

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Kinderneurologie und dem  
NeuroCure Clinical Research Center der  
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung neu identifizierter  
*NDUFB3*-Mutationen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eva-Maria Wohlgemuth (geb. Frisch)

aus Warendorf

Datum der Promotion: 04.06.2021

Die vorliegende Dissertation widme ich  
meinem großartigen Ehemann Felix,  
meinen wundervollen Kindern Rosa und Gero  
und meinen lieben Eltern Barbara und Gerhard.

## **Vorwort**

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits unmittelbar nach Vollendung der Forschungsarbeit im Labor unter dem Titel:

„Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing.“  
im Journal of Medical Genetics, 2012 publiziert.

Bei denen im Paper vorgestellten Individuen, mit diagnostiziertem Komplex I-Defekt, handelt es sich bei der Patienten-ID 50845 um die verwendeten Ergebnisse aus der folgenden Monographie.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Vorwort</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Die Atmungskette	11
1.2 Symptome und Diagnose von Mitochondriopathien	15
1.3 Fallvorstellung	18
1.4 Zielsetzung	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Rechtliche Rahmenbedingungen	23
2.2 Organismen, Zelllinien und Gewebeproben	23
2.3 Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Software	24
2.4 Studiendesign	28
2.5 Methoden	29
2.5.1 Kultivierung, Konservierung und Lagerung von E. coli und humanen Zelllinien	29
2.5.2 DNA- und RNA-Extraktionen	30
2.5.3 cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion	31
2.5.4 PCR-Nachweis von Hepatitis B, Hepatitis C und HIV	34
2.5.5 Klonierung und Selektion von Klonen für die Transduktion	35
2.5.6 Transduktion	37
2.5.7 Western Blot	40
2.5.8 Bestimmung der Enzymaktivität des Komplexes I der Atmungskette	43
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1 Nachweis von Mutationen im Gen NDUF3 einer Mitochondriopathiepatientin	49
3.2 Test der Fibroblasten auf Infektionen mit Hepatitis B, Hepatitis C und HIV	51
3.3 Messung der Enzymaktivität des Komplexes I vor der Transduktion	52
3.4 Klonierung der NDUF3 cDNA	53

3.5 Ergebnisse der Rescue-Experimente	56
3.5.1 Messung der Enzymaktivität des Komplexes I in den transduzierten Zelllinien	57
3.5.2 Proteinuntersuchungen mittels Western Blot	59
<b>4 Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>77</b>
Eidesstattliche Versicherung	79
Anteilerklärung an erfolgter Publikation	80
Lebenslauf	81
Publikationsliste	82
Danksagung	83

## Zusammenfassung

### Funktionelle Charakterisierung neu identifizierter *NDUFB3* Mutationen

Eva-Maria Wohlgemuth (geb. Frisch)

Mitochondriopathien sind Erkrankungen, die auf Störungen der Energiegewinnung der Mitochondrien beruhen. Der klinische Phänotyp ist heterogen. Sie treten meist als Multiorganerkrankungen auf, wobei hauptsächlich Organe mit hohem Energiebedarf betroffen sind. Mitochondriopathien sind genetische Erkrankungen und können entweder mitochondrial oder kernkodiert vererbt werden.

Aufgabe dieser Arbeit war die Charakterisierung compound heterozygoter Mutationen im Gen *NDUFB3* (missense- und nonsense-Mutation in Exon 2 bzw. 3) des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes I einer 2008 geborenen Patientin. Das Frühgeborene zeigte von Geburt an rezidivierende Laktatazidosen und wies eine Muskelhypotonie auf. Im Verlauf zeigte sich eine bilaterale Hörstörung, eine motorische Entwicklungsverzögerung und eine geistige Retardierung.

Im Muskelgewebe wurde eine reduzierte Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes I gemessen und die Diagnose einer Mitochondriopathie gestellt. Durch Exom-Sequenzierung wurden zwei seltene Varianten im Gen *NDUFB3* identifiziert, deren Pathogenität noch nicht bekannt war.

Nach Bestätigung der beiden *NDUFB3*-Varianten mittels Sequenzierung von Fibroblasten-DNA erfolgten Zell-Rescue-Experimente (lentivirale Transduktion) zur Überprüfung, ob die beiden Mutationen ursächlich für den Komplex I-Defekt sind. Durch Einschleusen einer *NDUFB3*-cDNA Expressionskassette (Wildtyp-Genotyp) in die Fibroblastenzelllinie der Patientin wurde versucht, die deutlich erniedrigte Komplex I Enzymaktivität wiederherzustellen. Zusätzlich wurden auch die beiden Allele mit der missense- bzw. nonsense-Mutation in die Patientenfibroblasten und eine Wildtyp-Kontrollzelllinie eingeschleust und die Enzymaktivität des Komplexes I der nicht transduzierten und aller transduzierten Zellen gemessen. Die Menge bestimmter Proteine des Komplexes I und III wurde mittels Western Blot quantifiziert, um die Auswirkung der Mutationen auf Proteinniveau zu untersuchen und mögliche Hinweise auf die Rolle des *NDUFB3*-Proteins während der Assemblierung zu erhalten.

In den nicht transduzierten Fibroblasten der Patientin betrug die Komplex I-Enzymaktivität nur 19 % im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Die Komplex I-Proteine

NDUFB3 und NDUFS3 waren in den Fibroblasten der Patientin nicht nachweisbar, NDUFB8 zeigte lediglich eine sehr schwache Bande im Western Blot. Das Einschleusen des Wildtyp-Allels rekonstituierte die Enzymaktivität des Komplexes I und die Menge aller untersuchter Proteine nahezu auf Normalniveau.

Die Transduktion der Allele in die Kontrollzelllinie ergab durch die alleinige Überexpression keine gesteigerte Komplex I-Enzymaktivität.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die in dieser Arbeit validierten compound heterozygoten Mutationen im Gen *NDUFB3* eine starke Reduktion der Komplex I-Enzymaktivität verursachen. Sie führen zudem zu einer Störung der Assemblierung des Komplexes I und sind als ursächlich für die schweren klinischen Symptome der Patientin anzusehen. Daher kann das Gen *NDUFB3* als neues Kandidatengen für die genetische Abklärung von Patienten mit Komplex I-Defekt in die Paneluntersuchung mit aufgenommen werden.

## Abstract

### Functional characterisation of new identified mutations in *NDUFB3*

Eva-Maria Wohlgemuth (geb. Frisch)

Mitochondriopathies are diseases that are based on disorders of mitochondrial energy production. The clinical phenotype is heterogeneous. They usually occur as multi-organ diseases; mainly organs with high energy requirements are affected. Mitochondrial diseases are genetic diseases and can be inherited either mitochondrially or nucleus encoded.

This study was based on the characterisation of compound heterozygous mutations of the gene *NDUFB3* (missense- and nonsense-mutation in exon 2 and 3) in the mitochondrial respiratory chain complex I from a patient born in 2008. The prematurely born infant showed recurrent acidosis from birth.

In the course of development the baby showed a bilateral auditory defect and a growth retardation. A muscle biopsy identified reduced enzyme activity of the complex I and therefore, a mitochondrial dysfunction was ascertained.

Via exome sequencing, two variants in the gene *NDUFB3* were identified whose pathogenicity had not yet been known. To verify the findings cell rescue experiments (lentiviral transduction) were performed in order to determine whether the two mutations were responsible for the complex I deficiency.

In order to restore normal complex I respiratory activity, wild type cDNA was expressed into the defective fibroblast cell line. In addition, lentiviral mediated expression of the isolated missense- and nonsense-mutations was performed and the complex I activity of the non-transduced and transduced cells were measured. Furthermore the expression of selected proteins from complex I and III were analysed with Western blot to obtain evidence of the role of the *NDUFB3*-protein during the assembly process within the respiratory chain.

The respiratory function of complex I found in naive cells of the patient measured 19 % while the proteins *NDUFB3* and *NDUFS3* were absent. The expression of wild type genotype of *NDUFB3* reconstituted the complex I activity to an almost normal level and both previously mentioned proteins were again verifiable. The complex I protein *NDUFB8* was weakly expressed in patient fibroblasts, but its presence also increased



after transduction. After the control NHDFneo had received all transgenes, there was no benefit detectable.

Taking everything into account the detected mutations in the gene *NDUFB3* cause a strong reduction of complex I activity and are considered to be the cause of the severe clinical symptoms of the patient.

Therefore, the gene *NDUFB3* can be included as a new candidate gene for the genetic evaluation of patients with complex I defect.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung. 1: Schematische Darstellung der Funktion der Atmungskette.
- Abbildung. 2: Struktur des Atmungskettenkomplexes I und seiner Untereinheiten.
- Abbildung. 3: Assemblierungsmodell des Atmungskettenkomplexes I.
- Abbildung. 4: Symptomheterogenität von Mitochondriopathien.
- Abbildung. 5: Möglicher Verlauf der Diagnosestellung einer Mitochondriopathie.
- Abbildung. 6: Sequenz der Exone 2 und 3 des Gens *NDUFB3* der Patientin.
- Abbildung. 7: Übersicht über den Verlauf der Studie.
- Abbildung. 8: Schematische Darstellung des Transduktionsvorgangs.
- Abbildung. 9: Querschnitt durch eine Kavität einer 96er-Mikrotiterplatte für die extrazelluläre Flussanalyse mit optischem Sensor.
- Abbildung. 10: Schema der Belegung der Mikrotiterplatten für die Messung der Enzymaktivität des Atmungskettenkomplexes I.
- Abbildung. 11: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte für Exon 2 und 3 des Gens *NDFUB3* aus der Zelllinie PatF58027.
- Abbildung. 12: Chromatogramme der Sequenzierung des Exons 2 von *NDUFB3*.
- Abbildung. 13: Chromatogramme der Sequenzierung des Exons 3 von *NDUFB3*.
- Abbildung. 14: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate aus der PatF58027-DNA für den HIV- und HBV-Infektionstest.
- Abbildung. 15: Relative Komplex I-Enzymaktivität in der Zelllinie der Patientin im Vergleich zur Wildtypkontrolle; Sauerstoffverbrauch in %.
- Abbildung. 16: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte von Exon 2 und 3 des *NDUFB3*-Gens aus der Kontrollzelllinie NHDFneo und aus PatF58027.
- Abbildung. 17: Das Agarosegel zeigt PCR-Amplifikate, welche die klonierten Fragmente nachweisen und die Orientierung der klonierten Fragmente feststellen.
- Abbildung. 18: Relative Komplex I-Enzymaktivität der nicht transduzierten Zelllinien Kontrolle NHDFneo und PatF58027 verglichen mit den transduzierten NHDFneo-Linien.
- Abbildung. 19: Relative Komplex I-Enzymaktivität der nicht transduzierten Zelllinien NHDFneo und PatF58027 verglichen mit den transduzierten PatF58027-Linien.

Abbildung. 20: Lokalisation der Zielproteine für die im Western Blot verwendeten Antikörper in der Atmungskette.

Abbildung. 21: Western Blot-Ergebnisse der PatF58027- und NHDFneo-Zelllinien vor und nach der Transduktion.

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle. 1: Ergebnisse der mitochondrialen Enzymaktivität in den Patientenfibroblasten.

Tabelle. 2: Liste der verwendeten Primer für die PCR und Größe der erwarteten Amplifikate.

Tabelle. 3: Liste der durchgeführten Transduktionen.

Tabelle. 4: Übersicht über die Ergebnisse der Messung der Komplex I-Enzymaktivität und der durchgeführten Western Blots.

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pair (Basenpaar)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Deoxyribonukleinsäure)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotidhydrid
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötale Kälberserum)
FCCP	Carbonyl-Cyanide4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HEK 293T-Zellen	Human Embryonic Kidney 293T-Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen)
HIV-1	Humanes Immunschwächevirus 1
kb	Kilobasenpaar
KI	Atmungskettenkomplex I
KIII	Atmungskettenkomplex III
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
ms	missense
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
mtRNA	mitochondrial ribonucleic acid
mU/UCOX	Millieinheiten (Einheit der atomaren Größe) pro Einheit Cytochrom Oxygenase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamid-adenindinukleotidhydrid
NDUFB3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 3
NHDFneo	Normal Human Dermal Fibroblasts, neonatal
ns	nonsense
PatF58027	Patientenfibroblasten
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
T	transduziert
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus-aquaticus</i> -Polymerase
TBST	Tris-buffered Saline und Tween™ 20
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer-Ribonukleinsäure)
Wt	Wildtyp

## 1 Einleitung

---

Mitochondrien bilden die bioenergetische Grundlage des Lebens. Das Wort Mitochondrium leitet sich aus dem Griechischen "Mitos" für Faden und "Chondron" für Korn ab. Es wurde 1840 zum ersten Mal schriftlich erwähnt.[1] Mitochondrien generieren Energie aus der Oxidation von Pyruvat und Fetten ( $\beta$ -Oxidation); sie modulieren die intrazelluläre Kalziumkonzentration und beeinflussen die zelluläre Apoptose. Sie besitzen ein eigenes Genom mit einem Teil der für die Vervielfältigung notwendigen Gene für die Transkription und Translation.[2] Pro Mitochondrium gibt es 2 – 10 ringförmige DNA-Moleküle, ihre Gene besitzen keine Introns. Mitochondrien werden über die Eizelle vererbt und sind somit maternaler Herkunft. Väterliche Mitochondrien werden von der befruchteten Eizelle aktiv vernichtet.[3] Eine genetisch bedingte Dysfunktion der Mitochondrien kann entweder durch eine Mutation in der mitochondrialen oder aber der nukleären DNA verursacht sein.

## 1.1 Die Atmungskette

In die innere mitochondriale Membran ist die Atmungskette eingebettet. Sie besteht aus fünf Multiproteinkomplexen (Komplex I bis Komplex V), die sich aus ca. 80 Untereinheiten zusammensetzen. Von den Untereinheiten werden 13 durch die mitochondriale DNA (mtDNA) und die restlichen durch die nukleäre DNA kodiert.[2] Die mtDNA enthält außerdem die genetischen Informationen für zwei mt-rRNAs und 22 mt-tRNAs.[4]

Die Atmungskette generiert mit Hilfe eines Protonengradienten Adenosintriphosphat (ATP). Katabole Stoffwechselprozesse im Zytoplasma wie die  $\beta$ -Oxidation und der Citratzyklus liefern die reduzierten Coenzyme Nicotinamidadenindinukleotidhydrid ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ) und Flavinadenin-dinukleotidhydrid ( $\text{FADH}_2$ ), die die Protonen an Komplex I (KI) und II abladen (vgl. Abbildung 1).

Eine Funktionsminderung der Atmungskette führt zu einer gesteigerten Glykolyse in der Zelle, um das nötige ATP zu generieren. Hierbei kommt es intrazellulär zu einem Anstieg von  $\text{NADH}_2$ , welches mit zunehmender Pyruvatkonzentration zu Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und Laktat reagiert. Steigende Blutlaktatwerte sind klinisch daher ein Indikator für eine mitochondriale Dysfunktion.

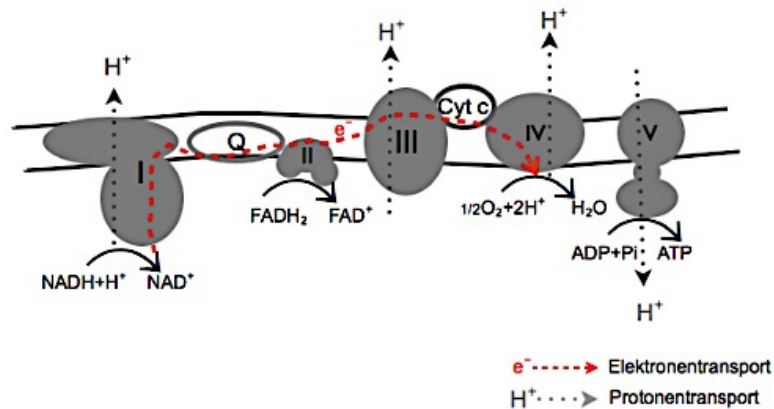


Abbildung. 1:

Schematische Darstellung der Funktion der Atmungskette. NADH+H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> laden ihre Protonen (H<sup>+</sup>) an KI und KII ab. KI pumpt diese durch die innere mitochondriale Membran. Die bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen bilden den elektrochemischen Gradienten (e<sup>-</sup>). Die Komplexe I, III und IV bilden eine Elektronentransportkette. Zwischen KI und KIII werden die Elektronen über das im Membranspalt gelöste Coenzym Q10 (Q) weitergegeben. Von dort werden sie über das peripher angelagerte Cytochrom c (Cyt c) auf Komplex IV übertragen. Komplex IV reduziert mit Hilfe der Elektronen Sauerstoff zu Wasser. Durch die Protonen sinkt der pH-Wert im Intermembranraum und sie fließen durch den Kanal von Komplex V wie durch eine Turbine zurück in die Matrix. Dieser H<sup>+</sup>-Strom treibt die ATP-Synthese in Komplex V an.[5]

Der erste und größte Komplex der Atmungskette ist die NADH-Coenzym-Q-Oxidoreduktase. Der Komplex I besteht aus 45 Untereinheiten, 7 davon durch mtDNA und 38 durch nukleare DNAs kodiert. 14 dieser Untereinheiten gelten als „Kern-Untereinheiten“, verantwortlich für die enzymatischen Reaktionen des KI; die übrigen dienen möglicherweise zur Stabilisierung des Komplexes.[6] Zudem sind vom KI 15 nukleär kodierte Assemblierungsfaktoren bekannt.[7] Der Komplex ist L-förmig und wird in die vier Subkomplexe α, β, γ und λ unterteilt. Ein Teil des Komplexes ist in die innere mitochondriale Membran eingebettet und der andere ragt in die Matrix hinein.[2] Abbildung 2 zeigt ein Schema des KI.

Bis dato waren für alle 7 von der mtDNA kodierten Untereinheiten des KI und für 20 der 38 nukleär kodierten Proteine krankheitsverursachende Mutationen beschrieben worden.[8] Die Analyse von Patienten mit verifizierten Mutationen in einzelnen Untereinheiten oder Assemblierungsfaktoren des KI kann ein besseres Verständnis über Struktur, Funktion, Pathophysiologie und Ablauf der Assemblierung des Komplexes liefern.

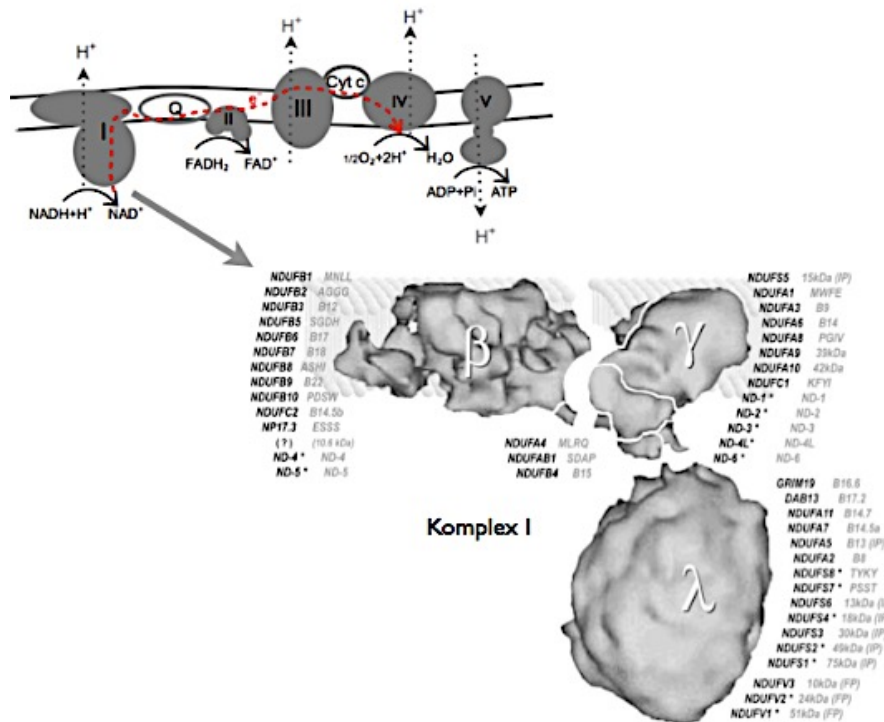


Abbildung. 2:

Struktur des Atmungskettenkomplexes I und seiner Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\lambda$ . Für jede Untereinheit sind die Namen der Proteine angegeben. (Schwarz: Name für *Homo sapiens*; Grau: Name für *Bos taurus*.)

Genehmigter Abdruck aus Koopman (2010), ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING 12/12, published by Mary Ann Liebert, Inc., New Rochelle, NY.

Das Assemblierungsmodell in Abbildung 3 zeigt die einzelnen Stadien der Bildung des KI und der bisher in den zeitlichen Entwicklungsverlauf eingeordneten Untereinheiten. Unter Mitwirkung von schon teilweise identifizierten Assemblierungsfaktoren setzt sich der KI im „Baukastenprinzip“ zusammen. Auf Grund der Masse von ca. 980 kDa, der großen Zahl an Untereinheiten sowie des bigenomischen Ursprungs ist der Assemblierungsprozess sehr komplex und schwierig zu erschließen.[9]



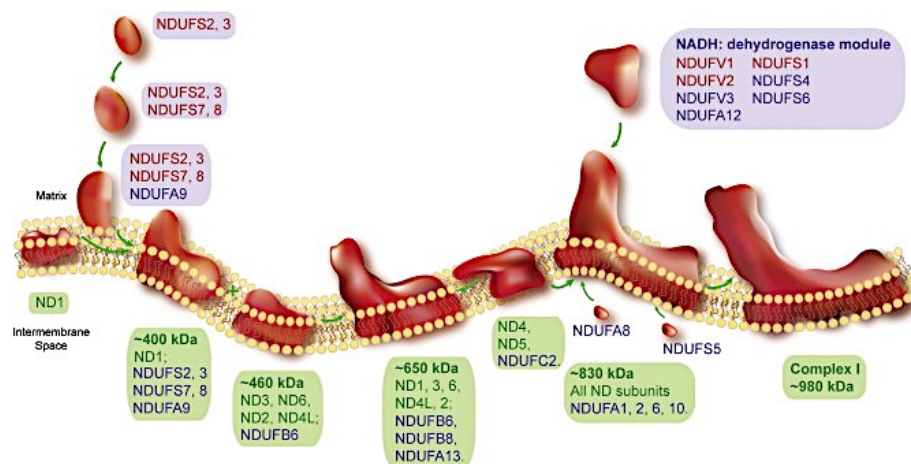


Abbildung. 3:

Assemblierungsmodell des Komplexes I. Die Genese beginnt mit der parallelen Formation von Untereinheit aus nukleär und mt-DNA kodierten Proteinen. Es schließen sich in einer festgelegten Reihenfolge weitere Proteine, sowie bereits in kleinere Zwischeneinheiten formierte Proteinkomplexe der bestehenden Einheit an. Der fertige KI hat eine Größe von ca. 980 kDa. Die Namen der Kernuntereinheiten sind in rot dargestellt, die der nukleär kodierten Untereinheiten in blau und die durch mt-DNA kodierten in grün.[9]

Reprinted from: Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease, 1817, Masakazu Mimaki, Xiaonan Wang, Matthew McKenzie, David R. Thorburn, Michael T. Ryan, p. 12, Copyright (2015) with permission from Elsevier.

Die Untereinheiten des KI sind kontinuierlicher oxidativer Schädigung ausgesetzt, da der Komplex untrennbar mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies verbunden ist. Dieteren *et al.* (2012) wiesen nach, dass durch den ständigen Austausch einiger Untereinheiten die Funktion des Komplexes aufrechterhalten wird.[10]

## 1.2 Symptome und Diagnose von Mitochondriopathien

Insgesamt sind derzeit über 250 krankheitsverursachende Mutationen für die Erkrankungsgruppe der Mitochondriopathien bekannt.[8] Wenn Symptome wie zum Beispiel erhöhte Blutlaktatwerte, zerebrale Anfälle, Spastik, muskuläre Hypotonie, respiratorische Insuffizienz und Wachstumsretardierung gemeinsam auftreten, liegt die Verdachtsdiagnose einer Fehlfunktion der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe nahe. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Symptomheterogenität von Mitochondriopathien.[2]

Multisystemcharakter der Mitochondriopathien

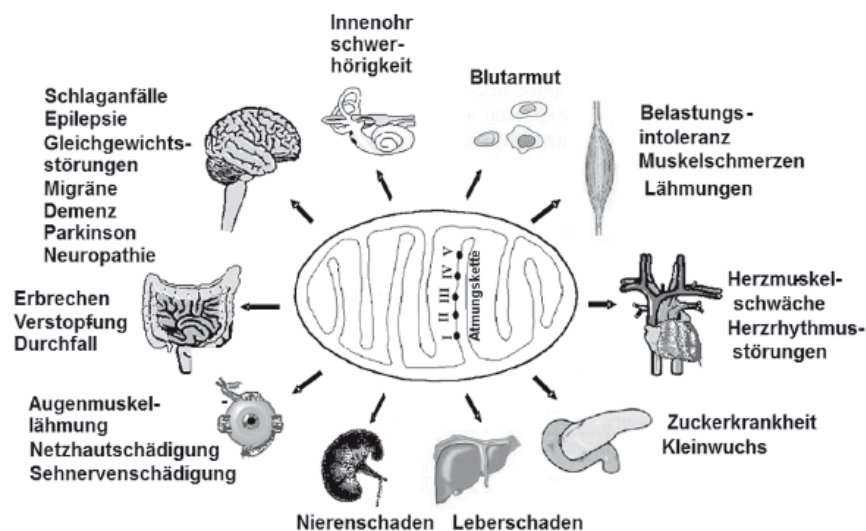


Abbildung. 4:

Symptomheterogenität von Mitochondriopathien.

Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Markus Deschauer, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Laut Thorburn *et al.* (2004) ist eine von 7634 Personen von einer Dysfunktion der Atmungskette betroffen, die in jeder Altersstufe symptomatisch werden kann.[11] Bei einem von 5.000 bis 10.000 Neugeborenen wird eine mitochondriale Dysfunktion diagnostiziert.[12] Die Erkrankung manifestiert sich meist in den ersten zwei Lebensjahren. Zuerst fällt ein Leistungsdefizit in den Geweben mit hohem Energiebedarf in Form von Muskelhypotonie, motorischen Entwicklungsdefiziten und

mentaler Retardierung auf. Auch Infekte, Stress und körperliche Belastung führen bei betroffenen Patienten zu einer deutlich stärkeren Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes als bei Gesunden. Klinisch kommt es gehäuft zu metabolischen Azidosen. Die betroffenen Kinder zeigen das höchst heterogene Symptombild, anhand dessen es meist nicht möglich ist, die Krankheitsursache gezielt der Fehlfunktion eines Atmungskettenkomplexes zuzuordnen.[13]

Auch bei vielen neurologischen Systemerkrankungen, die oft erst im späteren Lebensalter auftreten, ist eine abnehmende mitochondriale Funktion oder eine Störung der Atmungskettenaktivität nachgewiesen, so zum Beispiel bei der amyotrophen Lateralsklerose, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, bestimmten Formen von Hirntumoren, Epilepsie oder Psychosen.[14] Bei circa 40 % der betroffenen Patienten liegt eine Dysfunktion der Elektronentransportkette oder der ATP-Synthese vor, die entweder kombiniert mehrere Atmungskettenkomplexe betrifft (15 %) oder isoliert vorkommt. Ein frühes Manifestationsalter einer Mitochondriopathie scheint mit einem schwereren Verlauf und einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein.[15]

Unter allen Mitochondriopathien ist der KI mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 25 % betroffen.[16] Eine Mutation in den Genen des KI kann zur Entstehung eines ausgeprägten Energiemangels in der Zelle führen.

### Diagnose

Die genaue Diagnosestellung gelingt häufig nur über Umwege und kann für Patienten und Angehörige belastend sein. Abbildung 5 stellt beispielhaft mögliche Wege der Diagnosestellung einer Mitochondriopathie dar.[17]

Am Anfang steht eine detaillierte Familienanamnese. Stellt sich ein ausnahmslos mütterlicher Erbgang ohne männliche Transduktoren dar, ist primär von einem Defekt der mtDNA auszugehen.[18] Hinweise auf einen autosomal dominanten, autosomal rezessiven oder x-chromosomalen Erbgang würden auf eine Mutation nukleärer DNA zurückzuführen zu sein.[19]

Bis vor Kurzem wurde zunächst die Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe über eine Muskelbiopsie und anschließend über eine Fibroblastenzellanalyse bestimmt.[17]

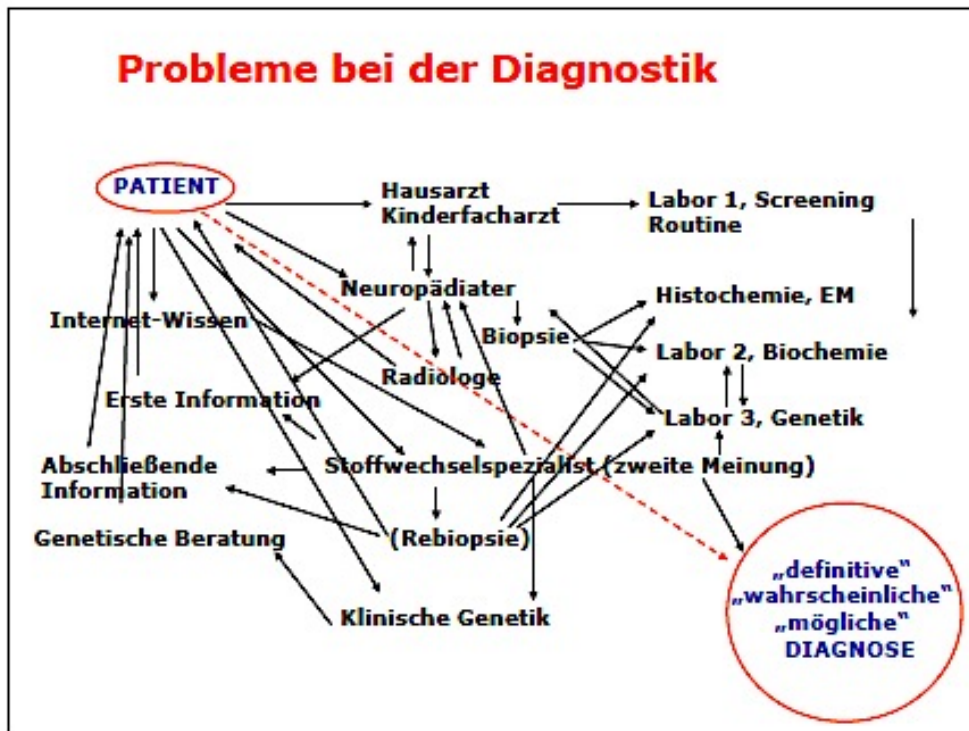


Abbildung. 5:

Möglicher Verlauf der Diagnosestellung einer Mitochondriopathie.[17] Bedingt durch das heterogene Symptombild der Betroffenen können multiple medizinische Fachgebiete in die Diagnosestellung involviert sein. Bei mangelnder Koordination kann dies zur verzögerten oder unbestätigten Diagnose führen.

Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Wolfgang Sperl, Paracelsus Medizinische Privatuniversität und der Max Schmidt-Römhild KG (Artikel: Diagnostik und Therapie von Mitochondriopathien)

Lag hier eine Reduktion der Enzymaktivität vor, wurden zunächst diejenigen Abschnitte der mitochondrialen DNA sequenziert, die bereits für das Auftreten von Mitochondriopathie verursachenden Mutationen bekannt waren. Erst bei fehlendem Nachweis einer verdächtigen Mutation folgte dann eine Exomsequenzierung. Immer häufiger erfolgt derzeit direkt eine Exomsequenzierung, um den ursächlichen Gendefekt zu finden. Für den Patienten bedeutet dies lediglich eine Blutentnahme zur Isolierung der DNA und nicht mehr primär eine deutlich invasivere Muskelbiopsie.

Unter Exomsequenzierung wird die Sequenzierung aller Exone eines Genoms verstanden. Dank neuer Sequenzierungsmethoden und Automatisierung, wie die Next-Generation-Sequenzierung (NGS), kann ein menschliches Genom in kurzer Zeit und vergleichsweise kostengünstig sequenziert werden.

Der Vergleich der gewonnenen Patientensequenzen mit einer humanen Standardsequenz ergibt durchschnittlich 10.000 Varianten in den proteinkodierenden Exonen.

In einem nächsten Schritt wird geprüft, ob und welche dieser Varianten als Ursache für eine Mitochondriopathie in Frage kommen. Dazu wird mithilfe bioinformatischer Programme wie "PolyPhen" oder MutationTaster (Schwarz et al, 2013) ein Abgleich mit den in den Datenbanken hinterlegten Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP)[20], der Human Gene Mutation Database (HGMD)[21] und dem Exome Aggregation Consortium Browser (ExAC) vorgenommen. Es verbleiben am Ende nur noch seltene Varianten unter denen nach Genen gesucht wird, die an der Kodierung der strukturellen Untereinheiten oder möglicher Assemblierungsfaktoren der Atmungskettenkomplexe beteiligt sind, oder seltene bi-allelische Varianten tragen.

Im Fall eines rezessiven Erbgangs müssen beide Allele eines Gens eine Variante tragen, was die potentiell ursächlichen Mutationen unter den Varianten deutlich einschränkt. Eine systematische Zusammenstellung seltener Genmutationen, die zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen können, sind in öffentlichen Mutations-Datenbanken wie ClinVar (nicht mitochondrien-spezifisch) oder MitoMap (speziell für mtDNA) oder in der internen Datenbank „EvaDB“ zu finden.

Zur funktionellen Verifizierung der gefundenen Mutationen dienen Zell-Rescue-Experimente. Dabei wird eine Wildtypkopie (Wt) des Gens mit Hilfe von Vektoren (z. B. Lentiviren) in die Patientenzelllinie eingeschleust (Transduktion) und in dieser anschließend die Atmungsaktivität getestet. Parallel dazu hilft die Untersuchung der Proteine der Atmungskettenkomplexe mittels Western Blot.

Das empfohlene Vorgehen zur Diagnosesicherung einer Mitochondriopathie ist unter anderem in der AWMF-Leitlinie zur Diagnostik und Therapieansätze bei Mitochondriopathien im Kindes- und Jugendalter beschrieben.[22] Die Auswertpipeline neu identifizierter Mutationen bei mitochondrialer Dysfunktion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „GENOMIT“ auch durch die Identifizierung dieser *NDUFB3*-Mutationen weiter etabliert.

### **1.3 Fallvorstellung**

Im Folgenden wird der Fall vorgestellt, welcher der Ausgangspunkt für die hier vorgestellte Studie war.

Bei einem 2008 geborenen Mädchen wurde eine Muskelhypotonie mit motorischer Entwicklungsverzögerung, eine angeborene bilaterale Hörstörung und im Verlauf eine

geistige Retardierung beschrieben. Das Kind kam in der 35. Schwangerschaftswoche mit 1820 g und reduziertem Allgemeinzustand zur Welt. Am zweiten Lebenstag zeigte sich eine Laktatazidose von 3,05 mmol/L (Referenzwert: 0,5 - 2,1 mmol/L).[23]

Die Eltern waren nicht blutsverwandt und hatten zwei gesunde Töchter und eine Totgeburt unbekanntes Geschlechts. Weitere Informationen über erkrankte Familienmitglieder/Verwandte waren nicht bekannt.

In einer cranialen MRT fiel eine Enzephalopathie mit fehlender Myelinisierung der weißen Substanz sowie eine frontale Hirnatrophie auf. 2009 wurde eine Skelettmuskelbiopsie durchgeführt und eine Fibroblastenzellprobe an das Clinical Genetics Center Nijmegen (Niederlande) gesendet. Die histologische Untersuchung wies einen erhöhten Fettgehalt im Muskelgewebe sowie formveränderte Mitochondrien nach. Die Messung der mitochondrialen Enzymaktivität ergab in den Fibroblasten eine deutlich reduzierte Aktivität des KI (Tabelle 1).

<b>Atmungskettenkomplex</b>	<b>Enzymaktivität</b>	<b>Referenzwerte</b>	<b>Einheit</b>
Komplex I	73	279 – 1076	mU/UCOX
Komplex II	782	375 – 2692	mU/UCOX
Komplex III	955	623 – 3524	mU/UCOX
Komplex II+III (Succ.: Cytochrom c Oxidoreduktase; SCC)	497	269 – 781	mU/UCOX
Komplex IV	630	288 – 954	mU/UCS
Komplex V (ATPase)	1140	373 – 2705	mU/UCOX

Tabelle. 1:

Ergebnisse der mitochondrialen Enzymaktivität in den Patientenfibroblasten.

Veröffentlichung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Richard Rodenburg, Clinical Genetics Center Nijmegen.

Um die Ursache der mitochondrialen Fehlfunktion zu finden, wurde zunächst eine klassische DNA-Sequenzierung der mtDNA nach Sanger durchgeführt. Hiermit konnte keine bereits bekannte Krankheitsmutation gefunden werden. Aufgrund der erhöhten Blutlaktatwerte wurde eine Sequenzierung der mitochondrialen Ribonukleinsäuregene und des nukleären Gens Pyruvat-Dehydrogenase-(Lipoamid)-a 1 (PDHA1) ange-

geschlossen, da eine Mutation im PDH-Komplex mit einem Pyruvatdehydrogenase-E1-alpha-Mangel oder einem Leigh-Syndrom einhergehen kann.[24] Doch ergab auch diese Sequenzierung keinen pathologischen Befund. Im Jahr 2011 wurde eine aus Blutzellen isolierte DNA-Probe der Patientin am Helmholtz Zentrum München exomsequenziert. Die Exomsequenzierung brachte 13.008 Varianten hervor, aus denen 13 Varianten herausgefiltert wurden, die potentielle Krankheitsgene betrafen. Im Gen *NDUFB3* (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3) fand man compound heterozygote Mutationen, die als potenziell pathogene Variante in Frage kam (vgl. die Sequenz in Abbildung 6). Das Gen kodiert eine Untereinheit des KI, welche Teil des intermembranösen  $\beta$ -Armes ist, und es liegt auf dem q-Arm des Chromosoms 2 (Lokalisation: 2q31.3). Bei den in Exon 2 und 3 gefundenen Mutationen handelt es sich um eine missense-Mutation (ms-Mutation) und eine nonsense-Mutation (ns-Mutation). Die ms-Mutation in Exon 2 bewirkt an Nukleotidposition 64 einen Austausch der Base Cytosin zu Thymin, so dass statt der Aminosäure Tryptophan ein Arginin eingebaut wird. Die ns-Mutation in Exon 3 führt zu einem Austausch des Guanins an Nukleotidposition 208 durch Thymin, wodurch ein Stoppcodon an Position 208 entsteht und die Translation abbricht.

Eine nachfolgende Genanalyse der Eltern ergab, dass beide Elternteile heterozygote Träger jeweils einer der Mutationen waren. Zum Zeitpunkt der Entdeckung waren dies die ersten beschriebenen compound heterozygoten Mutationen im *NDUFB3* Gen.

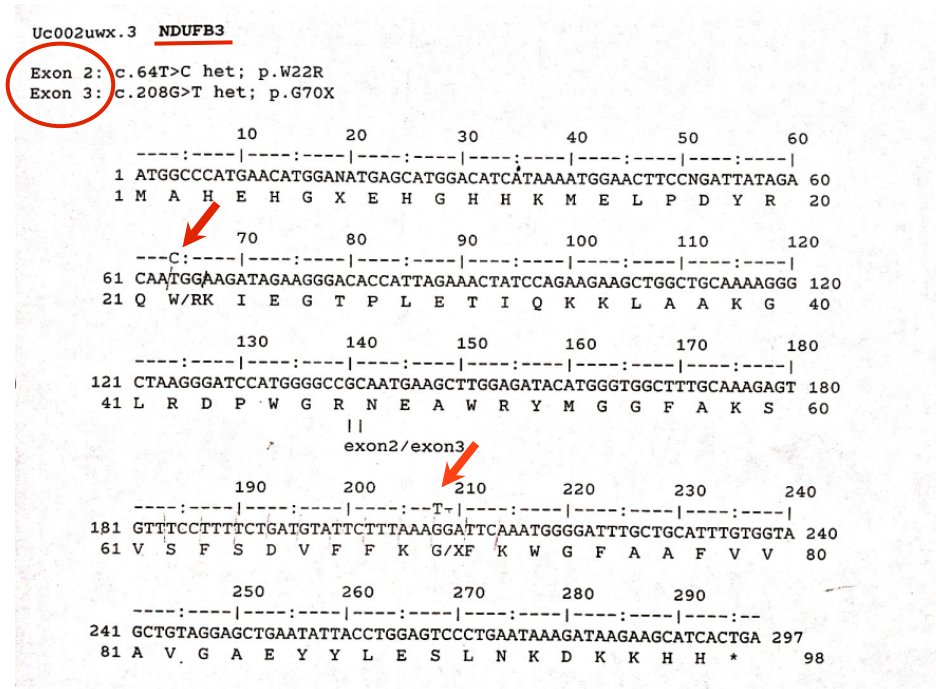


Abbildung. 6:  
 Sequenz der Exone 2 und 3 des Gens *NDUFB3* der Patientin. Die Pfeile kennzeichnen die im Text beschriebene ms- (c.64T>C het; p.W22R) und ns-Mutation (c.208G>T het; p.G70X).

## 1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung neu identifizierter *NDUFB3*-Mutationen, die als potentiell pathogene Varianten bei einer Patientin, bei der eine Mitochondriopathie und eine Defizienz des Atmungskettenkomplexes I gefunden wurden. Die durchgeführten Experimente beabsichtigten die molekulare Diagnose funktionell zu validieren.

Dazu sollte mittels lentiviralem Gentransfer von drei *NDUFB3* Allelen (Wildtyp-, ms- und ns-Allel) in die Patientenzelllinie die reduzierte Atmungsaktivität untersucht und beeinflusst werden. Die Enzymaktivität, speziell des Atmungskettenkomplexes I sollte anhand des Sauerstoffverbrauchs mittels extrazellulärer Flussanalyse (Seahorse-System Bioscience) gemessen werden. Zusätzlich sollte mittels Western Blots der Einfluss der Mutationen in den nicht transduzierten und transduzierten Zelllinien auf Proteinniveau untersucht werden.



## 2 Material und Methoden

---

## 2.1 Rechtliche Rahmenbedingungen

Die Untersuchung war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt worden; von allen Studienteilnehmern bzw. den Erziehungsberechtigten lagen schriftliche Einverständniserklärungen vor (vgl. dazu Haack *et al.* 2012).[25]

### Biologische Sicherheit

Die Anzucht und Kultivierung der Zelllinien und *E. coli*-Bakterien erfolgte im Labor in S1-Zellkulturräumen. Die Verwendung der Lentiviren zur Transduktion und die Kultivierung der transduzierten Zelllinien wurde in S2-Zellkulturräumen durchgeführt.

## 2.2 Organismen, Zelllinien und Gewebeproben

Für die Untersuchungen wurden folgende biologische Materialien verwendet:

<b>Organismus/Zelllinie</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<i>Escherichia coli</i> , Stamm Stb13™	Transformation mit dem Vektor p-Lenti6.3/V5- TOPO®	invitrogen™
HEK 293FT Zelllinie (humane embryonale Nieren-zellen)	Wirtszellen für Lentiviren	invitrogen™
PaF58027 Patientenfibroblasten (Haut)	Transduktionsexperimente	Charité Berlin, Klinik für Pädiatrie, Prof. Dr. M. Schülke- Gerstenfeld
NHDFneo (Normal Human Dermal Fibroblasts)	Kontrollzelllinie (Wildtyp) für die Transduktions- experimente	Lonza (Schweiz)

## 2.3 Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Software

Übliche Laborchemikalien, Standardpuffer, Medienkomponenten und Einwegmaterialien wurden von Sigma-Aldrich, Merck, invitrogen™ und über den Laborfachhandel bezogen. Im Folgenden sind unter Angabe der Bezugsquelle alle für die Experimente relevanten Reagenzien und Enzyme aufgelistet, sowie spezielle Nährmedien, Geräte und anderweitige Hilfsmittel.

### Nährmedien und Medienkomponenten:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) Base, pH 7,4	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose	invitrogen™
Gibco Standard FBS (Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher Scientific

### Chemikalien:

ATX Ponceau S red staining solution	Sigma-Aldrich
Carbonyl-Cyanide4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone (FCCP)	Sigma-Aldrich
Oligomycin	Sigma-Aldrich
Rotenon	Sigma-Aldrich
Uridine (powder, BioReagent)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	invitrogen™
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/mL)	Carl Roth

## Biochemikalien und Enzyme:

Ampicillin	Sigma-Aldrich®
Agarose LE GP	Biozym
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas
0,05 %-Trypsin-EDTA, phenol red	invitrogen™
Penstrep (Penicillin und Streptomycin) 5,000 U/mL und 5000 µg/mL	Gibco
Elektrochemilumineszenz (ECL) Western Blotting Substrate	Promega
dNTPs (2 mM)	Thermo Scientific
Thermo-Start Hotstart Taq DNA- Polymerase	Thermo Scientific
Platinum® Taq Polymerase High Fidelity (5 U/µL)	Thermo Scientific
Blotting-Grade Blocker (nonfat dry milk)	Bio-Rad Laboratories

## Antikörper:

CIII subunit Core 2	Mitosciences
NDUFA9	Mitosciences
NDUFB3	Sigma-Aldrich®
NDUFB8	Mitosciences
NDUFS1 (E20)	abcam®
NDUFS3	Mitosciences
Porin	abcam®
Amersham ECL Prime mouse IgG (Secondary-AB Western-Blot)	GE Healthcare

## Kits:

AllPrep DNA/RNA Mini (Extraktion von DNA/RNA aus menschlichen Zellen und Geweben)	Qiagen
BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 cycle Sequencing-Kit	Applied Biosystems
CyQuant Cell Prolifera Assay-Kit (Zellzahlbestimmung)	Life Technologies
First Strand cDNA Synthesis-Kit	Thermo Fisher Scientific
HCV 240/440 IC-Kit (Nachweis Hepatitis C)	Sacace Biotechnologies
p-Lenti6.3/V5-TOPO <sup>®</sup> TA Cloning-Kit (Klonierung in Expressionsvektor)	invitrogen <sup>™</sup>
Für anschließende Transduktion mittels Lentivirus: ViraPower <sup>™</sup> Lentiviral Packaging Mix Lipofectamine LTX and PLUS Reagents Blastizidin	invitrogen <sup>™</sup>
NucleoFast <sup>®</sup> 96 PCR Clean-up Kit (Aufreinigung per Ultrafiltration von PCR-Produkten im 96er-Titerplattenformat)	Macherey-Nagel
QIAquick PCR Purification Kit-Midi Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen

## Geräte und Software:

MultiScreenHTS Vakuum-Filtrationssystem	Merck Millipore
ABI 3730 DNA Analyzer (Kapillarelektrophoresesystem zur Analyse fluoreszent markierter DNA)	Thermo Scientific
Geldokumentationssystem E.A.S.Y.	Herolab
QIAshredder	Qiagen
Scepter 2.0 Zellzähler u. Zubehör	Merck Millipore™
Seahorse XF 96 Cell Flux Analyser und Zubehör	Seahorse Bioscience
Spectrometer Nanodrop®	Thermo Scientific
PTC 225 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
Mini Trans-Blot® Cell (Elektroblotting)	Bio-Rad Laboratories
Photometer Ultraspec 3300 plus	GE Healthcare
ExonPrimer (für Primerdesign)	T. M. Strom, Helmholtz Zentrum München
Dot Plot Maker	<a href="http://data.vanderbilt.edu/~graywh/dotplot/">http://data.vanderbilt.edu/~graywh/dotplot/</a>
GAP-Assembler Version 4.11 (Software für die Sequenzanalyse)	<a href="http://staden.sourceforge.net">http://staden.sourceforge.net</a>

## Sonstige Hilfsmittel:

Gold Precast Gel	Lonza PAGEr™
PAGEr Precast Gel (10 – 20 %	Lonza
Hybond™ Blotting Paper	GE Healthcare
Hybond™-P (PVDF) membranes	GE Healthcare
Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film	GE Healthcare

## 2.4 Studiendesign

Das Flussdiagramm in der Abbildung 7 gibt eine Übersicht über das Studiendesign und die Abfolge der experimentellen Schritte.

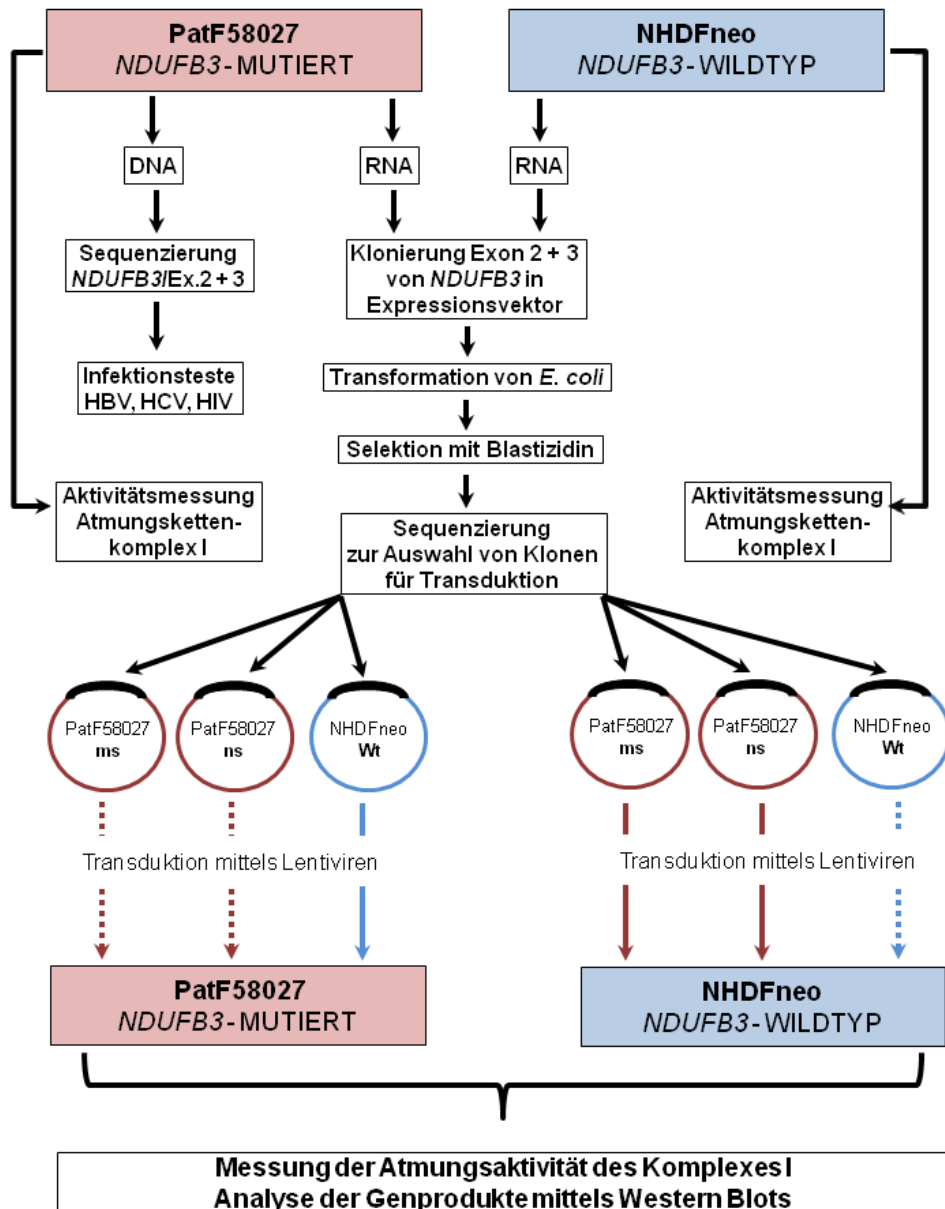


Abbildung. 7:

Übersicht über den Verlauf der Studie. Die gestrichelten Pfeile markieren die Transduktionen mit den Expressionsvektoren, die wieder zurück in die Ursprungszelllinie transduziert wurden. (ms = missense-Mutation, ns = nonsense-Mutation, Wt = Wildtyp, *NDUF3* = Exon 2 und 3 des Gens *NDUF3*, PatF58027 = Fibroblastenzelllinie der Patientin, NHDFneo = Kontrollzelllinie).

## 2.5 Methoden

In den folgenden Kapiteln sind die verwendeten Methoden und die Zusammensetzung der benötigten Lösungen beschrieben. Wenn die Vorgehensweise exakt bereits veröffentlichten Protokollen bzw. den Anleitungen der Hersteller der verwendeten Kits/Reaktionskomponenten entsprach, wird auf die entsprechende Referenz verwiesen. Alle unveröffentlichten oder modifizierten Methoden sind ausführlich beschrieben.

### 2.5.1 Kultivierung, Konservierung und Lagerung von *E. coli* und humanen Zelllinien

#### Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Zur Kultivierung wurden die Zellen auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Weiterverarbeitung hing von der geplanten Verwendung ab. Um die Vektor-DNA der Bakterien direkt als Matrize für PCRs verwenden zu können, wurden am Folgetag Einzelkolonien mithilfe von Pipettenspitzen in 20 µL RNase-freies Wasser überführt und bis zum Ansetzen der PCR bei 4 °C gelagert. Zur Vermehrung des Vektors wurde LB-Medium mit 100 µg/mL Ampizillin mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln für 12 – 16 Stunden inkubiert.

#### LB-Medium, pH 7,0

1 % Tryptone

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

autoklavieren

#### LB-Agar

LB-Medium + 1,5 % Agar

#### Kultivierung und Konservierung der Fibroblastenzelllinien PatF58027, NHDFneo und HEK 293FT

Die Fibroblastenzelllinie der Patientin, PatF58027, wurde von Prof. Dr. M. Schülke-Gerstenfeld, Klinik für Pädiatrie m.S. Neurologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, für die hier beschriebenen Versuche zur Verfügung gestellt. Sie war aus einem Hautstück von ca. 2 x 4 mm etabliert worden.



PatF58027 und NHDFneo (Wildtyp) wurden bei 37 °C und unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in 500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, dem 5,5 mL Penicillin und Streptomycin (PenStrep), 50 mL Fetal Bovine Serum (FBS) und 200 µL Uridin (Stock: 100 mM) je 500 mL DMEM zugesetzt wurde. Uridin ist für die Replikation der mt-DNA notwendig. In Zellen mit einer oder mehreren Mutationen in Genen der Atmungskette kann es nicht mehr ausreichend synthetisiert werden. In kultivierten Zellen würde daher ohne Uridin das Atmungskettenkomplexdefizit mit der Anzahl der Passagierungen zunehmen. Uridin hält die Enzymaktivitäten im Atmungskettenkomplex I der Fibroblasten konstant.[26]

Die Passagierungen wurden bei 80 – 90 % Konfluenz durchgeführt.

Die als Wirtszellen für die Transduktion verwendete Zelllinie HEK 293FT wurden auf dieselbe Art und Weise kultiviert und konserviert; lediglich das Uridin entfiel.

Von allen Passagen der Zelllinien wurden Aliquots in Stickstoff (-80 °C) in DMEM mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (PatF58027, NHDFneo) bzw. 7,5 % DMSO (HEK 293FT) als Gefrierschutz eingelagert.[27]

## **2.5.2 DNA- und RNA-Extraktionen**

### Extraktion von Vektor-DNA aus *E. coli*

Anhand ihrer Sequenz wurden *E. coli*-Klone (vgl. Kapitel 2.5.5) selektiert, die die gewünschten Mutationen (ms oder ns) bzw. die Wildtypsequenz des Gens *NDUFB3* trugen. Die selektierten Klone wurden in Vorkulturen mit 3 mL selektivem LB-Medium (Ampizillin 100 ng/µL) für 8 h unter Schütteln bei 37 °C angezogen. Im Anschluss wurden die Hauptkulturen im Verhältnis 1 : 500 mit selektivem LB-Medium auf 1,5 L verdünnt, unter gleichen Bedingungen inkubiert und nach ca. 15 h geerntet. Anschließend wurde die Vektor-DNA mit dem QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit gemäß der Anleitung des Herstellers extrahiert.[28]

### Extraktion genomischer DNA und RNA aus Fibroblasten

Aus der Fibroblastenzelllinie PatF58027 der Patientin wurde mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) DNA und RNA isoliert. Alle Arbeitsschritte wurden nach Anleitung des

Herstellers durchgeführt.[29] Die Ausbeute und Konzentrationen der Präparationen wurden spektrophotometrisch durch Messung bei 260 nm bestimmt.

Die RNA wurde als Template für die cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.5.3) und den Test auf Vorliegen einer HCV-Infektion verwendet; die DNA wurde für reguläre PCRs und die Tests auf Vorliegen von Infektionen mit HBV und HIV eingesetzt (siehe Kapitel 2.5.4).

### **2.5.3 cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion**

#### cDNA-Synthese mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die extrahierte RNA wurde unter Verwendung des First strand cDNA synthesis kits (Thermo Fisher Scientific) in cDNA umgeschrieben. Alle Schritte wurden nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.[30] Zur Überprüfung der extrahierten RNA wurde bei allen RT-PCRs auch die cDNA des Gens  $\beta$ -Actin als Positivkontrolle mit  $\beta$ -Actin-spezifischen Primern synthetisiert.

#### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCRs wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Primer verwendet. Sie enthält außer den Primern zur Amplifizierung der Exone des Gens *NDUFB3* auch diejenigen, die zur Überprüfung der Patientenzelllinie auf Koinfektionen mit Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV) und dem Humanen Immunschwäche-Virus (HIV) verwendet wurden (vgl. Kapitel 2.5.4) und den für Sequenzierungen verwendeten VektorPrimer (vgl. Kapitel 2.5.5). Die Primer für *NDUFB3* wurden mithilfe der ExonPrimer-Software entworfen. Alle Primer wurden von der Firma metabion international AG (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Name	Sequenz (5' – 3')	Amplifikat (bp)	Annealing Temp. (°C)
NDUFB3_Exon2_F	GCATATTTCTCACTTGTGTTAATCTTT	299	63
NDUFB3_Exon2_R	ACTTGATTCTCTAGGATACATTCTATCTAA		63
NDUFB3_Exon3_F	TGATCTTCTGTAGGGTAGCATTTAAG	227	68
NDUFB3_Exon3_R	AATGACAAAAGCAGATTGGC		68
NDUFB3_cDNA_F	TCAGATTGCTGTCAGACATGG	334	58
NDUFB3_cDNA_R	GATGCTTCCAGGTATTATCTTCAG		58
HIV_F	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	115	60
HIV_R	TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC		60
HBV_F	CCGTCTGTGCCTTCTCATCTG	104	60
HBV_R	AGTCCAAGAGTYCTTATGYAAGACCTT		60
VektorPrimer F (pLenti6.3/V5-TO- PO TA CloningKit)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	258	58
VektorPrimer R (pLenti6.3/V5-TO- PO TA CloningKit)	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT		58

Tabelle. 2:

Liste der verwendeten Primer für die PCR und Größe der erwarteten Amplifikate.

Primer mit der Bezeichnung NDUFB3 dienen zur getrennten Amplifizierung der Exone 2 und 3 des *NDUFB3*-Gens bzw. der cDNA beider Exone zusammen. Weiterhin wurden diejenigen Primer aufgeführt, die zur Überprüfung der Patientenzelllinie auf Koinfektionen mit Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV) und dem Humanen Immunschwächevirus (HIV) verwendet wurden sowie der für die Sequenzierungen verwendete VektorPrimer. „F“ und „R“ bezieht sich auf den jeweiligen forward bzw. reverse Primer.

#### Zusammensetzung der PCR-Reaktionsmische und Amplifikationsbedingungen

Alle PCRs wurden unter der Sterilbank angesetzt und die temperaturempfindlichen Komponenten auf Eis gekühlt. Falls im Kapitel Ergebnisse nicht anders vermerkt, wurden die 10-µL-Reaktionsmische für die PCRs wie folgt angesetzt:

Reagenzien	$\mu\text{L}/\text{Reaktion}$	Konzentration bzw. Menge/Reaktion
10x High Fidelity PCR-Puffer	1,0	1x
dNTP-Mix (2 mM, jedes dNTP)	1,0	0,2 mM
Platinum <sup>®</sup> Taq Polymerase High Fidelity (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,04	0,2 U
forward Primer (100 pmole/ $\mu\text{L}$ )	0,2	20 pmole
reverse Primer (100 pmole/ $\mu\text{L}$ )	0,2	20 pmole
Template DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	0,2	10 ng
RNase-freies H <sub>2</sub> O (Ampuwa) ad 10 $\mu\text{L}$	5,4	---

Wenn nicht anders vermerkt wurden folgende Amplifikationsbedingungen verwendet:

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	5	1
	95	0,5	40
Anlagerung	Primerspezifisch	0,5	
Verlängerung	72	1	
	72	10	1
Kühlung	4	10	1

Um Kontaminationen mit Fremd-DNA ausschließen zu können, wurde bei allen PCR-Experimenten eine Negativkontrolle mitgeführt, die keine Template-DNA (bzw. RNA für die cDNA-Synthese) enthielt.

Die PCRs mit den Primern NDUF3\_cDNA\_F u. R und  $\beta$ -Actin benötigten für eine erfolgreiche Amplifikation ein Additiv. In diesen Fällen wurde dem Reaktionsmix Q-Solution (Qiagen<sup>®</sup>) in 1x Konzentration hinzugefügt. Laut Hersteller ermöglicht Q-Solution eine effiziente Amplifikation GC-reicher Sequenzen, doch wird die Zusammensetzung nicht angegeben (Firmengeheimnis). Frackman *et al.* (1998) zeigten jedoch durch vergleichende Kernspinresonanzspektroskopie, dass es sich bei der im Kit enthaltenen 5x Q-Solution mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit um 5 M Betaine handelt.[31]

Zur Überprüfung der Amplifikation wurden die Produkte auf 1.5 %igen Agarosegelen in 1x Tris-Borat-Ethylendiaminotetraacetat-EDTA (TBE)-Puffer mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid elektrophoretisch für 20 min bei 120 V aufgetrennt. Pro Geltasche wurde ca.  $\frac{1}{3}$  der Reaktion (3 µL) und 5 µL Loading Dye Orange G aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard zur Größenbestimmung der Amplifikate diente eine 1 kb-Leiter. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht (wahlweise 366 nm oder 254 nm) fotografiert.

#### **2.5.4 PCR-Nachweis von Hepatitis B, Hepatitis C und HIV**

Um die Gefahr einer Interaktion und Rekombination verschiedener Viren mit dem verwendeten Lentivirus auszuschließen sowie zum Infektionsschutz, wurde die Patientenzelllinie PatF58027 zu Beginn der Arbeiten auf das Vorliegen von Infektionen mit dem HI-, dem Hepatitis B- und Hepatitis C-Virus getestet.

Für den Nachweis von HBV und HIV wurde genomische DNA der Patientin als Template für die PCR und die Primer HBV\_F und HBV\_R bzw. HIV\_F und HIV\_R verwendet. Die Zielregion der HBV-Primer (Nukleotidposition 1549 – 1653) ist eine hoch konservierte Region des HBV-Genoms, die die kodierenden Gene des X-Proteins und der DNA-Polymerase miteinschließt.[32] Die HIV-Primer amplifizieren einen Teil der gruppenspezifischen Antigen-Region (gag-Region, Nukleotidposition 47386 – 47618).[33] Als PCR-Positivkontrolle wurde DNA eines Patienten, der nachgewiesenermaßen eine chronische Hepatitis B- und HIV-Infektion hatte verwendet.

Für den Test auf HCV wurde die aus den Fibroblasten isolierte RNA genutzt. Für den Virusnachweis wurde das HCV 240/440 IC-Kit (Sacace Biotechnologies) verwendet.[34] Es enthält alle notwendigen Bestandteile sowohl für die Umschreibung in cDNA als auch für die anschließende PCR einschließlich der notwendigen Primer sowie eine Hepatitis-C-positive cDNA. Zusätzlich zur regulären Negativkontrolle (ohne Patienten-cDNA) wurde eine weitere Negativkontrolle ohne Patienten-cDNA, jedoch mit der HCV-positiven cDNA durchgeführt. Das Amplifikat der internen HCV-positiven Kontrolle ist 440 bp lang; somit war es auf dem Agarosegel eindeutig von dem mit dem zweiten Primerpaar amplifizierten 240 bp langen Fragment zu unterscheiden.

### 2.5.5 Klonierung und Selektion von Klonen für die Transduktion

Um die Auswirkungen der Mutationen im Gen *NDUFB3* auf den Komplex I der Atmungskette im Detail mittels Zell-Rescue-Experimenten zu analysieren, wurden die entsprechenden Genfragmente der Patientin und des Wildtyps (Kontrolle) zunächst in einen Expressionsvektor kloniert und mit diesem *E. coli* transformiert.

In einem zweiten Schritt wurden die Klone gescreent und diejenigen ausgewählt, welche die zu untersuchenden Mutationen bzw. den Wildtyp in der richtigen, die Expression ermöglichenden Orientierung trugen. Die Verifizierung erfolgte durch Sequenzierung.

Daran anschließend wurden die drei Klone ausgewählt, welche die gewünschte cDNA trugen (missense-Mutation bzw. nonsense-Mutation und Wildtypsequenz). Mittels Lentiviren wurde diese in die Zellen der Patientin (PatF58027) und der Wildtypkontrolle (NHDFneo) (vgl. Kapitel 2.4, Abbildung 7) transduziert.

In den folgenden Abschnitten und Kapitel 2.5.6 werden die experimentellen Schritte im Einzelnen beschrieben.

## Klonierung

Für die Klonierung wurde das p-Lenti6.3/V5-TOPO<sup>®</sup>TA Cloning-Kit (invitrogen<sup>™</sup>) verwendet. Es enthält den Expressionsvektor p-Lenti6.3/V5-TOPO und für die Transformation den *E. coli*-Stamm StBl3.

Klonierungsansatz 1:        Exon 2 (ms-Mutation) / Exon 3 (Wt) und  
                                  (PatF58027)            Exon 2 (Wt) / Exon 3 (ns-Mutation) von *NDUFB3*

Klonierungsansatz 2:        *NDUFB3*-Wildtypgen  
                                  (NHDFneo)

Alle Arbeitsschritte wurden nach den Vorgaben im Manual des Herstellers durchgeführt.[35]

## Screening und Selektion von Klonen

1. Von jedem der beiden Ansätze (PatF58027, NHDFneo) wurde Zellmaterial von je 20 zufällig ausgewählten Klonen pro Transformation mit einer Pipettenspitze in 20 µL RNase-freies H<sub>2</sub>O übertragen.
2. Je 0,2 µL dieser insgesamt 40 Zellysate wurden als Template für zwei verschiedene PCRs verwendet:
  - a. PCR mit Vektorprimer\_F und Vektorprimer\_R, um zu prüfen, ob der Vektor das gewünschte klonierte Fragment enthält.
  - b. PCR mit Vektorprimer\_F und *NDUFB3\_cDNA\_R*.  
Diese PCR kann nur dann ein Amplifikat generieren, wenn die Orientierung des Inserts im Vektor die spätere Expression ermöglicht.
3. Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (1,5 % Agarose mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid in 1x TBE-Puffer; 100 V, 35 min) überprüft.
4. Die PCR-Produkte wurden mit dem Nucleo Fast Kit 96 PCR nach Herstelleranweisung aufgereinigt, mit 100 % Ethanol gefällt und in 25 µL Wasser resuspendiert. Die Aufreinigung basiert auf dem Prinzip der Ultrafiltration bei der die Primer, überschüssige dNTPs und Salze über eine Membran vom DNA-Template getrennt werden.[36]

Die DNA-Konzentration wurde auf Agarosegelen (1,5 %) durch visuellen Vergleich der Bandenintensität mit bekannten DNA-Mengen der Banden eines Molekulargewichtsstandards (1 kB-Leiter, MBI Fermentas) abgeschätzt.

#### Verifizierung durch Sequenzierung

Die Sequenz der selektierten Klone wurde über eine Sequenzierung mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) überprüft. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellermanuals.[37] Die Fragmente wurden mit dem Kapillarelektrophoresegerät ABI 3730 DNA Analyzer aufgetrennt. Für die Analyse der Sequenz wurde die Software GAP-Assembler Version 4.11 benutzt.[38] Aus den sequenzierten Klonen wurden auf Grundlage der Sequenzen drei ausgewählt, welche die gewünschten Mutationen bzw. den Wildtyp trugen:

1. PatF58027-ms
2. PatF58027-ns
3. NHDFneo-Wt

Der verwendete Laborcode leitet sich ab vom Namen der Ursprungszelllinie und der Abkürzung für die Mutation (ms = missense; ns = nonsense) bzw. den Wildtyp (Wt); vgl. dazu auch das Studiendesign in Abbildung 7, Kapitel 2.4.

### **2.5.6 Transduktion**

Zur Vorbereitung der eigentlichen Transduktion wurde zunächst die dazu notwendige DNA der zu transduzierenden Genvarianten extrahiert und für die Selektion der transduzierten Zellen mit Blastizidin die dazu geeignete Antibiotikakonzentration bestimmt.

#### Anzucht der für die Transduktion selektierten Klone und Extraktion der DNA

Um für die Transduktion eine ausreichende Menge des Expressionsvektors pLenti6.3/V5-TOPO<sup>®</sup> mit dem jeweils hineinklonierten Genfragment zur Verfügung zu haben, wurden zunächst die drei durch Sequenzierung verifizierten Klone (PatF58027-ms, PatF58027-ns und NHDFneo-Wt, vgl. 2.5.5) wie folgt angezogen:

Etwas Zellmaterial der Klone wurde mit einer Pipettenspitze in 20 µL RNase-freies H<sub>2</sub>O resuspendiert und davon 2 µL zum Animpfen von 3 mL selektivem LB-Medium



verwendet. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und die Vektor-DNA mit dem Plasmid Plus Kit Midi (Qiagen®) extrahiert. Das Vorgehen erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.[39]

#### Erstellung der „Blastizidin-Kill-Curve“

Als Selektionsmarker wurde das Antibiotikum Blastizidin verwendet. Der Expressionsvektor besitzt das dazu notwendige Blastizidinresistenzgen (bsd). Das Gen ermöglicht die Selektion von stabil transduzierten Zellen, aus denen dann klonale Zelllinien entwickelt werden können.[40]

Um Blastizidin als Selektionsmarker zu nutzen, muss allerdings vorab für jede Zelllinie, die transduziert werden soll, die minimal notwendige Konzentration bestimmt werden, bei der die nicht transduzierten Zellen abgetötet werden. Für die Erstellung dieser sogenannten „Blastizidin-Kill-Curve“ wurde wie folgt vorgegangen:

1. Unter Zuhilfenahme des Zellzählgerätes wurde die Zelllinien PatF58027 und NHDFneo auf eine Konzentration von 37.500 Zellen/mL Medium eingestellt.
2. An Tag 1 Aussaat von 75.000 Zellen in DMEM mit PenStrep, FBS, und Uridin (vgl. Kap. 2.5.1) in 6-Well-Mikrotiterplatten.
3. Nach dem Anwachsen der Zellen an Tag 2 Zugabe von Blastizidin in den Endkonzentrationen 2 – 4 – 6 – 8 – 10 µg/mL. Die sechste Kultur diente als Negativkontrolle (ohne Blastizidin).
4. Das Medium wurde alle 2 – 3 Tage erneuert.
5. Das Verhältnis zwischen lebenden und toten (nicht mehr adhären) Zellen wurde täglich zur gleichen Zeit durch Beobachtung unter dem Mikroskop kontrolliert.

#### Transduktion

Für die Transduktion wurde das ViraPower™ Lentiviral Expression System (invitrogen™) verwendet. Der pLenti-Expressionsvektor trägt unter anderem einen starken CMV Promoter des Human Cytomegalievirus, der die Expression des Transgens deutlich erhöht.[35] Die Abbildung 8 gibt einen schematischen Überblick über den Transduktionsvorgang.

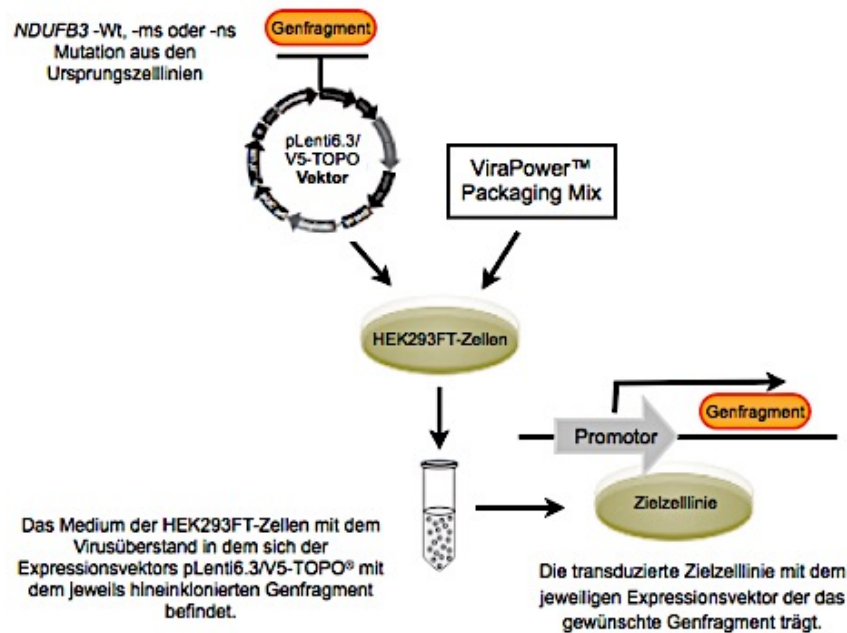


Abbildung. 8:

Schematische Darstellung des Transduktionsvorgangs.

Für die Bildausschnitte der Graphik gilt: Copyright© 2014 Life Technologies Corporation. Genehmigter Abdruck. [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)

Die beiden Zelllinien PatF58027 und NHDFneo wurden jeweils mit allen Konstrukten transduziert. Um einen überadditiven Effekt der Transgene durch die Überexpression zu erkennen, wurde zusätzlich zur Patientenzelllinie PatF58027 auch eine Wildtypkontrolle NHDFneo mit den aus ihnen selbst stammenden Genvarianten (PatF58027-ms und Pat58027-ns bzw. NHDFneo-Wt) transduziert.

Die pLenti-Expressionsvektoren der für die Transduktion ausgewählten Klone wurden zusammen mit dem ViraPower™Packaging Mix (invitrogen™) und Lipofectamin™2000 (invitrogen™) auf die kultivierten HEK 293FT Zelllinien gegeben. Der ViraPower™Packaging Mix enthält drei unterschiedliche Regulator- und Verpackungspasmide zur Herstellung viraler Proteine für den Aufbau viraler Partikel. Das Lipofectamin™2000 unterstützt den Transport von Nukleinsäure in eukaryotische Zellen. Die positiv geladenen Lipide binden an die negativ geladene DNA. Da die ebenfalls negativ geladene Zellmembran aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht, passiert dieser Komplex mit Leichtigkeit die Membran.[41] Laut Hersteller steigert Lipofectamin™2000 die Virusproduktion durch eine effizientere Einschleusung der

pLenti-Vektoren sowie der Regulator- und Verpackungsplasmide in die HEK 293FT Zelllinie.

Der verwendete Lentivirus ist eine genetisch veränderte Variante des Wildtyps HIV-1, die nicht mehr replikationsfähig ist. Sie besitzt nur noch drei der ursprünglich neun HIV-1-Gene (rev, gag und pol). Zudem bewirkt eine Deletion in der 3' - Long terminal repeats ( $\Delta$ U3)-Region, dass nur das zu transduzierende Gen repliziert wird.[42]

In der Zelllinie HEK 293FT wurde der Lentivirus so zum Träger der gewünschten Genfragmente (PatF58027-ms, PatF58027-ns, NHDFneo-Wt) und nutzte die Wirtszelle zur Produktion seiner Virusbestandteile. Mit dem jeweils entstandenen Virusüberstand wurde die Zelllinien NHDFneo und PatF58027 infiziert.

Alle Arbeitsschritte der Transduktion und der Selektion stabil transduzierter Zellen mittels Blastizidin führte ich nach der Anleitung des Herstellers invitrogen<sup>TM</sup> aus dem ViraPower<sup>TM</sup> Lentiviral Expression Systems-Manual durch.[43] Die Selektion mit Blastizidin wurde mit der zuvor bestimmten (siehe oben, Blastizidin-Kill-Curve) Konzentration für 10 Tage durchgeführt.

### **2.5.7 Western Blot**

Zur Analyse der Proteinmengen in den mit der ms- und ns-Mutation und dem Wildtyp transduzierten Zelllinien wurden Western Blots gemacht und ausgewählte Proteine aus den Atmungskettenkomplexen I und III über Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen.

#### Bradford Assay

Um aussagekräftige Signale im Western Blot zu erhalten, sollten von allen Proben möglichst gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen werden. Daher wurden zunächst mit einem Bradford-Assay die Proteinmengen der Proben bestimmt. Die dafür notwendige BSA-Standardkurve wurde gemäß der Anleitung des Herstellers des Protein Dye Reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250, BioRAD) erstellt. Für die Messung der eigentlichen Proteinproben wurden diese nach der Pelletierung in 1x PBS durch Vortexen und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durch eine Spritzenkanüle resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 2  $\mu$ L mit 1 mL 5x Dye Reagent in der

Glasküvette des Photometers gemischt, im Photometer Ultraspec 3300 pro gemessen und die Menge anhand der BSA-Standardkurve bestimmt.

### Versuchsdurchführung Western Blot

#### 1. Denaturierung der Proteine:

20 µL der Proteinproben ( $\approx$  30 – 50 ng Protein) in Lämmli-Puffer (2x) für 10 min bei 70 °C.

#### 2. Elektrophorese:

Auftrennung der denaturierten Proteine in einer Elektrophorese auf PAGE™ Gold Precast-Gelen (Lonza) in 1x Laufpuffer.

Einlaufen ins Sammelgel für 20 min bei 65 V; anschließend Trennung für 1 h bei 110 V. Als Molekulargewichtsstandard wurden 5 µL der Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

#### 3. Blotting:

Die Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran vor Gebrauch für mindestens 20 Sekunden in 100 % Methanol aktivieren. Gel, Blottingmembran und Plastikschwämme durch Inkubation für einige Minuten in kaltem 1x Blotting-Puffer äquilibrieren. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte im Elektrobloßgerät Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) bei 4 °C für 90 min bei 100 V.

Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran für 5 min bei Raumtemperatur reversibel mit dem Farbstoff Ponceau S (0,5 %) und 3 % Essigsäure angefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 1x Tris-buffered Saline und Tween™ 20 (TBST)-Puffer.

#### 4. Bindung der primären Antikörper:

Um unspezifische Bindungen der primären Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde diese zunächst für 30 min bei RT mit 5 %iger Magermilch abgesättigt und anschließend mit den in Magermilch gelösten spezifischen Antikörpern bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Folgende primäre Antikörper wurden in den aufgeführten Konzentrationen verwendet:

Anti-Ki67 subunit Core 2 (1 µg/mL)

Anti-NDUFA9 (1 µg/mL)

Anti-NDUFB3 (5 µg/mL)

Anti-NDUFB8 (1 µg/mL)

Anti-NDUFS1 (E20) (5 µg/mL)

Anti-NDUFS3 (1 µg/mL)

Anti-Porin (1 µg/mL)

Zusätzlich wurde jede Membran mit dem Anti-Porin-Antikörper (1 µg/mL) inkubiert. Porin bindet an Rezeptoren der äußeren mitochondrialen Membran und dient als Ladekontrolle (39 kDa). Die Bandenintensität gibt Auskunft über die einheitliche Beladung der Geltaschen mit den Proteinproben und den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran. Ladekontrollen sind typischerweise Proteine mit starker und ubiquitärer Expression. Die Expressionslevel der Ladekontrollen sollten unabhängig von Gewebe, Zelltyp oder experimentellen Bedingungen gleichbleibend sein.

Nach der Inkubation über Nacht wurde die Membranen dreimal für je 10 min bei RT mit 1x TBST gewaschen, um unspezifisch gebundene und freie Antikörper zu entfernen.

#### 5. Bindung des sekundären Antikörpers:

Weil alle primären Antikörper in Mäusen hergestellt worden waren, wurde als sekundären Antikörper Amersham ECL Prime mouse IgG-AK verwendet und die Membran mit diesem für 1 h bei 4 °C (Verdünnung 1 : 7500 in Magermilch) inkubiert. Der sekundäre Antimausantikörper bindet an die proteinspezifischen primären Antikörper und konnte über eine chemilumineszente Reaktion nachgewiesen werden.

#### 6. Chemilumineszente Detektion:

Die Detektion der Signale erfolgte wie vom Hersteller des verwendeten Reagenz „ECL Plus Western-Blotting Detection Reagent“ (GE Healthcare) empfohlen.[44]

#### 7. Membran Stripping:

Zur Wiederholung der Experimente oder zur Verwendung derselben Membran mit verschiedenen Antikörpern, wurden die zuvor bereits verwendeten primären und

sekundären Antikörper abgewaschen („stripping“). Dazu wurde nach der Anleitung von GE Healthcare, „Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system“ vorgegangen.[45]

4x Lämmli-Puffer, pH 6,8

8 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

40 % (w/v) Glycerol

250 mM Tris-HCl

0,02 % Bromphenolblau

0,1 M Dithiothreitol

Blotting-Puffer, pH 8,3

192 mM Glycine

25 mM Trizma-base

20 % (v/v) Methanol

Ponceau S Lösung

0,5 % Ponceau S

3 % Essigsäure

10x Laufpuffer

192 mM Glycine

25 mM Trizma-base

0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

10x TBST (Waschpuffer), pH 7,4

200 mM Tris

0,9 % NaCl

0,01 % Tween 20

Stripping-Puffer, pH 6,7

100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

62,5 mM Tris-HCl

### **2.5.8 Bestimmung der Enzymaktivität des Komplexes I der Atmungskette**

Zur Messung der Komplex I-Enzymaktivität in den Zelllinien PatF58027 und NHDFneo wurde das Seahorse<sup>®</sup>-System von Bioscience verwendet, welches den extrazellulären Sauerstoffverbrauch der Zellen bestimmt.

Die Funktion einzelner Atmungskettenkomplexe wurde durch Zugabe von Oligomycin, FCCP und Rotenon modifiziert. Die Addition von Oligomycin führt durch die Blockade der H<sup>+</sup>-Ionenkanäle zu einer Unterbrechung der ATP-Synthese an Komplex V. Die Gabe von FCCP permeabilisiert die innere mitochondriale Membran und hebt das Membranpotential auf. Zusammen bewirken Oligomycin und FCCP eine maximale, ungehinderte Zellatmung und einen erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch ohne ATP-Synthese. Wird anschließend Rotenon als Komplex I-Inhibitor dazugegeben bricht der Elektronentransport zwischen Komplex I und Ubiquinon (Coenzym Q10) ab und der O<sub>2</sub>-

Verbrauch sinkt. Die Differenz zwischen dem Sauerstoffverbrauch bei maximaler Zellatmung und der Rotenon-sensitiven Atmung lässt auf die Enzymaktivität des KI schließen.

Das verwendete Gerät (Seahorse® XF 96 Cell Flux Analyser) misst den Sauerstoffverbrauch der Zellen mit Hilfe optischer Sensoren in Echtzeit. Die gemessenen Zellen liegen als Monolayer vor.

Im Folgenden wird die Durchführung der Messungen ausführlich.

Die Zellen und das Medium wurden in einer speziellen gerätespezifischen 96er-Mikrotiterplatte vorgelegt. Für die Messung wird ein vertikal beweglicher Mikrosensor in die Kavität mit der Zellschicht abgesenkt, sodass sich oberhalb der Zellschicht eine geschlossene sogenannte Mikrozellkammer mit nur ca. 7 µL Volumen bildet (vgl. Abbildung 9). Der sich durch die Zellatmung verändernde O<sub>2</sub>-Gehalt in diesen 7 µL wird registriert. Nach einer festgelegten Messdauer werden die Messkolben für eine bestimmte Zeit auf und ab bewegt, um das Medium gut zu durchmischen und so zu gewährleisten, dass den Zellen für die nachfolgenden Wiederholungsmessungen wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht. Um die Messsensoren herum sind zwei sogenannte Substratadditionskanäle (Abbildung 9, A) angeordnet, die mit je 20 µL eines Substrates beladen werden können, welches zu einem definierten Zeitpunkt ins Medium abgegeben wird. Die Messwerte sind in Form einer Excel-Tabelle auslesbar.

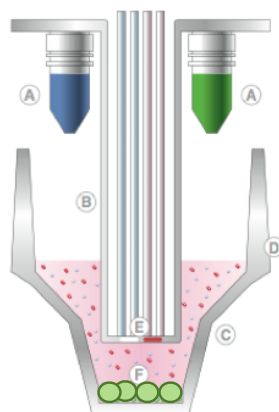


Abbildung. 9:

Querschnitt durch eine Kavität einer 96er Mikrotiterplatte für die extrazelluläre Flussanalyse. (A) Substratadditionskanäle, (B) Kolben mit Sensoren, (C/D) Kavität der 96er-Mikrotiterplatte, (E) optische Mikrosensoren zur Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs, (F) Mikrozellkammer.

Genehmigter Abdruck von Seahorse Bioscience.

Vor dem eigentlichen Versuch wurde die für die jeweils benutzten Zelltypen und Versuchsbedingungen geeignete Messdauer ermittelt, um Daten mit eindeutig erkennbaren und reproduzierbaren Peaks zu erhalten. Für die hier verwendeten Zelllinien erwiesen sich fünf Minuten als ideale Messdauer.

## Versuchsdurchführung

### Tag 1

1. Herstellung des ungepufferten Mediums: DMEM Base versetzt mit Glutamat (0,584 g/L), Natrium Pyruvat (3,7 g/L) und 20 %iger Glukose (1 g/L), pH 7,4; das Medium wurde sterilfiltriert (45 µm) und bei 4 °C gelagert.
2. Die zu untersuchenden stabil transduzierten Zelllinien (PatF58027-T-Wt, PatF58027-T-ms, PatF58027-T-ns und NHDFneo-T-Wt, NHDFneo-T-ms, NHDFneo-T-ns) wurden bei einer Konfluenz von 80 % geerntet und pelletiert.
3. Zellzahlbestimmung mit dem automatischen Scepter 2.0 Cell counter (Millipore) nach Vorschrift des Geräteherstellers.[46]
4. Aussaat von 20.000 Zellen/Kavität in 80 µL ungepuffertem DMEM in einer XF96 Cell Culture Microplate (Seahorse® Bioscience) und Inkubation für 24 h bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>.

Das Belegungsschema der Mikrotiterplatte ist in Abbildung 10 wiedergegeben. Vier nur mit Medium befüllte Kavitäten waren für die Gerätekalibrierung notwendig. Die restlichen 92 Kavitäten wurden so belegt, dass für die Messungen ohne Substratzugabe die nicht transduzierte Ursprungszelllinie (Kontrolle) und die zugehörigen transduzierten Linien jeweils 9 (T-Wt und T-ms) bzw. 8 (T-ns) Wiederholungen aufgetragen wurden. Für die Messungen nach Substratzugabe wurden 15 (Kontrolle, T-Wt, T-ms) bzw. 14 (T-ns) Wiederholungen aufgetragen.

5. Kalibrierung der Kassette mit den Messsensoren in 200 µL XF-Calibrant Solution in der sogenannten XF-Prepstation (Seahorse® Bioscience), bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>, über Nacht.

### Tag 2

1. Vorbereitung der Substrate Oligomycin (Endkonzentration 1 µM), FCCP (Endkonzentration 0,4 µM) und Rotenon (Endkonzentration 5 µM) in DMEM Base.



2. Medium abpipettieren und Zellen mit 150  $\mu\text{L}$ /Kavität ungepuffertem DMEM Base 1x waschen; 130  $\mu\text{L}$  DMEM Base/Kavität zugeben; Inkubation für 15 min bei 37 °C ohne  $\text{CO}_2$ .
3. Beladung der beiden Injektionskanäle mit je 20  $\mu\text{L}$  FCCP (0.4  $\mu\text{M}$ ) bzw. Rotenon (5  $\mu\text{M}$ ) und Hinzugabe von Oligomycin in den Teil des Mediums, der für die Zellen mit Substratzugabe vorgesehen ist.
4. Eingabe aller Versuchsparameter in das entsprechende Template der Geräte-software.
5. Messprotokoll:
  - a) Kalibrierung 30 min
  - b) Äquilibrierung 20 min
  - c) Messungen 5 min messen, 2 min mischen (3 Wiederholungen)
  - d) Messung mit FCCP: 5 min messen, 2 min mischen (2 Wiederholungen)
  - e) Messung mit Rotenon: 5 min messen, 2 min mischen (2 Wiederholungen)

Aufgrund dieses Messprotokolls und des verwendeten Belegungsschemas gab es für alle Proben ohne Substratzugabe insgesamt 7 Messwerte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	X	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	X	ohne Substrat
<b>B</b>	K	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	T-ns	
<b>C</b>	K	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	T-ns	
<b>D</b>	K	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	T-ns	mit Substrat
<b>E</b>	K	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	T-ns	
<b>F</b>	K	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	T-ns	
<b>G</b>	K	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	T-ns	
<b>H</b>	X	K	K	T-Wt	T-Wt	T-Wt	T-ms	T-ms	T-ms	T-ns	T-ns	X	

|-----| nicht transduzierte Zelllinie
 |-----| transduzierte Zelllinien

Abbildung. 10:

Schema der Belegung der Mikrotiterplatten für die Messung der Enzymaktivität des KI. K = Kontrolle (nicht transduzierte Zelllinie); T-Wt, T-ms, T-ns = transduzierte Zelllinien, die den Wildtyp des *NDUFB3*-Gens tragen bzw. die missense-Mutation oder die nonsense-Mutation; X = Kavitäten mit Medium für die Gerätekalibrierung.

### Normalisierung

Die Atmungsaktivität wurde in relativen prozentualen Werten in Bezug auf die Atmung der Wildtypkontrolle NHDFneo angegeben, welche mit 100 % gleichgesetzt wurden. Extreme Ausreißerwerte (keine Zellatmung bzw. 3-fach höhere Atmung als der Durchschnitt aller Messwerte) wurden für die Auswertung nicht herangezogen.

### Statistische Auswertung

Zur Datenanalyse wurde die Software „Dot Plot Maker“ [47] mit folgenden Einstellungen verwendet:

Plot type: Dots over Box, Mean/Median: Mean, Jitter: 0,05.

### 3 Ergebnisse

---

Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde für die Aktivitätsmessungen und bei der Ernte von Zellen für RNA-Extraktionen darauf geachtet, dass die gemessenen bzw. verwendeten Zellen die nahezu gleiche Anzahl von Passagen durchlaufen hatten. Als Wildtypkontrolle diente in allen Versuchen die Zelllinie NHDFneo. Die Zellen behalten ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften mindestens über 15 Passagen bei.[48]

### 3.1 Nachweis von Mutationen im Gen *NDUFB3* einer Mitochondriopathiepatientin

Als erster Schritt dieser Arbeit mussten die Mutationen im Gen *NDUFB3* ebenfalls in der Fibroblasten-DNA nachgewiesen werden. Zunächst erfolgte die Amplifizierung der DNA mittels PCR und Gen-spezifischen Primern. Abbildung 11 zeigt die Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate von PatF58027 mit den zu erwartenden Basenpaarlängen von 227 bp (Exon 3) und 299 bp (Exon 2).

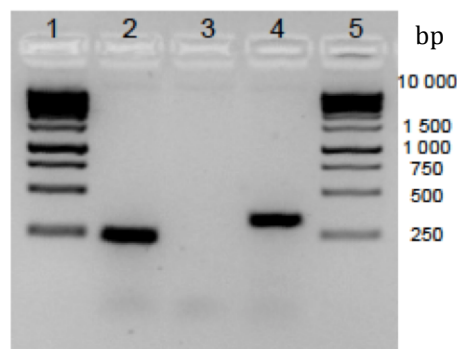


Abbildung. 11:

Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der PCR-Produkte für Exon 2 (Primer *NDUFB3\_Exon2\_F* und R) und 3 (Primer *NDUFB3\_Exon3\_F* und R) des Gens *NDUFB3* aus der Zelllinie PatF58027. Spuren 1 und 5: Molekulargewichtsstandard GeneRuler 1 kb DNA (Fermentas), Spur 2: Amplifikat *NDUFB3* Exon 3 (227 bp), Spur 3: Negativkontrolle ohne Template-DNA, Spur 4: Amplifikat *NDUFB3* Exon 2 (299 bp)

Die aufgereinigten Produkte beider Zelllinien wurden anschließend sequenziert. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die dazugehörigen Elektropherogramme. Es konnten sowohl die missense-Mutation in Exon 2 als auch die nonsense-Mutation in Exon 3 im

*NDUFB3* Gen aus der Fibroblastenzelllinie nachgewiesen werden. Die Positionen der mutierten Basen sind durch Pfeile markiert.

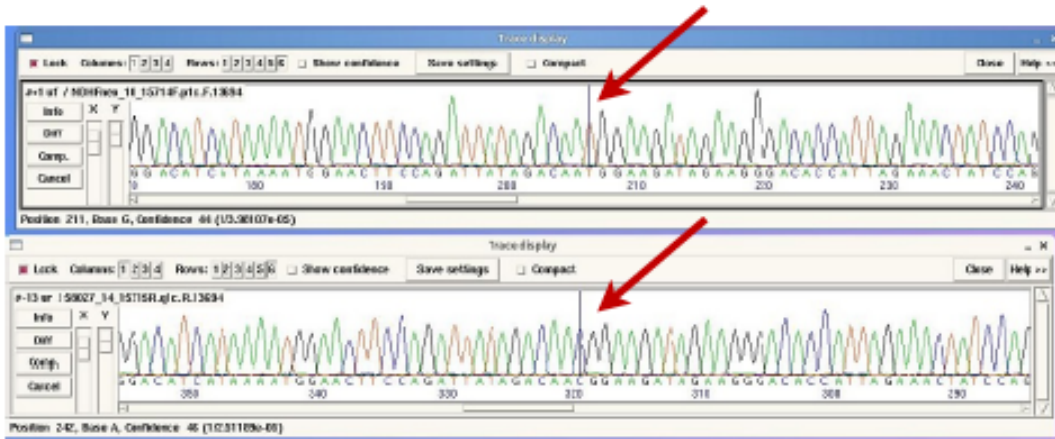


Abbildung. 12:

Chromatogramme der Sequenzierung des Exons 2 von *NDUFB3*.

Oben: Referenzsequenz. Unten: PatF58027. Die roten Pfeile markieren die missense-Mutation (Base T in der Wildtypsequenz vs. C in PatF58027).

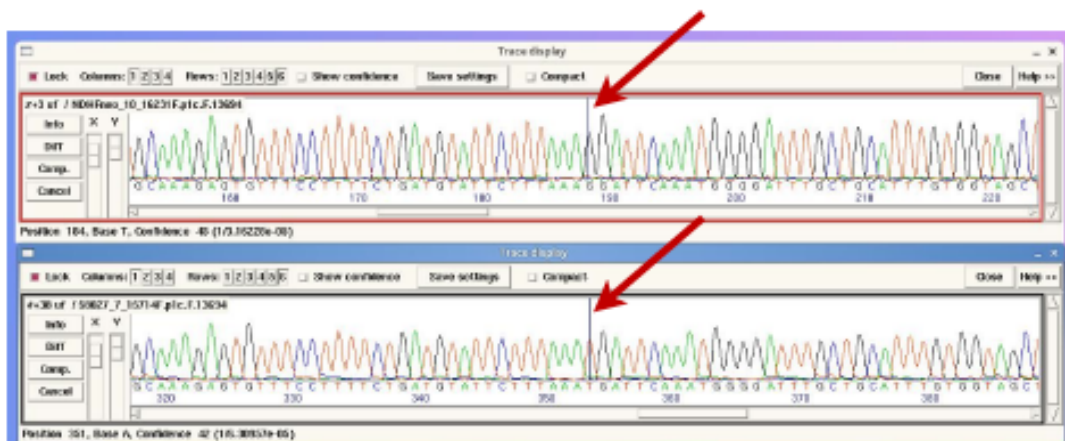


Abbildung. 13:

Chromatogramme der Sequenzierung des Exons 3 von *NDUFB3*.

Oben: Referenzsequenz. Unten: PatF58027. Die roten Pfeile markieren die nonsense-Mutation (Base G in der Wildtypsequenz vs. T in PatF58027).

### 3.2 Test der Fibroblasten auf Infektionen mit Hepatitis B, Hepatitis C und HIV

Um eine Interaktion zwischen dem Lentivirus und HBV, HCV und HIV auszuschließen, wurde PatF58027 vor Beginn der Klonierungs- und Transduktionsexperimente auf das Vorliegen dieser Viren getestet. Die Wildtypkontrolle NHDFneo war bereits vom Hersteller negativ auf diese Erreger sowie auf Mykoplasmen, Bakterien und Hefen getestet worden.[48]

Der PCR-Nachweis von HBV und HIV erfolgte jeweils mit genomischer DNA von PatF58027 und den erregerspezifischen Primerpaaren. Als Positivkontrolle für die PCR wurde DNA von Patienten verwendet, die nachgewiesenermaßen eine chronische Hepatitis B oder HIV-Infektion hatten.

Abbildung 14 zeigt die Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate des HBV- und HIV-Tests. Die Spuren 4 und 7 zeigen Amplifikate einer Fremdprobe, die keinen Bezug zu der vorgelegten Arbeit haben. Die erwartete Produktgröße beträgt bei Vorliegen einer HIV-Infektion 115 bp (vgl. Abbildung. 14, Spur 2) und bei einer HBV-Infektion 104 bp (vgl. Abbildung. 14, Spur 5). Die Amplifikate aus PatF58027 hatten jedoch eine davon abweichende Größe; es lag also keine Infektion vor.

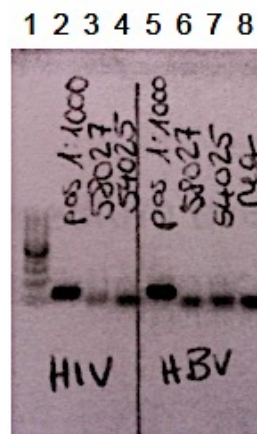


Abbildung. 14:

Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate aus PatF58027-DNA für den Infektionstest auf HIV (Primer HIV\_F und R) und HBV (Primer HBV\_F und R).

Spur 1: Molekulargewichtsstandard GeneRuler 1 kb DNA (Fermentas), Spur 2: Positivkontrolle mit DNA eines HIV infizierten Patienten (115 bp), Spur 3: Amplifikat für HIV von PatF58027, Spur 4 und 7: Amplifikate einer Fremdprobe ohne Bezug zur vorgelegten Arbeit, Spur 5: Positivkontrolle mit DNA eines Patienten mit chron. Hepatitis B (104 bp), Spur 6: Amplifikat für HBV von PatF58027, Spur 8: Negativkontrolle ohne Template-DNA

Der Nachweis einer HCV-Infektion mit dem HCV 240/440 IC-Kit von Sacace und einer Positivkontrolle aus dem Kit war ebenfalls negativ. (Daten nicht gezeigt).

### **3.3 Messung der Enzymaktivität des Komplexes I vor der Transduktion**

Mit dem Seahorse-System (Bioscience) wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des KI der Rotenon-sensitive-Sauerstoffverbrauch der Zelllinie PatF58027 gemessen.

Für die statistische Auswertung wurde die durchschnittliche KI-Enzymaktivität des Wildtyps NHDFneo als 100 % festgesetzt und die Atmungsaktivität von PatF58027 relativ dazu in Prozent angegeben. Pro Zelllinie gingen 10 Messungen in diese Auswertung ein.

Die relative Restaktivität des KI der PatF58027 betrug im Vergleich zu NHDFneo lediglich 19 %. Der Versuch bestätigte die Ergebnisse der bereits von Dr. Richard Rodenburg im Clinical Genetics Center Nijmegen durchgeführten mitochondrialen Enzymaktivitätsmessung (Einleitung 1.3, Tabelle 1). Auch eine einmalig zusätzlich durchgeführte Messung der Zellsuspension im Respirometer kam zu einem ähnlichen Ergebnis (21 %, Daten nicht gezeigt).

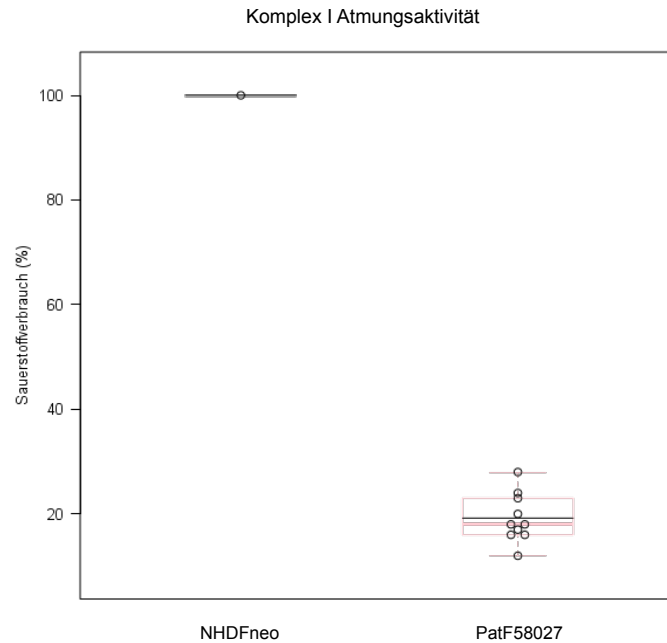


Abbildung. 15:

Relative KI-Enzymaktivität von PatF58027 (gemessen am Sauerstoffverbrauch in %) nach Zugabe von Oligomycin, FCCP und Rotenon im Vergleich zur Wildtypkontrolle (NHDFneo). Die Box enthält die mittleren 50 % der Messwerte. Der rote Balken in der Box stellt den Median dar, die schwarze Linie innerhalb der Box zeigt den Mittelwert. Die Whisker geben die übrigen 50 % der Messwerte im oberen und unteren Quartil an.

### 3.4 Klonierung der *NDUFB3* cDNA

Für die Klonierung der *NDUFB3* cDNA in den Vektor p-Lenti6.3/V5-TOPO<sup>®</sup> wurde die Wildtyp-Kopie aus NHDFneo und die mutierten Varianten aus den Fibroblasten des Patienten (PatF58027) amplifiziert. Abbildung 16 zeigt die Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate von NHDFneo und PatF58027; sie hatten die erwartete Länge von 334 bp.



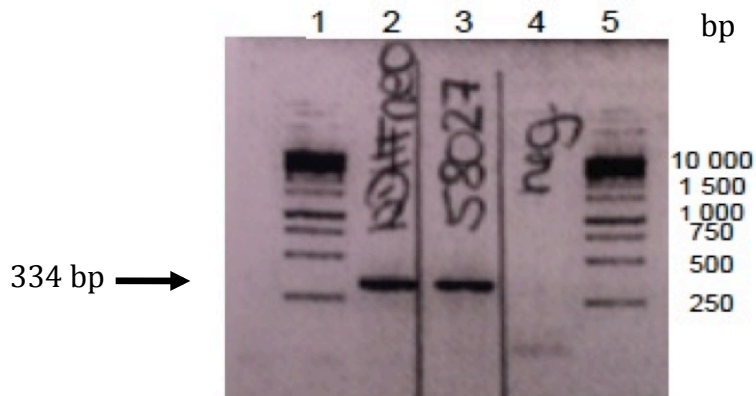


Abbildung. 16:

Agarosegelelektrophorese (1,5 %) der PCR-Produkte von Exon 2 und 3 des *NDUF3* Gens (Primer *NDUF3\_cDNA\_F* und R) aus der Kontrollzelllinie NHDFneo und aus PatF58027. Spur 1 und 5: Molekulargewichtsstandard GeneRuler 1 kb DNA (Fermentas) Spur 2: Amplifikat der Exone 2 und 3 des Gens *NDUF3* der NHDFneo (334 bp). Spur 3: Amplifikat der Exone 2 und 3 des Gens *NDUF3* der PatF58027 (334 bp). Spur 4: Negativkontrolle ohne Template cDNA.

Die PCR-Amplifikate wurden anschließend in den Expressionsvektor p-Lenti6.3/V5-TOPO<sup>®</sup> kloniert (vgl. Kap. 2.5.5).

Die Abbildung 17 zeigt die Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate zur Kontrolle der klonierten Genfragmente sowie deren Orientierung. Von den 20 für jede Zelllinie untersuchten Klonen enthielten insgesamt 11 aus PatF58027 und 8 aus NHDFneo das gewünschte Insert in richtiger Orientierung. Nur 4 von 20 Transformanten enthielten das klonierte Genfragment nicht oder Artefakte falscher Länge (vgl. Abbildung 17, A und B). Die Gelspuren, die in Abbildung 17 mit „x“ gekennzeichnet sind, entsprechen den 19 Klonen, die für die anschließende Sequenzierung ausgewählt wurden.

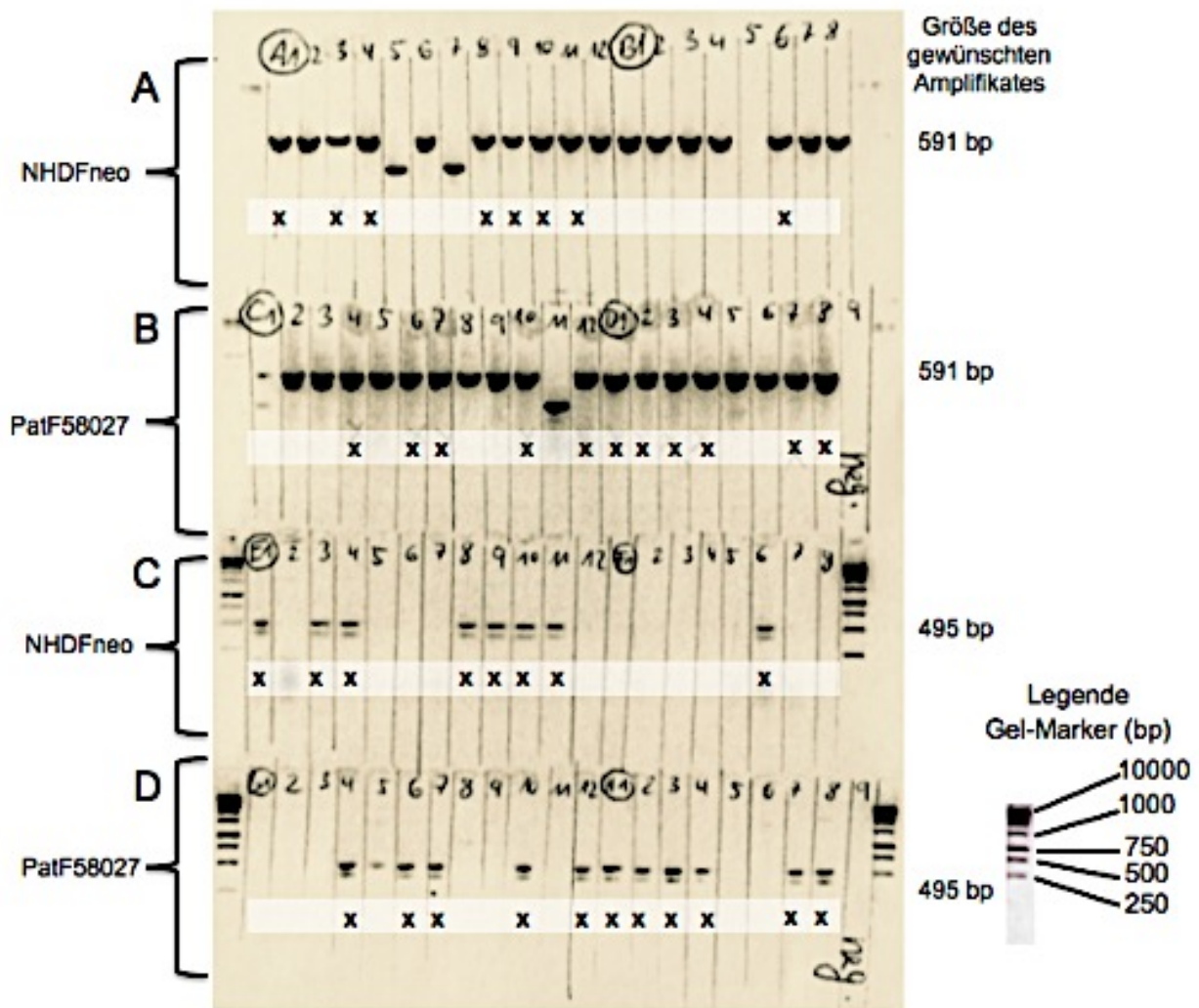


Abbildung. 17:

Agarosegelelektrophorese nach Klonierung. Das Agarosegel (1,5 %) zeigt die PCR-Amplifikate erzeugt mit den Primerpaaren VektorPrimer\_F/R (A, B; erwartete Produktgröße 592 bp), welches die klonierten Fragmente nachweist und mit VektorPrimer\_F/NDUFB3\_cDNA\_R (C, D; erwartete Produktgröße 495 bp), mit dem die Orientierung der klonierten Fragmente festgestellt wurde. Als Template wurde Zelllysate von *E.-coli*-Klonen verwendet, die mit Exon 2 und 3 des *NDUFB3*-Gens aus PatF58027 und NHDFneo transformiert worden waren. Die jeweils erste und letzte Spur enthält den Molekulargewichtsstandard GeneRuler 1 kb DNA (Fermentas). Die mit „neg.“ beschrifteten Spuren enthalten die Negativkontrolle (ohne Template-DNA). Die mit „x“ gekennzeichneten Spuren markieren die Transformanten, die das klonierte Genfragment in richtiger Orientierung enthalten und für die Sequenzierung ausgewählt wurden.

Um die klonierten Fragmente zu überprüfen, wurden alle 19 Klone sequenziert. Auf Grundlage der Sequenzdaten wurden drei Klone ausgewählt, welche die gewünschten

Allele trugen. Die so selektierten Vektoren erhielten die Bezeichnungen NHDFneo-Wt, PatF58027-ms und PatF58027-ns.

### 3.5 Ergebnisse der Rescue-Experimente

Für die Transduktion wurde Blastizidin als Selektionsmarker verwendet (vgl. Kapitel 2.5.6). Eine Konzentration von 2 µg/mL Medium erwies sich als geeignet. Bei dieser Konzentration begann die Apoptose an Tag 7; an Tag 10 waren alle Zellen abgestorben.

#### Transduktion

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Transduktionen.

Durch die Transduktion exprimieren drei Zelllinien der Patientin und drei Kontrollzelllinien zusätzlich zu den endogenen *NDUFB3*-Allelen jeweils den WT oder eine der beiden Varianten.

Transduktions-Ansatz	Ursprungszelllinie und transduzierte cDNA	Zielzelllinie
I	NHDFneo-Wt	PatF58027 (Patient)
II	PatF58027-ms	
III	PatF58027-ns	
IV	NHDFneo-Wt	NHDFneo (Wildtypkontrolle)
V	PatF58027-ms	
VI	PatF58027-ns	

Tabelle 3: Liste der durchgeführten Transduktionen (vgl. dazu auch das Studiendesign in Abbildung. 7, Kapitel 2.4)

An die Transduktion schloss sich die 10-tägige Selektion mit Blastizidin (2 µg/mL) an, um stabil transduzierte Zellen zu selektieren. Die selektierten Linien wurden in Erweiterung der bereits verwendeten Bezeichnungen als PatF58027-T-Wt, PatF58027-T-ms, PatF58027-T-ns und NHDFneo-T-Wt, NHDFneo-T-ms und NHDFneo-T-ns bezeichnet, wobei das „T“ für transduziert steht.

### 3.5.1 Messung der Enzymaktivität des Komplexes I in den transduzierten Zelllinien

Um einen überadditiven Effekt der Transgene durch die Überexpression zuerkennen, wurde zusätzlich zu PatF58027 eine Wildtypkontrolle NHDFneo mit den Genvarianten NHDFneo-Wt, PatF58027-ms und Pat58027-ns transduziert.

Die transduzierten Kontrollzelllinien zeigten eine relative KI-Enzymaktivität von 88 % nach Expression des Wildtyps (NHDFneo-T-Wt) und 94 % (NHDFneo-T-ms) nach Expression der missense-Mutation. Das Einschleusen der nonsense-Mutation senkte die KI-Enzymaktivität in der Kontrollzelllinie deutlich auf 31 %.

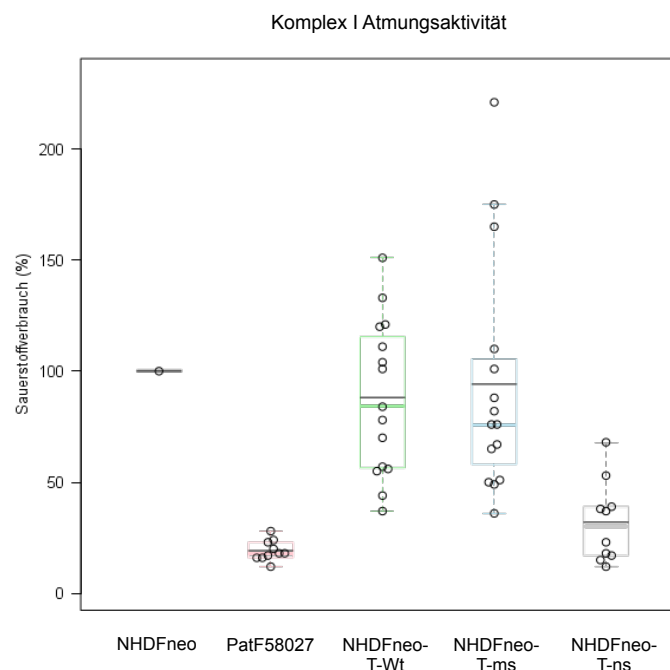


Abbildung. 18:

Relative KI-Enzymaktivität (gemessen am Rotenon-sensitiven-Sauerstoffverbrauch in %) der nicht transduzierten Zelllinien NHDFneo und PatF58027 verglichen mit den transduzierten (T) NHDFneo-Linien. Die Aktivität von NHDFneo wurde auf 100 % festgesetzt. Die Durchschnittswerte der anderen Zelllinien sind: PatF58027: 19 %, NHDFneo-T-Wt: 88 %, NHDFneo-T-ms: 94 %, NHDFneo-T-ns: 31 %. Die Box enthält die mittleren 50 % der Messwerte. Die farbigen Balken in der Box stellen den Median dar, die schwarze Linie innerhalb der Box zeigt den Mittelwert. Die Whisker geben die übrigen 50 % der Messwerte im oberen und unteren Quartil an.

Die KI-Enzymaktivität der Patientenzelllinie stieg nach der Transduktion mit dem *NDUFB3*-Wildtyp (PatF58027-T-Wt) von 19 % auf 90 %. Nach Einschleusen der missense-Mutation (PatF58027-T-ms) und der nonsense-Mutation (PatF58027-T-ns) verblieb die Aktivität erniedrigt bei 12 % (ms-Mutation) bzw. 17 % (ns-Mutation), siehe Abbildung 19.

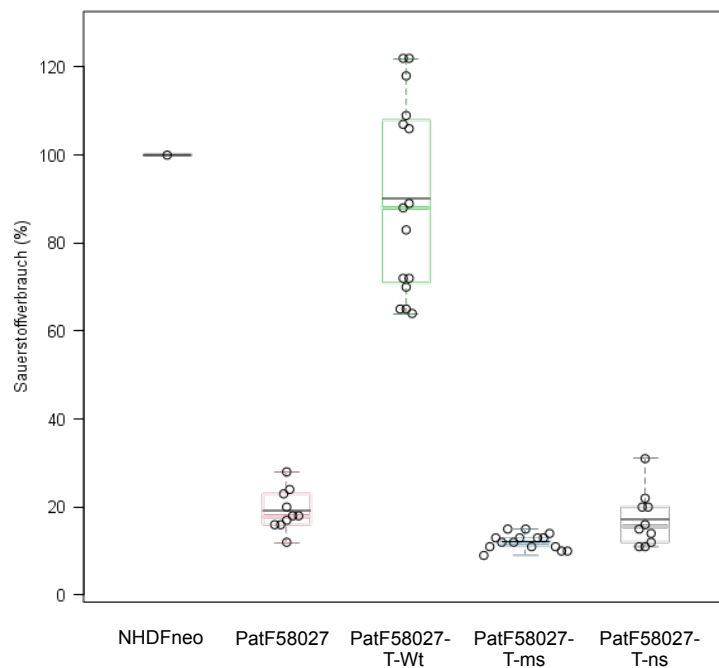


Abbildung. 19:

Relative KI-Atmungsaktivität (gemessen am Sauerstoffverbrauch in %) der nicht transduzierten Zelllinien NHDFneo und PatF58027 verglichen mit den transduzierten (T) PatF58027-Linien. Die Enzymaktivität der Kontrolle NHDFneo wurde auf 100 % festgesetzt. Die Durchschnittswerte der anderen Zelllinien sind: PatF58027: 19 %, PatF58027-T-Wt: 90 %, PatF58027-T-ms: 12 %, PatF58027-T-ns: 17 %. Die Box enthält die mittleren 50 % der Messwerte. Die farbigen Balken in der Box stellen den Median dar, die schwarze Linie innerhalb der Box zeigt den Mittelwert. Die Whisker geben die übrigen 50 % der Messwerte im oberen und unteren Quartil an.

### 3.5.2 Proteinuntersuchungen mittels Western Blot

Nach Untersuchung der KI-Enzymaktivität in den Patientenzellen folgte die Studie über die Auswirkung der Mutationen auf die Proteinexpression von NDUFB3. Zur Beurteilung des NDUFB3-Proteines in den nicht transduzierten und transduzierten Zellen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Zusätzlich wurden auch Antikörper gegen die Proteine weiterer Untereinheiten des KI (NDUFB8, NDUFA9, NDUFS1, NDUFS3) sowie des Komplexes III (Core 2) verwendet. Möglicherweise können die Ergebnisse Auskunft über eine Substanzreduktion bzw. eine gestörte Assemblierung des KI geben. Abbildung 20 zeigt eine schematische Darstellung der Atmungskette mit Zuordnung der verwendeten Antikörper.

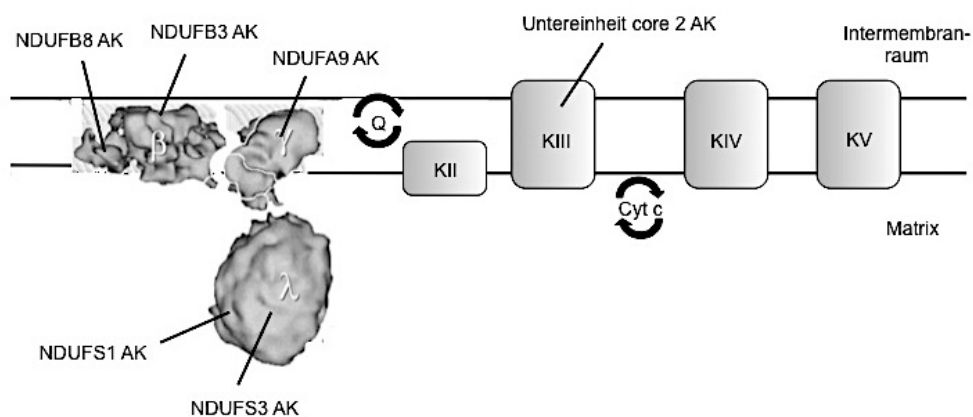


Abbildung. 20:

Lokalisation der Zielproteine in der Atmungskette für die im Western Blot verwendeten Antikörper. Die Darstellung zeigt von links nach rechts die in die mitochondriale Membran eingebetteten Komplexe I bis V und die für KI und seine Untereinheiten sowie für KIII verwendeten Antikörper. KI: NDUFB8 und NDUFB3 (β-Arm), NDUFA9 (γ-Arm), NDUFS1 und NDUFS3 (λ-Arm) KIII: Core 2, Q = Coenzym Q10, Cyt c = Cytochrom c (Abbildung modifiziert nach Koopman 2010, ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING 12/12, published by Mary Ann Liebert, Inc., New Rochelle, NY).

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Experimente. In allen Versuchen wurde als mitochondrialer Ladekontroll-Antikörper 1 µg/mL Porin verwendet (39 kDa).

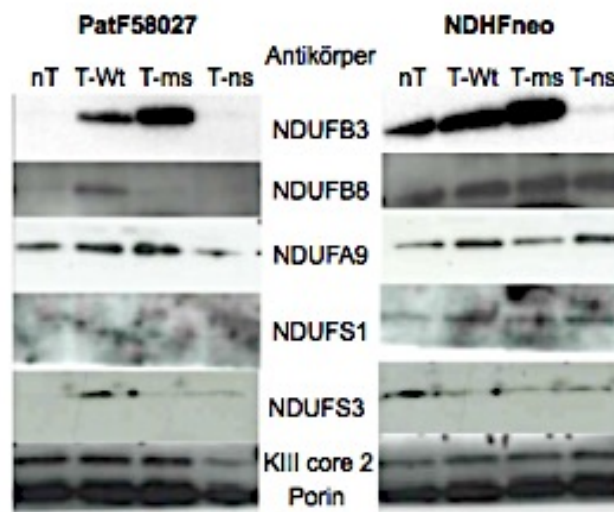


Abbildung. 21:

Western Blot der PatF58027- und NHDFneo-Zelllinien vor (nT – nicht transduziert) und nach der Transduktion mit dem Wildtyp (T-Wt), der missense-Mutation (T-ms) und der nonsense-Mutation (T-ns). Bei allen Proben wurde Porin als interne Ladungskontrolle mitgeführt und ist hier beispielhaft für den Nachweis des Core 2-Proteins im KIII abgebildet.

Die Proteine NDUFB3, NDUF3 und NDUFB8 waren in PatF58027 gar nicht, bzw NDUFB8 nur mit einer schwachen Intensität nachweisbar. Nach Einbringen der Wildtyp-cDNA in PatF58027 wurden die drei Proteine wieder eindeutig exprimiert. Die Signale des NDUF9- und Core-2-Proteins aus KIII waren in PatF58027 vor und nach der Transduktion zu detektieren.

Durch die Transduktion der ms-Mutation in die Patientenzellen ließen sich NDUFB3 und NDUF3 wieder nachweisen.

Das Einbringen der ns-Mutation in PatF58027 führte zu einer deutlichen Reduktion der Signalstärke.

Die Detektion der Untereinheit NDUF1 in PatF58027 war leider aufgrund vieler fleckenartiger Signale nicht auswertbar. Die Ursache für den hohen Hintergrund ist unklar; evtl. könnte ein wiederholtes Stripping der Membran dazu beigetragen haben.

Die Rescue-Experimente für die Wildtypzelllinie NHDFneo ergaben im Vergleich zur nicht transduzierten Ausgangslinie nur wenige Signaländerungen. Alle untersuchten Proteine konnten unabhängig davon, ob der Wildtyp, oder die missense- bzw.

nonsense-Mutation für den Gentransfer verwendet worden war, weiterhin dargestellt werden. Lediglich die Signalstärken änderten sich in einigen Fällen.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Proteinexpression (vgl. Kapitel 3.5.1) sowie der Komplex I-abhängigen Atmungsaktivitätsmessungen zusammengefasst. Die Klassifizierung der Signalintensitäten erfolgte durch visuellen Vergleich mit der Kontrolle Porin. Die Ergebnisse für die Untereinheit NDUFS1 wurden in der Tabelle nicht aufgeführt, da sie für die Zelllinie PatF58027 nicht auswertbar waren und da sich die Signalstärken von NHDFneo vor und nach den Transduktionen nicht unterschieden.

Zelllinie ( <i>NDUFB3</i> - Genotyp)	Rescue mit Genotyp	Relative Atmungs- aktivität KI (%)	Genexpression (Signalstärke im Western Blot)				
			<i>NDUFB3</i>	<i>NDUFB8</i>	<i>NDUFS3</i>	<i>NDUFA9</i>	KIII Core 2
<b>NHDFneo</b> (Wt)	-	100	+++	++	+	+	++
	Wt	88	+++	++	(+)	+	++
	ms	94	+++	++	(+)	+	++
	ns	31	(+)	++	(+)	+	++
<b>PatF58027</b> (ms/ns)	-	19	-	(+)	-	++	++
	Wt	90	++	++	+	++	++
	ms	12	+++	?	(+)	++	++
	ns	17	-	?	(+)	+	+

Abkürzungen: - = nicht transduziert, Wt = Wildtyp, ms = missense-Mutation, ns = nonsense-Mutation  
Signalintensität: +++ = sehr stark, ++ = stark, + = mittel, (+) = schwach, ? = fraglich, - = kein Signal

Tabelle. 4:

Ergebnisse der Messung der Enzymaktivität des KI und der Untersuchung der Proteinuntereinheiten des KI und KIII (Core 2) vor und nach Transduktion der Zelllinien PatF58027 und NHDFneo mit dem Wildtyp bzw. dem mutierten Gen *NDUFB3* (missense-, nonsense-Mutation).





**4 Diskussion**

---

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die potentiell pathogenen Varianten im Gen *NDUFB3* zu validieren und die Verdachtsdiagnose einer Mitochondriopathie bei einer Patientin molekulargenetisch zu bestätigen. Nach der Exomsequenzierung fiel der Fokus auf zwei compound heterozygote Mutationen im Gen *NDUFB3*, das ein Protein des Komplexes I (KI) der mitochondrialen Atmungskette kodiert. Zum Zeitpunkt der durchgeführten Exomsequenzierung und der Erstellung der Arbeit waren Mutationen im *NDUFB3*-Gen noch nicht als krankheitsverursachend für Mitochondriopathien beschrieben. Somit musste der Verdacht, dass die beiden Varianten in kausalem Zusammenhang mit der Erkrankung stehen könnten, funktionell bewiesen werden.

Hierfür wurden nach lentiviralem Gentransfer von drei *NDUFB3* Allelen (Wildtyp, missense- und nonsense-Mutation) in Patientenzellen und eine Kontrollzelllinie Atmungskettenenzymmessungen durchgeführt. Die Aktivität, speziell des KI, wurde vor und nach der Transduktion anhand des Sauerstoffverbrauchs der Zellen durch extrazelluläre Flussanalyse (Seahorse-System Bioscience) bestimmt. Zusätzlich wurde mittels Western Blot Untersuchungen der Einfluss der Mutationen in den nicht-transduzierten und transduzierten Zelllinien auf Proteinniveau untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits von Haack *et al.* (2012) im Rahmen einer Veröffentlichung über den Einsatz der Exomsequenzierung zur Identifizierung pathogener Mutationen Protein-kodierender Gene für den KI der Atmungskette publiziert.[25] In der Publikation handelt es sich bei der mit dem Code 50845 aufgeführten Person um die Patientin der Fallstudie dieser Arbeit.

Im Folgenden werden die experimentellen Ergebnisse vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes im Bereich der Mitochondriopathien diskutiert.

### Validierung der Mutationen

Zunächst wurden die in der DNA einer Blutprobe gefundenen Mutationen in der DNA einer Fibroblastenzellprobe dieser Patientin bestätigt.

Für die Untersuchung der KI-Aktivität wurde die extrazelluläre Flussanalyse (Seahorse<sup>®</sup>-System, Bioscience) gewählt. Das Hauptaugenmerk dieser Methode ist, dass sich multiple Zelllinien parallel in der 96er Mikrotiterplatte untersuchen lassen, verglichen mit einem Respirometer (O2k, Oroboros Instruments, Österreich), welches lediglich zwei Zellkammern à 2 mL hat. Außerdem befinden sich die Zellen nicht in einer Zellsuspension und müssen dafür kurz vor der Analyse geerntet werden, sondern sind

ausplattiert und angewachsen. Vergleicht man die Messdaten beider Verfahren miteinander ergeben sich laut Horan *et al.* (2012) keine signifikanten Unterschiede.[49] Eine zusätzlich durchgeführte Messung der Atmungsaktivität in einer Zellsuspension mit PatF58027 vs. NHDFneo im Respirometer (Daten nicht gezeigt) bestätigt die Vergleichbarkeit der Methoden auch im Fall dieser Studie.

Die in den Patientenfibroblasten bestimmte Enzymaktivität des KI vor der Transduktion betrug im Vergleich zur Wildtypkontrolle NHDFneo (= 100 %) nur 19 %. Nach Expression des *NDUFB3*-Wildtypallels in der Patientenzelllinie verbesserte sich die KI-Aktivität auf 90 % ( $\pm 22$ ). Eine Rekonstitution auf 100 % wurde nicht erzielt. Dies war in vergleichbaren Zell-Rescue-Experimenten anderer Studien auch nicht der Fall, in denen ebenfalls Patientenfibroblasten mit einer pathogenen Mutation mit der Wildtyp-cDNA transduziert worden waren.[50], [51], [52], [53] Eine mögliche Hypothese ist, dass nach der Transduktion mehrere Allele parallel exprimiert werden und die Wildtypproteine mit den mutierten Proteinen während der Assemblierung des KI konkurrieren.[53]

Im Western Blot konnte *NDUFB3* in den Patientenfibroblasten (PatF58027) nicht detektiert werden. Außerdem war *NDUFS3* nicht nachweisbar und *NDUFB8* allenfalls in einer ganz geringen Menge zuerkennen. Beide Proteine gehören zu Untereinheiten des KI. *NDUFB8* ist wie *NDUFB3* Teil des  $\beta$ -Armes und innerhalb der mitochondrialen Membran lokalisiert. *NDUFS3* gehört zum  $\lambda$ -Arm, dem hydrophilen Arm des KI, welcher sich in die mitochondriale Matrix erstreckt. Nach der Transduktion mit dem *NDUFB3*-Wildtyp war in den transduzierten Patientenzellen für alle untersuchten Proteine wieder eine kräftige Bande nachzuweisen. Die Expression von *NDUFB3*-cDNA in den Patientenfibroblasten führte somit zu einer Wiederherstellung der Komplex I-Enzymaktivität sowie der Menge an Protein *NDUFB3*, *NDUFS3* und *NDUFB8*.

Nach Transfer der missense (ms)- und nonsense (ns)-Mutation in PatF58027 blieb die Aktivität des KI mit 12 % bzw. 17 % erwartungsgemäß deutlich erniedrigt. Der Western Blot zeigte nach Expression der ms-Mutation ein sehr starkes Signal für *NDUFB3*. Durch die Überexpression des Allels mit der ms-Mutation wurde das *NDUFB3*-Protein nun in PatF58027-T-ms in großen Mengen synthetisiert, das Protein kann jedoch durch die Mutation seine physiologische Funktion nicht übernehmen. Die übrigen markierten Proteine blieben unverändert, weil die ns-Mutation zu einem Stoppcodon führt, welches die vollständige Transkription und somit die Synthese des *NDUFB3* Proteins verhindert. In der Kontrollzelllinie führte die Expression des Wildtyp-Allels (NHDFneo-T-Wt) und der ms-Mutation (NHDFneo-T-ms) nach der Transduktion zu einer geringen Signal-

verstärkung der Banden im Western Blot. Der Effekt ist durch die zusätzliche Proteinsynthese der Transgene in den Zellen bedingt und war zu erwarten. Die KI-Aktivität blieb jeweils erhalten. Auffallend war jedoch, dass nach Expression der ns-Mutation in der Kontrollzelllinie (NHDFneo-T-ns) die KI-Aktivität von NHDFneo-T-ns von 100 % auf 31 % ( $\pm 18$  %) abnahm. Korreliert mit dem Western Blot fiel ausschließlich die reduzierte Proteinexpression von NDUFB3 auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der CMV Promoter des Transgens so stark ist, dass es zu einer deutlich gesteigerten Expression des ns-Allels in den einzelnen Zellen kommt. Die Menge an NDUFB3-Wildtyp Protein war somit zu gering, um die KI-Aktivität zu erhalten. Die alleinige Überexpression des Wt-Transgenes in der Kontrollzelllinie hatte keinen positiven Effekt auf die KI-Enzymaktivität.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die compound heterozygoten Mutationen (ms/ns) im Gen *NDUFB3* für den Komplex-I-Defekt der Patientin verantwortlich sind und somit das Krankheitsbild einer Mitochondriopathie erklären.

Neben der Detektierung von verschiedenen KI-Untereinheiten wurde zur Kontrolle auch ein Protein des Komplexes III in der Western Blot-Analyse berücksichtigt. Nach dem „solid state“-Modell zur Anordnung der einzelnen Atmungskettenkomplexe in der mitochondrialen Membran kann es zur Formation eines funktionsfähigen Superkomplexes aus KI und KIII<sub>2</sub> kommen.[54] Die Untereinheit Core 2 aus KIII wurde sowohl in der nicht-transduzierten als auch in allen transduzierten Patientenzelllinien nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit derjenigen der enzymatischen Untersuchung der KIII-Aktivität (Tabelle 1) überein, die im unteren Normbereich lag. Die Mutationen haben in Anlehnung an diese Ergebnisse mutmaßlich keinen signifikanten Einfluss auf den KIII.

Andere Arbeiten zur Validierung von Komplex I-Defekten zeigten ähnliche Ergebnisse: Die missense-Mutation allein führt nur bei Homozygotie zur Erkrankung, wie Calvo *et al.* (2012) beschrieben haben.[55] Die von den Autoren untersuchte Patientin war homozygot für die ms-Mutation im *NDUFB3*-Gen (c.64T>C), hatte eine schwere postnatale Laktatazidose und verstarb im 4. Lebensmonat. Die gesunde Mutter war nachgewiesenermaßen heterozygote Trägerin der Mutation. Die Autoren führten ebenfalls Zell-Rescue-Experimente mit dem Wildtyp von *NDUFB3* durch. Dies verbesserte die KI-Atmungsaktivität von zuvor 15 % auf nahezu Normalniveau.

Danhauser *et al.* (2011) identifizierten eine compound heterozygote missense-Mutation im Gen *NDUFS1* des KI und verifizierten diese ebenfalls durch Zell-Rescue.[53]

Haack *et al.* (2012) beschrieben erstmalig eine homozygote Mutation im Gen *NDUFB9* zweier Brüder mit Mitochondriopathie, die zu einer deutlichen Minderung der KI-Atmungsaktivität führte, die *in vitro* ebenfalls mittels Zell-Rescue-Experimenten rekonstituiert werden konnte.[25]

Alston *et al.* (2016) analysierten eine Kohorte von 10 Patienten (9 irischen Ursprungs) mit identischen homozygoten missense Mutationen im Gen *NDUFB3* (c.64T>C, p.Trp22Arg). Von drei Patienten konnten Muskelbiopsien immunhistologisch untersucht werden, die eine deutliche Reduktion des zum Teil noch voll assemblierten Komplexes I ergab. Klinisch präsentierten die Patienten überwiegend milde Symptome, die Blutlaktatwerte waren weitgehend normal, keine zerebralen Anfälle oder andere neurologischen Auffälligkeiten. Beachtlich erschien jedoch die Genotyp-Phänotyp-Korrelation unter den Patienten. Allesamt waren kleinwüchsig, und hatten gleichartige Gesichtszüge mit prominenter Stirn, glattem Philtrum und tiefstehenden Augen.[56] Diese Erkenntnisse sind für Kliniker hilfreich, weil Komplex I-Defekte durch ihre Symptomheterogenität rein phänotypisch kaum beschriebene Hinweise auf die Art des zugrunde liegenden genetischen Defektes geben und bei Identifizierung die Diagnosestellung beschleunigen können. In Verbindung mit der vorliegenden Arbeit ist eine detaillierte körperliche Untersuchung der Patientin auf besondere Merkmale nicht erfolgt.

#### Auswirkung der Mutation auf die Assemblierung des KI

Die Analyse von Patienten mit genetisch verifizierten Mutationen in einzelnen Untereinheiten oder Assemblierungsfaktoren des KI kann Aufschluss über Struktur, Funktion, Pathophysiologie und zeitlichen Ablauf der Assemblierung des Komplexes geben. Laut Koopman *et al.* (2013) handelt es sich bei *NDUFB3* um ein 'accessory' or 'supernumerary' Protein, das vermutlich zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt. *NDUFS3* ist Teil des hydrophilen Armes, der in die mitochondriale Matrix hineinragt und an dem die Redoxreaktionen stattfinden.[15]

*NDUFB3* und *NDUFS3* wurden durch die eigenen Western Blot-Ergebnisse in der Patientenzelllinie nicht nachgewiesen, *NDUFB8* nur in sehr geringer Menge. Die *NDUFB3*-Mutationen haben somit nicht nur einen negativen Effekt auf die  $\beta$ -Untereinheit (*NDUFB8* und *NDUFB3*), sondern auch auf die  $\lambda$ -Untereinheit (*NDUFS3*) des KI, was ihre Pathogenität noch einmal unterstreicht.

Ein Einfluss der erforschten Mutationen auf die  $\gamma$ -Untereinheit ist bei der exemplarischen Detektion des Proteins NDUFA9 im Western Blot nicht nachzuweisen.

### Humangenetische Beratung

Derzeit gibt es noch keine kurative Therapie für Patienten mit einer Mitochondriopathie. Neue Erkenntnisse der Grundlagenforschung über Assemblierung und Funktionen des KI könnten die pathophysiologische Basis für zukünftige Therapieansätze sein. Betroffenen kann momentan in den meisten Fällen lediglich eine symptomorientierte Behandlung angeboten werden.[15] Umso wichtiger ist die genetische Beratung für Eltern mit einem an Mitochondriopathie erkrankten Kind, die eine weitere Schwangerschaft anstreben. Ein Großteil aller mutationsbedingten Komplex I-Defekte sind nukleären Ursprungs.[13], [57] Ist auch der Genotyp der Eltern bekannt, kann die Berechnung des Wiederholungsrisikos für einen autosomal-rezessiven Erbgang und die anschließende genetische Beratung eine wichtige Entscheidungshilfe für die Eltern sein. Im Falle der Patientin dieser Arbeit mit den autosomal-rezessiv vererbten compound heterozygoten Mutationen im Gen *NDUFB3* beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass ein weiteres Kind beide mutierten Allele erben würde, 25 %.

Kommt es zu einer weiteren Schwangerschaft, können auf Wunsch der Eltern identifizierte nukleäre Mutationen pränatal in fötalen Zellen, die durch Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie gewonnen wurden, nachgewiesen werden. Häufig exprimieren Chorionzellen oder Fibroblasten jedoch keinen enzymatischen Gendefekt, so dass bei bekanntem Gendefekt der Eltern der genetische Nachweis der enzymatischen Bestimmung überlegen ist.[22]

Liegt die Ursache einer Mitochondriopathie in einer Mutation der mtDNA ist eine unterstützende Beratung sowie eine zuverlässige Pränataldiagnostik schwierig. Der Prozentsatz an Heteroplasmie, also dem Verhältnis zwischen mutierter und nicht mutierter mtDNA in unterschiedlichen Geweben des Ungeborenen, kann variieren und die Ergebnisse der Diagnostik beeinflussen.[22], [17]

Großbritannien erlaubt seit dem 27.01.2015 als erstes Land für betroffene Paare die anonyme Spende von Mitochondrien an Frauen mit genetisch diagnostizierter Mutation in ihrer mtDNA, die Auslöser einer Mitochondriopathie ist.[58], [59] Abgesehen davon, dass die heutige Rechtslage in Deutschland eine Zulassung dieser Methode eindeutig ausschließt, bleibt abzuwarten, ob in den wenigen Fällen von durch mt-DNA-Mutationen verursachten Mitochondriopathien die Mitochondrienspende eine Therapieoption sein

kann. Der Kern der mütterlichen Eizelle wird in die kernlose Spendereizelle transferiert. Ein mögliches Risiko dabei ist, dass eventuell am Zellkern anhaftende Mitochondrien mit ihren mutierten Genen ebenfalls übertragen werden und es so zu einer Heteroplasmie kommt.[59]

Studien zur Identifizierung krankheitsverursachender Mutationen sind notwendig, um den betroffenen Patienten eine molekulare Diagnose ihrer Mitochondriopathie zu geben und die Familie gezielt genetisch beraten zu können.

Die Mutationen im Gen *NDUFB3* verursachten eine starke Minderung der KI-Enzymaktivität und führten zu einer Störung der Assemblierung des KI. Daher ist das Gen ein weiterer wichtiger Kandidat für Screening-Sequenzierungen von Patienten mit Mitochondriopathie. Es erweitert das verantwortliche Genrepertoire der Gene für Mitochondriopathien, bei denen eine Verminderung der biochemischen Aktivität zu erwarten ist.



## 5 Literaturverzeichnis

---

1. Henle F. Allgemeine Anatomie. Lehre von den Mischungs- und Formbestandteilen des menschlichen Körpers. 6. Aufl. Leipzig: Leopold Verlag; 1841. 150–216 S.
2. Distelmaier F, Koopman WJH, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willems PHGM, Smeitink JAM. Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain*. April 2009;132(Pt 4):833–42.
3. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod*. August 2000;63(2):582–90.
4. Koopman WJH, Distelmaier F, Smeitink JAM, Willems PHGM. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J*. 9. Januar 2013;32(1):9–29.
5. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008. 164–177 S.
6. Angerer H, Zwicker K, Wumaier Z, Sokolova L, Heide H, Steger M, Kaiser S, Nübel E, Brutschy B, Radermacher M, Brandt U, Zickermann V. A scaffold of accessory subunits links the peripheral arm and the distal proton-pumping module of mitochondrial complex I. *Biochem J*. 15. Juli 2011;437(2):279–88.
7. Formosa LE, Dibley MG, Stroud DA, Ryan MT. Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Semin Cell Dev Biol*. April 2018;76:154–62.
8. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *The Journal of Pathology*. 2017;241(2):236–50.
9. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn DR, Ryan MT. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. Juni 2012;1817(6):851–62.
10. Dieteren CEJ, Koopman WJH, Swarts HG, Peters JGP, Maczuga P, van Gemst JJ, Masereeuw R, Smeitink JAM, Nijtmans LGJ, Willems PHGM. Subunit-specific incorporation efficiency and kinetics in mitochondrial complex I homeostasis. *J Biol Chem*. 7. Dezember 2012;287(50):41851–60.
11. Thorburn DR. Mitochondrial disorders: Prevalence, myths and advances. *J Inherit Metab Dis*. 1. Mai 2004;27(3):349–62.
12. Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*. August 2003;126:1905–12.

13. Triepels R h., Van Den Heuvel L p., Trijbels J m., Smeitink J a. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet.* 1. März 2001;106(1):37–45.
14. Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1. Juni 2011;1807(6):620–5.
15. Pagniez-Mammeri H, Loublier S, Legrand A, Bénit P, Rustin P, Slama A. Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin I. Structural genes. *Mol Genet Metab.* Februar 2012;105(2):163–72.
16. Koopman WJH, Nijtmans LGJ, Dieteren CEJ, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JAM, Willems PHGM. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal.* 15. Juni 2010;12(12):1431–70.
17. Sperl W, Mayr ja, Freisinger P. Diagnostik und Therapie von Mitochondriopathien. *Zeitschrift für Neurologie des Kindes- und Jugendalters und ihre Grenzgebiete*, 2008;7(4):106 – 115. - Google-Suche [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: <https://silو.tips/download/zeitschrift-fr-neurologie-des-kindes-und-jugendalters-und-ihre-grenzgebiete-7-jg>
18. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.* 1. Juni 2013;106(1):135–59.
19. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet.* Mai 2001;2(5):342–52.
20. dbSNP Home Page [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
21. HGMD® home page [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
22. AWMF-Leitlinie. Sperl W, Burgard P, Freisinger P, Mayr H, Schülke M. Diagnostik und Therapieansätze bei Mitochondriopathien im Kindes- und Jugendalter. Ergebnisse von 3 Expertenkonferenzen Dzt. 2009. - Google-Suche [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: [http://www.mito-center.org/mito-center.org/fileadmin/user\\_upload/LLUpdateAWMF2009Final.pdf](http://www.mito-center.org/mito-center.org/fileadmin/user_upload/LLUpdateAWMF2009Final.pdf)
23. Klauwer D, Neuhäuser C, Thul J, Zimmermann R. Pädiatrische Intensivmedizin - Kinderkardiologische Praxis. 1. Aufl. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2013. 409 S.
24. PDHA1 Gene - GeneCards | ODPa Protein | ODPa Antibody [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: <http://www.genecards.org/cgi->

bin/carddisp.pl?gene=PDHA1

25. Haack TB, Haberberger B, Frisch E-M, Wieland T, Iuso A, Gorza M, Strecker V, Graf E, Mayr JA, Herberg U, Hennermann JB, Klopstock T, Kuhn KA, Ahting U, Sperl W, Wilichowski E, Hoffmann GF, Tesarova M, Hansikova H, Zeman J, Plecko B, Zeviani M, Wittig I, Strom TM, Schuelke M, Freisinger P, Meitinger T, Prokisch H. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet.* April 2012;49(4):277–83.
26. Bourgeron T, Chretien D, Amati P, Rötig A, Munnich A, Rustin P. Expression of respiratory chain deficiencies in human cultured cells. *Neuromuscular Disorders.* 1. Januar 1993;3(5):605–8.
27. Empfehlungen zum sicheren Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen in TPP-Kryoröhrchen. Berlin:Biochrom AG, 2011. (Accessed May 8, 2015, at [http://www.biochrom.de/fileadmin/user\\_upload/service/Tipps\\_und\\_Hinweise/deutsch/110616\\_biochrom\\_anwendung\\_faq\\_kryoroehrchen.pdf](http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/Tipps_und_Hinweise/deutsch/110616_biochrom_anwendung_faq_kryoroehrchen.pdf).) - Google-Suche [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: <https://docplayer.org/4865466-En-zum-sicheren-einfrieren-und-auftauen-von-zellkulturen-in-tpk-kryoroehrchen.html>
28. QIAGEN Plasmid Plus Purification Handbook — April 2012 - (EN) [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=0bc0a0fe-480e-4e5e-b6e2-e75a654dd791&lang=en>
29. (EN) - AllPrep DNA/RNA Mini Handbook - QIAGEN [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/de/resources/%20resourcedetail?id=bbd50261-3b80-4657-ad58-6a5a97b88821&lang=en>).
30. MAN0012716\_RevertAid\_FirstStrand\_cDNA\_Syn\_K1622\_UG.pdf [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716\\_RevertAid\\_FirstStrand\\_cDNA\\_Syn\\_K1622\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf)
31. Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Corporation Notes*, 1998;65:27. - Google-Suche [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: <https://www.semanticscholar.org/paper/Betaine-and-DMSO-%3A-Enhancing-Agents-for-PCR-Frackman-Kobs/0bc6fc3bcc9a6333b098fa1cc374e6388fc67ac1>
32. Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology.* September 2000;32(3):626–9.
33. Coutlée F, Viscidi RP, Saint-Antoine P, Kessous A, Yolken RH. The polymerase

chain reaction: a new tool for the understanding and diagnosis of HIV-1 infection at the molecular level. *Molecular and Cellular Probes*. 1. August 1991;5(4):241–59.

34. Sacace Biotechnologies [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: <http://www.sacace.com/manuals.htm>

35. invitrogen™. pLenti6.3/V5-TOPO® and pLenti7.3/V5-TOPO® TA Cloning® Kits. 2007.

36. UM\_PCRcleanup\_NFast96.pdf [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/DNA%20cleanup/UM\\_PCRcleanup\\_NFast96.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20cleanup/UM_PCRcleanup_NFast96.pdf)

37. cms\_081527.pdf [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_081527.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf)

38. Staden Package Home [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: <http://staden.sourceforge.net/>

39. QIAGEN Plasmid Plus Purification Handbook — April 2012 - (EN) [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=0bc0a0fe-480e-4e5e-b6e2-e75a654dd791&lang=en>

40. Kimura M, Takatsuki A, Yamaguchi I. Blastocidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 22. November 1994;1219(3):653–9.

41. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. Juni 2004;33(2):95–103.

42. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. November 1998;72(11):8463–71.

43. virapower\_lentiviral\_system\_man.pdf [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/virapower\\_lentiviral\\_system\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf)

44. litdoc28982942\_20170725152449.pdf [Internet]. [zitiert 10. September 2017].

Verfügbar unter:

[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1500992712338/litdoc28982942\\_20170725152449.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1500992712338/litdoc28982942_20170725152449.pdf)

45. litdoc28999897\_20161015021727.pdf [Internet]. [zitiert 10. September 2017].

Verfügbar unter:

[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc28999897\\_20161015021727.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc28999897_20161015021727.pdf)

46. Scepter™ 2.0 Cell Counter - How it Works | Life Science Research | Merck

[Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter:

<http://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/cell-analysis/scepter-cell-counter/how-it-works/gRSb.qB.oKMAAAFAUlg.1ab4,nav>

47. Dot Plot [Internet]. [zitiert 10. September 2017]. Verfügbar unter:

<http://data.vanderbilt.edu/~graywh/dotplot/>

48. Lonza\_ManualsProductInstructions\_TechSheet\_-\_Dermal\_Fibroblast\_Cell\_Systems\_NHDF.pdf [Internet]. [zitiert 9. September 2017].

Verfügbar unter:

[http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_TechSheet\\_-\\_Dermal\\_Fibroblast\\_Cell\\_Systems\\_NHDF.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_TechSheet_-_Dermal_Fibroblast_Cell_Systems_NHDF.pdf)

49. Horan MP, Pichaud N, Ballard JWO. Review: Quantifying Mitochondrial Dysfunction in Complex Diseases of Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1. Oktober 2012;67(10):1022–35.

50. Hoefs SJG, Dieteren CEJ, Rodenburg RJ, Naess K, Bruhn H, Wibom R, Wagena E, Willems PH, Smeitink JAM, Nijtmans LG, van den Heuvel LP. Baculovirus complementation restores a novel NDUFAF2 mutation causing complex I deficiency. *Hum Mutat*. Juli 2009;30(7):E728-736.

51. Gerards M, Sluiter W, van den Bosch BJC, de Wit LEA, Calis CMH, Frentzen M, Akbari H, Schoonderwoerd K, Scholte HR, Jongbloed RJ, Hendrickx ATM, de Coo IFM, Smeets HJM. Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome. *J Med Genet*. August 2010;47(8):507–12.

52. Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, Kirby DM, Crawford G, Burt NP, Rivas M, Guiducci C, Bruno DL, Goldberger OA, Redman MC, Wiltshire E, Wilson CJ, Altshuler D, Gabriel SB, Daly MJ, Thorburn DR, Mootha VK. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet*. Oktober 2010;42(10):851–8.

53. Haack TB, Danhauser K, Haberberger B, Hoser J, Strecker V, Boehm D, Uziel G, Lamantea E, Invernizzi F, Poulton J, Rolinski B, Iuso A, Biskup S, Schmidt T, Mewes H-W, Wittig I, Meitinger T, Zeviani M, Prokisch H. Exome sequencing identifies ACAD9

mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet.* Dezember 2010;42(12):1131–4.

54. Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR, Ryan MT. Analysis of the Assembly Profiles for Mitochondrial- and Nuclear-DNA-Encoded Subunits into Complex I. *Mol Cell Biol.* Juni 2007;27(12):4228–37.

55. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, Lim SC, Lieber DS, Tucker EJ, Laskowski A, Garone C, Liu S, Jaffe DB, Christodoulou J, Fletcher JM, Bruno DL, Goldblatt J, Dimauro S, Thorburn DR, Mootha VK. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 25. Januar 2012;4(118):118ra10.

56. Alston CL, Howard C, Oláhová M, Hardy SA, He L, Murray PG, O’Sullivan S, Doherty G, Shield JPH, Hargreaves IP, Monavari AA, Knerr I, McCarthy P, Morris AAM, Thorburn DR, Prokisch H, Clayton PE, McFarland R, Hughes J, Crushell E, Taylor RW. A recurrent mitochondrial p.Trp22Arg NDUFB3 variant causes a distinctive facial appearance, short stature and a mild biochemical and clinical phenotype. *J Med Genet.* 2016;53(9):634–41.

57. Loeffen J I. c. m., Smeitink J a. m., Trijbels J m. f., Janssen A j. m., Triepels R h., Sengers R c. a., van den Heuvel L p. Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat.* 1. Februar 2000;15(2):123–34.

58. Zeitung Ä. Mitochondrien-Spenden: Großbritannien erlaubt „Drei-Eltern-Babys“ [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: [https://www.aerztezeitung.de/politik\\_gesellschaft/gesundheitspolitik\\_international/article/878583/mitochondrien-spenden-grossbritannien-erlaubt-drei-eltern-babys.html](https://www.aerztezeitung.de/politik_gesellschaft/gesundheitspolitik_international/article/878583/mitochondrien-spenden-grossbritannien-erlaubt-drei-eltern-babys.html)

59. Mitochondrien-Spende: Drei Eltern, ein Kind und viele offene Fragen [Internet]. [zitiert 9. September 2017]. Verfügbar unter: [http://www.wissensschau.de/reproduktionsmedizin/mitochondrien\\_spende\\_kuenstliche\\_befruchtung.php](http://www.wissensschau.de/reproduktionsmedizin/mitochondrien_spende_kuenstliche_befruchtung.php)

**6 Anhang**

---





## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Eva-Maria Wohlgemuth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Funktionelle Charakterisierung neu identifizierter *NDUFB3* Mutationen, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der obenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Die Publikation, die aus dieser Dissertation hervorgegangen ist und bei der ich Autor bin, entspricht den URM (s.o) und wird von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den

PD Dr. E. Knierim  
*betreuende Hochschullehrerin*

Eva-Maria Wohlgemuth  
*Doktorandin*

## **Anteilerklärung an erfolgter Publikation**

Eva-Maria Wohlgemuth (geb. Frisch) hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Haack TB, Haberberger B, Frisch EM, Wieland T, Iuso A, Gorza M, Strecker V, Graf E, Mayr JA, Herberg U, Hennermann JB, Klopstock T, Kuhn KA, Ahting U, Sperl W, Wilichowski E, Hoffmann GF, Tesarova M, Hansikova H, Zeman J, Plecko B, Zeviani M, Wittig I, Strom TM, Schuelke M, Freisinger P, Meitinger T, Prokisch H.

Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing.

J Med Genet. 2012;49(4):277 – 283.

Beitrag im Einzelnen:

Zell-Rescue-Experimente der Patientenfibroblasten (50845) und der Kontrollzelllinie (NHDFneo), Messungen zur Atmungsaktivität sowie Western Blots für die Genexpression ausgewählter Proteine vor und nach der Transduktion der genannten Ursprungs- und transduzierten Zelllinien.

PD Dr. E. Knierim  
*betreuende Hochschullehrerin*

Eva-Maria Wohlgemuth  
*Doktorandin*

Westkirchen, den

## **Lebenslauf**

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

## **Publikationsliste**

Haack TB, Haberberger B, Frisch EM, Wieland T, Iuso A, Gorza M, Strecker V, Graf E, Mayr JA, Herberg U, Hennermann JB, Klopstock T, Kuhn KA, Ahting U, Sperl W, Wilichowski E, Hoffmann GF, Tesarova M, Hansikova H, Zeman J, Plecko B, Zeviani M, Wittig I, Strom TM, Schuelke M, Freisinger P, Meitinger T, Prokisch H.

Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing.

J Med Genet. 2012;49(4):277 – 283.

## **Danksagung**

Aufrichtiger Dank gebührt Frau PD Dr. Ellen Knierim für die Übernahme der Betreuung und die hilfreichen Denkanstöße. Danke für den stets freundlichen Kontakt!

Herrn Dr. rer. nat. Holger Prokisch vom Helmholtz-Zentrum München danke ich für die Überlassung des spannenden Themas und die Möglichkeit, dieses Projekt eigenständig in den Laboren seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten.

Dank gebührt auch Herrn Dr. med. Tobias Haack für die stete Diskussionsbereitschaft, mit der er mir zur Seite stand.

Ferner danke ich Frau Anne Loeschner, Frau Dr. rer. nat. Birgit Haberberger, Frau Carola Fischer und meiner Mitdotorandin Frau Susanne Diener für die Einarbeitung in die Methodik und Experimente. Dank ihnen wird mir die Zeit im Labor unvergesslich bleiben.

Meinen Freundinnen Vera und Birte danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen und ihre motivierende Unterstützung, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beitrugen.

Mein allergrößter Dank gebührt jedoch dem unermesslichen Glück mit wunderbaren Eltern aufgewachsen zu sein und völlig sorgenfrei leben zu können; sowie meinem Mann Felix und meinen Kindern, die mich an vielen Abenden und Wochenenden unausgeglichen oder gar ungerecht erdulden mussten.