

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Humangenetik
Klinikum rechts der Isar
Helmholtz Zentrum München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger)

**Funktionelle Analyse von seltenen DNA-Varianten in
Genen, die mit einem Defekt des Atmungskettenkomplexes I
assoziiert sind**

Katharina Danhauser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

2. apl. Prof. Dr. M. Retz

3. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 20.06.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Mitochondrien	7
1.2 Das System der oxidativen Phosphorylierung	8
1.2.1 Komplex I – NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase	8
1.2.2 Komplex II – Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase.....	10
1.2.3 Komplex III – Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase	10
1.2.4 Komplex IV – Cytochrom c-Oxidase	10
1.2.5 Komplex V – F ₁ F ₀ -ATP-Synthase	11
1.3 Mitochondriale Erkrankungen.....	12
1.3.1 Allgemein	12
1.3.2 Vererbung.....	13
1.3.3 Defekte der oxidativen Phosphorylierung	14
1.3.3.1 Übersicht	14
1.3.3.2 Atmungskettenkomplex I-Defekt.....	15
1.4 Atmungskettenkomplex I-Defekt – Molekulargenetische Suche nach der Ursache...16	
2 Zielsetzung der Arbeit.....	18
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	20
3.1.1 DNA- und RNA-Isolierung	20
3.1.1.1 RNA und genomische DNA aus humanen Fibroblasten	20
3.1.1.2 Plasmid-DNA aus Bakterien	20
3.1.1.3 Konzentrationsbestimmung der RNA und der DNA	20
3.1.2 Reverse Transkription	21
3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
3.1.3.1 Amplifizierung von DNA-Sequenzen mittels PCR	21
3.1.3.2 Agarosegel-Elektrophorese	23
3.1.4 Mutagenese	23
3.2 Zellbiologische Methoden.....	24
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	24
3.2.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen	25
3.2.3 Kultivierung von Fibroblasten	25
3.2.4 Kontaminationstest auf HBV, HCV und HIV.....	25
3.2.5 Wachstumskurven	26
3.3 Methoden des Gentransfers	27

3.3.1	Transformation von Bakterien	27
3.3.2	Transfektion von primären Fibroblasten.....	27
3.3.2.1	Lipofektion.....	28
3.3.2.1.1	„FuGENE® HD Transfection Reagent“	28
3.3.2.1.2	„Effectene® Transfection Reagent“.....	28
3.3.2.1.3	„Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents“	29
3.3.2.2	Calciumphosphat-Präzipitation	30
3.3.2.3	Elektroporation.....	30
3.3.3	Lentiviraler Gentransfer	31
3.3.3.1	Verwendetes Vektorsystem	31
3.3.3.2	Protokoll	34
3.4	Biochemische Aktivitätsmessungen	35
3.4.1	Vorbereitung der Zellen.....	35
3.4.2	Bestimmung der Komplex I-Aktivität	36
3.4.3	Bestimmung der Komplex IV-Aktivität.....	38
3.4.4	Bestimmung der Aktivität der Citratsynthase	39
3.5	Westernblot.....	40
3.5.1	Mitochondrienanreicherung.....	40
3.5.2	Durchführung des Westernblots.....	40
3.6	Puffer, Lösungen und Medien	42
3.7	Reagenzien, Material und Geräte	47
4	Ergebnisse	51
4.1	Generierung einer stabilen Zelllinie.....	51
4.1.1	Transfektion	51
4.1.1.1	Lipofektion.....	52
4.1.1.1.1	Transfektion mit „FuGENE® HD Transfection Reagent“	52
4.1.1.1.2	Transfektion mit „Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents“	52
4.1.1.1.3	Transfektion mit „Effectene® Transfection Reagent“.....	53
4.1.1.2	Calciumphosphat-Präzipitation	54
4.1.1.3	Elektroporation.....	55
4.1.1.4	Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse	56
4.1.2	Transduktion.....	57
4.2	Etablierung eines Assays zur funktionellen Analyse von DNA-Varianten	58
4.2.1	Auswahl der Zelllinien - Patienten mit Mutationen in <i>NDUFS1</i>	58
4.2.2	Funktionelle Analyse und Komplementation des Defekts.....	59
4.2.2.1	Biochemische Aktivitätsmessungen	60
4.2.2.1.1	Referenzbereich für die biochemischen Aktivitätsmessungen	60
4.2.2.1.2	Messungen der Patientenzelllinien	61

4.2.2.2	Wachstumsverhalten	64
4.2.2.3	Westernblots	66
4.2.3	Zusammenfassung - Assay zur funktionellen Analyse von DNA-Varianten	67
4.3	Funktionelle Analyse potentiell krankheitsassoziierter Genvarianten	69
4.3.1	Patienten mit Mutationen in <i>NDUFB9</i>	69
4.3.1.1	Biochemische Aktivitätsmessungen	69
4.3.1.2	Wachstumsverhalten	70
4.3.1.3	Westernblots	71
4.3.2	Patienten mit Mutationen in <i>ACAD9</i>	72
4.3.2.1	Biochemische Aktivitätsmessungen	73
4.3.2.2	Wachstumsverhalten	75
4.3.2.3	Assemblierung	75
5	Diskussion	77
5.1	Stabiler Gentransfer in primäre Fibroblasten	77
5.1.1	Nicht-virale Gentransfermethoden	77
5.1.2	Viraler Gentransfer	79
5.2	Funktionelle Analyse	80
5.2.1	Notwendigkeit der Funktionsanalyse	80
5.2.2	Ansatz zur Funktionsanalyse	81
5.2.2.1	Notwendigkeit von Zelllinien	81
5.2.2.1.1	Zellen der Patienten	81
5.2.2.1.2	Kontrollen für die Komplementation	82
5.2.2.2	Methoden zum Nachweis des Defekts	82
5.2.3	Beurteilung der Ergebnisse	84
5.2.3.1	Patienten mit Mutationen in <i>NDUFS1</i>	84
5.2.3.2	Patienten mit Mutationen in <i>NDUFB9</i>	85
5.2.3.3	Patienten mit Mutationen in <i>ACAD9</i>	85
5.2.4	Aussagekraft und Grenzen der Komplementation	86
6	Zusammenfassung	88
7	Literatur	90
8	Danksagung	101
9	Publikationsliste	102

Abkürzungsverzeichnis

ACAD	Acyl-CoA-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	kodierende DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FIV	Feliner Immundefizienz-Virus
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kDa	Kilodalton
l	Liter

LTRs	„long terminal repeats“
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
mtDNA	mitochondriale DNA
μF	Microfarad
μg	Microgramm
μl	Microliter
μM	micromolar
NADH/NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NDUFB	NADH-Dehydrogenase-(Ubiquinon)-1 β -Subkomplex
NDUFS	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Eisenschwefelprotein
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Nach der Endosymbiontentheorie entstanden vor über 1,5 Milliarden Jahren die Mitochondrien durch eine Symbiose von aeroben Protobakterien mit urtümlichen Eukaryonten [51, 77, 86, 88]. Die Aufnahme der Bakterien führte zu dem kennzeichnenden Merkmal dieser Organellen, ihrer Begrenzung durch zwei hoch spezialisierte Membranen, der inneren und der äußeren Membran. Hierdurch entstanden zwei getrennte Kompartimente innerhalb der Mitochondrien, die innere Matrix und der Intermembranraum [47]. Der Matrixraum enthält neben zahlreichen Enzymen für diverse Funktionen der Mitochondrien das mitochondriale Genom, mitochondriale Ribosomen und tRNAs und wird vom Intermembranraum durch die innere Membran abgegrenzt, die zur Oberflächenvergrößerung zahlreiche Falten aufweist [8]. Die Anzahl an Mitochondrien pro Zelle ist sehr variabel. Während Erythrozyten keine Mitochondrien besitzen, können in quergestreiften Muskelzellen mehrere tausend sein [108]. In Anpassung an den Energieverbrauch des jeweiligen Gewebes entstehen neue Mitochondrien durch Wachstum und Teilung bereits vorhandener Organellen. Ihre hohe Dynamik zeigt sich darin, dass sie ihre Form verändern, sich ständig bewegen, sich teilen und miteinander verschmelzen können [25].

Die evolutionär günstige Symbiose führte zu einer Erweiterung des Stoffwechsels der Eukaryonten durch zahlreiche inzwischen lebensnotwendige Funktionen. So wird in den Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung der größte Anteil des durch den katabolen Stoffwechsel gewonnenen ATPs produziert. In den Mitochondrien finden außerdem die β -Oxidation und ein Teil der Häm biosynthese und des Steroidstoffwechsels statt. Die Mitochondrien sind ferner für den Citratcyclus und einen Teil des Harnstoffzyklus verantwortlich [83]. Zudem sind sie an der Einleitung der Kaskade für die Apoptose bei verschiedenen Funktionsstörungen der Zelle beteiligt [104].

Die funktionelle Ergänzung führte im Laufe der Evolution zu einem Verlust der Eigenständigkeit der beiden Partner. Das Genom des eingewanderten Bakteriums wurde immer kleiner. Die aus 16569 Basenpaaren bestehende, doppelsträngige und zirkuläre mitochondriale DNA (mtDNA) besitzt 37 Gene, von denen 24 in Form von rRNA (2 Gene) und tRNA (22 Gene) für die Translation der mtDNA be-

nötigt werden. Die restlichen 13 Gene kodieren für Untereinheiten der Atmungskette [32].

1.2 Das System der oxidativen Phosphorylierung

Das System der oxidativen Phosphorylierung besteht aus fünf aneinandergereihten Komplexen (Abbildung 1). Die Atmungskette wird durch die Komplexe eins bis vier gebildet und dient dem Aufbau eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran. Dieser wird von der ATP-Synthase, dem Komplex V, für den Prozess der oxidativen Phosphorylierung benötigt. Hierdurch wird der größte Teil des für den Energiehaushalt der Zelle wichtigen ATPs bereitgestellt.

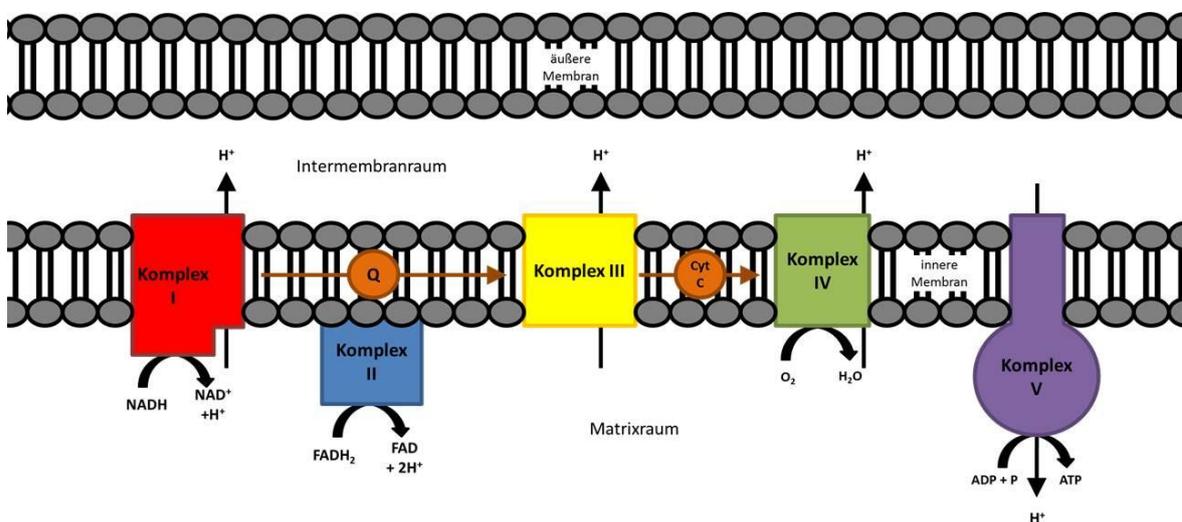


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Systems der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Innenmembran: Die Oxidation von NADH und FADH₂ durch die Komplexe I und II führt zu einem Elektronenfluss durch die Atmungskette. Die Elektronen werden durch die beiden Komplexe auf Ubichinon (Q) übertragen. Dieses transportiert sie weiter zum Komplex III, der sie auf das Cytochrom c (Cyt c) überträgt. Das Cytochrom c überträgt sie dann über den Komplex IV auf molekularen Sauerstoff. Der Elektronenfluss ist an einen Protonenstrom durch die Komplexe I, III und IV gekoppelt. Durch diesen bildet sich ein Protonengradient zwischen dem Intermembranraum und der Matrix aus. Die freie Energie des Rückstroms der Protonen über den Komplex V wird von diesem zur ATP-Synthese genutzt.

1.2.1 Komplex I – NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase

Der Komplex I, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, ist mit seinen 45 Untereinheiten der mit Abstand größte Enzymkomplex der Atmungskette [24]. Während sieben Untereinheiten, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 und ND6, von der mitochondrialen DNA kodiert werden, sind die Gene für die anderen 38 nukleären Ursprungs. Die sieben mitochondrial und weitere sieben nukleär kodierte Untereinheiten, NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7 und NDUFS8, sind auch in funktionell vergleichbaren bakteriellen Enzymen vorhanden. Daher

wird davon ausgegangen, dass diese 14 Proteine primär für die katalytische Funktion verantwortlich sind [16]. Demgegenüber ist die Aufgabe der restlichen 31 Untereinheiten noch weitgehend unklar. Eine L-förmige Konformation des Komplexes konnte mittels Kristallstrukturanalysen bestätigt werden [61]. Strukturell besteht der Komplex aus zwei intramembranären Unterkomplexen β und γ und einem peripheren in die Matrix ragenden Arm λ [44, 64, 102, 143]. Letzterer enthält ein Flavoprotein zur Übernahme der Elektronen, die bei der Oxidation des vor allem im Citratcyclus, in der β -Oxidation und durch die Pyruvatdehydrogenase gebildeten NADHs entstehen. Zusätzlich finden sich in ihm acht Eisen-Schwefel-Zentren, die den Weg der Elektronen zu dem in der inneren Mitochondrienmembran frei beweglichen Ubichinon bahnen [13, 96, 97]. Durch die Aufnahme der Elektronen wird das Ubichinon reduziert. Die während der Reaktion freiwerdende Energie wird zum Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt. Der exakte Weg der Elektronen, sowie die genaue Funktion der intramembranären Untereinheiten ist noch nicht bekannt, es wird jedoch eine Stabilisierungsfunktion und eine Beteiligung an der Translokation der Protonen über die Membran vermutet [78].

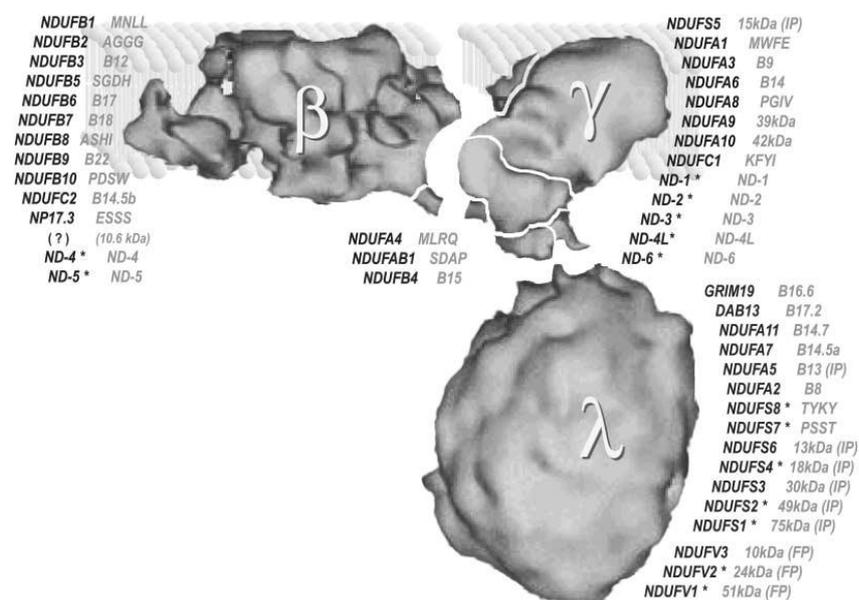


Abbildung 2: Schematische Anordnung der Untereinheiten im Atmungskettenkomplex I nach Ugalde et al. (2004) [143]: Es ist die L-förmige Struktur des Komplexes I dargestellt mit den Unterkomplexen β und γ , die in der inneren Membran liegen, und dem Unterkomplex λ , der in den Matrixraum ragt.

1.2.2 Komplex II – Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase

Den kleinsten Atmungskettenkomplex stellt mit vier Untereinheiten die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, der Komplex II, dar. Alle Proteine werden von nukleären Genen kodiert. Wie der Komplex I besitzt der Komplex II einen membranständigen und einen hydrophilen, in die Matrix ragenden Teil, der der Succinat-Dehydrogenase des Citratcyclus entspricht. Bei der Reaktion von Succinat zu Fumarat werden zwei Elektronen zunächst durch das Flavoprotein, FAD, aufgenommen, das kovalent mit dem hydrophilen Teil verbunden ist. Nach der Durchwanderung von drei im Komplex enthaltenen Eisen-Schwefel-Zentren werden die Elektronen auf das Ubichinon übertragen. Es findet keine Translokation von Protonen statt [2, 76, 114, 120].

1.2.3 Komplex III – Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase

Die Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase, der Komplex III, besteht aus elf Untereinheiten. Das Cytochrom b, das Cytochrom c_1 und das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein bilden den katalytischen Kern. Das vom mitochondrialen Genom kodierte Cytochrom b sorgt mit seinen zwei Häm-Zentren für den Elektronentransfer innerhalb der Membran. Ebenso enthält das Cytochrom c_1 eine Hämgruppe. Zusätzlich findet sich das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein mit seinem Eisen-Schwefel-Zentrum für den Transfer der Elektronen. Die Funktion der Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase besteht in der Übertragung der Elektronen von Ubichinon zum Cytochrom c und einem Protonentransfer über die innere Mitochondrienmembran [153, 154].

1.2.4 Komplex IV – Cytochrom c-Oxidase

Die Elektronen des Cytochrom c werden durch den Komplex IV, die Cytochrom c-Oxidase, unter Bildung von Wasser auf Sauerstoff übertragen. Hierbei werden erneut Protonen über die Membran gepumpt. Dieser Komplex besteht aus 13 Untereinheiten. Der katalytische Kern wird von drei mitochondrial kodierten Proteinen gebildet. Im Komplex finden sich die Bindungsstelle für Cytochrom c und ein Kupferzentrum. Nachdem letzteres die Elektronen aufgenommen hat, fließen diese über das Häm a-Zentrum auf das binukleäre Zentrum bestehend aus Häm a_3 und einem Kupferzentrum. Dort befindet sich die Reduktionsstelle für den Sauerstoff [138, 139].

1.2.5 Komplex V – F_1F_0 -ATP-Synthase

Nach Aufbau des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran durch die Komplexe I, III und IV wird dieser von der F_1F_0 -ATP-Synthase genutzt, um ATP zu bilden. Der pilzförmige Komplex setzt sich aus einem membranständigen F_0 -Teil, welcher den Protonenfluss gewährleistet, und einem in die Matrix ragenden F_1 -Teil, welcher die Nukleotidbindestellen enthält, zusammen. Durch Protonenkanäle in der Untereinheit a des F_0 -Teils fließen die Protonen aus dem Intermembranraum zurück in die Matrix. Die hierbei frei werdende Energie führt zu einer Drehung des Rings der c-Untereinheiten. Diese wird auf eine γ -Untereinheit übertragen. Hierdurch kommt es zu Konformationsänderungen in dem durch den peripheren Stiel fixierten Hexamer aus α - und β -Untereinheiten, wodurch die Synthese des ATP ermöglicht wird [149].

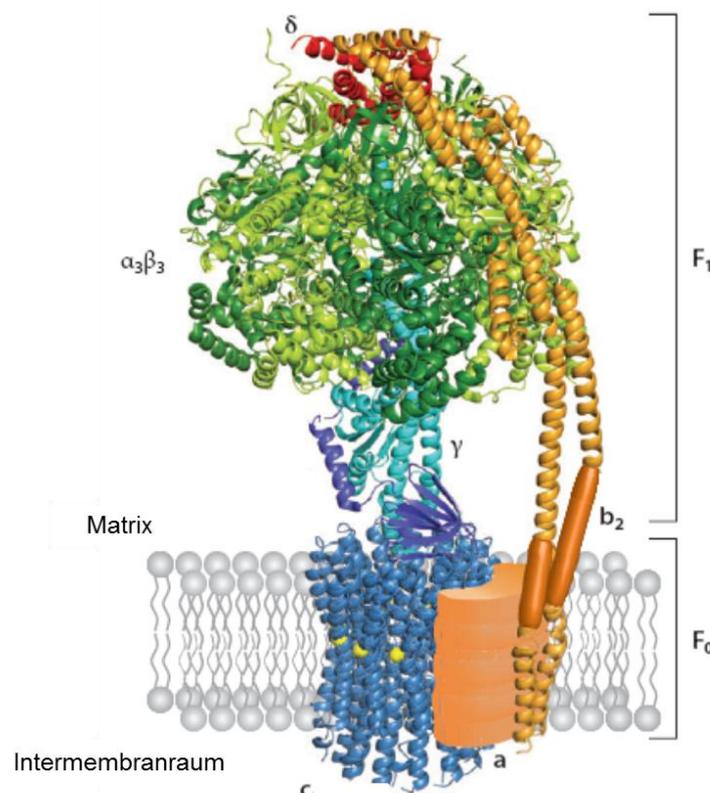


Abbildung 3: Aufbau der F_1F_0 -ATP-Synthase nach von Ballmoos et al. (2009) [149]: Die ATP-Synthase besteht aus dem membranständigen F_0 -Teil und dem in die Matrix ragenden F_1 -Teil. Die in der Untereinheit a enthaltenen Protonenkanäle gewährleisten den Rückfluss der Protonen aus dem Intermembranraum in den Matrixraum der Mitochondrien. Die hierbei freiwerdende Energie führt zu einer Drehung der intermembranären Untereinheiten (c), die über den γ -Stiel zu Konformationsänderungen in dem durch die b_2 - und δ -Untereinheiten fixierten $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer führt. Hierdurch kommt es zur Synthese von ATP im Hexamer.

1.3 Mitochondriale Erkrankungen

1.3.1 Allgemein

Vor etwa 50 Jahren wurde erstmals von Luft et al. (1962) [85] berichtet, dass Mitochondrien eine Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen spielen [33]. Die Anzahl der Erkrankungen aufgrund einer beeinträchtigten Funktion dieser Organelle nahm seither stetig zu. Mitochondriale Dysfunktionen finden sich beispielsweise auch bei häufig vorkommenden Krankheiten wie dem Diabetes mellitus [84] und zahlreichen Krebserkrankungen [91]. Defekte innerhalb dieses Organells können auf sekundären Ursachen wie anderen Grunderkrankungen oder der Wirkung von Toxinen und Medikamenten wie z.B. von Zidovudin [4, 14] oder Statinen [74] beruhen. So führen die bei klassischen Organazidurien entstehenden Metabolite zu einer Inhibition zentraler mitochondrialer Stoffwechselwege [122]. Beim Morbus Wilson kommt es durch die erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies aufgrund der Akkumulation von Kupfer zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien, der mitunter das Leberversagen bedingt [55]. Ein erhöhter oxidativer Stress einhergehend mit einer Beeinträchtigung der Energieproduktion hat ebenso im Rahmen einer Sepsis Einfluss auf die Prognose [17, 125]. Auch eine Einschränkung der Expression der Gene der Atmungskette, die zu einem Defekt in der oxidativen Phosphorylierung führt, wird zu den sekundären Mitochondriopathien gezählt, wenn sie durch eine Verminderung der expressionsregulierenden Schilddrüsenhormone verursacht wird [151].

Im Gegensatz hierzu findet sich die Ursache der Erkrankung bei primären Mitochondriopathien in den Mitochondrien selbst, wobei jeder in ihnen lokalisierte Stoffwechselweg betroffen sein kann. Da die Mitochondrien den wichtigsten Energielieferanten der Zellen darstellen, werden vor allem die Krankheiten, die zu einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung führen, unter diesem Begriff zusammengefasst. Diese kann sowohl indirekt durch eine Störung des Cardiolipinmetabolismus wie beim Barth-Syndrom [121] oder des Proteinimports wie beim Mohr-Tranebjaerg Syndrom [70, 111] als auch direkt beispielsweise durch Atmungskettendefekte (siehe 1.3.3) oder Pyruvatstoffwechselstörungen [109, 150] bedingt sein. Da Mitochondrien in nahezu allen Zellen vorkommen und zahlreiche Stoffwechselwege in ihnen ablaufen, die von keinem anderen Organell übernommen werden können, zeigen mitochondriale Erkrankungen ein sehr vielgestaltiges klinisches Bild. Wegen ihrer zentralen Rolle im Energiehaushalt der Zelle sind

vermehrt Gewebe mit hohem Energiebedarf, wie beispielsweise das Nervensystem, die Skelettmuskulatur, das Herz und das Auge betroffen [30, 33, 34]. Häufig kommt es daher zu neurologischen Manifestationen dieser Erkrankungen, die unter anderem in Form von Dystonie [31, 119], Ataxie [119] oder Epilepsie [46] symptomatisch werden. Je nach Ausmaß der Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels kann es nur zu einer leichten Einschränkung der Zellfunktion mit kaum merklichen und nur unter Belastung auftretenden Symptomen [131] oder zu einer massiven Dysfunktion bis hin zum Zelluntergang in einem Organ kommen. Vor allem in Geweben mit nur eingeschränkter Regenerationsfähigkeit, wie dem Nervengewebe, kann ein Zelluntergang zu einem frühzeitigen Auftreten von Symptomen führen, so verursachen einige Defekte schon intrauterin ein Absterben des Organismus, während andere sich erst postnatal, in der Jugend oder im Erwachsenenalter manifestieren.

1.3.2 Vererbung

Mitochondriale Erkrankungen können nicht nur die 13 mitochondrial kodierten Proteine betreffen, sondern auch einige der ca. 1500 nukleär kodierten, in die Mitochondrien importierten Proteine [21]. Eine Möglichkeit der Einteilung primärer Mitochondriopathien stellt daher der genetische Ursprung des Defekts dar. Man unterscheidet zwischen Mutationen in der mitochondrialen und der nukleären DNA. Während die nukleären Gene autosomal rezessiv, autosomal dominant oder X-chromosomal vererbt werden, zeigt die Vererbung mitochondrialer DNA einige Besonderheiten. Nachdem alle Mitochondrien einer Zygote von der Eizelle abstammen, wird die mtDNA von der Mutter vererbt, sie folgt somit einem maternalen Erbgang. Des Weiteren enthält jede Zelle tausende mtDNA-Moleküle. Wenn der Genotyp eines Individuums aus nur einer mtDNA-Spezies besteht, bezeichnet man dies als Homoplasmie. Die relativ hohe Mutationsrate der mtDNA bei gleichzeitig nahezu fehlenden Reparaturmechanismen bedingt, dass es zu gemeinsamen Vorkommen von mutierter und Wildtyp-mtDNA innerhalb einer Zelle kommen kann. Inwiefern sich eine mitochondriale Mutation auch phänotypisch auswirkt, hängt von dem Grad der Heteroplasmie und damit dem Verhältnis von normaler zu mutierter mtDNA ab [126]. Dieses kann sich im Verlauf mehrerer Zellteilungen auch ändern, da sich das mitochondriale Genom vervielfältigt und auf neugebildete Mitochondrien verteilt und diese zufällig auf die Tochterzellen verteilt werden. Durch eine Verschiebung zugunsten der mutierten Sequenzen treten manche

Symptome erst im Verlauf auf und der Phänotyp kann wechseln [33, 89]. Das Ausmaß der Verschiebung und das Auftreten von Störungen ist vom organspezifischen Schwellenwert, der die Kompensationsfähigkeit bestimmt, abhängig [126].

1.3.3 Defekte der oxidativen Phosphorylierung

1.3.3.1 Übersicht

Primäre Defekte der oxidativen Phosphorylierung betreffen einen oder mehrere Komplexe der Atmungskette. Als Gruppe stellen sie mit einer Prävalenz von 1 zu 5000-10000 eine der häufigsten Ursachen angeborener Stoffwechselerkrankungen dar [34, 134]. In der symptomatischen Ausprägung dieser Erkrankungen findet sich kein pathognomonisches Zeichen, so bedingt die hohe Variabilität des klinischen Phänotyps, dass die Diagnose oft nur unter Einschluss aller verfügbaren klinischen, biochemischen und genetischen Informationen gestellt werden kann [135]. Nach dem vorherrschenden Gendefekt lassen sich die Krankheiten in vier Klassen einteilen (Abbildung 4):

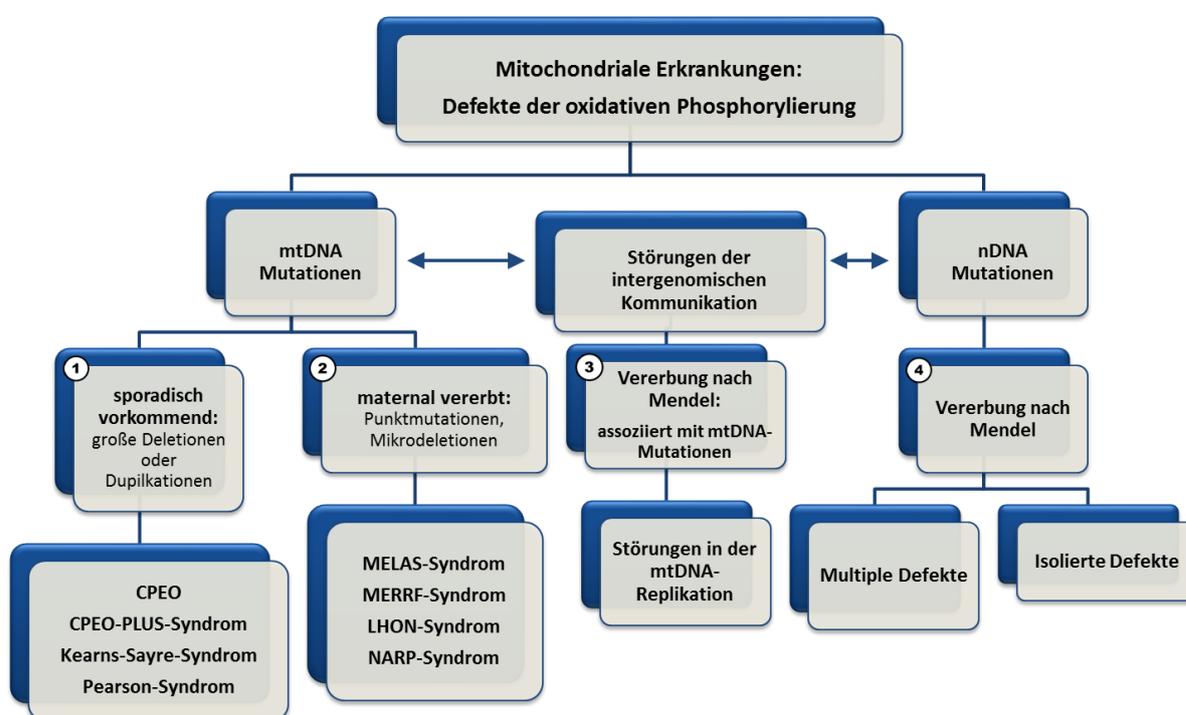


Abbildung 4: Klassifizierung der mitochondrialen Erkrankungen mit Defekten der oxidativen Phosphorylierung: Die Einteilung basiert auf der Einteilung der European Federation of Neurological Societies [45] mit Angabe einzelner mitochondrialer Syndrome.

Während in der ersten Gruppe Erkrankungen (wie CPEO, CPEO-PLUS-Syndrom, Kearns-Sayre-Syndrom oder Pearson-Syndrom) infolge sporadisch vorkommender mtDNA-Mutationen, die im Allgemeinen aufgrund von spontan auftretenden Insertionen und Deletionen der mtDNA entstehen, subsumiert werden, finden sich in der zweiten Gruppe maternal vererbte klinische Entitäten basierend auf Punktmutationen (wie MELAS, MERRF, LHON, NARP). Die mtDNA benötigt nukleär kodierte Proteine wie die DNA-Polymerase γ (POLG) und die DNA-Helikase (TWINKLE) zur Replikation, sowie z.B. die Nukleosidkinasen DGUOK und TK2 zur Produktion und Erhaltung des Speichers der Deoxynukleosidtriphosphate innerhalb der Mitochondrien, so dass Defekte in diesen Genprodukten das Auftreten von mtDNA-Depletionen [127, 128] und -Deletionen [90] begünstigen. Solche Störungen der mtDNA-Replikation werden in der dritten Gruppe zusammengefasst. Die letzte Gruppe enthält die Krankheiten infolge biochemischer Defekte aufgrund von nukleären Mutationen, bei denen keine Läsion der mtDNA nachweisbar ist [45]. Die Mutationen führen zu Störungen in der Biogenese der Atmungskette, der Assemblierung der Komplexe, der Transkription und auch der mitochondrialen Proteinsynthese [71, 98, 129]. Auf molekulargenetischer Ebene können Mutationen in ganz unterschiedlichen Genen zu den Defekten führen.

1.3.3.2 Atmungskettenkomplex I-Defekt

Neben der genetischen Klassifikation lassen sich die Defekte auch nach ihrem biochemisch messbaren Phänotyp einteilen. Es werden isolierte Defekte, die nur einen Komplex betreffen, von kombinierten Defekten, bei denen mindestens zwei Komplexe eine Einschränkung der Aktivität aufweisen, unterschieden. Der isolierte Atmungskettenkomplex I-Defekt ist hierunter der häufigste und findet sich in etwa in einem Drittel aller Fälle mit primärer Störung der oxidativen Phosphorylierung [45]. Als Ursache für eine Dysfunktion dieses Komplexes finden sich sowohl Mutationen in der mtDNA als auch in der nukleären DNA. Neben den Mutationen in allen sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten, ND1 [62, 144], ND2 [142], ND3 [133], ND4 [73], ND4L [18], ND5 [132] und ND6 [65], wurden bisher pathogene Mutationen in den mitochondrialen tRNAs [130] und in 15 nukleär kodierten Untereinheiten, NDUFA1 [42], NDUFA2 [57], NDUFA9 [145], NDUFA10 [60], NDUFA11 [12], NDUFS1 [10], NDUFS2 [81], NDUFS3 [11], NDUFS4 [101], NDUFS6 [69], NDUFS7 [137], NDUFS8 [107], NDUFV1 [10], NDUFV2 [9] und NDUFV3 [22], beschrieben. Ferner konnten Mutationen in nukleär kodierten Prote-

inen, *NDUFAF1* [36], *NDUFAF2* [95], *NDUFAF3* [116], *NDUFAF4* [115], *C8orf38* [98], *C20orf7* [48], *NUBPL* [23] und *FOXRED1* [23], detektiert werden, die vermutlich auf Ebene der Biogenese und der Stabilität des Komplexes wirken, wobei der genaue Funktionsmechanismus meist noch nicht geklärt ist. Die bisher mit isoliertem Komplex I-Defekt assoziierten nukleären Mutationen folgen alle mit Ausnahme von *NDUFA1*, das X-chromosomal vererbt wird [42], einem autosomal-rezessiven Erbgang. Wie bei allen Mitochondriopathien zeigt sich ein sehr vielgestaltiges klinisches Erscheinungsbild, so kann sich die Erkrankung unter anderem in Form von Muskelschwäche, Hypotonie, zerebralen Krampfanfällen, subakuter nekrotisierender Enzephalomyopathie (Leigh-Syndrom), Gedeihstörung und Minderwuchs, Laktatazidose, Atemstörungen, Kardiomyopathien, neurosensorischem Hörverlust, Retinopathien, hepatischen, gastrointestinalen oder endokrinen Störungen äußern. Während Mutationen in der mtDNA häufig erst in der Jugend oder im Erwachsenenalter symptomatisch werden, wird bei Mutationen der nukleären DNA oft eine Manifestation in der frühen Kindheit beschrieben, die nicht selten mit einem tödlichen Verlauf assoziiert ist [19, 34, 72, 82]. Die therapeutischen Optionen bei diesen Erkrankungen sind sehr begrenzt und beinhalten vor allem supportive Maßnahmen, wobei die langfristigen Therapieeffekte äußerst gering sind. Der genetischen Beratung und der Pränataldiagnostik kommt daher eine große Bedeutung zu.

1.4 Atmungskettenkomplex I-Defekt – Molekulargenetische Suche nach der Ursache

Das Auffinden der genetischen Ursache bei Defekten der oxidativen Phosphorylierung ist schwierig. Häufig wird im Rahmen der Routinediagnostik zunächst nach Mutationen in der mtDNA gesucht. Die punktuelle mtDNA-Analyse führt aber nur bei ca. 15% der Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt zu einer molekularen Diagnose [32]. Die Mehrzahl der Fälle wird durch Mutationen in nukleär kodierten Proteinen verursacht, wobei ganz unterschiedliche Gene betroffen sein können. Hierfür gibt es eine hohe Zahl an bekannten und eine wohl noch höhere Zahl an unbekanntem krankheitsassoziierten Genen [19, 23]. Aufgrund der relativ hohen Kosten verbunden mit der geringen Effizienz können bei der in der Klinik durchgeführten genetischen Diagnostik nicht alle potentiellen Kandidatengene untersucht werden. Daher bleibt bei pädiatrischen Patienten die molekulargenetische Ursa-

che der Erkrankung zumeist ungeklärt. Um krankheitsverursachende Mutationen zu detektieren, wurde am Institut für Humangenetik der Technischen Universität München und des Helmholtz Zentrum München ein Hochdurchsatz-Screen durchgeführt. Dieser beinhaltete die Analyse von 75 Kandidatengen in 152 Patienten mit vorherrschendem Komplex I-Defekt. Es wurden die Gene aller Untereinheiten des Komplexes, der mitochondrialen tRNAs sowie von acht Assemblierungsfaktoren untersucht. Zusammenfassend erhielten 18% der Patienten eine molekulargenetische Diagnose. Zusätzlich konnten mehrere verschiedene heterozygote Varianten in dem Kollektiv nachgewiesen werden (zur Übersicht und den Ergebnissen des Screens siehe Haack et al. (2012) [54]).

2 Zielsetzung der Arbeit

Der Einsatz von Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden eignet sich zum Auffinden der molekulargenetischen Ursachen von Erkrankungen. Durch die Möglichkeiten der parallelen Untersuchung zahlreicher Gene erhöht sich die Detektionsrate von Varianten in bekannten und potentiell krankheitsassoziierten Genen. Die hohe Variabilität innerhalb des menschlichen Genoms führt jedoch dazu, dass nicht jede gefundene Variante auch krankheitsverursachend ist. Der möglicherweise pathogene Charakter einer gefundenen Variante kann immer nur mit einer vermuteten Wahrscheinlichkeit angegeben werden. Der Differenzierung zwischen erkrankungsrelevanten und gutartigen DNA-Varianten kommt daher eine besondere Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Weg gefunden werden, um DNA-Varianten von Patienten mit isoliertem Atmungskettenkomplex I-Defekt funktionell zu analysieren. Nachdem der isolierte Komplex I-Defekt eine vorwiegend autosomal rezessiv vererbte Erkrankung darstellt, sollte mit Hilfe des Mechanismus der Komplementation der genetische Defekt in Fibroblasten von Patienten auf Proteinebene behoben werden [58]. Hierfür wurde die Wildtyp-cDNA des betreffenden Gens in den Patientenzellen exprimiert und im Anschluss analysiert, inwieweit die Funktion des Proteins wiederhergestellt werden kann (Abbildung 5).

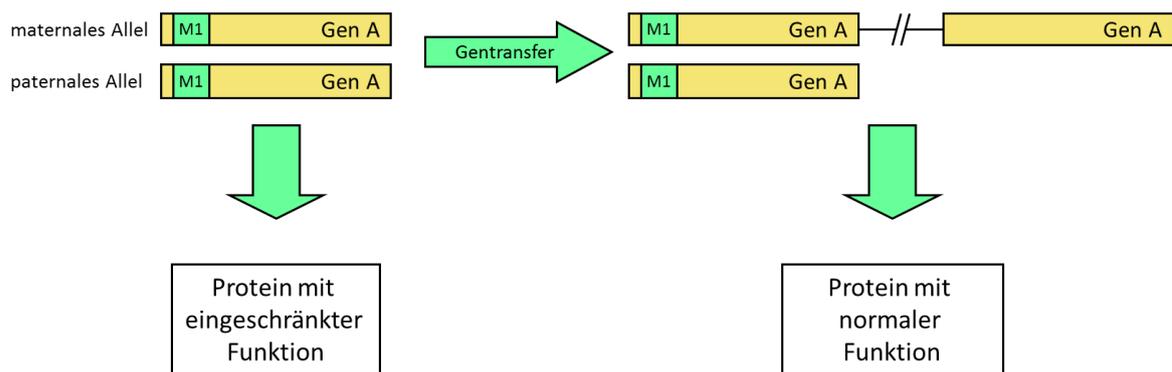


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mechanismus der Komplementation am Beispiel einer homozygoten Mutation: Es wird angenommen, dass die homozygote Mutation M1 im Gen A zu einer Einschränkung der Funktion des Proteins führt. Nun wird zusätzlich die Wildtyp-Variante des Gens A mittels Gentransfer eingeschleust und exprimiert. Dies führt bei einer für die Funktionseinschränkung ursächlichen Mutation zu einer Kompensation des Defekts und die normale Funktion des Proteins kann wiederhergestellt werden.

Basierend auf den gefundenen Mutationen im Atmungskettenkomplex I-Screen (siehe 1.4) sollten zunächst Fibroblastenzellkulturen der Patienten im Labor etabliert werden. Danach erfolgte das Suchen einer passenden Methode zur Expression eines beliebigen Gens in primären Fibroblasten. Zur Überprüfung der Komplementierbarkeit des Defekts sollte die biochemische Aktivität der Atmungskette mittels spektrophotometrischer Messungen, das Wachstumsverhalten der Fibroblasten in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und der Effekt der Mutation auf Proteinebene vor und nach Gentransfer sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen in ausgewählten Patientenzelllinien untersucht werden (Abbildung 6).

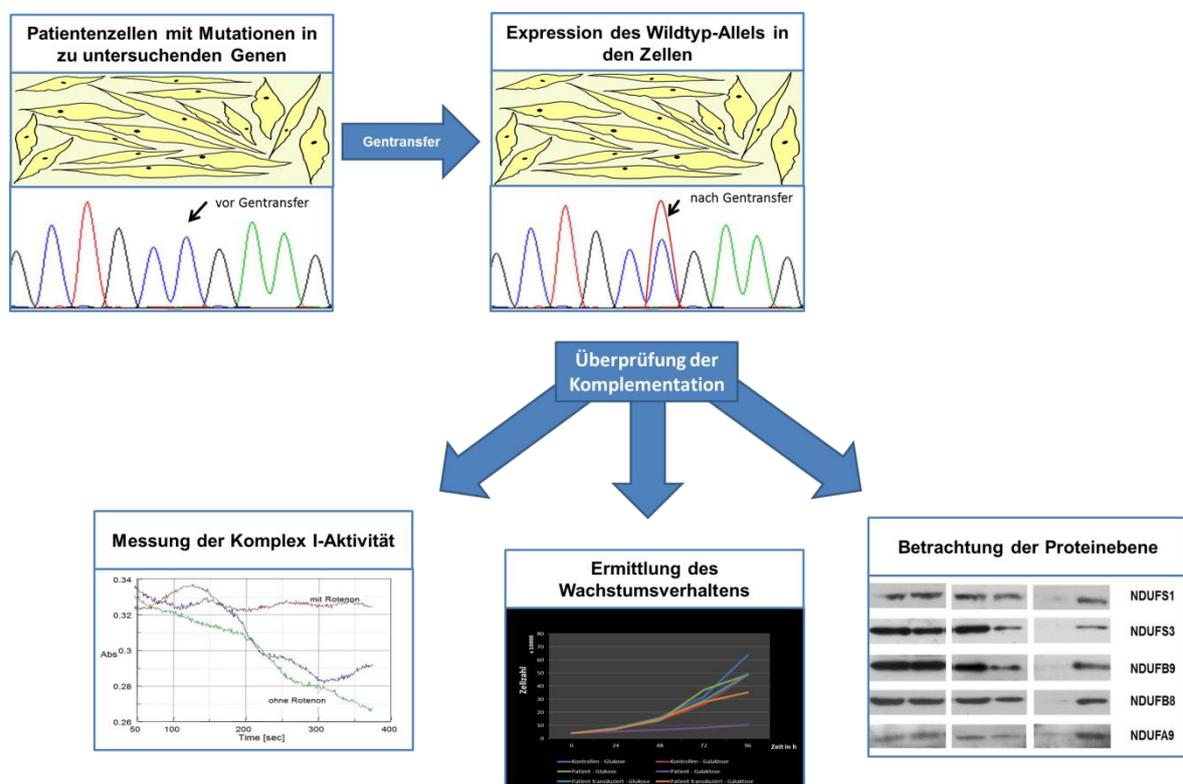


Abbildung 6: Überblick zum Versuchsablauf der vorliegenden Arbeit: Nach Etablierung von Fibroblastenzellkulturen des Patienten wurde die Wildtyp-cDNA in die Patientenzellen eingeschleust und exprimiert. Im Anschluss an den Gentransfer wurden drei verschiedene Funktionsebenen getestet, um die Komplementierbarkeit des Defekts zu überprüfen.

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA- und RNA-Isolierung

3.1.1.1 RNA und genomische DNA aus humanen Fibroblasten

Die Isolierung von RNA und DNA aus humanen Fibroblastenzellen wurde mit dem „AllPrep DNA/RNA Mini Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Durch die in den verwendeten Säulen enthaltenen speziellen Membranen werden die Nukleinsäuren gebunden und können später abgelöst werden. Zur Extraktion der Nukleinsäuren wurden Zellen von ein bis zwei zu 80% konfluenten großen Platten (\varnothing 14 cm) gesammelt und entsprechend dem Protokoll des Herstellers zunächst die RNA und dann die DNA isoliert. Dies erfolgte für die RNA auf Eis und für die DNA bei Raumtemperatur. Die erhaltene RNA wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die DNA bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.1.1.2 Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Extraktion von Plasmid-DNA erfolgte als „Miniprep“ oder „Midiprep“. Verwendet wurden die Kits der Firma Qiagen, welche die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufschließen. Nach Adsorption an einer Silica-Gel-Membran wird diese gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nachdem zur Sequenzierung der Plasmide geringe DNA-Mengen ausreichen, wurde hierfür der „Miniprep“ verwendet. Mit dem Einsatz des „Midipreps“ konnte eine größere Ausbeute erzielt werden, so dass dieser vornehmlich zur Gewinnung der benötigten Menge an Plasmid-DNA zum Gentransfer eingesetzt wurde.

3.1.1.3 Konzentrationsbestimmung der RNA und der DNA

Da DNA und RNA Licht absorbiert, wurden mittels des ND-1000 Spectrometer Nanodrop[®] der Firma Thermo Scientific Abgene[®] Germany die Konzentrationen der isolierten RNA und DNA ermittelt. Dies erfolgte für beide Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Software wurde die NanoDrop ND-1000 Version 3.5.2 verwendet. Zusätzlich wurde der Absorptions-Quotient 260/280 nm als

Nachweis der Reinheit der Probe ermittelt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.1.2 Reverse Transkription

Durch Reverse Transkription mittels des „First strand cDNA synthesis kit (#1611)“ der Firma Fermentas wurde die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese wurde 1 µg der RNA eingesetzt. Es wurde 1 µl der „Random hexamer“-Primer hinzu gegeben und das Gesamte mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 4 µl 5X Reaktionspuffer, 1 µl „RiboLock“ RNase-Inhibitor, 2 µl dNTP-Mix (10 mM) und 2 µl Reverse Transkriptase. Die Probe wurde dann zentrifugiert und für die Synthese der cDNA für 5 min bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C für 60 min. Um die Reaktion zu beenden, wurde die Probe auf 70 °C für 5 min erhitzt und anschließend für 10 min auf 4 °C abgekühlt. Die so erhaltene cDNA wurde entweder sofort weiter verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* durchgeführte DNA-Amplifikation zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, die in mehreren Zyklen wiederholt werden. Zunächst erfolgt durch Erhitzen die Denaturierung der DNA. Im Anschluss kommt es zur Hybridisierung der zu der gewünschten Sequenz komplementären Primer. Hierbei hängt die sogenannte „Annealing“-Temperatur von der Basensequenz und der Länge der verwendeten Primer ab. In einem letzten Schritt wird das gewünschte DNA-Stück von einer thermostabilen Polymerase synthetisiert [83].

3.1.3.1 Amplifizierung von DNA-Sequenzen mittels PCR

Die Amplifizierung der DNA-Sequenzen erfolgte nach dem Protokoll von Qiagen. Der 10X PCR-Puffer, der dNTP-Mix (2 mM), die „Q-Solution“, die Taq-Polymerase und die sequenzspezifischen Primer wurden auf Eis aufgetaut. Durch das Mischen von H₂O, „Q-Solution“, dNTP-Mix, 10X PCR-Puffer, Primer und Taq-Polymerase in einem Verhältnis von 26,8:10:5:5:2:0,2 wurde ein Mastermix hergestellt. Die benötigten Volumina wurden auf PCR-Platten oder -Tubes verteilt und die DNA hinzugefügt. Darauf wurden diese in einen Thermocycler gestellt und das PCR-Programm (Tabelle 1) gestartet.

Tabelle 1: PCR-Programm für die Amplifizierung der DNA-Sequenzen

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	0,5 min	35
X °C (primerspezifische „Annealing“-Temperatur)	0,5 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1
4 °C	10 min	1

Für die Untersuchung auf eine Kontamination mit Viren wurden virusspezifische Primer verwendet [20, 29, 80]. Die Sequenzen der Primer für die Expressionsvektoren ergaben sich nach dem Protokoll des Herstellers. Die anderen Primer wurden mithilfe des Primerdesign-Programms Primer Design-ExonPrimer (<http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>) designt. Für die verwendeten Primer siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primer mit Angabe der „Annealing“-Temperatur und der erwarteten Produktgröße

Primer	Nr.	Name	Sequenz	„Annealing“-Temperatur	Produktlänge
HIV-Primer	15188	HIV F	5'-ATAATCCACCTATC CCAGTAGGAGAAAT-3'	60 °C	115
	15188	HIV R	5'-TTTGGTCCTTGTCTT ATGTCCAGAATGC-3'		
HBV-Primer	15189	HBV F	5'-CCGTCTGTGCCTTC TCATCTG-3'	60 °C	104
	15189	HBV R	5'-AGTCCAAGAGTYCT CTTATGYAAGACCTT-3'		
HCV-Primer	15190	HCV_Outer F	5'-ACTGTCTTCACGCAG AAAGCGTCTAGCCAT-3'	55 °C	271
	15190	HCV_Outer R	5'-CGAGACCTCCCGGG GCACTCGCAAGCACCC-3'		
EX-T0208_Lv21 (Expressionsvektor für <i>NDUFS1</i>)	15212	EX-T0208_Lv21 F	5'-ATCCACGCTGTTTTG ACC-3'	50 °C	2477
	15212	EX-T0208_Lv21 R	5'-CGTGAAGAATGTGC GAGAC-3'		
EX-L0032-Lv21 (Expressionsvektor für <i>NDUFB9</i>)	15213	EX-L0032-LV21 F	5'-ATCCACGCTGTTTTG ACC-3'	50 °C	817
	15213	EX-L0032-LV21 R	5'-CGTGAAGAATGTGC GAGAC-3'		
cDNA <i>NDUFS1-1</i>	15230	<i>NDUFS1_1_1_F67</i>	5'-GGGTCGTCGTGGTC CAG-3'	50 °C	551
	15230	<i>NDUFS1_1_1_R617</i>	5'-TTCTTGTCTTCCACA GCACG-3'		

cDNA NDUFS1-2	15231	NDUFS1_1_2_F511	5'-CCTATTTGTGACCAG GGAGG-3'	50 °C	537
	15231	NDUFS1_1_2_R104 7	5'-GACCATTGGCTCGG TAAGTC-3'		
cDNA NDUFS1-3	15232	NDUFS1_1_3_F948	5'-GCCACGTATGCATG AGGAC-3'	50 °C	555
	15232	NDUFS1_1_3_R150 2	5'-CTTCCCGAAGCAAT GTCTTG-3'		
cDNA NDUFS1-4	15233	NDUFS1_1_4_F138 5	5'-AGAGCTGGCTGCAT AATGAC-3'	50 °C	555
	15233	NDUFS1_1_4_R193 9	5'-GCTGAGCTCTACCC TCAGTG-3'		
cDNA NDUFS1-5	15234	NDUFS1_1_5_F178 9	5'-ATCACACGACAGGA TTTGCC-3'	50 °C	595
	15234	NDUFS1_1_5_R238 3	5'-AACCTGTAAAGGAT CACTGCACTAC-3'		
cDNA NDUFB9-1	15235	NDUFB9_1_1_F53	5'-GTGCAGTTTCCCGG CTC-3'	50 °C	364
	15235	NDUFB9_1_1_R416	5'-TCATCTAAGCACCA TTCTGGG-3'		
cDNA NDUFB9-2	15236	NDUFB9_1_2_F320	5'-GTCAGCATCCACAG CCATAC-3'	50 °C	385
	15236	NDUFB9_1_2_R704	5'-TAGGGCAAGTGCAT GTTCTG-3'		

3.1.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Größe der nach der PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese ermittelt. Zum Längenvergleich der Fragmente dienten DNA-Marker der Firma Fermentas. Zur Herstellung des Gels wurden 4 oder 6 g Agarose in 400 ml TBE-Puffer in einem Mikrowellenherd gelöst und bei 65 °C aufbewahrt. Zusätzlich wurden der Lösung 2 µl/100 ml unverdünntes Ethidiumbromid zugesetzt, wodurch die DNA im Gel mit interkalierendem, bei Anregung mit UV-Licht fluoreszierendem, Ethidiumbromid gefärbt wurde. 5 µl der DNA-Lösung wurden mit 5 µl 15%igem Ficoll®-Orange G versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente TBE. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 130 V über 15 bis 20 min durchgeführt. Unter UV-Licht konnten dann die DNA-Banden detektiert werden.

3.1.4 Mutagenese

In die cDNA von *NDUFS1* wurde mit Hilfe des „QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene ein Basenaustausch von C nach G an Position 1291 eingeführt. Hierbei wurden zwei Primer, ein Strang (5'-ATGAC-TTAAAAGTGGCCGTTATAGGCAGTCCAGTG-3') und ein Gegenstrangprimer (5'-CACTGGACTGCCTATAACGGCCACTTTTAAGTCAT-3'), verwendet, die bei-

de die gewünschte Mutation enthielten. Es wurden 5 µl 10X Reaktionspuffer mit 30 ng Plasmid, 125 ng des „Forward“- und des „Reverse“-Primers, 1 µl dNTP-Mix und 3 µl „QuikSolution“ vermengt und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl der „Proofreading“-Polymerase „PfuTurbo“ DNA-Polymerase hinzu gegeben und es wurden wenige PCR-Zyklen durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Thermocycler-Programm für die Mutagenese

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	1 min
2	16	95 °C	50 s
		60 °C	50 s
		68 °C	9 min
3	1	68 °C	7 min
4	1	4 °C	10 min

Nach Amplifizierung des Plasmids erfolgte ein Verdau des Produkts mittels des Restriktionsenzym Dpn I. Hierfür wurde 1 µl des Dpn I-Restriktionsenzym (10 U/µl) hinzu gegeben und das Ganze durch Pipettieren gemischt und zum Verdau der DNA die Mischung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dpn I schneidet spezifisch methylierte DNA. Nachdem die Plasmid-DNA normalerweise methyliert ist, wird sie abgebaut.

Abschließend wurden 2 µl der Dpn I-behandelten DNA in „XL10-Gold ultracompetent cells“ transformiert (siehe 3.3.1). Diese Transformation der übriggebliebenen Template-DNA in Bakterien ermöglichte eine Koloniebildung unter Selektionsbedingungen.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Es wurden „One Shot[®] Stbl3[™] chemically competent“ *E. coli* und „XL10-Gold ultracompetent cells“ (*E. coli*) verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte, um einzelne Kolonien zu erhalten, auf Platten. Hierfür wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und in einem Trockenschrank der Firma Memmert bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von den Platten wurden Einzelkolonien gepickt und diese in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C und 225 U/min über Nacht vermehrt.

Zur Herstellung von Glycerolstocks der Bakterien wurden zu 0,75 ml einer frischen Bakterienkultur 0,25 ml autoklaviertes, 60%iges Glycerol gegeben. Um das Glycerol mit den Bakterien gleichmäßig zu vermischen, wurde die Kultur gevortext. Danach wurde das Tube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

3.2.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen

HEK 293T-Zellen wurden in „Dulbecco's modified eagle Medium high-glucose“ versetzt mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Ab einer Konfluenz von ca. 80 bis 90% wurden die Zellen geteilt. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Anschluss mittels Trypsin von der Platte gelöst. Die Zellen wurden durch Spülen mit Kulturmedium gesammelt und für 3,5 min bei 500 g und 24 °C zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde nun entweder wieder in Kulturmedium gelöst und auf neue Platten verteilt oder in Kulturmedium versetzt mit 7,5% (v/v) DMSO gelöst und bei - 80 °C zur Aufbewahrung weggefroren.

3.2.3 Kultivierung von Fibroblasten

Die Anzucht der primären Fibroblastenzellkulturen erfolgte in „Dulbecco's modified eagle Medium high-glucose“ versetzt mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin. Zusätzlich wurde Uridin in einer Konzentration von 200 µM hinzugefügt. Aufgrund der beeinträchtigten Aktivität der Atmungskette kann in den Patientenzellen keine ausreichende Uridin-Synthese gewährleistet werden, diese ist jedoch für die DNA-Replikation notwendig [15]. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂. Die Zellen wurden analog zu den HEK 293T-Zellen ab einer Konfluenz von 70 bis 90% geteilt oder mit Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO bei - 80 °C eingefroren.

3.2.4 Kontaminationstest auf HBV, HCV und HIV

Voraussetzung für den lentiviralen Gentransfer ist der Ausschluss einer Infektion der humanen Zellen mit Hepatitis B- (HBV) und C-Virus (HCV) sowie mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV). Hierdurch erhöht sich die Sicherheit, da mögliche Rekombinationen der verschiedenen Viren vermieden werden. Der Nachweis von HBV und HIV erfolgte mittels PCR und für das RNA-Virus HCV mittels

RT-PCR, wobei jeweils eine hochkonservierte Region des betreffenden Virus amplifiziert wurde (Tabelle 4) [20, 29, 80].

Tabelle 4: Hochkonservierte amplifizierte Regionen für den Kontaminationstest auf HBV, HCV und HIV

Virus	Region	Primer-Nummer	Verdünnung des PCR-Produkts*
HBV	X-Protein und DNA-Polymerase	15189	1:100000
HCV	5'-UTR	15190	1:100000
HIV	gag-Region	15188	1:10000

*Als Positivkontrollen dienten Verdünnungen des PCR-Produkts der Viren, bei denen gerade noch eine Bande detektiert werden konnte.

Als Positiv-Kontrollen wurde für die Hepatitisviren DNA von Patienten mit nachgewiesener chronischer Hepatitis verwendet und für den HI-Virus HIV-DNA mit einem deletierten env-Gen. Die minimal notwendigen Konzentrationen der Kontroll-DNAs wurden mittels Verdünnungsreihen des primär gewonnenen PCR-Produkts in 10er Potenzschritten ermittelt. Hierbei ergab sich für HIV eine Verdünnung von 1:10000 und für die beiden Hepatitisviren eine von 1:100000. Nach der Ermittlung der Verdünnung wurden für den Nachweis von HBV, HCV und HIV in einem parallelen Ansatz Patienten-DNA und Kontroll-DNAs mit den oben genannten Primern amplifiziert und das Produkt auf das Agarosegel aufgetragen. Für den Test auf HCV wurde zuvor die RNA aus den Fibroblasten isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Alle getesteten Zelllinien erwiesen sich als negativ bezüglich der getesteten Viren.

3.2.5 Wachstumskurven

Die Wachstumsrate der Fibroblasten wurde durch die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt. Die Verdopplungszeit ist die Zeit, die für die Verdopplung der Zellzahl benötigt wird.

Sie wird wie folgt berechnet:

$$\text{Verdopplungszeit} = \frac{\log 2 \cdot \text{Kulturdauer}}{\log N - \log N_0}$$

Hierbei entspricht N der Zellzahl nach Kulturdauer und N_0 ist die Zahl der Zellen zum Zeitpunkt null.

Zu Beginn wurden pro Zelllinie ca. 40000 Zellen auf 6 cm-Kulturschalen ausplattiert. Diese enthielten je nach Ansatz 2 ml Glukose-Medium oder 2 ml Galaktose-Medium. Die Zellzahl N_0 sowie die Zellzahl nach Kulturdauer wurde lichtmikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Auszählung erfolgte geblindet nach 24, 48, 72 und 96 h.

3.3 Methoden des Gentransfers

3.3.1 Transformation von Bakterien

Zur Amplifikation der Expressionsvektoren wurden „One Shot[®] Stbl3[™] chemically competent“ *E. coli* und zur Anreicherung des mutierten Expressionsvektors wurden „XL10-Gold ultracompetent cells“ transformiert. Für jeden Klon wurden zunächst die Bakterien auf Eis aufgetaut. Es wurden 50 ng Expressionsvektor oder 2 µl der Dpn I-behandelten mutierten Plasmide zu der Kultur hinzu gegeben. Im Anschluss wurde die Mischung leicht geschwenkt und für 30 min auf Eis gestellt. Um die Membran der Bakterien für die Plasmide durchlässig zu machen, erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und das sofortige Abkühlen auf Eis für zwei Minuten. Danach wurden 250 µl S.O.C.-Medium hinzu gegeben und die Kultur für eine Stunde bei 37 °C und 225 U/min im Schüttler wachsen gelassen. Abschließend wurden die Bakterien auf einer LB-Medium-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.2 Transfektion von primären Fibroblasten

Alle Methoden wurden mit primären Fibroblastenzellkulturen von Gesunden erprobt. Als DNA diente ein GFP-Plasmid mit Resistenzgen, damit zum einen direkt nach der Transfektion die Effizienz beurteilt werden konnte und zum anderen auch eine Selektion zum Nachweis der stabilen Expression des Transgens möglich war. Die Effizienz wurde nach Gentransfer anhand des Prozentsatzes der grün fluoreszierenden Zellen an den lebenden Zellen geschätzt.

Die Transfektionsmethoden FuGENE[®], Effectene[®], Lipofectamine[™]PLUS[™] und die Calciumphosphat-Präzipitation wurden auf 24-Well-Platten durchgeführt. Hierfür wurden am Tag vor dem Gentransfer die Zellen ausplattiert, so dass am Tage der Transfektion eine Konfluenz zwischen 50 und 80% vorherrschte.

3.3.2.1 Lipofektion

Die Methodik der Lipofektion basiert auf dem Einbringen von genetischem Material mithilfe von Vesikeln, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren [3, 40, 41]. Hierbei wird häufig aus kationischen Lipiden und der DNA ein Lipid/DNA-Komplex gebildet, der aufgrund der Interaktion seiner positiven Ladung mit der negativ geladenen äußeren Zellmembran in die Zelle eindringen kann.

3.3.2.1.1 „FuGENE[®] HD Transfection Reagent“

Bei dieser auf der Lipofektion basierenden Methode wurde die Transfektion mit „FuGENE[®] HD Transfection Reagent“ der Firma Roche durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde zunächst mit DMEM verdünnt bis eine Konzentration von 0,02 µg/µl erreicht wurde. Zu 100 µl der Verdünnung wurden zum Testen verschiedener DNA/Transfektionsreagenz-Verhältnisse 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 7 µl oder 8 µl des „FuGENE[®] HD Transfection Reagents“ gegeben. Nach dem Vortexen für 1-2 s wurde zur Bildung der Lipidkomplexe die Mischung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 25 µl der Mischung auf die Zellen getropft und diese für 24 h inkubiert, bevor die Proteinexpression beurteilt wurde. Die zuvor ausplattierten Zellen hatten je nach Versuch eine Konfluenz von 60-80%.

3.3.2.1.2 „Effectene[®] Transfection Reagent“

Die Durchführung der Transfektion mit „Effectene[®] Transfection Reagent“ der Firma Qiagen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Am Tag zuvor wurden die Zellen so ausplattiert, dass sie für die Transfektion eine Konfluenz von 50-70% aufwiesen. Die gewünschte Menge an DNA wurde in TE-Puffer (pH=7-8) gelöst und mit Puffer EC auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt. Dann wurde der „Enhacer“ hinzugefügt und das Ganze für 1 s gevortext. Anschließend wurde die Mischung für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert und leicht geschwenkt. Nun erfolgte die Beimengung des Transfektionsreagenzes zur „Enhacer“-mischung und deren Vermischen durch 5-maliges Auf- und Abpipettieren. Zur Bildung der Lipidkomplexe wurde die Mischung nun für 5-10 min bei 15-25 °C inkubiert. Die genauen Mengenangaben ergaben sich aus dem Pipettierschema (Tabelle 5).

Während der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 350 µl neues Fibroblastenmedium hinzugefügt. Zum Transfektionskomplex wurden 350 µl DMEM hinzu gegeben und vermischt. Das Ganze wurde zum Abschluss tropfen-

weise auf die Zellen gegeben und die Platte vorsichtig geschwenkt. Nach 24 h erfolgte eine Beurteilung der Effizienz.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Optimierung der Transfektion mit Effectene®

Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz			
DNA (µg)	1:10	1:25	1:50
0,2	0,2 µg DNA 1,6 µl „Enhacer“ 2 µl Effectene-Reagenz	0,2 µg DNA 1,6 µl „Enhacer“ 5 µl Effectene-Reagenz	0,2 µg DNA 1,6 µl „Enhacer“ 10 µl Effectene-Reagenz
0,3	0,3 µg DNA 2,4 µl „Enhacer“ 3 µl Effectene-Reagenz	0,3 µg DNA 2,4 µl „Enhacer“ 7,5 µl Effectene-Reagenz	0,3 µg DNA 2,4 µl „Enhacer“ 15 µl Effectene-Reagenz
0,4	0,4 µg DNA 3,2 µl „Enhacer“ 4 µl Effectene-Reagenz	0,4 µg DNA 3,2 µl „Enhacer“ 10 µl Effectene-Reagenz	0,4 µg DNA 3,2 µl „Enhacer“ 20 µl Effectene-Reagenz

3.3.2.1.3 „Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents“

Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen vorgegangen. Die Zellen hatten am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-80%. 0,5 µg oder 0,75 µg DNA wurden in 100 µl DMEM gelöst und gut vermischt. Im Anschluss wurden 0,25-1,5 µl (je nach Versuch in 0,25 µl Schritten) des PLUS-Reagenzes zu der DNA-Lösung hinzu gegeben, erneut vorsichtig gemischt und anschließend die Mischung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,75-4,5 µl (je nach Ansatz in 0,5 µl Schritten) Lipofectamine-Reagenz hinzugefügt und das Gesamte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurden verschiedene Verhältnisse von PLUS-Reagenz zu Lipofectamine-Reagenz in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration erprobt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Verwendete Mengen des Lipofectamine-Reagenz und des PLUS-Reagenz in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration

DNA (µg)	Lipofectamine-Reagenz	PLUS-Reagenz
0,5	0,75 µl - 3,0 µl	0,25 µl - 1,0 µl
0,75	1,125 µl - 4,5 µl	0,375 µl - 1,5 µl

Abschließend wurden ca. 100 µl des DNA-Lipid-Komplexes tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Platte vorsichtig geschwenkt. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und nach 24 h die Expression des Transgens beurteilt.

3.3.2.2 Calciumphosphat-Präzipitation

In einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Die Methode wurde nach Kingston et al. (2003) [68] durchgeführt.

Auch bei dieser Methode wurden die Zellen so ausplattiert, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80% aufwiesen. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium gewechselt. Zur Herstellung des Calciumphosphat-DNA-Copräzipitates wurden 100 µl einer 2,5-molaren CaCl₂-Lösung mit 25 µg DNA versetzt und das Volumen auf 1 ml mit TE-Puffer aufgefüllt. Im Anschluss wurde 1:1 (v/v) 2X HEPES-Puffer hinzu gegeben und das Ganze durch Vortexen gemischt. Zur Bildung der Präzipitate wurde die Mischung für 1 bis 20 min stehen gelassen. Die Transfektion wurde durch Hinzufügen von 0,1 ml der Lösung auf 1 ml Medium durchgeführt und nach 4 h wurde das Medium gewechselt. Beim Mediumwechsel wurde zum Teil ein DMSO-Schock durchgeführt. Hierfür wurden 400 µl einer 10%igen, in DMEM gelösten DMSO-Lösung für 3 min auf die Zellen gegeben, das Gesamte dann mit 500 µl PBS verdünnt und im Anschluss die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Effizienz wurde nach 24 h ermittelt.

3.3.2.3 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Membran der Zielzelle mittels eines elektrischen Impulses für die DNA durchlässig gemacht. Das Einschleusen der DNA-Moleküle wird hierbei durch die Wanderung der negativ-geladenen DNA entlang dem elektrischen Feld begünstigt [26]. Die verwendeten Einstellungen ergaben sich aus den technischen Möglichkeiten und nach Jordan et al. (2008) [67].

Die Fibroblasten wurden zunächst gesammelt, mit PBS gewaschen und die Zellzahl ermittelt. Danach wurden 1-2 x 10⁶ Zellen in 450 µl PBS gegeben. Dieses Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und 10-40 µg DNA hinzugefügt. Nach Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde das DNA-Zellgemisch für 10 min auf Eis gestellt. Währenddessen erfolgte die Einstellung der Parameter am Elektroporator:

- Elektrische Kapazität: 900-960 µF
- Spannung: 250 V
- Dauer des elektrischen Pulses: 20-100 ms

Das Programm wurde zunächst mit einer Küvette mit PBS gestartet. Im Anschluss daran wurde die Küvette mit Zellen und DNA in den Elektroporator gestellt und das Programm erneut gestartet. Direkt nach der Elektroporation wurde die Küvette für 10 min auf Eis inkubiert und zum Schluss wurden die Zellen auf einer Platte (\varnothing 10 cm) mit Fibroblastenmedium ausplattiert.

3.3.3 Lentiviraler Gentransfer

Der Vorteil der Verwendung von lentiviralen Vektoren beim Gentransfer ist ihre Fähigkeit durch eine Infektion die DNA in das humane Genom zu integrieren und somit eine dauerhafte Expression des Transgens zu ermöglichen.

3.3.3.1 Verwendetes Vektorsystem

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete lentivirale System basiert auf dem Felines Immundefizienz-Virus. Dies erhöht die Sicherheit, da keine signifikante Homologie in den Nukleotiden zwischen HIV und FIV besteht, so dass eine Rekombination bei der Transduktion von humanen Zellen sehr unwahrscheinlich ist. Des Weiteren ist bisher kein Fall beschrieben, in dem von einer Infektion des Menschen mit dem FI-Virus berichtet wurde [5].

Ein Großteil des FIV-Gens ist deletiert und die für die Produktion des lentiviralen Vektors notwendigen Gene sind auf drei Konstrukte verteilt [5, 66, 103, 117, 118]:

Expressionsvektor

Der Expressionsvektor enthält das einzige genetische Material, das in lentiviralen Partikeln an die Zielzellen weitergegeben wird. In ihm finden sich neben der Expressionskassette nur noch wenige FIV-Sequenzen [117, 118]: ein cPPT-Element 5' des internen CMV-Promotors, die gag-Sequenz und Sequenzen aus den 5'- und 3'-LTRs, die für die reverse Transkription und Integration des Provirus in das Genom der Zielzelle benötigt werden. Die Expressionskassette besteht aus dem internen CMV-Promotor, dem Transgen, dem Resistenzgen und einem regulatorischen Element. Durch den Einsatz des starken viralen Promotors kann eine Expression des Transgens in fast allen humanen Zelltypen gewährleistet werden. Das, auf die für das Transgen und das Resistenzgen kodierenden Sequenzen folgende, posttranskriptionale, regulatorische Element aus dem Murmeltier-Hepatitisvirus (WPRE) besitzt eine besondere Sekundärstruktur. Es führt am 3'-Ende von RNA-Transkripten zu einem effizienteren Export aus dem Kern und er-

höht wahrscheinlich auch die Effizienz von RNA-Prozessierungsschritten. Hierdurch kommt es zu erhöhten Konzentrationen der jeweiligen mRNAs in den Zielzellen und damit zu einer verstärkten Proteinexpression [35, 117, 155]. Vor der Expressionskassette findet sich die cPPT-Sequenz, die aus dem FI-Virus stammt. Sie unterstützt die reverse Transkription und den nukleären Import der DNA, wodurch die Transduktionseffizienz erhöht wird [117]. Der Vektor enthält FIV-abgeleitete 5'- und 3'-LTRs („long terminal repeats“), die stark modifiziert sind. Um die niedrige Transkriptionsaktivität der FIV-LTRs in humanen Zellen zu überwinden wurde die U3-Region des 5'-LTR durch den CMV-Promotor ersetzt. Die 3'-LTR weist eine Deletion in der U3 Region auf, die während der reversen Transkription auf die 5'-LTR des Provirus übertragen wird, wodurch der LTR seine Promotor-Aktivität verliert. Die Expression des Transgens wird damit ausschließlich von dem zwischen den LTRs positionierten internen Promotoren CMV und hPGK reguliert. Die genomische virale RNA kann nicht vom Provirus transkribiert werden [118].

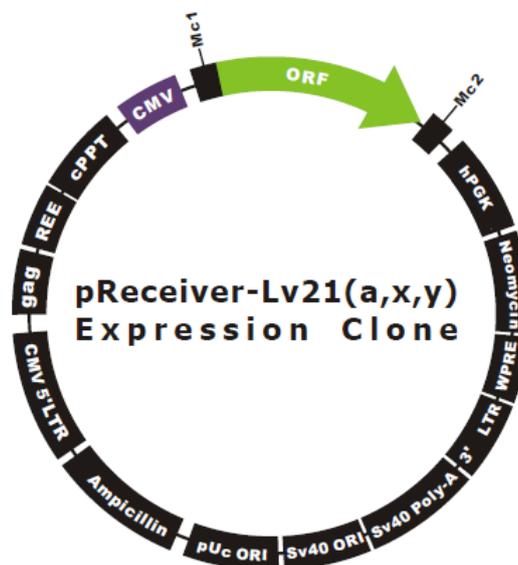


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des verwendeten Expressionsvektors der Firma GeneCopoeia™

Verpackungsplasmid 1

Von diesem Verpackungsplasmid werden die strukturellen (*gag*), regulatorischen (*vif*, *gp4*, *rev/RRE*, *nef*) und Replikationsgene (*pol*), die für die Virusproduktion notwendig sind, exprimiert. Die Transkription erfolgt über den CMV-Promotor und

wird durch ein Polyadenylierungssignal (polyA) terminiert. Das env-Gen für das Hüllprotein ist deletiert [117].

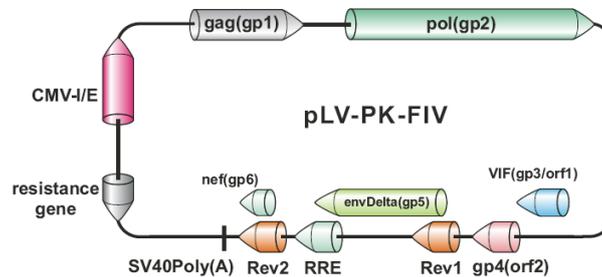


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Verpackungskonstrukts 1 der Firma GeneCopoeia™

Verpackungsplasmid 2

Die Pseudotypisierung, die Verwendung eines heterologen Hüllproteins (VSV-G) anstelle des ursprünglichen env-Proteins, erweitert das Spektrum der Zielzellen von T-Zellen und Makrophagen auf eine breite Auswahl von primären Zelllinien. VSV-G bindet recht unspezifisch an Membranphospholipide und benötigt keinen spezifischen Proteinrezeptor. Die Transkription wird auch hier durch den CMV-Promotor und das polyA-Signal reguliert [117, 118].

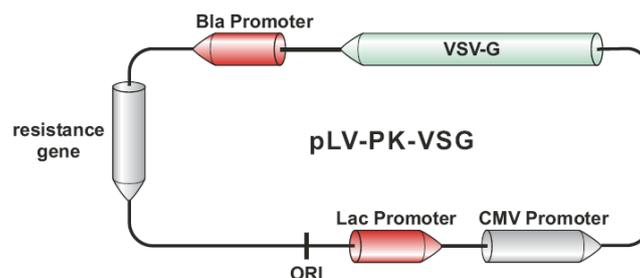


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Verpackungskonstrukts 2 der Firma GeneCopoeia™

Durch die Aufteilung der für die Generierung lentiviraler Partikel notwendigen Proteine auf drei Konstrukte soll die Entwicklung pathogenerer und replikationskompetenter Viren in den Zielzellen verhindert werden. Die Verpackungsplasmide enthalten alle akzessorischen Proteine, die für die Produktion der viralen Partikel benötigt werden, als trans-Elemente. Sie werden daher nicht in das Genom der Zielzelle integriert. Nachdem nur die genomische RNA des Expressionsvektors in die

transduzierten Zellen gelangt, können keine neuen Viren von den Zielzellen produziert werden [117, 118].

Aufgrund der zytotoxischen Wirkung der Expression von VSV-G und einigen FIV-Proteinen erfolgt die Produktion der lentiviralen Partikel durch transiente Kotransfektion der drei Plasmide in eine Verpackungszelllinie, die HEK 293T-Zellen [118].

3.3.3.2 Protokoll

Die Produktion der Viruspartikel erfolgte nach dem Protokoll von GeneCopoeia™. Zunächst wurden die benötigten Medien (Tabelle 7) hergestellt und vor Gebrauch mit einem 45 µm-Proteinfilter gefiltert, um Präzipitatbildungen der Viren zu verhindern.

Tabelle 7: Medien, die für den Transduktionsprozess benötigt wurden

Benötigte Medien	
Medium 1:	DMEM + 10% Fötale Kälberserum + 1% Penicillin-Streptomycin
Medium 2:	DMEM + 10% Hitze inaktiviertes fötales Kälberserum
Medium 3:	DMEM + 2% Fötale Kälberserum
Medium 4:	DMEM (ohne Serum und ohne Antibiotika)

Die HEK 293T-Zellen wurden für mehrere Tage in Medium 1 kultiviert. Einen Tag vor Transfektion wurden ca. 4×10^6 Zellen auf eine kleine Platte (\varnothing 10 cm) ausplattiert und in Medium 2 wachsen gelassen, so dass die Zellen bei Transfektion eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen. Am Tag darauf wurden 10 µg der Verpackungsplasmide (PLV-PK-01) mit 2 µg des Expressionsvektors gemischt und 400 µl Medium 4 und 20 µl PLUS-Reagenz (aus dem „Lipofectamine™ LTX and PLUS™-Reagents“-Transfektions-Kit) hinzu gegeben und die Mischung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 30 µl Lipofectamine-Reagenz mit 400 µl Medium 4 vorsichtig vermischt. Im Anschluss wurde das verdünnte Lipofectamine-Reagenz zu der Plasmid-PLUS-Reagenz-Mischung hinzugegotft und erneut für 15 min inkubiert. Diese Zeit wurde genutzt, um die HEK 293T-Zellen mit Medium 4 zu waschen und 4 ml Medium 3 auf die Zellen zu geben. Abschließend wurde dann der DNA/Lipofectamine-Komplex vorsichtig auf die Zellen getropft und die Platte vorsichtig geschwenkt. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand mit den Viren wurde nach 24 h und 48 h gesammelt und für 5 min bei Raumtemperatur und 3000 U/min zentrifu-

giert und mit einem 45 µm-Filter filtriert. Im Anschluss wurde er direkt zur Transduktion der ausgewählten Fibroblastenzellen verwendet, indem auf die zu 70% konfluenten Zellen der Virenüberstand im Verhältnis von 1:1 (v/v) mit normalem Medium gegeben wurde. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und nach 48 h die Selektion mit 2 µl/ml des Antibiotikums G418 begonnen.

3.4 Biochemische Aktivitätsmessungen

Die biochemischen Aktivitätsmessungen der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, der Cytochrom c-Oxidase und der Citratsynthase erfolgten mittels des Spektrophotometers V-550 der Firma Jasco. Es wurde das Programm „Spectra Manager for Windows™“ für die Durchführung und Auswertung der Experimente verwendet. Alle Messungen wurden in einer Quarzküvette durchgeführt. Die Aktivitätsmessungen wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Methodik basiert auf einem modifizierten Protokoll nach Sgobbo et al. (2007) [124].

3.4.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Aktivitätsmessungen wurden 2 bis 3 zu 70% konfluente Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 14 cm benötigt. Dies entsprach 3 bis 5 x 10⁶ Fibroblastenzellen. Die Zellen wurden zu Beginn mit Trypsin von der Oberfläche der Platten gelöst und gesammelt. Das gewonnene Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und bei 500 g für 3,5 min zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden alle weiteren Schritte auf Eis ausgeführt. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, die Zellzahl mittels der Neubauerzählkammer ermittelt und 30 µl DNase (2 U/µl) zur Eliminierung der DNA hinzu gegeben. Im Anschluss wurden zur Permeabilisation der Zellmembranen für ziemlich exakt eine Minute 30 µg Digitonin pro Million Zellen hinzugefügt, so dass die Konzentration in dem PBS-Zell-Digitoningemisch zwischen 0,1% und 0,2% (v/v) lag. Nach der Minute wurde das Gemisch durch Hinzufügen von mindestens dem neunfachen Volumen an PBS verdünnt und bei 10000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl hypotonem Puffer (25 mM Kaliumphosphat pH=7,4, 5 mM MgCl₂) resuspendiert und der Proteaseinhibitor PMSF in einer Konzentration von 0,25 mM zu gegeben. Um die Enzyme für die zugefügten Substrate leichter erreichbar zu machen, wurde anschließend die Präparation dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Wenn die Messung nicht am selben Tag wie die Vorbereitung der Proben stattfand, wurde nach dem ersten Einfrieren die Probe bei - 80 °C bis zur Messung

aufbewahrt und erst dann erneut zweimal eingefroren und aufgetaut. Nach dem letzten Auftauen wurde die Proteinkonzentration mittels der Methode nach Bradford bestimmt. Als Referenz diente eine mit bovinem Serumalbumin erstellte Standardkurve. Die Probe wurde während der Messungen auf Eis gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Komplex I-Aktivität

Es wurde die Oxidation von NADH zu NAD^+ über 5 min gemessen. NADH hat im Gegensatz zu NAD^+ ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm, so dass diese Wellenlänge für die Messung gewählt wurde [124]. Es wurde an jedem Messtag neu hergestellt, indem eine kleine Menge an NADH abgewogen und in Milliporewasser zu einer 10-millimolaren Lösung gelöst wurde. Nachdem NADH eine hohe Autooxidationsrate aufweist, wurde vor Beginn der Messungen die tatsächliche Konzentration mittels einer Spektromessung im Bereich von 300 bis 400 nm ermittelt. Hierfür wurden 2 μl NADH in 1 ml Wasser gegeben und die Messung gestartet. Die Konzentration errechnete sich dann nach der folgenden Formel, wobei Abs_{340} der gemessenen Absorption bei 340 nm entspricht:

$$C_{\text{NADH}} = \frac{\text{Abs}_{340} \cdot (1 \text{ ml} + 0,002 \text{ ml})}{\frac{6,22}{\text{mmol}} \cdot 0,002 \text{ ml}}$$

Als Puffer für die Bestimmung der Aktivität des Atmungskettenkomplexes I diente ein hypotoner Puffer (25 mM Kaliumphosphat $\text{pH}=7,4$, 5 mM MgCl_2) versetzt mit 2,5 mg/ml bovinem Serumalbumin, dem zur Blockierung des Komplexes II 3 $\mu\text{g/ml}$ Antimycin A und zur Inhibition des Komplexes IV Kaliumcyanid in einer Endkonzentration von 2 mM beigemischt wurde. Vor Beginn der Messung wurde ein Testgemisch bestehend aus Puffer, 250 $\mu\text{g/ml}$ der vorbereiteten Probe und Ubichinon in einer Konzentration von 65 μM hergestellt. Durch die Zugabe von Ubichinon im Überschuss wurde gewährleistet, dass der Elektronenakzeptor bei der Oxidation des NADH nicht den limitierenden Faktor darstellt. Danach wurde die Quarzküvette mit 200 μl des Testgemisches gefüllt. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von NADH in einer Konzentration von 250 μM bei einer Wellenlänge von 340 nm gestartet und über 5 min verfolgt. Die Messung einer Probe wurde an

einem Messtag dreimal wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine weitere Messung, bei der zur Blockierung des Komplexes I Rotenon im Überschuss hinzu gegeben wurde, um das Ausmaß der Oxidation des NADH in den vorhandenen Nebenreaktionen in dem Gemisch zu bestimmen.

Nachdem die Messungen beendet waren, wurde die rotenonsensitive Aktivität des Komplexes I mittels der Lambert-Eaton-Gleichung berechnet. Es wurde zunächst die Steigung der Aktivitätskurve mit Hilfe des „Spectra Managers“ in das Diagramm eingezeichnet. Hierbei wurde ein Bereich von 200 s ausgewählt, in dem die Kurve weitestgehend einer Gerade glich. Wenn kein passender Bereich gefunden werden konnte, wurde die Messung wiederholt. Der Absorptionsunterschied über die Zeit konnte dann abgelesen werden. Der Mittelwert der Steigungen der ersten drei Messungen ohne Rotenon wurde berechnet und im Anschluss die spezifische, rotenonsensitive Aktivität des Komplexes I wie folgt berechnet:

Absorptionsunterschied über die Zeit:

$$\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \text{ ohne Rotenon} - \frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \text{ mit Rotenon}$$

Spezifische Aktivität:

$$\frac{\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \cdot V_{\text{eingesetzt}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}} = X \frac{U}{\text{mg Protein}}$$

Extinktionskoeffizient in l/(mmol · cm):

$$\Delta \varepsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}} = 6,22$$

Eingesetztes Volumen:

$$V_{\text{eingesetzt}} = 200 \mu\text{l} + \text{Volumen NADH}$$

Dicke der Küvette:

$$d = 1 \text{ cm}$$

Volumen der Probe:

$$V_{\text{Probe}} = 50 \mu\text{g}/\text{Probenkonzentration}$$

$$U = \mu\text{mol}/\text{min}$$

3.4.3 Bestimmung der Komplex IV-Aktivität

Hierbei wurde die Oxidation von reduziertem Cytochrom c über die Zeit verfolgt [124]. Dies geschah bei einer Wellenlänge von 550 nm. Vor Beginn der Aktivitätsmessungen wurde das reduzierte Cytochrom c hergestellt. Am Tage der Messung wurde die tatsächliche Konzentration der hergestellten Lösung ermittelt. Dies geschah durch eine Spektromessung im Bereich von 500 bis 600 nm. Es wurden 2 µl der Lösung in 1 ml Wasser gegeben und die Messung gestartet. Danach erfolgte die Berechnung der Konzentration nach:

$$C_{\text{Cyt c}} = \frac{(\text{Abs}_{550} - \text{Abs}_{540}) \cdot (1 \text{ ml} + 0,002 \text{ ml})}{\frac{19,1}{\text{mmol}} \cdot 0,002 \text{ ml}}$$

Der verwendete Puffer für die Aktivitätsmessungen war der hypotone Puffer versetzt mit 3 µg/ml Antimycin A. Es wurden 80 µg Protein in 1 ml des Puffers gelöst und 200 µl des Gemischs in die Küvette überführt. Daraufhin wurde das Programm „Time course measurements“ geöffnet und die Parameter (550 nm, 300 s) eingestellt. Durch das Hinzufügen von reduziertem Cytochrom c in einer Endkonzentration von 20 µM wurde die Reaktion gestartet und über den angegebenen Zeitraum verfolgt. Insgesamt wurde diese Messung dreimal wiederholt und jeweils die Änderung der Absorption über die Zeit ermittelt. Somit konnte dann die spezifische Aktivität des Komplexes IV berechnet werden:

$$\frac{\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \cdot V_{\text{eingesetzt}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}} = X \frac{U}{\text{mg Protein}}$$

Extinktionskoeffizient in l/(mmol · cm):

$$\Delta \varepsilon_{\text{Cyt c } 550 \text{ nm}} = 19,1$$

Eingesetztes Volumen:

$$V_{\text{eingesetzt}} = 200 \mu\text{l} + \text{Volumen Cyt c}$$

Dicke der Küvette:

$$d = 1 \text{ cm}$$

Volumen der Probe:

$$V_{\text{Probe}} = 16 \mu\text{g} / \text{Probenkonzentration}$$

$$U = \mu\text{mol}/\text{min}$$

3.4.4 Bestimmung der Aktivität der Citratsynthase

Die Aktivität der Citratsynthase wurde indirekt bestimmt. Die Citratsynthase katalysiert in den Mitochondrien die Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat. Hierbei entsteht neben dem Citrat freies Coenzym A [152]. Mit Hilfe des sogenannten Ellmans-Reagenzes, DTNB, 5, 5'-Dithiobis (2, 2'-nitrobenzoesäure), das mit der freien Sulhydryl-Gruppe des Coenzym A reagiert, wodurch das 2-Nitrobenzoat-thio-Anion freigesetzt wird, dessen Konzentration bei 412 nm photometrisch bestimmt werden kann [37], lässt sich diese Reaktion indirekt nachweisen und somit die Aktivität der Citratsynthase ermitteln [124].

Als Testpuffer diente ein 10-millimolarer Tris-HCl-Puffer (pH=7,4) mit 0,2 % (v/v) Triton-X-100. Eine 50-millimolare Acetyl-CoA-Lösung wurde direkt vor Beginn der Messung durch Lösen des Pulvers in Testpuffer hergestellt. Zudem wurden DTNB (50 mM) und Oxalacetat (50 mM) benötigt. Zunächst wurden 80 µg Protein in 1 ml Testpuffer gelöst. Zu dem Gemisch wurden 4 µl DTNB und 5 µl Acetyl-CoA hinzugegeben und vermischt. Im Anschluss wurden 200 µl des Reaktionsgemisches in die Küvette überführt und im Programm „Time course measurements“ die Parameter (412 nm, 300 s) eingestellt. Durch das Hinzufügen von 1,6 µl Oxalacetat wurde die Reaktion gestartet. Nach dreimaliger Wiederholung der Messung wurde die mittlere Absorptionsänderung über die Zeit ermittelt und die spezifische Aktivität der Citratsynthase mit Hilfe der Lambert-Eaton-Gleichung bestimmt:

$$\frac{\frac{\Delta \text{Abs}}{\text{min}} \cdot V_{\text{eingesetzt}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{Probe}}} = X \frac{U}{\text{mg Protein}}$$

Probenkonzentration

Extinktionskoeffizient in l/(mmol · cm):

$$\Delta \varepsilon_{\text{DTNB } 412 \text{ nm}} = 13,6$$

Eingesetztes Volumen:

$$V_{\text{eingesetzt}} = 201,6 \mu\text{l}$$

Dicke der Küvette:

$$d = 1 \text{ cm}$$

Volumen der Probe:

$$V_{\text{Probe}} = 16 \mu\text{g} / \text{Probenkonzentration}$$

$$U = \mu\text{mol/min}$$

3.5 Westernblot

Für die Westernblots wurden angereicherte Mitochondrien verwendet.

3.5.1 Mitochondrienanreicherung

Zur Anreicherung der Mitochondrien wurde nach einem Protokoll von Pon und Schon (2001) [106] vorgegangen. Alle Schritte wurden bei 0-4 °C ausgeführt. Zunächst wurden die Fibroblasten von fünf zu 80% konfluenten Platten (Ø 14 cm) gesammelt, in 1 ml Mito-Puffer (Saccharose 250 mM, HEPES 2 mM pH=7,4, EGTA 0,1 mM) resuspendiert und bei 327 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde anschließend erneut in 2 ml Mito-Puffer aufgelöst. Danach wurden die Zellen durch 10 bis 20-maliges Auf- und Abführen des Kolbens im Potter S der Firma B. Braun Biotech International bei einer Geschwindigkeit von 500 U/min homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 571 g für 10 min zentrifugiert und der mitochondrienreiche Überstand in ein neues Gefäß überführt. Mit dem übrig gebliebenen Pellet wurde wie zuvor verfahren und der zweite Überstand zum ersten gegeben. Das Gesamte wurde abschließend bei 14290 g für 10 min zentrifugiert und die im Anschluss erhaltenden angereicherten Mitochondrien wurden in 100 µl Mito-Puffer gelöst und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung weggefroren. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt.

3.5.2 Durchführung des Westernblots

Die größenspezifische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Elektrophorese [75]. Hierbei wurden die Moleküle einem elektrischen Feld ausgesetzt. Es wurden je Probe 40 µg Protein mit 4X Lämmli-Puffer versetzt. Die Suspension wurde mit Phosphatpuffer (20 mM) auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt und im Anschluss für 10 min auf 70 °C erhitzt. Das im Lämmli-Puffer enthaltene aniosche Detergenz Natriumdodecylsulfat führte zu einer Überdeckung der Eigenladung der Proteine. Das Protein wurde negativ geladen und die Ladung des Proteins somit größenabhängig [75]. Die Laufgeschwindigkeit wurde folglich fast ausschließlich durch die Molekülgröße bestimmt. Es wurden aufgrund der Größe der zu detektierenden Proteine 4-12% oder 10-20% Polyacrylamid-Precast-Gele der Firma Lonza für die Elektrophorese verwendet. Diese wurden zunächst in Lauf-Puffer gelegt und dann in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Lauf-Puffer gefüllt. Nach Beladen des Gels mit den 40 µl der Proben und einem grö-

ßenspezifischen Proteinmarker erfolgte das Anlegen des elektrischen Feldes bei einer Spannung von 130 V.

Nachdem die Proteine gewichtsspezifisch aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine PVDF-Membran transferiert [136]. Diese wurde vor Gebrauch in ca. 100%igen Methanol eingelegt. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen, sowie die PVDF-Membran und die Blotting-Papiere wurden für 10 min in Blotting-Puffer gelegt und geschüttelt. Gel, Membran und sie umgebende Blotting-Papiere wurden in die mit Blotting-Puffer gesäuberte und vorbefeuchtete Blotting-Kammer gelegt und einem Stromfeld bei konstanter Stromstärke (die der cm²-Fläche der Membran in mA entsprach) für 75 min ausgesetzt.

Durch Inkubation der Membran für 1 Stunde in 5%iger (w/v) Blockierungsmilch wurden freie Bindungsstellen der Membran blockiert. Danach erfolgte die Dekoration der Membran mit Antikörpern. Diese wurden hierfür im unten angegebenen Verhältnis (siehe Tabelle 8) in 5%iger Blockierungsmilch gelöst und auf die Membran gegeben, die dann bei 4 °C über Nacht inkubiert wurde. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran für 10 min mit Tween-TBS, bevor der sekundäre Antikörper (gelöst in 5%iger Blockierungsmilch) für eine Stunde hinzugegeben wurde. Nach erneutem Waschen mit Tween-TBS wurde die Membran mit ECL befeuchtet und der Film aufgelegt und somit die Proteine detektiert.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper mit Angabe der Verdünnung und des sekundären Antikörpers

Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Ak (Verdünnung)	Bandengröße (kDa)
ACAD9	1:500	Anti-mouse (1:1000)	69
NDUFS1	1:200	Anti-goat (1:7500)	75
NDUFS3	1:1000	Anti-mouse (1:1000)	30
NDUFB8	1:1000	Anti-mouse (1:1000)	19
NDUFB9	1:200	Anti-rabbit (1:1000)	22
NDUFA9	1:1000	Anti-mouse (1:1000)	35
Porin	1:1000	Anti-mouse (1:1000)	39
CIII Core 2	1:1000	Anti-mouse (1:1000)	48

3.6 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer

Blotting-Puffer	Zur Herstellung von 1 l: 3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol
5% (w/v)-Blockierungsmilch	1 g Trockenmilchpulver wurde in 20 ml Tween-TBS gelöst.
HEPES-Puffer 2X (pH=7,05)	Zur Herstellung von 100 ml: 0,8 g NaCl 0,027 g Na ₂ HPO ₄ 1,2 g HEPES pH-Einstellung mit NaOH sterile Filtrierung mit 0,22 µm-Filter Aufbewahrung bei - 20 °C
Kaliumphosphat-Puffer (pH=7,4)	Herstellung je einer 1-molaren Lösung: K ₂ HPO ₄ : 17,418 g in 100 ml KH ₂ PO ₄ : 13,609 g in 100 ml Für den Phosphat-Puffer (100 mM) mit pH=7,4 wurden 80,2 ml der K ₂ HPO ₄ -Lösung mit 19,8 ml der KH ₂ PO ₄ -Lösung gemischt.
Lämmli-Puffer 4X	8% SDS 40% Glycerol 0,02% Bromphenolblau 250 mM Tris-HCl (pH=6,8) 0,1 M DTT
Mito-Puffer	250 mM Saccharose 2 mM HEPES (pH=7,4) 0,1 mM EGTA

PBS 10X (pH=7,4)	Zur Herstellung von 1 l: 80 g NaCl 2 g KCl 14,2 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ pH-Einstellung mit HCl
Lauf-Puffer 10X (pH = 8,9)	Zur Herstellung von 2 l: 60,6 g Tris 288 g Glycin 20 g SDS
TBE-Puffer 10X	Zur Herstellung von 2 l: 102 g Tris 55 g EDTA 7,4 g Borsäure
TBS-Puffer (pH=7,5)	Zur Herstellung von 5 l: 12,1 g Tris 40,0 g NaCl Einstellung des pH mit HCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH=7,6) 1 mM EDTA (pH=7,6)
Tween-TBS	0,1% (v/v)-Lösung von Tween™ 20 in TBS

Lösungen

Antimycin A (1 mg/ml)	1 mg Antimycin A wurde in 100%igem Ethanol gelöst und bei - 20 °C aufbewahrt.
Cytochrom c reduziert (2mM)	124 mg oxidiertes Cytochrom c wurden in 5 ml Tris-HCl (125 mM, pH=8) gelöst. Im Anschluss wurde eine Löffelspitze Natriumdithionit hinzu gegeben, um das Cytochrom c zu reduzieren. Danach wurde die Lösung in eine „SlidAlyser“-Membran gefüllt und über Nacht bei 4 °C in Tris-HCl (25 mM, pH=8) dialysiert. Am Tag darauf wurde die Lösung aliquotiert (ca. 60 µl) und bei - 20 °C weggefroren. Die gesamte Herstellung erfolgte so gut wie möglich unter Lichtausschluss.
Decylubichinon (50 mM)	25 mg Decylubichinon wurden in 1,55 ml 100%igem Ethanol gelöst und in kleinen Stocks (ca. 30 µl) bei - 20 °C weggefroren.
Digitonin (10%)	100 mg wurden in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und in kleinen Stocks (ca. 10 µl) bei - 20 °C weggefroren.
DNase (2 U/µl)	10000 U der DNase wurden in 5 ml Tris-HCl (20 mM, pH 7,5) mit MgCl ₂ (1 mM) gelöst und bei - 80 °C aufbewahrt.
DTNB (50mM)	99 mg wurden in 5 ml Tris (1M, pH=8) gelöst und in kleinen Stocks (ca. 10-20 µl) bei - 20 °C weggefroren.
KCN (1M)	1,3 g wurden in Millipore-Wasser gelöst und ein pH von 8 eingestellt. Da HCN bei der pH-Einstellung entstehen kann, wurde unter dem Abzug gearbeitet. Im Anschluss wurde das Ganze mit Millipore-Wasser auf 20 ml aufgefüllt und die Stocks wurden bei - 80 °C aufbewahrt.
Oxalacetat (50mM)	33 mg wurden in 5 ml Millipore-Wasser gelöst und die Aliquots wurden bei - 20 °C weggefroren.

PMSF (100 mM)	PMSF wurde in Ethanol gelöst und bei - 20°C weggefroren.
Rotenon (1 mg/ml)	Rotenon wurde in Ethanol gelöst und bei - 20 °C aufbewahrt.
Uridin (100 mM)	240 mg wurden in 10 ml Millipore-Wasser gelöst und mit einem 22 µm-Filter sterilisiert. Die Stocks von 1 ml wurden bei - 20 °C weggefroren.

Medien

Wachstumsmedium für HEK 293T-Zellen	500 ml "Dulbecco's modified eagle Medium high-glucose" 50 ml fötales Kälberserum 5,5 ml Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium für HEK 293T-Zellen	Wachstumsmedium für HEK 293T-Zellen versetzt mit 7,5% (v/v) DMSO
Wachstumsmedium für Fibroblasten – Glukose	500 ml „Dulbecco's modified eagle Medium high-glucose“ 50 ml fötales Kälberserum 5,5 ml Penicillin-Streptomycin 200 µM Uridin
Wachstumsmedium für Fibroblasten – Galaktose	500 ml „Dulbecco's modified eagle Medium no-glucose“ 50 ml fötales Kälberserum 5,5 ml Penicillin-Streptomycin 200 µM Uridin 5 mM Galaktose 5 mM Pyruvat
Einfriermedium für Fibroblasten	Glukose-Wachstumsmedium für Fibroblas- ten versetzt mit 10% (v/v) DMSO

LB-Medium	<p>Zur Herstellung von 1 l:</p> <ul style="list-style-type: none">10 g Trypton5 g Hefeextrakt10 g NaCl <p>Das Medium wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.</p>
LB-Agar-Platten mit Ampicillin	<p>Zu 1 l LB-Medium wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar-Agar hinzu gegeben und dann autoklaviert. Nach dem Abkühlen bis 55 °C wurde das Antibiotikum hinzu gegeben (100 µg/ml Ampicillin) und im Anschluss das Medium auf Platten verteilt (ca. 15 ml pro 10 cm Platte). Nach dem Aushärten wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt.</p>
S.O.C.-Medium	<ul style="list-style-type: none">0.5% Hefeextrakt2% Trypton10 mM NaCl2,5 mM KCl10 mM MgCl₂10 mM MgSO₄20 mM Glukose

3.7 Reagenzien, Material und Geräte

Reagenzien, Lösungen und Medien

Name	Hersteller	Produktnummer
Acetyl-Coenzym A	Sigma-Aldrich	A2056
Agar-Agar	Roth	5210.4
Agarose	Biozym	870055
Ampicillin	Sigma-Aldrich	A9518
Antimycin A	Sigma-Aldrich	A8674
Borsäure	Sigma-Aldrich	B6768
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories GmbH	K41-001
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH	500-0006
Bromophenolblau	Fluka	18040
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich	223506
Cytochrom c	Sigma-Aldrich	C2506
Decylubichinon	Sigma-Aldrich	D7911
Digitonin	Calbiochem	300410
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	1-05099-1000
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	D5879
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	1-06580-1000
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	D0632
DMEM - High glucose	Invitrogen	41966
DMEM - No glucose	Invitrogen	11966
DTNB	Sigma-Aldrich	D8130
ECL	Amersham TM	RPN2132
EDTA	Sigma-Aldrich	E5391
EGTA	Sigma-Aldrich	E3889
Ethidiumbromid	Roth	7870.1
Ficoll®	Sigma-Aldrich	F2637
Fötales Kälberserum	Invitrogen	10270
G418	Sigma-Aldrich	G8168
Galaktose	Sigma-Aldrich	G5388
Glycerol	Merck	1-09634-2500
Glycin	Roth	3908-3
HCl	Merck	1-04936-1000
Hefeextrakt	Roth	2363.4
HEPES	Sigma-Aldrich	H7523
Kaliumchlorid	Merck	1-04936-1000
Kaliumcyanid	Sigma-Aldrich	297038
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	1-04873-1000

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich	M8266
Methanol	Merck	1-06009-2500
NADH	Roche	10128-015-001
Natriumchlorid	Merck	1-06404-1000
Natriumdithionit	Merck	1-06507-0500
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich	P2256
Orange G	Sigma-Aldrich	O3756
Oxalacetat	Sigma-Aldrich	O4126
PBS	Invitrogen	14190
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	15070-063
PMSF	Sigma-Aldrich	P7626
Rotenon	Sigma-Aldrich	R8875
Saccharose	Merck	1-07687-1000
SDS-Pellets	Roth	CN30.2
Tris	Sigma-Aldrich	T1503
Tris-HCl (1M, pH=7,8)	Rockland	MB-004
Triton X-100	Merck	1-08603-1000
Trockenmilchpulver	BioRad Laboratories	170-6404
Trypsin	Invitrogen	25300
Trypton	Roth	8952.4
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich	P7949
Uridin	Sigma-Aldrich	U3003

Ladder, Antikörper und Enzyme

Name	Hersteller	Produktnummer
ACAD9-Antikörper	Sigma-Aldrich	SAB1400510
Anti-goat	Von der benachbarten Arbeitsgruppe	
Anti-mouse	Amersham Bioscience	RPN 4201
Anti-rabbit	Amersham Bioscience	RPN 4301
CIII Core 2-Antikörper	Mitosciences	MS-304
DNA-Marker (1kb)	Fermentas	SM1163
DNase	Roche	04 716 728 001
NDUFA9-Antikörper	Mitosciences	MS-111
NDUFB8-Antikörper	Mitosciences	MS-105
NDUFB9-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-98030
NDUFS1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-50132
NDUFS3-Antikörper	Mitosciences	MS-110
Porin-Antikörper	Mitosciences	MSA-03
Proteinmarker	Fermentas	SM0441

Verwendete Kits

Name	Hersteller	Produktnummer
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen	80204
Effectene [®] Transfection Reagent	Qiagen	301425
First strand cDNA synthesis kit (#1611)	Fermentas	K1611
FuGene [®] HD Transfection Reagent	Roche	04709691001
Lipofectamine [™] LTX and PLUS [™] Reagents	Invitrogen	15338-100
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen	12143
QIAPrep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27104
QuickChange [™] XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	200516
Taq Polymerase	Qiagen	201203

Plasmide und Bakterien

Name	Hersteller	Produktnummer
Expressionsvektor ACAD9	GeneCopoeia [™]	EX-V1486-Lv21
Expressionsvektor NDUFB9	GeneCopoeia [™]	EX-L0032-Lv21
Expressionsvektor NDUFS1	GeneCopoeia [™]	EX-T0208-Lv21
One Shot [®] Stbl3 [™] chemically competent <i>E.coli</i>	Invitrogen	C7373-03
Verpackungsplasmide	GeneCopoeia [™]	pLV-PK-01
XL10-Gold ultracompetent cells (<i>E.coli</i>)	Stratagene	200516

Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
EasyWin 32	Herolab
Electroporator - EasyJect Plus	Wolf Laboratories
Elektrophoresekammer P8DS	Owl Separation Systems Inc.
Inkubator (37 °C) / Trockenschrank	Memmert
NanoDrop ND-1000 Version 3.5.2	Thermo Scientific Abgene (R) Germany
ND-1000 Spectrometer Nanodrop [®]	Thermo Scientific Abgene (R) Germany
Potter S	B. Braun Biotech International
PTC 225 Peltier Thermal Cycler	MJResearch
Rotanta 46 RS	Hettich Zentrifugen
Sanyo CO ₂ Incubator - MCO 17AIC	Sanyo
SIGMA Zentrifuge 3K30	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
SIGMA Zentrifuge 6K15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH
Spectra Manager for Windows [™]	Jasco
Spektrophotometer Jasco V-550	Jasco
UVT-40-M	Herolab

Material

Name	Hersteller	Produktnummer
ABgene® PCR Plates	Thermo Scientific	AB-0600
Adhesive PCR Film	Thermo Scientific	AB-0558
Hybond™ Blotting Paper	Amersham TM	RPN6101M
Hybond™-P	Amersham TM	RPN303F
Hyperfilm™ ECL High performance chemi-luminescence film	Amersham TM	92645
PAGEr Gold Precast Gels 4-12%	Lonza	59520
PAGEr Gold Precast Gels 10-20%	Lonza	59518
QIAshredder	Qiagen	79654
Slide-A-Lyzer-Cassette	Pierce	66410
TC Dish 140x20	Nunc	168381
TC Dish 60x15	Nunc	150288
TC Dish 92x17	Nunc	150350

4 Ergebnisse

4.1 Generierung einer stabilen Zelllinie

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden des Gentransfers erprobt, um die stabile Expression eines Transgens in primären Fibroblastenzelllinien zu ermöglichen. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass eine ausreichende Anzahl der das Transgen exprimierenden Zellen zur Verfügung stand, um durch funktionelle Analysen die Krankheitsrelevanz der zu testenden DNA-Varianten nachweisen zu können. Die verwendeten Protokolle der Transfektion und Transduktion unterschieden sich im Versuchsaufwand und in den Erfolgsaussichten einer stabilen Expression des Transgens. Es wurde mit der Testung der einfacheren Methoden der Transfektion begonnen. Da durch diese keine stabile Zelllinie hergestellt werden konnte, wurde das aufwändigere Protokoll der lentiviralen Transduktion etabliert.

4.1.1 Transfektion

In einer ersten Versuchsreihe wurden verschiedene Ansätze der Transfektion erprobt. Zu diesen gehörten die Lipofektionsmethoden LipofectamineTMPLUSTM, Effectene[®] und FuGENE[®]. Eine weitere chemische Methode stellte die Calciumphosphat-Präzipitation dar. Zudem wurde die auf physikalischen Mechanismen beruhende Methodik der Elektroporation getestet. Die Vorauswahl der Methoden wurde anhand der Artikel von Veelken et al. (1994) [146] und Uchida et al. (2002) [141] getroffen. Nach Veelken et al. (1994) bieten sich bei humanen Fibroblasten für eine transiente Transfektion vor allem die Lipofektion und die Elektroporation an. In dem Artikel von Uchida et al. (2002) wurde die Effizienz verschiedener chemischer Methoden verglichen. Die besten Ergebnisse erhält man danach für primäre humane Fibroblasten mit LipofectamineTMPLUSTM und Effectene[®]. Die zusätzliche Aufnahme der Calciumphosphat-Präzipitation beruhte auf der beschriebenen Effektivität dieser Methodik zum stabilen Gentransfer in primäre Fibroblastenzelllinien [28].

Um die Effektivität der Transfektion beurteilen zu können, wurde ein GFP-Plasmid mit Selektionsmarker verwendet.

4.1.1.1 Lipofektion

4.1.1.1.1 Transfektion mit „FuGENE® HD Transfection Reagent“

In einer ersten Versuchsreihe wurden sechs verschiedene Verhältnisse (2:3; 2:4, 2:5, 2:6, 2:7 und 2:8) von eingesetzter Plasmid-DNA zu Transfektionsreagenz erprobt. Hierbei zeigten sich nur bei Verwendung der höchsten Konzentrationen an Transfektionsreagenz grün fluoreszierende Zellen. Allerdings exprimierten nur vier bzw. 10 von 40000 ausplattierten Zellen das GFP bei einem Verhältnis von 2:7 bzw. 2:8. Es zeigte sich keine Toxizität des Reagenzes, so dass nahezu alle Zellen den Transfektionsprozess überlebten. Auch bei einem erneuten Versuch und einem parallelen Ansatz mit linearisierter DNA konnte die Effizienz der Transfektion nicht gesteigert werden. Nachdem diese Methode eine sehr geringe Effizienz aufwies und zudem nach 72 h ohne Beginn der Selektion keine grün fluoreszierenden Zellen mehr sichtbar waren, wurde diese Methode verlassen.

4.1.1.1.2 Transfektion mit „Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents“

Die Erprobung dieser Methode beinhaltete verschiedene Ansätze:

- Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse von DNA zu Transfektionsreagenz
- Erhöhung der Konzentration an DNA
- Variation der Inkubationszeiten der Zellen mit dem Transfektionsgemisch
- Erprobung verschiedener Verhältnisse von Lipofectamine-Reagenz zu PLUS-Reagenz

Interessanterweise blieb die Effizienz der Transfektion unabhängig von den veränderten Bedingungen bei 15-20%, so dass diese Methode unter den drei Lipofektionsmethoden zu der höchsten Rate an transfizierten Zellen führte. Die Überlebenswahrscheinlichkeit erwies sich als abhängig von der Inkubationszeit der Zellen mit dem DNA-Lipidkomplex, so betrug sie bei Mediumwechsel nach 4-6 h um die 90%, während sie bei länger anhaltender Inkubation auf bis zu 50% zurückging. Einen weiteren Einfluss auf die Mortalität hatte die verwendete Konzentration an PLUS-Reagenz. Der zu beobachtende Unterschied lag bei etwa 20% bei Erhöhung der eingesetzten Konzentration an PLUS-Reagenz. Obwohl mit dieser Methodik stets ein Gentransfer mit guter Effektivität erzielt werden konnte, konnte unter Selektion die Expression des GFP nur bis zu 20 Tage beobachtet werden. Es wurde keine stabile Transfektion erreicht. Auch unter Einsatz von linearisierter Plasmid-DNA und bei mehrmaliger Wiederholung gelang dies nicht.

4.1.1.1.3 Transfektion mit „Effectene® Transfection Reagent“

Nachdem sich in einem ersten Versuch unter Einsatz von 0,3 µg DNA bei einem DNA/Transfektionsreagenz-Verhältnis von 1:25 und einer Konfluenz der Zellen von 70% eine Effizienz von etwa 3% bei 60%igem Überleben der Zellen zeigte, wurden in einem zweiten Ansatz verschiedene DNA-Konzentrationen, verschiedene Verhältnisse und unterschiedliche Ausgangskonfluenzen zur Optimierung der Methodik erprobt (Abbildung 10).

		Verhältnis DNA zu Effectene®-Reagenz					
		1:10	1:10	1:25	1:25	1:50	1:50
eingesetzte Menge an DNA in µg	0,2	< 1%	ca. 5%	ca. 2%	ca. 4%	< 1%	< 1%
	0,3	ca. 5%	ca. 8%	ca. 5%	ca. 9%	ca. 2%	ca. 2%
	0,4	ca. 6%	ca. 10%	ca. 8%	ca. 15%	ca. 4%	ca. 5%

Abbildung 10: Optimierung der Transfektion mit Effectene®: Angabe der abgeschätzten maximal erreichbaren Effizienz in Prozent der grün fluoreszierenden Zellen nach 24 h. Orange entspricht ungefähr einer 50%igen Konfluenz und blau einer 70%igen Konfluenz der Zellen zum Transfektionszeitpunkt.

Nahezu 100% der Zellen überlebten unter allen gewählten Bedingungen und es waren grün fluoreszierende Zellen sichtbar. Die Transfektionseffizienz variierte von 1% bis ca. 15%. Die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen stieg mit der eingesetzten DNA-Menge an und fiel mit Erhöhung der Menge an Transfektionsreagenz ab. Zudem zeigte sich eine Verbesserung bei einer Konfluenz von ca. 70%. Die Verhältnisse 1:10 und 1:25 stellten bei einer eingesetzten DNA-Menge von 0,4 µg die besten Bedingungen dar. 48 h nach Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Die Expression des GFP-Gens konnte maximal bis zu 14 Tage beobachtet werden, so dass auch in diesem Ansatz kein stabiler Gentransfer erzielt werden konnte. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Integration der DNA in das Genom wurde die Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen lineari-

siert und die Transfektion erneut unter den beiden optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Effizienz konnte bestätigt werden, jedoch war die Detektion des GFP auch diesmal auf zwei Wochen beschränkt. Insgesamt stellte sich Effectene[®] als eine einfach durchzuführende und effiziente Methode für die transiente Expression eines Transgens heraus, jedoch konnte keine stabile Transfektion erreicht werden.

4.1.1.2 Calciumphosphat-Präzipitation

Gemäß den Optimierungsverschlügen nach Rose (2003) [112] wurde die Calciumphosphat-Präzipitation mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

- Verwendung von verschiedenen DNA-Konzentrationen von 12,5 µg bis 50 µg
- Einsatz zirkulärer und linearisierter DNA
- Erhöhung der Inkubationszeit zur DNA-Calciumphosphat-Komplexbildung von 1 min auf 20 min
- Unterschiedliche Inkubationszeiten des Transfektionsgemisches auf den Fibroblasten (4 h, 6 h, 12 h)
- Kultivierung der Fibroblasten vor Transfektion mit und ohne Serum
- Durchführung eines DMSO-Schocks im Anschluss an die Transfektion

Mit allen eingesetzten DNA-Konzentrationen unabhängig von zirkulärer oder linearisierter DNA konnte eine transiente Expression des Transgens mit einer Effizienz von 1-2% erreicht werden. Die Inkubationszeit von einer Minute stellte sich als ineffizient heraus, wohingegen die Erhöhung auf 20 Minuten zu einem Erfolg führte, so dass die weiteren Versuche stets unter längerer Inkubation durchgeführt wurden. Unter Einsatz von Serum bei der Kultivierung der Fibroblasten konnte keine Transfektion erzielt werden, so dass trotz des Anstiegs der Mortalität von 50% mit Serum auf ca. 80% ohne Serum die folgenden Versuche ohne Serum durchgeführt wurden. Einen weiteren Einfluss auf die Sterblichkeit der Zellen hatte auch eine Erhöhung der Inkubationszeit des Transfektionsgemisches auf 6 h, wobei die Effizienz stabil blieb. Ein DMSO-Schock im Anschluss an die Transfektion soll die Wahrscheinlichkeit der stabilen Integration des Zielgenes in die nukleäre DNA erhöhen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Zusammenfassend wurde bei einem Einsatz von 12,5 bis 50 µg zirkulärer oder linearisierter DNA, 20-minütiger Bildung des DNA-Calcium-Phosphat-Komplexes und 4-stündiger Inku-

bation der in serumfreiem Medium wachsenden Fibroblasten mit dem Transfektionsgemisch eine maximale Effizienz von 2% grün fluoreszierender Zellen als Ausdruck der transienten Expression des GFP-Gens über einen Zeitraum von 3 Tagen erreicht. Aufgrund der relativ hohen Mortalität in Verbindung mit der geringen Effizienz der nur transienten Transfektion stellte sich diese Methodik als ungeeignet für das weitere Vorgehen heraus.

4.1.1.3 Elektroporation

Bei der Elektroporation wurden die eingesetzten DNA-Mengen variiert, die weiteren Variablen blieben weitestgehend konstant. Es zeigte sich bis zu 30 μg ein Anstieg der Anzahl an transgenexprimierenden Zellen. Bei weiterer Erhöhung der DNA-Konzentration blieb die Effizienz konstant (Abbildung 11). Mit Werten um die 30% war diese Methode die effizienteste unter den erprobten Transfektionsmethoden, wobei jedoch die Zelmortalität, die zwischen 70 und 90% lag, auch am höchsten war. Versuche sie durch eine Verkürzung der Impulsdauer oder Variation des angelegten elektrischen Feldes zu minimieren verliefen erfolglos.

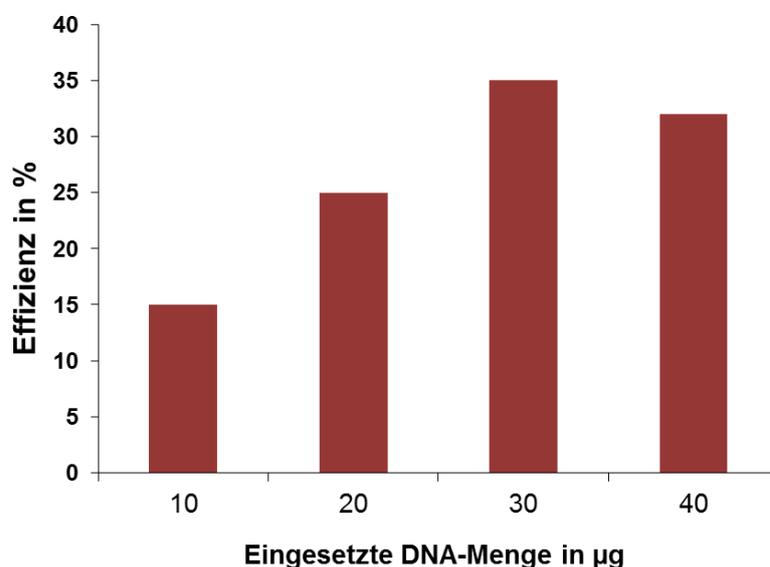


Abbildung 11: Elektroporation - Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge: Die Effizienz entspricht dem maximal abgeschätzten Prozentsatz des Anteils der grün fluoreszierenden Zellen nach 24 h.

Unter Selektion konnte die Expression des GFP-Gens bis zu 18 Tage nach Elektroporation beobachtet werden. Es konnte keine stabile Zelllinie generiert werden. Auch der Einsatz von linearisierter Plasmid-DNA führte nicht zum Erfolg.

4.1.1.4 Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse

Die erprobten Transfektionsmethoden erwiesen sich als mehr oder weniger brauchbar für die transiente Expression des Zielgens. Mit allen konnte ein Gentransfer erreicht werden. Hierbei gab es jedoch unter den Ansätzen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Effizienz und der Überlebenswahrscheinlichkeit (Abbildung 12). Die effizienteste Methode war mit einer Erfolgsrate von bis zu 30% die Elektroporation gefolgt von der Lipofektion mit „Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents“ mit bis zu 20 %. Die Calciumphosphat-Präzipitation und der Einsatz von FuGENE® erwiesen sich als unbrauchbar für die Transfektion primärer Fibroblastenzellen. Effectene® hatte eine Erfolgsrate von maximal 15 % und fügte sich damit in der Mitte ein. Bezüglich der Sterblichkeit nahm wiederum die Elektroporation den ersten Platz ein, gefolgt von der Calciumphosphat-Präzipitation. Alle auf dem Mechanismus der Lipofektion basierenden Methoden zeigten unter optimierten Bedingungen eine geringe Toxizität. Zusammenfassend konnte mit keinem der untersuchten Ansätze eine stabile Transfektion erreicht werden.

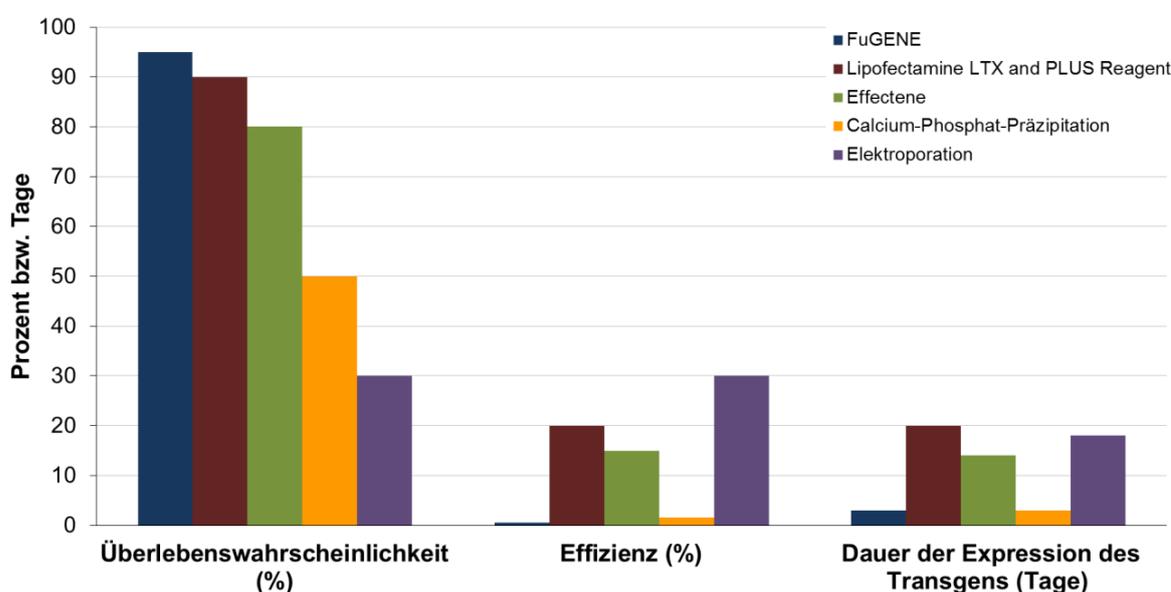


Abbildung 12: Überlebenswahrscheinlichkeit, Effizienz und Dauer der Expression des Transgens der erprobten Transfektionsmethoden: Die Werte stellen jeweils die Maxima dar, die erzielt werden konnten. Die Effizienz entspricht dem Anteil der grün fluoreszierenden Zellen an den überlebenden Zellen. Die Dauer der Expression bezieht sich auf die Zeit unter Selektion.

4.1.2 Transduktion

Da mit den Methoden der Transfektion nur eine transiente Expression mit relativ geringer Effizienz erzielt werden konnte und dies für die geplanten Komplementationsexperimente als nicht ausreichend angesehen wurde, erfolgte ein Wechsel auf eine virale Methode. Der FIV-basierte lentivirale Gentransfer stellt ein effizientes Werkzeug zur stabilen Überexpression des Zielgens in primären Fibroblastenzelllinien dar [66]. Nachdem die Arbeiten mit lentiviralen Vektoren beantragt und virale Kontaminationen der Fibroblastenzellen (siehe 3.2.4) ausgeschlossen wurden, konnte mit den Versuchen begonnen werden. Mittels eines GFP-Expressionsvektors wurde bei erstmaliger Transduktion eine Effizienz von bis zu 70% erreicht. Die stabile Transduktion wurde durch das im Vektor enthaltene Neomycinresistenzgen überprüft. Hierfür wurde die Selektion mit dem Aminoglykosid G418 gleichzeitig für transduzierte und untransduzierte Zelllinien durchgeführt. Nach einem Zeitraum von zwei bis drei Wochen, abhängig von der verwendeten Antibiotikakonzentration (2 bis 4 $\mu\text{l/ml}$), war keine untransduzierte Zelle mehr am Leben und alle transduzierten Zellen exprimierten das GFP. Ab diesem Zeitpunkt konnte daher von einer annähernden Reinkultur und einer stabilen Insertion der eingeschleusten DNA in die nukleäre DNA ausgegangen werden. Nachdem somit eine Methode zur Generierung einer stabilen Zelllinie gefunden wurde, wurden die Komplementationsexperimente mittels FIV-basierter Transduktion durchgeführt. Der Selektionsdruck wurde während aller Experimente fortgesetzt, um die maximale Anzahl an Zellen zu erhalten, die das Transgen stabil exprimieren, und die Anreicherung von Zellen mit spontanem Verlust der inserierten DNA zu verhindern.

4.2 Etablierung eines Assays zur funktionellen Analyse von DNA-Varianten

4.2.1 Auswahl der Zelllinien - Patienten mit Mutationen in *NDUFS1*

Um die Methodik zur Überprüfung der Pathogenität der gefunden Varianten mittels Komplementation zu etablieren, wurden zunächst Patienten ausgesucht, die Mutationen in einem bereits bekannten krankheitsassoziierten Gen zeigten. Die primäre Auswahl der Patienten für die Komplementationsexperimente erfolgte daher nach folgenden Kriterien:

- nachgewiesener isolierter Komplex I-Defekt, messbar in Fibroblasten
- beide Allele eines bekannten, krankheitsassoziierten Gens mutiert

Dies führte zur Auswahl von drei Patienten mit Mutationen in dem Gen für die strukturelle Untereinheit *NDUFS1*. *NDUFS1* kodiert für die größte Untereinheit des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes I mit einem Molekulargewicht von 75 kDa [100]. Bisher sind mehrere Patienten mit Mutationen in diesem Gen beschrieben worden, diese beinhalten sowohl Deletionen als auch Punktmutationen an hochkonservierten Positionen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Bisher beschriebene Mutationen für *NDUFS1* auf DNA und Protein-Niveau

Mutationen (geordnet nach Patient(en))(Referenz)	Klinische Symptome
c.664_666del heterozygot; p.222delIle c.755A>G heterozygot; p.Asp252Gly (Benit et al. (2001) [10])	Psychomotorische Retardierung, Hypotonie, Nystagmus, Optikusatrophy, Leukodystrophie, Laktatazidose
c.721C>T heterozygot; p.Arg241Trp c.1669C>T heterozygot; p.Arg557* (Benit et al. (2001) [10])	Wachstumshemmung, Hypotonie, Hepatomegalie, Dystonie, Laktatazidose
c.2219A>G heterozygot; p.Met707Val „large scale deletion“ heterozygot (Benit et al. (2001) [10])	Trinkschwäche, Hypotonie, Mikrozephalie, pyramidales Syndrom, Leigh-Syndrom
c.1564C>A homozygot; p.Gln552Lys (Bugiani et al. (2004) [19])	Psychomotorische Retardierung, Leukoenzephalopathie, Hyperlaktämie
c.691C>G homozygot; p.Leu231Val (Martin et al. (2005) [87])	Wachstumsretardierung, Nystagmus, Hypotonie, Hyperlaktämie, positive pyramidale Zeichen, respiratorische Insuffizienz
c.683T>C heterozygot; p.Val228Ala c.755A>G heterozygot; p.Asp252Gly (Pagniez-Mammeri et al. (2009) [99])	Leukodystrophie, Hyperlaktämie
c.1855G>A heterozygot; p.Asp619Asn; c.1669C>T heterozygot; p.Arg557* (Hoefs et al. (2010) [59])	Motorische Retardierung, Leukodystrophie, Mikrozephalie, mentale Retardierung
c.1222C>T homozygot; p.Arg408Cys (Hoefs et al. (2010) [59], Tuppen et al. (2010) [140])	Leukoenzephalopathie, respiratorische Probleme, Dysphagie, muskuläre Dystrophie, Hypotonie, Hyperlaktämie, Nystagmus, Spastik
c.631_633del heterozygot; p.211delGlu c.683T>C heterozygot; p.Val228Ala (Hoefs et al. (2010) [59])	Nystagmus, Trinkschwäche, motorische und mentale Entwicklungsverzögerung, Spastik, mentale Retardierung
c.1783A>G homozygot; p.Thr595Ala (Ferreira et al. (2011) [43])	Dystonie, Hyperlaktämie

Funktionelle Analysen von Patientenzellen mit Mutationen in *NDUFS1* hatten bereits eine Reduktion der biochemischen Aktivität und des Membranpotentials und eine negative Auswirkung auf die Stabilität des Komplexes I gezeigt [43, 59, 63]. Patienten mit DNA-Varianten in dieser Untereinheit (Tabelle 10) eigneten sich daher gut zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des zu etablierenden Assays.

Tabelle 10: Auswahl der Patienten mit Varianten in *NDUFS1*

Patienten*	DNA-Nummer	Alter bei Biopsie	Mutation in <i>NDUFS1</i>	Klinische Symptome
Patient 1	33255	32 Monate	c.497G>A heterozygot; p.Gly166Glu c.683T>C heterozygot; p.Val228Ala	Optikusatrophie, Nystagmus, psychomotorische Regression, Spastik, Dystonie, Leukodystrophie, Laktatazidose
Patient 2	33460	8 Monate	c.683T>C heterozygot; p.Val228Ala c.754A>G heterozygot; p.Asp252Gly	Hypotonie, psychomotorische Regression, Laktatazidose
Patient 3	37796	4 Monate	c.1291C>G heterozygot; p.Leu431Val	Hypotonie, Spastik, Dystonie, Enzephalomyopathie, epileptische Anfälle, Hypertrophe Kardiomyopathie, Laktatazidose

*Die Patienten 1 und 2 mit je zwei compound heterozygoten Mutationen wurden zur Etablierung des Assays für die funktionelle Analyse ausgewählt. Patient 3 diente zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Systems auf weitere Varianten in *NDUFS1* bei fehlender Zellkultur.

Patient 1 und Patient 2 besitzen beide compound heterozygote Mutationen in *NDUFS1*. Diese befinden sich jeweils an hochkonservierten Stellen innerhalb des Gens, so dass sie als molekulargenetische Ursache der Erkrankung angesehen werden können. Die Mutationen von Patient 2 fanden sich auch in dem bereits beschriebenen Patienten von Pagniez-Mammeri et al. (2009) [99].

Zur Darstellung der Anwendbarkeit des Komplementationssystems auf weitere Varianten in *NDUFS1* auch bei fehlender Zellkultur wurde der Patient 3 mit in das Kollektiv aufgenommen. Nachdem die gesunde Mutter Trägerin dieser Mutation ist, konnte ein dominant negativer Charakter dieser Variante ausgeschlossen werden.

4.2.2 Funktionelle Analyse und Komplementation des Defekts

Die Komplementationen wurden für Patient 1 und Patient 2 mit einem lentiviralen Expressionsvektor für *NDUFS1* der Firma GeneCopoeiaTM durchgeführt. Für den Patienten 3 wurde mittels Mutagenese die nachgewiesene Mutation in die *NDUFS1*-cDNA eingefügt. Die Sequenzierungen der Expressionsvektoren der jeweiligen Zielgene vor Beginn der Komplementationsexperimente bestätigten die

Sequenzen und unerwünschte Mutationen konnten ausgeschlossen werden. Im Anschluss erfolgte die Transduktion der beiden Patientenzelllinien mit dem Expressionsvektor für *NDUFS1*, wobei parallel eine Kontrollzelllinie transduziert wurde, um einen positiven Effekt durch alleinige Überexpression des Transgens auszuschließen.

Durch Sequenzierung der cDNA und Betrachtung der Proteinebene zeigte sich die Expression des Transgens in den transduzierten Zellen.

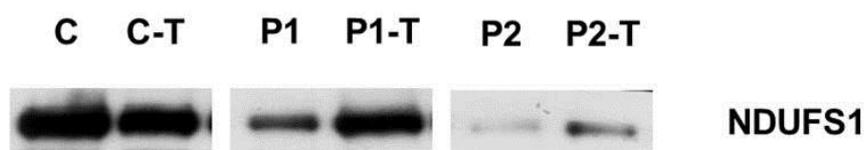


Abbildung 13: Expression von *NDUFS1* in den transduzierten Fibroblasten auf Proteinebene: Westernblotanalyse mit *NDUFS1*-Antikörpern von der Kontrolle (C) und Patienten (P1, P2) vor und nach (-T) Gentransfer

Zudem wurde die Integration der Virus-DNA in das Genom der Zelllinie mittels PCR der Fibroblasten-DNA mit virusspezifischen Primern nachgewiesen.

4.2.2.1 Biochemische Aktivitätsmessungen

4.2.2.1.1 Referenzbereich für die biochemischen Aktivitätsmessungen

Der Referenzbereich für die biochemischen Aktivitäten von Komplex I, Komplex IV und der Citratsynthase in Fibroblasten wurde anhand von elf verschiedenen Kontrollzelllinien (Tabelle 11) unter Berücksichtigung des Alters der ausgewählten Patientenfibroblasten aufgestellt. Die zusätzliche Bestimmung der Komplex IV-Aktivität erlaubte eine Einschätzung der Komplex I-Aktivität in Bezug auf die restliche Atmungskette. Als Maß für die Integrität der Mitochondrien bei den Messungen wurde die Aktivität der Citratsynthase ermittelt, da dieses Enzym bei einer Schädigung aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Zudem diente sie als ein indirektes Maß für den absoluten Mitochondriengehalt der Zelle. Durch die Angabe der Komplex I-Aktivitäten in Bezug auf das Gesamtprotein, die Komplex IV- und die Citratsynthaseaktivität konnte somit eine bessere Beurteilung der Ergebnisse erreicht werden.

Tabelle 11: Aktivitätsmessungen der Kontrollen für Komplex I, Komplex IV und Citratsynthase

Kontrollzelllinie	Alter	Komplex I U/gProtein*	Komplex IV U/gProtein*	Citrat- synthase U/gProtein*	Komplex I /Komplex IV*	Komplex I /Citrat- synthase*
NHDF-neo (kommerzielle neonata- le humane dermale Fibroblastenzellen)	≤28 Tage	17,26 ± 4,08	2,46 ± 0,73	90,17 ± 27,87	7,44 ± 2,27	0,21 ± 0,08
18270	Unbekannt	16,74 ± 6,58	5,82 ± 3,35	66,43 ± 22,30	3,61 ± 1,97	0,25 ± 0,04
18278	Unbekannt	10,75 ± 0,45	2,45 ± 0,31	75,14 ± 18,26	4,43 ± 0,44	0,15 ± 0,05
18282	Unbekannt	13,76 ± 3,02	3,87 ± 2,29	73,46 ± 8,20	4,09 ± 1,51	0,19 ± 0,03
18337	Unbekannt	12,42 ± 1,86	2,52 ± 0,37	72,85 ± 4,58	4,93 ± 0,08	0,17 ± 0,03
45863	50 Monate	13,14 ± 2,36	1,96 ± 0,37	81,40 ± 18,10	6,73 ± 0,22	0,16 ± 0,02
47040	4 Monate	10,99 ± 1,21	2,95 ± 0,37	70,04 ± 10,28	3,80 ± 0,87	0,16 ± 0,04
47039	55 Monate	12,21 ± 1,54	1,77 ± 0,61	58,18 ± 6,85	7,54 ± 2,85	0,21 ± 0,05
47041	24 Monate	14,50 ± 4,76	2,70 ± 0,97	97,63 ± 10,50	5,41 ± 0,14	0,15 ± 0,05
35028	62 Monate	11,89 ± 0,76	1,39 ± 0,12	82,98 ± 16,85	8,59 ± 0,40	0,15 ± 0,02
49593	51 Jahre	10,74 ± 0,96	2,77 ± 0,61	71,27 ± 2,97	3,94 ± 0,47	0,15 ± 0,02

*Mittelwerte ± Standardabweichung bestimmt durch drei bis sechs unabhängige Dreifachmessungen

Aus den Mittelwerten der gemessenen Aktivitäten ergab sich der folgende Kontrollbereich:

Tabelle 12: Referenzbereich für die biochemischen Aktivitäten von Komplex I, Komplex IV und der Citratsynthase

	Komplex I U/gProtein	Komplex IV U/gProtein	Citrat- synthase U/gProtein	Komplex I /Komplex IV	Komplex I /Citrat- synthase
Höchster Wert	17,26	5,82	97,63	8,59	0,25
Niedrigster Wert	10,74	1,39	58,18	3,61	0,15
Mittelwert	13,13	2,79	76,32	5,50	0,18
Standardabweichung	2,26	1,20	11,09	1,77	0,03

4.2.2.1.2 Messungen der Patientenzelllinien

Die verwendeten Zellkulturen der Patienten wiesen einen biochemisch messbaren Defekt des Komplexes I in der Atmungskette auf. Dieser war sowohl relativ zur Menge an Protein und zum Komplex IV als auch relativ zur Citratsynthase reduziert. Bei den biochemischen Aktivitätsmessungen zeigte sich für den Patienten 1 eine Restaktivität des Komplexes I relativ zur Citratsynthase von 45% bezogen auf den niedrigsten Kontrollwert und für den Patienten 2 eine Restaktivität von 39%. Durch Expression der Wildtyp-cDNA konnte bei beiden Patienten ein Anstieg der

Aktivitäten beobachtet werden. Der Unterschied war für die beiden compound heterozygoten Mutationen bei Patient 1 und 2 signifikant (Abbildung 14). Bei den Kontrollen hingegen hatte die Expression von *NDUFS1* keinen Einfluss auf die Aktivität. Somit können bei beiden Patienten die nachgewiesenen compound heterozygoten Mutationen als Ursache für die eingeschränkte Komplex I-Aktivität und damit krankheitsrelevant betrachtet werden. Gleichzeitig zeigte die erfolgreiche Komplementation die Funktionstüchtigkeit des Assays zur Überprüfung der Pathogenität von Mutationen.

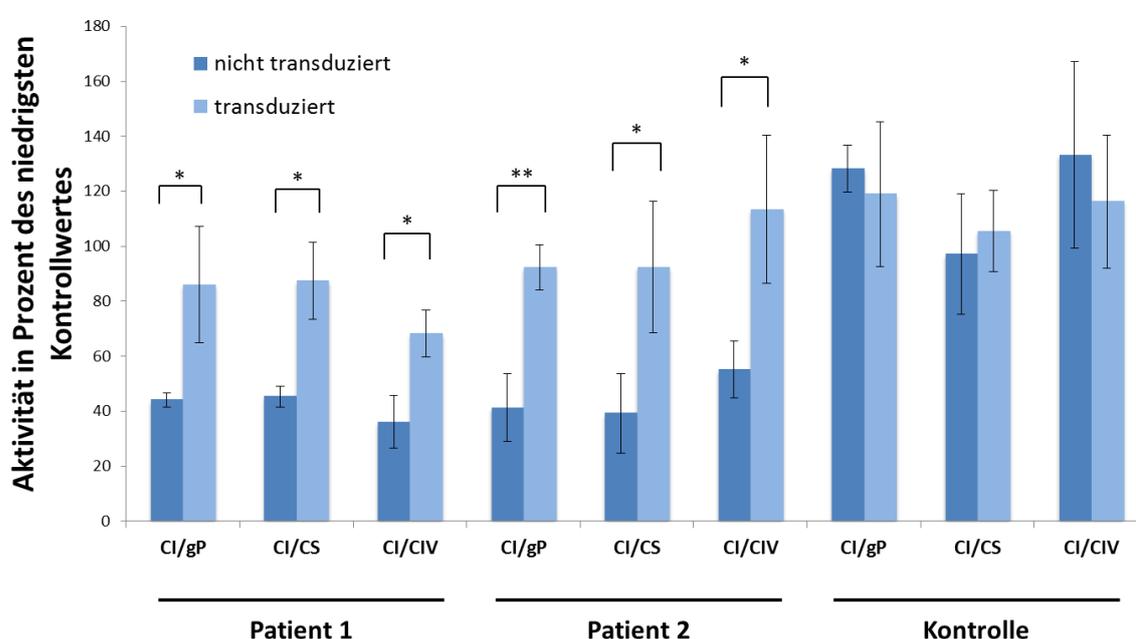


Abbildung 14: Biochemische Aktivitätsmessungen in Fibroblastenzellen der Patienten mit Mutationen in *NDUFS1*: Komplex I-Aktivitäten (CI) in Bezug zum Gesamtprotein (CI/gP), zur Citratsynthase (CI/CS) und zum Komplex IV (CI/CIV), jeweils in Prozent des niedrigsten Kontrollwertes, bestimmt durch drei unabhängige Dreifachmessungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Vom Patienten 3 standen zunächst keine Zellen zur Verfügung. Daher wurden zur Überprüfung des Charakters der gefundenen Variante die Fibroblasten des Patienten 1 mit einem modifizierten Expressionsvektor transduziert. Dieser enthielt anstelle der Wildtyp-cDNA eine mutierte cDNA von *NDUFS1* mit dem Basenaustausch C nach G an der Stelle 1291 und somit die gefundene Mutation des Patienten 3. Es zeigte sich nach Expression der mutierten cDNA ein signifikanter Anstieg der Komplex I-Aktivität vergleichbar zum Anstieg nach Expression von Wildtyp-cDNA (Abbildung 15). Hieraus lässt sich schließen, dass es sich bei der Punktmu-

tation c.1291C>G um eine benigne Variante handelt, die keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität des Atmungskettenkomplexes I hat. Hierbei kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Aktivitätszunahme durch eine erhöhte Menge an leicht funktionseingeschränktem Protein bedingt ist. Es zeigt sich zudem, dass nicht notwendigerweise eine Zellkultur des Patienten selbst vorhanden sein muss, um die Mutation zu überprüfen. Es reicht eine Zellkultur eines Patienten mit irgendeiner nachgewiesenen pathogenen Mutation in dem zu untersuchenden Gen.

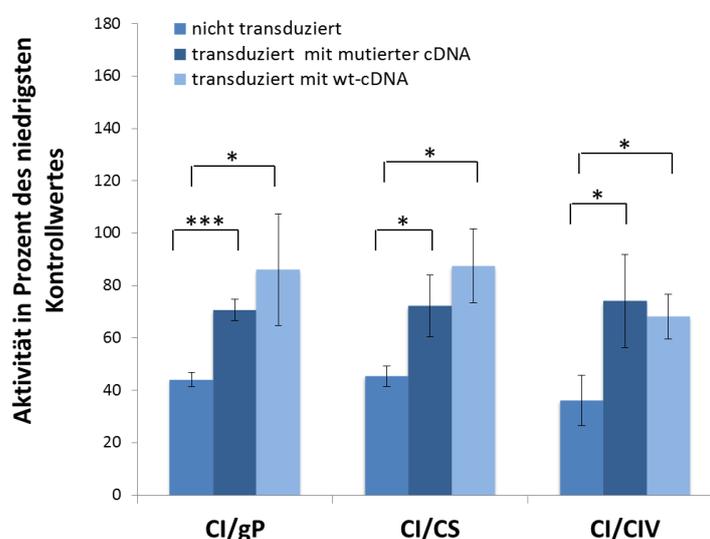


Abbildung 15: Überprüfung der *NDUFS1*-Variante c.1291C>G des Patienten 3 durch Überexpression der mutierten cDNA in Patient 1: Komplex I-Aktivitäten (CI) in Bezug zum Gesamtprotein (CI/gP), zur Citratsynthase (CI/CS) und zum Komplex IV (CI/CIV), jeweils in Prozent des niedrigsten Kontrollwertes, bestimmt durch drei unabhängige Dreifachmessungen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Nach Erhalt der Fibroblastenzellen des Patienten 3 wurden diese ebenfalls mit dem Expressionsvektor für *NDUFS1* transduziert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Komplex I-Aktivität nach Gentransfer (Abbildung 16) von 44% auf 76%. Diese erfolgreiche Kompensation des Defekts der Fibroblasten des Patienten 3 nach Einbringen der *NDUFS1*-cDNA spricht dafür, dass die molekulargenetische Ursache der Erkrankung bei Patient 3 in einer Funktionseinschränkung von *NDUFS1* zu finden ist, da weitere Mutationen in Form von Deletionen oder im Promotorbereich des Gens nicht sicher ausgeschlossen werden können.

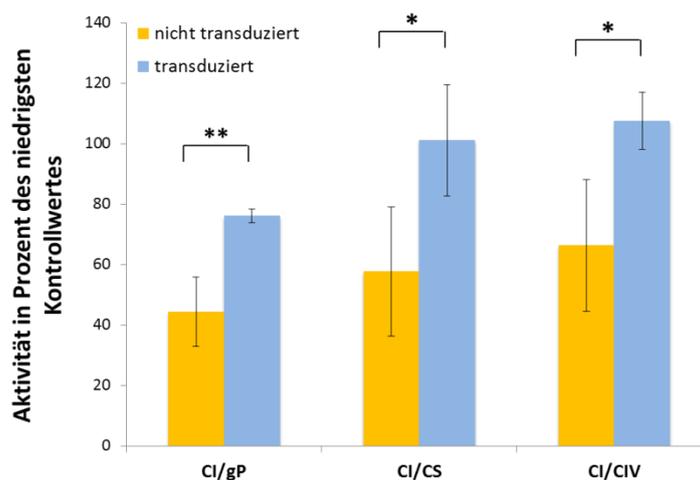


Abbildung 16: Biochemische Aktivitätsmessungen der Fibroblasten des Patienten 3 vor und nach Transduktion mit *NDUFS1*: Komplex I-Aktivitäten (CI) in Bezug zum Gesamtprotein (CI/gP), zur Citratsynthase (CI/CS) und zum Komplex IV (CI/CIV), jeweils in Prozent des niedrigsten Kontrollwertes, bestimmt durch drei unabhängige Dreifachmessungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.2.2.2 Wachstumsverhalten

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der energetischen Kompetenz der Atmungskette stellt die Ermittlung des Wachstumsverhaltens auf Galaktose im Vergleich zur Glukose dar. Neben der oxidativen Phosphorylierung kann mittels Glykolyse ATP produziert werden. Während der glykolytische Weg der ATP-Gewinnung durch die Kultivierung in Glukose-Medium in hohem Ausmaß unterstützt wird, ist die Ausbeute an ATP in Galaktose-Medium gering. Die Zellen sind unter dieser Bedingung primär auf die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette angewiesen. Bei Patienten mit einer eingeschränkten Funktion der Atmungskette ist somit sekundär aufgrund eines ATP-Mangels ein verlangsamtes Wachstum auf Galaktose zu erwarten [110].

Die durchschnittliche Verdopplungszeit der Kontrollzelllinien betrug auf Glukose 24 h und auf Galaktose 27 h, wobei sich für das Verhältnis der Zeiten auf Glukose zu Galaktose Werte von $0,90 \pm 0,06$ ergaben. Durch die Bildung des Quotienten der Verdopplungszeiten konnten unspezifische Differenzen wie beispielsweise eine höhere Passagenzahl, die zu einer Verlangsamung des Wachstums führen kann, herausgerechnet werden.

Die Wachstumskurven der Zelllinien der Patienten 1 und 2 zeigten beide ein verlangsamtes Wachstum auf Galaktose im Vergleich zu den Kontrollen. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten auf Glukose zu Galaktose betrug für Patient 1 0,44 und für Patient 2 0,36. Nach Transduktion der Fibroblasten mit Wildtyp-cDNA von

NDUFS1 kam es bei beiden Patienten zu einer signifikanten Beschleunigung des Wachstums auf Galaktose. So war das Verhältnis der Verdopplungszeiten auf Glukose zu Galaktose nach Einschleusen der cDNA bei Patient 1 mit einem Wert von 1,04 im Kontrollbereich. Ebenso veränderte sich das Verhältnis von Patient 2 von 0,36 auf 0,93 nach Transduktion. Hierdurch bestätigte sich indirekt die Einschränkung der oxidativen Phosphorylierung bei beiden Patienten aufgrund der compound heterozygoten Mutationen in *NDUFS1*.

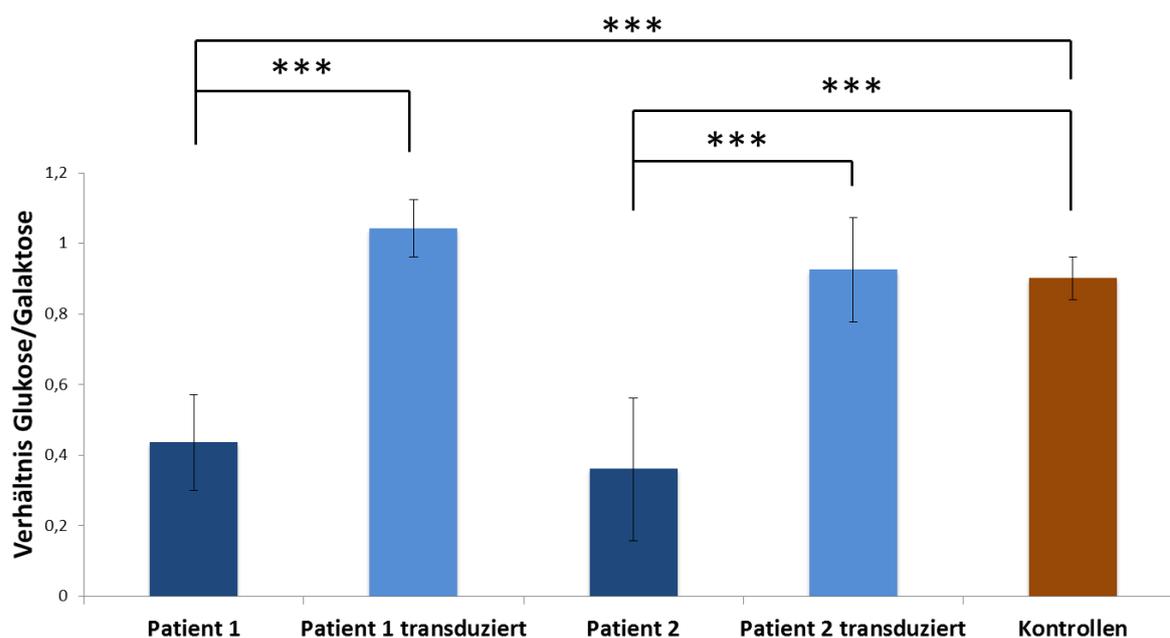


Abbildung 17: Wachstumsverhalten der Patienten mit Mutationen in *NDUFS1*: Angabe des Verhältnisses der Wachstumsgeschwindigkeit auf Glukose zu Galaktose, bestimmt durch drei unabhängige Zählungen. *** $p < 0,001$

Die Betrachtung des Wachstumsverhaltens von Patient 1 nach Transduktion mit *NDUFS1*-cDNA mit dem Basenaustausch C nach G an Stelle 1291 zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit auf Werte im Kontrollbereich (Abbildung 18), so dass hier davon auszugehen ist, dass diese Variante keine Einschränkung der ATP-Gewinnung über die Atmungskette bedingt.

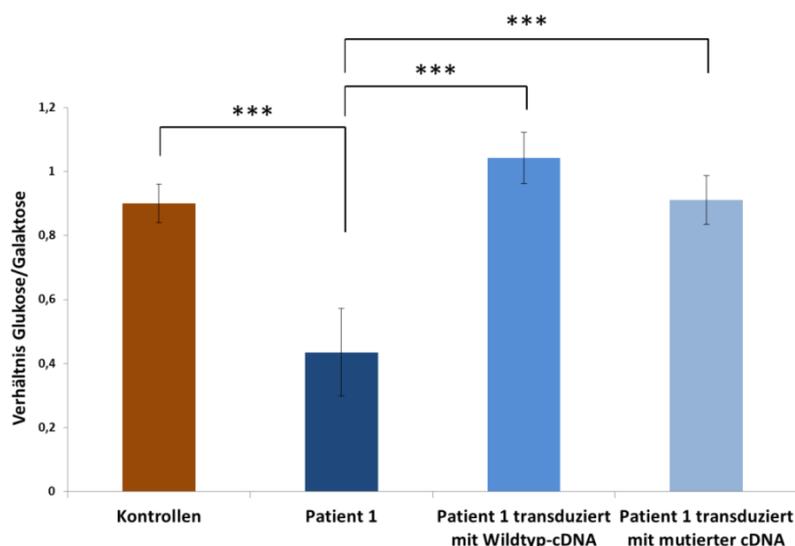


Abbildung 18: Wachstumsverhalten von Patient 1 vor und nach Transduktion mit Wildtyp- und mutierter cDNA: Angabe des Verhältnisses der Wachstumsgeschwindigkeit auf Glukose zu Galaktose, bestimmt durch drei unabhängige Zählungen. *** $p < 0,001$

4.2.2.3 Westernblots

Nach Betrachtung der Enzymaktivität und der energetischen Kompetenz der Patientenzellen und der Feststellung der Pathogenität der gefundenen Mutationen stellte sich die Frage nach dem Effekt der Mutationen auf Proteinebene. Es wurde zunächst überprüft, ob die Funktionseinschränkung des Komplexes I bei den Patienten auf eine Verminderung der Menge des assemblierten Komplexes oder einer eingeschränkten Enzymaktivität des assemblierten Komplexes zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Proteine aus angereicherten Mitochondrien von Kontroll- und Patientenzellen der Größe nach im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran gebロットet und mit Antikörpern gegen verschiedene Untereinheiten des Komplexes I dekoriert. Von jedem Unterkomplex (siehe 1.2.1) wurde mindestens ein Protein überprüft.

Die Detektion der Untereinheiten *NDUFS1*, *NDUFS3*, *NDUFB9* und *NDUFA9* zeigte sowohl für Patient 1 als auch für die Patient 2 ein reduziertes Signal. Durch die Expression der Wildtyp-cDNA von *NDUFS1* konnte diese Verminderung weitestgehend behoben werden (Abbildung 19). Sowohl das zur Ladungskontrolle detektierte Porin als auch die Darstellung einer Komplex III-Untereinheit wiesen keinen Unterschied zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen auf. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Funktionseinschränkung von *NDUFS1* bei

beiden Patienten zu einer Verminderung des vollständig assemblierten Atmungskettenkomplexes I führt.

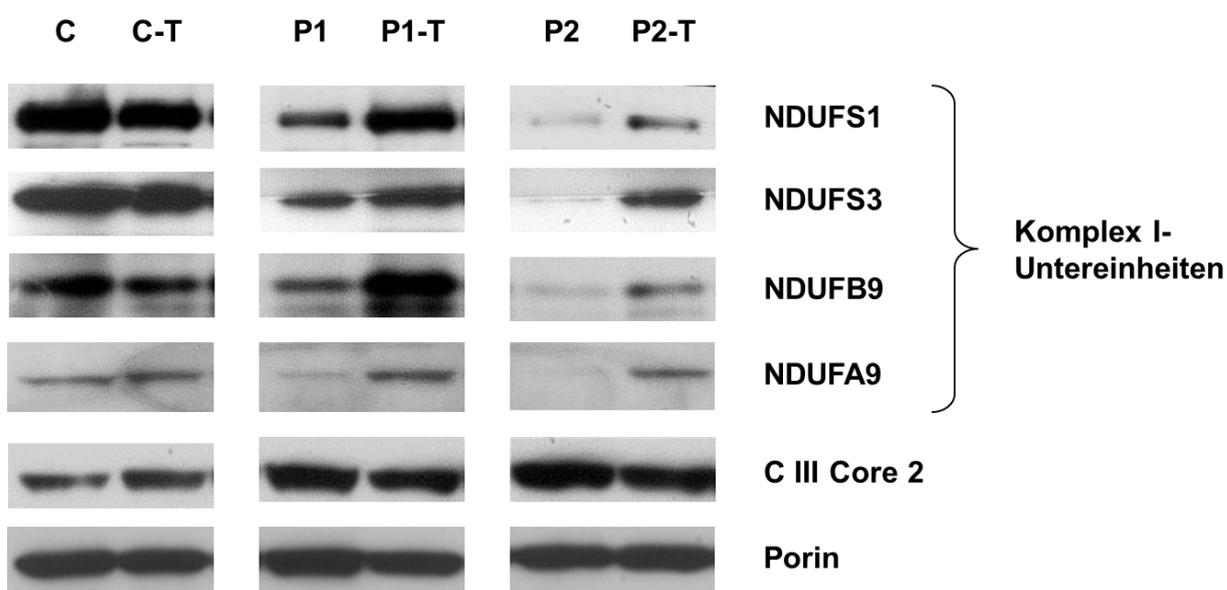


Abbildung 19: Westernblotanalyse der Patienten mit Mutationen in *NDUFS1*: Detektion der Komplex I-Untereinheiten NDUFS1, NDUFS3, NDUFB9 und NDUFA9. Zusätzliche Detektion der Core 2-Untereinheit des Komplexes III (CIII) und von Porin zur Ladungskontrolle.

4.2.3 Zusammenfassung - Assay zur funktionellen Analyse von DNA-Varianten

Zusammenfassend ergab sich zur näheren funktionellen Analyse von DNA-Varianten in Genen, die mit einem Atmungskettenkomplex I-Defekt assoziiert sind, der folgende Ablauf. Zunächst erfolgte die Etablierung einer Fibroblastenzelllinie des Patienten mit Mutationen in dem zu untersuchenden Gen. In dieser wurde überprüft, inwieweit der Defekt messbar ist. Bei nachgewiesenem Defekt wurde im Anschluss die Wildtyp-cDNA des zu analysierenden Gens mittels lentiviralen Gentransfers in die Zellen eingeschleust. Durch Sequenzierung der cDNA und die Betrachtung der Proteinebene konnte nach mindestens zweiwöchiger Selektion die stabile Expression des Transgens in den Zellen gezeigt werden.

Daraufhin erfolgte die Überprüfung der Kompensation der Funktion des defekten Proteins durch das nun vorhandene Wildtyp-Protein. Dies wurde zum einen direkt durch Bestimmung der Aktivitäten des Atmungskettenkomplexes I und zum anderen indirekt über die Ermittlung des Wachstumsverhaltens auf Galaktose im Vergleich zu Glukose durchgeführt. Bei krankheitsrelevanten Mutationen konnte mit beiden Ansätzen ein Unterschied zwischen den transduzierten und den untrans-

duzierten Zellen detektiert werden. Somit eigneten sich die beiden Methoden zur Untersuchung der Komplementation.

Zur Darstellung der Auswirkungen der gefundenen Mutationen in Bezug auf die Proteinebene wurden zusätzlich Westernblots durchgeführt. Hierdurch konnten die Stabilität und die Assemblierung des Atmungskettenkomplexes I vor und nach Gentransfer betrachtet werden.

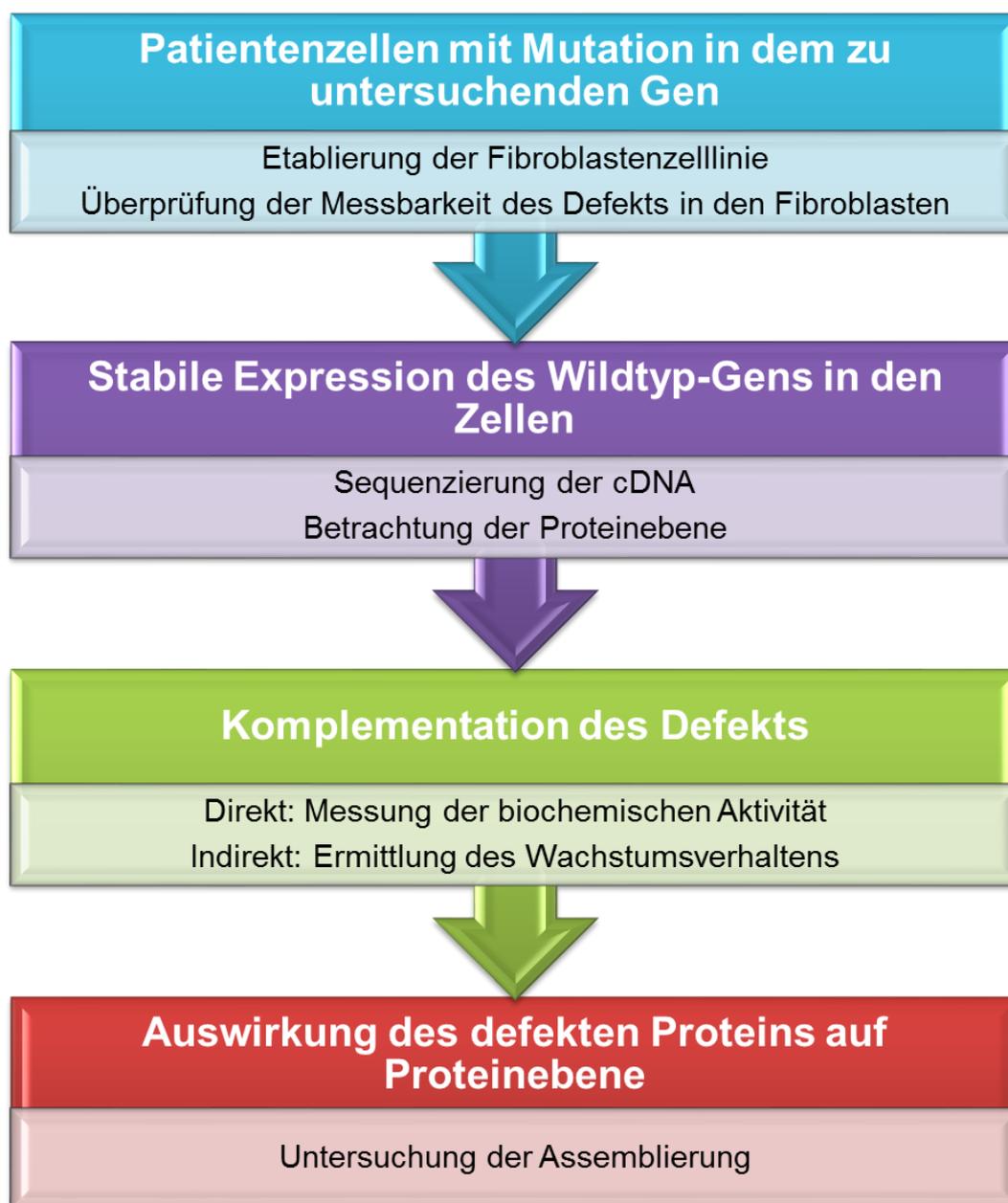


Abbildung 20: Ablauf zur funktionellen Analyse von seltenen DNA-Varianten in Genen, die mit einem Atmungskettenkomplex I-Defekt assoziiert sind

4.3 Funktionelle Analyse potentiell krankheitsassoziierter Genvarianten

Im dritten Teil der Arbeit wurden potentiell krankheitsassoziierte Genvarianten untersucht. Die Auswahlkriterien waren der Nachweis eines isolierten Komplex I-Defekts, eine vorhandene Fibroblastenzellkultur und mindestens eine Mutation in einem potentiell krankheitsassoziierten Gen, nachdem eine Deletion auf dem zweiten Allel nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Es ergaben sich zwei zu analysierende Gene, *NDUFB9* und *ACAD9*. Für beide Gene wurden zwei Patienten ausgewählt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Patienten mit Varianten in *NDUFB9* und *ACAD9*

Patienten	DNA-Nummer	Alter bei Biopsie	Betroffenes Gen	Mutation	Klinische Symptome
Patient 4	33027	3 Monate	<i>NDUFB9</i>	c.140G>T heterozygot; p.Arg47Leu	Dyskinesie, muskuläre Hypotonie, Epilepsie, Laktatazidose
Patient 5	47103	4 Monate	<i>NDUFB9</i>	c.191T>C homozygot; p.Leu64Pro	Hyperlaktatämie, muskuläre Hypotonie, Mikrozephalie, Katarakt
Patient 6	49591	48 Jahre	<i>ACAD9</i>	c.1594C>T homozygot; p.Arg532Trp	Hyperlaktatämie, schnelle Ermüdbarkeit, mentale Verlangsamung
Patient 7	35834	< 48 Tage	<i>ACAD9</i>	c.130T>A heterozygot; p.Phe44Ile c.797 G>A heterozygot; p.Arg266Gln	Hypertrophe Kardiomyopathie, Hyperlaktatämie, muskuläre Hypotonie, Enzephalomyopathie

4.3.1 Patienten mit Mutationen in *NDUFB9*

NDUFB9 kodiert für einen Teil der intramembranösen β -Einheit des Komplexes I. Die Funktion dieser Untereinheit ist weitestgehend unklar, wobei aufgrund ihrer Lokalisation im β -Unterkomplex eine Stabilisierungsfunktion vermutet werden kann. Bei den Patienten 4 und 5 wurden im Komplex I-Screen (siehe 1.4) Mutationen in *NDUFB9* gefunden. Patient 4 weist eine heterozygote Mutation auf und Patient 5 besitzt eine homozygote Mutation. Beide Mutationen betreffen hochkonservierte Domänen des Proteins. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war außer diesen beiden Patienten noch kein Patient mit Mutationen in dieser Untereinheit bekannt.

4.3.1.1 Biochemische Aktivitätsmessungen

Die Fibroblastenzellen von Patient 4 und Patient 5 wiesen Restaktivitäten des Komplexes I zur Citratsynthase von 40% und 28% im Vergleich zum niedrigsten Kontrollwert auf. Die Expression der Wildtyp-cDNA von *NDUFB9* führte weder bei

den Zellen von Patient 4 noch bei der Kontrollzelllinie zu einer Änderung der Komplex I-Aktivität. Im Gegensatz hierzu stieg die biochemische Komplex I-Aktivität in den Fibroblasten von Patient 5 nach Einschleusen der *NDUFB9*-cDNA signifikant von 28% auf 78% an (Abbildung 21). Aufgrund der fehlenden Aktivitätszunahme nach Expression von *NDUFB9* in den Fibroblasten des Patienten 4 kann angenommen werden, dass die heterozygote Mutation nicht für den Komplex I-Defekt verantwortlich ist. Hingegen spricht der signifikante Anstieg der Komplex I-Aktivität bei Patient 5 für einen pathogenen Charakter der gefundenen homozygoten Mutation.

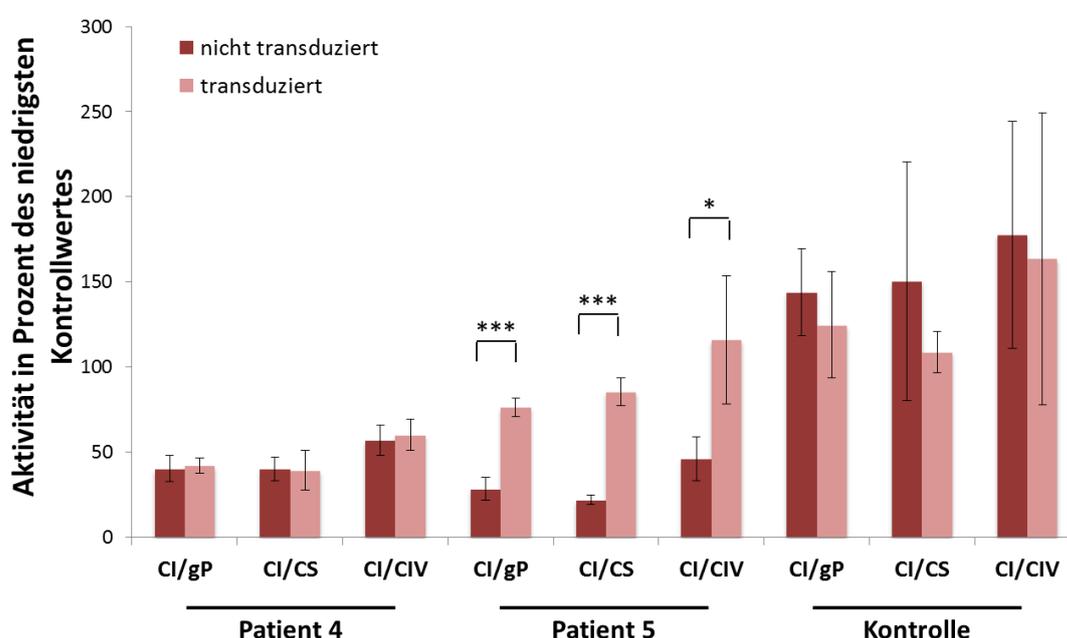


Abbildung 21: Biochemische Aktivitätsmessungen in den Fibroblastenzellen der Patienten mit Mutationen in *NDUFB9*: Komplex I-Aktivitäten (CI) in Bezug zum Gesamtprotein (CI/gP), zur Citratsynthase (CI/CS) und zum Komplex IV (CI/CIV), jeweils in Prozent des niedrigsten Kontrollwertes, bestimmt durch drei unabhängige Dreifachmessungen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

4.3.1.2 Wachstumsverhalten

Die Fibroblastenzellen der Patienten 4 und 5 zeigten eine deutliche Verlangsamung gegenüber den Kontrollen. Die Verdopplungszeiten lagen für Patient 4 bei 37 h auf Glukose und 63 h auf Galaktose. Die Expression der Wildtyp-cDNA in den Fibroblasten des Patienten 4 ergab keinen signifikanten Effekt. Bei den Zellen des Patienten 5 lagen die Verdopplungszeiten bei 30 h auf Glukose und 71 h auf Galaktose. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten auf Glukose zu Galaktose be-

trug 0,46 vor und 0,99 nach Transduktion und erreichte somit in etwa den Kontrollwert (Abbildung 22). Die Wachstumskurven bestätigten somit die schon zuvor bei den biochemischen Messungen erhaltenen Ergebnisse, nämlich das krankheitsrelevante Potential der homozygoten Mutation c.191T>C und die fehlende Pathogenität der einzelnen heterozygoten Mutation c.140G>T in *NDUFB9*.

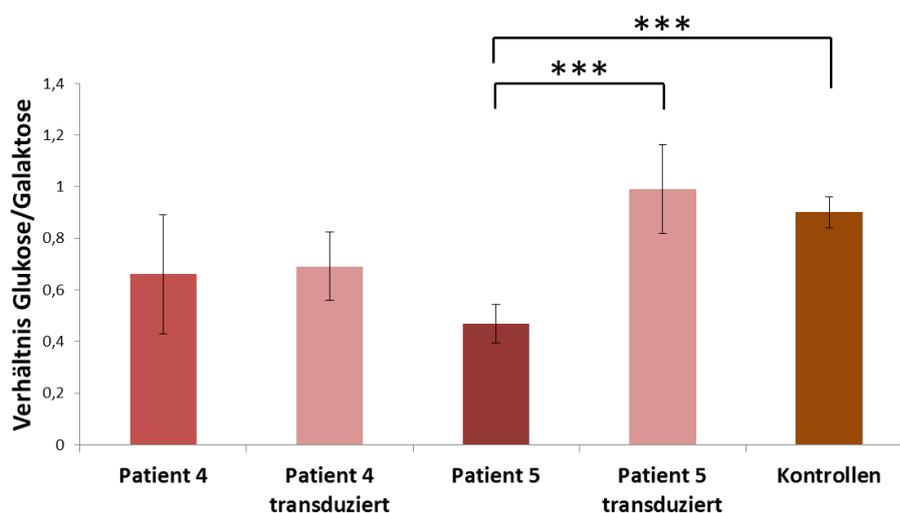


Abbildung 22: Wachstumsverhalten der Patienten mit Mutationen in *NDUFB9*: Angabe des Verhältnisses der Wachstumsgeschwindigkeit auf Glukose zu Galaktose, bestimmt durch drei unabhängige Zählungen. ***p<0,001

4.3.1.3 Westernblots

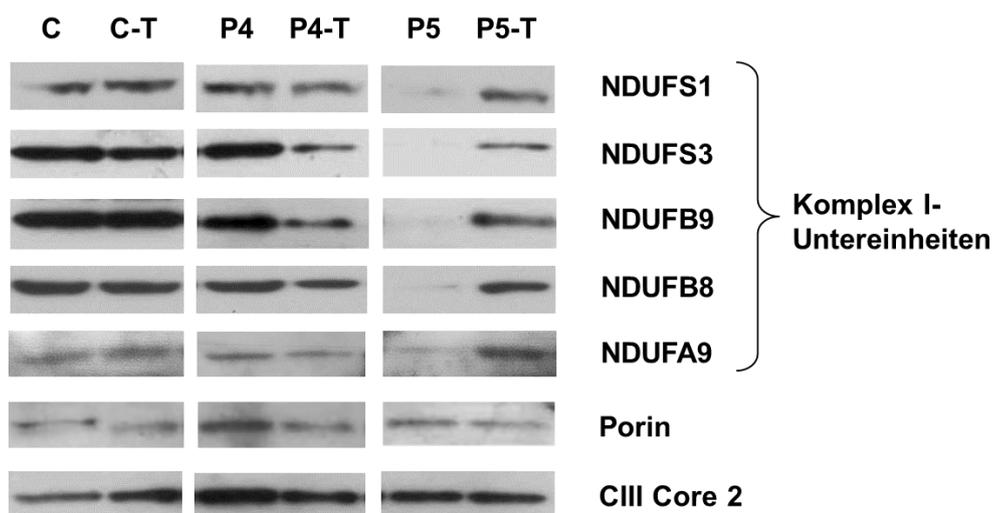


Abbildung 23: Westernblotanalyse der Patienten mit Mutationen in *NDUFB9*: Detektion der Komplex I-Untereinheiten NDUF51, NDUF53, NDUFB8, NDUFB9 und NDUFA9. Zusätzliche Detektion der Core 2-Untereinheit des Komplexes III. Der Antikörper gegen Porin diente der Ladungskontrolle.

Während die Westernblot-Analyse für Patient 4 einen Normalbefund ergab, zeigte sich für Patient 5 eine Reduzierung der Proteinmenge aller getesteten Untereinheiten des Komplexes I. Nach Transduktion konnten alle Untereinheiten auf fast normalem Level nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die homozygote Mutation zu einem vermindert assemblierten Atmungskettenkomplex I führt und die Untereinheiten als Folge abgebaut werden. Andere Proteine, wie die getestete Untereinheit des Komplexes III und Porin waren nicht betroffen. Als Gründe für diesen Stabilitätsdefekt des Komplexes I können verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen werden. So ist es möglich, dass der Basenaustausch c.191T>C zur Bildung eines instabilen Proteins führt oder durch die Mutation ein Protein entsteht, das nicht in den Atmungskettenkomplex I passt und daher abgebaut wird. Die zusätzliche Verminderung der anderen getesteten Untereinheiten unterstützt die Annahme, dass NDUFB9 notwendig ist, um einen stabilen Komplex I zu bilden.

4.3.2 Patienten mit Mutationen in ACAD9

Im Gegensatz zu NDUFS1 und NDUFB9 handelt es sich bei ACAD9 nicht um eine Untereinheit des Komplexes I. Zum Zeitpunkt meiner Arbeit wurde von einer möglichen Beteiligung an der β -Oxidation in den Mitochondrien berichtet [39] und es gab keine Hinweise auf eine Funktion von ACAD9 im Zusammenhang mit dem Atmungskettenkomplex I.

Die Zelllinie des Patienten 6 (Tabelle 14) wurde uns von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bert Smeets aus Maastricht zur funktionellen Analyse zugesandt. Die homozygote Mutation wurde dort durch Homozygosity-Mapping einer größeren Familie gefunden [49]. Es standen uns zusätzlich Fibroblasten eines gesunden Trägers dieser Mutation zur Verfügung. Zudem wurde eine vom Alter passende Kontrolle für diese Versuche verwendet.

Bei Patient 7 (Tabelle 14) handelt sich um einen Patienten, bei dem keine Mutation in einem bekannten Kandidatengen gefunden werden konnte. Daher war das Exom des Patienten sequenziert worden. Bei dieser Art der Sequenzierung wurde der gesamte kodierende Bereich des Genoms gleichzeitig analysiert. Im Anschluss war unter allen gefundenen Varianten zunächst nach denjenigen gesucht worden, die zu einem Aminosäureaustausch führten. Nach Identifizierung derjenigen Gene mit zwei heterozygoten oder einer homozygoten Mutation und zusätzli-

cher Berücksichtigung der mitochondrialen Lokalisation des kodierten Proteins war *ACAD9* als eines der möglichen neuen Kandidatengene übriggeblieben [53].

Tabelle 14: Übersicht der Zelllinien zu den Experimenten für Varianten in *ACAD9*

	DNA-Nummer	Alter bei Biopsie	Mutation in <i>ACAD9</i>	Klinische Symptome
Patient 6	49591	48 Jahre	c.1594C>T homozygot; p.Arg532Trp	Hyperlaktämie, schnelle Ermüdbarkeit, mentale Verlangsamung
Träger	49592	58 Jahre	c.1594C>T heterozygot; p.Arg532Trp	
Kontrolle	49593	51 Jahre		
Patient 7	35834	< 48 Tage (Patient im Alter von 48 Tagen verstorben)	c.130T>A heterozygot; p.Phe44Ile c.797G>A heterozygot; p.Arg266Gln	Hypertrophe Kardiomyopathie, Hyperlaktämie, Enzephalomyopathie

4.3.2.1 Biochemische Aktivitätsmessungen

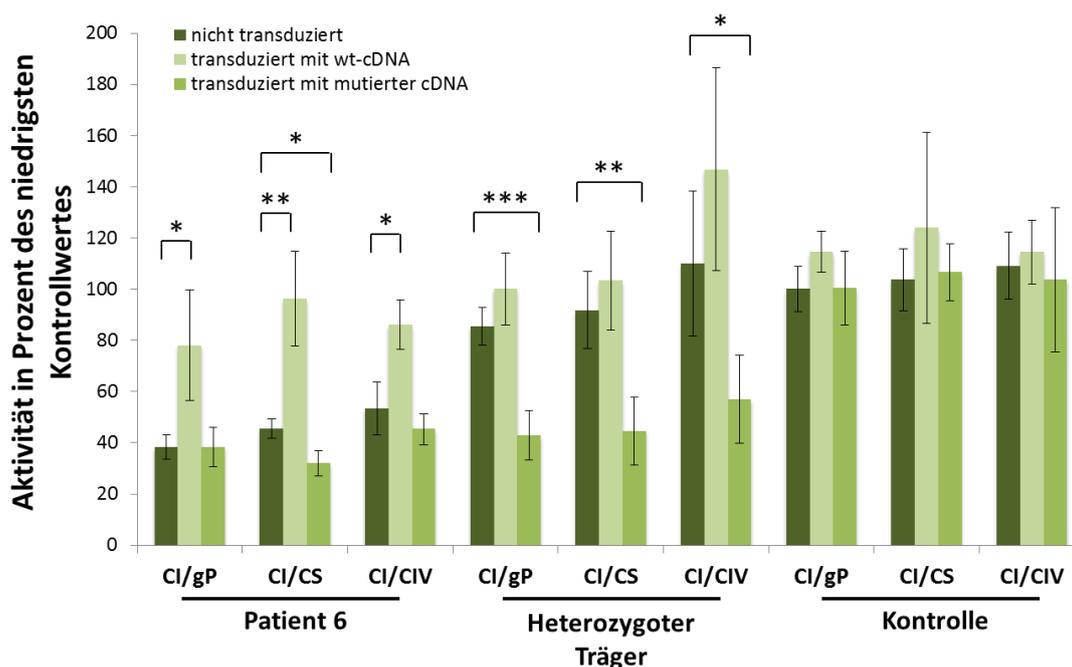


Abbildung 24: Biochemische Aktivitätsmessungen in den Fibroblastenzellen des Patienten 6 und einer heterozygoten Trägerzelllinie: Komplex I-Aktivitäten (CI) in Bezug zum Gesamtprotein (CI/gP), zur Citratsynthese (CI/CS) und zum Komplex IV (CI/CIV), jeweils in Prozent des niedrigsten Kontrollwertes, bestimmt durch drei unabhängige Dreifachmessungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Um die Pathogenität der homozygoten Mutation von Patient 6 zu überprüfen, wurde neben der Wildtyp-cDNA von *ACAD9* auch ein Expressionsvektor mit der homozygoten *ACAD9*-Mutation in die Fibroblasten von Patient 6 eingeschleust. Die Expression der Wildtyp-*ACAD9*-cDNA führte zu einem signifikanten Anstieg der

Komplex I-Aktivität von 45% auf 96%. Hingegen blieb die Komplex I-Aktivität nach Expression der mutierten cDNA konstant. Die homozygote Mutation ist demnach für den Komplex I-Defekt verantwortlich. Der krankheitsverursachende Charakter konnte durch die zusätzliche Transduktion einer heterozygoten Trägerzelllinie bestätigt werden. Nach Expression der mutierten cDNA kam es zu einer signifikanten Verminderung der Komplex I-Aktivität von 100% auf 45%. Die Expression der *ACAD9*-cDNAs mit und ohne Mutation in der Kontrollzelllinie zeigte keinen Effekt auf die biochemische Komplex I-Aktivität (Abbildung 24).

Die Fibroblasten des Patienten 7 mit den beiden heterozygoten Mutationen in *ACAD9* wiesen eine 33%ige Restaktivität des Komplexes I auf. Durch Expression der Wildtyp-*ACAD9*-cDNA konnte die Aktivität auf 73% signifikant gesteigert werden (Abbildung 25). Diese Zunahme ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass *ACAD9* wichtig für die volle Komplex I-Aktivität ist und dass die Mutationen die *ACAD9*-Funktion beeinträchtigen.

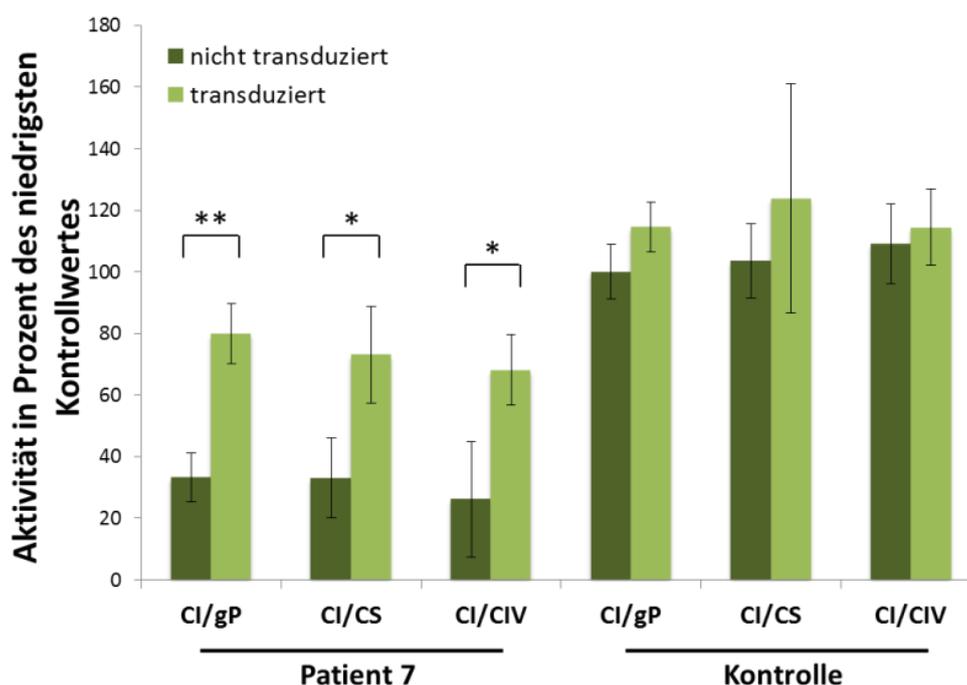


Abbildung 25: Biochemische Aktivitätsmessungen der Fibroblastenzellen des Patienten 7: Komplex I-Aktivitäten (CI) in Bezug zum Gesamtprotein (CI/gP), zur Citratsynthase (CI/CS) und zum Komplex IV (CI/CIV), jeweils in Prozent des niedrigsten Kontrollwertes, bestimmt durch drei unabhängige Dreifachmessungen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.3.2.2 Wachstumsverhalten

Die Verdopplungszeiten der Fibroblastenzellen des Patienten 6 waren auf Glukose im Durchschnitt 32 h und auf Galaktose 57 h. Nach Einbringen der Wildtyp-cDNA betrug die Zeit zur doppelten Zellzahl auf Glukose und auf Galaktose 35 h. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten konnte also von 0,63 auf 1 komplementiert werden. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich bei den Zellkulturen von Patient 7 (Abbildung 26). Durch den Nachweis des Erreichens des Kontrollbereichs bei beiden Patientenzelllinien nach Gentransfer konnte indirekt die einschränkende Auswirkung der gefundenen Mutationen auf die Funktionstüchtigkeit der Atmungskette bestätigt werden.

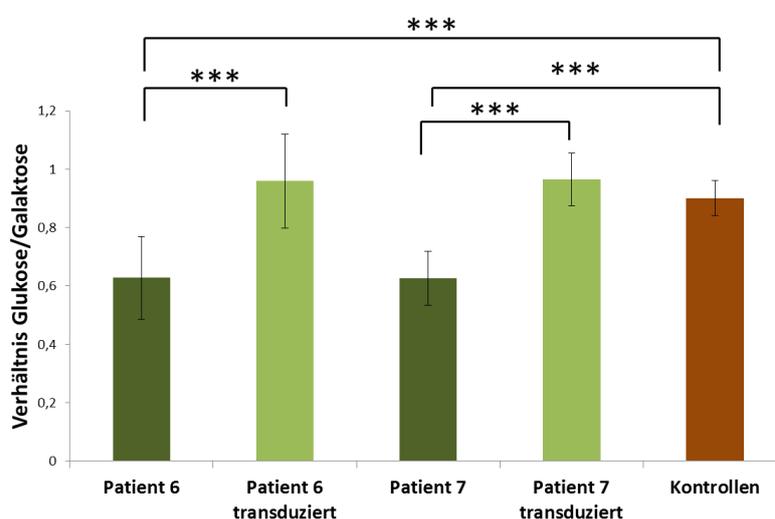


Abbildung 26: Wachstumsverhalten der Patienten mit Mutationen in *ACAD9*: Angabe des Verhältnisses der Wachstumsgeschwindigkeit auf Glukose zu Galaktose, bestimmt durch drei unabhängige Zählungen. *** $p < 0,001$

4.3.2.3 Assemblierung

Vor Gentransfer konnte das *ACAD9*-Protein weder in der Kontrolle noch in den Patienten detektiert werden. Das Protein konnte erst nach Transduktion nachgewiesen werden. Daher kann von einer Überexpression des Gens nach Transduktion ausgegangen werden. Die Dekoration der Mitochondrien im Westernblot mit einem Antikörper gegen die Komplex I-Untereinheit *NDUFS3* zeigte für beide Patienten höchstens einen kleinen Unterschied vor und nach Überexpression der Wildtyp-cDNA von *ACAD9*. Wohingegen die Menge an *NDUFB8* in den beiden untransduzierten Patientenzelllinien deutlich reduziert war. Dies deutete auf eine Funktion von *ACAD9* bei der Assemblierung oder der Stabilisierung des Komple-

xes I der Atmungskette hin. Für die Komplex III-Untereinheit konnte keine Veränderung gesehen werden (Abbildung 27).

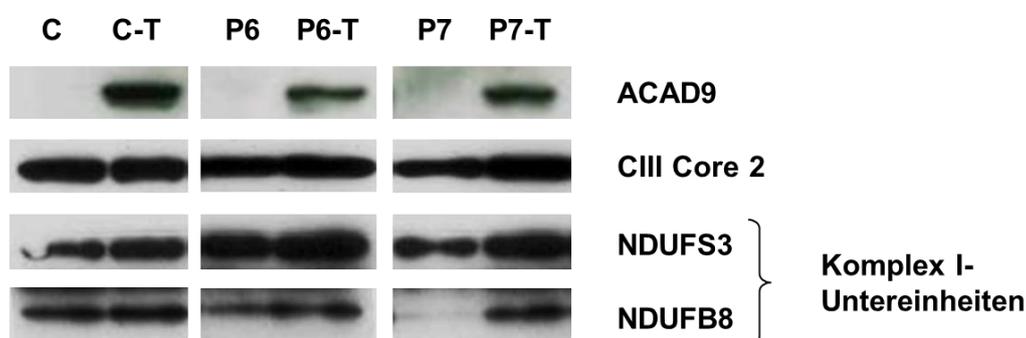


Abbildung 27: Westernblot der Patienten mit Mutationen in *ACAD9*: Detektion von *ACAD9* und der Komplex I-Untereinheiten *NDUFS3* und *NDUFB8*. Der Antikörper gegen die Untereinheit des Komplex III diente als Ladungskontrolle.

Zur zusätzlichen Darstellung des Komplexes I des Patienten mit den compound heterozygoten Mutationen wurde von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Ilka Wittig in Frankfurt eine Blue native-Gelelektrophorese mit fluoreszenzmarkierten mitochondrialen Proteinen aus Zellen des Patienten 7 durchgeführt (Abbildung 28). Die Quantifizierung zeigte, dass der Komplex I auch beim Patienten in Superkomplexen aus Komplex I, III und IV assembliert ist. Es wurde jedoch eine Verminderung des Komplexes I in den Patientenzellen auf 35% festgestellt. Dies kann entweder auf eine Instabilität des Komplexes oder auf einen beeinträchtigten Assemblierungsprozess zurückgeführt werden. Nach Transduktion der Zellen mit Wildtyp-cDNA von *ACAD9* konnte eine zu den Kontrollen vergleichbare Menge des Komplexes detektiert werden. Somit verursachen die Mutationen in *ACAD9* eine Reduzierung des assemblierten Komplexes I [53].

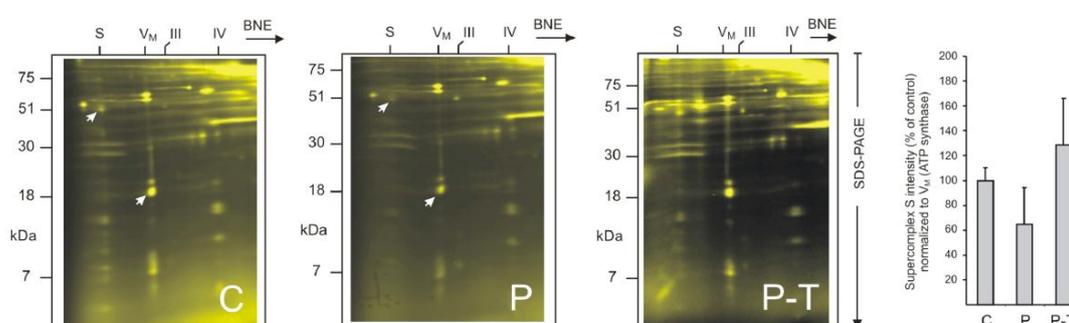


Abbildung 28: Blue native-Gelelektrophorese in Kombination mit Fluoreszenzmarkierung der mitochondrialen Proteine aus Haack et al. (2010) [53]: Untersucht wurden Fibroblasten einer Kontrolle (C) und des Patienten 7 vor (P) und nach (P-T) Transduktion. Die Quantifizierung der Superkomplexe erfolgte durch Normalisierung auf die Menge an Komplex V unter Angabe der Standardabweichung. Die Pfeile zeigen die Untereinheiten, die für die Quantifizierung verwendet wurden.

5 Diskussion

5.1 Stabiler Gentransfer in primäre Fibroblasten

Patientenzellen sind eines der wichtigsten Untersuchungsobjekte für die nähere Charakterisierung von DNA-Varianten bei metabolischen Erkrankungen. Obwohl Lymphozyten am einfachsten zu gewinnen sind, eignen sie sich nur bedingt zur Untersuchung von Atmungskettenkomplex I-Defekten, da sie eine hohe, nicht durch Rotenon blockierbare Oxidationsrate von NADH aufweisen [113]. Dies erschwert die Analyse des Atmungskettenkomplexes I. Hingegen zeigen primäre Fibroblastenzellen häufig einen ähnlichen Metabolismus bezüglich der Aktivitäten der Atmungskette wie Muskelzellen, in denen die Aktivitäten zur Diagnosestellung ermittelt werden. Fibroblasten können schon bei der Muskelbiopsie bei Diagnosefindung gewonnen werden. Ihre längere Lebensdauer gegenüber Myoblasten führt dazu, dass sie eine häufig eingesetzte Zellart bei der Überprüfung von Mutationen in Bezug auf Atmungskettendefekte sind [23, 60].

Der Nachweis des biochemischen Defekts verursacht durch mutierte Allele kann mittels Komplementationsexperimenten geführt werden. Hierbei wird die Wildtyp-cDNA des zu untersuchenden Gens in die Zellen eingeschleust und stabil exprimiert. Im Anschluss kann mittels verschiedener Methoden veranschaulicht werden, inwieweit das Produkt dieser cDNA den zellulären Defekt behebt und somit komplementiert [23]. Für diese funktionellen Analysen wird eine hohe Zellzahl benötigt, wobei eine bestmögliche Reinkultur der das Transgen exprimierenden Zellen angestrebt wird, um vorhandene signifikante Unterschiede im Vergleich zu den nicht modifizierten Patientenzellen detektieren zu können. Daher bestand der erste Teil dieser Arbeit in dem Suchen einer geeigneten Methode zum stabilen Gentransfer in primäre Fibroblasten. Mit der lentiviralen Transduktion konnte eine effiziente Methode gefunden werden.

5.1.1 Nicht-virale Gentransfermethoden

Nicht-virale Gentransfermethoden haben trotz ihrer bekannten niedrigeren Effizienz gegenüber viralen Ansätzen unter anderem die Vorteile, dass sie einfacher durchzuführen sind und niedrigere Biosicherheitsstandards benötigt werden [141]. Jedoch sind vor allem primäre Zelllinien schwierig zu transfizieren [52]. Der Einsatz einiger nicht-viraler Methoden führte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur

zu einem unbefriedigenden Ergebnis im Hinblick auf die Effizienz und es konnte bei keiner Methode eine stabile Expression des Transgens erreicht werden. Während mit der Calciumphosphat-Präzipitation fast keine Transfektion erzielt werden konnte, zeigten sich die Lipofektionsmethoden LipofectamineTMPLUSTM und Effectene[®] und die Elektroporation als geeignet für die transiente Transfektion primärer humaner Fibroblastenzellen. Es zeigten sich für diese drei Methoden eine nahezu gleiche Zytotoxizität und ähnliche Effizienzen wie in der Literatur [27, 141, 146]. Die Gründe für die Widerstandsfähigkeit primärer Zellen beim Einschleusen eines Gens sind unklar. Beim Gentransfer finden sich verschiedene Barrieren, die das einzuschleusende Genkonstrukt zu überwinden hat, bevor eine stabile Insertion in das Genom der Zelle möglich ist [38]. Hierbei stellt die Zellmembran die erste Hürde dar. Diese wird bei den Lipofektionsmethoden zu einem Teil durch direkte Fusion der Partikel mit der Membran überwunden, wobei jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil der DNA nicht in die Zelle sondern nach außen freigesetzt wird, was einen der Gründe für die mäßige Effizienz darstellt [38]. Auch bei der Calciumphosphat-Präzipitation wird nur ein kleiner Teil durch Endozytose aufgenommen [28]. Bei der Elektroporation kommt es nach Anlage des elektrischen Feldes zu einer Zunahme der Durchlässigkeit der Zellmembran durch Konformationsänderungen. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die DNA in das Zytosol gelangt. Jedoch stellt dies einen großen Stress für die Zellen dar, worin die Ursache der extrem erhöhten Mortalität bei dieser Methodik vermutet werden kann. Die erhöhte Effizienz beim Einschleusen nackter DNA bei der Elektroporation im Gegensatz zur verminderten Ergiebigkeit bei den Methoden, die mit einer Komplexbildung der DNA mit anderen Substanzen einhergehen, beruht auf einer eingeschränkten Freisetzung der DNA im Zytoplasma aus den Endosomen und den eingeschleusten Komplexen. Jedoch auch bei frei im Zytosol vorliegender DNA bewirkt eine dort lokalisierte Nuklease, dass ein Teil schon vorher abgebaut wird und daher nur etwa eines von 1000 Plasmiden den Kern erreicht [105]. Hierin begründet sich unter anderem die erhöhte Effizienz bei höheren DNA-Konzentrationen. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist dieser Prozess allerdings sättigbar. Bedingt wird dies wahrscheinlich durch die eingeschränkte Permeabilität der Kernhülle. Das Eindringen der DNA in den Kern erfolgt über zwei Hauptmechanismen, zum einen passiv während der Mitose, wenn die Membran durchlässiger ist und zum anderen aktiv durch Poren in der

Kernhülle [79]. Nachdem sich zum Zeitpunkt der Transfektion nicht alle Zellen in der gleichen Phase des Zellzyklus befinden und die Aufnahmekapazität der DNA durch die Kernporen begrenzt ist, kann ab einer bestimmten Konzentration keine Zunahme der Effektivität bei weiterer Erhöhung der DNA-Menge beobachtet werden.

Die Transkription der Genkonstrukte ist erst nach Import in den Nukleus möglich. Dieser wird durch die genannten Mechanismen erschwert, so dass nur ein geringer Teil der eingeschleusten DNA überhaupt exprimiert wird. Für die dauerhafte Expression des Transgens wird eine Integration in das Genom der Zelle benötigt. Dieser Prozess läuft zufällig ab und ist abhängig von der Art der Zellen und anderen Faktoren. Die Wahrscheinlichkeit eine stabile Transfektion zu erzielen ist sehr gering, so dass nur eines von zehntausend DNA-Konstrukten stabil transfiziert wird [92].

5.1.2 Viraler Gentransfer

Die stabile Expression des Transgens in primären Fibroblasten konnte mithilfe der Transfektionsmethoden nicht erreicht werden. Dies gelang jedoch mittels lentiviralen Gentransfers. Im Rahmen der Arbeit zeigten sich bezüglich der Effizienz der Methodik und der Mortalität ähnlich gute Resultate wie bereits in der Literatur beschrieben wurden [27, 66]. Die Abweichungen von minus 10-20% in der Transduktionseffizienz bei primären Fibroblasten erklären sich dadurch, dass in der Arbeit von Chen et al. (2003) [27] mit einem HIV-basierten Vektorsystem gearbeitet wurde und das FIV-basierte Vektorsystem bei Johnston et al. (1999) [66] ein im Vergleich zu dem hier verwendeten Ansatz modifiziertes Rückgrat des Expressionsvektors aufwies. Obwohl der lentivirale Gentransfer in der Durchführung aufwendiger ist, höhere Biosicherheitsstandards wie beispielweise spezielle Räume benötigt und die Kapazität für das Transgen bei dem in der Arbeit verwendeten System auf 8 kb beschränkt ist [118], zählt sie zu einer häufig eingesetzten Methode. Dies begründet sich vor allem darin, dass die oben beschriebenen Barrieren wie die Zellmembran und die Kernhülle mittels viruseigener Proteine überwunden werden können und eine stabile Integration des Transgens durch die virale Integrase gewährleistet wird.

5.2 Funktionelle Analyse

5.2.1 Notwendigkeit der Funktionsanalyse

Eines der Ziele in der Genetik ist das Auffinden von Genotypen, die definierte Phänotypen erklären. Durch die Möglichkeiten der Analyse ganzer Exome [93] und ganzer Genome [1] ist die Identifizierung häufiger und seltener DNA-Varianten im Genom eines Individuums möglich. Da sich zwei haploide Genome im Durchschnitt in jedem 1200-1500sten Basenpaar unterscheiden [147], kommt es im Rahmen der eingesetzten Sequenzierungsmethoden zu einer Detektion zahlreicher Varianten innerhalb verschiedenster Gene. Der Ermittlung der Krankheitsrelevanz gefundener Varianten, kommt daher eine besondere Rolle zu.

Eine Einschätzung des Bezugs der Variante zu dem zu untersuchenden Defekt ermöglicht die Betrachtung der Funktion des vom entsprechenden Gen kodierten Proteins. Während im Rahmen dieser Arbeit *NDUFB9* aufgrund seiner Kodierung für eine Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I als sehr wahrscheinliches neues Kandidatengen betrachtet werden konnte, bestand für *ACAD9* zum Zeitpunkt der Arbeit kein Anhalt für eine Beziehung zu der Erkrankung. Es wurde mit einem Defekt in der β -Oxidation assoziiert [56]. Der Umstand der Unbekanntheit der vielfältigen Funktionen zahlreicher Gene erschwert eine Einschätzung der Konsequenz einer Mutation in solchen Genen.

Bei der Identifikation von krankheitsassoziierten Genen stellt sich die Frage, ob die gefundenen Mutationen auch krankheitsrelevant sind. Erste Anhaltspunkte über den Charakter gefundener Varianten ergeben sich durch einen Vergleich mit Datenbanken wie dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), dem „1000genomes Browser“ (<http://browser.1000genomes.org>) oder institutsinternen Exom-Datenbanken, in denen detektierte Varianten aufgeführt werden. Hierdurch lässt sich die Häufigkeit des Vorkommens der Variante abschätzen, wobei bei höheren Frequenzen ein pathogener Charakter unwahrscheinlicher wird. Die in der Arbeit getesteten Varianten konnten bis auf den Basenaustausch c.1291C>G in *NDUFS1*, der mit einer Frequenz von 1% in einer europäischen Kohorte im „1000genomes Browser“ aufgeführt wurde, zum Zeitpunkt der Arbeit in den Datenbanken nicht gefunden werden. Dies ergab erste Hinweise auf das krankheitsrelevante Potential der anderen untersuchten Varianten. Auch die Betrachtung des Konservierungsstatus auf Proteinniveau gibt Informationen über die mögliche Pa-

thogenität der Mutation, so führten alle der in der Arbeit getesteten Varianten (bis auf die eben genannte) zu einem Austausch einer hochkonservierten Aminosäure. Dies sprach ebenfalls für den pathogenen Charakter der Mutationen.

Verfügbare Software-Tools, wie beispielsweise PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) oder MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), erleichtern die Differenzierung zwischen möglicherweise krankheitsrelevanten und gutartigen DNA-Varianten. Sie geben unter anderem durch Analyse der Frequenz der gefundenen Mutationen, des Konservierungsstatus, der Mutationsart und dem möglichen Effekt auf Proteinebene die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität des funktionellen Effekts einer Variante an [123]. Sowohl PolyPhen-2 als auch der MutationTaster stuften die in der Arbeit nachgewiesenen pathogenen Mutationen als krankheitsverursachend ein. Hingegen war die Zuordnung für die benigne Variante gegensätzlich. Der Basenaustausch von C nach G an der Stelle 1291 in *NDUFS1* wurde in PolyPhen-2 als gutartig mit einem Score von 0,005 (0 = neutral, 1 = pathogen) und im MutationTaster als vermutlich krankheitsverursachend mit einem Score von 0,795 (gleiche Skala) gedeutet. Solch ein Widerspruch der Ergebnisse zeigt die eingeschränkte Vorhersagekraft dieser Programme und, dass Funktionsanalysen notwendig sind.

Dies gilt in besonderem Maße bei neuen Kandidatengen. Der Nachweis von Mutationen in dem vermuteten Gen bei mehreren betroffenen Patienten erhöht die Wahrscheinlichkeit des ursächlichen Zusammenhangs, wenn solche Varianten nicht bei Kontrollen gefunden werden. Jedoch kann dies vor allem bei seltenen Erkrankungen, bei denen zudem zahlreiche Gene involviert sind, wie dem Atmungskettenkomplex I-Defekt, schwierig sein. Hier können funktionelle Untersuchungen helfen.

5.2.2 Ansatz zur Funktionsanalyse

5.2.2.1 Notwendigkeit von Zelllinien

5.2.2.1.1 Zellen der Patienten

Für die funktionellen Analysen von neuen Genvarianten werden zumeist Zellen der betroffenen Patienten verwendet. Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass nicht notwendigerweise Zellen des Patienten, bei dem die zu untersuchende Mutation nachgewiesen wurde, benötigt werden. Es reicht, wenn Zellen eines anderen von derselben Erkrankung Betroffenen vorhanden sind, der deutlich funktionsein-

schränkende Mutationen in demselben Gen trägt. Dies konnte durch die Testung der Variante c.1291C>G in *NDUFS1* veranschaulicht werden. Der Basenaustausch wurde hierfür in den Expressionsvektor von *NDUFS1* eingefügt und das veränderte Transgen in die Zellen des ersten untersuchten Patienten mit Mutationen in *NDUFS1* eingeschleust. Nach Expression der Variante konnten ähnliche Werte bei den Aktivitätsmessungen wie nach Expression der Wildtyp-cDNA erhalten werden, wodurch sich der benigne Charakter der Variante bestätigte.

5.2.2.1.2 Kontrollen für die Komplementation

Bei Komplementationsexperimenten muss gegebenenfalls berücksichtigt werden, dass derzeit nur wenig über die zu untersuchenden Gene bekannt ist. So stellen vor allem mögliche Gen-Gen-Interaktionen ein Problem bei der Komplementation dar. Es ist möglich, dass die Expression eines Transgens aufgrund von bisher nicht bekannten Wechselwirkungen auch zu einer Aktivitätszunahme führt, obwohl dieses Gen nicht bei dem betreffenden Patienten für den Defekt verantwortlich ist. Die zusätzliche Transduktion von Kontrollzelllinien gibt Hinweise darauf, inwiefern eine alleinige Überexpression des Gens schon zu einer Aktivitätszunahme führt. Im Rahmen der Arbeit zeigte sich für alle verwendeten Wildtyp-Gene kein Anstieg der Aktivitäten in den Kontrollzelllinien.

Dass der leere Expressionsvektor selbst nicht zu einer Kompensation des Defekts führt, zeigte sich sowohl am Beispiel des Patienten mit einer heterozygoten Mutation in *NDUFB9*, bei denen keine Aktivitätsänderung beobachtet werden konnte, als auch die Untersuchung der Trägerzelllinie bei *ACAD9*, bei der sogar eine Abnahme der Aktivität beobachtet werden konnte.

5.2.2.2 Methoden zum Nachweis des Defekts

Neben den Patientenzellen ist ein zuverlässiger Assay Voraussetzung für die funktionelle Analyse zur Auswirkung der Mutationen. Bei Atmungskettendefekten sind die Erkrankungen über die Einschränkung der Aktivität dieser Komplexe definiert, die bereits bei Diagnosestellung mittels biochemischer Untersuchungen im Muskel nachgewiesen wurden. Die Aktivität des Atmungskettenkomplexes I kann sowohl spektrophotometrisch als auch polarographisch bestimmt werden [6]. Bei polarographischen Messungen wird der O₂-Verbrauch der lebenden Zellen ermittelt und die gesamte Atmungskette in ihrem funktionellen Zusammenhang überprüft. Das Hinzufügen von spezifischen Substraten und Inhibitoren erlaubt es, Aussagen

über den Anteil der Beteiligung der einzelnen Komplexe an der ATP-Produktion zu machen [148]. Hingegen können spektrophotometrisch die Aktivitäten der einzelnen Komplexe isoliert betrachtet und der spezifische Substratumsatz bestimmt werden. Zudem besteht bei dieser Methodik die Möglichkeit zur Ermittlung der Aktivität der Citratsynthase, die als indirektes Maß für den absoluten Mitochondriengehalt der Zelle verwendet werden kann [6].

Das Wachstumsverhalten der Fibroblasten auf Galaktose im Vergleich zu dem auf Glukose gibt Hinweise auf die Pathogenität der zu testenden Varianten. Diese Untersuchung eignet sich vor allem zu einer ersten Einschätzung des Charakters der Mutationen, da sie schnell durchzuführen ist und nur wenige Zellen benötigt werden. Außerdem kann sie zur zusätzlichen Bestätigung eingesetzt werden. Diese ist beispielweise dann hilfreich, wenn die Patientenzellen eine recht hohe Restaktivität des Atmungskettenkomplexes I aufweisen und daher die Aktivitätszunahme nach Komplementation geringer ist als bei massiv eingeschränkter Funktion des Komplexes. Allerdings reichen die Wachstumskurven für den Nachweis der Komplementierbarkeit des Defekts nicht aus, da sie nur eine indirekte Aussage über die Funktion der Atmungskette zulassen. So kann beispielweise die ATP-Produktion und damit das bessere Wachstum nach Einbringen des Transgens auch auf anderen Ursachen beruhen. Nachdem häufig nicht alle Funktionen eines Gens bekannt sind, ist es zum einen möglich, dass das eingeschleuste Gen ein Wachstumsfaktor ist und daher das Wachstum verbessert wird, zum anderen kann die Expression des Gens über indirekte Mechanismen, wie beispielweise die Erhöhung der intramitochondrialen Calciumkonzentration zu einer Aktivitätszunahme in der Atmungskette und damit einer verbesserten ATP-Produktion führen [34]. Daher ist es nicht möglich alleine durch das Wachstumsverhalten Rückschlüsse auf das krankheitsverursachende Potential der untersuchten DNA-Variante im Hinblick auf den isolierten Komplex I-Defekt zu ziehen.

Sowohl bei den enzymatischen Analysen als auch beim Wachstumsverhalten konnte eine Abhängigkeit der ermittelten Werte von der Passagenzahl der verwendeten Fibroblastenzellen beobachtet werden. Eine Erhöhung der Passagenzahl führte zu einer Verminderung der Enzymaktivität und auch zu einer Verlangsamung im Wachstum. Am deutlichsten äußerte sich dies in der Arbeit bei der Ermittlung des Wachstumsverhaltens der Patienten mit homozygoter Mutation in *NDUFB9*. Nach Gentransfer war die Verdopplungszeit auf Glukose fast verdrei-

facht. Hierbei handelt es sich um einen bekannten Effekt der auf das „Altern“ und die damit einhergehende Verminderung von Reparaturmechanismen zurückzuführen ist. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist es daher wichtig die Passagenzahlen bei den Analysen mit zu berücksichtigen oder über die Berechnung von Verhältnissen dieses Problem zu adressieren.

5.2.3 Beurteilung der Ergebnisse

5.2.3.1 Patienten mit Mutationen in *NDUFS1*

Die Untersuchung der Fibroblastenzellen der Patienten mit Mutationen in *NDUFS1* veranschaulichte die Funktionstüchtigkeit des Assays für die Analyse von DNA-Varianten. Nach Transduktion zeigte sich bei beiden Patienten mit compound heterozygoten Mutationen ein signifikanter Anstieg der biochemisch gemessenen Komplex I-Aktivität und der pathogene Charakter der compound heterozygoten Mutationen, c.497G>A, c.683T>C und c.683T>C, c.755A>G, konnte nachgewiesen werden. Obwohl nach lentiviralem Gentransfer von einer vermehrten Expression des gesunden Allels auszugehen ist, konnte bei den Aktivitätsmessungen nur eine Annäherung an die Kontrollwerte erzielt werden. Dies erklärt sich möglicherweise durch die immer noch vorhandene Expression des mutierten Allels, wodurch sowohl funktionseingeschränkte als auch Wildtyp-Proteine in den Komplex eingebaut werden können. Zudem erhöht die zwei bis vier wöchige Selektionsphase die Passagenzahl der zu untersuchenden Zellen und es kommt zu einer Verringerung der maximal möglichen Aktivität.

Die Betrachtungen der Auswirkung der Mutationen auf Proteinebene zeigten eine Verminderung sämtlicher getesteter Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette, die mit Hilfe der Transduktion der Wildtyp-cDNA nahezu behoben werden konnte. Es konnte keine direkte Korrelation zwischen dem Proteinniveau in den Fibroblastenzellen der verschiedenen Patienten und der biochemischen Aktivität beobachtet werden. Insgesamt bestätigte sich der Einfluss von *NDUFS1* auf die Stabilität beziehungsweise die Assemblierung des Komplexes I.

Während bei den ersten beiden Patienten mit Mutationen in *NDUFS1* die krankheitsverursachenden Allele je in einem compound heterozygoten Status vorlagen und der Aminosäureaustausch eine hochkonservierte Stelle des Proteins betraf, war dies beim dritten Patienten nicht der Fall. Er war Träger einer heterozygoten Mutation, die eine Aminosäure mit nur geringem Konservierungsstatus betraf. Mit-

tels funktioneller Analysen konnte der benigne Charakter dieser Mutation nachgewiesen werden, wobei jedoch eine Aktivitätszunahme durch Überexpression des mutierten Allels nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann.

5.2.3.2 Patienten mit Mutationen in *NDUFB9*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals das krankheitsverursachende Potential von Mutationen in *NDUFB9* funktionell nachgewiesen werden. Es bestätigte sich der krankheitsrelevante Charakter der homozygoten Mutation c.191T>C.

NDUFB9 ist eine Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I, deren genaue Funktion nicht bekannt ist. Ihre Lokalisation in dem intramembranären Teil des Komplexes legt eine Stabilisierungsfunktion nahe. Aufgrund der strukturellen Verwandtheit von *NDUFB9* zu den LYR-Proteinen in Bakterien wird eine Beteiligung bei der Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster diskutiert [50]. Die durchgeführten Untersuchungen auf Proteinniveau lassen wegen der Verminderung aller getesteten Untereinheiten ebenfalls einen Einfluss von *NDUFB9* auf die Stabilität beziehungsweise die Assemblierung des Komplexes vermuten.

5.2.3.3 Patienten mit Mutationen in *ACAD9*

Dass es sich bei *ACAD9* um ein neues Kandidatengen bei Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt handelt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Die funktionellen Analysen zeigten sowohl den krankheitsverursachenden Charakter der homozygoten Mutation c.1594C>T wie auch den der compound heterozygoten Mutationen c.130T>A und c.797G>A.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei *ACAD9* nicht um eine Untereinheit des Komplexes I. Es hat allem Anschein nach mehrere Funktionen in der Zelle:

Es wurde von einer möglichen Beteiligung an der β -Oxidation in den Mitochondrien berichtet. Diese basierte auf In vitro-Messungen der Oxidation von langkettigen Fettsäuren [39]. In drei Patienten mit Defekten in der β -Oxidation konnte zudem eine Verminderung der mRNA von *ACAD9* detektiert werden, wobei sich jedoch bei keinem der Patienten eine Mutation in dem Gen zeigte [56]. Daher ist es möglich, dass *ACAD9* in den beschriebenen Fällen nicht für den metabolischen Defekt verantwortlich ist.

Neben der Beteiligung am Fettstoffwechsel wurde *ACAD9* eine Bedeutung bei der Assemblierung des Komplexes I der Atmungskette zugeschrieben [94]. Demnach bildet *ACAD9* mit *NDUFAF1* und *ECSIT*, zwei bekannten Assemblierungsfaktoren,

einen Komplex. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *ACAD9* zu einem verminderten voll assemblierten Komplex I führen, wodurch die Funktion der Beteiligung von *ACAD9* an der Stabilität beziehungsweise der Assemblierung des Atmungskettenkomplexes I unterstützt wird. Der Nachweis von Mutationen in *ACAD9* bei bisher sieben Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt spricht ebenfalls für eine Assoziation dieses Gens mit der Erkrankung [49, 53, 94], so dass *ACAD9* als ein neues Kandidatengen betrachtet werden kann.

5.2.4 Aussagekraft und Grenzen der Komplementation

Komplementationsexperimente eignen sich zur Analyse des Charakters von DNA-Varianten in Patientenzellen mit Atmungskettenkomplex I-Defekt. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele [23, 58] und auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Wildtyp-Gens den zu analysierenden Gendefekt kompensieren kann. Bei der Interpretation von Komplementationsexperimenten muss jedoch berücksichtigt werden, wie spezifisch die getestete Funktion für das Gen ist. Hierbei gilt, je spezifischer die Genfunktion überprüft werden kann, desto eher deutet ein signifikanter Unterschied nach Gentransfer auf eine erfolgreiche Komplementation hin. Obwohl die Überprüfung der Atmungskettenkomplex I-Aktivität spezifischer als die Untersuchung des Wachstumsverhaltens ist, bedingt die Vielzahl der beispielsweise an der Assemblierung, der Stabilität und der katalytischen Funktion dieses Komplexes beteiligten Gene, dass die genaue Genfunktion durch alleinige biochemische Messungen nicht getestet werden kann. So ist es möglich, dass die Überexpression eines Gens beispielweise einen anderen Proteindefekt kompensiert, ohne jedoch selbst für die Erkrankung verantwortlich zu sein. Daher sollte nicht alleine aufgrund der Aktivitätsmessungen auf das krankheitsrelevante Gen geschlossen werden, da sie häufig nur einen indirekten Test für die Funktion des Gens darstellen, wodurch die genaue Beurteilung der Komplementation erschwert wird. Eine Aussage über die Assoziation eines Gens zu einer Erkrankung sollte aus diesem Grunde immer unter Zusammenschau aller zu ermittelnden Ergebnisse erfolgen.

Dass der krankheitsrelevante Charakter von gefundenen Mutationen dennoch, wenn immer möglich, bestätigt werden sollte, zeigte sich in einer Studie von Bell et al. (2011) [7]. In dieser wurde darauf hingewiesen, dass bis zu 27% der in der Literatur als krankheitsverursachend beschriebenen Mutationen Polymorphismen oder

Fehler bei der Sequenzierung zu sein scheinen. Die Chance der Identifizierung von Varianten, die als wahrscheinlich pathogen eingestuft werden, obwohl sie nicht krankheitsrelevant sind, erhöht sich durch die Möglichkeit der parallelen Analyse zahlreicher Gene. Die funktionelle Analyse der DNA-Varianten wird daher immer wichtiger.

6 Zusammenfassung

Der mitochondriale Atmungskettenkomplex I-Defekt stellt die häufigste Ursache einer primären Störung der oxidativen Phosphorylierung dar. Die hohe Anzahl der für die Funktion und Assemblierung des Komplexes notwendigen Gene bedingt, dass derzeit nur bei einem kleinen Teil der Patienten die molekulargenetische Ursache der Erkrankung bekannt ist. Durch den Einsatz von Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden, die parallele Untersuchungen zahlreicher Gene ermöglichen, wird versucht bei einem höheren Prozentsatz der Patienten eine molekulare Diagnose zu stellen. Dabei stellt vor allem die Detektion von zahlreichen Varianten in unterschiedlichen Genen eine Herausforderung bei der Identifikation der krankheitsverursachenden Variante dar. Zur Untersuchung des pathogenen Potentials postulierter krankheitsrelevanter Allele können funktionelle Analysen einen wertvollen Beitrag leisten.

In dieser Arbeit wurde hierfür ein Assay etabliert: Mittels lentiviraler Transduktion wurden Wildtyp- oder mutierte cDNAs der zu untersuchenden Gene in Patientenfibroblasten eingeführt und exprimiert. Im Anschluss wurde die Komplementierbarkeit des mutierten Proteins durch biochemische Aktivitätsmessungen, Bestimmung des Wachstumsverhaltens der Zellen auf Galaktose im Vergleich zu Glukose und Betrachtung der Auswirkung der Mutation auf Proteinniveau vor und nach Gentransfer untersucht.

Es wurden Varianten in den Genen *NDUFS1* und *NDUFB9*, die für Untereinheiten des Atmungskettenkomplexes kodieren, und in *ACAD9*, einem zum Zeitpunkt der Arbeit nicht mit dem Atmungskettenkomplex I in Verbindung gebrachten Gen, analysiert. Der funktionelle Ansatz ermöglichte den Nachweis der pathogenen Eigenschaften der Mutationen c.497G>A, c.683T>C und c.755A>G in *NDUFS1*. Zudem konnte der benigne Charakter der Variante c.1291C>G in *NDUFS1* gezeigt werden. Durch Untersuchungen der Variante c.191T>C in *NDUFB9* konnte zum ersten Mal der krankheitsverursachende Charakter von Mutationen in diesem Gen dargestellt werden, so dass *NDUFB9* als ein neues Kandidatengen bei Patienten mit isoliertem Atmungskettenkomplex I-Defekt betrachtet werden kann. Ebenso halfen erfolgreiche Komplementationsexperimente der homozygoten Mutation c.1594C>T und der compound heterozygoten Mutationen c.130T>A und c.797G>A in *ACAD9* zu belegen, dass dieses Protein für eine vollständige Assemblierung des Atmungskettenkomplexes I notwendig ist und Mutationen in die-

sem Gen zu Mitochondriopathien mit Atmungskettenkomplex I-Defekt führen können.

Zusammenfassend zeigte sich im Rahmen der funktionellen Untersuchungen die Funktionstüchtigkeit des Assays und die Pathogenität von Mutationen in einem bereits bekannten und in zwei neuen Kandidatengenomen konnte nachgewiesen werden.

7 Literatur

1. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurler ME, McVean GA (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061-1073
2. Ackrell BA (2000) Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett* 466:1-5
3. Almofti MR, Harashima H, Shinohara Y, Almofti A, Baba Y, Kiwada H (2003) Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch Biochem Biophys* 410:246-253
4. Arnaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, Dimauro S, Schon EA (1991) Depletion of Muscle Mitochondrial-DNA in Aids Patients with Zidovudine-Induced Myopathy. *Lancet* 337:508-510
5. Barraza RA, Poeschla EM (2008) Human gene therapy vectors derived from feline lentiviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123:23-31
6. Barrientos A, Fontanesi F, Diaz F (2009) Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr Protoc Hum Genet Chapter* 19:Unit19 13
7. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, Langley RJ, Zhang L, Lee CC, Schilkey FD, Sheth V, Woodward JE, Peckham HE, Schroth GP, Kim RW, Kingsmore SF (2011) Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Science translational medicine* 3:65ra64
8. Benard G, Rossignol R (2008) Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10:1313-1342
9. Benit P, Beugnot R, Chretien D, Giurgea I, De Lonlay-Debeney P, Issartel JP, Corral-Debrinski M, Kerscher S, Rustin P, Rotig A, Munnich A (2003) Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat* 21:582-586
10. Benit P, Chretien D, Kadhom N, de Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, Peudenier S, Rustin P, Munnich A, Rotig A (2001) Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet* 68:1344-1352
11. Benit P, Slama A, Cartault F, Giurgea I, Chretien D, Lebon S, Marsac C, Munnich A, Rotig A, Rustin P (2004) Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome. *J Med Genet* 41:14-17
12. Berger I, Hershkovitz E, Shaag A, Edvardson S, Saada A, Elpeleg O (2008) Mitochondrial complex I deficiency caused by a deleterious NDUFA11 mutation. *Ann Neurol* 63:405-408
13. Berrisford JM, Sazanov LA (2009) Structural Basis for the Mechanism of Respiratory Complex I. *Journal of Biological Chemistry* 284:29773-29783
14. Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret B, Firtion G, Ciraru-Vigneron N, Lacroix C, Rouzioux C, Mandelbrot L, Desguerre I, Rotig A, Mayaux MJ, Delfraissy JF (1999) Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 354:1084-1089
15. Bourgeron T, Chretien D, Amati P, Rotig A, Munnich A, Rustin P (1993) Expression of respiratory chain deficiencies in human cultured cells. *Neuromuscul Disord* 3:605-608

16. Brandt U (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69-92
17. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360:219-223
18. Brown MD, Starikovskaya E, Derbeneva O, Hosseini S, Allen JC, Mikhailovskaya IE, Sukernik RI, Wallace DC (2002) The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. *Hum Genet* 110:130-138
19. Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, Briem E, Lamantea E, Carrara F, Moroni I, Farina L, Spada M, Donati MA, Uziel G, Zeviani M (2004) Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1659:136-147
20. Bukh J, Purcell RH, Miller RH (1992) Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:187-191
21. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA, Mootha VK (2006) Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* 38:576-582
22. 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 (2012) Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science translational medicine* 4:118ra110
23. 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 (2010) High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet* 42:851-858
24. Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J Biol Chem* 281:32724-32727
25. Chan DC (2006) Mitochondria: Dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125:1241-1252
26. Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA (2006) Membrane electroporation theories: a review. *Med Biol Eng Comput* 44:5-14
27. Chen M, Li W, Fan J, Kasahara N, Woodley D (2003) An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Clinical and experimental dermatology* 28:193-199
28. Coonrod A, Li FQ, Horwitz M (1997) On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* 4:1313-1321
29. Coutlee F, Viscidi RP, Saint-Antoine P, Kessous A, Yolken RH (1991) The polymerase chain reaction: a new tool for the understanding and diagnosis of HIV-1 infection at the molecular level. *Mol Cell Probes* 5:241-259
30. Di Donato S (2009) Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol* 256:693-710
31. DiMauro S (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658:80-88

32. Dimauro S, Davidzon G (2005) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 37:222-232
33. DiMauro S, Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668
34. Distelmaier F, Koopman WJ, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willems PH, Smeitink JA (2009) Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* 132:833-842
35. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ (1998) Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-5092
36. Dunning CJ, McKenzie M, Sugiana C, Lazarou M, Silke J, Connelly A, Fletcher JM, Kirby DM, Thorburn DR, Ryan MT (2007) Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *Embo J* 26:3227-3237
37. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77
38. Elouahabi A, Ruyschaert JM (2005) Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* 11:336-347
39. Ensenauer R, He M, Willard JM, Goetzman ES, Corydon TJ, Vandahl BB, Mohsen AW, Isaya G, Vockley J (2005) Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 280:32309-32316
40. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413-7417
41. Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, Cheng SH (1995) Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 772:126-139
42. Fernandez-Moreira D, Ugalde C, Smeets R, Rodenburg RJ, Lopez-Laso E, Ruiz-Falco ML, Briones P, Martin MA, Smeitink JA, Arenas J (2007) X-linked NDUFA1 gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Neurol* 61:73-83
43. Ferreira M, Torraco A, Rizza T, Fattori F, Meschini MC, Castana C, Go NE, Nargang FE, Duarte M, Piemonte F, Dionisi-Vici C, Videira A, Vilarinho L, Santorelli FM, Carozzo R, Bertini E (2011) Progressive cavitating leukoencephalopathy associated with respiratory chain complex I deficiency and a novel mutation in NDUFS1. *Neurogenetics* 12:9-17
44. Finel M, Skehel JM, Albracht SP, Fearnley IM, Walker JE (1992) Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme. *Biochemistry* 31:11425-11434
45. Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B, De Jonghe P, Lossos A, Lynch T, Mariotti C, Schols L, Spinazzola A, Szolnoki Z, Tabrizi SJ, Tallaksen CM, Zeviani M, Burgunder JM, Gasser T (2009) EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur J Neurol* 16:1255-1264
46. Finsterer J, Zarrouk Mahjoub S (2012) Epilepsy in mitochondrial disorders. *Seizure* 21:316-321
47. Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25:319-324

48. Gerards M, Sluiter W, van den Bosch BJ, de Wit LE, Calis CM, Frentzen M, Akbari H, Schoonderwoerd K, Scholte HR, Jongbloed RJ, Hendrickx AT, de Coo IF, Smeets HJ (2010) Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome. *J Med Genet* 47:507-512
49. Gerards M, van den Bosch BJ, Danhauser K, Serre V, van Weeghel M, Wanders RJ, Nicolaes GA, Sluiter W, Schoonderwoerd K, Scholte HR, Prokisch H, Rotig A, de Coo IF, Smeets HJ (2011) Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene. *Brain* 134:210-219
50. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmuller H, D'Adamo P, Gasparini P, Strom TM, Prokisch H, Invernizzi F, Ferrero I, Zeviani M (2009) SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat Genet* 41:654-656
51. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476-1481
52. Gresch O, Engel FB, Nestic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G, Lun K (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33:151-163
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 HW, Wittig I, Meitinger T, Zeviani M, Prokisch H (2010) Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet* 42:1131-1134
54. Haack TB, Madignier F, Herzer M, Lamantea E, Danhauser K, Invernizzi F, Koch J, Freitag M, Drost R, Hillier I, Haberberger B, Mayr JA, Ahting U, Tiranti V, Rotig A, Iuso A, Horvath R, Tesarova M, Baric I, Uziel G, Rolinski B, Sperl W, Meitinger T, Zeviani M, Freisinger P, Prokisch H (2012) Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9. *J Med Genet* 49:83-89
55. Hassanein T, Frederick T (2004) Mitochondrial dysfunction in liver disease and organ transplantation. *Mitochondrion* 4:609-620
56. He M, Rutledge SL, Kelly DR, Palmer CA, Murdoch G, Majumder N, Nicholls RD, Pei Z, Watkins PA, Vockley J (2007) A new genetic disorder in mitochondrial fatty acid beta-oxidation: ACAD9 deficiency. *Am J Hum Genet* 81:87-103
57. Hoefs SJ, Dieteren CE, Distelmaier F, Janssen RJ, Epplen A, Swarts HG, Forkink M, Rodenburg RJ, Nijtmans LG, Willems PH, Smeitink JA, van den Heuvel LP (2008) NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease. *Am J Hum Genet* 82:1306-1315
58. Hoefs SJ, Dieteren CE, Rodenburg RJ, Naess K, Bruhn H, Wibom R, Wagena E, Willems PH, Smeitink JA, Nijtmans LG, van den Heuvel LP (2009) Baculovirus complementation restores a novel NDUFAF2 mutation causing complex I deficiency. *Hum Mutat* 30:E728-736
59. Hoefs SJ, Skjeldal OH, Rodenburg RJ, Nedregard B, van Kaauwen EP, Spiekerkotter U, von Kleist-Retzow JC, Smeitink JA, Nijtmans LG, van den Heuvel LP (2010) Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol Genet Metab* 100:251-256

60. Hoefs SJ, van Spronsen FJ, Lenssen EW, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, Smeitink JA, van den Heuvel LP (2011) NDUFA10 mutations cause complex I deficiency in a patient with Leigh disease. *Eur J Hum Genet* 19:270-274
61. Hunte C, Zickermann V, Brandt U (2010) Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* 329:448-451
62. Huoponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML (1991) A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 48:1147-1153
63. Iuso A, Scacco S, Piccoli C, Bellomo F, Petruzzella V, Trentadue R, Minuto M, Ripoli M, Capitanio N, Zeviani M, Papa S (2006) Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *J Biol Chem* 281:10374-10380
64. Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA (2006) Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 29:499-515
65. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD (1992) An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1551-1557
66. Johnston JC, Gasmi M, Lim LE, Elder JH, Yee JK, Jolly DJ, Campbell KP, Davidson BL, Sauter SL (1999) Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J Virol* 73:4991-5000
67. Jordan ET, Collins M, Terefe J, Ugozzoli L, Rubio T (2008) Optimizing electroporation conditions in primary and other difficult-to-transfect cells. *J Biomol Tech* 19:328-334
68. Kingston RE, Chen CA, Okayama H (2003) Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 20:Unit 20 23*
69. Kirby DM, Salemi R, Sugiana C, Ohtake A, Parry L, Bell KM, Kirk EP, Boneh A, Taylor RW, Dahl HH, Ryan MT, Thorburn DR (2004) NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. *J Clin Invest* 114:837-845
70. Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, Schatz G (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2141-2146
71. Koene S, Smeitink J (2009) Mitochondrial medicine: entering the era of treatment. *J Intern Med* 265:193-209
72. Koenig MK (2008) Presentation and diagnosis of mitochondrial disorders in children. *Pediatr Neurol* 38:305-313
73. Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, Goto Y (2003) A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. *Mitochondrion* 2:293-304
74. Kuncl RW (2009) Agents and mechanisms of toxic myopathy. *Current Opinion in Neurology* 22:506-515
75. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
76. Lancaster CR, Kroger A (2000) Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta* 1459:422-431
77. Lang BF, Gray MW, Burger G (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33:351-397

78. Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M (2009) Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta* 1793:78-88
79. Lechardeur D, Lukacs GL (2006) Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum Gene Ther* 17:882-889
80. Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L (2000) High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 32:626-629
81. Loeffen J, Elpeleg O, Smeitink J, Smeets R, Stockler-Ipsiroglu S, Mandel H, Sengers R, Trijbels F, van den Heuvel L (2001) Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol* 49:195-201
82. Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, Janssen AJ, Triepels RH, Sengers RC, van den Heuvel LP (2000) Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* 15:123-134
83. Löffler G, Petrides P (eds) (2003) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
84. Lowell BB, Shulman GI (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387
85. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41:1776-1804
86. Margulis L (1971) Symbiosis and evolution. *Sci Am* 225:48-57
87. Martin MA, Blazquez A, Gutierrez-Solana LG, Fernandez-Moreira D, Briones P, Andreu AL, Garesse R, Campos Y, Arenas J (2005) Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene. *Arch Neurol* 62:659-661
88. Martin W, Hoffmeister M, Rotte C, Henze K (2001) An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biol Chem* 382:1521-1539
89. McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG (2004) Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochem Res* 29:589-600
90. Milone M, Brunetti-Pierri N, Tang LY, Kumar N, Mezei MM, Josephs K, Powell S, Simpson E, Wong LJ (2008) Sensory ataxic neuropathy with ophthalmoparesis caused by POLG mutations. *Neuromuscul Disord* 18:626-632
91. Modica-Napolitano JS, Singh KK (2004) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 4:755-762
92. Mülhardt C (ed) (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Heidelberg
93. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigam AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42:30-35
94. Nouws J, Nijtmans L, Houten SM, van den Brand M, Huynen M, Venselaar H, Hoefs S, Gloerich J, Kronick J, Hutchin T, Willems P, Rodenburg R, Wanders R, van den Heuvel L, Smeitink J, Vogel RO (2010) Acyl-CoA

- dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metab* 12:283-294
95. Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA (2005) A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* 115:2784-2792
 96. Ohnishi T (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim Biophys Acta* 1364:186-206
 97. Ohnishi T, Sled VD, Yano T, Yagi T, Burbaev DS, Vinogradov AD (1998) Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1365:301-308
 98. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134:112-123
 99. Pagniez-Mammeri H, Lombes A, Brivet M, Ogier-de Baulny H, Landrieu P, Legrand A, Slama A (2009) Rapid screening for nuclear genes mutations in isolated respiratory chain complex I defects. *Mol Genet Metab* 96:196-200
 100. Papa S, Petruzzella V, Scacco S, Sardanelli AM, Iuso A, Panelli D, Vitale R, Trentadue R, De Rasmio D, Capitanio N, Piccoli C, Papa F, Scivetti M, Bertini E, Rizza T, De Michele G (2009) Pathogenetic mechanisms in hereditary dysfunctions of complex I of the respiratory chain in neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 1787:502-517
 101. Petruzzella V, Vergari R, Puzziferri I, Boffoli D, Lamantea E, Zeviani M, Papa S (2001) A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet* 10:529-535
 102. Pilkington SJ, Arizmendi JM, Fearnley IM, Runswick MJ, Skehel JM, Walker JE (1993) Structural organization of complex I from bovine mitochondria. *Biochem Soc Trans* 21:26-31
 103. Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ (1998) Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* 4:354-357
 104. Pollack M, Leeuwenburgh C (2001) Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B475-482
 105. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D (1998) Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273:7507-7511
 106. Pon LA, Schon EA (eds) (2001) *Mitochondria*. Academic Press, New York
 107. Procaccio V, Wallace DC (2004) Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* 62:1899-1901
 108. Robin ED, Wong R (1988) Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 136:507-513
 109. Robinson BH (2006) Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 89:3-13
 110. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC (1992) Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochemical medicine and metabolic biology* 48:122-126

111. Roesch K, Curran SP, Tranebjaerg L, Koehler CM (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet* 11:477-486
112. Rose JK (2003) Optimization of transfection. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 20:Unit 20 27
113. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 228:35-51
114. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD (2010) Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10:393-401
115. Saada A, Edvardson S, Rapoport M, Shaag A, Amry K, Miller C, Lorberboum-Galski H, Elpeleg O (2008) C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I. *Am J Hum Genet* 82:32-38
116. Saada A, Vogel RO, Hoefs SJ, van den Brand MA, Wessels HJ, Willems PH, Venselaar H, Shaag A, Barghuti F, Reish O, Shohat M, Huynen MA, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Nijtmans LG (2009) Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 84:718-727
117. Saenz DT, Poeschla EM (2004) FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med* 6 Suppl 1:S95-104
118. Sauter SL, Gasmi M (2001) FIV vector systems. *Somat Cell Mol Genet* 26:99-129
119. Schapira AH (2006) Mitochondrial disease. *Lancet* 368:70-82
120. Scheffler IE (1998) Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 60:267-315
121. Schlame M, Towbin JA, Heerdt PM, Jehle R, DiMauro S, Blanck TJ (2002) Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth syndrome. *Ann Neurol* 51:634-637
122. Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, van den Heuvel LP, Drose S, Brandt U, Hoffmann GF, Ter Laak H, Kolker S, Smeitink JA (2006) Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* 398:107-112
123. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods* 7:575-576
124. Sgobbo P, Pacelli C, Grattagliano I, Villani G, Cocco T (2007) Carvedilol inhibits mitochondrial complex I and induces resistance to H₂O₂-mediated oxidative insult in H9C2 myocardial cells. *Biochim Biophys Acta* 1767:222-232
125. Singer M, Brealey D (1999) Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Mitochondria and Cell Death* 66:149-166
126. Smeitink J, Wendel U (2007) *Mitochondriopathien*. Springer Verlag, Heidelberg
127. Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, Lamantea E, Donati A, Dirocco M, Giordano I, Meznaric-Petrusa M, Baruffini E, Ferrero I, Zeviani M (2009) Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inherit Metab Dis* 32:143-158

128. Spinazzola A, Zeviani M (2009) Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *J Intern Med* 265:174-192
129. Spinazzola A, Zeviani M (2005) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* 354:162-168
130. Swalwell H, Kirby DM, Blakely EL, Mitchell A, Salemi R, Sugiana C, Compton AG, Tucker EJ, Ke BX, Lamont PJ, Turnbull DM, McFarland R, Taylor RW, Thorburn DR (2011) Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *Eur J Hum Genet* 19:769-775
131. Taivassalo T, Jensen TD, Kennaway N, DiMauro S, Vissing J, Haller RG (2003) The spectrum of exercise tolerance in mitochondrial myopathies: a study of 40 patients. *Brain* 126:413-423
132. Taylor RW, Morris AA, Hutchinson M, Turnbull DM (2002) Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation. *Eur J Hum Genet* 10:141-144
133. Taylor RW, Singh-Kler R, Hayes CM, Smith PE, Turnbull DM (2001) Progressive mitochondrial disease resulting from a novel missense mutation in the mitochondrial DNA ND3 gene. *Ann Neurol* 50:104-107
134. Thorburn DR (2004) Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J Inherit Metab Dis* 27:349-362
135. Thorburn DR, Sugiana C, Salemi R, Kirby DM, Worgan L, Ohtake A, Ryan MT (2004) Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochim Biophys Acta* 1659:121-128
136. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
137. Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JL, Buskens CA, Smeets RJ, Rubio Gozalbo ME, Budde SM, Mariman EC, Wijburg FA, Barth PG, Trijbels JM, Smeitink JA (1999) Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 45:787-790
138. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawaitoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1995) Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome-C-Oxidase at 2.8 Angstrom. *Science* 269:1069-1074
139. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawaltoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 angstrom. *Science* 272:1136-1144
140. Tuppen HAL, Hogan VE, He L, Blakely EL, Worgan L, Al-Dosary M, Saretzki G, Alston CL, Morris AA, Clarke M, Jones S, Devlin AM, Mansour S, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Thorburn DR, McFarland R, Taylor RW (2010) The p.M292T NDUFS2 mutation causes complex I-deficient Leigh syndrome in multiple families. *Brain* 133:2952-2963
141. Uchida E, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Hayakawa T (2002) Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25:891-897
142. Ugalde C, Hinttala R, Timal S, Smeets R, Rodenburg RJ, Uusimaa J, van Heuvel LP, Nijtmans LG, Majamaa K, Smeitink JA (2007) Mutated ND2 impairs mitochondrial complex I assembly and leads to Leigh syndrome. *Mol Genet Metab* 90:10-14

143. Ugalde C, Vogel R, van den Heuvel B, Smeitink J, Nijtmans L (2004) Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* 13:2461-2472
144. Valentino ML, Barboni P, Ghelli A, Bucchi L, Rengo C, Achilli A, Torroni A, Lugaresi A, Lodi R, Barbiroli B, Dotti M, Federico A, Baruzzi A, Carelli V (2004) The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 56:631-641
145. van den Bosch BJ, Gerards M, Sluiter W, Stegmann AP, Jongen EL, Hellebrekers DM, Oegema R, Lambrichs EH, Prokisch H, Danhauser K, Schoonderwoerd K, de Coo IF, Smeets HJ (2011) Defective NDUFA9 as a novel cause of neonatally fatal complex I disease. *J Med Genet*
146. Veelken H, Jesuiter H, Mackensen A, Kulmburg P, Schultze J, Rosenthal F, Mertelsmann R, Lindemann A (1994) Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy. *Hum Gene Ther* 5:1203-1210
147. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nuskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J,

- Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351
148. Villani G, Attardi G (2007) Polarographic assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 80:121-133
 149. von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P (2009) Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu Rev Biochem* 78:649-672
 150. Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488
 151. Weitzel JM, Iwen KAH, Seitz HJ (2003) Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Experimental Physiology* 88:121-128
 152. Wiegand G, Remington SJ (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 15:97-117
 153. Xia D, Yu CA, Kim H, Xian JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1997) Crystal structure of the cytochrome bc(1) complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277:60-66
 154. Zhang ZL, Huang LS, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH (1998) Electron transfer by domain movement in stockbroker bc(1). *Nature* 392:677-684
 155. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen denjenigen danken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit an seinem Institut danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. Holger Prokisch, da er mir ermöglicht hat in seiner Arbeitsgruppe dieses Thema zu bearbeiten. Dabei konnte ich sehr eigenständig arbeiten und bekam durch viele hilfreiche Diskussionen Impulse und stete Unterstützung.

Frau Dr. Arcangela Iuso möchte ich herzlich für die Einarbeitung in zahlreiche der benötigten Methoden und ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft und ihr stets offenes Ohr danken. So haben ihre aufmunternden Worte wesentlich mit zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Tobias Haack danken, der stets ein guter Zuhörer und Diskussionspartner war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Einarbeitung in die Zellkulturarbeiten, ihre stete Hilfe und die gute Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich herzlich bei Frau Birgit Haberberger bedanken.

Anne Löschner und Rosi Hellinger möchte ich für sämtliche für die Arbeit benötigten Sequenzierungen danken. Ebenso möchte ich allen denjenigen danken, die durch ihre Arbeit am Atmungskettenkomplex I-Screen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Marieta Borzes möchte ich für die Hilfe bei der Zellkulturarbeit und vor allem den Wachstumskurven danken.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und der benachbarten Arbeitsgruppen für das angenehme Arbeiten und die gute und kollegiale Atmosphäre im Institut für Humangenetik.

9 Publikationsliste

Haack TB, Madignier F, Herzer M, Lamantea E, Danhauser K, Invernizzi F, Koch J, Freitag M, Drost R, Hillier I, Haberberger B, Mayr JA, Athing U, Tiranti V, Rötig A, Iuso A, Horvath R, Tesarova M, Baric I, Uziel G, Rolinski B, Sperl W, Meitinger TH, Zeviani M, Freisinger P, Prokisch H. *Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9*. J Med Genet. 2012 Feb;49(2):83-9.[#]

Van den Bosch BJ, Gerards M, Sluiter W, Stegmann APA, Jongen ELC, Hellebrekers DMEI, Oegema R, Lambrichs EH, Prokisch H, Danhauser K, Schoonderwoerd K, de Coo IF, Smeets HJ. *Defective NDUFA9 as a novel cause of neonatally fatal complex I disease*. J Med Genet. 2012 Jan;49(1):10.

Danhauser K, Iuso A, Haack TB, Freisinger P, Brockmann K, Mayr JA, Meitinger TH, Prokisch H. *Cellular rescue-assay aids verification of causative DNA-variants in mitochondrial complex I deficiency*. Mol Genet Metab. 2011 Jun;103(2):161-6.[#]

Gerards M, van den Bosch BJ, Danhauser K, Serre V, van Weeghel M, Wanders RJ, Nicolaes GA, Sluiter W, Schoonderwoerd K, Scholte HR, Prokisch H, Rötig A, de Coo IF, Smeets HJ. *Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene*. Brain. 2011 Jan;134(Pt 1):210-9.[#]

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 HW, Wittig I, Meitinger TH, Zeviani M, Prokisch H. *Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency*. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1131-4.[#]

[#]Teile der Arbeit wurden in diesen Originalarbeiten veröffentlicht