anhang	125
8.1	Datenbank der Whole-Exom-Sequenzierungsergebnisse	126
8.2	Mutagenese der N-terminalen Arginine des <i>YME1L1</i> -Proteins	126
8.3	Bindungssequenz des <i>YME1L1</i> -Antikörpers	127
8.4	Digitales Zusatzmaterial.....	127

8.5 Tabellenverzeichnis	128
8.6 Abbildungsverzeichnis	128
8.7 Abkürzungsverzeichnis	129
Publikationsverzeichnis	132
8.8 Originalarbeiten	132
8.9 Vorträge	132
8.10 Poster	132
Eidesstattliche Erklärung	134

1 Einleitung

1.1 Das Mitochondrium

Mitochondrien, als Organellen der Energiebereitstellung, integrieren durch ihre typische Ultrastruktur eine hohe Variabilität von biochemischen Prozessen (Karp, 2005). Mitochondrien entstanden, nach heutigem Konsens, durch die phagozytotische Aufnahme eines aeroben α -Proteobakteriums in eine eukaryotische Zelle (Sagan, 1967; Schimper, 1883). Die Präsenz einer mitochondrialen Doppelmembran, das eigene zirkuläre Genom, die Fähigkeit zur symmetrischen Teilung und damit verbunden das Ausbleiben einer *de novo* Synthese, sind Indikatoren für die Theorie einer endosymbiontischen Aufnahme. Hauptargument ist jedoch die Fähigkeit der Mitochondrien zur aeroben Atmung und der damit verbundenen Energiebereitstellung für die Zelle. Mitochondrien sind in einer spezifischen und hoch konservierten Struktur aufgebaut: äußere Membran, Intermembranraum, innere Membran und Matrix (Abbildung 1). Die äußere Membran ist in ihrer Zusammensetzung der semipermeablen Plasmamembran sehr ähnlich (Karp, 2005). Sie steht in Kontakt mit dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Zellkern und ermöglicht die Weiterleitung apoptotischer Signalkaskaden, eine Regulation der Kalziumhomöostase oder der Genexpression, ist aber auch essentiell für den Proteinimport in das Mitochondrium. Der Intermembranraum des Mitochondriums ist ein plasmagefülltes Kompartiment, begrenzt durch äußere und innere Membran. Er integriert die löslichen Domänen von großen Transportkomplexen, die zwischen äußerer und innerer Membran gespannt sind, so zum Beispiel beim MICOS-Komplex. Weiterhin dient er als Speicher von Cytochrom c, ein essentielles Protein für die apoptotischen Signalkaskaden (Cai et al., 1998; Karp, 2005; Rampelt et al., 2016). Die innere Membran stellt eine impermeable Barriere dar, die sich aus einer inneren Grenzschicht und den Cristae zusammensetzt. Beide Schichten sind in ihrer biochemischen Zusammensetzung grundverschieden und zur Erhaltung der Kommunikation durch Cristae junctions, kleine tubuläre Strukturen, miteinander verbunden (Harner et al., 2011; Rampelt et al., 2016). Cristae sind Einstülpungen in das Innere des Mitochondriums und stellen einen effizienten Mechanismus zur Oberflächenvergrößerung dar. Sie

integrieren essentielle Enzymkomplexe wie zum Beispiel die Atmungskettenkomplexe oder ATP-Synthase (Karp, 2005). Anzahl, Größe und Form der Cristae variiert zwischen den Mitochondrien diverser Zelltypen.

Die Matrix ist ein flüssigkeitsgefüllter Raum, dessen Hauptfunktionen die Speicherung des mitochondrialen Genoms sowie der Transkriptions- und Translationseinheit ist (Karp, 2005). Mitochondrien ordnen sich unter stressfreien Bedingungen in einem weitverzweigten, tubulären Netzwerk innerhalb der Zelle an (Horbay and Bilyy, 2016). Dieses ist hoch dynamisch und kann sich entlang des Zytoskeletts an Mikrotubuli-Strukturen bewegen und verändern (Horbay and Bilyy, 2016). Form und Verzweigungsgrad des Netzwerks sind vom Zelltyp und dem metabolischen Stress in der Zelle abhängig.

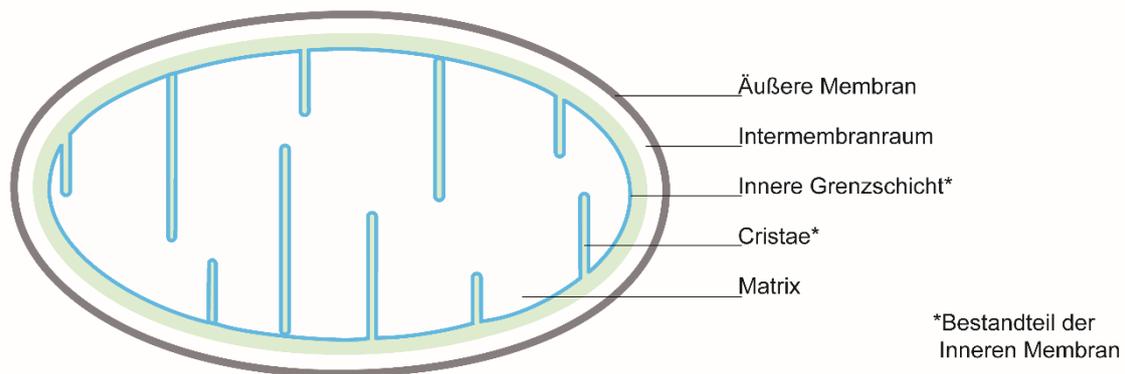


Abbildung 1: Die Ultrastruktur eines Mitochondriums. Das Mitochondrium hat einen hoch konservierten und spezifischen Aufbau. Die äußere Membran als semipermeable Barriere integriert viele Rezeptor- und Transporterproteine. Der Intermembranraum ist ein flüssigkeitsgefülltes, enzymatisch dicht-gepacktes Kompartiment. Die innere Membran ist impermeabel und erzeugt durch Ausstülpungen (Cristae) eine große Oberfläche. Sie ist Ort der Energieproduktion durch die Atmungskette. Die Matrix ist flüssigkeitsgefüllt und beinhaltet das mitochondriale Genom. Abbildung nach (Karp, 2005).

Die Omnipräsenz von Mitochondrien in eukaryotischen Zellen begründet sich auf der Abhängigkeit von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energielieferanten, welcher ausschließlich von der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran synthetisiert werden kann. Am Aufbau beteiligt sind die Atmungskettenkomplexe NADH-Dehydrogenase (Komplex I), die Succinat-

Dehydrogenase (Komplex II), die Cytochrom c-Reduktase (Komplex III) und die Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV). Die Proteinkomplexe bauen durch Reduktions- und Oxidationsvorgänge einen Protonengradienten auf, welcher von der ATP-Synthase (Komplex V) als frei-werdende Energie, zur oxidativen Phosphorylierung des Adenosindiphosphats (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) eingesetzt wird (Karp, 2005; Löffler and Schölmerich, 2008). Die Produktion von ATP als Energielieferant ist überlebenswichtig und dementsprechend genetisch konserviert. Hierfür besitzt das Mitochondrium ein eigenes zirkuläres Genom, welches 13 Gene umfasst, die hauptsächlich für Proteine der Atmungskette kodieren, aber auch für tRNAs und andere RNA-Formen (Calvo and Mootha, 2010; Gerdes et al., 2012; Wallace, 2010). Mit diesem organell-eigenen Genom können die Informationen für eine funktionierende Atmungskette und ATP-Produktion, über symmetrische Teilung, auch im Tochter-Mitochondrium integriert werden. Die Vererbung des mitochondrialen Genoms erfolgt maternal über das Genom der Oozyte. Nach wissenschaftlichem Konsens fallen die genetischen mitochondrialen Informationen des Spermiums der Ubiquitinierung zum Opfer (Taylor et al., 2003). Die Möglichkeit zur paternalen Vererbung kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden (Schwartz and Vissing, 2002). Neben den mitochondrial kodierten Proteinen wird der Großteil der mitochondrialen Proteine im Kern kodiert und im Zytosol transkribiert bzw. translatiert. Dementsprechend umfasst das gesamte Proteom des Mitochondriums 900-1500 Proteine (Bohovich et al., 2015). Diese Tatsache setzt eine Transporteinheit innerhalb der mitochondrialen Membranen voraus, um den Import und den Einbau dieser nukleär kodierten Proteine im Organell zu ermöglichen.

Der Import nukleär kodierter Proteine ins Mitochondrium

Nukleär kodierte Proteine können über verschiedene Mechanismen in die inneren Kompartimente der Mitochondrien transportiert werden. Erkannt werden die ungefalteten Präproteine von den Translokoneinheiten der äußeren mitochondrialen Membran, dem TOM-Komplex (TOM, translocon-of-outer-membrane). Im weiteren Schritt wird das Polypeptid je nach Ziellokalisierung in

den Intermembranraum gegeben oder über die Importeinheit der inneren Membran, den TIM23-Komplex (TIM, translocon-of-inner-membrane-23), weitergeschleust. Die Möglichkeit zur finalen Proteinfaltung ergibt sich erst innerhalb des Mitochondriums mit Hilfe von Chaperonen. In bisherigen Publikationen wurden drei grundverschiedene Möglichkeiten zu Erkennung, Transport und Faltung mitochondrialer Proteinen identifiziert (Herrmann and Neupert, 2000; Rehling et al., 2003; Stojanovski et al., 2012). Als erste Option können Proteine über integrierte, spezifisch konservierte Cystein-Motive erkannt und über den TOM-Komplex eingeschleust werden. Im Intermembranraum findet der Faltungsprozess über den Einbau von Disulfidbrücken durch das Mia40-Erv1-Disulfid-System statt (Schreiner et al., 2012; Weckbecker et al., 2012). Ein weiterer Mechanismus basiert auf mehreren Konformationsänderungen der Proteine, welche für die Erkennung, den Import in den Intermembranraum sowie einer Proteinaktivierung notwendig sind. Cytochrom c als Intermembranraum-Protein durchläuft diese Form des Imports (Dumont et al., 1991; Schreiner et al., 2012).

Eine dritte Option für nukleär kodierte Proteine ins Mitochondrium zu gelangen, besteht über die Erkennung einer N-terminalen mitochondrialen Erkennungssequenz (MTS, mitochondrial targeting site). Die ungefalteten Polypeptide passieren, mit Hilfe dieser MTS, sowohl den TOM- als auch TIM23-Komplex bis sie in die Matrix entlassen werden (Kovermann et al., 2002; Rehling et al., 2003). Hier wird die MTS abgespalten, das Protein anschließend gefaltet und in das Zielkompartiment integriert (Arretz et al., 1991). Zahlreiche Proteine können ihre vollständige Faltung und Funktionalität im Mitochondrium erst erreichen, wenn die MTS entfernt wird (Herrmann and Neupert, 2000). Hierfür kann unter anderem die Mitochondrial-processing-Peptidase (MPP) in der Matrix aktiv werden. Diese erkennt und spaltet spezifische Arginin-Positionen der MTS vom Rest des Polypeptids (Mossmann et al., 2012). Aber auch andere Enzyme der Matrix können zur Abspaltung mitochondrialer Sortierungssignale aktiv werden (Arretz et al., 1991; Gakh et al., 2002). Die Transport- und Reifungsprozesse von mitochondrialen Proteinen sind ausgereifte Mechanismen, um deren korrekte Integration in die Kompartimente zu gewährleisten. Die hohe

Variabilität an Proteinen bedingt hierbei die unterschiedlichsten Formen des Imports und trägt zur Erhaltung der Organellen bei.

1.2 Das mitochondriale Qualitätskontrollsystem (mtUPR)

Die besonderen Umstände der Proteinreifung im Mitochondrium und die Notwendigkeit des Schutzes der mitochondrialen Funktion machen verschiedene Mechanismen zur Proteinqualitätskontrolle im Organell notwendig. Das Mitochondrium zeichnet sich hierbei durch seine hohe Flexibilität und Kompensationskraft gegenüber pathologischen Einflüssen aus. Das mitochondriale Qualitätskontrollsystem, kurz mtUPR (mitochondrial unfolded protein response, auch QC oder MQC für mitochondrial quality control) ist ein hochkomplexes System, um Schäden am Mitochondrium zu vermeiden (Anand et al., 2013; Ni et al., 2015). Es handelt sich hierbei um Antworten auf molekularer oder zellulärer Ebene, die einer Degradierung der Mitochondrien, verursacht durch die Akkumulation schadhafter Faktoren, vorbeugen.

1.2.1 mtUPR auf molekularer Ebene

Auf molekularer Ebene sind verschiedene Klassen von Enzymen im Mitochondrium für die Detektion, Korrektur oder Entfernung dysfunktionaler und potentiell schädlicher Proteine verantwortlich. Diese sind je nach Kompartiment in der Lage, weitere Signalkaskaden zu aktivieren. In einem ersten Schritt sind Mitglieder der Chaperonfamilien mtHsp70 und mtHsp60 verantwortlich für die Detektion, Sortierung, Faltung und Disaggregation fehlerhafter Proteine (Bohovych et al., 2015). Kann dies eine Schädigung des Mitochondriums nicht abwenden, werden weitere Proteine aktiv. Hierzu zählen unter anderem ATP-unabhängige Proteasen, welche eine sehr heterogene Gruppe an Proteinen darstellen. Zu diesen Enzymen gehören zum einen prozessierende Peptidasen wie die MPP, die mitochondrial-intermediate-peptidase (MIP) und die inner-membrane-peptidase (IMP) an. Sie erkennen und entfernen sequenziell MTS- oder andere Erkennungsdomänen (Gakh et al., 2002). Dies geht gleichzeitig mit einer Sortierung und Stabilisierung von Proteinen einher, welche Zielsignale für die Matrix oder den Intermembranraum in ihrer Sequenz tragen. Weiterhin

kontrollieren sowohl lösliche Peptidasen wie die Metallopeptidase-and-ATP-Synthase-Assembly-Factor-Homolog ATP23 oder Neurolysin, aber auch membrangebundene Peptidasen, wie Presenilins-associated-rhomboid-like-protein (PARL) oder Overlapping-with-the-m-AAA-protease-1-homolog (OMA1), das Proteasom der inneren Membran (Anand et al., 2013; Bohovych et al., 2015). Sie bilden jedoch nur einen kleinen Teil der Proteinklassen, die in der Proteinqualitätskontrolle involviert sind. Hauptsächlich agieren ATP-abhängige Proteasen, auch AAA⁺-Proteasen genannt, innerhalb des mtUPR-Systems (Bohovych et al., 2015).

Die Familie der AAA⁺-Proteine

ATPases associated with diverse cellular activities (AAA⁺-Proteasen) sind ATP-abhängige Proteasen aller zellulären Bestandteile. AAA⁺-Proteine zeichnen sich durch eine ATP-Bindungsdomäne (auch AAA⁺-Domäne) aus, welche 200-250 Aminosäuren umfasst (Hanson and Whiteheart, 2005). AAA⁺-Proteasen sind in ihrem Aufbau und der Aminosäuresequenz, zwischen diversen Spezies, konserviert erhalten (Gerdes et al., 2012). Die AAA⁺-Domäne besteht aus zwei Subdomänen, die unterschiedliche räumliche Anordnungen einnehmen können. Innerhalb der AAA⁺-Domäne sind einzelne Aminosäuremotive hoch konserviert zusammengesetzt und realisieren verschiedene funktionelle Elemente in der Proteinsequenz. Am N-Terminus befindet sich ein N-Linker Motiv, welches zur Einteilung in zwei Unterklassen dient. Dabei wird in der Anordnung in Glycin-Glycin oder hydrophobe Aminosäure-Glycin-Proteasen unterschieden. Das Walker-A-Motiv, als integraler Teil der ATP-Bindungsstelle, enthält eine P-Loop Struktur, an welcher das γ -Phosphat des ATP für die spätere Hydrolyse gebunden wird (Abbildung 2). Das Porenelement bildet den Ort der Substratumsetzung. Das Walker-B-Motiv stellt, mit einem Aspartat und Glutamat in seiner konservierten Aminosäureabfolge, den Reaktionsort einer Mg²⁺-abhängigen ATP-Hydrolyse dar. Gleichzeitig ist es auch in die Substratbindung involviert. Die Second-region-of-homology (SRH) enthält das Sensor-1-Motiv und das Argininfinger-Motiv. Sensor-1 ist hauptverantwortlich für die Konformationsänderungen, die die Protease während der Nukleotid-Bindung

vollzieht. Das Arginin-Finger-Motiv ist bisher im Zusammenhang mit der Hydrolyse des ATP beschrieben. Sensor-2 ist an der Bindung des γ -Phosphats von ATP beteiligt (Abbildung 2). Des Weiteren reguliert es die räumlichen Veränderungen zwischen der C- und N-terminalen Subdomäne (Hanson and Whiteheart, 2005; Iyer et al., 2004). AAA⁺-Proteasen assemblieren in Oligomere, bevorzugt hexamerische Ringkomplexe, und können somit Substrate in der gebildeten proteolytische Pore umsetzen (Hanson and Whiteheart, 2005).

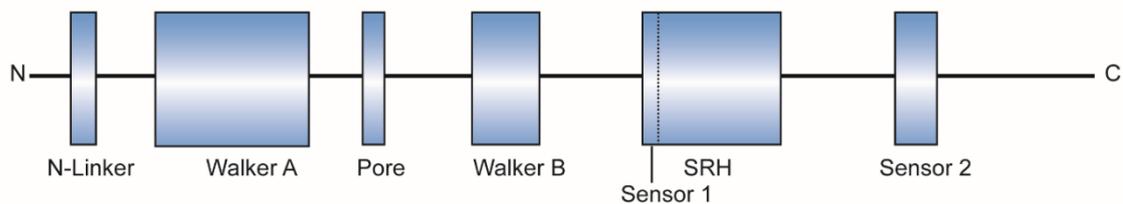


Abbildung 2: Die spezifische Zusammensetzung der AAA⁺-Domäne. Die AAA⁺ Domäne ist durch eine hoch konservierte Zusammensetzung verschiedener funktioneller Elemente gekennzeichnet. Am N-terminalen N-Linker-Motiv erfolgt die Unterscheidung in zwei AAA⁺-Unterklassen, entsprechend nach der vorliegenden Aminosäurenabfolge. Das Walker-A-Motiv ist Teil der ATP-Bindungsstelle und ermöglicht über eine P-Loop Struktur die Bindung des γ -Phosphat des ATP. Das Porenelement bildet den Ort der Substratumsetzung. Im Walker-B-Motiv ist der Reaktionsort einer Mg^{2+} -abhängigen ATP-Hydrolyse integriert. Es dient auch der Substratbindung. Die Second-region-of-homology (SRH) setzt sich zusammen aus dem Sensor-1-Motiv und Argininfinger und reguliert Konformationsänderungen, während der Nukleotid-Bindung. Sensor-2 ist essentiell für die räumlichen Veränderungen zwischen den C- und N-Termini. Abbildung nach (Hanson and Whiteheart, 2005).

AAA⁺-Proteasen sind in der Lage chemische Energie in biologische Prozesse umzuwandeln. Dies wird ermöglicht durch ihre Bindung von ATP bzw. dessen Hydrolyse und der damit verbundenen Konformationsänderung, die die Protease durchläuft. Der Phosphorylierungsgrad des Nukleotids reguliert die Zugänglichkeit der Substratbindungsstelle. Eine Bindung des energiereichen ATP hat zur Folge, dass sich C- und N-terminale Subdomänen voneinander entfernen und die Bindungsstelle für Substrate zugänglich wird. Eine Hydrolyse des ATP zum energiearmen ADP bewirkt eine Energiefreisetzung, die für Substratentfaltung oder -degradierung genutzt wird. Gleichzeitig nähern sich C-

und N-Terminus wieder einander an, um die Bindungsstelle zu blockieren (Hanson and Whiteheart, 2005). In den Mitochondrien übernehmen die AAA⁺-Proteasen eine essentielle Funktion bei der Umsetzung von dysfunktionalen Proteinen.

AAA⁺-Proteasen im Mitochondrium (mtAAA⁺) sind nukleär kodierte Proteine, werden im Zytosol translatiert und müssen den mitochondrialen Import-Weg durchlaufen. Sie sind grundlegender Bestandteil des mtUPR-Systems. Durch die Anordnung in hexamerische Ringkomplexe können sie Substrate in der proteolytische Pore umsetzen (Hanson and Whiteheart, 2005). Zu den Substraten der mtAAA⁺-Proteine zählen vor allem falsch gefaltete, ungefaltete oder dysfunktionale Proteine (Gerdes et al., 2012). mtAAA⁺-Proteasen liegen sowohl membrangebunden, als auch in löslicher Form innerhalb des Mitochondriums vor. In Hefen und Säugerzellen wurden bisher Caseinolytic-mitochondrial-matrix-peptidase-chaperone-Untereinheit (ClpXP) und Lon-Peptidase-1 (LonP) als AAA⁺-Proteasen der Matrix identifiziert. Sie liegen in der Matrixflüssigkeit gelöst vor und degradieren oxidativ geschädigte oder aggregierte Polypeptide (Bohovych et al., 2015; Corydon et al., 2000; Suzuki et al., 1994; Wang et al., 1993). Weiterhin gibt es Vertreter der AAA⁺-Proteasen, welche über Transmembrandomänen in der inneren mitochondrialen Membran verankert sind. Hier werden sie nach ihrer Position des proteolytisch aktiven C-Terminus unterschieden. AAA⁺-Proteasen, welche mit dem C-Terminus in die Matrix ragen, bilden den sogenannten m-AAA⁺-Komplex. Weist der C-Terminus in den Intermembranraum, so werden sie als i-AAA⁺-Komplex bezeichnet (Arnold and Langer, 2002; Koppen and Langer, 2007; Langer, 2000). In der Hefe wurden bereits sehr früh die beiden Proteine der yta-Familie yta10p und yta12p als m-AAA⁺-Proteasen und yeast-mitochondrial-escape-1-protein (yme1p) als i-AAA⁺-Protease identifiziert. Homolog dazu bilden in Säugerzellen die Proteine ATPase-family-gene-3-like-2 (AFG3L2) und PARAPLEGIN den m-AAA⁺-Komplex, sowie Yeast-mitochondrial-escape-1-like-1 (YME1L1) die i-AAA⁺ Protease (Di Bella et al., 2010). Hierbei kann sich die m-AAA⁺-Protease zum einen aus einem AFG3L2-Homomer, aber auch aus einem Heteromer mit PARAPLEGIN zusammensetzen. Die i-AAA⁺-Protease stellt, in allen bisher untersuchten

Organismen, ein Homo-Oligomer aus YME1L1-Monomeren dar (König et al., 2016). Sowohl m-AAA⁺ als auch i-AAA⁺-Komplex sind Bestandteile des mtUPR und degradieren graduell defekte, nicht- oder falsch-gefaltete Proteine, der inneren mitochondrialen Membran (Aldridge et al., 2007; Bohovych et al., 2015; Leonhard et al., 1999; Sauer and Baker, 2011). Sie bewahren das Mitochondrium somit vor einer Akkumulation defekter Proteine und dem mitophagischen Abbau sowie die gesamte Zelle vor potentiellen Folgeschäden.

1.2.2 mtUPR auf zellulärer Ebene

Auf der Basis der Proteinaktivitäten kommt es auch zu ganzheitlichen zellulären Reaktionen, welche durch das mtUPR-System gesteuert werden (Bohovych et al., 2015). So können zum einen Zytosol und Mitochondrium interagieren, indem das Ubiquitin-Proteasom-System sich mit der äußeren mitochondrialen Membran verbindet (Heo et al., 2010). Es kann somit defekte mitochondriale Proteine degradieren, bevor sie in den Importprozess eintreten. Weiterhin kann es Rückschleusungen von Proteinen der äußeren Membran veranlassen und diese außerhalb des Mitochondriums degradieren (Bohovych et al., 2015). Zusätzlich zu den oben genannten Mechanismen haben Mitochondrien die Fähigkeit zu dynamischen Prozessen innerhalb des mitochondrialen Netzwerks entwickelt. Mitochondrien sind in der Lage über Fusions- und Trennungsvorgänge miteinander zu verschmelzen oder sich zu trennen und dabei mtDNA und das Proteom verschiedener einzelner Mitochondrien auszutauschen und zu verdünnen (Anand et al., 2013; Bohovych et al., 2015). Dies sorgt vor allem dafür, dass eine Akkumulation potentiell schadhafter Proteine in einem Mitochondrium nicht sofort zur Autophagie führt, sondern das einzelne Organell erhalten bleiben kann.

Fusion und Trennung von Mitochondrien sind empfindliche Prozesse, die von diversen Proteinen reguliert werden. So sind zum Beispiel Dynamin-related-protein-1 (Drp1), Mitofusin-1 und -2 (Mfn1, 2) sowie Dynamin-like-GTPase-Optic-Atrophy-1 (OPA1) als Regulatoren der mitochondrialen Dynamik bekannt (Wai and Langer, 2016). Die Klassifizierung mitochondrialer Netzwerke kann nach ihren räumlichen Zuständen bzw. ihrer Morphologie erfolgen. Sie nehmen eine

hyperfusionierte, tubuläre oder fragmentierte Form an (Anand et al., 2013). Kurzzeitiger oxidativer Stress oder Nährstoffmangel können zu einer Hyperfusion der Mitochondrien und damit zum maximalen Austausch des mitochondrialen Inhalts sowie zur erhöhten ATP-Produktion führen (Baker et al., 2014a). Kontinuierliche Veränderungen im Membranpotential der Mitochondrien können eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks zur Folge haben. Die Mitochondrien liegen dann als punktförmige Strukturen innerhalb der Zelle vor und verfügen über keine Verbindungen untereinander. Dies wiederum aktiviert Auto- und Mitophagie sowie Apoptoseprozesse. Die mitochondriale Dynamik ist ein sensibler Vorgang, der von den umgebenden zellulären Umständen oder äußeren Einflüssen bestimmt werden kann. Als letzte Instanz des mtUPR kann es, in einem ganzheitlich zellulären Mechanismus, zu einer Abschnürung von mitochondrialen Vesikeln (MDV, mitochondrial derived vesicles) kommen. Diese werden nach der Abschnürung erst ins Zytosol und anschließend zu Lysosomen befördert, wo deren Inhalt proteolytisch abgebaut wird (Bohovych et al., 2015; Wai and Langer, 2016). Letzterer besteht zumeist aus oxidativ geschädigten Proteinen. Dieser Vorgang tritt meist früh in der Kette des oxidativen Stresses auf und ist unabhängig von der mitochondrialen Dynamik oder Autophagie (Anand et al., 2013).

Die mtUPR-Mechanismen garantieren die Funktionalität des Mitochondriums und gewährleisten somit die ATP-Produktion der Zelle. Die Schädigung eines mtUPR-Schlüsselproteins kann eine Dysfunktion des gesamten Systems nach sich ziehen. Der i-AAA⁺-Proteasekomplex YME1L1 stellt hierbei solch ein verbindendes Element der einzelnen mtUPR-Ebenen dar. Einerseits ist YME1L1 als Chaperon und degradierende Protease auf molekularer Ebene, andererseits als Regulator der OPA1-abhängigen Fusionsprozesse und somit für die Erhaltung der mitochondrialen Netzwerke aktiv. YME1L1 ist besonders im Hefemodell bereits genauer untersucht worden. Die Rolle des i-AAA⁺-Proteasenkomplex im Menschen ist bisher jedoch weitestgehend unklar.

1.3 YME1L1, der i-AAA⁺-Komplex

1.3.1 *yme1* in der Hefe

Das humane *YME1L1* ist ein Homolog des, erstmals im Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* beschriebenen, *yme1* (Thorsness et al., 1993). Hier wurde *yme1* im Zusammenhang mit Genen identifiziert, welche den Effekt der mtDNA-Migration regulieren (Campbell et al., 1994; Thorsness and Fox, 1993; Thorsness et al., 1993). In Hefen stellt die Migration von mtDNA zum Zellkern einen Mechanismus dar, um auf Umwelteinflüsse und Zellstress zu reagieren. Ein Verlust der Proteinfunktion führte in *yme1*-Knockdown-Hefezellen zu einem ausgeprägten Wachstumsdefekt bei 37°C unter spezifischen Kulturbedingungen, zu vermehrter Apoptose, geschwollenen Mitochondrien mit erweiterten Cristae und zur Fragmentierung der mitochondrialen Netzwerke (Campbell et al., 1994; Thorsness and Fox, 1993). Die Atmungskettenaktivität war in den entsprechenden Zellen stark reduziert und von einer Akkumulation der ungebundenen Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit-2 (COX2), einem Protein der Atmungskette, geprägt. Diese Beeinträchtigungen lösten Signalkaskaden für eine gesteigerte mtDNA-Migration zum Zellkern zum Schutz der Mitochondrien aus (Thorsness and Fox, 1993; Thorsness et al., 1993). Bereits in ersten Veröffentlichungen wurde *yme1p* als ATPase der inneren Mitochondrienmembran identifiziert und eine hohe Sequenzhomologie zu anderen Organismen ermittelt (Weber et al., 1996). Weiterhin wurde der Zusammenhang von *yme1p* mit mitochondrialen Fusionsprozessen und der Reifung alternativer Proteine im Mitochondrium diskutiert (Campbell et al., 1994; Thorsness and Fox, 1993). In nachfolgenden Publikationen konnte dem *yme1p* außerdem eine Chaperonaktivität sowie die Beteiligung in der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle, Proteinimport und Proteinassemblierung nachgewiesen werden (Francis and Thorsness, 2011; Graef and Langer, 2006; Leonhard et al., 1999; Rainey et al., 2006). Hierbei wurde unter anderem gezeigt, dass *yme1p* im Rahmen der Qualitätskontrolle, akkumulierte und defekte Proteine degradierte (Nakai et al., 1995; Pearce and Sherman, 1995; Potting et al., 2010).

1.3.2 YME1L1 im humanen und murinen Organismus

Viele Eigenschaften des *yme1p* sind aufgrund der evolutionären Homologie der Sequenzen auf das murine *Yme1l1* und humane *YME1L1* übertragbar, was sich auch mit der Erhaltung des mtUPR-Systems, als essentiellen mitochondrialen Mechanismus, begründet (Bohovych et al., 2015; Coppola et al., 2000; Juhola et al., 2000). Diese Übertragbarkeit wurde deutlich durch Untersuchungen, in denen eine Überexpression der humanen *YME1L1*-Sequenz den Phänotyp von *yme1*-Knockdown-Hefezellen komplementieren konnte (Shah et al., 2000). Andere Erkenntnisse über Funktion und Struktur von *YME1L1* konnten, in den vergangenen Jahren, durch detaillierte Untersuchungen im Maus- und Humanmodell, gewonnen werden.

YME1L1 (NM_014263) ist ubiquitär exprimiert, weist jedoch eine höhere Expression in Geweben mit erhöhter Mitochondriendichte und Energiebedarf, wie Skelettmuskel oder Herz auf (Coppola et al., 2000). *YME1L1* ist nukleär kodiert und wird zu einem ~80 kDa schweren Präprotein mit einer Länge von 716 Aminosäuren transkribiert. Dieses wird über die N-terminale MTS als Präprotein erkannt und ins Mitochondrium importiert. Die spezifische und konservierte Aminosäureabfolge des Aminoterminus deutet auf diesen Import-Mechanismus, über den TOM-Komplex und den TIM23-Komplex, hin, der in der Freilassung des Vorläuferproteins in die Matrix gipfelt (Gakh et al., 2002). Hier erfolgt die Reifung des Präproteins, bei welcher die MTS mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die MPP abgespalten wird (Rehling et al., 2003). Anschließend kann das reife, ~60 kDa *YME1L1* durch Chaperone gefaltet und mit seiner Transmembrandomäne in die innere Mitochondrienmembran integriert werden (Leonhard et al., 1996; Mokranjac and Neupert, 2008). Hierbei assemblieren sechs bis acht Monomere des *YME1L1*-Proteins in einen homo-oligomeren Komplex mit einer Größe von ~1 MDa (Leonhard et al., 1996; Stiburek et al., 2012). Dieser bildet eine Pore – Ort der proteolytischen Aktivität – in welchem Substrate eingeschleust und umgesetzt werden (Graef and Langer, 2006; Leonhard et al., 1996). Mit der proteolytisch aktiven Seite am C-Terminus agiert *YME1L1* im Intermembranraum als eine konstitutiv aktive Protease.

YME1L1 als Protease des mtUPR

Das humane YME1L1 ist unverzichtbarer Bestandteil des mtUPR-Systems. Sowohl dem Protein der Hefe als auch der humanen Form wurden eine Chaperonaktivität nachgewiesen (Leonhard et al., 1999; Schreiner et al., 2012). YME1L1 ist somit in der Lage falsch oder nicht gefaltete Proteine zu erkennen und diese adäquat zu falten, kann aber auch gleichzeitig dysfunktionale Proteine in seiner proteolytischen Pore degradieren und somit mitochondrialen Stress vermeiden (Baker et al., 2012; Graef and Langer, 2006). Neben der Proteolyse ist die Regulation der mitochondrialen Dynamik, speziell der Fusion, über das hauptverantwortliche Protein OPA1 eine Funktion der i-AAA⁺-Protease. OPA1, als einzig bekannter Akteur für die Fusion der inneren mitochondrialen Membran zweier Mitochondrien, wird von der Transkription bis zur Prozessierung intensiv reguliert. OPA1 liegt im Menschen in Form von acht mRNA-Isoformen vor (Delettre et al., 2000). Nach der MPP-abhängigen Prozessierung in der Matrix, verbleiben zwei lange, membrangebundene OPA1-Proteine (L-OPA1), von denen alle eine S1 splicing site, aber nur die Hälfte der Isoformen eine zweite S2 splicing site besitzen (MacVicar and Langer, 2016). Mit Hilfe dieser S1 und S2 Positionen können sowohl im murinen als auch humanen Organismus YME1L1 und OMA1 die langen OPA1-Proteine, zu kürzeren, löslichen (S-OPA1) Proteinen spalten (Abbildung 3). YME1L1 erzeugt hierbei das S-OPA1 d Protein durch konstitutive Prozessierung an S2. OMA1, als stress-induzierte Protease, ist verantwortlich für die Bildung zweier weiterer kurzer Isoformen: S-OPA1 c, e (Abbildung 3) (Guillery et al., 2008). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die L-OPA1 Proteine essentiell für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Fusion sind, wobei den kurzen Spaltungsprodukten eine putative Rolle in der Trennung der Mitochondrien zugeschrieben wird (Anand et al., 2014; Ishihara et al., 2006; MacVicar and Langer, 2016). OPA1 und die Fusion der inneren mitochondrialen Membran stellen demnach einen fein-regulierten Mechanismus dar, der maßgeblich durch YME1L1 beeinflusst wird (Anand et al., 2014). Ein Ausbleiben der dynamischen Fusion kann in verschiedenen Organismen zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks führen und

schwerwiegende Folgen haben, wie bereits in diversen Organismen gezeigt wurde (Arduino et al., 2011; Chen and Chan, 2009; Knott et al., 2008).

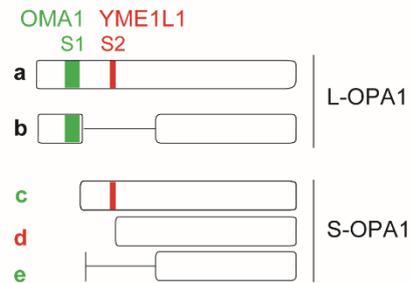


Abbildung 3: YME1L1 prozessiert OPA1 zur Erhaltung der mitochondrialen Fusion. YME1L1 und OMA1 sind in der Lage die langen, membrangebundenen Isoformen des OPA1-Protein (L-OPA1, long OPA1) in lösliche, kurze Isoformen (S-OPA1, short OPA1) zu spalten. Hierbei prozessiert YME1L1 als konstitutiv aktive Protease L-OPA1 a zu S-OPA1 d. OMA1, als stress-induziertes Enzym, bildet S-OPA1 c und e. Die L-OPA1 Isoformen sind essentiell für die erfolgreiche Fusion der Mitochondrien. Sämtlichen S-OPA1 Isoformen wird eine Rolle in der Trennung der tubulären Mitochondrienstrukturen zugeschrieben.

Besonders im Mausmodell wurde deutlich, dass die Erhaltung der Fusionsprozesse und seiner Regulationseinheiten essentiell für die Erhaltung des gesamten Mitochondriums ist (Anand et al., 2014; Wai et al., 2015). Die ganzheitliche Betrachtung des murinen Organismus zeigt deutlich, dass eine Schädigung der Mitochondrien zu vielfältigen Ausfallerscheinungen in verschiedensten Geweben führen kann. Mitochondriale Erkrankungen sind sowohl in murinen als auch im humanen Organismus Krankheiten mit einer hohen Variabilität an Symptomen und Schweregraden.

1.4 Mitochondriopathien - das dysfunktionale Mitochondrium

Mitochondriopathien treten meist als Multiorganerkrankungen auf, da alle Organe und Gewebe von der Präsenz der Mitochondrien abhängig sind. Bei einer Mitochondriopathie sind meist Organe mit hohem Energiebedarf, wie Muskel und Gehirn, am stärksten betroffen, da sie vom synthetisierten ATP der Mitochondrien besonders abhängig sind (Berlit, 2014; Deschauer et al., 2014). Das klinische Bild einer Mitochondriopathie variiert sehr stark je nach betroffenem Gewebe und kann zu einem sehr heterogenen Symptompektrum führen. Hierzu können unter

anderem Entwicklungsverzögerungen, Intelligenzminderung, Epilepsie, Ataxie, Spastiken, Muskelschwäche, Sehstörungen, Schwerhörigkeit und Stoffwechselstörungen des Zitrats-, Harnstoff- oder Glukosestoffwechsels gehören (Sperl et al., 2011; Wallace, 1999). Es kann eine Vielzahl von Geweben betroffen sein, so dass gastrointestinale, endokrine, kardiale und renale Symptome das klinische Bild erweitern und die Diagnose erschweren können (Berlit, 2014; Hübner et al., 2013).

Mitochondriopathien können nach drei Kategorien definiert werden: nach der Ursache (hereditär, primär oder sekundär erworben), dem biochemischen Defekt oder dem klinischen Phänotyp (Finsterer, 2004). Letzteres stellt sich oftmals als Kumulation verschiedener Symptome (Syndrom) dar. Zu diesen Syndromen zählen unter anderem das MELAS-Syndrom mit mitochondrialer Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Episoden oder das Kearns-Sayre-Syndrom mit Ophthalmoplegie, Retinopathia pigmentosa und Myopathien, um nur zwei Vertreter zu nennen (Deschauer et al., 2014; El-Hattab et al., 2015; Finsterer, 2004). Diese Heterogenität erschwert eine genaue Diagnose der Mitochondriopathien. Diese beruht meist auf der Gesamtbetrachtung von Anamnese, Blut- und Liquor-Diagnostik (Laktat, Pyruvat, Aminosäuren), Muskelbiopsat-Untersuchungen, inklusive immunhistologischer Färbungen, elektronenmikroskopischer Darstellung der Mitochondrien, biochemischen Enzymaktivitätsmessungen und weiteren molekulargenetischen Untersuchungen (Finsterer, 2004; Hübner et al., 2013). Zusätzliche, gewebsspezifische Untersuchungen können sich anschließen. Meist bildet sich erst aus der Summe der Ergebnisse eine klare Diagnose. Mitochondriopathien können sich bereits im frühen Kindesalter manifestieren. Auch im Erwachsenenalter kann sich eine Mitochondriopathie, durch den progressiven Verlauf der Symptomatik, noch herausbilden. Die Therapie dieser Erkrankung ist nicht kurativ, erfolgt metabolisch oder symptomspezifisch, je nach ursächlichem Faktor (Finsterer, 2004).

Mitochondriopathien, als Störungen der Atmungskettenaktivität, können durch viele verschiedene Faktoren verursacht werden. Ein Großteil bekannter Mitochondriopathien wird durch Mutationen meist nukleär kodierter, seltener

mitochondrial kodierter Gene verursacht (Wallace, 1999; Wallace, 2001; Wallace, 2010). Dies begründet sich vor allem auf der geringen Anzahl der Gene des mitochondrialen Genoms und der maternalen Vererbung (Calvo and Mootha, 2010; Gerdes et al., 2012; Wallace, 2010). Das heterogene, klinische Bild der Mitochondriopathie ist meist mit Dysfunktionen von Proteinen verbunden, die für die Erhaltung des Organells verantwortlich sind. Vor allem Mutationen in Genen der Atmungskette, der mitochondrialen Dynamik oder der Proteinqualitätskontrolle können schwere Formen von Mitochondriopathien auslösen (Martinelli and Rugarli, 2010; Soto, 2003). Das Mitochondrium ist von der Funktionalität der ribosomalen Transkription und Translation, der Importmaschinerie, der Proteinerkennung und anderen Stationen der mitochondrialen Proteinbiosynthese abhängig. Selbst weniger pathologisch-assoziierte Mutationen können großen Einfluss auf die Kaskaden der mitochondrialen Funktion haben. Des Weiteren führt eine ausbleibende *de novo* Synthese mit ansteigendem Lebensalter zur Anhäufung spontaner, mitochondrialer Mutationen. Die Anzahl bekannter krankheitsassoziiierter Mutationen nimmt mit den verbesserten diagnostischen Methoden der Molekulargenetik rapide zu. Whole-Gen- oder Whole-Exom-Sequenzierung an DNA der Patienten ermöglicht die gezielte Identifizierung pathologischer Mutationen und erleichtert somit die Diagnose. Die hohe Variabilität der Mutationen verursacht demnach auch das heterogene Bild der Mitochondriopathie. Die Symptome können sich mit fortschreitendem Lebensalter verstärken, da sich auch die Anzahl der mitochondrialen Mutationen erhöht. Eine Mitochondriopathie kann auch sekundär durch andere Erkrankungen, nicht-mitochondrial-assoziierte Genmutationen oder exogene Noxen hervorgerufen werden. So ist zum Beispiel bekannt, dass sowohl Parkinson oder eine HIV-Infektion eine sekundäre Mitochondriopathie hervorrufen können (Martin, 2006; Sperl et al., 2011). Diese machen jedoch nur einen geringen Anteil der Gesamterkrankungen aus.

2 Zielstellung

Ziel dieser Dissertation ist die Identifizierung und Charakterisierung einer neuen Form der Mitochondriopathie, ausgelöst durch eine Mutation im *YME1L1*-Gen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Aufklärung der Krankheitsursache sowie des molekularbiologischen Pathomechanismus. Für den experimentellen Ansatz werden humane, primäre Fibroblasten von erkrankten Kindern der Indexfamilie untersucht. Mit Hilfe von Whole-Exom- und Sanger-Sequenzierungen, molekularbiologischen, biochemischen und zellulären Experimenten an DNA und Zellen der Patienten sollen Erkenntnisse zur ursächlichen Mutation sowie zur Funktion des betroffenen *YME1L1*-Gens im Menschen gewonnen werden. Gleichzeitig kann ein direkter Vergleich zu anderen Modellen, bezüglich der Rolle *YME1L1*s in der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle, gezogen werden. Die Aufklärung des Pathomechanismus kann weiterhin zu einer verbesserten Diagnostik für zukünftige Patienten beitragen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav, Varioklav	HP Medizintechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Externe Stromquelle	Biorad (Kalifornien, USA)
Elisa-Reader, Synergy 2	Biotek Instrument (Vermont, USA)
Elisa-Reader, Varioskan	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Feinwaage, CP225D	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Gradienten-Gießler	Biocomp (Fredericton, Canada)
Imager, Chemi Doc XRS+	Biorad (Kalifornien, USA)
Inkubator, 5810E	NuAIR (Minnesota, USA)
Inkubator, C150	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Magnetrührer, C-MAG HS7	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Mikroskop, Leica SL 2360	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop, Yokogawa CSU-X1	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts)
Mikroskop, Axio Observer	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop, LSM5	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop, Meta 510	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop, BX51	Olympus (Tokio, Japan),
Mikrozentrifuge	VWR (Pennsylvania, USA)
Nano Photometer	IMPLEN (Kalifornien, USA)
Neubauer-Zellzählkammer	Labor Optik (Lancing, UK)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe, Pipetus	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Potter S Homogenisator	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
qPCR-System, StepOne Plus	Applied Biosystems (Kalifornien, USA)
Röntgenfilm-Kassette	Kodak (New York, USA)
Schüttler, Swip	Edmund Bühler (Hechingen, Deutschland)

SDS-Page System, Mini-Protean®	Biorad (Kalifornien, USA)
SDS-Page System, SE600 Ruby	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Semi-Dry-Blotter	VWR (Pennsylvania, USA)
Thermocycler, T100	Biorad (Kalifornien, USA)
Thermoschüttler, MB-102	BIOER (Zhejiang, China)
Vortex, MS2 Minishaker	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Waage, Navigator	OHAUS Corporation (New Jersey, USA)
Wasserbad, 1086	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Western Blot Wet Tank	Biorad (Kalifornien, USA)
Zentrifuge, 5427R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge, GS-15R	Beckman (Krefeld, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamidlösung, 30%	Biorad (Kalifornien, USA)
Agarose	Biozym (H. Oldendorf, Deutschland)
Ammoniumpersulfat, APS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ApoONE® Homogenous Caspase 3/7	Promega (Wisconsin, USA)
Bovine Albumin Standard	Pierce (Teil von Thermo Fisher)
Bovines Serumalbumin, BSA	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Cell Proliferation ELISA, BrdU®	Roche (Basel, Schweiz)
Cell Titer Blue Assay®	Promega (Wisconsin, USA)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Dithiothreitol, DTT	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
DMEM-Medium	Gibco (Teil von Thermo Fisher)
DNA Größenmarker, 100 bp	Invitrogen (Kalifornien, USA)
Eindeckmedium, ImmuMount®	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Entwicklerlösung	Kodak (New York, USA)
Ethanol, vergällt, 100%	VWR (Pennsylvania, USA)

Ethanol, vergällt, 99,99%	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure-Dinatriumsalzdihydrat, EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fixierlösung	Kodak (New York, USA)
Fötales Kälberserum, FBS	Merck Biochrom (Berlin, Deutschland)
GeneJuice	EMD Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
GoTaq-G2-DNA-Polymerase	Promega (Wisconsin, USA)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Inducible-expression-vector-Flp-In™-T-REx™-System	Invitrogen (Kalifornien, USA)
Lipofectamine, RNAiMAX®	Invitrogen (Kalifornien, USA)
Lipofectamine, 2000	Invitrogen (Kalifornien, USA)
M199 Medium	Life Technologies (Breda, Niederlande)
Magermilchpulver	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Maxima SYBR Green, 2x Mastermix	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mitotracker®, DeepRed	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Mitotracker®, Green FM	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat, SDS	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natriumhydroxid, NaOH	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N, N'-Methylen-bis-acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N, N, N', N-Tetramethylen-Ethylendiamin, TEMED	Biorad (Kalifornien, USA)
Optimem®	Gibco (Teil von Thermo Fisher)
Parafomaldehyd, PFA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Teil von Thermo Fisher)
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung, PBS	Merck Biochrom (Berlin, Deutschland)
Phusion-Site-Directed-Mutagenesis-Kit	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)

Ponceau-Rot-Färbelösung	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Protease-Inhibitor-Tabletten	Sigma Aldrich (Missouri, USA) und Roche (Basel, Schweiz)
Proteinmarker Page Ruler Plus	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Proteinmarker SeeBlue Plus 2	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Proteinase K	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Restriktionsenzym, <i>AvaI</i>	NE Biolabs (Massachusetts, USA)
RIPA-Puffer, 10x	Cell Signalling (Cambridge, UK)
TaqMan qPCR System	GenScript (New Jersey, USA)
ThermoScript RT-PCR System	Invitrogen (Kalifornien, USA)
Tris Base	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRI-Reagenz®	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Triton-X	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco (Teil von Thermo Fisher)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Autoradiography Film RX, 18 x 24 cm	FUJI (Tokio, Japan)
Blotting-Papier, 0,35 mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Deckgläschen, Ø 18, 14, 12 mm	Menzel-Gläser (Teil von Thermo Fisher)
Einweg-Pasteur-Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
FluoroDish® Tissue Culture Dishes	WPI (Florida, USA)
Gefilterte Pipettenspitzen, 10-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Hyperfilm ECL, 18 × 24 cm	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Isopropanol-Einfrierhilfe, Mr. Frosty	VWR (Pennsylvania, USA)
MicroAmp 96 Well Tray	Applied Biosystems (Kalifornien, USA)
MicroAmp 96-Well Support Base	Applied Biosystems (Kalifornien, USA)
MicroAmp Adhesive Foil	Applied Biosystems (Kalifornien, USA)
MultiPLY 8er Strips	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Multiwell Platte, 6, 12, 24, 96 Wells	TPP (Trasadingen, Schweiz)

Nitrozellulose-Membran, 0,45 µm	Biorad (Kalifornien, USA)
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen, Deutschland)
Parafilm® M	Sigma Aldrich (Missouri, USA)
Pipettenspitzen, 10-1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße, 0,5-5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäßständer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rundboden-Röhrchen, 50 ml	Falcon, Corning (New York, USA)
Serologische Pipetten, 1-25 ml	Falcon (New York, USA)
Sterilfilterflaschen, 250, 500 ml	Corning (New York, USA)
Zellkulturflaschen, 25, 75 cm ²	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen, Ø 3, 6, 10 cm	TPP (Trasadingen, Schweiz) und Falcon (New York, USA)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen, 15, 50 ml	TPP (Trasadingen, Schweiz) und Falcon (New York, USA)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Zellkulturmedien

Humanes Vollmedium

DMEM GlutaMax
mit 4,5 g/l D-Glucose, Pyruvat
15% fötales Kälberserum
1% Penicillin/Streptomycin

HEK293-Vollmedium

DMEM GlutaMax
mit 4,5 g/l D-Glucose, Glutamin
10% fetales Kälberserum
1% Penicillin/Streptomycin

Murines Vollmedium

DMEM GlutaMax
mit 4,5 g/l D-Glucose, Pyruvat
10% fötales Kälberserum
1% Penicillin/Streptomycin

Humanes Vollmedium zur Atmungskettenanalyse

M199 Medium
10% fetales Kälberserum
1% Penicillin/Streptomycin

Lösungen zur DNA-Extraktion aus Blut

Lysepuffer

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0,1 mM Na₂EDTA·H₂O

SE-Puffer

75 mM NaCl

25 mM Na₂EDTA·H₂O

pH 8.0

Lösungen zur Zellyse

Zellyse-Puffer zur DNA-Extraktion

1 M Tris (pH 8.5)

0,5 M EDTA

20% SDS

5 M NaCl

ddH₂O

Radioimmunopräzipitation-Puffer,

RIPA⁺⁺

1x 10-fach konzentrierten RIPA-Puffer

10 µM Phenylmethylsulfonylfluorid

1 Tablette Protease Inhibitor

Zellyse-Puffer zur RNA-Extraktion

4 M Guanidinthiozyanat

25 mM Natriumzitat

0,5% Natrium-Lauryl-Sulfat

RNAse ddH₂O

pH 7.0

8 µl β-Mercaptoethanol / ml

Lösungen zur Proteinanalyse

4x SDS-Puffer (Laemmli-Puffer)

0,04 M DTT

0,02 M Tris-HCl (pH 6.8)

4 ml Glycerol

0,8 g SDS

0,02 g Bromphenol-Blau

48% Acrylamidlösung

96 g Acrylamid

3 g N, N'-Methylen-Bis-Acrylamid

Auf 200 ml mit ddH₂O auffüllen

10% SDS

25 mg SDS
250 ml ddH₂O

10% APS

1 mg APS
10 ml ddH₂O

Tris-Glycin-Sammelgellösung (3%)

6,5 ml ddH₂O
1 ml 30% Acrylamidlösung
2,5 ml Tris-Glycin Sammelgel-Puffer
100 µl 10% SDS
100 µl 10% APS
10 µl TEMED

Tris-Glycin-Trenngellösung (8%)

4,6 ml ddH₂O
2,6 ml 30% Acrylamidlösung
2,6 ml Tris-Glycin Trenngel-Puffer
100 µl 10% SDS
100 µl 10% APS
6 µl TEMED

1x Tris-Glycin-Trenngel-Puffer

1 M Tris-HCl
ddH₂O
pH 8.8 einstellen

1x Tris-Glycin-Sammelgel-Puffer

0,5 M Tris-HCl
ddH₂O
pH 6.8 einstellen

1x Elektrophorese-Puffer

0,192 M Glycin
0,025 M Tris-HCl
ddH₂O
0,1% SDS

1x Transfer-Puffer

0,039 M Glycin
0,047 M Tris
pH 9.7 einstellen
ddH₂O
20% Methanol frisch hinzufügen

Tris-Tricin-Sammelgellösung (3%)

4,15 ml ddH₂O
0,5 ml 48% Acrylamidlösung
1,55 ml 3x Tris-Tricin-Gelpuffer
50 µl APS
16 µl TEMED

Tris-Tricin-Trenngellösung (8%)

10,1 ml ddH₂O
3,2 ml 48% Acrylamidlösung
6,7 ml 3x Tris-Tricin-Gelpuffer
100 µl APS
10 µl TEMED

1x Tris-Tricin-Anoden-Puffer

0,2 M Tris
ddH₂O
pH 8.9 einstellen

10x Tris-Tricin-Kathoden-Puffer

1 M Tris
1 M Tricin
1% SDS
ddH₂O
pH 8.45 einstellen

3x Tris-Tricin-Gelpuffer

3 M Tris
0,3% SDS
ddH₂O

1x Tris-gepufferte Salzlösung, TBS

0,008 M Tris-HCl
0,114 M NaCl
ddH₂O

1x TBS-Tween, TBS-T

1x TBS
0,001% Tween 20
ddH₂O

Blockierlösung

5 g Magermilchpulver oder FBS
100 ml TBS-T

Luminol

0,24 M Luminol
10 ml DMSO

p-Coumarinsäure

0,09 M p-Coumarinsäure
5 ml DMSO

Enhanced Chemiluminescence-
Puffer, ECL

0,1 M Tris
ddH₂O
pH 8.5 einstellen

Isotonischer Puffer zur
Mitochondrienanreicherung

0,25 M Sucrose
5 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA
0,1 mM PMSF

*Lösungen für die Proteinanalyse mittels Sucrosegradienten*Isotonischer Puffer

0,25 M Sucrose
 5 mM Tris-HCL (pH 7.5)
 1 mM EDTA
 1x Protease Inhibitor Cocktail

Lysepuffer

270 mM Sucrose
 100 mM KCl
 20 mM MgCl₂
 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 1x Protease Inhibitor Cocktail
 6 g Digitonin/ g isoliertes Protein

*Lösungen für fluoreszenzmikroskopische Analysen*Phosphatpuffer, 0,24 M TPO₄

137,68 g Na₂HPO₄·12H₂O
 14,36 g Na₂HPO₄·H₂O
 2 l ddH₂O

Waschlösung, 1x PBS

10 ml 10x PBS
 90 ml ddH₂O

Fixierlösung, 4% PFA

4 g Paraformaldehyd
 500 ml ddH₂O
 Tropfenweise NaOH
 500 ml 0,24 M TPO₄

Blockierlösung

5 ml Fetales Kälberserum
 45 ml 1x PBS

Permeabilisierungslösung

50 µl Triton-X
 45,95 ml ddH₂O

Antikörperlösung

2,5 ml FBS
 47,5 ml 1x PBS

3.1.5 Antikörper

Die immunzytochemische, -histochemische und chemilumineszente Detektion von Proteinen erfolgte mittels Primär- und Sekundärantikörpern der entsprechenden Spezies und zu den angegebenen Verdünnungen.

Name	Verdünnung	Firma	Spezies
Primäre Antikörper			
ATP-Synthase- β	1:200	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)	Kaninchen
COX IV	1:1000	Cell Signaling (Cambridge, UK)	Maus
CYCLOPHILIN D	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)	Maus
CYTOCHROM C	1:1000	BD Biosciences (New Jersey, USA)	Maus
NDUFB6	1:1000	Mitosciences (Oregon, USA)	Maus
OPA1	1:1000	BD Biosciences (New Jersey, USA)	Maus
PD41	1:1000	Cell Signaling (Cambridge, UK)	Maus
PRELID1 (PX19)	1:500	Abnova (Taipei, Taiwan)	Maus
SDHA	1:10000	Abcam (Cambridge, UK)	Maus
TOM20	1:1000	BD Biosciences (New Jersey, USA)	Maus
TOM20	1:1000	Santa Cruz (Texas, USA)	Kaninchen
YME1L1	1:1000	Proteintech (Illinois, USA)	Kaninchen
Sekundäre Antikörper			
Anti -Maus-Cy3	1:1000	Invitrogen (Kalifornien, USA)	Esel
Anti-Kaninchen-Cy3	1:1000	Invitrogen (Kalifornien, USA)	Esel
Anti-Kaninchen-Alexa488	1:500	Invitrogen (Kalifornien, USA)	Ziege
Anti-Maus-Alexa488	1:1000	Invitrogen (Kalifornien, USA)	Ziege
Anti-Maus-Alexa568	1:500	Invitrogen (Kalifornien, USA)	Ziege
Anti-Kaninchen-HRP	1:2000	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)	Esel
Anti-Maus-HRP	1:10000	Dako (Kalifornien, USA)	Ziege
Weitere Farbstoffe			
DAPI	1:1000	Sigma Aldrich (Missouri, USA)	

Tabelle 1: Liste der Antikörper. ATP-Synthase- β , ATP-Synthase-Untereinheit-Beta; COX4, Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit-4; DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol; HRP, Horseradish-

Peroxidase (Meerrettichperoxidase); NDUFB6, NADH-Dehydrogenase-Ubiquinon-1-Beta-Untereinheit-6; OPA1, Optic-Atrophy-1; PD41, Ubiquitin; PX19, PRELID1, Protein-of-Relevant-Evolutionary-and-Lymphoid-Interest-domain-containing-protein-1; SDHA, Succinat-Dehydrogenase; TOM20, translocon-of-outer-mitochondrial-membrane-20; YME1L1, Yeast-Mitochondrial-Escape-Protein-1-like-1.

3.1.6 Primer und Sonden

Für die quantitative Realtime-PCR, die semi-quantitative PCR sowie für Sequenzierungen und Genotypisierungen designten wir spezifische Primer mit der Software Primer3¹ bzw. NCBI Primer-Blast². Alle Primer und Sonden wurden anschließend von TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert.

Primer/Sonde	Spezies	Sequenz
qPCR		
hRP11-F	Human	GCACCACGTCCAATGACAT
hRP11-R	Human	GTGCGGCTGCTTCCATAA
hRP11-TM	Human	FAM-TACCACGTCATCTCCTTTGATGGCTCCTAT-TAMRA
hYME1L1-F	Human	CCCATGTCTCTGCACAATCC
hYME1L1-R	Human	ACCCCTTCACGAATGATGG
hYME1L1-TM	Human	FAM-CAGCTAATCTCTCGGAGGTAGACTGGAGAC-BBQ
mHprt-F	Maus	ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA
mHprt-R	Maus	TTGAGCACACAGAGGGCCA
mHprt-TM	Maus	FAM-TGGACAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGATG-TAMRA
mYme1l1-F	Maus	AGGCGAACTCGTCTGATCCTC
mYme1l1-R	Maus	ACAGGGTCTACCGCAGAATCAA
mYme1l1-TM	Maus	FAM-TCCTGTAGTTGTCCGAAAGCGCACAA-BBQ
Sanger Sequenzierung		
Q105_F	Human	TCTTAGGCATTTTTCTTTTCCTG
Q105_R	Human	TGATCCAAAAAGCAAATATTTTCA
Genotypisierung		

¹ <http://primer3.ut.ee/>, Stand: 09.01.2017

² https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, Stand: 09.01.2017

YME1L1_Ex5_F	Human	CGTATTGAAGTGTGTCAGGCAA
YME1L1_Ex5_R	Human	TATCTGATTTCTTTTGTGGCTGA
OMA1 qPCR		
OMA1-F	Human	AGCCCTGCTTCCATAAGAGCTA
OMA1-R	Human	TCTTGTTAGGAGGAAGTGCCTG
OMA1-TM	Human	FAM-TCCACGGTTTCAAGCTGCTCCG-BBQ
Mutagenese		
YME1L1-MUT-F	Human	GGCCAGTTTTTCATACAGTCTTGGGGTTTTAAACTTTG
YME1L1-MUT-R	Human	CAAAGTTTTAAACCCCAAGACTGTATGAAACTGGCC

Tabelle 2: Primer und Sonden. F, Forward; h, human; Hprt, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase; m, murin; OMA1, Overlapping-with-the-m-AAA-protease-1-homolog R, Revers; RPII, RNA-Polymerase-II; TM, Taq-Man-Sonde; Yme1l1, Yeast-Mitochondrial-Escape-Protein-1-like-1; YME1L1_Ex5, Exon 5 des YME1L1-Gen; YME1L1-MUT, YME1L1-Mutagenese zur Generierung der Patientenmutation.

3.1.7 siRNAs

Alle siRNAs wurden kommerziell erworben. Design und Produktion erfolgten über die Firma Invitrogen (Kalifornien, USA).

siRNA	Nummer	Spezies	Sequenz	ID
OMA1	#1	Human	TGGACTACTGCTTGCTGCAAAGGCT	HSS132976
OMA1	#2	Human	TGGCAGCAAATGGAGTTCGTTGATA	HSS132977
OMA1	#3	Human	CAGCAGUCCCUAGUCUGUCAGUAUU	HSS174400
SLP2		Human	GCCUCCGUUAUGAGAUCAAGGAUUAU	HSS121274

Tabelle 3: Liste der siRNAs für OMA1 und SLP2. OMA1, Overlapping-with-the-m-AAA-protease-1-homolog; SLP2, Stomatin-like-protein-2.

3.1.8 Biologische Proben

Patienten

Die Patienten und Patientinnen der Indexfamilie wurden von Prof. Dr. Angela M. Kaindl in der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin untersucht und in die klinische Studie „Entwicklungsstörungen des Gehirns-Mikrozephalien“ aufgenommen. Die Studienteilnahme ermöglichte weiterführende genetische und zellbiologische Untersuchungen zur Aufklärung der Erkrankung. Die Eltern der erkrankten Kinder stimmten – nach ausführlicher Aufklärung – fotografischen Aufnahmen, der Untersuchung biologischen Materials (Blut, Liquor, Haut- und Muskelgewebe), zellbiologischen und genetischen Untersuchungen sowie der Veröffentlichung der Ergebnisse in entsprechender Fachliteratur zu. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin bewilligt (Zulassungsnummer: EA1/212/08).

Tiere

Alle Versuche an Tieren und die Entnahme und Nutzung von Organen, Geweben oder Zellen der Versuchstiere erfolgte nach den Vorschriften der nationalen Ethikkommission (Registrierungsnummer: T0344/12). C57BL/6 Mäuse wurden von der Tierhaltung der Charité-Universitätsmedizin Berlin (FEM) versorgt und für Experimente ins Labor überstellt. Zur Organentnahme wurden die Tiere zügig durch Genickbruch getötet und anschließend die benötigten Gewebe, nach den geltenden Standards der Versuchstierhandhabung, präpariert.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

Gewinnung und Kultur von primären, humanen adulten Fibroblasten

Primäre, humane adulte Fibroblasten (HAF) wurden aus der Hautbiopsie einer Patientin und dreier unabhängiger gesunder Kontrollen (Ko1, Ko2, Ko3) gewonnen. Dies wurde freundlicherweise von Frau Burmester vom Institut für Humangenetik und Medizinische Genetik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, nach einem standardisierten Protokoll, durchgeführt.

Die Kultur der HAF erfolgte im humanen Vollmedium. Die Zellen wuchsen in 25 mm²- oder 75 mm²-Zellkulturflaschen sowie auf Zellkulturschalen (Ø 6, 10, 15 cm), Well-Platten (6, 12, 24, 96 Wells) oder Deckgläschen (Ø 12-18 mm), abhängig von der benötigten Zellmenge. Alle Kulturen inkubierten durchgehend in einer wassergesättigten Umgebungsbedingung von 5% CO₂ und 37 °C. Zur Aufrechterhaltung des Zellwachstums wurde die Kultur einer 25 mm²-Zellkulturflasche bei 80%iger Konfluenz alle 48-72 h passagiert. Eine Zellpassage setzte sich zusammen aus einem Waschschrift mit 5 ml 1x PBS, der anschließenden Zugabe von 1 ml 0,05%igen EDTA-Trypsin für 3 Minuten bei 37 °C und dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 4 ml humanem Vollmedium. Die gelösten Zellen wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml frischem Vollmedium gelöst und anschließend äquivalent auf zwei sterile Kulturflaschen (25 mm²) verteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte bei 80%iger Konfluenz in 1 ml 10% DMSO in humanem Vollmedium, mit Hilfe einer Einfrierhilfe bei -80 °C für 24 h. Dauerhaft wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Gewinnung und Kultur von immortalisierten, murinen embryonalen und adulten Fibroblasten

Murine, embryonale Fibroblasten (MEF) sowie murine, adulte, kardiale Fibroblasten (MAF) entstammen dem Modell der konditionalen *Yme111-loxP*-Knockoutmaus (*Yme111*^(-/-)) (Anand et al., 2014; Wai et al., 2015; Yao and

Shoubridge, 1999). Alle immortalisierten murinen Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Langer, Institut für Genetik der Universität Köln, zur Verfügung gestellt.

Die Kultur der MEF und MAF erfolgte in murinem Vollmedium. Die Zellen wuchsen in 25 mm²- oder 75 mm²-Zellkulturflaschen sowie auf Zellkulturschalen (Ø 6, 10, 15 cm), Well-Platten (6, 12, 24, 96 Wells) oder Deckgläschen (Ø 12-18 mm), abhängig von der benötigten Zellmenge. Alle Kulturen inkubierten durchgehend in einer wassergesättigten Umgebungsbedingung von 5% CO₂ und 37 °C. Zur Aufrechterhaltung des Zellwachstums wurde die Kultur einer Ø 10 cm-Zellkulturschale bei 80%iger Konfluenz alle 48-72 h passagiert. Eine Zellpassage setzte sich zusammen aus einem Waschschrift mit 5 ml 1x PBS, der anschließenden Zugabe von 2 ml 0,05%igen EDTA-Trypsin für 3 min bei 37 °C und dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 8 ml humanem Vollmedium. Die gelösten Zellen wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml frischem Vollmedium gelöst und anschließend äquivalent auf zwei sterile Kulturschalen (Ø 10 cm) verteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte bei 80%iger Konfluenz in 1 ml 10% DMSO in humanem Vollmedium, mit Hilfe einer Einfrierhilfe bei -80 °C für 24 h. Dauerhaft wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.2 Nukleinsäurebasierte Methoden

DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Humanes EDTA-Blut wurde mit Lysepuffer versetzt, für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 670 g und 4 °C zentrifugiert. Dabei wurde das Blut in lösliche und feste Bestandteile aufgetrennt. Der lösliche Überstand wurde verworfen und die restlichen Bestandteile im Röhrchen gut getrocknet. Dem Kernpellet wurde ein Gemisch aus SE-Puffer, Proteinase K und SDS zugeführt und die festen Zellbestandteile durch Pipettieren gelöst. Die Permeabilisierung der Zellmembranen und Freisetzung der DNA erfolgte in einer Über-Nacht-Inkubation bei 55 °C im Wasserbad. Eine erneute Zugabe und Inkubation von SE-Puffer und gesättigter NaCl-Lösung ließ die verbliebenen Zellen platzen und

setzte die DNA in die Pufferlösung frei. Diese wurde mit zweifachem Volumenanteil 100% Ethanol versetzt und die DNA somit zwischen den löslichen Schichten gefällt. Eine Zentrifugation für 15 min bei 1500 g sammelte die DNA in einem Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes und konnte nach einem Waschschrift in adäquatem Volumen gelöst und bei - 20 °C eingefroren werden.

DNA-Extraktion aus Zellen

Eine Lösung von trypsinierten HAF, MEF und MAF wurde über eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 rpm und Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 480 µl Zellysepuffer gelöst, mit 20 µl Proteinase K (400 µg/ml) versetzt und über Nacht bei konstanter Temperatur von 56 °C geschüttelt. Dabei wurden die Zellen permeabilisiert und die DNA freigesetzt. Die lysierten Zellen wurden 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt und mit einer erneuten zehnminütigen Zentrifugation bei 1300 rpm gefällt. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl reinem 70% Ethanol gewaschen und erneut 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet trocknete bei 56 °C und wurde abschließend in einer adäquaten Menge Nuklease-freiem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

RNA-Extraktion aus Zellen

Adhärenten humanen Fibroblasten wurde das Medium aus der Kulturflasche entzogen, die Zellen mit 1x PBS-Lösung doppelt gewaschen und auf Eis gelagert. Auf eine konfluent-bewachsene 25 mm²-Zellkulturflasche wurden 100 µl eines gekühlten Zellyse-Puffers pipettiert und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung und weitere Verarbeitung erfolgte unter gekühlten Bedingungen und der Verwendung von TRI-Reagenz[®], entsprechend dem Herstellerprotokoll. In Kürze zusammengefasst permeabilisiert das TRI-Reagenz[®] die Zellen und sowohl DNA und RNA als auch Proteine können in die lösliche Phase übergehen. Die Zugabe von Chloroform, mit anschließender Zentrifugation, bewirkt eine Fällung und

Trennung der DNA-, RNA- und Proteinbestandteile in der Lösung in drei unterschiedliche Phasen. Die oberste, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit einer erneuten Isopropanol-Fällung und Zentrifugation sedimentiert. Es schlossen sich ein Waschschriff mit reinem 96% Ethanol und eine Zentrifugation an. Das RNA-Pellet wurde auf dem Thermoschüttler bei 55 °C angetrocknet und anschließend mit einem adäquaten Volumen ddH₂O in einem Wasserbad für 10-15 min gelöst werden. Durch die Zugabe von ddH₂O konnte eine ideale RNA-Konzentration zwischen 600-1300 ng/μl eingestellt werden. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Whole-Exom-Sequenzierung

Die Whole-Exom-Sequenzierung erfolgte nach, bereits veröffentlichtem, Protokoll (Najmabadi et al., 2011). Homozygote Linkage-Intervalle (Chr 10:24, 333, 063-49, 978, 774, LOD=2.533) mit der LOD-Länge >2 und >1MB wurden mit Hilfe des Affymetrix SNP Array 6.0 identifiziert. Für die Sequenzierung wurde 1 μg DNA über den Einsatz des Agilent SureSelect Human All Exon Enrichment Kits Version 3 angereichert und anschließend mit dem Illumina HiSeq2000 Sequenzer im 101 bp single-end Modus sequenziert. Auswertung und Abgleich der Resultate erfolgte unter Berücksichtigung der identifizierten Linkage Intervalle, der Pathogenität der Varianten, der Frequenzen für Allel-Polymorphismen anhand verschiedener Datenbanken wie z.B. 1000Genome³, Exome Variant Server⁴, ExAC⁵ und internen Datenbanken des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik sowie funktioneller Zusammenhänge von spezifischen Genen. Dies führte zur Identifikation von *YME1L1* (chr10p12.1) als Ort der Mutation. Das Auftreten weiterer homozygoter Mutationen konnte anhand von Recherchen in den aufgeführten Datenbanken ausgeschlossen werden. Die Durchführung und Auswertung der Exomsequenzierung oblag Dr. Hao Hu vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin.

³ <http://www.internationalgenome.org>, Stand: 23.02.2017

⁴ <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, Stand: 23.02.2017

⁵ <http://exac.broadinstitute.org/>, Stand: 23.02.2017

Sanger-Sequenzierung

Die genomische DNA bzw. cDNA der Patienten konnten wir aus Blut bzw. HAF extrahieren. Diese wurde anschließend mit Hilfe der SMB Services in Molecular Biology GmbH (Berlin, Deutschland) aufgereinigt und sequenziert. Geeignete Primer für die spezifische Genregion wurden im Vorfeld mittels elektronischer und online verfügbarer Software (Primer 3⁶, NCBI-Blast⁷) selbst entworfen und von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH synthetisiert (Tabelle 2). Eine Analyse der Chromatogramme und Sequenzen, in Form eines Abgleiches mit der Wildtyp-Sequenz, erfolgte manuell und mit Hilfe der Programme Chromas (Technelysium Pty Ltd, Australien) und NCBI-Blast.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion, als Methode zur Vervielfältigung kleinerer DNA-Abschnitte, kann genomische DNA mittels Zugabe von Nukleotiden, Primer und einem Taq-DNA-Polymeraseenzym in cDNA (komplementäre DNA), in Abhängigkeit von spezifischen Temperaturen, umschreiben (Aigner et al., 2012). Diese Temperaturabhängigkeit wird über einen Thermocycler realisiert. Hierfür wurde das System der GoTaq-G2-DNA-Polymerase der Firma Promega (Wisconsin, USA), entsprechend der Herstellerempfehlungen, verwendet. Für die PCR wurde 1 µg genomische DNA mit einem Mastermix aus ddH₂O, Desoxyribonukleotiden, Primer in Vorwärts- und Rückwärtsleserichtung sowie einer Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Spezifische Primer für die Leserichtungen des gewünschten Genabschnitts wurden selbst designt (Tabelle 2). Das Endprodukt der PCR wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel bei 120 V für 45-60 min elektrophoretisch aufgetrennt und das erwartete Genprodukt anhand eines DNA-Größenmarkers abgeglichen.

⁶ <http://primer3.ut.ee>, Stand 23.02.2017

⁷ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand 23.02.2017

YME1L1-Genotypisierung

Aus HAF wurde die genomische DNA nach beschriebenem Protokoll extrahiert und mittels PCR für YME1L1 amplifiziert. Hierfür wurde eine GoTaq-G2-DNA-Polymerase der Firma Promega (Wisconsin, USA) mit zugehörigem Puffer, entsprechend der Herstellerempfehlungen, verwendet. Spezifische Primer für Exon 5 wurden selbst designt und von TIB MOLBIOL synthetisiert (Tabelle 2). Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgte in folgendem temperaturabhängigen Protokoll des Thermocyclers (Tabelle 4). Es folgte ein Verdau des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym *AvaI* in entsprechendem Puffer für 1 h bei 37 °C und konstantem Schütteln. *AvaI* schneidet am Schnittpalyndrom TCGGG/GGGCT, welches durch die Mutation in den Patienten verändert ist. Die Mutation blockiert das Schneiden des PCR-Produkts, was nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in einem 2%igen Agarosegel zu einem größeren Produkt mit einer Länge von 180 bp für die Patienten und bei den Kontrollen zu zwei kleinen Produkten mit einer Länge von 100 bp führte.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	95 °C	2 min	-
2	95 °C	45 s	34x
	55 °C	45 s	
	72 °C	1 min	
3	72 °C	5 min	-

Tabelle 4: Temperaturabhängige Amplifikationsschritte der YME1L1-Genotypisierung. Die Genotypisierung der humanen DNA aus Fibroblasten erfolgte über den Einsatz eines GoTaq-G2-DNA-Polymerase-Systems (Promega) und mit Hilfe eines temperaturabhängigen Programms im Thermocycler (min, Minuten s, Sekunden).

Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR Reaktion stellt eine Methode zur Umschreibung von RNA zu einem komplementären DNA-Strang (cDNA) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase dar (Aigner et al., 2012). Man bedient sich hierbei der Eigenschaft des viralen Enzyms der Reversen Transkriptase, welches in der Lage ist, RNA

mit Hilfe der Zugabe von Desoxribinukleotiden (dNTP), Reaktionspuffer und unspezifischen Primern in cDNA umzuschreiben (Taylor et al., 1976). Die Instabilität von RNA gewährleistet keine dauerhaft gleichbleibende Qualität für den Einsatz in Experimenten und kann somit nicht direkt in PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das ThermoScript-RT-PCR-System-for-First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit® der Firma Invitrogen (Kalifornien, USA) entsprechend der Herstellerangaben, verwendet.

Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Zur Messung der mRNA-Expression verschiedener Gene kann cDNA eingesetzt werden. Die Durchführung der quantitativen Realtime-PCR (qPCR) erfolgte nach bereits veröffentlichten Protokollen (Issa et al., 2013). Es wurden zum einen das TaqMan qPCR System als auch das Maxima SYBR Green (2x) System, entsprechend der Herstellerprotokolle, verwendet. Bei beiden Systemen kommt es zu einer Akkumulation des fluoreszenten Farbstoffs, der entweder an eine komplementäre Sonde gebunden (TaqMan) oder im Master Mix enthalten, selbst amplifiziert und detektiert wird (SYBR Green). Die Durchführung der temperaturabhängigen Schritte erfolgte im StepONE-qPCR-System® der Firma Applied Biosystems (Kalifornien, USA). Um die mRNA-Expression zu ermitteln wurden hierfür spezifische Primer in Vorwärts- und Rückwärtsleserichtung designt. Für den Einsatz des TaqMan-Systems wurden zusätzlich Fluoreszenzgekoppelte Sonden für murines Yme1l1, humanes YME1L1, murines Hprt (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, Referenzgen) und humanes RPII (RNA Polymerase II, Referenzgen) entworfen und eingesetzt (Tabelle 2).

Herunterregulierung von OMA1 mittels siRNA-Transfektion

Zur Herunterregulierung von *OMA1* wurden 100.000 HAF pro Well einer 6-Well-Platte ausplattiert und unter Standard-Kulturbedingungen kultiviert. Zur Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml humanes Vollmedium ohne Antibiotika ersetzt. 2,4 µl jeder *OMA1* siRNA (Tabelle 3) wurden in jeweils 250 µl OPTIMEM® gelöst und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurden 4 µl Lipofectamin RNAiMax® mit 250 µl OPTIMEM® versetzt

und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Reagenzansätze wurden gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den Einschluss der siRNAs in die lipophilen Bestandteile des Transfektionsreagenz zu gewährleisten. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte eine tropfenweise Zugabe von 500 µl des Transfektionsreagenz in jedes Well. Die Zellen verblieben 3 Tage unter Kulturbedingungen. Nach 72 h erfolgte eine Wiederholung der Transfektion unter gleichen Bedingungen. Die Zellen wurden für die Auswertung am Tag 5 der Transfektion auf Deckgläschen bzw. in sterile Zellkulturschalen passagiert. Eine Auswertung der Herunterregulierung erfolgte mittels immunzytochemischer Färbungen und Western Blot. Zur Überprüfung einer effizienten *OMA1*-Herunterregulierung wurde die mRNA-Expression zudem mittels TaqMan-qPCR mit spezifischen Primern und Sonden für *OMA1* (Tabelle 2) ermittelt. Zur zusätzlichen internen Kontrolle der Transfektionseffizienz in den HAF und in Ermangelung eines effizienten Antikörpers für *OMA1*, erfolgte in einem zusätzlichen biologischen Replikat eine Herunterregulierung der *SLP2*-Genexpression nach gleichem Protokoll. Die *SLP2*-siRNA-Transfektion wurde durch einen Western Blot ausgewertet. Diese Zellen wurden jedoch nicht in die Betrachtung der *OMA1*-Herunterregulierung eingeschlossen.

Überexpression diverser genetischer YME1L1-Varianten

Für die Expression diverser genetischer *YME1L1*-Varianten wurde die humane *YME1L1*-Sequenz in einen pcDNA5-FRT/TO-Vektor kloniert (Potting et al., 2013; Wai et al., 2016), um diese mittels einer Flp-Rekombinase-Reaktion stabil in HEK293T-Zellen zu integrieren. Hierfür wurde das Inducible-expression-vector-designed-for-use-with-the-Flp-In™-T-REx™-System der Firma Invitrogen (Kalifornien, USA) verwendet und die *YME1L1*-Genexpression in den transfizierten HEK293T-Zellen über die Zugabe von Tetracyclin induziert. Die diversen genetischen Varianten der humanen *YME1L1*-Sequenz wurden Hilfe von selbst-designten Mutagenese-Primern und dem Phusion-Site-Directed-Mutagenesis-Kit der Firma Thermo Fisher (Massachusetts, USA), nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers, generiert. Die Mutagenese-Primer für *YME1L1*^{R149W} sind in Tabelle 2 aufgeführt. Alle transienten Transfektionen

diverser genetischer YME1L1-Varianten in HeLa-Zellen, MEF oder MAF erfolgten mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 der Firma Thermo Fisher (Massachusetts, USA) oder des GeneJuice-Systems der Firma EMD Millipore (Darmstadt, Deutschland), entsprechend der Herstellerangaben. Für die Komplementationsanalyse wurden MAF zusätzlich mit 100 ng mitochondrial-gerichtetem GFP (mito-GFP) transfiziert. Für die spätere Analyse wurden nur GFP-positive MAF ausgewertet. Die Generierung der stabil-exprimierenden Zellen, sowie die Mutagenese des YME1L1-Plasmids erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Timothy Wai vom Institut für Genetik der Universität Köln.

3.2.3 Untersuchungen der Zellfunktionen

Viabilitätsmessung

Die Viabilität von Zellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assays, einer fluoreszenten Resazurin/Resofurin abhängigen Reaktion ermittelt. Hierfür wurden 1000 Zellen/100 μ l/Well der HAF am Tag 0 in 96-Well-Platten mit schwarzem Boden ausplattiert und für jeden Messpunkt (6, 24, 48, 72, 96, 120 h) jeweils eine Platte präpariert. Es fand eine Kontrollmessung 6 h nach Ausplattieren der Zellen statt, um eine äquivalente Aussaat der Zellen in den Wells zu gewährleisten. 21 h nach Ausplattieren erfolgte die Zugabe von 20 μ l des Resazurin-Reagents in die entsprechenden Wells und eine Inkubation von 3 h bei 37 °C, entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Messung des fluoreszenten Signals der lebenden Zellen bei einer Emission von 560/590 nm und die Auswertung, abzüglich des Blank-Wertes des Mediums, erfolgte am Multi-Detektions-Reader Synergy 2.

Proliferationsanalyse

Eine Untersuchung der Proliferation der HAF erfolgte mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffes Bromdesoxyuridin (BrdU), welcher sich als Analogon der DNA-Basen Thymidin bzw. Desoxy-Uridin in der DNA-Struktur einlagert. Mit fortschreitender Proliferation und der somit verbundenen

Vermehrung der DNA kommt es zu einem akkumulierenden kolorimetrischen Signal. Hierfür wurde ein kommerzielles BrdU-ELISA-Assay der Firma Roche Diagnostics (Basel, Schweiz) angewendet. Es wurden 1000 Zellen/ 100 µl/ Well in eine transparente 96-Well-Platte ausgesät und eine Endkonzentration von 10 µM BrdU pro Well pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation über 2 h bei 37 °C. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit einer Fixierlösung versetzt. Zur Entwicklung des kolorimetrischen Signals wurde die Fixierlösung durch eine Anti-BrdU-Peroxidase Lösung ausgetauscht und inkubiert. Ein dreifacher Waschschrift und die Zugabe eines Substrats ermöglichte abschließend eine Messung der Farbentwicklung in einem Zeitspektrum 10, 20 und 30 min. Die Proliferation der Zellen wurde für drei Messpunkte (24, 72, 120 h) vorbereitet und alle Reagenzien entsprechend des Herstellerprotokolls hinzugefügt. Die Messung der Absorption des kolorimetrischen Signals der lebenden Zellen bei 370/420 nm und die Auswertung, abzüglich des Blank-Wertes des Mediums, erfolgte am Multi-Detektions-Reader Synergy 2.

Untersuchungen zur spontanen Apoptose

Die spontane Apoptose von Zellen wurde mit einem fluoreszierenden Caspase 3-abhängigen Assay, dem ApoONE[®]-Homogeneous-Caspase-3/7-Assay, ermittelt. Hierfür wurden 1000 Zellen/100 µl/Well am Tag 0 in 96-Well-Platten mit schwarzem Boden ausplattiert und für jeden Messpunkt (24, 48, 72, 96, 120 h) jeweils eine Platte vorbereitet. Die Messung der Apoptose erfolgte immer gekoppelt mit einer Viabilitätsmessung der Zellen. Hierfür wurde das CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay eingesetzt. 21 h nach Ausplattieren der Zellen erfolgte die Zugabe von 20 µl des CellTiter-Blue[®]-Reagents in die entsprechenden Wells und eine Inkubation von 3 h bei 37 °C schloss sich an. Die Messung des Viabilitätssignals erfolgte wie bereits beschrieben. Anschließend wurden den gemessenen Wells 100 µl des prä-fluoreszierenden Caspasesubstrats Z-DEVD-R110 in entsprechendem Puffer zugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken der Platte. Die Messung und Auswertung des Fluoreszenzsignals der apoptotischen Zellen erfolgte bei einer

Emissions-Wellenlänge von 521 nm, abzüglich des Blank-Wertes des Mediums, am Multi-Detektions-Reader Synergy 2.

Untersuchungen zur induzierten Apoptose

HAF wurden auf Ø 6cm-Zellkulturplatten in doppeltem biologischem Ansatz mit einer 70%igen Konfluenz ausplattiert. Nach 24 h wurde, durch die Zugabe von 2 µM Staurosporin (STS) ins Zellkulturmedium, Apoptose induziert. Die Zellen wurden anschließend in dem STS-Medium bei Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂) inkubiert. 0, 3 und 6 h nach Zugabe des Stressors wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgestrichen und die Proteine aus den Zellen extrahiert. Die Proteinlysate wurden mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte auf Basis der chemilumineszenten Signalintensitäten für den Antikörper gegen die gesplante Form der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (cleaved-PARP, cPARP), als Apoptosemarker.

Messung der Atmungskettenaktivität in primären humanen Fibroblasten

Die Messung der Aktivität der Atmungskettenenzyme und Komplex V-Enzyme erfolgte nach etablierten, bereits publizierten Methoden (Janssen et al., 2003; Janssen et al., 2007; Janssen et al., 2006; Smeitink et al., 2001). HAF wurden hierfür in humanem Vollmedium zur Atmungskettenanalyse, in einer wassergesättigten Atmosphäre von 37 °C und 5% CO₂, kultiviert. Die Messwerte wurden relativ zur Aktivität der Zitratsynthase dargestellt. Die Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bert van den Heuvel vom Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders des Radboud University Medical Center, Nijmegen.

3.2.4 Immunfluoreszenz- und Histochemische Färbungen

Immunfluoreszenz-Färbungen

Immunfluoreszenz-Färbungen wurden an murinen als auch humanen Zellen appliziert. Die Zellen wurden auf Glas-Deckgläschen in entsprechenden Well-Platten in notwendiger Zelldichte (zwischen 1000 und 100.000 Zellen/ml)

kultiviert und die Deckgläschen zweimal mit 4 °C kalter Waschlösung gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Deckgläschen mit 1 ml Fixierlösung pro Deckgläschen für 10 min bei 37 °C. Nach einem doppelten Waschschrift mit 2 ml Waschlösung pro Deckgläschen wurde 1 ml Permeabilisierungslösung auf jedes Deckgläschen gegeben, bis dieses vollständig bedeckt war. Nach 10 min bei Raumtemperatur schloss sich ein weiterer dreifacher Waschschrift an. Auf den fixierten Zellen konnten anschließend, mit 3 ml Blockierlösung pro Gläschen für 1 h bei Raumtemperatur, alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden. Die Blockierlösung wurde entfernt, die gewünschte Konzentration des Primärantikörpers in 200 µl/Well gelöst und auf die Deckgläschen pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Die Primärantikörperlösung wurde entfernt und ein dreimaliger Waschschrift mit Waschlösung angeschlossen. 400 µl Sekundärantikörperlösung pro Deckgläschen wurden in Konzentrationen entsprechend der Herstellerempfehlungen angesetzt und zusätzlich DAPI in einer Konzentration 1:1000 zur Lösung hinzugegeben. Diese wurde auf die Zellen pipettiert und nach zweistündiger, lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur durch einen erneuten dreifachen Waschschrift abgelöst. Die Zellen wurden final mit ImmuMount® auf Objektträgern eingedeckt.

Histochemische Färbungen

Die histochemischen Färbungen der Muskelgewebsproben für die Succinat-Dehydrogenase (SDHA), die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) sowie die Gomori-Trichrom-Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Werner Stenzel vom Institut für Neuropathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, nach bereits veröffentlichten Protokollen (Preuße et al.; Stenzel et al., 2015).

Charakterisierung des mitochondrialen Netzwerks

Die Charakterisierung des mitochondrialen Netzwerks führten wir anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen durch. Hierbei wurden sowohl Antikörper für mitochondriale Marker wie TOM20 und Cyclophilin D verwendet. Parallel wurden die Zellkerne über eine Inkubation mit DAPI angefärbt. Es erfolgte eine doppelblind Analyse der Morphologie der mitochondrialen Netzwerke. Hierbei wurde auf

die Länge der tubulären Verbindungen zwischen den Mitochondrien geachtet und diese in drei Klassen eingeteilt.

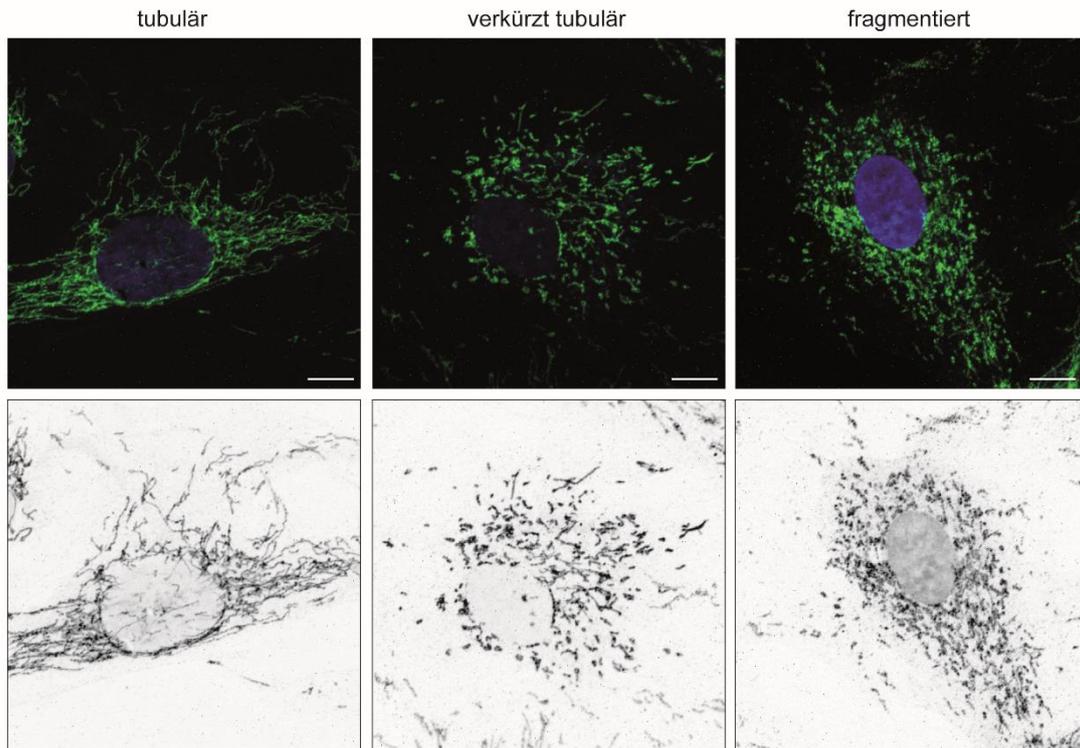


Abbildung 4: Klassifizierung des mitochondrialen Netzwerks. Obere Reihe: Darstellung der unterschiedlichen Netzwerkklassen der Mitochondrien mittels Immunfluoreszenzfärbungen für Cyclophilin D, als mitochondrialen Marker (grün) sowie DAPI-positive Zellkerne (blau; Maßstabsbalken=10 μ m). **Untere Reihe:** Die inverse Darstellung der Immunfluoreszenzsignale der oberen Reihe, dient zur besseren Veranschaulichung der mitochondrialen Morphologie. Die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks wird in drei Klassen unterteilt: tubuläre mitochondriale Verbindungen (links), verkürzte tubuläre mitochondriale Verbindungen (Mitte) und fragmentierte Mitochondrien (rechts).

Unter physiologischen Bedingungen besitzt eine Zelle ein „tubuläres“ Netzwerk. Alle Mitochondrien sind hierbei miteinander verbunden und bilden ein zellumspannendes, fein definiertes Netzwerk. Die Klasse der „verkürzt tubulären“ Mitochondrien zeichnet sich durch zum Teil stark verkürzte Mitochondrienverbindungen, mit mehrfachen Unterbrechungen des Netzwerks aus. Es können in dieser Klasse vereinzelt fragmentartige Strukturen auftreten. Die dritte Klasse der „fragmentierten“ Mitochondriennetze grenzt sich klar von den ersten beiden Klassen ab. In diesen Zellen finden sich ausschließlich unverbundene

Mitochondrien, welche als diffuse Punktsignale innerhalb der Zelle vorliegen (Abbildung 4).

3.2.5 Dreidimensionale Darstellung der mitochondrialen Netzwerke

Zur Darstellung des mitochondrialen Netzwerks wurden 10.000 HAF auf sterilen, runden Ø 18 mm-Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät und über Nacht unter Kulturbedingungen inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein Wachschrift mit 1x PBS und der anschließenden Zugabe von vorgewärmtem, humanem Vollmedium mit 500 nM Mitotracker® DeepRed. Die Zellen waren in der Lage, während einer 30-minütigen Inkubation den Fluoreszenzfarbstoff diffusiv aufzunehmen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen, fixiert und mit DAPI als nukleären Marker gefärbt. Die Zellen wurden mit ImmuMount® eingedeckt und anschließend mit einem LSM5 Konfokalen Laser Scanning Mikroskop mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden als z-Stacks, also sequenzielle Fotografien verschiedener Ebenen der gesamten Zelldicke, aufgenommen und aufsummiert. Die Aufnahmen wurden anschließend in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ralph Gräf vom Institut für Zellbiologie der Universität Potsdam, über eine Dekonvolutions-Software (Carl Zeiss Mikroskopie) optimiert. Eine Animation zu den dreidimensionalen Ansichten wurde mit der ZEN2012 Software (Carl Zeiss Mikroskopie) realisiert.

3.2.6 Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie

Für die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die angefärbten Präparate mit Hilfe der Mikroskope Olympus BX51, Zeiss Axio Observer with Spinning Disc Technology und Leica SL 2360 Konfokalmikroskop mikroskopiert. Die Analyse der Überexpressionsexperimente an murinen Zellen erfolgte mit dem UltraVIEW VoX Spinning Disc Yokogawa CSU-X1 Konfokalmikroskop. HeLa Zellen wurden mit Hilfe des Meta 510 Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskops mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden unter ähnlichen Belichtungs- und Vergrößerungsbedingungen angefertigt, digitalisiert und gegebenenfalls

elektronisch mit Adobe Photoshop[®], Volocity[®] (PerkinElmer, Massachusetts, USA) oder ImageJ[®] (National Institute of Health, New York, USA) nachbearbeitet.

Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Aufbereitung und Analyse des Muskelbiopats erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Werner Stenzel des Instituts für Neuropathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, nach bereits publiziertem Protokoll (Stenzel et al., 2015).

Live-Cell-Mikroskopie

Für die Live-Cell-Mikroskopie wurden 25.000 HAF auf speziellen Ø 35 mm-FluoroDish[®]-Zellkulturschalen ausgesät und unter Standardkulturbedingungen über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Zellen inkubierten in vorgewärmtem, humanem Vollmedium mit einer Zugabe von 500 nM Mitotracker[®] Green FM für 30 Min, entsprechend den Herstellerempfehlungen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml frisches humanes Vollmedium ersetzt. Es schloss sich die direkte Fluoreszenzmikroskopie in der Inkubationskammer mit 5% CO₂-Begasung und 37 °C Umgebungstemperatur mit dem Zeiss Axio Observer with Spinning Disc Technology an. Die Aufnahme erfolgte für 7-10 min bis zum Ausbleichen des Fluoreszenzsignals in den Zellen. Die Aufnahmen wurden anschließend mittels Adobe Photoshop[®] (Adobe Systems Inc., Kalifornien, USA) und Magix Video Maker Deluxe[®] (Magix Software GmbH, Berlin, Deutschland) bearbeitet.

3.2.7 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung von Proteinlysaten

Von konfluent bewachsenen Zellkulturschalen wurde das Medium abgesaugt und mit 0,5-1 ml gekühltes 1x PBS – versetzt mit Protease-Inhibitor – auf den Zellrasen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale geschabt und die Lösung in einem gekühlten, sterilen

Reaktionsgefäß gesammelt. In einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm und 4 °C sedimentierten die Zellen am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem adäquaten Volumen RIPA⁺⁺ Puffer, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren, gelöst. Für ein Pellet einer vollbewachsenen Ø 10 cm-Zellkulturschale wurden 15 µl Puffer hinzugegeben. Die Lösung inkubierte anschließend für 30 min auf Eis. Eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C schloss sich an und sedimentierte Zelltrümmer und Kernbestandteile im Pellet. Die gelösten Proteine verblieben im Überstand. Letzterer wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und bei - 80 °C gelagert.

Herstellung von angereicherten mitochondrialen Fraktionen

Die Zellen wurden mit einer adäquaten Menge 0,05% Trypsin/EDTA von der Kulturplatte gelöst, in der Zentrifuge bei 1000 rpm für 5 min pelletiert und das Pellet dreimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit 3 ml isotonischem Puffer gelöst. Die gelösten Zellen wurden mit einem Potter-Homogenisator in acht Durchgängen zu je 2100 rpm aufgebrochen. Unbeschädigte Zellen und Nuclei wurden über Zentrifugation bei 600x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde bei 10000x g für 25 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun sowohl die zytosolische Fraktion, als auch das Mitochondrien-reiche Pellet. Das mitochondriale Pellet wurde anschließend zweimal mit isotonischem Puffer gewaschen und für SDS-Page und Western Blot weiterverwendet. Die Herstellung der angereicherten mitochondrialen Lysate erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Björn Fischer-Zirnsak vom Institut für medizinische Genetik und Humangenetik der Charité-Universitätsmedizin Berlin und nach folgendem Protokoll (Vogel et al., 2005).

Bicinchoninsäure-Assay zur Messung der Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay. Dieses beruht auf der Eigenschaft von Proteinen, speziell den vorhandenen Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin sowie Tryptophan Cu^{2+} zu Cu^{+} zu reduzieren, welches anschließend mit der BCA eine

Bindung eingeht. Dies verursacht einen Farbumschlag von grün zu violett (Rehm and Letzel, 2016; Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Zu Beginn wurden beide Stammlösungen des Assays im Verhältnis 1:50 zu einer Arbeitslösung gemischt. Anschließend wurde in die Wells einer 96-Well-Platte 100 µl der Arbeitslösung vorgelegt. Gleichzeitig erfolgte das Ansetzen einer Standardkurve mit Stufen unterschiedlichen Albumin-Proteingehalts von 25, 125, 250, 500, 750, 1000 und 1500 mg/ml. Die Standardkurve wurde in doppeltem Ansatz, die zu messenden Proteinlysate in zwei Verdünnungsstufen (1:5 und 1:10) und doppeltem Ansatz in die vorbereiteten Wells pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C war der erwartete Farbumschlag zu verzeichnen und die Absorption dieses Farbumschlags im Elisa-Reader Varioskan bei 526 nm messbar. Anhand des linearen Anstiegs der Standardkurven-Absorptionswerte konnte anschließend die genaue Konzentration der Proteinlysate durch die Anstiegsberechnung und Mittelung der Verdünnungsstufen pro Ansatz bestimmt werden.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Acrylamid-Gelelektrophorese wirkt eine senkrecht angelegte Spannung auf die geladenen Proteine in einem Acrylamid-Gel, welche durch die Spannung in Richtung der Anode migrieren. Der Acrylamidgehalt eines Gels, bestimmt die Dichte der Gitterstruktur, durch welche sich die Proteine bewegen müssen. Größere Proteine können demnach nicht gut durch hochprozentige, feinmaschige Acrylamid-Gele laufen, sondern verbleiben im oberen Bereich des Gels, im Gegensatz zu Proteinen von kleinerer Größe (Rehm and Letzel, 2016). Elektrophoresekammer, Transfermaschinen, Stromquellen, Membranen und Filterpapier für Acrylamid-Elektrophorese und Western Blotting wurden vom System Biorad Mini Protean® oder GE Healthcare SE 600 Ruby verwendet. Puffer und Lösungen wurden nach den aufgeführten Rezepten in Abschnitt 3.1.4 selbst angefertigt.

Zur Auftrennung der Proteinlysate wurden Gele mit einer Größe von 8,6 x 6,8 cm und angepasstem Acrylamidgehalt gegossen und für 30 min polymerisiert. Der Acrylamidgehalt des Gels richtete sich hierbei nach der Größe

des zu detektierenden Proteins. Für die Detektion von YME1L1, PRELID1 (PX19), VINCULIN, β -AKTIN und SDHA wurde ein 8%iges, für TOM20, CYTOCHROM C, CYCLOPHILIN D ein 12%iges und für NDUFB6 und COX4 ein 15%iges Tris-Glycin-Gel verwendet. Für die Detektion von OPA1 wurden große 18 x 18 cm Tris-Tricin-Gele mit einem Acrylamidgehalt von 8% verwendet. Alle Gele besaßen ein 3%iges Sammelgel als oberste Schicht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem flüssigkeitsgefüllten Anoden-Kathoden-System, gemäß den Herstellerangaben. Die genaue Zusammensetzung eines Tris-Glycin- und Tris-Tricin-Trenngels mit dazugehörigem Sammelgel sind beispielhaft für einen Acrylamidgehalt von 8% unter 3.1.4 notiert.

15-50 μ g Protein wurden 1:3 mit 4x SDS (Laemmli)-Puffer versetzt und gegebenenfalls mit RIPA⁺⁺ Puffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt. Die Proteine wurden 5 min bei 95 °C, für die Detektion von OPA1 für 20 min bei 40 °C, denaturiert und anschließend in die Geltaschen des Sammelgels geladen. Das Anlegen einer Spannung von 80 V für 20 min führte zum Sammeln der Proben in eine einheitliche Lauflinie am Ende des Sammelgels. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung im Trenngel dauerte, je nach Proteingröße und Differenzierung der Banden, zwischen 1-3 h bei konstanten 120 V. Im Fall der OPA1-Detektion betrug die Laufzeit 14,5 h bei konstanten 30 mA und maximal 180 V. Parallel zu den Proben wurde ein Proteinmarker aufgetragen, der mit farblichen Markierungen eine Orientierung zum Grad der Proteinauftrennung darstellte.

Transfer auf Nitrozellulosemembran/Western Blot

Das Gel sowie die Nitrozellulosemembran wurden in Transfer-Puffer für 5 min equilibriert. Der vertikale Transfer der Proteine auf Tris-Glycin-Gelen auf die Nitrozellulosemembran erfolgte in einem Wet-Tank-System der Firma BioRad. Acrylamid-Gel, Nitrozellulosemembran, sowie Schwämme und Filterpapier wurden nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und zusammengefügt. Das Anlegen einer horizontalen Spannung von 100 V für 1 h führte zu einer horizontalen Migration der Proteine vom Gel in die Nitrozellulosemembran. Für den Proteintransfer von Tris-Tricin-Gelen auf Nitrozellulosemembranen wurde

ein Semi-Dry-Transfervorgang eingesetzt. Hierfür wurde ein Semi-Dry-Blotter verwendet. Diese Art des Transfers findet unter halbtrockenen Bedingungen statt, wobei nur Filterpapier, Membran und Gel mit Transferpuffer angefeuchtet werden. Der Transfer erfolgt in vertikaler Richtung für 2 h bei 10 V. Ein erfolgreicher Transfer der Proteine auf die Membran konnte durch eine kurzzeitige Inkubation der Membran mit Ponceau-Rot nachgewiesen werden. Dieses wurde anschließend durch einen Waschschrift in TBS-T entfernt. Um unspezifischen Bindungen der Antikörper vorzubeugen, inkubierte die Membran mit Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur.

Chemilumineszente Proteindetektion und Quantifizierung

Die Detektion der Proteine wurde mit Hilfe primärer spezifischer Antikörper für die entsprechenden Proteine realisiert. Die Inkubation der primären Antikörperlösung erfolgte in Blockierlösung über Nacht bei 4 °C und unter konstantem Schwenken der Membran. Es schloss sich ein dreifacher Waschschrift mit TBS-T für jeweils 8 min an. Es folgte eine Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase- (Horseradish, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper in Blockierlösung für 2 h bei Raumtemperatur und konstantem Schwenken. Der Sekundärantikörper wurde entsprechend der Spezies des Primärantikörpers ausgewählt. Die verwendeten Konzentrationen der Antikörper sind in Tabelle 1 verzeichnet. Das HRP-Signal wurde über ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus 45 µl p-Coumarinsäure und 110 µl Luminol, in 40 ml ECL-Puffer mit 40 µl H₂O₂ aktiviert. Dabei entstand ein lumineszentes Signal, welches durch die gezielte Belichtung lichtsensitiver Röntgenfilme oder über ein Gel-Imaging-System visualisiert werden konnte. Die Quantifizierung der Proteinsignale erfolgte mit Hilfe der Software Adobe Photoshop®. Hierfür wurden den digitalisierten Röntgenfilmen bzw. den Bilddateien die Farbwerte entzogen. Im inversen Modus wurde der durchschnittliche numerische Grauwert mit der Größe der ausgewählten Bande in Pixeln multipliziert. Diese absolute Intensität wurde sowohl für das gewünschte Protein, als auch für eine interne Ladekontrolle berechnet und anschließend ins Verhältnis zueinander gesetzt. Als Ladekontrolle dienten β-AKTIN oder VINCULIN.

Hemmung der Proteinbiosynthese

Unter Zugabe von 15 µg Cycloheximid (CHX) in 50 ml Kulturmedium verschiedener Zellen wurde eine Hemmung der Proteinbiosynthese hervorgerufen. Nach einer definierten Inkubationszeit von 0, 1 und 2 h wurden die Proteine aus den behandelten Zellen isoliert und für SDS-Page Experimente weiterverwendet.

Zell-freies in-vitro MPP-Assay

Die DNA der YME1L1- und YME1L1^{R149W}-Sequenz wurden mittels TNT-Sp6 oder Coupled-Reticulocyte-Lysate-System der Firma Promega (Wisconsin, USA) nach empfohlenen Herstellerangaben, zell-frei transkribiert und translatiert. Die, mit ³⁵S markierten, Proteine konnten anschließend isoliert werden und in einem Cleavage Puffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 50 mM NaCl₂, 1 mM Zn Cl₂, 1 mM ATP, 5 mM Mg Cl₂) bei 30 °C und in Anwesenheit oder Abwesenheit von bakterieller mitochondrial processing peptidase (MPP) inkubiert werden. Die Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel getrocknet und mittels Autoradiographie ausgewertet. Die Anwendung des Assays erfolgte äquivalent an den Proteinen mit positionsgerichteter Mutagenese aller N-terminalen Arginine. Die Durchführung dieses Experiments erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Timothy Wai, nach bereits veröffentlichtem Protokoll (Nolden et al., 2005)

Sucrosegradienten-Ultrazentrifugation

Für die Betrachtung der nieder- und hochmolekularen Komplexbildung der verschiedenen genetischen Varianten des YME1L1, wurden mitochondrial-angereicherte Membranfraktionen von Flp-In-T-Rex-HEK293T, unter Überexpression diverser genetischer Varianten von YME1L1, verwendet. Die konfluente Kultur der Zellen wurde trypsinisiert, zentrifugiert und das Pellet dreimal mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine schrittweise Resuspension in isotonischem Puffer, um ein Aufplatzen der Organellen zu vermeiden. Die Zellen der Suspension wurde anschließend mit 15 Stößen bei 1000 rpm eines Potter S Homogenisators mechanisch geöffnet. Ungeöffnete Zellen wurden über Zentrifugation bei 600x g für 5 min und 4 °C pelletiert. Für den Überstand schloss

sich ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10000x g für 10 min bei 4 °C an, der die mitochondrial angereicherte Membranfraktion im Pellet sedimentierte. Dieses wurde in Lysepuffer zu einer Konzentration von 2.5 mg/ml gelöst und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten zehnmütigen Zentrifugation, zur Entfernung aller ungelösten Bestandteile bei 16000x g und 4 °C, wurde der Überstand unverzüglich auf einen vorbereiteten 5-25%igen Sucrosegradienten in 14x89 mm Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Der Gradient wurde mit Hilfe eines automatischen Gradienten-Gießers angefertigt. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 71000x g für 16 h und 4 °C. 1,2 ml jeder der insgesamt zehn Fraktionen wurde manuell gesammelt, mit Trichloressigsäure gefällt und über SDS-Page und Western Blot analysiert. Als Referenz diente das YME1L1-Wildtyp-Protein sowie das Heat-shock-Protein-60 als Größenvergleich. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas MacVicar und Dr. Timothy Wai.

3.2.8 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software Graph Pad Prism[®] (San Diego, USA) durchgeführt. Alle Daten repräsentieren die Mittelwerte von mindestens dreifachen biologischen Replikaten unter doppelter technischer Wiederholung. Aufgrund experimenteller Umstände sind wenige Experimente mit doppelten biologischen Replikaten, jedoch mindestens doppelt technisch, durchgeführt worden. Die Ermittlung des Mittelwerts geht in jeder statistischen Analyse mit der Darstellung und Betrachtung der Standardabweichung (SD) einher, also dem Ausmaß der Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert. Experimente mit einem Vergleichsparameter und zwei Vergleichsgruppen wurden mittels t-Test und einem Signifikanzniveau von $p=0.05$ analysiert. Für Experimente mit einem Vergleichsparameter, aber mehr als zwei Vergleichsgruppen wurde der one-way-ANOVA Test mit einem Signifikanzniveau von $p=0.05$ und einem Turkey Posttest angewendet. Die statistische Analyse von zwei oder mehr Vergleichsparametern an zwei oder mehr Vergleichsgruppen erfolgte mit dem two-way-ANOVA, einem Signifikanzniveau von $p=0.05$ und dem

Bonferroni-Posttest. Dies ermöglichte die Betrachtung aller statistischen Verhältnisse zueinander unter unterschiedlichen Parametern.

4 Ergebnisse

4.1 Indexpatienten mit einer neuen Form der Mitochondriopathie

Vier betroffene Kinder einer konsanguinen Familie aus Saudi-Arabien (II.5, II.8, II.9, II.11, Abbildung 5 A) wiesen Symptome auf, die auf eine Mitochondriopathie schließen ließen. Dazu zählten Intelligenzminderung, motorische Entwicklungsstörungen mit muskulärer Hypotonie und Ataxie, Atrophie des *Nervus opticus*, Schwerhörigkeit sowie eine Leukoenzephalopathie. Patient II.9 und Patientin II.11 wiesen eine Mikrozephalie, Patientin II.5 jedoch eine Makrozephalie auf.

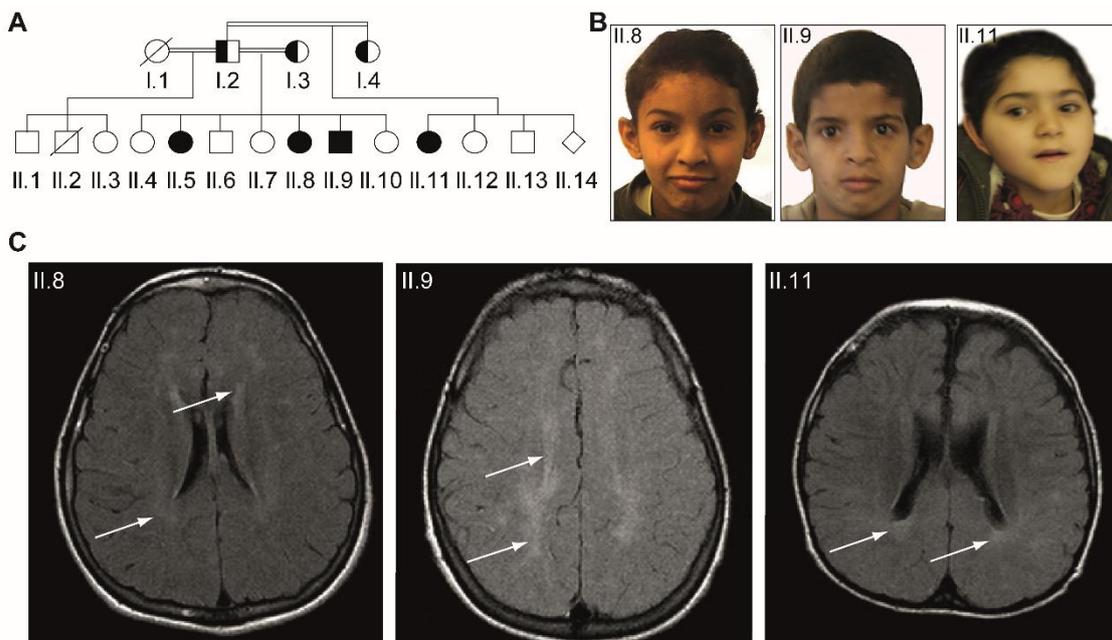


Abbildung 5: Stammbaum der Indexfamilie und MRT-Aufnahmen der vier erkrankten Kinder. **A** Stammbaum der konsanguinen Indexfamilie aus Saudi-Arabien. Vier (II.5, II.8, II.9, II.11) der vierzehn Kinder des Vaters (I.2) weisen Symptome einer neuen Form der Mitochondriopathie auf. **B** Fotografien von drei der vier betroffenen Patienten. Die Indexpatienten weisen keine fazialen Dysmorphien auf. **C** Hyperintense Veränderungen der weißen Substanz (weiße Pfeile) geben unspezifische, jedoch pathologische Hinweise und können Zeichen einer Leukoenzephalopathie darstellen (T1-Aufnahmemodus; Alter der Patienten bei der Aufnahme: II.8, 12 Jahre; II.9, 10 Jahre; II.11, 5 Jahre)

Bei Patientin II.11 konnte ein kirschroter Fleck der Makula identifiziert werden. Sowohl das Symptomspektrum als auch die Schwere des Phänotyps zwischen den Geschwistern waren sehr heterogen. Alle klinischen Symptome sind in

Tabelle 5 ausführlich aufgelistet. Nach Aussage des Vaters traten erste Symptome der Erkrankung erst einige Monate nach der Geburt auf, mit nachfolgender Progredienz. Die Eltern gaben an, keinerlei Beschwerden zu haben. Es wurden magnetresonanztomografische T1-Aufnahmen der Patienten II.8, II.9 und II.11 angefertigt, anhand welcher hyperintense Veränderungen in der weißen Substanz des Gehirns identifiziert werden konnten (Abbildung 5 C, weiße Pfeile). Im T1-Aufnahmemodus entsprechen hyperintense Veränderungen pathologischen, jedoch unspezifischen Phänomenen, die auf eine Myelinisierungsstörung, im Sinne einer Leukoenzephalopathie hindeuten können. Labordiagnostische Untersuchungen des Blutes wiesen in den Patienten II.8 (23,9 mg/dl) und II.9 (16,4 mg/dl) erhöhte Laktatwerte nach (Referenzbereich <16 mg/dl). Auch im Liquor konnten den Patienten II.8 und II.9 eine leichte Erhöhung der Laktatwerte bescheinigt werden. Die Untersuchung des Aminosäuregehalts in Blut und Liquor ergaben nur bei Patientin II.8 einen abnormalen und erhöhten Alanin- und Lysin-Gehalt (3,39 $\mu\text{mol/l}$; Referenzbereich <3 $\mu\text{mol/l}$). Im Serum der Patientin II.11 konnte ein leicht erhöhter Wert der Kreatinkinase nachgewiesen werden (198 U/l; Referenzbereich <15 U/l). Alle weiteren labordiagnostischen Untersuchungen des Blutes und Liquor blieben unauffällig.

		Stammbaum-ID		II.5	II.8	II.9	II.11
		Geschlecht		w	w	m	w
		Alter in Jahren		14	12	10	5
		Symptom	HPO				
Wachstum	Größe	Kleinwuchs		+	+	+	-
		Standardabweichung		-2.19	-2.09	-1.89	0.38
		Perzentil		1	2	3	35
	Gewicht	Untergewicht		+	-	-	-
		Standardabweichung		-2.8	-1.18	0.07	-1.35
		Perzentil		<1	12	53	12
Neonatal		Neonatale Asphyxie	0012768	-	-	-	+

Kopf und Nacken	Kopf	Mikrozephalie		-	-	+	+
		Makrozephalie		+	-	-	-
	Gesicht	Hypoplasie	0011800	-	-	+	+
		Angeborene Faziale Diplegie	0007188	+	-	-	+
	Ohren	Schwerhörigkeit	0000365	-	+	+	+
		Makrotie	0000400	n.d.	+	+	n.d.
		Sensorineurale Schwerhörigkeit	0000407	n.d.	n.d.	+	+
	Augen	Retinopathia pigmentorum	0000580	+	-	-	-
		Hypoplasie des <i>Nervus opticus</i>	0000609	+	+	+	+
		Kirschroter Fleck der Makula	0010729	-	-	-	+
		Strabismus	0000486	n.d.	-	+	+
		Hypermetropie	0000540		-	-	+
		Myopie	0000545	+	+	+	n.d.
		Amblyopie	0000646	-	+	+	+
Abnormale visuelle Potentiale	0000649	n.d.	-	+	+		
Abdomen		Konstipation	0002019	+	n.d.	+	+
		Splenomegalie	0001744	+	-	+	-
Skelett	Füße	Bilateraler talipes equinovarus	0001776	-	-	-	+
Muskel		Erhöhte Variabilität des Muskelfaser-Durchmessers	0003557	+	n.d.	n.d.	n.d.
Neurologie	ZNS	Generalisierte neonatale Hypotonie	0008935	n.d.	n.d.	n.d.	+
		Infantile muskuläre Hypotonie	0008947	n.d.	n.d.	n.d.	+
		Globale Entwicklungsverzögerung	0001263	+	+	+	+
		Motorische Entwicklungsverzögerung	0001270	+	+	+	+
		Athetose	0002305	-	-	-	+
		Intelligenzminderung, IQ	0002342	+, 48	n.d.	n.d.	+, 39
		Unverständliche Sprache	0002546	n.d.	-	-	+
		Fehlende Sprachentwicklung	0001344	n.d.	+	-	-

Neurologie	ZNS	Mangelnde Sprachentwicklung	0002465	n.d.	-	+	-
		Schwere rezeptive Sprachverzögerung	0011352	n.d.	n.d.	+	n.d.
		Epilepsie, Beginn in Monaten	0001250	-	-	-	+, 6
		Dysmetrie	0001310	+	+	+	n.d.
		Ataxie	0001251	+	+	+	n.d.
		Atrophie des Gehirns	0012444	-	-		+
		Ventrikulomegalie	0002119	-	-	-	+
		Verzögerte ZNS Myelinisierung	0002188	+	-	-	-
		Auffälligkeiten der zerebralen weißen Substanz	0002500	+	+	+	+
		Auffälligkeiten der Basalganglien	0002134	-	-	+	-
		Progrediente zerebelläre Hypoplasie	0001321	+	-	-	+
		EEG mit fokalen sharp-waves	0011196	n.d.	n.d.	+	-
		Abnorm akustisch evozierte Potentiale	0006958	n.d.	n.d.	+	+
		Verminderte sensible Nervenleitungsgeschwindigkeit	0003448	-	+	n.d.	-
	PNS	Hyperaktivität	0000752	-	+	-	-
	Verhalten	Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom	0007018	-	n.d.	n.d.	+
		Stereotypische Bewegungen "Body rocking"	0012172		-	-	+

Tabelle 5: Phänotyp der Indexpatienten. EEG, Elektroenzephalogramm; HPO, human phenotype ontology; ID, Identifikationsnummer; IQ, Intelligenzquotient; m, männlich; n.d., nicht determiniert; PNS, peripheres Nervensystem; w, weiblich; ZNS, zentrales Nervensystem.

Wir konnten am Muskelgewebe der Patientin II.5 mittels histochemischer Färbungen keine pathologischen Auffälligkeiten identifizieren. Eine Gomori-Trichrom-Färbung wies eine leichte auffällige Variabilität der Muskelfaserkaliber auf. Eine Ausbildung von akkumulierten Mitochondrien, sogenannten „Red-Ragged-Fibers“, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Signale der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) erzeugten ein leicht vergrößertes

Binnenmuster der Muskelfasern mit Kappenbildung (Abbildung 6 A, schwarze Pfeile). Die Intensität des Signals für die Neuronen-spezifische-Enolase (NSE) war nur teilweise leicht verändert, was Hinweise auf eine chronisch aktive neurogene Myopathie geben könnte (Abbildung 6 A, schwarze Pfeile). Die Lokalisation der Mitochondrien unterhalb des Sarkolemms war unauffällig. Zur weiteren Diagnosestellung wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Muskelbiopsats angefertigt. Diese zeigten zum Teil verkleinerte, malformierte Mitochondrien. Die Malformation zeichnete sich vor allem durch rarifizierte Cristastrukturen, als auch durch parakristalline Einschlüsse aus. Jene Einschlüsse bestehen aus Präzipitationsprodukten der mitochondrialen Kreatinkinase, welche bei verminderter Energiebereitstellung akkumulieren kann (Abbildung 6 B schwarze Pfeile). Diese Einschlüsse sind meist nicht krankheitsspezifisch, aber Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion (Bourgeois and Tarnopolsky, 2004) (Stachowiak et al., 1998).

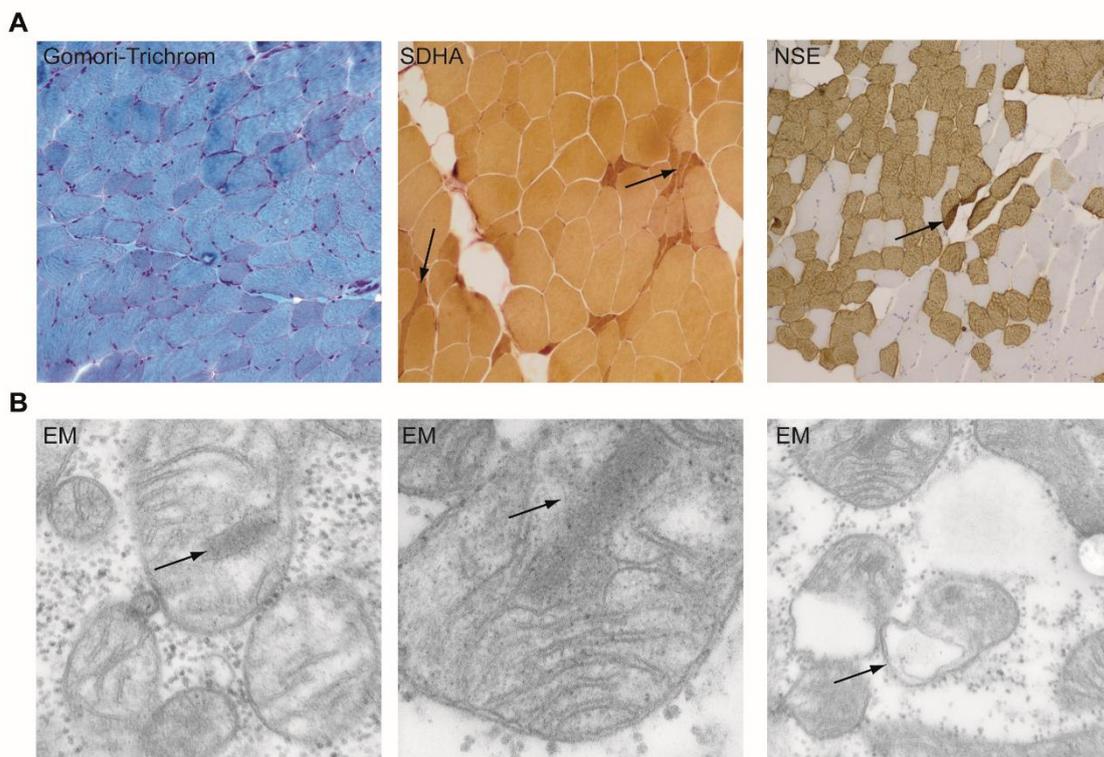


Abbildung 6: Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung eines Muskelbiopsats der Patientin II.5. A Links: In der Gomori-Trichrom-Färbung zeigten sich leichte Veränderungen der Muskelfasern hinsichtlich eines heterogenen Faserdurchmessers. Mitte: Die Färbung der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) wies eine Tendenz zu einem veränderten Binnenmuster der Muskelfasern mit Kappenbildung (schwarze Pfeile) auf. Rechts: Die Färbung

der Neuronen-spezifischen-Enolase (NSE) verweist auf einzelne atrophische Fasern (schwarze Pfeile). **B** Elektronenmikroskopische Aufnahmen (EM) zeigten Mitochondrien mit kleinerem Durchmesser, partial veränderte Cristastrukturen und parakristalline Einschlüsse (schwarze Pfeile; Lichtmikroskopie, 200fache Vergrößerung; EM, 30.000-85.000fache Vergrößerung).

4.2 Identifizierung einer Missense-Mutation im *YME1L1*-Gen der Patienten

Durch Whole-Exom-Sequenzierungen konnten wir in allen erkrankten Patienten eine homozygote Missense-Mutation im *YME1L1*-Gen identifizieren und mittels Sanger-Sequenzierung bestätigen. Beim Vater (I.2) wiesen wir eine heterozygote Form der Mutation nach. Die Mutation betrifft die Basenposition c.616C>T im Exon 5 des *YME1L1* Gens (NM_014263). Sie verursacht einen Austausch der Base Cytosin durch Thymin (Abbildung 7 A). Der Basenaustausch, eine Desaminierung des Cytosins, findet als Mutationsform im DNA-Replikationsprozess häufig statt. Die Aminogruppe wird zu einer Ketogruppe und demnach Cytosin zu Uracil umgewandelt, welches später durch Thymin ersetzt wird (Klug et al., 2007). Die Basenabfolge des betroffenen Triplets ändert sich von *CGG* zu *TGG*.

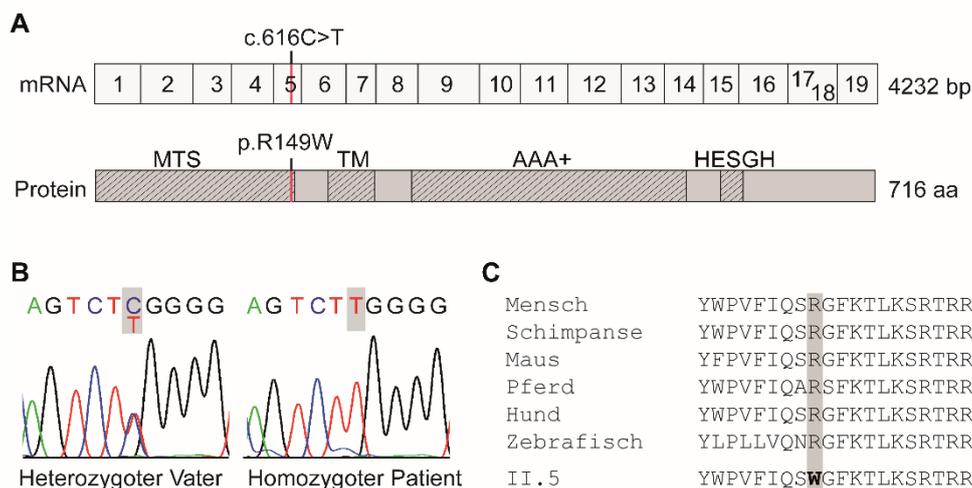


Abbildung 7: Eine homozygote Missense-Mutation im *YME1L1*-Gen der Patienten. **A** Die humane *YME1L1*-mRNA besteht aus 19 Exons mit einer Gesamtlänge von 4232 Basenpaaren (bp). In der DNA der Patienten wurde eine Missense-Mutation in Exon 5 an Position c.616 identifiziert, welche eine cytogene Desaminierung zur Folge hat. Im *YME1L1*-Protein, mit einer Länge von 716 Aminosäuren (aa), kommt es somit zu einem Austausch von Arginin zu Tryptophan an Position 149. **B** Die Mutation wird autosomal rezessiv vererbt. Die Mutation liegt beim Vater

heterozygot, bei den erkrankten Kindern homozygot vor. **C** Die Missense Mutation betrifft einen zwischen verschiedenen Spezies hoch konservierte Aminosäureabschnitt. (mRNA, messenger RNA; MTS, mitochondrial targeting site/mitochondriale Erkennungssequenz; TM, Transmembrandomäne; AAA⁺, proteolytische Domäne der AAA⁺Proteasen; HESGH, Aminosäuremotiv mit Metalloprotease-Domäne; A, Adenin; G, Guanin; C, Cytosin; T, Thymin).

Posttranskriptional erzeugt die Mutation eine veränderte Aminosäureabfolge innerhalb der Proteinsequenz. Es kommt zu einem Austausch des Arginins (R) zu Tryptophan (W) an Position p.149 (Abbildung 7 A und B). Basierend auf diesem Mutationslocus wird im folgendem Text das mutante Protein als YME1L1^{R149W} bezeichnet. Die YME1L1-Proteinsequenz ist mit ihren funktionellen Domänen, zwischen verschiedenen Spezies, hoch konserviert (Abbildung 7 A und C). Entsprechend des Kenntnisstandes zu Beginn unserer Untersuchungen sollte die Mutation zwischen der erwarteten mitochondrialen Erkennungssequenz (MTS) und der Transmembrandomäne (TM) liegen (NP_055078 in NCBI⁸; Mitoprot⁹) (Claros and Vincens, 1996).

In ersten Untersuchungen konnten wir durch quantitative Realtime-PCR (qPCR) keine signifikanten Unterschiede der YME1L1-mRNA-Expression zwischen gesunden Kontroll- und den Patientenzellen detektieren (Abbildung 8).

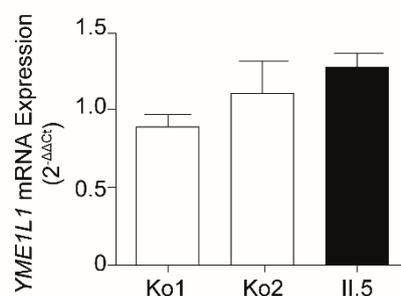


Abbildung 8: Der Austausch an Position c.616C<T im YME1L1-Gen hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression. Zwischen gesunden Kontrollen und II.5 konnte kein signifikanter Unterschied in der YME1L1-mRNA-Expression detektiert werden. Die Genexpression wurde mittels spezifischer Primer (Tabelle 2) im Taq-Man-qPCR-System ermittelt (mRNA-Expression als

⁸ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_055078, Stand 23.02.2017

⁹ <https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>, Query sequence: YME1L1-FASTA-Sequenz
Stand 22.02.2017

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert dargestellt; Referenz=Mittelwert der Expression von Kontrolle 1; $p=0.0961$; one-way ANOVA; Post Test: Turkey's Multiple Comparison Test; ns, nicht signifikant; Ko1, Kontrolle 1; Ko 2, Kontrolle 2; II.5, Patientin II.5; $n=6$).

Die Missense-Mutation hat somit keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription des mutierten Gens. Unsere Ergebnisse der qPCR schlossen eine Störung der Transkription aus.

Zur Untersuchung der Proteinlokalisierung und einer somit indirekt nachgewiesenen erfolgreichen mRNA-Translation führten wir Kollokalisationsstudien für das YME1L1- und YME1L1^{R149W}-Protein in Wildtyp (WT) und Knockout (*YME1L1*^(-/-)) HeLa-Zellen nach Überexpression beider Sequenzen sowie eines leeren Vektors, als Negativkontrolle, durch. Wir detektierten mit Hilfe von Antikörpern ein positives Fluoreszenzsignal sowohl für YME1L1 und YME1L1^{R149W} innerhalb der Mitochondrien der WT- und Knockoutzellen. Gleichzeitig konnte mit Hilfe eines Markers der inneren mitochondrialen Membran, der β -Untereinheit des Atmungskettenkomplex V (ATP-Synthase- β), eine Kollokalisierung der Fluoreszenzsignale der Proteine in allen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 9 A). Dies lässt auf eine Integration des YME1L1^{R149W} innerhalb der inneren mitochondrialen Membran schließen. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse untersuchten wir die Proteinsignale für YME1L1 und YME1L1^{R149W} in Whole-cell-Lysaten mit Hilfe von SDS-Page und Western Blot. Wir detektierten in den Patientenzellen eine signifikante Reduktion des YME1L1^{R149W}-Proteinsignals, verglichen zu den Kontrollzellen. Teilweise lag die Signalintensität für YME1L1^{R149W} unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 9 B). Über Western Blot mit Lysaten angereicherter Mitochondrien konnten wir jedoch ein Restsignal in Patientenzellen gewinnen und die mitochondriale Lokalisation von YME1L1 und YME1L1^{R149W} bestätigen. Das YME1L1^{R149W}-Proteinsignal war auch in diesem Fall, im Vergleich zur Kondition der Kontrollzellen, stark reduziert (Abbildung 9 C). Diese Ergebnisse, gemeinsam mit den Erkenntnissen der immunzytologischen Färbungen, weisen auf eine erfolgreiche Translation sowie einen mitochondrialen Import von YME1L1 und YME1L1^{R149W} hin.

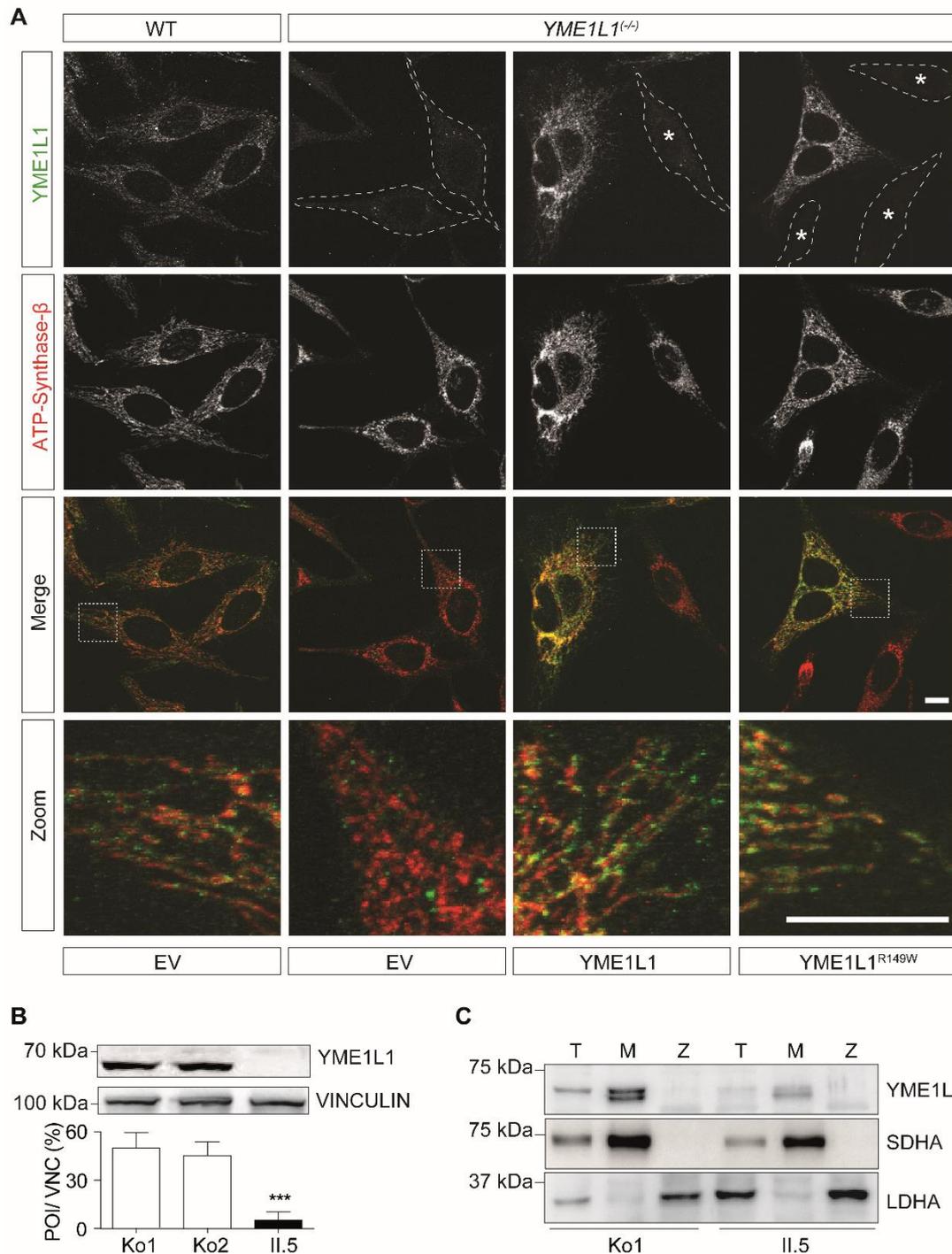


Abbildung 9: YME1L1 und YME1L1^{R149W} sind mitochondrial lokalisiert. **A** Überexprimiertes YME1L1 und YME1L1^{R149W} kann über Immunfluoreszenz innerhalb des Mitochondriums in YME1L1-defizienten HeLa-Zellen (*YME1L1^{-/-}*), lokalisiert werden. Die Kolo-kalisationen der immunfluoreszenten Signale, von YME1L1 und der ATP-Synthase-β-Untereinheit, als Protein der inneren Membran, zeigen, dass sowohl YME1L1 als auch YME1L1^{R149W} in der inneren mitochondrialen Membran integriert sind (Anti-YME1L1, grün; Anti-ATP-Synthase-β, rot; EV, leerer Vektor; Maßstabsbalken 10 µm). **B** Das YME1L1^{R149W}-Proteinsignal ist in Zelllysaten der

Patientin im Vergleich zu den Kontrollen mit Wildtyp-Protein signifikant reduziert. Teilweise konnte kein Proteinsignal detektiert werden (Ko1, Kontrolle 1; Ko 2, Kontrolle 2; II.5, Patientin II.5; POI, Protein of interest=YME1L1; VNC, Vinculin=Ladekontrolle; kDa, Kilo Dalton; one-way ANOVA; Post Test: Turkey's Multiple Comparison Test; ***, $p < 0,001$; $n=6$). **C** In angereicherten mitochondrialen Fraktionen der Patientenzellen konnte ein YME1L1^{R149W}-Restsignal detektiert werden. Dieses ist jedoch im Vergleich zu der gesunden Kontrolle, deutlich reduziert (Ko1, Kontrolle II.5, Patientin; T, Totales Zelllysate; M, Mitochondrial angereichertes Zelllysate; Z, Zytosolisches Zelllysate; SDHA, Succinat-Dehydrogenase; LDHA, Lactat-Dehydrogenase; kDa, Kilo Dalton; $n=2$).

4.2.1 YME1L1^{R149W} betrifft die hoch konservierte MTS-Domäne

Da Störungen im mitochondrialen Importprozess durch die vorangegangenen Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten, fokussierten wir uns auf potentielle Störungen der Proteinreifung, als auch auf zytosolische Mechanismen zur Degradierung von Proteinen, um den starken Proteinverlust innerhalb der Patientenzellen aufzuklären. Als Protein der inneren Membran ist es wahrscheinlich, dass YME1L1 seine N-terminale MTS nach dem Import durch eine Arginin-spezifische Bindung und Abspaltung durch die MPP verliert; es kommt zur Bildung des reifen, 60 kDa-Proteins (Gakh et al., 2002) (Abschnitt 1.3.2). Demnach untersuchten wir in einem ersten Schritt die MPP-abhängige Prozessierung des YME1L1-Vorläuferproteins. Wir bedienten uns hierbei eines zellfreien Assays, mit welchem die Interaktion von gezielt mutierten YME1L1-Sequenzen und der MPP untersucht werden konnte. Dabei mutierten wir alle Arginin-Positionen in der YME1L1-Proteinsequenz (p.R44-p.R262, für weitere Informationen siehe 8.2) innerhalb des N-Terminus, inklusive der bioinformatisch berechneten MTS¹⁰. Die radiografische Auswertung der genetisch veränderten ³⁵S-radioaktiv-markierten Proteine, unter An- und Abwesenheit der MPP ergab, dass nur ein Austausch des Arginins an Position 149 kein Signal der reifen YME1L1-Form (~ 60 kDa) hervorbringen kann. Dies ließ uns auf einen blockierten Bindungslokus der MPP an YME1L1^{R149W} schließen (Abbildung 10 A). Weitere Mutationen an anderen Argininen der N-terminalen

¹⁰ <https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>, Stand 22.02.2017

Query sequence: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/37182091?report=fasta>, Stand 22.02.2017

Proteinsequenz konnten ein Signal für die reife YME1L1-Form, auf der erwarteten Höhe, ausbilden (Abbildung 10 A). Mit der Durchführung des MPP-Assays anhand der Sequenz von YME1L1^{R149W} und dessen spezifischen Aminosäureaustausch, von Arginin zu Tryptophan, konnten wir diesen Effekt, eines ausbleibenden Signals für die reife Form, bestätigen. Wir konnten aus diesen Untersuchungen somit zwei wichtige Erkenntnisse gewinnen: YME1L1^{R149W} verbleibt in der Vorläuferproteinform (Abbildung 10 B) und kann aufgrund des Aminosäurewechsels an Position 149 nicht prozessiert werden, was das Ausbleiben des Signals für die reife Proteinform zur Folge hat. Weiterhin zeigten unsere Daten, dass die bioinformatische Berechnung der Länge der MTS im humanen YME1L1 nicht der tatsächlichen Anzahl an Aminosäuren entspricht, sondern sich anstatt bis zum Arginin^{p.44} bis zum Arginin^{p.149} erstreckt. Sie ist somit um ein Dreifaches länger als bisher bioinformatisch erwartet.

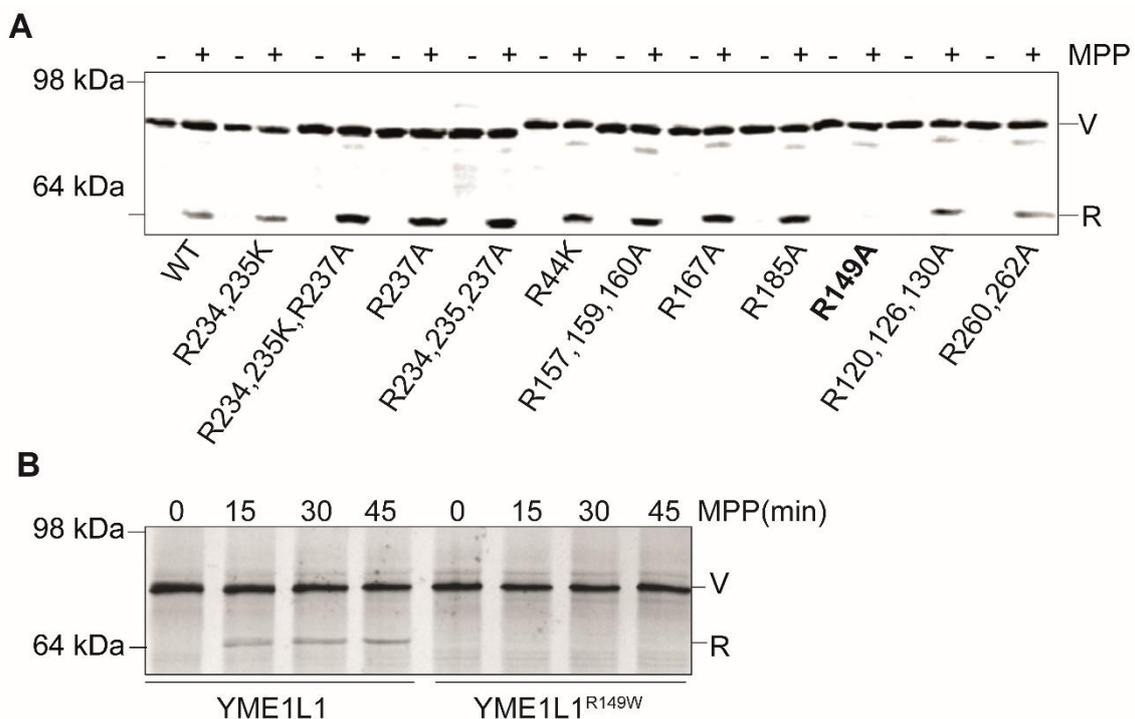


Abbildung 10: YME1L1^{R149W} kann nicht durch MPP prozessiert werden. A Die Autoradiographie-Aufnahmen nach zellfreier Transkription und Translation sowie Interaktion von ³⁵S-markierten YME1L1-Varianten und dem MPP-Protein zeigt, dass nur ein Austausch des Arginins an Position 149 im YME1L1 kein Signal für das reife YME1L1-Protein (~60 kDa) nach Zugabe der MPP ausbildet. Die Mutagenese weiterer Arginine innerhalb der MTS blieb ohne Folgen für die Signaldetektion. Dies unterstreicht die Arginin-abhängige Bindung der MPP an

YME1L1 an Position 149 (+, mit Zugabe von MPP; -, ohne Zugabe von MPP; A, Alanin; K, Lysin; R, Arginin; kDa, Kilo Dalton; MPP, mitochondrial processing peptidase; V, Vorläuferprotein; R, reifes Protein; WT, Wildtyp; n=2). **B** Für den spezifischen Austausch von Arginin zu Tryptophan, wie er im Patientenprotein präsent ist, konnte dieser Effekt an ³⁵S-markiertem-YME1L1^{R149W}, bestätigt werden. Das Wildtyp-Protein konnte unter Zugabe der MPP ein Signal für die reife Proteinform ausbilden (MPP, mitochondrial processing peptidase; min, Minuten; YME1L1^{R149W}, Patientenmutation; V, Vorläuferprotein; R, reifes Protein; kDa, Kilo Dalton; n=3).

4.2.2 YME1L1^{R149W} wird innerhalb des Mitochondriums degradiert

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten, dass YME1L1^{R149W} erfolgreich ins Mitochondrium importiert, hier jedoch nicht zum reifen Protein prozessiert werden, weshalb wir einen Verbleib der Vorläuferform, innerhalb des Mitochondriums, vermuteten. Dies stellte jedoch keine Erklärung für den starken Verlust des Proteinsignals in Patientenzellen dar. Da Mitochondrien über verschiedene Prozesse in der Lage sind, das Organell vor schädlichen Proteinen zu schützen, vermuteten wir eine Degradierung als Ursache des YME1L1^{R149W}-Proteinverlustes (Abschnitt 1.2.1). YME1L1^{R149W} als unreifes Protein mit unbekanntem Faltungsgrad könnte Stress und Schäden im Mitochondrium verursachen und potentiell durch verschiedene Qualitätskontrollinstanzen des Mitochondriums degradiert werden. Weitere Möglichkeiten wie post-translationale Veränderungen, ein Abbau durch mitochondriale Proteasen oder sogar zytosolische Degradierungsmechanismen, zum Beispiel durch das Proteasom, mussten hierbei berücksichtigt werden.

In bisher unveröffentlichten und noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen konnten wir bisher mehrere mitochondriale Proteasen des mitochondrialen Qualitätssicherungsapparates für eine potentielle Degradierung von YME1L1/YME1L1^{R149W} weitestgehend ausschließen (Ergebnisse aus der Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Langer des Instituts für Genetik, Universität Köln). So konnten wir beispielsweise in initialen Experimenten über eine Herunterregulierung der *LONP*-, *PARL*- und *AFG3L2*-Expression die YME1L1^{R149W}-Proteinsignale in den Patientenzellen nicht wiederherstellen. Daran anknüpfend zogen wir eine Degradierung des YME1L1^{R149W} durch das

zytosolische Proteasom in Betracht. Hierfür blockierten wir alle Proteasen des 20S-Proteasom durch die Zugabe von N-Carboxybenzyl-Leucyl-Leucyl-Leucyl-Aldehyd (MG132) in das Kulturmedium von Flp-In T-Rex-HEK293T-Zellen. Diese Zellen exprimierten diverse genetische Varianten von YME1L1 (YME1L1, YME1L1^{R149W}, YME1L1^{E381Q}, YME1L1^{R149W/E381Q}). YME1L1^{E381Q}, mit dominant negativer Punktmutation in der ATPase-Domäne, stellt eine proteolytisch inaktive, aber stabile Variante des Proteins dar. Die Präsenz einer Doppelmutation (YME1L1^{R149W/E381Q}) sorgt für eine Stabilisierung der Vorläuferform innerhalb der Zelle und stellte somit ein wertvolles Modell zur Betrachtung der unreifen YME1L1-Form dar.

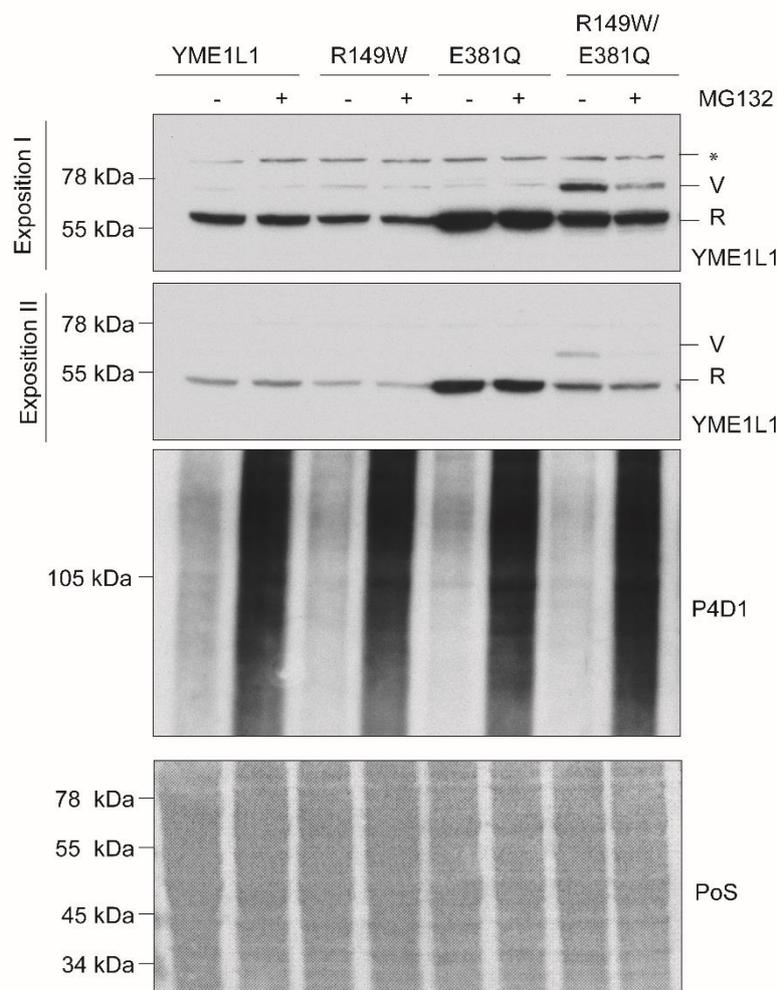


Abbildung 11: YME1L1^{R149W} wird nicht durch das zytosolische Proteasom degradiert. Eine Zugabe von 20 mM N-Carboxybenzyl-Leucyl-Leucyl-Leucyl-Aldehyd (MG132) in das Kulturmedium von Flp-In T-Rex-HEK293T-Zellen, mit gleichzeitiger Überexpression von YME1L1, YME1L1^{R149W}, YME1L1^{E381Q} und YME1L1^{R149W/E381Q} für 18 h, konnte keine Veränderung der

Proteinlevel aller YME1L1-Varianten hervorrufen. P4D1 wurde als interne, aktive Kontrolle für die Ubiquitinierung (molekulare Markierung für das Proteasom) eingesetzt. YME1L1^{E381Q}, als proteolytisch inaktives, aber stabiles Protein sowie YME1L1^{R149W/E381Q} als Doppelmutante stellen ein wertvolles Modell zur Betrachtung der unreifen YME1L1-Form dar. (R149W, Patientenmutation; E381Q, proteolytisch inaktives Protein; R149W/E381Q, Doppelmutante; -, ohne Zugabe von MG132; +, mit Zugabe von MG132; *, unspezifisches Signal; V, Vorläuferprotein; R, Reifes Protein; kDa, Kilo Dalton; P4D1, Anti-Ubiquitin Antikörper; PoS, Ponceau; n=2).

Die Hemmung des Proteasoms führte für keine der genetischen Varianten von YME1L1 zu einer Veränderung der Proteinsignalintensitäten im Western Blot, weder für das unreife oder reife Protein (Abbildung 11). Unsere Ergebnisse schließen demnach eine Degradierung von YME1L1^{R149W} durch das zytosolische Proteasom aus.

Durch den Ausschluss mitochondrialer Proteasen bzw. des Proteasoms als Ursache der YME1L1^{R149W}-Proteinreduktion, untersuchten wir die Option eines autokatalytischen Abbaus aufgrund der bekannten Eigenschaften der YME1L1-Protease zur Degradierung von Peptiden. Eine Fähigkeit von YME1L1 zur Autokatalyse war bisher jedoch nicht beschrieben. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, bedienten wir uns der bereits vorgestellten YME1L1-Mutanten: YME1L1^{R149W}, YME1L1^{E381Q} und YME1L1^{R149W/E381Q} sowie dem WT-Protein. Wir hemmten die Proteinbiosynthese durch eine Zugabe von Cycloheximid ins Kulturmedium von Flp-In T-Rex-HEK293T-Zellen, mit gleichzeitiger Überexpression der YME1L1-Varianten in den Zellen. In der Auswertung über SDS-Page und Western Blot konnten wir für YME1L1^{R149W} und YME1L1^{E381Q} eine zeitabhängige Reduktion des Vorläufersignals (Abbildung 12) nachweisen, die nach 2 h zum vollständigen Verlust der unreifen Form führte. Dieser Effekt war bereits für das YME1L1^{R149W} in den Patientenzellen bekannt. Für YME1L1^{E381Q} ging diese Reduktion des Vorläuferproteinsignals vermutlich einher mit einer gleichzeitigen Zunahme für die Signalintensität des reifen Proteins, im Zuge der Reifung (Abbildung 12), was jedoch vor dem endogenen Hintergrund der HEK293T-Zellen nicht final nachzuweisen war (Abbildung 12). Für das Patientenprotein konnten vergleichsweise schwache Signalintensitäten detektiert werden. Durch das zusätzliche Einbringen der proteolytisch inaktivierenden

Mutation E381Q in das Patientenprotein konnten wir jedoch beobachten, dass (1) das Signal der unreifen Proteinform über den Betrachtungszeitraum stabilisiert wird und intensiver ausgeprägt ist (2) das Signal auf Höhe der reifen Form dabei über die Zeit nicht zunimmt und (3) das PRELID1, im Vergleich zur Kondition des einzelnen Patientenproteins, stärker akkumulierte, bevor es vor dem Hintergrund der CHX-Behandlung, wieder abnahm.

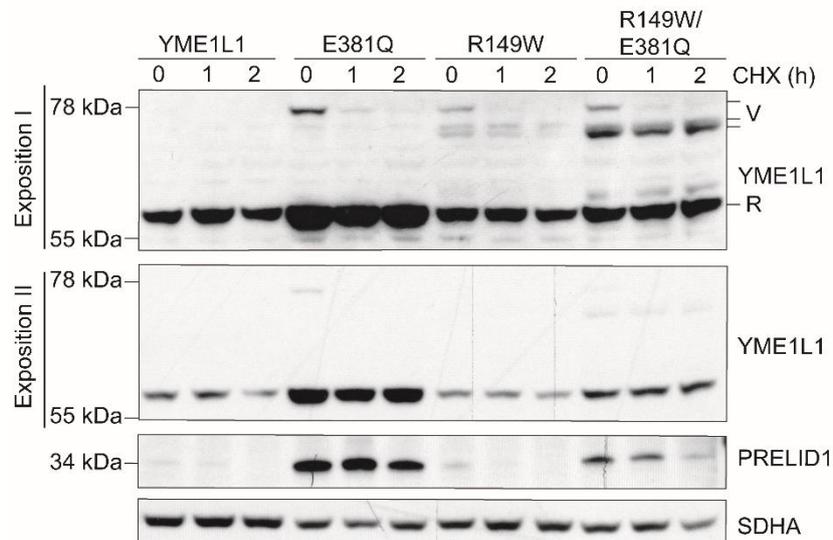


Abbildung 12: YME1L1^{R149W} durchläuft eine autokatalytische Degradierung. Die Proteinbiosynthese von HEK293T-Zellen, welche diverse genetische YME1L1-Varianten überexprimierten, wurde mittels Zugabe von 0,5 μ M Cycloheximid in das Kulturmedium, inhibiert. Das proteolytisch inaktive Patientenprotein (YME1L1^{R149W/E381Q}) verursacht eine Stabilisierung des Vorläuferprotein-Signals und hebt eine zeitlich bedingte Abnahme des PRELID1-Signals auf. YME1L1^{R149W} scheint mit einer proteolytischen Restfunktion seine Substrate und sich selbst in einem autokatalytischen Mechanismus abzubauen. Dieser Effekt kann nur durch die proteolytische Inaktivität aufgehoben werden. SDHA dient als Ladekontrolle (R149W, Patientenmutation; E381Q, proteolytisch inaktives Protein; R149W/E381Q, Doppelmutante; CHX, Cycloheximid; h, Stunden; SDHA, Succinat Dehydrogenase; V, Vorläuferprotein; R, reifes Protein; kDa, Kilo Dalton; n=2).

Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse auf eine proteolytische Restfunktion des YME1L1^{R149W}-Vorläuferprotein hin, welche in der Doppelmutante ausgeschaltet scheint und unter deren Aktivität das Signal des Vorläuferproteins graduell abnimmt (Abbildung 12). Da bisher keine weiteren Mechanismen für einen YME1L1-Abbau ermittelt werden konnten, schlossen wir

demnach auf eine Fähigkeit des YME1L1^{R149W}-Vorläuferproteins zur autokatalytischen Degradierung.

4.3 YME1L1^{R149W} als aktive Protease

4.3.1 YME1L1^{R149W} kann zu einem Proteinkomplex assemblieren

Unsere bisherigen Ergebnisse unterstreichen die Hypothese einer proteolytischen Restfunktion von YME1L1^{R149W}, mit der sich das Protein auch selbst abbauen kann. Die Voraussetzung der i-AAA⁺-Protease zur proteolytischen Aktivität ist jedoch die Assemblierung in einen oligomeren Komplex (1.3.2). Um die Fähigkeit des YME1L1^{R149W} zur Komplexassemblierung zu untersuchen, extrahierten wir mitochondrial angereicherte Membranfraktion aus Flp-In T-Rex HEK293T-Zellen, welche die genetischen Varianten YME1L1, YME1L1^{R149W}, YME1L1^{E381Q} und YME1L1^{R149W/E381Q} stabil überexprimierten. Diese applizierten wir auf einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten und sedimentierten die Proteinkomplexe verschiedener Größe und Dichte aus den Lysaten durch Ultrazentrifugation in verschiedene Fraktionen. Die Proteinkomplexe sammelten sich in den entsprechenden Bereichen des Gradienten, in denen eine äquivalente Dichte zwischen Proteinkomplex und Gel vorlag. In allen genetischen Varianten konnten wir Signalintensitäten detektieren, die sich äquivalent zum WT-Protein verhielten. Dabei detektierten wir Signale für Proteinkomplexe mit ~1 MDa, welche dem i-AAA⁺-Proteasekomplex entsprechen (Abbildung 13). Gleichzeitig detektierten wir das stärkste chemilumineszente Signal für alle YME1L1-Varianten, inklusive der stabilen unreifen Form der YME1L1^{R149W/E381Q}-Variante, in der Fraktion, in welcher sich ~2 MDa-Komplexe ansammelten. Diese Größe würde dem, erst kürzlich identifizierten, SLP2-PARL-YME1L1-Komplex (SPY-Komplex) entsprechen, in welchem das WT-YME1L1 integriert ist. Diese Größenverhältnisse wurden mit Hilfe des Referenzproteins HSP60, mit einer Größe von ~ 60 kDa, deutlich. Die Signale auf Höhe des reifen Proteins für YME1L1^{R149W} und YME1L1^{R149W/E381Q} wurden durch den endogenen Hintergrund der HEK293T-Zellen gebildet. Anhand dieser Ergebnisse konnten wir die Fähigkeit des unreifen YME1L1-Protein zur Assemblierung in einen

hochmolekularen Proteinkomplex nachweisen. Die Voraussetzung für eine proteolytische Aktivität ist somit aus chemisch-struktureller Sicht gegeben.

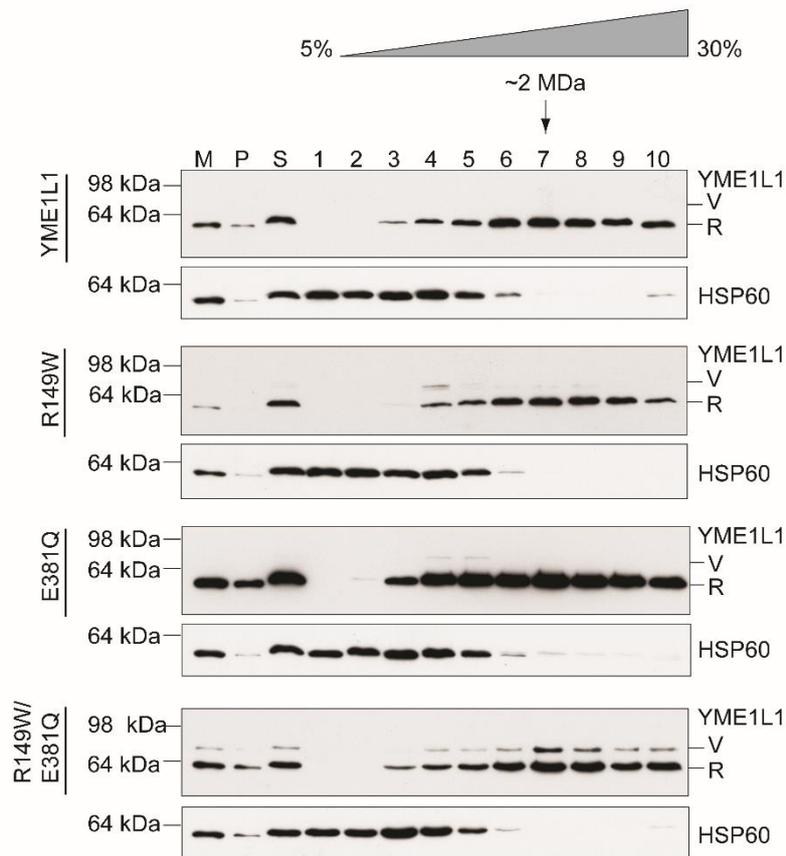


Abbildung 13: YME1L1^{R149W} kann zu einem proteolytischen Komplex assemblieren. Angereicherte mitochondriale Membranfraktionen von HEK293T-Zellen, welche YME1L1 und verschiedene genetische YME1L1-Varianten (R149W, E381Q und R149W/E381Q) überexprimierten, wurden über einen Sucrosegradienten nach Ultrazentrifugation aufgetrennt, mittels SDS-Page analysiert und über einen YME1L1-Antikörper detektiert. Alle genetischen Varianten wiesen Signalintensitäten in den einzelnen Fraktionen auf, die äquivalent zum Wildtypprotein waren. Es konnte für alle genetischen Varianten das stärkste Signal in der Fraktion detektiert werden, welche Proteinkomplexe mit einer Größe von ~2 MDa beinhaltete. Dies trifft auch für die Doppelmutation R149W/E381Q mit seiner stabilen Vorläuferform zu. Die Signale auf der Höhe des reifen Proteins für die Varianten R149W und R149W/E381Q werden durch den endogenen Hintergrund der HEK293T-Zellen verursacht. HSP60 dient als Referenz eines molekularen Komplexes für die Fraktionsdichte und Proteingröße (R149W, Patientenmutation; E381Q, proteolytisch inaktives Protein; R149W/E381Q, Doppelmutante; M, angereicherte mitochondriale Fraktion; P, Pellet; S, Supernatant; 1-10, Fraktionen des kontinuierlichen Sucrose-

Gradienten; HSP60, Hitzeschock-Protein 60; V, Vorläuferprotein; R, Reifes Protein; kDa, Kilo Dalton; n=2).

4.3.2 YME1L1^{R149W} prozessiert seine Substrate OPA1 und PRELID1

Um die Stärke der proteolytischen Restfunktion von YME1L1^{R149W} in den Patientenzellen zu ermitteln, wurde sich der Interaktion der i-AAA⁺-Protease mit seinen bekannten Substraten bedient. Hierfür wurden SDS-Page- und Western Blot -Experimente für die Substrate OPA1 und PRELID1 an Proteinlysaten der Patientin und Kontrollen durchgeführt. Wie in Abbildung 14 deutlich wird, zeigten sich bei beiden Proteinen deutliche Unterschiede in den Signalintensitäten. PRELID1 wird unter normalen Umständen, durch die Komplexbildung mit dem Protein TRIAP, vor einer YME1L1-abhängigen Degradierung geschützt. Vergleicht man die Signalintensitäten für PRELID1 der Patientenzellen, mit denen der gesunden Kontrollen, so zeigt sich eine Akkumulation von PRELID1. Diese Akkumulation ist jedoch im Vergleich zum murinen konditionalen YME1L1-Knockoutmodell abgeschwächt. YME1L1^{R149W} kann PRELID1 somit nicht vollständig umsetzen, es kommt zur signifikanten Ansammlung des Proteins in den Zellen der Patientin (Abbildung 14 A, B).

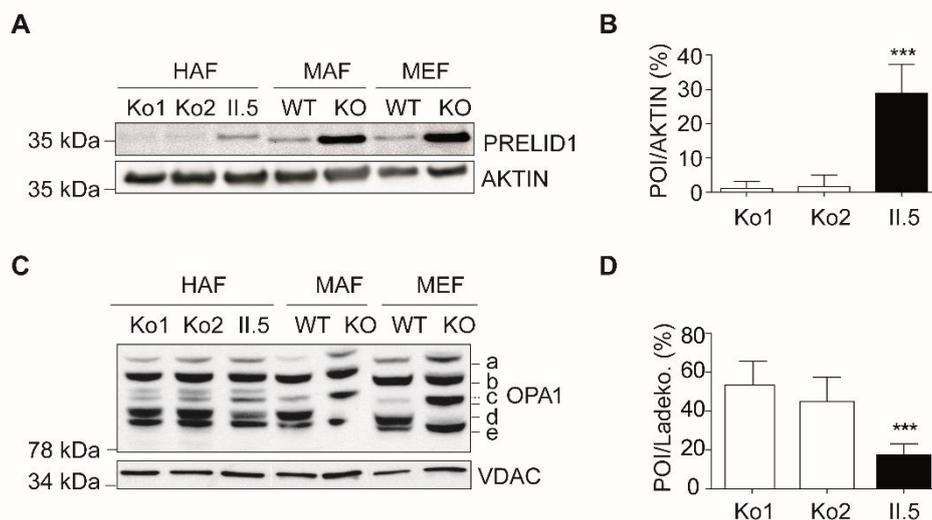


Abbildung 14: YME1L1^{R149W} kann die Substrate PRELID1 und OPA1 partial prozessieren. A PRELID1 akkumuliert in den Patientenzellen unter YME1L1^{R149W} und wird im Vergleich zu den gesunden Kontrollen unzureichend abgebaut. Der Effekt der Signalakkumulation ist jedoch abgeschwächt gegenüber dem murinen Modell. **B** Die Anreicherung des PRELID1-Proteins in den Patientenzellen ist im Vergleich zu den gesunden Kontrollen hoch signifikant (one-way ANOVA; Post Test: Turkey's Multiple Comparison Test; ***, p<0,001; POI, Protein of

interest=PRELID1; n=5). **C** YME1L1^{R149W} kann OPA1 nicht vollständig prozessieren. Die Isoform S-OPA1 d ist im Vergleich zu den gesunden Kontrollen vermindert detektierbar. **D** Die Reduktion des S-OPA1 d Signals verglichen mit den gesunden Kontrollen ist hoch signifikant (HAF; humane adulte primäre Fibroblasten; MAF, murine adulte immortalisierte Fibroblasten; MEF, murine embryonale immortalisierte Fibroblasten; Ko1, Kontrolle 1; Ko 2, Kontrolle 2; II.5, Patientin II.5; WT, Wildtyp; KO, konditionaler *Yme1l1*-Knockout; one-way ANOVA; ***, p<0,001; POI, Protein of interest=S-OPA1 d; Ladeko., Ladekontrolle Aktin und VDAC; kDa, Kilo Dalton; n=5).

In einem weiteren Schritt untersuchten wir auch die proteolytische Aktivität von YME1L1^{R149W} Substrat OPA1. OPA1 und YME1L1 stehen in einem engen proteolytischen Zusammenhang. Es kommt zu einer YME1L1-abhängigen Prozessierung von OPA1, bei welcher eine der drei kurzen Isoformen entsteht: S-OPA1 d. In den Proteinlysaten der Patienten detektierten wir eine Reduktion des S-OPA1 d-Signals (Abbildung 14 C). Diese Reduktion war in den Patientenzellen signifikant (Abbildung 14 D). Alle weiteren Isoformen von OPA1, sowohl lang als auch kurz, lagen unverändert vor. Auch hier dienten uns die Proteinsignale aus adulten und embryonalen murinen WT- und *Yme1l1*^(-/-)-Zellen als Vergleichskontrolle. Sie zeigten einen stärker ausgeprägten Phänotyp. Vor allem dieser Vergleich erleichterte eine Einordnung des Schweregrads der YME1L1-Patientenmutation.

4.3.3 YME1L1^{R149W} verursacht eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks

Das regulative Zusammenspiel von YME1L1 und OPA1 ist essentiell, um die mitochondriale Fusion aufrechtzuerhalten. Eine gestörte Prozessierung von OPA1 führt zum Ungleichgewicht der Isoformen und kann schwerwiegende Folgen für die Regulation der mitochondrialen Dynamik nach sich ziehen (Anand et al., 2014; Wai et al., 2015). Nach den signifikant veränderten Signalen der Isoformen von OPA1 unter YME1L1^{R149W}, stellte der Einfluss der Mutation auf die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks einen neuen Schwerpunkt für unsere weiteren Untersuchungen dar. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen für TOM20 sowie DAPI, als nukleären Marker, deckten wir in den Patientenzellen eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks auf. Die

statistische Auswertung ergab in den Patienten signifikant mehr Zellen mit fragmentiertem oder verkürzt-tubulärem mitochondrialen Netzwerk. Letzteres scheint eine Übergangsphase in die vollständige Fragmentierung darzustellen. Die Anzahl der Zellen mit tubulärem Netzwerk bei der Patientin war im Vergleich zu den gesunden Kontrollen verringert (Abbildung 15 A, B). Zur besseren Darstellung der unterbrochenen mitochondrialen Verbindungen schlossen wir eine dreidimensionale Rekonstruktion von Patienten- und Kontrollzellen an. Hierfür färbten wir alle Mitochondrien der Zellen durch die Zugabe des oxidativen Farbstoffs Mitotracker® DeepRed zum Kulturmedium. Dieser diffundierte passiv durch die Zellmembranen und akkumulierte in den Mitochondrien. Mit Hilfe der mikroskopischen Aufnahmen verschiedener Ebenen der Zellen konnten wir das Bild verkürzter, tubulärer oder fragmentierter Strukturen sowie den morphologischen Unterschied zwischen Patient und Kontrolle eindeutig darstellen (Digitales Zusatzmaterial 1 und 2). Anknüpfend an diese Untersuchung versetzten wir HAF der Patienten und Kontrollen mit MitoTracker® Green und betrachteten die aktive mitochondriale Dynamik innerhalb der Zellen mit Hilfe von live-cell-Mikroskopie. Hierbei wurde deutlich, dass die Mitochondrien der Patientin im Vergleich zu Kontrollzellen einen verlangsamten und teilweise erfolglosen Fusionsprozess durchlaufen (Digitales Zusatzmaterial 3 und 4).

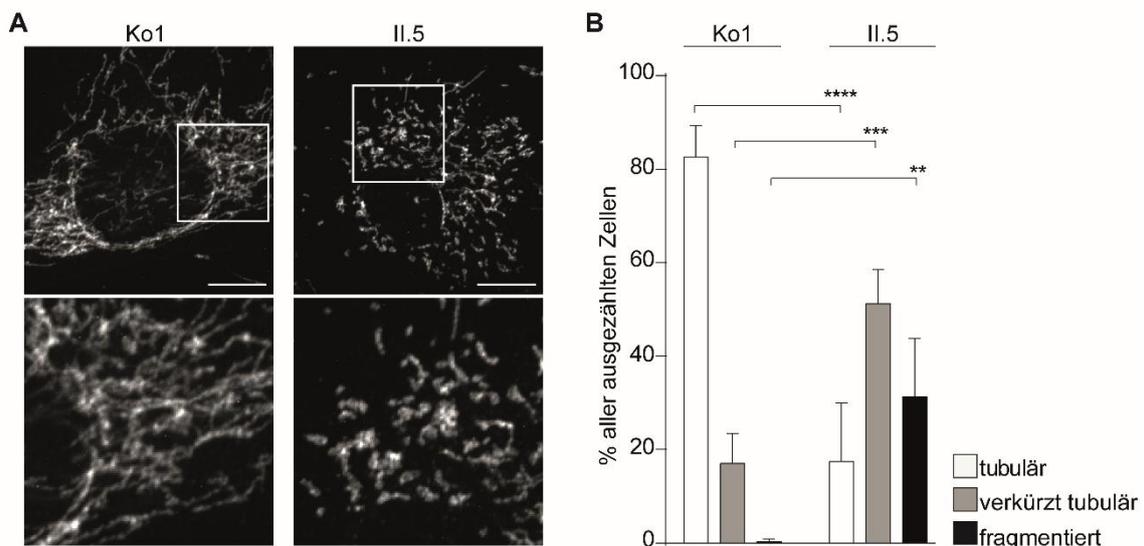


Abbildung 15: YME1L1^{R149W} erzeugt eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks.

A Immunzytochemische Färbungen der Fibroblasten von Patientin II.5 und einer gesunden Kontrolle wiesen deutliche Unterschiede in der mitochondrialen Morphologie auf. Die Mitochondrien der Patientenzellen beinhalteten ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk, in

Form von unterbrochenen tubulären Strukturen (Maßstabsbalken = 10 µm). **B** Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Erhöhung der Zellzahl mit verkürztem und fragmentiertem mitochondrialen Netzwerk im Fall der Patientin. Die Anzahl der Zellen mit einem physiologisch tubulären Netzwerk der Mitochondrien war im Vergleich zur Zellzahl der gesunden Kontrollen signifikant verringert (Ko1, Kontrolle 1; II.5, Patientin II.5; doppel-blinde Analyse; one-way-ANOVA; Turkey's Multiple Comparison Test ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; $n = 4$ mit jeweils 150-200 ausgezählten Zellen).

Mehrere Faktoren, wie oxidativer Stress oder erhöhte Apoptose, können Einfluss auf die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks nehmen. Um zu klären, ob die Fragmentierung Mitochondrien in Patientenzellen ursächlich auf $YME1L1^{R149W}$ zurückzuführen ist, nutzten wir MAF der WT und $Yme111^{-/-}$ -Maus und überexprimierten das humane $YME1L1$ und $YME1L1^{R149W}$ in diesen Zellen.

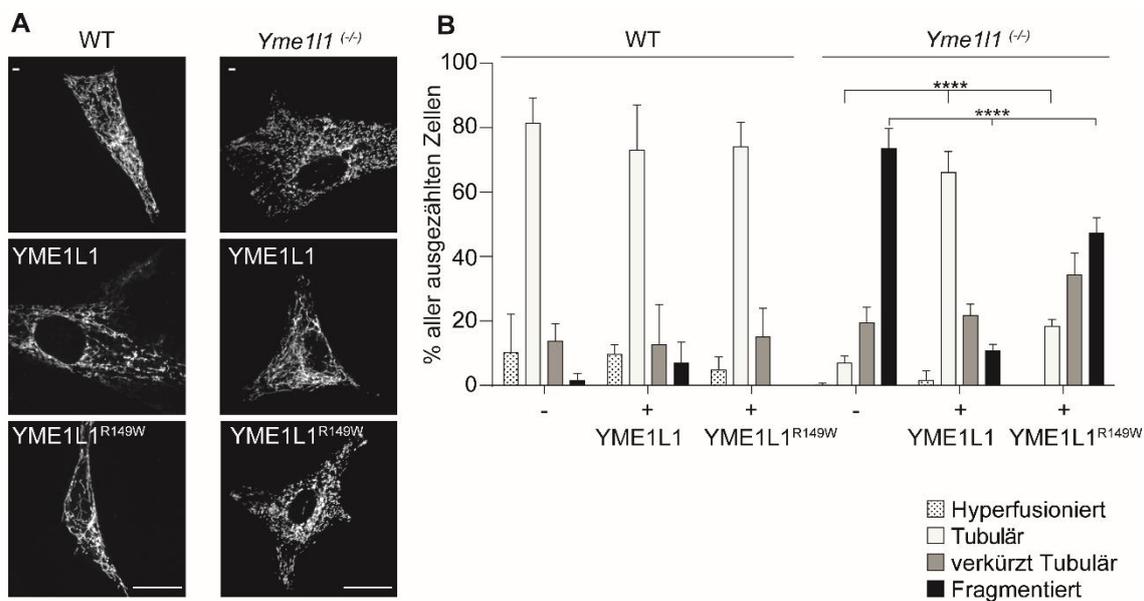


Abbildung 16: Überexpression von $YME1L1^{R149W}$ führt zur partiellen Verbesserung der mitochondrialen Fragmentierung. **A** Im endogen-freien Hintergrund der murinen, konditionalen $Yme111^{-/-}$ -Zellen konnten wir durch die Überexpression des humanen $YME1L1$ die mitochondriale Fragmentierung deutlich verbessern. Eine Überexpression des $YME1L1^{R149W}$ führte nur zu einer partiellen Verbesserung der mitochondrialen Morphologie, bei welcher vor allem Zellen mit verkürzt-tubulären Strukturen detektiert wurden (Maßstabsbalken = 10 µm). **B** Die Überexpression beider genetischen Varianten hatte murinen Wildtyp-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Morphologie der Mitochondriennetzwerke. Im konditionalen $Yme111^{-/-}$ -Modell erhöhte sich jedoch signifikant die Zellanzahl mit tubulären mitochondrialen

Netzwerken. Die Überexpression von YME1L1^{R149W} konnte in den Knockoutzellen eine leichte Veränderung hervorrufen, indem mehr Zellen mit verkürzt-tubulären Netzwerken und weniger Zellen mit einem fragmentierten Netzwerk detektiert wurden (two-way-ANOVA; Bonferroni Posttest; ****p<0.0001; WT, Wildtyp; *Yme111*^(-/-), konditionale murine Yme111-Knockoutzellen; YME1L1, humanes gesundes Protein; n=3).

Die Wahl des Zellmodells begründete sich auf den starken Phänotyp bezüglich der mitochondrialen Morphologie, verursacht durch den vollständigen Verlust des murinen Yme111-Proteins. Weiterhin erleichterte uns der endogen-freie Hintergrund die Klassifizierung der mitochondrialen Netzwerke. Wir konnten mit Hilfe der Überexpression des humanen WT-YME1L1 die mitochondriale Fragmentierung der konditionalen *Yme111*^(-/-)-Zellen vollständig wiederherstellen. Ebenso ermittelten wir einen positiven Effekt auf die geschädigten Mitochondriennetzwerke nach der Überexpression von YME1L1^{R149W} in den Knockoutzellen. Dieser war jedoch gegenüber der Wirkung des WT-Proteins stark abgeschwächt (Abbildung 16 A, B). In den WT-Zellen der Maus hatte sowohl die Überexpression des YME1L1 als auch des YME1L1^{R149W} keinerlei Veränderungen in der Morphologie der mitochondrialen Netzwerke zur Folge (Abbildung 16 A, B). Zusammenfassend konnten wir mit diesen Ergebnissen die Theorie einer partialen proteolytischen Aktivität des YME1L1^{R149W}-Komplexes in den Patientenzellen, welcher mit einer Fragmentierung der mitochondrialen Netzwerke einhergeht, bestätigen.

4.3.4 YME1L1^{R149W} blockiert Zellwachstum und Zellproliferation

Eine gestörte mitochondriale Dynamik hat zumeist schwerwiegende Folgen für die gesamte Physiologie der Zelle (Wai et al., 2015; Wai and Langer, 2016). Um den Einfluss der *YME1L1*-Mutation auf die Physiologie der Patientenzellen zu ermitteln, legten wir den Fokus auf die Untersuchung von zellbiologischen Prozessen wie Wachstum, Apoptose und Proliferation. Mit Hilfe eines immunfluoreszenten *in vivo* Assay konnten wir in den Patientenzellen eine signifikante Reduktion des Zellwachstums bereits nach 72 h unter Kulturbedingungen nachweisen (Abbildung 17 A).

Für die Untersuchung der Zellproliferation setzten wir ein BrdU-Peroxidase-basiertes Assay ein. Anhand der kolorimetrischen Auswertung ermittelten wir einen schweren Proliferationsdefekt in den Patientenzellen über einen Messzeitraum von 120 h (Abbildung 17 B). Mit der nachgewiesenen Wachstumsstörung in Patientenzellen konnten wir vorherige Ergebnisse aus anderen Zellmodellen bestätigen (Stiburek et al., 2012; Thorsness et al., 1993).

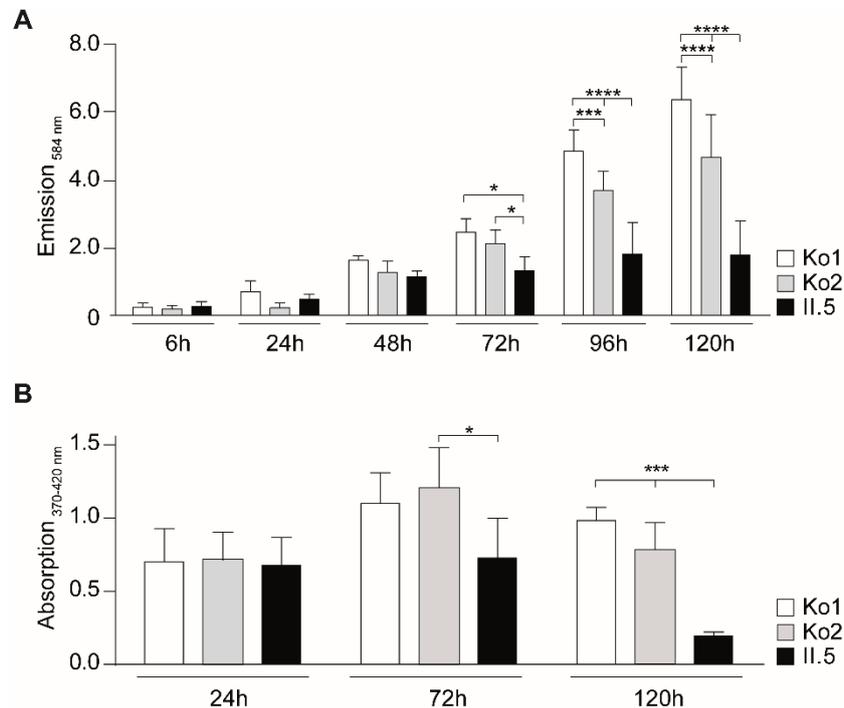


Abbildung 17: Patientenzellen mit YME1L1^{R149W} weisen Wachstums- und Proliferationsdefizite auf. **A** 72 h nach Aussaat von Kontroll- und Patientenfibroblasten produzierten die Zellen der Patientin im Vergleich zu beiden Kontrollen ein signifikant geringeres Fluoreszenzsignal. Dieses wurde durch die Reduktion von Resozurin zu Resofurin in viablen Zellen generiert. Das Wachstumsdefizit der Patientenzellen stieg mit fortschreitendem Messzeitraum progressiv an und war nach 120 h hoch signifikant, trotz signifikanter Variabilität zwischen den gesunden Kontrollen (Cell-Titer Blue Assay[®] Promega; y-Achsenwerte= $x \cdot 10^4$; one-way ANOVA; Posttest: Turkey Multiple comparison test; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; $n=5$). **B** Die kolorimetrische Messung der Proliferation mittels DNA-interkalierendem Farbstoff Bromdesoxyuridin (BrdU) ergab, nach 120 h unter Kulturbedingungen, eine hoch signifikante Verminderung der Proliferation in den Patientenzellen, (nm, Nanometer; h, Stunden; Ko1, Kontrolle 1; Ko2, Kontrolle 2; II.5, Patientin II.5; one-way ANOVA; Turkey Multiple comparison test; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n=5$).

Diese stellten wiederum auch Zusammenhänge zwischen YME1L1-Defekten und Störungen der Atmungskettenaktivität her (Nakai et al., 1995; Rainbolt et al., 2015; Stiburek et al., 2012). Demnach ermittelten wir die Enzymaktivitäten der einzelnen Atmungskettenuntereinheiten in den Patientenzellen. Wir konnten für die Messwerte der Patientenfibroblasten jedoch keine auffälligen Abweichungen nachweisen, die Werte lagen innerhalb der allgemein definierten Referenzbereiche (Tabelle 6). Unter YME1L1^{R149W} kommt es demnach zu keinen Einschränkungen in der Aktivität der Atmungskettenenzyme.

Komplex	Enzymname	Messwert	Referenz	Einheit
Komplex I	NADH-Dehydrogenase	411	163-599	mU/U ZS
Komplex II	Succinat-Dehydrogenase	560	335-888	mU/U ZS
Komplex III	Cytochrom C Reduktase	1064	570-1383	mU/U ZS
Komplex II+III		270	128-534	mU/U ZS
Komplex IV	Cytochrom C Oxidase	532	288-954	mU/U ZS
Komplex V	ATP Synthase	773	193-819	mU/U ZS
	Zitratsynthase	210	151-449	mU/mg

Tabelle 6: Messwerte der Atmungskettenaktivität. Die biochemische Messung der Aktivitäten der Atmungskettenenzyme in primären Fibroblasten der Patientin II.5 ergab keine Abweichungen von den Referenzwerten (NADH, Nicotinamidadenindinukleotid; ATP, Adenosintriphosphat; mU, milli Units; mg, Milligramm; U, Units; n=3).

4.3.5 YME1L1^{R149W} hat keinen Einfluss auf den Apoptoseprozess

Frühere Veröffentlichungen zu YME1L1 zeigten, dass Veränderungen oder ein Verlust der Proteinfunktion mit einem veränderten Apoptoseverhalten einhergehen kann (Stiburek et al., 2012; Thorsness et al., 1993). In einem ersten Schritt untersuchten wir die spontane Apoptose über einen Zeitraum von 120 h mit Hilfe eines Fluoreszenz-basierten *in vivo* Assays, auf Grundlage einer Caspase 3-Aktivität. Hierbei erfolgte die Messung im Verhältnis zur Anzahl lebender Zellen. Wir konnten diesbezüglich keine Unterschiede der spontanen Apoptosereaktion zwischen Patienten- und Kontrollzellen nachweisen (Abbildung 18 A).

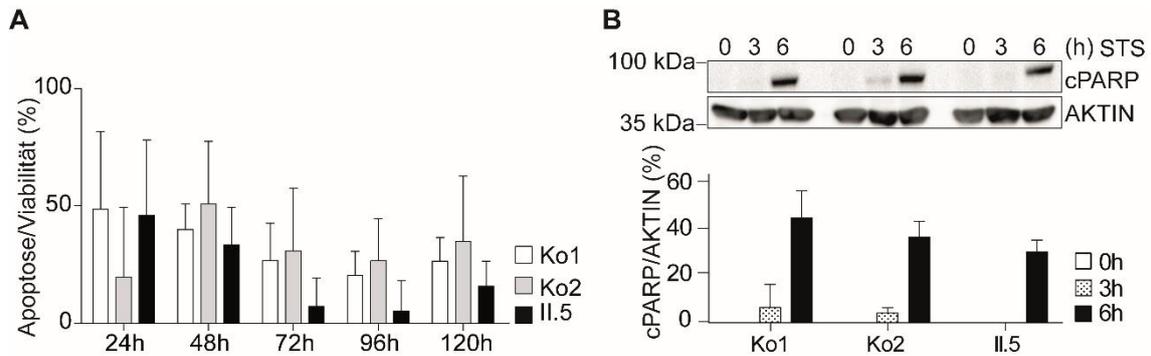


Abbildung 18: YME1L1^{R149W} hat keinen Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität der Patientenzellen. **A** Die Betrachtung der spontanen Apoptose relativ zur Lebendzellzahl war nach 120h zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich (h, Stunden; Ko1; Kontrolle 1; Ko2, Kontrolle 2; II.5; Patientin II.5; two-way ANOVA; Bonferroni Post tests; y-Achse: $Emission_{Apoptose}/Emission_{Viabilität} = 540nm/485nm$; $n=5$). **B** Nach der Applikation eines Apoptose-induzierenden Stressors (2 μ M Staurosporin) konnten wir mittels Western Blot keine signifikanten Unterschiede in den Signalintensitäten zwischen Patienten- und Kontrollzellen, nach 0, 3 und 6 h, detektieren. Die Stärke des chemilumineszenten Signals für das Spaltungsprodukt des PARP-Proteins, cleaved PARP, stieg erwartungsgemäß mit der Inkubationszeit, für Patientin und Kontrolle, an (cPARP, cleaved Poly-ADP-Ribose Polymerase; h, Stunden; Ko1; Kontrolle 1; Ko2, Kontrolle 2; II.5; Patientin II.5; STS, Staurosporin; kDa, Kilo Dalton; two-way ANOVA; Bonferroni Post Test; $n=3$).

In einer weiteren Betrachtung wurde durch über die Zugabe von 2 μ M Staurosporin ins Kulturmedium der Zellen Apoptose induziert. Anschließend erfolgte eine Proteinextraktion und Detektion der Signale des apoptotischen Markers cPARP mittels SDS-Page, Western Blot und einem spezifischen Antikörper für die gespaltene Form des PARP-Proteins, cleaved PARP (cPARP) (Abbildung 18 B). PARP, als wichtiger Bestandteil des BAK/Bax vermittelten Apoptose-Signalwegs, wird nach Induktion der Apoptose, zum Beispiel durch eine Stressor-Applikation, in kleinere Produkte gespalten. Äquivalent zur spontanen Apoptose konnten wir auch für die induzierte Apoptose keinen signifikanten Unterschied in der zeitabhängigen Reaktion zwischen Patienten- und Kontrollzellen detektieren.

4.3.6 YME1L1^{R149W} verursacht Reduktion mitochondrialer Proteine

In Western Blots für diverse mitochondriale Proteine beobachteten wir eine Tendenz zu verminderten Signalen bei Proteinlysaten der der YME1L1^{R149W}-Zellen. Zur näheren Charakterisierung dieses Phänomens wählten wir spezifische Proteine für jedes mitochondriale Kompartiment und detektierten die Proteinlevel in Whole-Cell-Lysaten mittels Western Blot. Als Marker der mitochondrialen Kompartimente wählten wir TOM20 für die äußere Membran, Cytochrome c für den Intermembranraum, SDHA für die innere Membran und Cyclophilin D als Matrixprotein. Alle Signalintensitäten in den Patientenzellen waren im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert, was auf eine Reduktion der mitochondrialen Masse in den Fibroblasten der Patientin hindeutet (Abbildung 19 A).

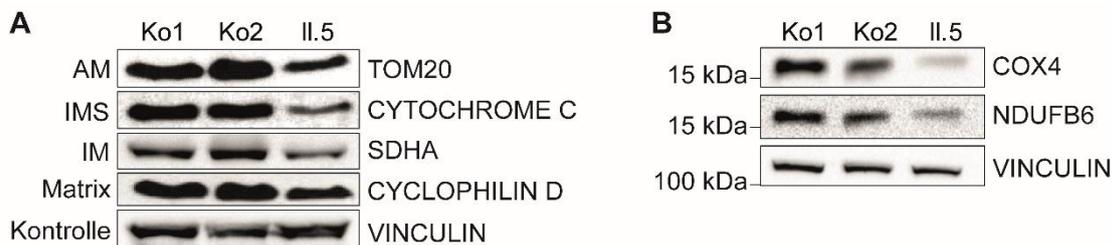


Abbildung 19: YME1L1^{R149W} verursacht eine Reduktion mitochondrialer Kompartimentmarker. **A** Western Blots für Marker aller mitochondrialen Kompartimente wiesen erniedrigte Signalintensitäten in den Patientenzellen unter YME1L1^{R149W} auf (Ko1, Kontrolle 1; Ko2, Kontrolle 2; II.5, Patientin II.5; AM, äußere Membran; IMS, Intermembranraum; IM, innere Membran; TOM20, Translocon-of-outer-mitochondrial-membrane-20; SDHA, Succinat-Dehydrogenase; n=3). **B** In Zellen mit YME1L1^{R149W} sind die Signalintensitäten der Atmungskettenuntereinheiten COX4 und NDUFB6 im Western Blot, verglichen zu den Kontrollen, reduziert (Ko1, Kontrolle 1; Ko2, Kontrolle 2; II.5, Patientin II.5; COX4, Cytochrome-C-Oxidase-Untereinheit-4; NDUFB6, NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Untereinheit-B-6; kDa, Kilo Dalton n=3).

Frühere Untersuchungen von YME1L1 lieferten bereits Erkenntnisse über die Fähigkeit zur Degradierung nicht-assemblierter Untereinheiten der Atmungskette, wie COX2 und COX4 sowie NADH-Dehydrogenase-Ubiquinon-1-Beta-Untereinheit-6 (NDUFB6) (Nakai et al., 1995; Stiburek et al., 2012). Anknüpfend an diesen Sachverhalt detektierten wir die Proteinlevel der

Atmungskettenuntereinheiten COX4 und NDUFB6, mittels Western Blot. In den Patientenzellen wiesen wir reduzierte Signalintensitäten für beide Atmungskettenproteine nach, was den bisher veröffentlichten Daten widerspricht und gegen einen Einfluss des YME1L1^{R149W} auf die Atmungskettenfunktion spricht (Abbildung 19 B). Die Reduktion mitochondrialer Kompartimentproteine und die unauffällige Atmungskettenaktivität in den Patientenzellen unterstützen diese Hypothese, lassen jedoch eine genaue Aussage über einen Enzym-Substrat-Zusammenhang, wie für OPA1 oder PRELID1, nicht zu. Es bleibt außerdem zu bemerken, dass keine tiefere Aussage über den Assemblierungsgrad von COX4 und NDUFB6 getätigt werden kann. Ein Enzym-Substrat-Zusammenhang wurde bisher nur für unassemblierte Atmungskettenproteine publiziert.

4.3.7 OMA1-Aktivität hat keinen Einfluss auf den zellulären YME1L1^{R149W}-Phänotyp

Einige aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit der proteolytischen und regulatorischen Beziehung zwischen YME1L1 und OMA1 (Anand et al., 2014; Rainbolt et al., 2016). Diese unterstreichen vor allem den Einfluss der beiden Proteasen auf die mitochondriale Fusion. Hierbei wurde herausgestellt, dass OMA1, als stress-sensitives Enzym, auf YME1L1-Dysfunktion reagieren kann und OPA1 übermäßig prozessiert, was die Fusion hemmt. Um den Einfluss der OMA1-Aktivität auf den zellulären Phänotyp der Patientenzellen zu untersuchen, blockierten wir die OMA1-Expression mit Hilfe von *small-interfering-RNAs* (*siRNAs*). Hierfür transfizierten wir die Patienten- und Kontrollzellen mit drei kommerziellen *siRNA*-Oligos, spezifisch und komplementär zur OMA1-Sequenz. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Gruppen konnten wir mit keiner der drei *siRNA*-Sequenzen, eine signifikante Reduktion der Patientenzellen mit fragmentiertem mitochondrialen Netzwerk hervorrufen (Abbildung 20 A, B). Wir verzeichneten jedoch einen Trend für die Patientenzellen in Richtung einer Erhöhung der Zellzahlen mit tubulären oder verkürzt-tubulären mitochondrialen Netzwerken (Abbildung 20 B).

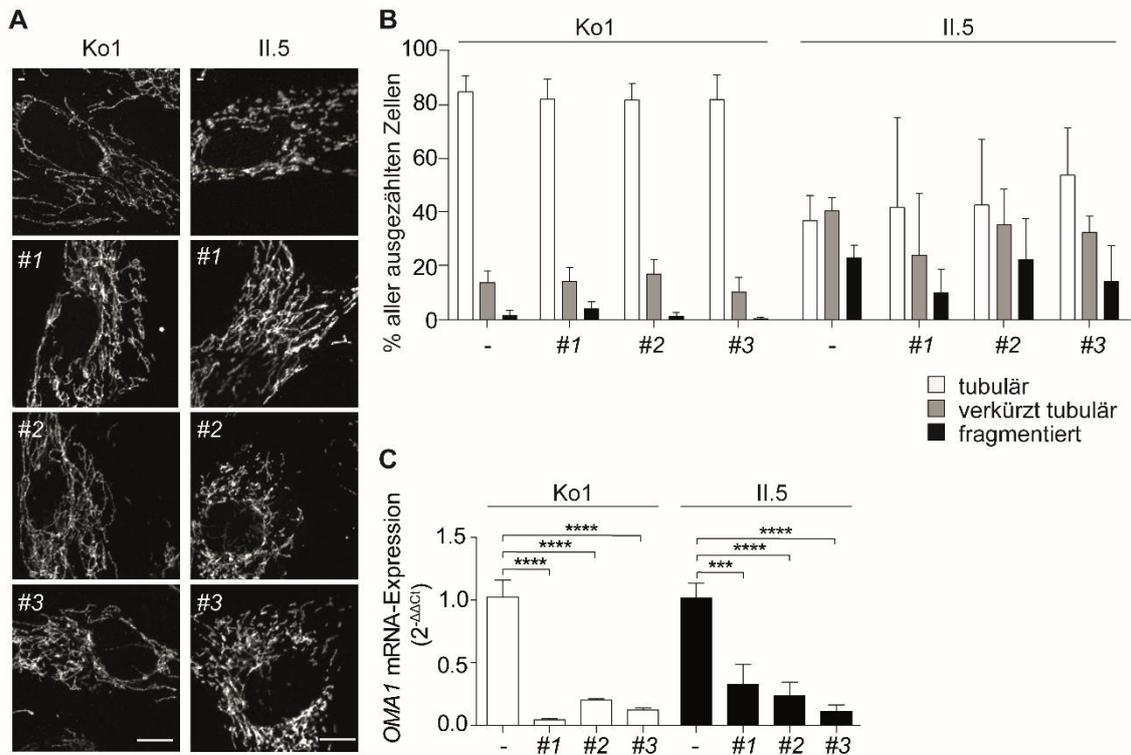


Abbildung 20: OMA1 Aktivität hat keinen Einfluss auf den YME1L1^{R149W}-basierten Phänotyp. **A** Eine *siRNA*-basierte Herunterregulierung von *OMA1* führt zu keiner Verbesserung der mitochondrialen Netzwerkfragmentierung in den Patientenzellen. **B** Die Anzahl der Patientenzellen mit tubulärem mitochondrialen Netzwerk konnte nicht erhöht sowie die Zahl derer mit fragmentiertem Netzwerk nicht signifikant gesenkt werden (-, unbehandelt; #1(2,3), *OMA1*-*siRNA*-*Oligos*; two-way ANOVA, Bonferroni-Posttest, Maßstabsbalken = 10µm; n=5). **C** Die Effizienz der *siRNA*-basierten Herunterregulierung der *OMA1*-mRNA-Expression wurde mittels qPCR für alle drei *siRNA*-Sequenzen nachgewiesen (Ko1, Kontrolle 1; II.5, Patientin II.5; -, unbehandelt; #1(2,3), *OMA1*-*siRNA*-*Oligos*, one-way-ANOVA, Turkey's Multiple Comparison Test *** p<0.001; **** p<0.0001).

Die Effizienz der Herunterregulierung der *OMA1*-Expression wurde über qPCR ermittelt (Abbildung 20 C). Diese Ergebnisse geben keinen eindeutigen Hinweis auf die Rolle einer übermäßigen *OMA1*-Aktivierung, verursacht durch die Präsenz des YME1L1^{R149W}, auf die Entstehung der mitochondrialen Netzwerkfragmentierung.

5 Diskussion

5.1 YME1L1^{R149W} als Auslöser einer Mitochondriopathie

Die Identifizierung und Charakterisierung der neuen YME1L1-Mitochondriopathie reiht sich in die Erkenntnisse ein, die in den letzten Jahrzehnten durch verbesserte genetische Methoden sowie Diagnostikverfahren, für das klinische Bild der mitochondriopathischen Erkrankungen erzielt werden konnten. Gleichzeitig verweisen diese gewonnenen Daten vermehrt auf die Rolle des mtUPR-Systems oder damit verbundener Prozesse zur Erhaltung der Mitochondrien. Mutationen in mtUPR-Proteinen können schwerwiegende Folgen nach sich ziehen, wie bereits bei den Symptomspektren von Mutationen in i-AAA⁺- oder m-AAA⁺-Komplexproteinen ersichtlich wird (Calvo and Mootha, 2010; Elleuch et al., 2006; König et al., 2016; Nolden et al., 2005). Aber auch der Zusammenhang zu neurodegenerativen Erkrankungen (Chan, 2006; Chen and Yan, 2007) wie Parkinson (Arduino et al., 2011), Autosomal-dominante Optikusatrophie (Delettre et al., 2000), Ataxie (Di Bella et al., 2010), Alzheimer (Martinelli and Rugarli, 2010) oder der Huntington-Krankheit (Wang et al., 2009) unterstreicht die Bedeutung mitochondrialer Qualitätsmechanismen. Neben exogenen Ursachen stehen vor allem hereditäre Formen dieser Erkrankungen im Fokus der Forschung. Verschiedenste Mutationen in Genen, die eng mit der Erhaltung der mitochondrialen Funktion, insbesondere der Dynamik, verknüpft sind, wurden hierbei identifiziert und eingehender untersucht (Chen and Chan, 2009; Delettre et al., 2000; Knott et al., 2008; Olichon et al., 2006). Somit kann die neue Form der YME1L1^{R149W}-Mitochondriopathie den vielfältigen, heterogenen, mitochondrialen Syndromen zugeordnet werden.

Der klinische Phänotyp der Patienten ist mit dem einer Mitochondriopathie vereinbar. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Muskelgewebes auf pathologische Veränderungen innerhalb der Mitochondrien hin. Eine homo- oder heterozygote Mutation im YME1L1-Gen, auch die hier identifizierte YME1L1-Missense-Mutation, sind bisher nicht in internationalen (Exac¹¹) und institutionellen (Max-Planck-Institut

¹¹ <http://exac.broadinstitute.org/>, Stand: 23.02.2017

für Molekulare Genetik; Datenbank des Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders) genetischen Datenbanken verzeichnet. Zum derzeitigen Stand der Forschung sind keine weiteren homozygoten Mutationen für YME1L1 als krankheitsassoziiert beschrieben. Um die Ursache der Symptome der Patienten eindeutig zuzuordnen, konnten die Sequenzierungsuntersuchungen die Beteiligung weiterer Mutationen in bereits bekannten Genen für zum Beispiel Neurodegeneration, Ataxie oder Paraplegie ausschließen. Diese kodieren unter anderem für die Proteine Spastin (*SPG4*, MIM* 604277) (Ivanova et al., 2006), Optic atrophy 1 (*OPA1*, MIM*605290) (Delettre et al., 2000), ATPase Family Gene 3-Like 2 (*AFG3L2*, MIM*604581) (Di Bella et al., 2010) oder Paraplegin (*SPG7*, MIM*602783) (Pearce, 1999; Warnecke et al., 2007). Diese Proteine gehören teilweise der gleichen Proteinfamilie wie YME1L1 an. Die bioinformatische Analyse bescheinigte der neu identifizierten YME1L1-Missense-Mutation (c.616C>T), ein hohes krankheitsverursachenden Potential (Mutation Taster¹²). Die Mutation an Position 616 des Gens hat für die Proteinsequenz den Austausch in der mitochondrialen Erkennungssequenz von zwei sehr gegensätzlichen Aminosäuren, nämlich dem basischen Arginin zum aromatischen Tryptophan, zur Folge. Dieser Austausch von Aminosäuren mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Charakteristika in hoch konservierten Regionen kann schwere Folgen für die Funktionalität der betroffenen Proteindomäne nach sich ziehen.

5.2 Die Folgen von YME1L1^{R149W} für den i-AAA⁺-Komplex

Die Funktionalität von YME1L1 und anderen AAA⁺-Proteasen basiert auf der Anordnung und Konservierung spezifischer Proteindomänen. Die Anordnung und Erhaltung der hoch konservierten Proteindomänen bilden die Grundlage für die Funktionalität der AAA⁺-Protease (Coppola et al., 2000; Leonhard et al., 2000; Leonhard et al., 1999). Die Aminosäuresequenz dieser Proteindomänen ist selbst zwischen verschiedensten Spezies konserviert erhalten und unterstreicht

¹² Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org/cgi-bin/MutationTaster/MutationTaster69.cgi>
Gen: YME1L1; Transkript: ENST00000376016/NM_014263; Position: AGTCT[C/T] GGGG,
Stand 23.02.2017

somit die Notwendigkeit und Bedeutung der einzelnen funktionellen Kompartimente für die AAA⁺-Proteasen. Dies gilt natürlich auch für die MTS-Domäne des nukleär kodierten Proteins. Die Identifikation des YME1L1^{R149W}-Proteins brachte uns zwei grundlegend neue Erkenntnisse zur MTS-Domäne. Zum einen konnten wir zeigen, dass die MTS einen größeren Teil des Proteins einnimmt als die bisherige bioinformatische Berechnung vermuten ließ, welche sich lediglich auf ein Drittel der von uns experimentell nachgewiesenen Länge beschränkte (Abbildung 10, Mitoprot¹³). Zum anderen belegten unsere Ergebnisse der Lokalisationsexperimente (Abbildung 9) nachweislich, dass eine mutierte MTS keine vollständige Blockade des Proteinimports verursacht. Durch das doppelpositive Immunfluoreszenzsignal für YME1L1^{R149W} und der ATPase- β -Untereinheit können wir einen gestörten Importprozess der MTS an TOM- oder TIM23-Komplexen ausschließen. In weiteren Untersuchungen konnten wir außerdem aufzeigen, dass der Austausch des Arginins an Position 149 vor allem schwerwiegende Folgen für die Prozessierung und Reifung hat.

Nach bisherigen Erkenntnissen wird der MTS keine grundlegende Rolle in der späteren Funktion von mitochondrialen Proteinen, wie der i-AAA⁺-Protease, zugeschrieben (Arretz et al., 1991; Gakh et al., 2002). Sie gewährleistet lediglich den erfolgreichen Erkennungs- und Importprozess des ungefalteten Polypeptids. Bisherige Veröffentlichungen zur Komplexgröße von YME1L1 zeigen auf, dass die MTS entfernt werden muss, damit eine erfolgreiche Assemblierung erfolgen kann (Stiburek et al., 2012). Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass die Abspaltung der MTS von YME1L1 MPP-abhängig ist und zu einem reifen, kleineren YME1L1-Monomer führt, dies jedoch für YME1L1^{R149W} blockiert ist und kein reifes YME1L1^{R149W}-Protein gebildet werden kann (Abbildung 10). Mit der detaillierten Untersuchung der putativen MPP-Bindungsloci, innerhalb der erwarteten MTS, wiesen wir nach, dass ausschließlich Arginin an Position 149 den Erkennungs- und Bindungslocus zwischen MPP und YME1L1 darstellt. Der Austausch des Arginins¹⁴⁹ durch Tryptophan in unserem Patientenprotein, blockiert die MPP-Bindungsstelle im Protein irreversibel. YME1L1^{R149W} verbleibt

¹³ <https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>, Query sequence: YME1L1-FASTA-Sequenz, Stand 22.02.2017

somit als unreifes Vorläuferprotein im Mitochondrium. Die MPP-abhängige Abspaltung von N-terminalen Erkennungssequenzen ist für viele mitochondriale Proteine notwendig, jedoch ist bekannt, dass auch andere Kandidatenproteine, innerhalb der Matrix, für die Beteiligung an Abspaltungsprozessen der Erkennungssequenzen verantwortlich sein können (Gakh et al., 2002; Teixeira and Glaser, 2013). Welches Enzym dabei aktiv wird, hängt vor allem von der Ziellokalisation des prozessierten Proteins im Mitochondrium ab. Es muss demnach diskutiert werden, ob auch eine andere Peptidase/Protease die MTS des YME1L1^{R149W}-Proteins abspalten könnte, indem sie eine alternative Bindungsstelle nutzt. Jene Proteasen, zum Beispiel MIP, IMP oder PARL, nutzen alternative Erkennungs- und Bindungsstellen der MTS (Gakh et al., 2002; Mossmann et al., 2012). In der Literatur sind bisher jedoch keine Zusammenhänge bezüglich YME1L1 als Protein der inneren Membran und einer MTS-Prozessierung durch alternative Proteasen bekannt (Gakh et al., 2002). Mit der gerichteten Analyse der einzelnen Peptidase-Kandidaten, in Form eines adaptierten, hier angewandten, zellfreien Assays, könnten wir Aufschluss über eine alternative YME1L1-Prozessierung gewinnen. Gegen diese Möglichkeit sprechen jedoch unsere Ergebnisse aus den Western Blots der Whole-Cell-Lysate sowie aus den MPP-Assays, welche klar zeigen, dass nur das WT-YME1L1 in der Zelle oder außerhalb nach Zugabe der MPP prozessiert werden kann und ein Signal für die reife Form ausgebildet wird.

Die Aktivität und Funktionalität von YME1L1 wird durch die Bildung eines homo-oligomeren Komplexes aus reifen YME1L1-Monomeren gewährleistet (Graef and Langer, 2006; Stiburek et al., 2012). Lediglich dieser Komplex ist chemisch und strukturell in der Lage, die hydrophoben Aminosäuren des Porenelements zu zentralisieren und eine proteolytische Pore zu bilden und Substrate umzusetzen (Gerdes et al., 2012; Graef and Langer, 2006). Durch die N-terminale MTS vermuteten wir, aus strukturchemischer Sicht, eine fehlerhafte oder ausbleibende Faltung des unreifen YME1L1^{R149W}-Proteins und daraus folgend keinen proteolytischen Komplex. YME1L1^{R149W} müsste, als unreifes, schädliches Protein, somit rasch durch das interne Kontrollsystem degradiert werden, sollte es nicht in eine stabile Form assemblieren. Unsere Ergebnisse zur

Untersuchung der Komplexbildung konnten aufzeigen, dass YME1L1^{R149W}, trotz der unreifen Form, in einen stabilen Proteinkomplex assemblieren kann, der äquivalente Signale zum WT-Protein produzierte. Die Fähigkeit zur Assemblierung in die i-AAA⁺-Protease mit einem Gewicht von ~1 MDa, wurde bisher nur dem reifen YME1L1-Protein zugeschrieben (Stiburek et al., 2012). Gleichzeitig konnten wir aufzeigen, dass YME1L1^{R149W} in der Lage ist, Komplexe mit einer Größe von ~2 MDa zu bilden, die dem molekularen Gewicht des kürzlich identifizierten SPY-Komplex entsprechen, in welchen die reife Form der i-AAA⁺-Protease eingebettet ist (Wai et al., 2016).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Formation der i-AAA⁺-Protease, sowie eine Assemblierung in hochmolekulare Komplexe, wie den SPY-Komplex, nicht mehr nur dem reifen Protein vorbehalten ist. Die strukturellen Voraussetzungen für eine proteolytische Funktionalität sind gegeben (Graef and Langer, 2006). Inwiefern der YME1L1^{R149W}-i-AAA⁺-Komplex Unterschiede, zum Beispiel im Faltungsgrad, zum WT-Gegenpart aufweist, kann nur über tiefere strukturelle Experimente geklärt werden.

5.2.1 YME1L1^{R149W} wird zum Schutz der Mitochondrien degradiert

Der Austausch von Aminosäuren kann schwere Folgen für den räumlichen Faltungsgrad von Proteinen mit sich bringen. Trotz der Fähigkeit zur Assemblierung in einen Komplex, bleibt zu beachten, dass unsere Ergebnisse einen signifikanten Proteinverlust des YME1L1^{R149W}-Komplexes nachweisen (Abbildung 9 C). Die Präsenz der MTS, im unreifen YME1L1^{R149W}-Proteasenkomples, könnte zur Einstufung als geschädigtes Protein durch das mtUPR-System führen. Dieser Einstufung schließt sich meist ein gradueller Abbau des schädlichen Proteins an. Ein solcher Abbau kann über diverse Mechanismen im Mitochondrium erfolgen, um dieses vor Mitophagie zu schützen (Baker et al., 2014b; Nakada et al., 2001; Soto, 2003; Wai and Langer, 2016). Für eine experimentelle Aufklärung der YME1L1^{R149W}-Degradierung wurden deshalb verschiedene Optionen in Betracht gezogen. Wir stellten hierbei vor allem proteolytische Abbaumechanismen in den Fokus unserer Untersuchungen.

In einem ersten, bisher nicht abgeschlossenen, Ansatz untersuchten wir die Möglichkeit einer YME1L1^{R149W}-Degradierung durch alternative, mitochondriale, mtUPR-abhängige Proteasen. Diese mtUPR-Proteasen (AFG3L2, LONP, PARL) konnten dabei als Kandidaten für einen Abbau von YME1L1^{R149W} bisher weitestgehend ausgeschlossen werden. Diese Proteasen wurden von uns als Kandidaten ausgewählt, da sie die Degradierung dysfunktionaler Proteine im mtUPR-System übernehmen können (Quiros et al., 2015). Die Identifikation weiterer Proteasen, welche durch Kompensationsmechanismen aktiviert werden können, wäre ein Ansatz zukünftiger Experimente.

Eine weitere Hypothese zum Abbau des YME1L1^{R149W}-Proteinsignals basierte auf einer möglichen Aktivierung des zytosolischen Proteasoms. Das Proteasom kann durch den mitochondrialen Signalweg UPR_{am} (unfolded protein response activated by mistargeting of proteins) reguliert werden. Hierbei kann die Anhäufung von MTS-Sequenzen unreifer Proteine im Zytosol das Proteasom aktivieren. Dies wiederum wirkt auf nukleär kodierte Peptide und hat eine vermehrte Ubiquitinierung mit anschließendem Abbau der unreifen Proteine, noch vor dem Import, zur Folge. Weiterhin kann die Transkription nukleär kodierter Gene negativ reguliert werden (Eisenberg-Bord and Schuldiner, 2016). In unseren Experimenten wurde deutlich, dass die Aktivität des Proteasoms, in Zellen mit YME1L1^{R149W}, nicht erhöht ist (Abbildung 11). Weiterhin kann eine MG132-abhängige Hemmung des Proteasoms die verminderten YME1L1^{R149W}-Signale nicht wiederherstellen. Wir können somit einen proteasomalen Abbau als Grund des der YME1L1^{R149W}-Reduktion ausschließen. Unsere Daten gehen außerdem mit Erkenntnissen aus früheren Veröffentlichungen einher, in denen vor allem bei Proteinen der äußeren Membran, seltener Proteinen anderer Kompartimente, durch das Ubiquitinierungssystem abgebaut werden (Koppen and Langer, 2007). Ein weiteres Gegenargument ist außerdem der erfolgreiche Import des Proteins in die innere Membran, wie wir durch unsere Lokalisationsuntersuchungen nachweisen konnten (Abbildung 9 Abbildung 9A).

Als weiteren alternativen Mechanismus der YME1L1^{R149W}-Proteinreduktion zogen wir die Möglichkeit einer Autokatalyse in Betracht, basierend auf der Chaperon- und Metalloproteasenaktivität des YME1L1-Proteins. Wir konnten

über die Stabilität diverser genetischer YME1L1-Varianten aufzeigen, dass YME1L1^{R149W} das Potential zum autokatalytischen Abbau besitzt (Abbildung 12). Wir detektierten, unter Proteinbiosynthesehemmung, einen graduellen Abbau des unreifen YME1L1^{R149W}-Proteins in Flp-In-T-Rex-HEK293-Zellen. Das Einfügen einer zusätzlichen Mutation an Position E381Q, die eine proteolytische Inaktivität der R149W-Variante zur Folge hatte, hob den Effekt der graduellen Signalreduktion auf und stabilisierte das unreife Proteinsignal. Wir interpretierten dieses Ergebnis zum einen als Beweis einer proteolytischen Restaktivität, als auch zur Fähigkeit zum autokatalytischen Abbau, welche wir mit der proteolytischen Inaktivierung in R149W/E381Q blockieren konnten. Die Wahl des Zellmodells in diesem Experiment behindert jedoch einen endgültigen Beweis für die Hypothese. In einem Modell ohne endogenen YME1L1-Hintergrund könnten wir eindeutiger differenzieren, ob möglicherweise keine Degradierung, sondern eine partielle Umwandlung in reife YME1L1^{R149W/E381Q}-Formen vorlag. Im derzeitigen Modell verstärkt der endogene YME1L1-Hintergrund der HEK293T-Zellen die Signale für das reife YME1L1 und erscheint somit auch unter der R149W-Variante. Wir können somit die Entstehung der reifen YME1L1-Signale den genetischen Varianten nicht zweifelsfrei zuordnen. Dieses Erkenntnis kann nur aus der Wiederholung mit einem totalen *YME1L1*^(-/-)-Modell gewonnen werden, welches zum aktuellen Zeitpunkt technisch nicht umsetzbar war. Zusammenfassend deuten wir die Ergebnisse als autokatalytischen Abbau des YME1L1^{R149W}. Um dies final zu belegen, wäre neben der Wiederholung in einem endogen-freien Hintergrund auch der Ausschluss weiterer potentiell degradierender, mitochondrialer Enzyme, wie zum Beispiel Oligopeptidasen der Matrix oder aber stress-sensitive Metallopeptidasen nötig. Auch das Ausschleusen akkumulierender und schädigender Polypeptide über ABC-Transporterproteine zum Beispiel MDL1 muss in der Betrachtung berücksichtigt werden (Koppen and Langer, 2007).

5.3 Die proteolytische Aktivität des YME1L1^{R149W} Proteins

Als i-AAA⁺-Proteasekomplex agiert YME1L1 auf vielfältige Weise auf Basis seiner Metalloproteasenaktivität und legt mit seiner proteolytischen Pore den

Grundstein für den Umsatz von Proteinen (Schreiner et al., 2012). Da unsere Ergebnisse für eine Fähigkeit zur autokatalytischen Degradierung des YME1L1^{R149W} sprechen, muss eine zumindest partielle proteolytische Funktion im Patientenprotein vorliegen. Diese wiederum benötigt als Voraussetzung die Bildung einer proteolytischen Pore aus den hydrophoben Aminosäuren der YME1L1-Proteinsequenz (Hanson and Whiteheart, 2005). Des Weiteren müssen C- und N-Terminus an den Oberflächen der hexameren Ringstruktur zugänglich sein, um Substrate zu binden. An dieser Position werden die oberflächlich gebundenen Substrate ATP-abhängig in das Innere des i-AAA⁺-Proteasekomplexes geschleust und abgebaut (Graef and Langer, 2006). Bisher deuten die Ergebnisse unserer Untersuchungen darauf hin, dass die katalytische Pore des YME1L1^{R149W}-Proteins unverändert ist. Hier könnten struktur-chemische oder kristallografische Untersuchungen aufschlussreich für Erkenntnisse über Aufbau und Faltung des proteolytischen YME1L1^{R149W}-Komplexes sein. Ein teilweiser oder kompletter Funktionsverlust, der durch die Präsenz eines Proteinkomplexes aus unreifen Monomeren hervorgerufen wird, hätte schwerwiegende Folgen für das molekulare mtUPR-System. Vor allem aber für dessen Hauptaufgabe: die Erhaltung der Atmungskettenaktivität. Störungen der Atmungskette können in der Auslösung apoptotischer Signalwege gipfeln. Die Anwesenheit eines YME1L1^{R149W}-Proteinkomplexes wirft somit zweierlei Fragen auf: (1) besitzt der mutante YME1L1^{R149W}-Komplex eine proteolytischen Restaktivität an seinen Substraten und verhindert somit selbst irreparable Schäden im Mitochondrium? (2) Verursacht die Anwesenheit des „fehlerhaften“ Proteinkomplexes oxidativen Stress oder sogar mitochondriale Schäden und aktiviert somit das mtUPR?

Zur Beantwortung der ersten Frage können unsere Ergebnisse aus der Betrachtung der Enzym-Substrat-Beziehung Aufschluss über den proteolytischen Funktionsgrad von YME1L1^{R149W} geben (Abbildung 14). Wir konnten, in Form einer gemäßigten Akkumulation von PRELID1 bzw. einer fehlenden Isoform S-OPA1 d in den entsprechenden Western Blots der Patientin, zeigen, dass YME1L1^{R149W} seine Substrate teilweise prozessieren kann. Dieses Erkenntnis bestätigt unsere vorangegangenen Ergebnisse und bescheinigt dem

YME1L1^{R149W}-Komplex die proteolytische Restfunktion. Besonders der Vergleich zwischen humanem Patienten- und murinem konditionalen Knockoutmodell kann auf deutliche Weise den graduellen Unterschied der Proteinaktivität einordnen. In den Lysaten der konditionalen Knockoutmaus zeigt sich eine starke Akkumulation von PRELID1 im Vergleich zu den Patientensignalen. Weiterhin fehlt das Signal für S-OPA1 d in den murinen Knockoutproben vollständig. Die murinen WT-Proben, als auch die gesunden humanen Kontrollen, sind hingegen bezüglich der S-OPA1 d und PRELID-Signale stabil. Diese Verhältnismäßigkeit zeigt, dass die Aktivität des YME1L1^{R149W}-Proteins zwischen der des WT-Yme1l1-Proteins und einem totalen Funktionsverlust im konditionalen Knockoutmodell einzuordnen ist. Hier soll außerdem der Verweis auf die embryonale Letalität der totalen Knockoutmaus zum Tag E13 der embryonalen Entwicklung angeführt werden (Wai et al., 2015). Vergleicht man den Schweregrad des totalen murinen Knockouts mit dem Patientenphänotyp, wird einmal mehr deutlich, dass YME1L1^{R149W} mit einer verbleibenden Enzymfunktion aktiv sein muss.

Ein weiterer Beleg für eine enzymatische Restaktivität des YME1L1^{R149W} konnten wir über die Betrachtung der Atmungskettenenzymaktivität und des apoptotischen Verhaltens erbringen. Wie bereits mehrfach veröffentlicht, führt ein *yme1*-Knockdown im Hefemodell zur Blockierung der Atmungskettenaktivität, einem schweren Wachstumsdefekt und einer erhöhten apoptotischen Tendenz (Campbell et al., 1994; Thorsness et al., 1993). In den Patientenzellen verzeichneten wir sowohl bei den Enzymaktivitäten der Atmungskette (Tabelle 6), als auch in der Messung induzierter Apoptose (Abbildung 18) keinen signifikanten Unterschied zu den gesunden Kontrollen. Hinzu kommt, dass wir für die Atmungskettenuntereinheiten COX4 und NDUF6 keine Akkumulation der Signalintensitäten in den Patientenlysaten detektierten (Abbildung 19). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur bisherigen Literatur, in welcher vor allem unassemblierte COX2-, COX4- und NDUF6-Proteine bei einem YME1L1-Funktionsverlust akkumulieren (Nakai et al., 1995; Potting et al., 2013; Stiburek et al., 2012). Auch diese Ergebnisse legen eine verminderte Restaktivität des YME1L1^{R149W}-Proteins in den Patientenzellen nahe. Fasst man unsere Daten

zusammen, so scheint es, dass diese YME1L1^{R149W}-Restaktivität die Funktionen der Atmungskette, der apoptotischen Signalwege und der Substratumsetzung in den Patientenzellen teilweise aufrechterhalten kann. Gleichzeitig schließt dies aber die Möglichkeit nicht aus, dass weitere Gene des mtUPR Systems durch die Präsenz des YME1L1^{R149W} übermäßig transkribiert werden und alternative Proteasen schwerwiegendere Schäden ausgleichen können. Diese Kompensationsmechanismen müssten durch weitere Experimente genauer untersucht werden. Es muss außerdem darauf hingewiesen werden, dass bestimmte Defekte der Patientenzellen, trotz der verbleibenden Funktion von YME1L1^{R149W}, nicht verhindert werden. So ist das von uns gemessene, hoch signifikante Wachstums- und Proliferationsdefizit ein Hinweis auf die schwerwiegende YME1L1-Dysfunktion, wie es auch im Hefeorganismus beobachtet werden konnte (Thorsness et al., 1993)

5.4 YME1L1^{R149W} blockiert den mitochondrialen Fusionsprozess

Mitochondrien besitzen neben der molekularen Ebene, auch auf zellulärer Eben des mtUPR System die Option, auf oxidativen Stress oder defekte Proteine zu reagieren. Dies geschieht mit Hilfe von dynamischen Prozessen der Mitochondrien entlang des Zellzytoskeletts. Hierbei reiht sich eine abwechselnde und stark regulierte Folge von Fusions- und Trennungsvorgängen aneinander, an denen YME1L1 maßgeblich beteiligt ist (Anand et al., 2014). Bei diesen Prozessen findet ein Austausch des gesamten oder von Teilen des mitochondrialen Inhalts statt. Aufgrund dieser Kenntnisse über die Rolle von YME1L1 in diesen Prozessen, betrachteten wir die mitochondriale Dynamik bzw. die Morphologie des mitochondrialen Netzwerks in den Patientenzellen und konnten eine schwere Fragmentierung der Mitochondriennetzwerke identifizieren (Abbildung 15, Digitales Zusatzmaterial 1 und 2). Unsere Ergebnisse geben demnach einen Hinweis auf eine gestörte Regulation der dynamischen Prozesse inner halb des mitochondrialen Netzwerkes der Zelle. Betrachtet man die Quantifizierung der morphologischen Analyse (Abbildung 15) sowie die Ergebnisse zur OPA1-Umsetzung in den Patientenzellen (Abbildung 14 C und D), so kann eine partiale proteolytische Interaktion der YME1L1^{R149W}- und OPA1-

Proteine nachgewiesen werden. Diese reicht jedoch nicht aus, um L-OPA1 angemessen zu spalten. Demnach kommt es zu einer signifikanten Reduktion des S-OPA1 d-Proteinsignals und das YME1L1^{R149W}-Protein ist nicht in der Lage ist, das Gleichgewicht der OPA1-Isoformen aufrechtzuerhalten. Dies gipfelt in einer Fusionsblockade und ruft eine übermäßige Trennung der Mitochondrien hervor, wie wir es in den Patientenzellen nachweisen konnten. Diesen Effekt konnten wir besonders mit Hilfe der live-cell-Mikroskopie verdeutlichen, in welcher neben einer unzureichenden Fusion der Mitochondrien auch eine Verlangsamung der dynamischen Prozesse, in den Mitochondrien der Patientin, zu erkennen ist (Digitales Zusatzmaterial 3 und 4). Es kann somit kein ausreichender Informations- und Inhaltsaustausch stattfinden. Gleichzeitig wird dies auch durch die Reduktion der mitochondrialen Kompartimentmarker in den Patientenzellen deutlich, die Hinweise für eine verringerte mitochondriale Masse geben könnten. Eine genauere Überprüfung dieser Theorie mittels Expressionsanalyse mitochondrialer und nukleärer Gene in genomischer DNA durch quantitativer qPCR, lieferte jedoch weder ein eindeutiges Ergebnis noch eine statistisch verwertbare Aussage und müsste technisch verbessert werden. Sowohl eine gestörte Dynamik als auch eine verringerte Anzahl an Mitochondrien können die Kommunikation zwischen den Organellen maßgeblich beeinträchtigen. Dass eine Blockade dieses Kommunikationswegs weitreichende Folgen für Zellen und Organismus mit sich führt, wird deutlich, wenn man den klinischen Phänotyp der Patienten betrachtet und mit anderen ähnlichen Krankheitsmodellen vergleicht. Auch andere Mutationen in Dynamik-involvierten und –regulierenden Genen haben die Ausprägung diverser neurodegenerativer Erkrankungen zur Folge und unterstreichen die essentielle Bedeutung der Dynamik zur Erhaltung der mitochondrialen Funktion (Chan, 2006; Martinelli and Rugarli, 2010).

5.5 YME1L1^{R149W} und OMA1 in proteolytischer Interaktion

Die Regulation der mitochondrialen Dynamik ist, neben YME1L1, von vielen weiteren Proteinen abhängig. OPA1, als einzig bekanntes Protein für die Fusion der inneren mitochondrialen Membran, wird nur in Teilen von YME1L1 gespalten

und aktiviert (Anand et al., 2014; MacVicar and Langer, 2016). Neben dieser Interaktion kann auch die ATP-unabhängige Peptidase OMA1 OPA1 prozessieren (Baker et al., 2014a). OMA1 ist eine stress-sensitive Metalloendopeptidase, welche auch dem Qualitätskontrollsystem der Mitochondrien angehört (Baker et al., 2014a; Quiros et al., 2013). Das Zusammenspiel zwischen YME1L1 und OMA1 führt zur Entstehung der drei kurzen, löslichen S-OPA1-Isoformen (Anand et al., 2014). In den letzten Jahren wurden von mehreren Gruppen zahlreiche Erkenntnisse zum regulativen Zusammenspiel der beiden Proteasen YME1L1 und OMA1 gewonnen (Anand et al., 2014; Rainbolt et al., 2016). Hierbei wurde unter anderem deutlich, dass YME1L1 maßgeblich die OMA1-Aktivität beeinflussen kann. Ist die YME1L1-Funktion gestört oder blockiert, führt dies zur Bildung von mitochondrialem Stress, welcher wiederum die OMA1-Aktivität triggert (Quiros et al., 2013; Rainbolt et al., 2016). Infolge dessen wird L-OPA1 übermäßig prozessiert und die langen Formen aufgebraucht, die Fähigkeit zur Fusion geht verloren und das mitochondriale Netzwerk fragmentiert (Anand et al., 2014). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir die Interaktion zwischen YME1L1^{R149W} und OMA1 im Patientenmodell mit Hilfe einer *siRNA*-basierten Herunterregulierung der *OMA1*-Genexpression. Wir vermuteten, dass eine Reduktion der *OMA1*-mRNA-Expression und damit verbunden ein Wegfall der OMA1-Proteinaktivität zu einer Wiederherstellung der mitochondrialen Netzwerkfragmentierung in den Patientenzellen führen könnte. Unsere Daten aus der *OMA1*-Herunterregulierung wiesen jedoch keine signifikanten Verbesserungen der mitochondrialen Morphologie in den Patientenzellen nach (Abbildung 20). Diese Resultate müssen jedoch vor dem Hintergrund einer YME1L1^{R149W}-Restfunktion betrachtet werden, die einen potentiellen Effekt aufheben könnte.

Mehrere Ebenen unserer Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass die verbleibende YME1L1^{R149W}-Aktivität keine Steigerung der OMA1-Funktion, über stress-induzierte Mechanismen, verursacht. Als Indikator dienen hierfür zum einen die Normwerte der Atmungskettenenzymaktivität in den Mitochondrien der Patientin. Zum anderen detektierten wir in weiteren, noch nicht abgeschlossenen, Experimenten keine Veränderungen bezüglich erhöhter Sauerstoffradikale in den

Zellen der Patientin (Reactive oxygen species/ROS-Assay), was zusätzlich gegen oxidativen Stress und eine OMA1-Aktivierung sprechen würde. Im Mausmodell jedoch verursachte allein der konditionale Knockout von *Yme111* erhöhten oxidativen Stress in den betroffenen Zellen und eine übermäßige Prozessierung von L-OPA1 mit einer Akkumulation der kurzen Isoformen c und e. Dies deutete auf eine gesteigerte OMA1-abhängige Reaktion hin (Anand et al., 2014). Im murinen *Yme111^(-/-)*-Modell erwies sich ein zusätzlicher OMA1-Knockout als Mittel der Wahl, um die mitochondriale Fragmentierung in den *Yme111^(-/-)*-MEF aufzuheben (Anand et al., 2014). Da im humanen Patientenmodell kein vollständiger Verlust der Proteinfunktion vorliegt, führt dies, gemäß unseren Ergebnissen, nicht zur Steigerung der OMA1-Aktivität. Diese hochkomplexe Interaktion und YME1L1 und OMA1 wird auch in der Fachliteratur mit unterschiedlichen Ansätzen diskutiert (Anand et al., 2014; Baker et al., 2014a; Rainbolt et al., 2016). So wurde gezeigt, dass unter Schwankungen des mitochondrialen Membranpotentials, YME1L1 in der Lage ist OMA1 zu degradieren, jedoch nicht zu aktivieren. Dies würde für die Patientenzellen eine Degradierung von OMA1 bedeuten, die YME1L1^{R149W} mit seiner verbleibenden Aktivität aufrechterhalten kann. Dies könnte eine Erklärung für den, im Vergleich zum murinen Modell, abgeschwächten Phänotyp darstellen, müsste doch durch eine Betrachtung der OMA1-Proteinstabilität in den Patientenzellen detaillierter aufgeklärt werden. Der genaue Zusammenhang zwischen YME1L1 und OMA1 kann mit unserem Patientenmodell und unseren derzeitigen Erkenntnissen noch nicht final aufgeklärt werden. Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die verbleibende Aktivität des YME1L1^{R149W}-i-AAA⁺-Komplexes Teile der mitochondrialen Aktivität bis zu einem bestimmten Grad aufrechterhalten kann. Diese reicht jedoch nicht aus, um die ganzheitlich schwerwiegenden Folgen für die Funktionalität des Mitochondriums vollständig zu vermeiden und verursacht in den Patienten einen progressiven Phänotyp mit erheblichen Einschränkungen.

6 Ausblick

YME1L1 als essentielles Protein des mtUPR-Systems ist verantwortlich für die Erhaltung der mitochondrialen Fusionsvorgänge sowie für die Degradierung potentiell schädlicher Polypeptide zur Erhaltung der mitochondrialen Integrität. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen auf, dass die Missense-Mutation c.616C>T in einer hoch konservierten Region des Proteins schwerwiegende Folgen für das Mitochondrium, die Zelle und den gesamten humanen Organismus haben kann. Der Austausch der Aminosäure innerhalb der MTS an Position p.149 verändert die Aminosäuresequenz auf derart gravierende Weise, dass das Protein im Mitochondrium nicht zum reifen, aktiven Protein prozessiert werden kann. Eine Veränderung in der mitochondrialen Erkennungssequenz hat demnach großen Einfluss auf die spätere Weiterverarbeitung des YME1L1-Proteins innerhalb des Mitochondriums. Im Fall von YME1L1^{R149W} führt dies zwar zu einer erfolgreichen Assemblierung in den i-AAA⁺-Proteasekomplex, jedoch kann dieser seine Funktionen nicht in vollem Maße entfalten. Anhand verschiedener Substrate von YME1L1, und an der Beteiligung an Fusionsprozessen der Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass die Mutation die Proteinfunktion maßgeblich behindert, jedoch nicht vollständig blockiert. Die Mitochondrien können nicht mehr vollständig fusionieren und somit angemessen auf Umwelteinflüsse und zelluläre Bedingungen reagieren. YME1L1, als Vertreter eines fein-regulierten proteolytischen Systems, ist ein gutes Beispiel für die komplexen proteolytischen Zusammenhänge im Mitochondrium. Die Erhaltung der mitochondrialen Dynamik nimmt, gemäß fortschreitender Forschung, einen immer größer werdenden Stellenwert in der Betrachtung der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen ein. Eine Erhaltung der ATP-Produktion, der Proteinqualitätskontrollmechanismen sowie der mitochondrialen Dynamik rückt demnach immer mehr in den Fokus zur Aufschlüsselung von Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer-Demenz oder amyotropher Lateralsklerose. Die proteolytische Beziehung zwischen YME1L1, OPA1 und OMA1 kann für weitere Erkenntnisse in der Fusionsregulation von großer Wichtigkeit sein. Aber auch die Rolle des YME1L1 bezüglich der Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membranen und der Umsetzung PRELID1 muss eingehender untersucht werden. Ein potentieller Einfluss von

YME1L1^{R149W} auf den Lipidhaushalt und damit verbundener Membranveränderungen kann über die Entstehung des Phänotyps der Patienten mehr Erkenntnisse bringen.

Mitochondriopathien, als Erkrankungen mit einem höchst heterogenen Symptomspektrum sind oftmals schwer zu diagnostizieren. Sie stehen stellvertretend für viele Erkrankungen, bei welchen genetische und molekularbiologische Untersuchungen gezieltere und schnellere Diagnosen ermöglichen können. Für die Patienten stellt diese fachübergreifende Analyse eine Möglichkeit für eine Ursachenaufklärung und eine gezieltere symptomale Therapie dar. Für die molekularbiologische Forschung ermöglicht sie neue Ansätze zur Aufklärung pathologischer Mechanismen und Zusammenhänge. In diesem spezifischen Fall der YME1L1-Mitochondriopathie werden neue Erkenntnisse für die Erhaltung der mitochondrialen Funktion gewonnen. Die zunehmende Anwendung von Methoden der Next-Generation-Sequenzierung auch in der klinischen Diagnostik wird zu einem weiteren rasanten Anstieg im Wissen um neue krankheitsassoziierte Gene führen. Die ganzheitliche Betrachtung von Erkrankungen auf allen Ebenen des Organismus stellt dabei die größte Herausforderung dar.

7 Literaturverzeichnis

- Aigner, A., T. Arndt, S. Bade, T. Bopp, U. Dechert, A. Frey, H. Gorris, J. Hermanns, M. Jansohn, M. Klein, S. Kneitz, C. Krettler, M. Lichtinger, G. Moeckel, C. Mülhardt, A. Petersen, C. Reinhart, C. Rió Bártulos, N. Röckendorf, S. Rothhämel, H. Schmidt, M. Schröder, M. Teifel, H. Tappe, K. Walter, and S. Wolf. 2012. *Gentechnische Methoden; Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Seitenzahl: 660.5: 5. Seite(n): 135.
- Aldridge, J.E., T. Horibe, and N.J. Hoogenraad. 2007. Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One*. 2: 2. Seite(n): e874.
- Anand, R., T. Langer, and M.J. Baker. 2013. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1833: 1833. Seite(n): 195-204.
- Anand, R., T. Wai, M.J. Baker, N. Kladt, A.C. Schauss, E. Rugarli, and T. Langer. 2014. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of cell biology*. 204: 204. Seite(n): 919-929.
- Arduino, D.M., A.R. Esteves, and S.M. Cardoso. 2011. Mitochondrial fusion/fission, transport and autophagy in Parkinson's disease: when mitochondria get nasty. *Parkinsons Dis*. 2011: 2011. Seite(n): 767230.
- Arnold, I., and T. Langer. 2002. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1592: 1592. Seite(n): 89-96.
- Arretz, M., H. Schneider, U. Wienhues, and W. Neupert. 1991. Processing of mitochondrial precursor proteins. *Biomed Biochim Acta*. 50: 50. Seite(n): 403-412.
- Baker, M.J., P.A. Lampe, D. Stojanovski, A. Korwitz, R. Anand, T. Tatsuta, and T. Langer. 2014a. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J*. 33: 33. Seite(n): 578-593.
- Baker, M.J., V.P. Mooga, B. Guiard, T. Langer, M.T. Ryan, and D. Stojanovski. 2012. Impaired folding of the mitochondrial small TIM chaperones induces clearance by the i-AAA protease. *Journal of molecular biology*. 424: 424. Seite(n): 227-239.
- Baker, M.J., C.S. Palmer, and D. Stojanovski. 2014b. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br J Pharmacol*. 171: 171. Seite(n): 1870-1889.
- Berlit, P. 2014. *Basiswissen Neurologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Seitenzahl: 431.6: 6. Seite(n): 51.
- Bohovych, I., S.S. Chan, and O. Khalimonchuk. 2015. Mitochondrial protein quality control: the mechanisms guarding mitochondrial health. *Antioxid Redox Signal*. 22: 22. Seite(n): 977-994.
- Bourgeois, J.M., and M.A. Tarnopolsky. 2004. Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders. *Mitochondrion*. 4: 4. Seite(n): 441-452.
- Cai, J., J. Yang, and D.P. Jones. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1366: 1366. Seite(n): 139-149.
- Calvo, S.E., and V.K. Mootha. 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 11: 11. Seite(n): 25-44.

- Campbell, C.L., N. Tanaka, K.H. White, and P.E. Thorsness. 1994. Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol Biol Cell*. 5: 5. Seite(n): 899-905.
- Chan, D.C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 125: 125. Seite(n): 1241-1252.
- Chen, H., and D.C. Chan. 2009. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Human molecular genetics*. 18: 18. Seite(n): R169-176.
- Chen, J.X., and S.D. Yan. 2007. Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis*. 12: 12. Seite(n): 177-184.
- Claros, M.G., and P. Vincens. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*. 241: 241. Seite(n): 779-786.
- Coppola, M., A. Pizzigoni, S. Banfi, M.T. Bassi, G. Casari, and B. Incerti. 2000. Identification and characterization of YME1L1, a novel paraplegin-related gene. *Genomics*. 66: 66. Seite(n): 48-54.
- Corydon, T.J., M. Wilsbech, C. Jespersgaard, B.S. Andresen, A.D. Borglum, S. Pedersen, L. Bolund, N. Gregersen, and P. Bross. 2000. Human and mouse mitochondrial orthologs of bacterial ClpX. *Mamm Genome*. 11: 11. Seite(n): 899-905.
- Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelles, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C.P. Hamel. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*. 26: 26. Seite(n): 207-210.
- Deschauer, M., K. Eger, B. Jordan, M. Kornhuber, T. Kraya, and T.J. Müller. 2014. *Muskelerkrankungen*. Verlagsgruppe Georg Thieme, Stuttgart, New York, Delhi, Rio Seitenzahl: 392.4: 4. Seite(n): 275-276.
- Di Bella, D., F. Lazzaro, A. Brusco, M. Plumari, G. Battaglia, A. Pastore, A. Finardi, C. Cagnoli, F. Tempia, M. Frontali, L. Veneziano, T. Sacco, E. Boda, A. Brussino, F. Bonn, B. Castellotti, S. Baratta, C. Mariotti, C. Gellera, V. Fracasso, S. Magri, T. Langer, P. Plevani, S. Di Donato, M. Muzi-Falconi, and F. Taroni. 2010. Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet*. 42: 42. Seite(n): 313-321.
- Dumont, M.E., T.S. Cardillo, M.K. Hayes, and F. Sherman. 1991. Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 11: 11. Seite(n): 5487-5496.
- Eisenberg-Bord, M., and M. Schuldiner. 2016. Ground control to major TOM: mitochondria-nucleus communication. *FEBS J*. Seite(n).
- El-Hattab, A.W., A.M. Adesina, J. Jones, and F. Scaglia. 2015. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab*. 116: 116. Seite(n): 4-12.
- Elleuch, N., C. Depienne, A. Benomar, A.M. Hernandez, X. Ferrer, B. Fontaine, D. Grid, C.M. Tallaksen, R. Zemmouri, G. Stevanin, A. Durr, and A. Brice.

2006. Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia. *Neurology*. 66: 66. Seite(n): 654-659.
- Finsterer, J. 2004. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol*. 11: 11. Seite(n): 163-186.
- Francis, B.R., and P.E. Thorsness. 2011. Hsp90 and mitochondrial proteases Yme1 and Yta10/12 participate in ATP synthase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion*. 11: 11. Seite(n): 587-600.
- Gakh, O., P. Cavadini, and G. Isaya. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta*. 1592: 1592. Seite(n): 63-77.
- Gerdes, F., T. Tatsuta, and T. Langer. 2012. Mitochondrial AAA proteases--towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim Biophys Acta*. 1823: 1823. Seite(n): 49-55.
- Graef, M., and T. Langer. 2006. Substrate specific consequences of central pore mutations in the i-AAA protease Yme1 on substrate engagement. *Journal of structural biology*. 156: 156. Seite(n): 101-108.
- Guillery, O., F. Malka, T. Landes, E. Guillou, C. Blackstone, A. Lombes, P. Belenguer, D. Arnoult, and M. Rojo. 2008. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell*. 100: 100. Seite(n): 315-325.
- Hanson, P.I., and S.W. Whiteheart. 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6: 6. Seite(n): 519-529.
- Harner, M., C. Korner, D. Walther, D. Mokranjac, J. Kaesmacher, U. Welsch, J. Griffith, M. Mann, F. Reggiori, and W. Neupert. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*. 30: 30. Seite(n): 4356-4370.
- Heo, J.M., N. Livnat-Levanon, E.B. Taylor, K.T. Jones, N. Dephoure, J. Ring, J. Xie, J.L. Brodsky, F. Madeo, S.P. Gygi, K. Ashrafi, M.H. Glickman, and J. Rutter. 2010. A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Molecular cell*. 40: 40. Seite(n): 465-480.
- Herrmann, J.M., and W. Neupert. 2000. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol*. 3: 3. Seite(n): 210-214.
- Horbay, R., and R. Bilyy. 2016. Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis*. Seite(n).
- Hübner, C., A.M. Kaindl, and M. Schülke. 2013. Pädiatrie. In *Pädiatrie*. 4: Vol. 4. Seite(n): 281. P.C. Speer and M. Gahr, editors. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Ishihara, N., Y. Fujita, T. Oka, and K. Mihara. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J*. 25: 25. Seite(n): 2966-2977.
- Issa, L., N. Kraemer, C.H. Rickert, M. Sifringer, O. Ninnemann, G. Stoltenburg-Didinger, and A.M. Kaindl. 2013. CDK5RAP2 expression during murine and human brain development correlates with pathology in primary autosomal recessive microcephaly. *Cereb Cortex*. 23: 23. Seite(n): 2245-2260.
- Ivanova, N., A. Lofgren, I. Tournev, R. Rousev, A. Andreeva, A. Jordanova, V. Georgieva, T. Deconinck, V. Timmerman, I. Kremensky, P. De Jonghe, and V. Mitev. 2006. Spastin gene mutations in Bulgarian patients with hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet*. 70: 70. Seite(n): 490-495.

- Iyer, L.M., D.D. Leipe, E.V. Koonin, and L. Aravind. 2004. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of structural biology*. 146: 146. Seite(n): 11-31.
- Janssen, A.J., J.A. Smeitink, and L.P. van den Heuvel. 2003. Some practical aspects of providing a diagnostic service for respiratory chain defects. *Annals of clinical biochemistry*. 40: 40. Seite(n): 3-8.
- Janssen, A.J., F.J. Trijbels, R.C. Sengers, J.A. Smeitink, L.P. van den Heuvel, L.T. Wintjes, B.J. Stoltenborg-Hogenkamp, and R.J. Rodenburg. 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clinical chemistry*. 53: 53. Seite(n): 729-734.
- Janssen, A.J., F.J. Trijbels, R.C. Sengers, L.T. Wintjes, W. Ruitenbeek, J.A. Smeitink, E. Morava, B.G. van Engelen, L.P. van den Heuvel, and R.J. Rodenburg. 2006. Measurement of the energy-generating capacity of human muscle mitochondria: diagnostic procedure and application to human pathology. *Clinical chemistry*. 52: 52. Seite(n): 860-871.
- Juhola, M.K., Z.H. Shah, L.A. Grivell, and H.T. Jacobs. 2000. The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett*. 481: 481. Seite(n): 91-95.
- Karp, G. 2005. *Molekulare Zellbiologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Seitenzahl: 1043.1: 1. Seite(n): 233-238, 242-247.
- Klug, W.S., M.R. Cummings, C.A. Spencer, and M. Thomm. 2007. *Genetik*. Pearson Studium München ; Boston, Mass. [u.a.]. Seitenzahl: 1066.8: 8. Seite(n): 517-518.
- Knott, A.B., G. Perkins, R. Schwarzenbacher, and E. Bossy-Wetzel. 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 9: 9. Seite(n): 505-518.
- Konig, T., S.E. Troder, K. Bakka, A. Korwitz, R. Richter-Dennerlein, P.A. Lampe, M. Patron, M. Muhlmeister, S. Guerrero-Castillo, U. Brandt, T. Decker, I. Lauria, A. Paggio, R. Rizzuto, E.I. Rugarli, D. De Stefani, and T. Langer. 2016. The m-AAA Protease Associated with Neurodegeneration Limits MCU Activity in Mitochondria. *Molecular cell*. 64: 64. Seite(n): 148-162.
- Koppen, M., and T. Langer. 2007. Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 42: 42. Seite(n): 221-242.
- Kovermann, P., K.N. Truscott, B. Guiard, P. Rehling, N.B. Sepuri, H. Muller, R.E. Jensen, R. Wagner, and N. Pfanner. 2002. Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Molecular cell*. 9: 9. Seite(n): 363-373.
- Langer, T. 2000. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends in biochemical sciences*. 25: 25. Seite(n): 247-251.
- Leonhard, K., B. Guiard, G. Pellicchia, A. Tzagoloff, W. Neupert, and T. Langer. 2000. Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Molecular cell*. 5: 5. Seite(n): 629-638.
- Leonhard, K., J.M. Herrmann, R.A. Stuart, G. Mannhaupt, W. Neupert, and T. Langer. 1996. AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation

- of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* 15: 15. Seite(n): 4218-4229.
- Leonhard, K., A. Stiegler, W. Neupert, and T. Langer. 1999. Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature.* 398: 398. Seite(n): 348-351.
- Löffler, G., and J. Schölmerich. 2008. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Seitenzahl: 527.7: 7. Seite(n): 170-171.
- MacVicar, T., and T. Langer. 2016. OPA1 processing in cell death and disease - the long and short of it. *J Cell Sci.* 129: 129. Seite(n): 2297-2306.
- Martin, L.J. 2006. Mitochondriopathy in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65: 65. Seite(n): 1103-1110.
- Martinelli, P., and E.I. Rugarli. 2010. Emerging roles of mitochondrial proteases in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1797: 1797. Seite(n): 1-10.
- Mokranjac, D., and W. Neupert. 2008. Energetics of protein translocation into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1777: 1777. Seite(n): 758-762.
- Mossmann, D., C. Meisinger, and F.N. Vogtle. 2012. Processing of mitochondrial presequences. *Biochim Biophys Acta.* 1819: 1819. Seite(n): 1098-1106.
- Najmabadi, H., H. Hu, M. Garshasbi, T. Zemojtel, S.S. Abedini, W. Chen, M. Hosseini, F. Behjati, S. Haas, P. Jamali, A. Zecha, M. Mohseni, L. Puttmann, L.N. Vahid, C. Jensen, L.A. Moheb, M. Bienek, F. Larti, I. Mueller, R. Weissmann, H. Darvish, K. Wrogemann, V. Hadavi, B. Lipkowitz, S. Esmaeeli-Nieh, D. Wiczorek, R. Kariminejad, S.G. Firouzabadi, M. Cohen, Z. Fattahi, I. Rost, F. Mojahedi, C. Hertzberg, A. Dehghan, A. Rajab, M.J. Banavandi, J. Hoffer, M. Falah, L. Musante, V. Kalscheuer, R. Ullmann, A.W. Kuss, A. Tzschach, K. Kahrizi, and H.H. Ropers. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 478: 478. Seite(n): 57-63.
- Nakada, K., K. Inoue, T. Ono, K. Isobe, A. Ogura, Y.I. Goto, I. Nonaka, and J.I. Hayashi. 2001. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med.* 7: 7. Seite(n): 934-940.
- Nakai, T., T. Yasuhara, Y. Fujiki, and A. Ohashi. 1995. Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria. *Molecular and cellular biology.* 15: 15. Seite(n): 4441-4452.
- Ni, H.-M., J.A. Williams, and W.-X. Ding. 2015. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology.* 4: 4. Seite(n): 6-13.
- Nolden, M., S. Ehses, M. Koppen, A. Bernacchia, E.I. Rugarli, and T. Langer. 2005. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell.* 123: 123. Seite(n): 277-289.
- Olichon, A., E. Guillou, C. Delettre, T. Landes, L. Arnaune-Pelloquin, L.J. Emorine, V. Mills, M. Daloyau, C. Hamel, P. Amati-Bonneau, D. Bonneau, P. Reynier, G. Lenaers, and P. Belenguer. 2006. Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim Biophys Acta.* 1763: 1763. Seite(n): 500-509.
- Pearce, D.A. 1999. Hereditary spastic paraplegia: mitochondrial metalloproteases of yeast. *Hum Genet.* 104: 104. Seite(n): 443-448.

- Pearce, D.A., and F. Sherman. 1995. Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome c and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J Biol Chem.* 270: 270. Seite(n): 20879-20882.
- Potting, C., T. Tatsuta, T. König, M. Haag, T. Wai, M.J. Aaltonen, and T. Langer. 2013. TRIAP1/PRELI complexes prevent apoptosis by mediating intramitochondrial transport of phosphatidic acid. *Cell metabolism.* 18: 18. Seite(n): 287-295.
- Potting, C., C. Wilmes, T. Engmann, C. Osman, and T. Langer. 2010. Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J.* 29: 29. Seite(n): 2888-2898.
- Preuß, C., H.H. Goebel, J. Held, O. Wengert, F. Scheibe, K. Irlbacher, A. Koch, F.L. Heppner, and W. Stenzel. Immune-Mediated Necrotizing Myopathy Is Characterized by a Specific Th1-M1 Polarized Immune Profile. *The American Journal of Pathology.* 181: 181. Seite(n): 2161-2171.
- Quiros, P.M., T. Langer, and C. Lopez-Otin. 2015. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16: 16. Seite(n): 345-359.
- Quiros, P.M., A.J. Ramsay, and C. Lopez-Otin. 2013. New roles for OMA1 metalloprotease: From mitochondrial proteostasis to metabolic homeostasis. *Adipocyte.* 2: 2. Seite(n): 7-11.
- Rainbolt, T.K., J. Lebeau, C. Puchades, and R.L. Wiseman. 2016. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. *Cell Rep.* 14: 14. Seite(n): 2041-2049.
- Rainbolt, T.K., J.M. Saunders, and R.L. Wiseman. 2015. YME1L degradation reduces mitochondrial proteolytic capacity during oxidative stress. *EMBO Rep.* 16: 16. Seite(n): 97-106.
- Rainey, R.N., J.D. Glavin, H.W. Chen, S.W. French, M.A. Teitell, and C.M. Koehler. 2006. A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease *Yme1*: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space. *Molecular and cellular biology.* 26: 26. Seite(n): 8488-8497.
- Rampelt, H., R.M. Zerbes, M. van der Laan, and N. Pfanner. 2016. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochim Biophys Acta.* Seite(n).
- Rehling, P., N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour. *Journal of molecular biology.* 326: 326. Seite(n): 639-657.
- Rehm, H., and T. Letzel. 2016. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag. Seitenzahl: 396.7: 7. Seite(n): 2, 8.
- Sagan, L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 14: 14. Seite(n): 255-274.
- Sauer, R.T., and T.A. Baker. 2011. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu Rev Biochem.* 80: 80. Seite(n): 587-612.
- Schimper, A.F. 1883. Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper, *Botanische Zeitung.* 41, Nr. 7, Sp. 105-120, 126-131 und 137-160. Seiten.

- Schreiner, B., H. Westerburg, I. Forne, A. Imhof, W. Neupert, and D. Mokranjac. 2012. Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell*. 23: 23. Seite(n): 4335-4346.
- Schwartz, M., and J. Vissing. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 347: 347. Seite(n): 576-580.
- Shah, Z.H., G.A. Hakkaart, B. Arku, L. de Jong, H. van der Spek, L.A. Grivell, and H.T. Jacobs. 2000. The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett*. 478: 478. Seite(n): 267-270.
- Smeitink, J., R. Sengers, F. Trijbels, and L. van den Heuvel. 2001. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 33: 33. Seite(n): 259-266.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150: 150. Seite(n): 76-85.
- Soto, C. 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 4: 4. Seite(n): 49-60.
- Sperl, W., H. Prokisch, D. Karall, J.A. Mayr, and P. Freisinger. 2011. Mitochondrial diseases. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 159: 159. Seite(n): 848.
- Stachowiak, O., M. Dolder, T. Wallimann, and C. Richter. 1998. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem*. 273: 273. Seite(n): 16694-16699.
- Stenzel, W., C. Preusse, Y. Allenbach, D. Pehl, R. Junckerstorff, F.L. Heppner, K. Nolte, E. Aronica, V. Kana, E. Rushing, U. Schneider, K.G. Claeys, O. Benveniste, J. Weis, and H.H. Goebel. 2015. Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology*. 84: 84. Seite(n): 1346-1354.
- Stiburek, L., J. Cesnekova, O. Kostkova, D. Fornuskova, K. Vinsova, L. Wenchich, J. Houstek, and J. Zeman. 2012. YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 23: 23. Seite(n): 1010-1023.
- Stojanovski, D., M. Bohnert, N. Pfanner, and M. van der Laan. 2012. Mechanisms of protein sorting in mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4: 4. Seite(n).
- Suzuki, C.K., K. Suda, N. Wang, and G. Schatz. 1994. Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science*. 264: 264. Seite(n): 891.
- Taylor, J.M., R. Illmensee, and J. Summers. 1976. Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 442: 442. Seite(n): 324-330.
- Taylor, R.W., M.T. McDonnell, E.L. Blakely, P.F. Chinnery, G.A. Taylor, N. Howell, M. Zeviani, E. Briem, F. Carrara, and D.M. Turnbull. 2003. Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol*. 54: 54. Seite(n): 521-524.

- Teixeira, P.F., and E. Glaser. 2013. Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*. 1833: 1833. Seite(n): 360-370.
- Thorsness, P.E., and T.D. Fox. 1993. Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics*. 134: 134. Seite(n): 21-28.
- Thorsness, P.E., K.H. White, and T.D. Fox. 1993. Inactivation of YME1, a member of the ftsH-SEC18-PAS1-CDC48 family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 13: 13. Seite(n): 5418-5426.
- Vogel, R.O., R.J. Janssen, C. Ugalde, M. Grovenstein, R.J. Huijbens, H.J. Visch, L.P. van den Heuvel, P.H. Willems, M. Zeviani, J.A. Smeitink, and L.G. Nijtmans. 2005. Human mitochondrial complex I assembly is mediated by NDUFAF1. *FEBS J*. 272: 272. Seite(n): 5317-5326.
- Wai, T., J. Garcia-Prieto, M.J. Baker, C. Merkwirth, P. Benit, P. Rustin, F.J. Ruperez, C. Barbas, B. Ibanez, and T. Langer. 2015. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*. 350: 350. Seite(n): aad0116.
- Wai, T., and T. Langer. 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 27: 27. Seite(n): 105-117.
- Wai, T., S. Saita, H. Nolte, S. Muller, T. Konig, R. Richter-Dennerlein, H.G. Sprenger, J. Madrenas, M. Muhlmeister, U. Brandt, M. Kruger, and T. Langer. 2016. The membrane scaffold SLP2 anchors a proteolytic hub in mitochondria containing PARL and the i-AAA protease YME1L. *EMBO Rep*. 17: 17. Seite(n): 1844-1856.
- Wallace, D.C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 283: 283. Seite(n): 1482-1488.
- Wallace, D.C. 2001. Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 7: 7. Seite(n): 158-166.
- Wallace, D.C. 2010. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*. 51: 51. Seite(n): 440-450.
- Wang, H., P.J. Lim, M. Karbowski, and M.J. Monteiro. 2009. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Human molecular genetics*. 18: 18. Seite(n): 737-752.
- Wang, N., S. Gottesman, M.C. Willingham, M.M. Gottesman, and M.R. Maurizi. 1993. A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 90. Seite(n): 11247-11251.
- Warnecke, T., T. Duning, A. Schwan, H. Lohmann, J.T. Epplen, and P. Young. 2007. A novel form of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia caused by a new SPG7 mutation. *Neurology*. 69: 69. Seite(n): 368-375.
- Weber, E.R., T. Hanekamp, and P.E. Thorsness. 1996. Biochemical and functional analysis of the YME1 gene product, an ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 7: 7. Seite(n): 307-317.
- Weckbecker, D., S. Longen, J. Riemer, and J.M. Herrmann. 2012. Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria. *EMBO J*. 31: 31. Seite(n): 4348-4358.

- Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 175: 175. Seite(n): 231-237.
- Yao, J., and E.A. Shoubridge. 1999. Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Human molecular genetics.* 8: 8. Seite(n): 2541-2549.

8 Anhang

8.1 Datenbank der Whole-Exom-Sequenzierungsergebnisse

Die Rohdaten der Whole-Exom-Sequenzierung für alle Patienten kann mit der folgenden Eintragsnummer #SRP073309 im Sequence Reads Archive (SRA) abgerufen werden.

8.2 Mutagenese der N-terminalen Arginine des YME1L1-Proteins

Zur Untersuchung des MPP-abhängigen Reifungsprozesses an YME1L1 wurden alle Arginin-Positionen innerhalb der N-terminalen Proteinsequenz gezielt mutiert. Hierbei wurden die konservierten Bereiche der mitochondrialen Erkennungssequenz und der Transmembrandomäne miteinbezogen.

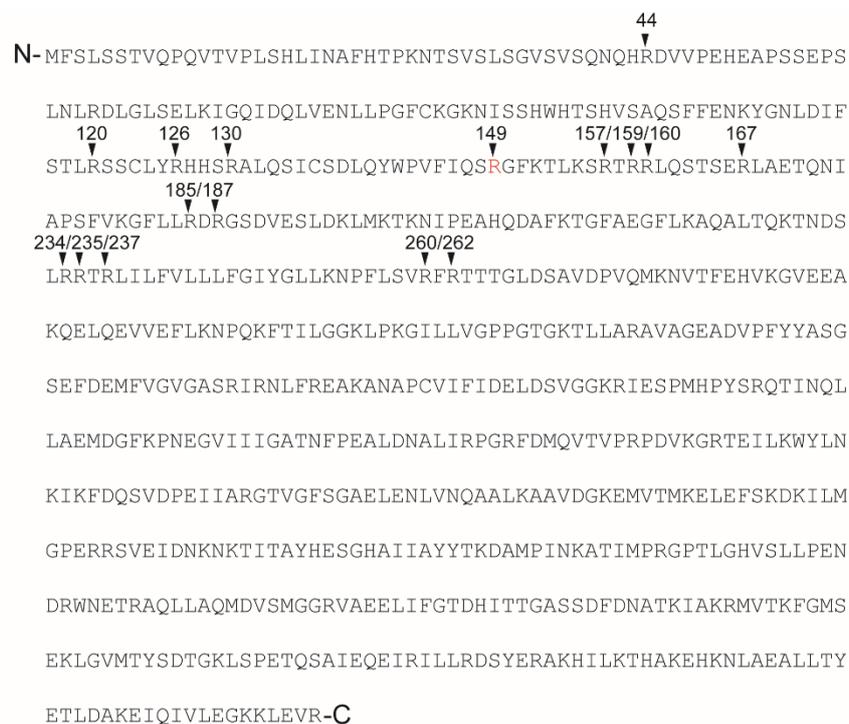


Abbildung 21: Darstellung der mutierten Arginin-Positionen des YME1L1-Protein für das MPP-Assay. Übersicht der mutierten Arginine der N-terminalen Region, einschließlich der mitochondrialen Erkennungssequenz und der Transmembrandomäne, welche im Rahmen des MPP-Assays ausgewählt wurden. Die Position des, vom Aminosäurewechsel betroffenen Arginin im Patientenprotein, ist rot markiert (N; Amino-Terminus; C, Carboxy-Terminus).

8.3 Bindungssequenz des YME1L1-Antikörpers

Zur Detektion des WT-YME1L1 und YME1L1^{R149W}-Proteins wurde in allen Experimenten der spezifische Antikörper Anti-YME1L1 der Firma Proteintech (Manchester, UK) verwendet. Die spezifische Bindungsstelle für diesen Antikörper liegt C-terminal und betrifft nicht den Ort des Aminosäureaustauschs im YME1L1^{R149W}.

```

MFSLSSTVQPQVTVPPLSHLINAFHTPKNTSVSLSGVSVSQNHQHRDVPPEHEAPSSEPS
LNLRDLGLSELKIGQIDQLVENLLPGFCKGKNISSHWHTSHVSAQSFFENKYGNLDIF
STLRSSCLYRHHSRALQSICSDLQYWPVFIQSRGFKTLKSRTRRLQSTSERLAETQNI
APSFVKGFLLRDRGSDVESLDKLMKTKNIPEAHQDAFKTGFAEGFLKAQALTQKTNDS
LRRTRLILFVLLLFGIYGLLKNPFLSVRFRTTGLDSAVDPVQMKNVTFEHVKGVEEA
KQELQEVVEFLKNPQKFTILGGKLPKGILLVGPPTGKTLARAVAGEADVPPYYASG
SEFDEMFGVVGASRIRNLFREAKANAPCVIFIDELDSVGGKRIESPMHPYSRQTINQL
LAEMDGFKPNEGVIIGATNFPEALDNALIRPGRFDMQVTVPRPDVKGRTEILKWYLN
KIKFDQSDPEI IARGTVGFGAELENLVNQAALKAADVGKEMVTMKELEFSKDKILM
GPERRSVEIDNKNKTITAYHESGHAI IAYYTKDAMPINKATIMPRGPTLGHVSLLEN
DRWNETRAQLLAQMDVSMGGRVAEELIFGTDHITGASSDFDNATKIARMTKFKGMS
EKLGVMYTSYDTGKLSPETQSAIEQEIRILLRDSYERAKHILKTHAKEHKNLAEALTY
ETLDAKEIQIVLEGKKLEVR

```

Abbildung 22: Die Bindungssequenz des YME1L1-Antikörpers. Die Bindungsstelle des anti-Human-YME1L1-Antikörper befindet sich C-terminal und betrifft nicht den Lokus der Mutation. Die Bindungssequenz ist rot markiert.

8.4 Digitales Zusatzmaterial

Das digitale Zusatzmaterial enthält dreidimensionale Animationen sowie live-cell-Mikroskopie-Aufnahmen von HAF der Patientin II.5 und einer gesunden Kontrolle. Das digitale Zusatzmaterial befindet sich auf der beiliegenden CD-ROM.

Digitales Zusatzmaterial 1: Dreidimensionale Darstellung und Animation des mitochondrialen Netzwerks in HAF der gesunden Kontrolle. MitoTracker DeepRed[®]-Mitochondrien; DAPI-Zellkern.

Digitales Zusatzmaterial 2: Dreidimensionale Darstellung und Animation des mitochondrialen Netzwerks in HAF der Patientin II.5. MitoTracker DeepRed[®]-Mitochondrien; DAPI-Zellkern.

Digitales Zusatzmaterial 3: Live-cell-Mikroskopie-Aufnahmen der mitochondrialen Dynamik in HAF der gesunden Kontrolle. MitoTracker Green®-Mitochondrien.

Digitales Zusatzmaterial 4: Live-cell-Mikroskopie-Aufnahmen der mitochondrialen Dynamik in HAF der Patientin II.5. MitoTracker Green®-Mitochondrien.

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Antikörper.	41
Tabelle 2: Primer und Sonden.	43
Tabelle 3: Liste der siRNAs für <i>OMA1</i> und <i>SLP2</i>	43
Tabelle 4: Temperaturabhängige Amplifikationsschritte der YME1L1-Genotypisierung.	50
Tabelle 5: Phänotyp der Indexpatienten.	71
Tabelle 6: Messwerte der Atmungskettenaktivität.	91

8.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Ultrastruktur eines Mitochondriums.	13
Abbildung 2: Die spezifische Zusammensetzung der AAA ⁺ -Domäne.	18
Abbildung 3: YME1L1 prozessiert OPA1 zur Erhaltung der mitochondrialen Fusion.	25
Abbildung 4: Klassifizierung des mitochondrialen Netzwerks.	57
Abbildung 5: Stammbaum der Indexfamilie und MRT-Aufnahmen der vier erkrankten Kinder.	68
Abbildung 6: Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung eines Muskelbiopsats der Patientin II.5.	72
Abbildung 7: Eine homozygote Missense-Mutation im <i>YME1L1</i> -Gen der Patienten.	73
Abbildung 8: Der Austausch an Position c.616C<T im <i>YME1L1</i> -Gen hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression.	74
Abbildung 9: YME1L1 und YME1L1 ^{R149W} sind mitochondrial lokalisiert.	76

Abbildung 10: YME1L1 ^{R149W} kann nicht durch MPP prozessiert werden.	78
Abbildung 11: YME1L1 ^{R149W} wird nicht durch das zytosolische Proteasom degradiert.....	80
Abbildung 12: YME1L1 ^{R149W} durchläuft eine autokatalytische Degradierung.	82
Abbildung 13: YME1L1 ^{R149W} kann zu einem proteolytischen Komplex assemblieren.....	84
Abbildung 14: YME1L1 ^{R149W} kann die Substrate PRELID1 und OPA1 partial prozessieren.	85
Abbildung 15: YME1L1 ^{R149W} erzeugt eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks.	87
Abbildung 16: Überexpression von YME1L1 ^{R149W} führt zur partialen Verbesserung der mitochondrialen Fragmentierung.	88
Abbildung 17: Patientenzellen mit YME1L1 ^{R149W} weisen Wachstums- und Proliferationsdefizite auf.	90
Abbildung 18: YME1L1 ^{R149W} hat keinen Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität der Patientenzellen.	92
Abbildung 19: YME1L1 ^{R149W} verursacht eine Reduktion mitochondrialer Kompartimentmarker.....	93
Abbildung 20: OMA1 Aktivität hat keinen Einfluss auf den YME1L1 ^{R149W} - basierten Phänotyp.	95
Abbildung 21: Darstellung der mutierten Arginin-Positionen des YME1L1- Protein für das MPP-Assay.	126
Abbildung 22: Die Bindungssequenz des YME1L1-Antikörpers.....	127

8.7 Abkürzungsverzeichnis

(-/-)	Knockout
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pairs / Basenpaare

cDNA	complementary (komplementäre) DNA
cPARP	cleaved Poly-Adenosindiphosphat-Ribose-Nuclease
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribnucleinacid / Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
Flp-In™-T-Rex	Flp-In-Recombination-Target-System
g	Gramm
h	Stunde(n)
HAF	Primäre, humane adulte Fibroblasten
HEK293T	Human embryonic kidney cells / humane embryonale Nierenzellen 293 (SV40 large T Antigen)
i-AAA ⁺	Intermembrane-ATPases-with-a-variety-of-cell-activities
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
m-AAA ⁺	Matrix-ATPases-with-a-variety-of-cell-activities
MAF	Immortalisierte, murine adulte kardiale Fibroblasten
MDa	Mega Dalton
MEF	Immortalisierte, murine embryonale Fibroblasten
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPP	Mitochondrial processing peptidase
mRNA	Messenger RNA
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale DNA
mtAAA ⁺	mitochondriale AAA ⁺ -Protease(n)
MTS	mitochondrial targeting sequence /

	mitochondriale Erkennungssequenz
mtUPR	Mitochondrial Unfolded Protein Response / mitochondriales Proteinqualitätskontrollsystem
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OMA1	Overlapping-with-the-m-AAA-protease-1-homolog
OPA1	Dynamin-like-GTPase-Optic-Atrophy-1
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffer saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PRELID1	Protein-of-relevant-evolutionary-and-lymphoid- interest-domain-containing-protein-1
RNA	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline / Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamid
TIM	Translocase-of -inner-mitochondrial-membrane / Translokase der inneren mitochondrialen Membran
TM	Transmembrandomäne
TOM	Translocase-of-outer-mitochondrial-membrane / Translokase der äußeren mitochondrialen Membran
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WT	Wildtyp
YME1L1	Yeast-mitochondrial-escape-1-like-1
YME1L1 ^{E381Q}	Proteolytisch inaktive YME1L1 Mutante
YME1L1 ^{R149W}	Mutantes YME1L1 der Patientin
YME1L1 ^{R149W/E381Q}	Doppelmutantes YME1L1

Publikationsverzeichnis

8.8 Originalarbeiten

Hartmann B.*, Wai T.*, Hu, H., MacVicar, T., Musante L., Fischer-Zirnsak B., Stenzel, W., Gräf, R., vd Heuvel L., Ropers, H-H., Wienker T., Hübner C., Langer T., Kaindl AM.: Homozygous YME1L1 Mutation Causes Mitochondriopathy with Optic Atrophy and Mitochondrial Network Fragmentation. Elife. 2016 Aug 6; 5. pii: e16078. doi: 10.7554/eLife.16078.

8.9 Vorträge

Bianca Hartmann, Timothy Wai, Hao Hu, Thomas MacVicar, Luciana Musante, Björn Fischer-Zirnsak, Werner Stenzel, Ralph Gräf, Lambert van den Heuvel, Hans-Hilger Ropers, Thomas F. Wienker, Christoph Hübner, Thomas Langer, Angela M. Kaindl

Homozygote YME1L1 Mutation verursacht eine neue Form der Mitochondriopathie mit Optikusatrophie und mitochondrialer Netzwerkfragmentierung

23. Kongress des wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V.

8.10 Poster

Bianca Hartmann, Hao Hu, Nadine Kraemer, Luciana Musante, Björn Fischer, Hans-Hilger Ropers, Thomas Wienker, Christoph Hübner, Angela M. Kaindl

Neue Form der Mitochondriopathie

87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, München

Bianca Hartmann, Hao Hu, Nadine Kraemer, Luciana Musante, Björn Fischer, Hans-Hilger Ropers, Thomas Wienker, Christoph Hübner, Angela M. Kaindl

Mutations in YME1L1 Cause Novel Infant-onset Mitochondriopathy

11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society

Bianca Hartmann, Tim Wai, Hao Hu, Nadine Kraemer, Luciana Musante, Björn Fischer, Werner Stenzel, Ralph Gräf, Lambert van den Heuvel, Hans-Hilger Ropers, Thomas Wienker, Christoph Hübner, Thomas Langer, Angela Kaindl

Mutations in YME1L1 Cause Novel Infant-onset Mitochondriopathy

Collaborative Research Center 665 International symposium 2014:
Developmental Disturbances in the Nervous System

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen, als die im Text aufgeführten Hilfsmittel und Referenzen verwendet. Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich wurde nicht beantragt.

Ort, Datum

Bianca Hartmann