

Analyse des gewebsspezifischen Pathomechanismus  
der A3302G-Mutation der mitochondrialen  
tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> in einem  
Rhabdomyosarkom-Zybridmodell

**Inaugural-Dissertation**  
zur  
**Erlangung des Doktorgrades**  
**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**  
**der Universität zu Köln**

vorgelegt von  
**Sabrina Eckertz**  
aus Köln

Köln 2009

1. Betreuer: Prof. Dr. Rudolf J. Wiesner

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2009

Für meine Eltern



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Summary</b>	<b>2</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Mitochondrien</b>	<b>3</b>
3.1.1 Bau und Struktur der Mitochondrien	3
3.1.2 Funktion der Mitochondrien	5
3.1.3 Die mitochondriale Atmungskette	6
<b>3.2 Humane mitochondriale DNA</b>	<b>9</b>
3.2.1 Replikation	12
3.2.2 Transkription	13
3.2.3 Translation	15
<b>3.3 tRNA</b>	<b>17</b>
3.3.1 Allgemeine Struktur der tRNA	17
3.3.2 Struktur mitochondrialer tRNAs	18
<b>3.4 Prozessierung und Modifizierung der mtRNAs</b>	<b>21</b>
3.4.1 Prozessierung der primären Transkripte	21
3.4.2 Aminoacylierung	25

---

<b>3.5</b>	<b>Mitochondriale Erkrankungen (Mitochondriopathien)</b>	<b>26</b>
3.5.2	Prävalenz und Pathophänotyp mitochondrialer Erkrankungen	28
3.5.3	Heteroplasmie und Schwellenwert	30
3.5.4	Mutation der tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	32
3.5.5	A3302G-Mutation der mt-tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> /klinische Deskription der Fälle	34
3.5.6	Das Zybridmodell	35
<b>4</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Material</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>40</b>
5.1.1	Chemikalien	40
5.1.2	Lösungen	42
5.1.3	Zellkulturmaterialien	45
5.1.4	Geräte	46
<b>5.2</b>	<b>Material für molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>47</b>
5.2.1	Kits	47
5.2.2	Enzyme und Marker	47
5.2.3	Nukleotide und Oligonukleotide	48
5.2.4	Radiochemikalien	48
5.2.5	Antikörper	49
<b>5.3</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Methoden</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>51</b>
6.1.1	Kultivierung von Zellen	51
6.1.2	Einfrieren, Auftauen und Passagieren von Zellen	51
6.1.3	Zellzählung	52
6.1.4	Nachweis des 143B-Längenpolymorphismus	52
6.1.5	Mycoplasmen-Kontamination	52

---

<b>6.2</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>53</b>
6.2.1	RNA-Extraktion	53
6.2.2	RNA aus Gewebe	54
6.2.3	DNA-Extraktion	54
6.2.4	PCR	55
6.2.5	Agarose Gelelektrophorese	56
6.2.6	RFLP-Analyse	56
6.2.7	DNA-PAGE	57
6.2.8	Sybrgreen Färbung	58
6.2.9	Szintillations-Zählung	58
6.2.10	Photometrie von Nukleinsäuren	58
6.2.11	Northern Blot	58
6.2.12	Saure denaturierende PAGE	59
6.2.13	Native PAGE	60
6.2.14	Random primed Labeling (RPL) der PCR-Sonden	61
6.2.15	Hybridisierung	61
6.2.16	RNase-Protection Assay	61
6.2.17	Real time qPCR	64
6.2.18	Autoradiographie	65
<b>6.3</b>	<b>Proteine</b>	<b>65</b>
6.3.1	Protein-Extraktion	65
6.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	66
6.3.3	Immunoblotting	66
6.3.4	Blot-Stripping	67
6.3.5	Tricin-SDS-PAGE	67
<b>6.4</b>	<b>Biochemische und physiologische Messungen</b>	<b>68</b>
6.4.1	Wachstum	68
6.4.2	Laktat-Messung	68
6.4.3	Adeninnukleotid-Bestimmung	69
6.4.4	RNA-Prozessierungs-Assay	69
6.4.5	Polarographie	71
6.4.6	Spektrophotometrie	74

---

<b>6.5</b>	<b>Mitochondrien-Extraktion</b>	<b>76</b>
6.5.1	Herstellung von Lysaten aus Gewebe	76
6.5.2	Mitochondrien-Extraktion	76
<b>6.6</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>77</b>
<b>6.7</b>	<b>Software</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>78</b>
<b>7.1</b>	<b>Genetische Charakterisierung der Zybridzelllinien</b>	<b>78</b>
7.1.1	Diagnostischer Restriktionsverdau	78
7.1.2	Bestimmung des Heteroplasmiegrades der RD3302-Zybride	80
7.1.3	Nachweis des Rhabdomyosarkom-Hintergrundes in mutierten RD-Zybriden	81
<b>7.2</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der RD3302-Zellen</b>	<b>82</b>
7.2.1	Wachstum	82
7.2.2	Laktatmessung	84
7.2.3	Energiestatus der Zybridzellen	85
7.2.4	Polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs	89
7.2.5	Spektrophotometrische Messung der Enzym-Aktivität	91
7.2.6	Steady state-Gehalt von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe	93
7.2.7	Akkumulation der tRNA-Vorstufe RNA19	95
7.2.8	Untersuchung der Aminoacylierung von tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	97
<b>7.3</b>	<b>Auswirkung der 3302-Mutation auf die tRNA-Prozessierung <i>in vitro</i></b>	<b>99</b>
7.3.1	RNase P-Assay	99
7.3.2	RNase Protection-Assay (RPA)	101
<b>7.4</b>	<b>Differenzierung der RD-Zybride</b>	<b>103</b>

---

<b>8 Diskussion</b>	<b>106</b>
8.1 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	106
8.2 Mitochondriale Myopathie	107
8.3 Deskription der klinisch bekannten Fälle mit A3302G-Mutation	108
8.4 Hypothese des gewebsspezifischen Pathomechanismus	110
8.5 Die Transkriptionsvorstufe RNA19	112
8.6 Das Zybridmodell	113
8.6.1 Differenzierung von Muskelzellen	114
8.7 Vergleich der Ergebnisse von RD- und 143B-Zybriden	115
8.7.1 Sauerstoffverbrauch	116
8.7.2 LaktatAkkumulation	116
8.7.3 Energiehaushalt der Zelle	117
8.7.4 Akkumulation der Transkriptionsvorstufe RNA19	118
8.7.5 Aminoacylierung der tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	119
8.7.6 Protein steady state-Gehalt	119
8.8 Möglicher Mechanismus der A3302G-Mutation	121
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>Danksagung</b>	<b>137</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Grundstruktur und Netzwerk von Mitochondrien	4
Abb. 2	Schema der mitochondrialen Atmungskette.	6
Abb. 3	Eigenschaften des mitochondrialen Nucleoids	10
Abb. 4	Schema der mitochondriale DNA	11
Abb. 5	Mitochondriale Abweichungen vom universellen Code nukleärer DNA.	16
Abb. 6	Sekundär- und Tertiärstruktur eines tRNA-Moleküls.	18
Abb. 7	Strukturbezogene Prävalenz von pathogenen Basenaustausche bzw. - deletionen im tRNA-Molekül.	19
Abb. 8	Häufigkeitsverteilung mitochondrialer tRNA-Mutationen.	20
Abb. 9	Prozessierung primärer Transkripte.	21
Abb. 10	Lokalisation unterschiedlicher Basenmodifikationen in der tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> .	24
Abb. 11	Veranschaulichung der Heteroplasmie.	31
Abb. 12	Mutationen der tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> und ihre Phänotypen.	33
Abb. 13	Gewebsspezifische Prozessierung von RNA19	35
Abb. 14	Schema der Zybridherstellung.	37
Abb. 15	Schema des diagnostischen Restiktionsverdaus.	79
Abb. 16	Elektrophoretische Auftrennung der Restiktionsfragmente.	80
Abb. 17	Sequenzierung des tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> –Gens aus RD3302-Zellen.	81
Abb. 18	Genetische Charakterisierung der nukleären Zellhintergrunds.	82
Abb. 19	Messung des Wachstums der RDWT und RD3302 über einen Zeitraum von 160 Stunden.	83
Abb. 20	Morphologische Veränderungen der RD3302-Zellen.	84
Abb. 21	Laktat-Akkumulation im Zellkulturmedium der RD-Zelllinien nach 24 Stunden Inkubation.	85
Abb. 22	Diagramm zur Darstellung des Nukleotidsgehaltes in RD-Zellen.	86

---

Abb. 23	Energiegehalt der RD-Zellen.	87
Abb. 24	Graphische Darstellung des Sauerstoffverbrauchs der RD3302-Zybride im Vergleich zum Wildtyp.	90
Abb. 25	Relative Werte des Sauerstoffverbrauchs.	91
Abb. 26	Spektrophotometrie der RD-Zellen.	92
Abb. 27	Protein-steady state-Gehalt in Zybridzellen	94
Abb. 28	A) Northern Blot zur Darstellung der RNA19-Akkumulation in Zybridzellen.	96
Abb. 29	Demonstration der veränderten Laufeigenschaften der A3302G--mutierten tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> .	98
Abb. 30	Kinetik des in vitro-Transkripts der tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> mit Wildtyp-Sequenz, A3302G und A3243G-Mutation.	100
Abb. 31	Rnase Protection Assay.	102
Abb. 32	Western Blot zum Nachweis der Differenzierung von RD-Zybriden.	105
Abb. 33	mt-tRNA-Mutationen mit dem Phänotyp der Mitochondrialen Myopathie	107
Abb. 34	Mögliches Prozessierungsschema in Muskel und Fibroblasten.	110
Abb. 35	Northern Blot Analyse von Prozessierungsvorstufe und -Intermediaten.	111
Abb. 36	Northern Blot-Analyse der Transkriptionsvorstufe RNA19 in normalen humanen Gewebeproben.	112
Abb. 37	Zusammenfassung der aus der in vitro-Analyse der mitochondrialen tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> gewonnen Daten	121

## Abkürzungen und Symbole

aaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ADP	Adenosin-Diphosphat
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
Bq	Bequerel
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
°C	Grad Celsius
CAP	Chloramphenicol
CCCP	Carbamyl-Cyanid-m-Chlorphenylhydrazin
COX	Cytochrom-c-Oxidase
cpm	<i>counts per minute</i> (radioaktive Zerfälle pro Minute)
D	Dehydrouridin
Da	Dalton
dNTP	Desoxynucleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnase	Desoyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double stranded
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FBS	Fötale Rinderserum
FMN	Flavinmononucleotid
fmol	Femtomol
g	Gramm
x g	Zentrifugalbeschleunigung
HSP	Heavy Strand Promotor
H-Strang	"schwerer" Strang
IVT	<i>In vitro</i> Transkript
kb	<i>kilo base pairs</i> (Kilo-Basenpaare)

---

KD	Kilo Dalton (Molekulare Masseinheit)
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	Leber Hereditary Optic Neuropathy
LSP	Light Strand Promoter
L-Strang	"leichter" Strang
MELAS	Mitochondrial Myopathy with Lactic Acidoses and Stroke Like Episodes
MM	Mitochondriale Myopathie
MERRF	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibres
mt	mitochondrial
mtDNA	Mitochondriale DNA
mTERF	Mitochondriale Transkriptionsfaktor
M	Molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
m-RNA	messenger RNA (Boten-RNA)
mt	Mitochondrial
mtDNA	Mitochondriale DNA
mtRNA	Mitochondriale RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NADH	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
Na <sub>2</sub> -EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
NARP	Neuropathy, Ataxia and Retinitis Pigmentosa
Ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
OH	Schwerer-Strang Replikations Ursprung
OL	Leichter-Strang Replikations Ursprung

---

OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEO	Progressive External Ophtalmoplegia
RD	Rhabdomyosarkomzelllinie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunden
ss	single stranded
SSC	Sodium Chloride – sodium citrate
T	Ribothymidin
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>Unit(s)</i> (Enzym-Einheiten)
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/o	without (ohne)
WT	Wildtyp
w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)
ψ	Pseudouridin
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional

# 1 Zusammenfassung

Mitochondrien nehmen eine zentrale Position im Energiestoffwechsel der Zelle ein, sind aber auch essentiell für weitere Stoffwechselforgänge, den Kalziumhaushalt und die Exekution der Apoptose. Störungen der Atmungskette werden als Mitochondriopathien bezeichnet und äußern sich in einem breiten Spektrum klinischer Phänotypen. Aufgrund der Schlüsselstellung im aeroben Stoffwechsel führen sie zu klinischen Mischbildern, bei dem meist Gewebe mit hohem Energiebedarf, wie Gehirn, Muskel, endokrine Organe und Sinnesorgane betroffen sind.

Verschiedene Faktoren tragen zu der heterogenen Erscheinung mitochondrialer Erkrankungen bei, so die hohe Kopienzahl des Organell-eigenen Genoms. Das kann zum Zustand der Heteroplasmie führen, bei der mutierte mit WT-mtDNA-Molekülen koexistieren und es erst nach Überschreiten eines Schwellenwertes zu einem Defekt kommt. Manche mitochondriale Mutationen zeigen außerdem eine Zellspezifität, die durch eine Modulation des pathologischen Effekts durch den jeweiligen nukleären Hintergrund erklärt wird.

Dies ist auch der Fall bei einer Patientin mit einer Mutation an Position nt3302 der mitochondrialen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (MTTL1), bei der der Defekt exklusiv auf den Skelettmuskel beschränkt war. In einer Muskelbiopsie wurden Besonderheiten in der Prozessierung eines primären, polyzistronischen Transkripts (RNA19), das 16S-rRNA, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und ND1-mRNA enthält, als Ursache für die Gewebespezifität angenommen. Dabei soll im Muskel in der Restriktionsabfolge der erste Schnitt am 5'-Ende durch das Enzym RNase P, in Fibroblasten jedoch am 3'-Ende durch die Endonuklease RNase Z erfolgen. Daraus resultierte die Annahme, dass diese gewebsspezifischen Unterschiede zu einer Potenzierung des pathologischen Effekts der nahe am 3'-Ende lokalisierten A3302G-Mutation führen.

Zur eingehenden Analyse des muskelspezifischen Pathomechanismus wurde eine transmitochondriale Rhabdomyosarkom-Zybridzelllinie mit muskel-ähnlichen Eigenschaften verwendet, die die Mutation homoplasmatisch enthielt. Die Charakterisierung der Zelllinie zeigte, dass die Zelllinie zwar einen Atmungsketten-Defekt, jedoch in stark abgeschwächter Form aufwies. Als Grund hierfür werden die metabolischen Anpassungen im Zuge der Tumorentwicklung bei den Rhabdomyosarkomzellen angenommen. Eine Differenzierung der Zellen mit dem Ziel der Annäherung an die in vivo Situation im postmitotischen Muskel der Patientin konnte nicht erreicht werden. Jedoch zeigt die Mutation in 143B-Osteosarkomzybriden einen deutlicheren Phänotyp als in den Rhabdomyosarkomzellen.

Die Mutation führt durch eine Summe verschiedener Störungen im Prozessierungsablauf und die dadurch geringere Bereitstellung der in der RNA19 enthaltenen Transkripte zu einer tiefen energetischen Krise in postmitotisch differenzierten Skelettmuskel, die unter Zellkulturbedingungen so nicht zum Ausdruck kommt. Jedoch spielt auch hier der nukleäre Hintergrund eine Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps.

## 2 Summary

Mitochondria play a central part in cellular energy metabolism as well as in other metabolic pathways,  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis and apoptosis. Defects of the respiratory chain are termed mitochondriopathies and show an expanded spectrum of diverse clinical phenotypes. Because of their key role in aerobic energy metabolism, they cause a set of clinical symptoms mostly affecting tissues with high energy demand like brain, muscle, endocrine and sensory organs.

Different factors account for the heterogeneous appearance of mitochondrial diseases such as the high copy number of the separate genome owned by the organelle. This can lead to heteroplasmy, a state where mutant and wild type DNA molecules coexist in the cell. Thus, a severe defect is only observed when the number of mutated molecules passes a certain threshold. Furthermore, some mitochondrial mutations show a particular cell specificity, which is explained by modulation of the pathological effect in a discrete nuclear background.

This is the case in a patient exhibiting a mutation in position nt3302 of the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (MTTL1) showing a defect exclusively limited to skeletal muscle. Certain features concerning processing of a polycistronic primary transcript (RNA19), which contains 16S-rRNA, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> and ND1-mRNA, are assumed to be the cause of the striking tissue specificity. A specific restriction order was postulated with the first cut being placed at the 5'-end by the endonuclease RNase P and subsequently RNase Z processing at the 3'-end. This raised the idea of tissue specific differences potentiating the pathological effect of the mutation located close to the 3'-end.

For in depth-analysis of the muscle specific pathomechanism, a transmittochondrial rhabdomyosarcoma tumor cell line resembling characteristic features of muscle was employed containing the mutation in homoplasmic state. Characterization of the cell line indeed revealed a respiratory chain defect, but to a much weaker extent as seen in the patient. Metabolic adaptations due to tumor development may be the cause for this weaker phenotype. Differentiation of cells to postmitotic muscle cells with the aim of approaching the in vivo situation in the patient could not be achieved. However, in 143B osteosarcoma cybrids the mutation showed a more drastic pathophenotype as in rhabdomyosarcoma cells.

The mutation leads to an energetic crisis in postmitotic differentiated skeletal muscle by a sum of different features interfering with the posttranscriptional maturation process, thereby reducing the supply of mature transcripts contained in RNA19, but not to that extent under cell culture conditions. However, also here the nuclear background plays a crucial role in the phenotypic expression of the defect.

## 3 Einleitung

### 3.1 Mitochondrien

#### 3.1.1 Bau und Struktur der Mitochondrien

Mitochondrien sind in nahezu allen eukaryotischen Zellen vorhanden und wurden lange Zeit als Bakterienzellen "verkannt", bis 1981 Lynn Margulis (Margulis L, 1981) die Theorie postulierte, dass Mitochondrien aus der Endosymbiose eines aeroben  $\alpha$ -Proteobakteriums mit einer protoeukaryotischen Zelle hervorgegangen sind (Gray et al., 1999). Die typische Doppelmembran, die eigenständige Erbsubstanz, auch zu Beginn als 47. Chromosom bezeichnet (Nass, 1968), und der spezielle Proteinsyntheseapparat der Mitochondrien bestätigen als evolutive Überbleibsel diese Theorie.

Mitochondrien sind keine statischen Strukturen, sondern hoch dynamische Organellen deren Morphologie, Verteilung und Aktivität von Fusions- und Teilungsvorgänge reguliert wird (Chan, 2006). Sie nehmen eine Vielzahl von Formen an, die zwischen langen verbundenen Gefäßen und individuellen ovalen Organellen variiert (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). So bilden sie ein komplexes dynamisches Netzwerk im Zytoplasma der Zelle aus, das mit dem Zytoskelett assoziiert (Yaffe, 1999, Hermann and Shaw, 1998) (siehe Abb. 1 B), welches für Verteilung und Bewegung der Mitochondrien innerhalb der Zelle zuständig, jedoch nicht an der Formgebung der Organellen beteiligt ist (Mattenberger et al., 2003). Der Fusionsvorgang lässt dabei nicht nur eine Interaktion durch den Austausch von Metaboliten, Proteinen und gelösten Stoffen der Mitochondrien zu, sondern ermöglicht es auch dysfunktionale Organellen aufgrund eines erniedrigten Membranpotentials selektiv auszusortieren und diese dem Abbau durch Autophagie zuzuführen. Dabei spielt das Membranpotential eine entscheidende regulatorische Rolle (Twig et al., 2008).

Die Anzahl der Mitochondrien, die man innerhalb dieses Netzwerkes definieren kann, variiert stark und hängt vom Zelltyp sowie dessen Energiebedarf ab. Leberzellen besitzen ca. 1.000-2.000 Organellen (Alberts et al. 1994), Hautzellen hingegen nur ca. ein Dutzend. Die höchste Mitochondriendichte mit bis zu mehreren Tausend Organellen ist in Muskelgewebe zu finden.

Die humane mtDNA ist 16.569 bp lang und liegt in Form von bis zu 10 identischen zirkulären DNA-Molekülen in der Matrix vor (Veltri et al., 1990) (siehe Abb. 4). Sie codiert die 37 Gene zur Synthese einzelner Komponenten des eigenen Proteinsyntheseapparates, womit nur etwa 2 % der insgesamt 1.500 Gene, die für die Funktionsfähigkeit eines Mitochondriums benötigt werden, mitochondrial codiert sind (Lopez et al., 2000).

Der Großteil der Proteine wird durch nukleäre DNA codiert und zeugt von der Entwicklung von einem autonomen Bakterium zu einem integrierten Zellorganell, in dessen Verlauf ursprünglich prokaryotischer Gene in den Zellkern transferiert wurden (Gray et al., 1999). Ein möglicher Grund, warum dieser Transfer nicht gänzlich vollzogen wurde, ist die Hydrophobizität der mitochondrial codierten Untereinheiten, die einen Transfer der zytosolisch synthetisierten Proteine über die Organellenmembran damit extrem erschweren würden (von Heijne, 1986). Ein weiterer Grund können Unterschiede im Codon-Gebrauch von Mitochondrium und Kern sein, die so eine korrekte Translation außerhalb des Mitochondriums mit einem veränderten Code unmöglich machen.

Auch die genaue Lokalisation in der Zelle ist zelltypspezifisch, wobei die Mitochondrien sich in der Regel am Ort des höchsten Energiebedarfs befinden, wie z.B. in Synapsen an den Dendriten und den Schnürringen bei Nervenzellen oder zwischen den Myofibrillen bzw. unter dem Sarkolemm des Muskels. In Spermien können sie sogar um das Flagellum eines Spermiums positioniert sein (Alberts et al, 1994).

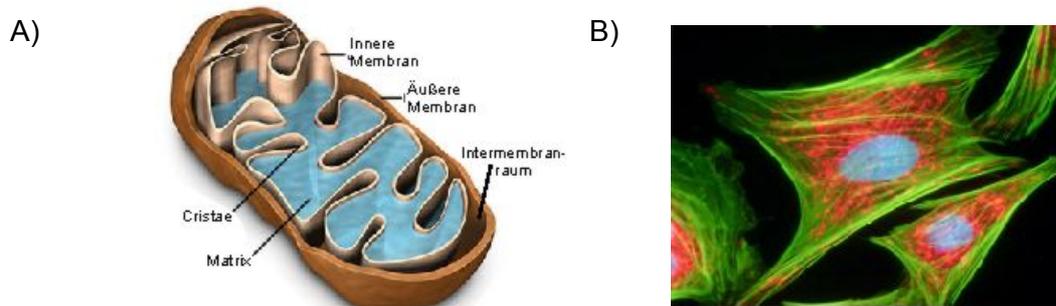


Abb. 1 Grundstruktur und Netzwerk von Mitochondrien

A) Schematische Darstellung der mitochondrialen Grundstruktur mit der durch die Membranen unterteilten Kompartimente.

B) Fluoreszenz-Emission-Mikroskopie der Mitochondrien, die im Gegensatz zu der schematischen Darstellung als dynamisches Netzwerk in der Zelle vorliegen. Dieses unterliegt dabei durchgehend Fusions- und Spaltungsprozessen. Die Struktur des Netzwerks ist mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert. Die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mito Tracker Red rot angefärbt, das Zytoskelett mit Alexa Fluor 488 grün, der Zellkern mit DAPI blau. (Quelle: [www.microscopyu.com](http://www.microscopyu.com))

Strukturell bildet das Mitochondrium fünf verschiedene Kompartimente: die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innere Membran, die durch Einstülpungen letzterer geformten Cristae sowie die Matrix (siehe Abb. 1 A).

Die beiden Membranen unterscheiden sich in ihrer molekularen Zusammensetzung und damit in ihren Eigenschaften. Die äußere Membran ist eine Phospholipid-Doppelschicht durchsetzt von Poren, die durch das Protein Porin gebildet werden und eine Permeabilität für Moleküle mit einer Größe von ca. 5.000-10.000 Da ermöglichen. In der Membran befinden sich außerdem Transportproteine (TOM), Enzyme des Fettsäure- und Tryptophan-Abbaus sowie der Adrenalinoxidation (Walther and Rapaport, 2009).

Die Zusammensetzung der inneren Membran ist extrem proteinreich und besteht zudem aus einem hohen Cardiolipin-Anteil, der zu der Impermeabilität der Membran beiträgt (Chen and Li, 2001). Hier wird durch selektive Transporter der Stoffaustausch kontrolliert und gesteuert. Nicht zuletzt bildet diese selektive Permeabilität die Grundlage für einen der wichtigsten mitochondrialen Prozesse, die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung. Diese basiert auf der Bildung eines elektrochemischen Potentials über die Membran und damit einer protonmotorischen Kraft (PMK), die die Synthese von ATP antreibt.

### 3.1.2 Funktion der Mitochondrien

Zusätzlich zu der Funktion als Energielieferant der Zelle wie Fettsäuremetabolismus und Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung übernehmen Mitochondrien eine Vielzahl weiterer Aufgaben. Sie sind Ort zahlreicher Reaktionswege wie der Phospholipidsynthese, des Aminosäure- und Steroid-Metabolismus. Daneben dienen sie auch als Herstellungsort von Eisen-Schwefel-Clustern (Lill and Kispal, 2000) sowie des Häm-Moleküls und spielen eine Rolle in weiteren wichtigen Vorgängen wie Apoptose (Green and Kroemer, 2004) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (Bianchi et al., 2004; Szabadkai and Rizzuto, 2004). Vermutlich sind sie auch in den Prozess der Alterung (Trifunovic et al., 2004; Fukui and Moraes, 2008) involviert. Die 1950 von Harwell postulierte mitochondriale Theorie des Alterns, die durch den "Teufelskreis" aus mtDNA-Mutationen, Atmungskettendefekten und Sauerstoffradikalen (ROS) zu einer Akkumulation weiterer mtDNA-Mutationen führt (Harwell et al., 1950) (Gruber et al., 2008), wird mittlerweile in Frage gestellt. Vielmehr scheint der Vorgang der klonalen Expansion einiger anfänglich entstandenen mtDNA-Mutationen zu schweren Defekten im Zuge des Alterungsprozesses zu führen, wie sich nach Untersuchung an einzelnen Zellen herausstellte (Khrapko et al., 1999; Bodyak et al., 2001, Wiesner et al., 2006).

### 3.1.3 Die mitochondriale Atmungskette

Die zentrale Rolle der Mitochondrien ist, wie bereits erwähnt, die Energiebereitstellung in Form von ATP zur Aufrechterhaltung grundlegender, wie auch spezifischer Zellfunktionen.

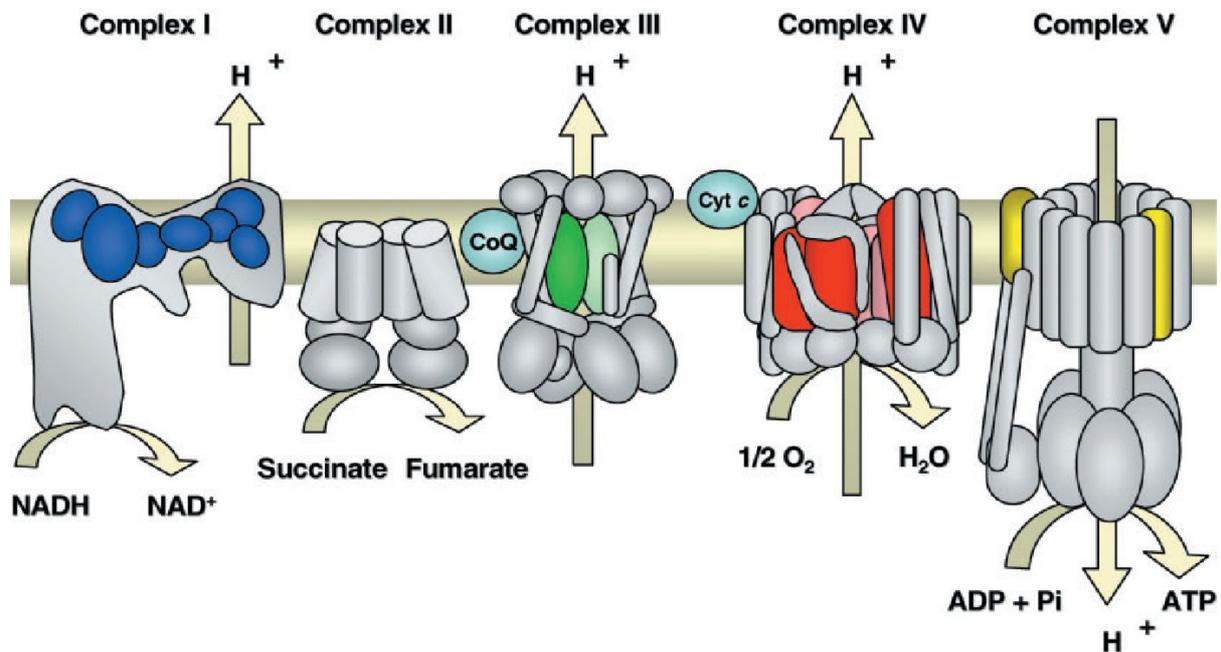


Abb. 2 Schema der mitochondrialen Atmungskette.

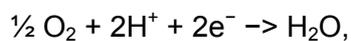
Die Elektronen werden von den Reduktionsäquivalenten NADH auf Komplex I bzw. FADH<sub>2</sub> via Succinatoxidation auf Komplex II übertragen. Diese bewirken schließlich die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser durch Komplex IV. Die Komplexe I, III und IV nutzen die Energie aus dem Elektronentransport zum Aufbau eines Protonengradienten, der durch die ATP-Synthase (Komplex V) zur Katalyse der Bindung anorganischen Phosphats an ADP genutzt wird. (Quelle: Zeviani and Di Donato, 2004)

Zusammen mit kerncodierten Untereinheiten, die nach der Synthese im Zytoplasma in das Mitochondrium importiert werden, bilden die mtDNA codierten Proteinen der Atmungskette die fünf Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran. Diese sind die NADH-Dehydrogenase (Komplex I), die Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II), die Ubichinon:Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III), die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und die ATP-Synthase (Komplex V).

Die oxidative Phosphorylierung ist unter aeroben Bedingungen die effizienteste Form der Energiegewinnung und nutzt die aus der Glykolyse und Citratzyklus bereitgestellten Reduktionsäquivalente zur exergonen Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff. Unter anaeroben Bedingungen oder bei einem Defekt der Atmungskette erfolgt die Energiegewinnung über die Glykolyse, die beim Abbau von einem Molekül Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat einen Nettogewinn von 2 ATP und 2 NADH/H<sup>+</sup> ergibt. Da in diesem Fall die Weiterverbrennung von Pyruvat durch die Atmungskette nicht möglich ist, jedoch die Glykolyse auf NAD<sup>+</sup> zur Oxidation weiterer Glukose angewiesen ist, erfolgt in Säugern die Regeneration des Reduktionsäquivalents durch das Enzym Laktat-Dehydrogenase, das Pyruvat zu Laktat reduziert und dabei NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert.

Unter aeroben Bedingungen werden Pyruvat aus der Glykolyse wie auch Fettsäuren, Glycerin und Aminosäuren zu Acetyl-CoA abgebaut. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA zu CO<sub>2</sub> oxidiert, wobei gleichzeitig NAD<sup>+</sup> und FAD zu NADH und FADH<sub>2</sub> reduziert werden.

Elektronen werden von den Reduktionsäquivalenten NADH auf Komplex I (Janssen et al., 2006) bzw. FADH<sub>2</sub> auf Komplex II (Sun et al., 2005) übertragen, der auch als Succinatdehydrogenase Teil des Citratzyklus ist, und sukzessive über die Komplexe III (Xia et al., 1997) und IV (Taanman, 1997) schließlich, in einem mehrstufigen Prozess gemäß der Knallgas-Reaktion



auf molekularen Sauerstoff übertragen.

Die Übertragung zwischen den einzelnen Komplexen wird durch die Wasserstoff- bzw. Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom c gewährleistet, die in die innere Mitochondrienmembran eingelagert sind. Im Zuge der Elektronenübertragung wird die Energie der stark exergonen Reaktionen in einem stufenweisen Prozess von den Komplexen I, III und IV zum Transport von Protonen entgegen ihres Konzentrationsgefälles von dem Intermembranraum in die Matrix genutzt und so eine Protonenmotorische Kraft (PMK) aufgebaut.

Der Transport eines Protons in die Mitochondrien-Matrix bei einem elektrochemischen Gradienten von 200 mV setzt etwa 19,3 kJ/mol frei (Alberts et al., 1994).

Die komplexe Struktur der ATP-Synthase (Komplex V) ermöglicht es, dessen potentielle Energie durch den Rückstrom durch die innere Mitochondrienmembran über den Protonenkanal der Untereinheit  $F_0$  in einer hochenergetischen Bindung zwischen ADP und anorganischem Phosphat zu ATP zu konservieren. Die Ausnutzung eines chemiosmotischen Gradienten zur Synthese von ATP bezeichnet man als chemiosmotische Kopplung (MITCHELL, 1961).

Ein Nebeneffekt der Elektronen-Transportkette ist die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die zum einen für eine pathologische Schädigung der Mitochondrien verantwortlich sind, zum anderen auch eine Funktion bei der Redox-Signaltransduktion zwischen Organell und Zelle einnehmen (Droge, 2002).

Die ROS-Produktion in Mitochondrien kann zu oxidativen Schäden mitochondrialer Proteine, Membranen und DNA und so zu einem Defekt der ATP-Synthese führen. Darüber hinaus sind auch weitere metabolische Funktionen wie Citratzyklus, Fettsäure-Oxidation, Harnstoff-Zyklus, Aminosäuremetabolismus, Hämsynthese und die Bildung von Eisen-Schwefel-Cluster betroffen. Zusätzlich können oxidative Schäden die Aktivierung von Apoptose auslösen (Richter et al., 1995). Ein zentraler Ort der ROS-Generierung ist der Redoxcarrier Flavinmononukleotid (FMN) im Zentrum von Komplex I, das durch seine zugängliche Position die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff begünstigt und so zur Bildung von  $O_2^-$ -Radikalen führt.

Es werden drei Zustände als ursächlich beschrieben:

1. ein hohes  $NADH/NAD^+$ -Verhältnis, das sich auf das Ausmaß der Reduktion des Flavinmononukleotid (FMN) auswirkt (Kussmaul and Hirst, 2006);
2. hohe Protonenmotorische Kraft (PMK) durch geringe ATP-Synthese und einen reduzierten Ubichinon-Pool, der zu einem Rücktransport von Elektronen über Komplex I auf  $O_2$  führt (Kudin et al., 2004) und
3. liegt unter normalen Bedingungen der NADH-Pool in oxidierterem Zustand vor, führt die aktive ATP-Synthese zu einer niedrigen PMK, so dass weit weniger  $O_2^-$ -Radikale anfallen, deren genaue Quelle dabei unklar ist (Votyakova and Reynolds, 2001). Obwohl ROS überwiegend an Komplex I entsteht, gibt es auch weitere Quellen für die Entstehung von Sauerstoffradikalen, wie z.B. Enzyme die mit dem  $NADH/NAD^+$ -Pool verknüpft sind oder auch Komplex III (Murphy, 2009).

Mitochondrien haben verschiedene Schutz-Reaktionen entwickelt, um auf die Gefahr durch Sauerstoffradikale zu reagieren. So wird das Superoxidanion durch die Mangan-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD) zu  $H_2O_2$  reduziert, welches durch die Gluthation-Peroxidase schließlich in  $H_2O$  umgewandelt wird (Fridovich, 1978).

### 3.2 Humane mitochondriale DNA

Die mitochondriale DNA erinnert in vielen Punkten an ihren bakteriellen Ursprung. Das zirkuläre mtDNA-Molekül ist 16569 bp groß und umfasst 37 Gene. Die mtDNA ist, im Gegensatz zur nukleären DNA, nicht mit Histonen komplexiert (Alberts et al., 1994), jedoch sind durchschnittlich 1-10 mtDNA-Moleküle (Iborra et al., 2004), assoziiert mit einer Anzahl anderer Proteine und Faktoren, in Nukleoide genannte Strukturen gefasst. Bei den Komponenten handelt es sich um TFAM (das sowohl Transkriptionsfaktor als auch DNA-Verpackungsproteins ist), das mitochondriale Einzelstrangbindende Protein mtSSB und metabolische Proteine wie DNA-Polymerase  $\gamma$ , mtRNA-Polymerase und mt-Helikase Twinkle (Chen and Butow, 2005; Chen et al., 2005; Wang and Bogenhagen, 2006).

Die schichtenartige Struktur aus zentralen, an die mtDNA geknüpften Faktoren für Replikation und Transkription zusammen mit in einer peripheren Zone angeordneten Moleküle für u.a. RNA-Prozessierung, Translation und der Zusammenbau der Atmungskettenkomplexe, ist in Abb. 3 A dargestellt (Bogenhagen et al., 2008). Nukleoide sind zudem, wie die mitochondrialen Ribosomen auch, mit der inneren Mitochondrienmembran verbunden, weshalb die Annahme besteht, dass Nukleoide ein allgemeines Zentrum der mitochondrialen Biogenese darstellen (Capaldi et al., 2002). Zusammen mit der membrannahen Translation mitochondrialer Proteine an zytoplasmatischen Ribosomen, die in direkter Folge durch Kanäle in unmittelbarer Nähe zu den Nukleoiden in das Organell importiert werden, könnte dies eine Möglichkeit zur Koordination der Komplexbildung darstellen (Iborra et al., 2004). Die Organisation der mtDNA in Nukleoidstruktur hat auch Einfluss auf die Verteilung heteroplasmatischer DNA-Varianten.

Der mtDNA-Gehalt der Nucleoide ist strikt reguliert und ihre DNA-Komposition ist konstant. So findet nahezu kein Austausch von DNA zwischen verschiedenen Nucleoiden statt. Die Annahme der "stabilen Nucleoide" wurde durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)-Experimente bewiesen und ist in Abb. 3 B dargestellt (Gilkerson et al., 2008). Dieses Modell erklärt sowohl konstante Heteroplasmiegrade über mehrere Zellteilungen als auch deren schnelle Verschiebung in Richtung Homoplasmie.

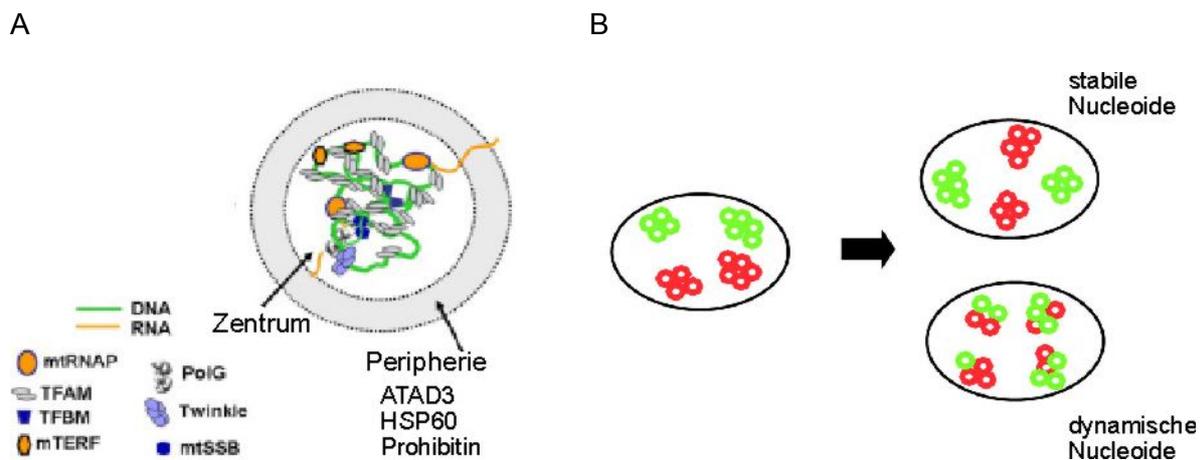


Abb. 3 Eigenschaften des mitochondrialen Nucleoids

A) Schichtenartiger Aufbau eines mitochondrialen Nucleoids. Im Zentrum befinden sich wichtige Proteine für Struktur und Nucleotidmetabolismus der mtDNA, in der Peripherie sind weitere Proteine assoziiert, die eine Verknüpfung des Nucleoids mit den metabolischen Anforderungen des Mitochondriums herstellen (Quelle: Bogenhagen, Rousseau, Burke, 2008).

B) Modelle der Segregation der mtDNA in Nucleoidstrukturen. Im Falle der dynamischen Nucleoide erfolgt ein Austausch von mtDNA-Molekülen zwischen Nucleoiden im Gegensatz zu dem Fall der stabilen Nucleoide, die eine konstante mtDNA-Population aufweisen. Durch FISH-Experimente wurde nachgewiesen, dass Nucleoide überwiegend in der stabilen Form vorliegen und ein Austausch von mtDNA nur minimal erfolgt (Quelle: Gilkerson et al., 2008).

Die humane mitochondriale DNA ist genetisch kompakt und besitzt keine Introns, nur wenige redundante Sequenzen und drei nicht codierende Regionen (Anderson et al., 1981). Die einzelnen Gene für die 2 rRNAs und 13 mRNAs werden durch die 22 tRNA-Gene separiert, die dazu gleichmäßig im Genom verteilt sind (*punctuation model*; Ojala et al., 1981) (siehe Abb. 4). Sie nehmen eine besondere Funktion bei der Prozessierung polyzistronischer Transkriptions-Vorstufen ein.

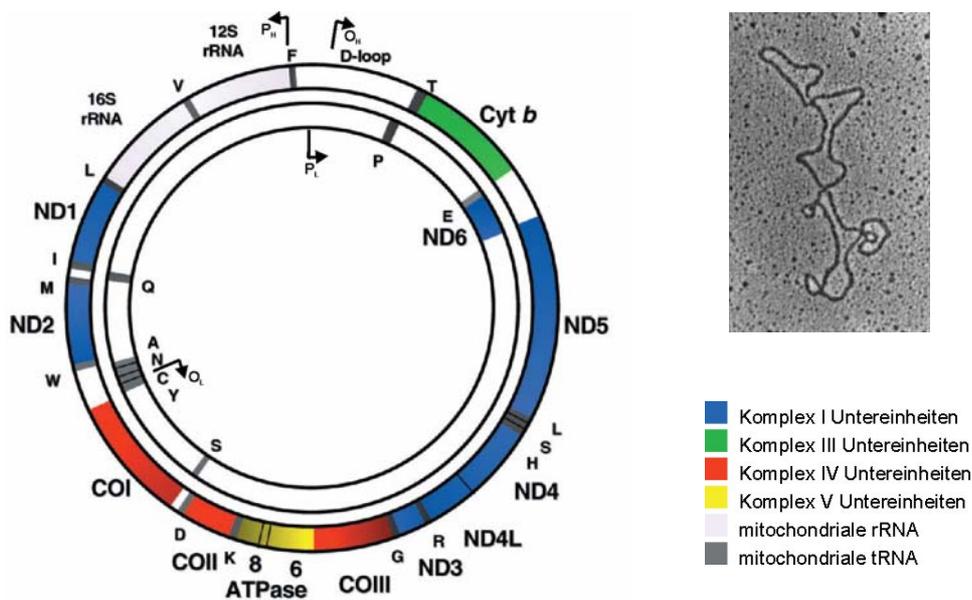


Abb. 4 Schema der mitochondriale DNA

Die humane mitochondriale DNA besteht aus einem 16 kb großen zirkulären DNA-Molekül. Der äußere Strang codiert 28 Gene und wird durch seinen hohen Guanin-Gehalt als *heavy strand* (H-Strang) bezeichnet. Der innere *light strand* (L-Strang), trägt hingegen die Information für 8 mitochondriale tRNAs und die Komplex I-Untereinheit ND6. Die mtDNA trägt neben den Strukturgenen für einzelne Untereinheiten von Komplex I (blau), Komplex III (grün), Komplex IV (rot), auch die Gene für die beiden 16S- und 12S- rRNA (hellgrau) sowie für 22 mitochondrialen tRNAs (dunkelgrau). Die Replikationsursprünge  $O_H$  und  $O_L$  des H- bzw. L-Stranges sowie die entsprechenden Promoter,  $P_H$  und  $P_L$ , sind eingezeichnet. (Quelle: verändert nach Zeviani and Di Donato, 2004)

Die Strukturgene codieren für einige Untereinheiten der einzelnen Komplexe mit Ausnahme von Komplex II, der vollständig kerncodiert ist. Diese sind die Untereinheiten ND1-6 und ND4L der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Cytochrom-b, Bestandteil der Ubichinon: Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III), die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und die Untereinheiten 6 und 8 der ATP-Synthase (Komplex V).

Die Information für den Großteil der Untereinheiten der Komplexe ist im Kern gespeichert, da es im Laufe des Evolutionsprozesses zu einem Transfer und Integration mitochondrialer Gene in das nukleäre Genom gekommen ist (Anderson et al., 1981), was zu einer starken Verkleinerung des mitochondrialen Genoms geführt hat

Die Vererbung der mitochondrialen Genome erfolgt in der Regel ausschließlich maternal, da die weibliche Eizelle, verglichen zu einer Spermienzelle, einen 10.000-fachen Überschuss an Mitochondrien besitzt und paternale Mitochondrien nach der Fertilisation durch Ubiquitin-Markierung selektiv eliminiert werden (Kaneda et al., 1995; Sutovsky et al., 1999). Ein einzigartiger Fall von paternalem mtDNA-Transfer wurde bei einem Jungen mit einer Mutation des ND2-Gens entdeckt (Schwartz and Vissing, 2002), die Inzidenz einer solchen paternalen Vererbung beim Menschen konnte jedoch bisher nicht spezifiziert werden (Schwartz and Vissing, 2003).

Der einzige weitere dokumentierte Fall einer paternalen Vererbung in Säugern stammt aus einer Rückkreuzungsstudie zweier Mausstämme, bei der die Häufigkeit auf 1:10.000 beziffert wurde (Gyllensten et al., 1991). Jedoch konnten diese Ergebnisse in einer weiteren Studie nicht wiederholt werden (Shitara et al., 1998).

### 3.2.1 Replikation

Die einzelnen mtDNA-Moleküle eines Mitochondriums replizieren unabhängig voneinander und sind nicht, wie die nukleäre DNA, strikt zellzyklusspezifisch reguliert. Weder eine genaue Anzahl der Teilungen, noch die Garantie, dass tatsächlich jedes mtDNA-Molekül pro Zellzyklus eine Verdopplung durchläuft, ist festgelegt. Es besteht ein kontinuierliches Gleichgewicht zwischen Replikation und Degradierung, wobei dieser *turnover*, genau wie die Replikation und Verteilung im Rahmen einer Zellteilung, zufällig stattfindet und zu zufälligen Weitergabe (*random segregation*) verschiedener mtDNA-Moleküle (Clayton, 1982) führt. Dieser Prozess findet auch in ausdifferenzierten, postmitotischen Zellen statt (Bogehagen and Clayton, 1977).

Nach neueren Erkenntnissen kann die Replikation nach zwei unterschiedlichen Mechanismen ablaufen. Die zuerst postulierte unidirektionale und partiell asymmetrische Synthese, kann nun durch das alternative Modell einer diskontinuierlichen symmetrischen DNA-Synthese, die an den beiden komplementären Stränge gekoppelt abläuft, ergänzt werden. Nach dem asymmetrischen Modell erfolgt die Leitstrang-Synthese durch Initiation an dem Ursprung  $O_H$ , verläuft über Ausbildung einer Replikationsblase, bis nach 2/3 der Strecke der Ursprung  $O_L$  für den Start der Folgestrang-Synthese zugänglich wird (Clayton, 1982).

Das zweite Modell beschreibt eine gleichzeitig an beiden parentalen Strängen ablaufenden DNA-Synthese, ausgehend von einer breiten Zone von Replikationsorten im D-loop, die in beide Richtungen abläuft (Holt et al., 2000; Yang et al., 2002). Dieser Lokus könnte hauptsächlich für mtDNA-Erhalt unter *steady state*-Bedingungen verantwortlich sein. Die mtDNA-Synthese, ausgehend von den zuvor identifizierten Ursprüngen  $O_H$  und  $O_L$ , läuft vermutlich für die Erholung nach Depletion oder Erhöhung der Replikationsgeschwindigkeit bei veränderten Stoffwechselbedingungen ab (Fish et al., 2004).

Die Replikationsmaschinerie umfasst zudem noch die mitochondriale Endonuklease RNase P (MRP) (Chang and Clayton, 1987, Lee and Clayton, 1998), die an der Primer-Bildung beteiligt sein soll sowie die DNA Polymerase  $\gamma$  mit einer Vielzahl weiterer Faktoren, die zu ihrer Funktionalität beitragen, wie z.B: Twinkle, mtSSB, TFAM, Topoisomerase und die mitochondriale DNA Ligase (Fernandez-Silva et al., 2003).

Ein relativ ineffizientes DNA-Reparatursystem, die hohe Replikationsrate, der Angriff von Sauerstoffradikalen und schließlich die hohe Fehlerrate der Polymerase machen das mitochondriale Genom besonders anfällig für Mutationen. Zusätzlich erhöhen der fehlende Histonschutz und ein ineffizienter Fehlererkennungsmechanismus die Verletzlichkeit der mtDNA. Es weist demnach im Vergleich zum nukleären Genom eine ca. 10-fach höhere Mutationsrate auf (Wallace et al., 1998; Croteau et al., 1999, Horai et al., 1991, Pesole et al., 1999).

### 3.2.2 Transkription

Mitochondriale DNA wird im Gegensatz zum nukleären Genom, das von drei Polymerase-Enzymkomplexen transkribiert wird, von einer eigenen RNA-Polymerase umgeschrieben, die aus einer einzigen, 1230 AS großen Untereinheit besteht, und im Kern codiert ist. Sie wird mit einem N-terminalen Zielsignal, das nach dem Import entfernt wird, in die Mitochondrien dirigiert. Startpunkt der RNA-Synthese sind die Promotoren LSP, HSP1 und HSP2, von denen aus die mtDNA in drei unterschiedliche Transkriptionseinheiten umgeschrieben wird. Die Synthese ausgehend von LSP umfasst den gesamten leichten Strang in einer Richtung. Vom Transkriptionsstartpunkt HSP2 ausgehend, erfolgt in entgegengesetzter Richtung die Synthese des kompletten schweren Strangs mit Ausnahme des Gens der tRNA<sup>Phe</sup>, das sich mit der Promotorsequenz überschneidet.

Die Einheit, ausgehend von HSP1, weist als einzige einen klar definierten Terminationspunkt auf (Christianson and Clayton, 1988), der sich am Ende des 16 S rRNA-Gens befindet und von der Bindung des mitochondrialen Transkriptions-Terminationsfaktor mTERF an einer 28 bp lange Region im Gen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> abhängt. So entsteht ein Transkript, das die beiden rRNAs 12 S und 16 S sowie die tRNA<sup>Phe</sup> und tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> umfasst (Montoya et al., 1983).

Dieser Mechanismus dient dazu einen 15 – 60-fachen Überschuss an rRNAs im RNA-Pool zu generieren, der sich primär aus der erhöhten Neusyntheserate, aber auch aus einer höheren Lebensdauer der rRNA-Transkripte zusammensetzt (Gelfand and Attardi, 1981). Der mitochondriale Transkriptionsfaktor mTERF, dessen spezifische Bindungsstelle sich im Gen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> befindet, spielt so eine Rolle in der Terminationskontrolle, scheint zusätzlich aber noch eine koordinative Funktion von Replikation und Transkription zu übernehmen (Hyvarinen et al., 2007).

Die mitochondriale Transkription kann nicht alleine durch die Polymerase  $\gamma$  initiiert werden, sondern bedarf der Unterstützung der Transkriptionsfaktoren TFAM und einer der beiden Paralogen TFB1M oder TFB2M (Falkenberg et al., 2002). TFAM ist dabei essentiell für die Aktivierung und bindet sequenz-spezifisch in exakt definierter Distanz zu den Transkriptions-Startstellen des H- bzw. des L-Stranges (HSP bzw. LSP).

Dort bewirkt die TFAM-Bindung strukturelle Veränderungen und führt somit zur Entwindung der helikalen DNA-Struktur an der Transkriptions-Initiationsstelle (Dairaghi et al., 1995). Die exakte Funktion der beiden Faktoren TFB1M und TFB2M ist bislang noch unbekannt, jedoch deutet die Ähnlichkeit zu einer RNA-Methyltransferase-Familie darauf hin, dass eine Bindungsfähigkeit für RNA als auch Einzelstrang-DNA besteht. So könnte ein neu synthetisierter RNA-Strang gebunden werden und damit eine DNA/RNA-Hybridbildung vermieden werden, die den Transkriptionsvorgang blockieren würde.

Die vorläufigen polyzistronischen Transkripte werden durch endonukleolytische Spaltung in einzelne RNA-Moleküle umgewandelt. Gemäß dem *punctuation model* (Ojala et al., 1981) sind die tRNAs zwischen den einzelnen Genen der mRNAs und rRNAs positioniert und dienen als Restriktionssignale für die 5'- und 3'-prozessierenden Enzyme RNase P und RNase Z.

Erst im Zuge der nachfolgenden Polyadenylierung entstehen bei menschlichen mitochondrialen mRNAs die eigentlichen Stop-Codons, die bei einigen mRNAs fehlen (Ojala et al., 1981). Eine zusätzliche Rolle der Polyadenylierung bei der Stabilität und Translations-effizienz der m-RNA wird kontrovers diskutiert (Tomecki et al., 2004).

### 3.2.3 Translation

Wie bereits in 3.1.1 erwähnt, unterhalten Mitochondrien einen eigenen Proteinsyntheseapparat zur Synthese der 13 mitochondrial codierten Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe. Mit Ausnahme der rRNAs und tRNAs sind wesentliche Bestandteile, wie z.B. ribosomale Proteine, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Initiations-, Elongations-, und Terminationsfaktoren im Kern codiert und müssen in die Mitochondrien importiert werden (Towpik, 2005). Das Mitochondriale Ribosom unterscheidet sich vom zytoplasmatischen Ribosom in seiner Größe, dem Aufbau aus den Prokaryoten-ähnlichen 12 S und 16 S rRNAs, und dem anteilmäßig hohen Proteingehalt (Patel et al., 2001). Trotz Ähnlichkeiten zum prokaryotischen System unterscheiden sich die mitochondrialen Ribosomen durch das Fehlen einer Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz, ebenso wie eines 5'-Methylguanosin-Caps und der 5'-untranslatierten Region der mRNAs.

Die Einzelprozesse der mitochondrialen Translation – Initiation, Elongation und Termination – sind bisher nur ansatzweise erforscht. Einzelne Komponenten wie die Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-Ts und EF-G und der Terminationsfaktor RF1 ähneln den ihnen homologen Faktoren von *E.coli* und auch der Elongationszyklus zeigt eine nahe Verwandtschaft zu dem prokaryotischen System (Rorbach et al., 2007).

Mitochondrien verwenden einen vom universellen nukleären Triplet-Code abweichende genetischen Code (Barrell et al., 1979). So codiert in den Mitochondrien das Basentriplett UGA für die Aminosäure Tryptophan, während es im universellen Code die Aufgabe des Stop-Codons übernimmt. Andererseits sind die Triplets AGA und AGG in den Mitochondrien Stop-Signale, während sie im universellen Code für die Aminosäure Arginin stehen. Auch das Triplett AUA wird abweichend, statt mit Isoleucin mit Methionin übersetzt und dafür AUU und AUC als Isoleucin translatiert (s. Abb. 5).

Codon	Standard-code	Mitochondrialer Code
UGA	Stop	Trp
UGG	Trp	Trp
AUA	Ile	Met
AUG	Met	Met
AGA	Arg	Stop
AGG	Arg	Stop

Abb. 5 Mitochondriale Abweichungen vom universellen Code nukleärer DNA.

Zum Schutz vor Reaktiven Sauerstoffradikalen wird vermehrt Methionin in mitochondrial codierte Proteine eingebaut, das dann, an der Moleküloberfläche positioniert, Oxidationsschäden vermindert.

Um die verbleibenden möglichen 60 Triplets den 20 Aminosäuren zuzuordnen, ist dieselbe Aminosäure durch mehrere Codons verschlüsselt. Deren tRNAs bezeichnet man daher als Isoakzeptoren, den Code als degeneriert. Für die Aminosäure Leucin sind dies  $tRNA^{Leu(CUN)}$  und  $tRNA^{Leu(UUR)}$ , für Serin  $tRNA^{Ser(AGY)}$ ,  $tRNA^{Ser(AGN)}$ . Gleichzeitig können auch verschiedene Basentriplets mit der gleichen tRNA interagieren (Wobble-Hypothese), da die dritte Position des Codons unübliche Basenpaare bildet (Barrell et al., 1980).

Die Translation beginnt mit der Anlagerung der mRNA an die kleine Ribosomen-Untereinheit, anschließend folgt die Assoziation an die große Untereinheit. Innerhalb des Ribosoms befinden sich drei Zentren, die von jeder tRNA der Reihe nach durchlaufen und als A- (Aminoacyl)-, P- (Peptidyl-) und E- (Exit-) Stellen bezeichnet werden.

Die Synthese läuft ab, indem eine aminoacylierte tRNA die A-Stelle besetzt, in der P-Stelle die Aminosäure über eine Peptidbindung an das wachsende Protein knüpft und in der E-Stelle das Ribosom wieder deacyliert verlässt.

Zahlreiche Proteinfaktoren werden bei dem Durchlaufen der drei Phasen der Initiation, Elongation und Termination benötigt, auf die jedoch hier nicht im Detail eingegangen wird.

### 3.3 tRNA

Die tRNA als Werkzeug zur Übersetzung des Codes in die Aminosäuresequenz nimmt eine zentrale Rolle bei der Proteinsynthese ein. Die dreidimensionale Struktur und Faltung ist von essentieller Bedeutung bei der Erkennung durch die jeweilige Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) wie auch bei der Einpassung in die Ribosomenbindestelle.

Der Gebrauch einzelner tRNAs korreliert mit der Größe des tRNA-Pools in den Mitochondrien und resultiert in einem spezifischen Codongebrauch (*codon usage*), der eine große Rolle bei der Regulation der Proteinbiosynthese spielt. Selten verwendete Codons können die Translation bremsen, während häufig genutzte Codons die Translation beschleunigen können.

Zudem sind die 13 mitochondrial codierten Proteine stark hydrophob, so dass sich dieses Ungleichgewicht in einem unterschiedlichen Bedarf an den spezifischen tRNAs auswirkt. So werden die tRNAs z.B. für Serin, Isoleucin, Threonin und Leucin in weitaus höheren Mengen benötigt als andere (z.B. tRNA<sup>Cys</sup>) (Florentz et al., 2003).

Abgesehen von ihrer zentralen Funktion bei der Translation, sind sowohl tRNA als auch aaRSs an weiteren zellulären Prozessen beteiligt. tRNAs sind bei der Expressionsregulation ihrer aaRSs involviert, weitere Funktionen der aaRSs beinhalten u.a. die Regulation ihrer eigenen Expression, tRNA Transport, RNA-Splicing, Aminosäuren-Biosynthese und Apoptose.

#### 3.3.1 Allgemeine Struktur der tRNA

Die Sekundärstruktur einer typischen tRNA beschreibt die Form eines Kleeblatts mit vier Seitenarmen, die jeweils nach ihrer Funktion bzw. Struktur benannt sind (Goldman, 2008). Der Akzeptor-Arm endet mit einer nachträglich am 3'-Ende angehängten CCA-Sequenz, an die schließlich die Aminosäure gebunden wird (siehe Abb. 6).

Der Anticodon-Arm enthält das Nukleotid-Triplett in der Mitte seiner Schleife, die Bezeichnung des T $\psi$ C-Arms bzw. des D-Arms bezieht sich auf die Anwesenheit spezifischer Basenmodifikationen (Dehydrouridin (D), Ribothymidin (T) und Pseudouridin ( $\psi$ )). Zusätzlich werden zahlreiche weitere Basen durch spezifische tRNA-Modifikationsenzyme post-transkriptionell modifiziert (Bjork, 1995; Helm, 2006) (siehe 3.4.1.4). Ein zusätzlicher variabler Arm ist bei einigen tRNAs zwischen dem T- und dem Anticodon-Arm positioniert und variiert stark in seiner Größe.

In der Tertiärstruktur ist die tRNA L-förmig gebogen und bildet zwei Domänen, die überwiegend aus Akzeptor- und Anticodon-Stamm bestehen (Steinberg et al., 1997).

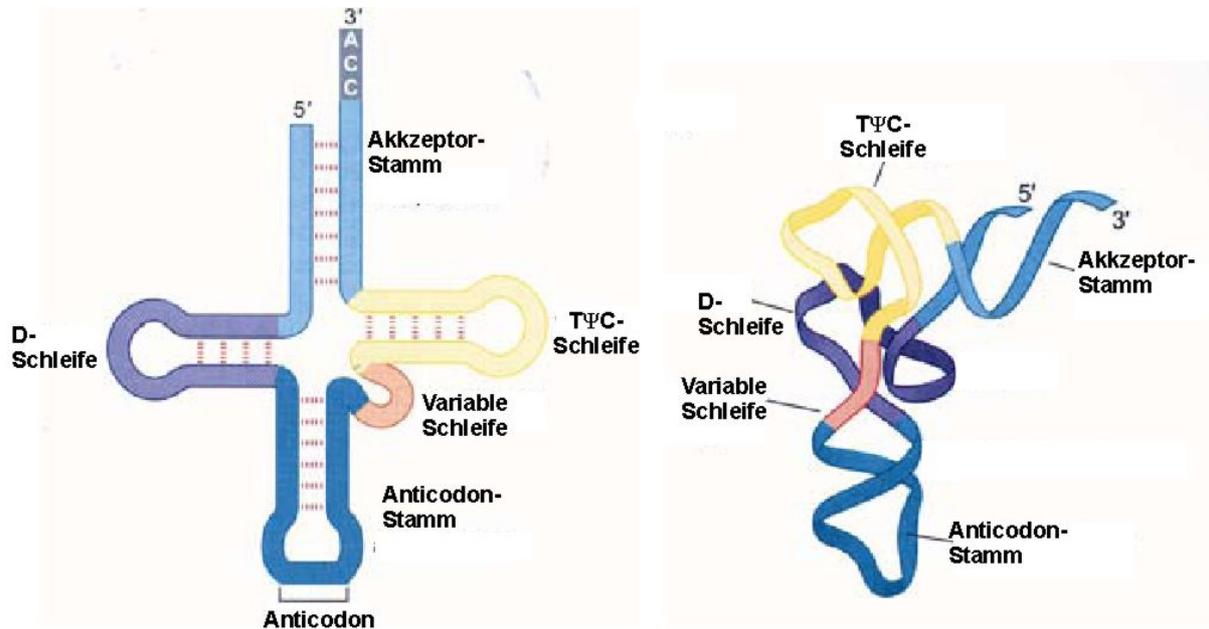


Abb. 6 Sekundär- und Tertiärstruktur eines tRNA-Moleküls.

Die unterschiedlichen Stämme und Schleifen sind farblich gekennzeichnet. Die Sekundärstruktur hat die Form eines Kleeblatts und entsteht durch intramolekulare Basenpaarungen. Die Tertiärstruktur der tRNA entsteht überwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen und bewirkt eine dreidimensionale Faltung in L-Form.

### 3.3.2 Struktur mitochondrialer tRNAs

Die mitochondrialen tRNAs zeigen im Vergleich zu zytoplasmatischen tRNAs einen ungewöhnlich hohen Anteil von Adenosin- und Uridin-Nucleotiden (Mittelwerte 35,9 % A; 28,4 % U; Jones et al., 2006) und sind in ihrer Struktur und Sequenz weit weniger stark konserviert als die tRNA der Prokaryonten und die nuklear codierten tRNA der Eukaryonten. Die Länge der mitochondrialen tRNAs liegt im Bereich von 73 bis 95 Nucleotiden und ist damit kürzer als die ihrer zytoplasmatischen Variante (aus: <http://www.mitomap.org>, 2009).

Die strukturellen Eigenschaften der mt-tRNAs sind von essentieller Wichtigkeit für ihre Funktionalität in verschiedenen Bereichen der mitochondrialen Biogenese.

Dazu gehört die optimale Identifikation und Bindung der entsprechenden aaRS, Interaktion mit Translations-, Initiations- und -Elongationsfaktoren und den Ribosomen und schließlich die Erkennung durch Enzyme wie RNase P, Nucleotidyl-Transferase und post-transkriptionale Modifikationsenzyme, die zu der Reifung der tRNA beitragen.

Die 14 tRNAs, die vom schweren H-Strang der mtDNA transkribiert werden, haben in der Regel einen niedrigen Guanin-Gehalt ("leichte tRNAs"), die 8 tRNAs des leichten L-Stranges weisen entsprechend einen niedrigeren Cytosin-Gehalt auf ("schwere tRNAs") (Anderson et al., 1981). Eine Ausnahme bilden die beiden tRNAs für die Aminosäure Leucin.

Abgesehen von den beiden tRNA für Serin besitzen alle mt-tRNAs die reguläre Kleeblattform, jedoch mit zum Teil starken Abweichungen und Größenvariationen in der D- und T-Domäne. Die Abwesenheit ganzer Struktur-Domänen (tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>) sowie einiger konservierter Sequenz-Modifikationen wie T $\psi$ C ist nicht unüblich. Die leichten tRNAs weisen hingegen zahlreiche Fehlpaarungen auf, im Gegensatz zu den schweren tRNAs, die zahlreiche GT-Paarungen haben. Die Tertiärstruktur der beiden tRNAs für Leucin sowie Glutamin und Asparagin ist stark konserviert und schließt auch Interaktionen der D- und T-Schleifen ein. Somit weisen diese Moleküle eine Form auf, die damit sehr stark der klassischen tRNA-Struktur entspricht.

Zusätzlich haben mitochondriale tRNAs im Vergleich zu ihrem zytoplasmatischen Pendant eine niedrigere thermodynamische Stabilität resultierend aus einem erniedrigten GC-Gehalt in der Stammregion und trunkierten D- und T-Domänen. Diese Instabilität macht tRNAs anfällig für strukturelle Störungen und Deaktivierung durch pathogene Mutationen.

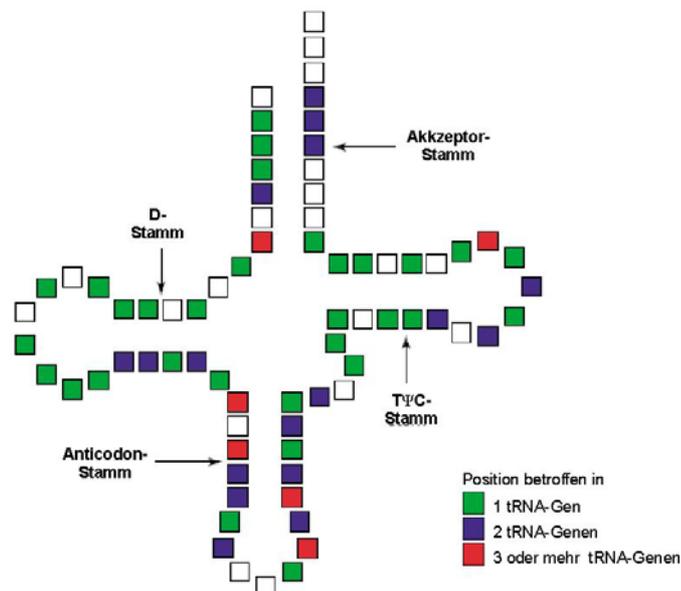


Abb. 7 Strukturbezogene Prävalenz von pathogenen Basenaustausche bzw. -deletionen im tRNA-Molekül.

Die tRNA ist in der kleeblattförmigen Sekundärstruktur dargestellt. Die Anticodon-Region ist nahezu frei von Veränderungen, da Mutationen in diesem Bereich einen gravierenden Effekt auf die Erkennung der passenden Triplettssequenz der mRNA hätte und zu defizienten Proteinen führen würde. Positionen einer Mutation, die nur ein tRNA-Gen betreffen, sind, wie in der Legende angegeben, in grün dargestellt, Positionen, die zwei Gene betreffen in blau. Mutationen, die in drei oder mehr Genen lokalisiert sind, sind rot gekennzeichnet (Quelle: Wittenhagen and Kelley, 2003).

Die Häufigkeitsverteilung der Mutationen in einer humanen mitochondrialen tRNA erstreckt sich über alle Domänen der Kleeblattstruktur (s. Abb. 7). Jedoch sind die Nukleotide des Anticodon, mit nur einer einzigen Mutation (Moraes et al., 1993a), am seltensten betroffen, da diese die Proteinsynthese empfindlich stören würde und somit für die Zelle letal wäre.

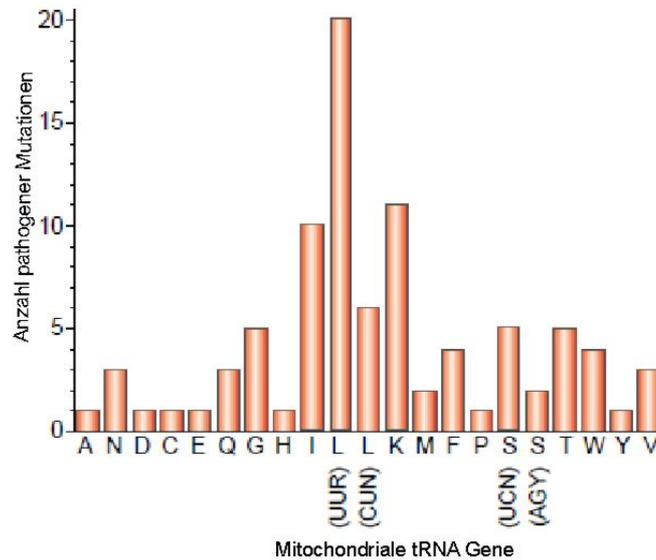


Abb. 8 Häufigkeitsve

Mutationen, die mit einem klinischen Phänotyp assoziiert sind, treten in den verschiedenen Genen der mitochondrialen tRNA in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Die drei Moleküle mit der höchsten Dichte an Mutationen sind tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, tRNA<sup>Ile</sup> und tRNA<sup>Lys</sup> (Quelle: Wittenhagen et al., 2003). (Daten aus: <http://www.mitomap.org>, 2009).

Abb. 8 gibt einen Überblick über die Verteilung der pathogenen Mutationen innerhalb der mitochondrialen tRNA-Gene. Für jedes Molekül ist bereits mindestens eine Mutation verzeichnet worden, drei tRNAs sind jedoch deutlich stärker betroffen als die anderen und konzentrieren 50 % der bekannten pathogenen Mutationen auf sich. Dies sind tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Lys</sup> und tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, wobei letztere im Zusammenhang mit über 20 verschiedenen Mutationen steht und so als Mutations-*hot spot* bezeichnet wird. Eine mögliche Erklärung, warum diese tRNA im Fokus der Mutationen steht, ist ihre der zytoplasmatischen tRNA-Struktur stark ähnelnde Form, die durch die damit verbundenen stärkeren Wechselwirkungen eine gewisse Toleranz gegenüber dem möglicherweise dramatischen Effekt dieser Mutationen aufweist.

Wie bereits beschrieben, besitzen die anderen mitochondrialen tRNAs mit trunkierten T- und D-Domänen eine geringere Thermostabilität und der strukturstörende Effekt eines Basenaustauschs oder einer Deletion könnte dort weniger tolerierbare Maße annehmen, als wie es möglicherweise bei der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> der Fall ist.

### 3.4 Prozessierung und Modifizierung der mtRNAs

Die polyzistronischen Primärtranskripte werden prozessiert und polyadenyliert. Die Generierung der individuellen Transkripten erfolgt durch zwei spezielle mitochondriale RNasen. Schon während dieser Reaktionen kommt es zu spezifischen Basen-Modifikationen der mt-tRNA. Alle diese Prozesse sind von essentieller Bedeutung für die Funktionalität der reifen mtRNA.

#### 3.4.1 Prozessierung der primären Transkripte

Die Transkription mitochondrialer Gene resultiert, wie bereits in 3.2.2 beschrieben, in drei polyzistronischen Einheiten, deren einzelne Transkripte bei der Restriktion der tRNAs generiert werden. Dies geschieht durch die beiden Endonukleasen RNase P und RNase Z, die spezifisch am 5'- bzw. am 3'-Terminus der tRNA schneiden. Die Erkennung der exakten Restriktionsstelle erfolgt über räumliche Strukturen durch Auffaltung der tRNA. Da alle mitochondrialen tRNAs durch das gleiche Enzym prozessiert werden, scheint es sich bei dem Strukturmotiv um die allen tRNAs gemeinsame L-Form zu handeln.

Im Anschluss daran durchläuft das tRNA-Molekül zahlreiche chemische Basenmodifikationen und nach Anknüpfung der Triplettssequenz CCA am 3'-Ende die ATP-abhängige Acylierung mit der entsprechenden Aminosäure. Die Zuordnung der Aminosäure zu dem passenden Anticodon erfolgt über die jeweilige Aminoacyl-tRNA-Synthetase, die ihre tRNA durch strukturelle Wechselwirkungen erkennen.

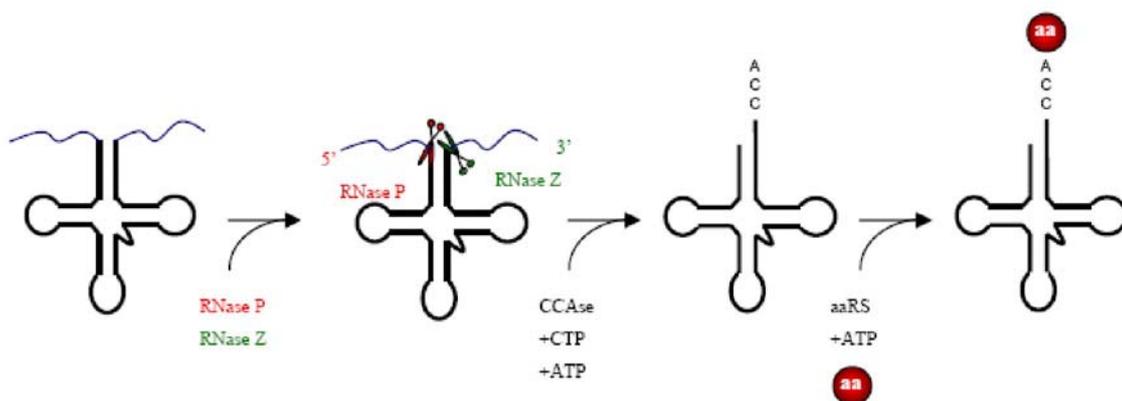


Abb. 9 Prozessierung primärer Transkripte.

Mitochondriale tRNAs werden als polyzistronische Transkripte generiert und dann durch spezifische Endonukleasen am 5'- und 3'-Ende prozessiert. Durch die Restriktion des 3'-Endes durch die RNase Z wird die Addition der drei Nukleotide CCA an das 3'-Ende der tRNA mit dem Enzym CC.Ase ermöglicht. Das tRNA-Molekül untergeht während der Reifung weiteren chemischen Modifizierungen einzelner Nukleotide/Basen (im Schema nicht gezeigt). Nach Erkennung durch die cognate Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) erfolgt die ATP-abhängige Veresterung der passenden Aminosäure (aa) an die CCA-Sequenz am 3'tRNA-Terminus (Levinger et al., 2004a).

#### 3.4.1.1 5'-End-Prozessierung durch Endonuklease RNase P

5'-End-Prozessierungen erfolgen sowohl im Kern als auch in den Mitochondrien. Katalysiert wird diese Reaktion jedoch durch isoenzymatische Varianten der Endonuklease RNase P. Im Gegensatz zum nukleären Enzym besitzt die mitochondriale RNase P keine katalytische RNA-Untereinheit und ist daher nach neuen Erkenntnissen kein Ribonukleoprotein (Rossmann et al., 2008). Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten, von denen MRPP1 und MRPP2 dem Enzym die tRNA-Bindungskapazität verleihen.

MRPP1 wird zudem aufgrund seiner Homologie zur Hefe-Methyltransferase Trm10 ebenfalls eine zusätzliche Funktion bei der m<sup>1</sup>G<sub>9</sub>-Methylierung mitochondrialer tRNAs zugeordnet (Nachbargauer, Holzmann, Rossmann, unpublizierte Daten). Sequenz-Analyse der dritten Untereinheit MRPP3 deckte Ähnlichkeiten mit Domänen spezifisch für Metallonukleasen auf (Dupureur, 2008) und veranlasst so zur Spekulation, dass MRPP3 eine neuartige Metallonuklease-Domäne hat und so RNA hydrolisiert ähnlich dem Mechanismus, der für Ribonukleoproteine angenommen wird (Steitz and Steitz, 1993).

#### 3.4.1.2 3'-End-Prozessierung durch Endonuklease RNase Z

Im Gegensatz zur RNase P ist die Endonuklease RNase Z sowohl in Mitochondrien als auch im Nukleus aktiv (Takaku et al., 2003). In Eukaryoten wird es zusätzlich von ELAC2 codiert, das als Resultat einer Duplikation des kurzen ubiquitär vorkommenden ELAC1-Gens angenommen wird, sich jedoch durch abweichende Substratspezifität und zusätzliche Aktivitäten im RNA-Metabolismus unterscheidet. Die lange Form der RNase Z prozessiert das Substrat bis zu 1.600-fach effizienter als die kurze Form. Sie besitzt ein starkes mitochondriales Importsignal und kann sowohl nukleär als auch mitochondrial codierte prä-tRNAs prozessieren (Dubrovsky et al., 2004).

RNase Z prozessiert *in vitro* wie auch *in vivo* nur bereits 5'-geschnittene Transkripte. Die Mechanismus ergibt somit eine definierte Prozessierungs-Reihenfolge (Manam and Van Tuyle, 1987; Kunzmann et al., 1998), bei der zuerst RNase P den 5'-Leader des Transkripts entfernt und nachfolgend RNase Z am 3'-Ende der tRNA endonukleolytisch aktiv wird. Es wird angenommen, dass eine lange 5'-Leadersequenz die Aktivität der RNase Z behindert (Nashimoto et al., 1999).

### 3.4.1.3 CCA-Addition

Die CCA-Addition am 3'-Terminus der tRNA ist einer der essentiellen Schritte der tRNA-Reifung in Mitochondrien. In humaner mtDNA ist die CCA-Sequenz im Gegensatz zu nukleärer DNA nicht in den tRNA-Genen codiert, sondern wird post-transkriptional durch die Aktivität der ATP (CTP):tRNA Nukleotidyltransferase, auch CCA-addierendes Enzym genannt, synthetisiert. Dabei handelt es sich um eine Matrizen-unabhängige Polymerase. In Bakterien und Hefe wurde gezeigt, dass das Enzym eine bestimmte Struktur, die aus der Interaktion der D- und T-Schleifen hervorgeht, erkennt (Spacciopoli et al., 1989). Da mitochondriale tRNAs keine Consensus-Sequenz der D- und T-Schleifen aufweisen, ist der benannte Erkennungsmechanismus nicht eins zu eins übertragbar. Der Mechanismus ist in Mitochondrien noch nicht entschlüsselt, jedoch ergaben Forschungen, dass zumindest der T-Arm eine wichtige Rolle bei der effizienten CCA-Addition spielt (Nagaike et al., 2001).

### 3.4.1.4 Modifizierung

Bislang sind ca. 100 verschiedenen Basenmodifikationen in tRNAs beschrieben worden (Helm et al., 2006). Deren Funktionen können in zwei Kategorien unterteilt werden:

- Modifikationen im tRNA-Zentrum, die die Auffaltung zur Tertiärstruktur unterstützen und
- Modifikationen in der Anticodon-Schleife, die in die Codon-Erkennung involviert sind und Einfluss auf den Aminoacylierungsprozess haben (Nakanishi and Nureki, 2005).

Diese finden laut der *reinforcement*-Theorie sukzessiv hintereinander statt, wobei zuerst Modifikationen in der Akzeptor-Domäne die T-Schleife stabilisieren und Interaktion mit der D-Schleife unterstützen und dadurch die nachfolgende Modifikation in der Anticodon-Domäne erleichtern (Helm, 2006).

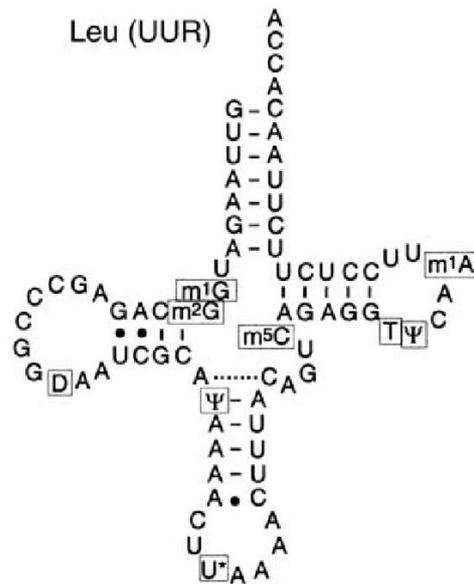


Abb. 10 Lokalisation unterschiedlicher Basenmodifikationen in der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>.

Dihydrouridin (D) befindet sich in der entsprechend benannten D-Schleife und ist dort ein wichtiger Faktor bei der Auffaltung in die L-förmige Tertiärstruktur, Pseudouridin ist in der T<sub>Ψ</sub>C –Schleife lokalisiert. Eine Taurin-Methylierung der Base Uracil im Anticodon der tRNA ist essentiell für die Codonerkennung bei der Translation und erleichtert die Wobble-Bindung (Quelle: Florentz et al., 2003).

Jede mitochondriale tRNA enthält im Schnitt ca. 7-20 post-transkriptional modifizierte Basen. Häufig modifiziert sind in der Regel die *wobble base* des Anticodons und die Base, die 3' zum Anticodon positioniert ist, was so möglicherweise die Effizienz der Wobble-Codon-Erkennung erhöht. Einige modifizierte Nukleotide wie Dihydrouridine oder Ribothymidin sind hochkonserviert innerhalb der tRNA und dienen dadurch als Namensgeber der beiden tRNA-Stämme. Im Gegensatz zu den zytoplasmatischen tRNAs sind Modifikationen der mt-tRNA in der Regel in ihrer Häufigkeit und Variabilität reduziert.

Einige Basenveränderungen kompensieren den Verlust von Sekundär- oder Tertiärstrukturen, indem sie die Faltung unterstützen, wie für tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und tRNA<sup>Lys</sup> in vitro gezeigt wurde (Helm, 2006; Sohm et al., 2003).

Die mitochondrialen Enzyme, die diese Modifikationen katalysieren, sind zum Teil spezifisch und in einem eigenständigen Gen im Kern codiert, es können jedoch auch Enzyme sein, wie die humane Pseudouridin-Synthase (Pus1p), die sowohl im zytoplasmatischen als auch mitochondrialen Kompartiment vorkommen und mit aller Wahrscheinlichkeit auch in beiden aktiv sind. Einige spezifische mt-tRNA Modifikationsenzyme sind auch im Zusammenhang mitochondrialer Erkrankungen identifiziert worden. Hypomodifikationen der tRNA sind eine häufige Ursache für mitochondriale Dysfunktion mit pathologischem Verlauf wie z.B. Muskelschwäche, Laktatazidose, oder Myoklonusepilepsie (Kirino et al., 2005).

In Abb. 10 ist die Basenmodifikation der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> dargestellt. Diese besitzt die üblichen Modifikationen des T- und D-Arms und weist eine Taurinmethyl-Gruppe an der Wobble-Base Uracil auf. Zusätzlich sind weitere von Guanin- und Cytosin-Basen methyliert.

### 3.4.2 Aminoacylierung

Die 20 proteinogenen Aminosäuren werden durch die passende, spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase aktiviert und mit dem 3'OH-Ende der entsprechenden tRNA verestert. Die Beladung der zwei Isoakzeptoren von Serin wie auch von Leucin erfolgt in beiden Fällen durch nur jeweils eine Synthetase (Szymanski et al., 2001). Die Reaktion kann man in zwei Teile gliedern. Bei der ersten Teilreaktion wird die Carboxylgruppe der Aminosäure durch eine Anhydridbindung mit ATP aktiviert. Die anschließende Hydrolyse bewirkt, dass das Reaktionsprodukt Aminoacylat mit der passenden tRNA reagiert und schließlich die Aminoacyl-tRNA, Pyrophosphat und AMP vorliegen (Ibba and Soll, 2000).

Die Synthetasen lassen sich aufgrund ihrer Struktur, dem Reaktionsmechanismus sowie ihrer Entwicklung zwei Klassen zuordnen. Die Enzyme der Klasse I besitzen eine charakteristische katalytische Domäne mit einer sog. Rossmann-Faltung und übertragen den aktiven Aminoacylrest von Adenylat auf die 2'-OH-Gruppe, während die Klasse II Enzyme mit einer Zentrum aus  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -helix Strukturen das Adenylat auf die 3'-OH-Gruppe des 3'-terminalen Adenosins der tRNA transferiert.

Die hohe Beladungsspezifität der tRNA-Synthetasen wird durch eine Vielzahl von Interaktionen mit der Struktur der passenden tRNA gewährleistet. Fehler werden durch eine prä- und post-transfere Editierung erkannt und korrigiert und letztendlich wird damit eine 99 prozentige Fehlerfreiheit erzielt.

### 3.5 Mitochondriale Erkrankungen (Mitochondriopathien)

Die erste Beschreibung einer mitochondrialen Erkrankung bei einem Patienten mit Belastungsintoleranz, Muskelschwäche und einem nicht-thyroidal bedingten Hypermetabolismus wurde Ende der 50er Jahre von Ernster et al. veröffentlicht (ERNSTER et al., 1959). Der biochemische Nachweis einer mitochondrialen Dysfunktion wurde kurz darauf an dieser Patientin von LUFT et al., 1962 erbracht. Anfang der 60er Jahre wurden in dem Zusammenhang histologischen Veränderungen des Muskels durch eine Akkumulation großer Mitochondrien, sogenannte *ragged red fibres* (RRF) diagnostiziert (ENGEL, 1963). Mitochondriale Erkrankungen sind seitdem im Zuge immer neu diagnostizierter Fälle ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt.

Aufgrund ihrer Schlüsselstellung im aeroben Energiestoffwechsel der Zelle führt eine Störung der Mitochondrienfunktion meist zu einem klinischen Mischbild (Syndrom), bei dem insbesondere Gewebe mit hohem Energiebedarf betroffen sind. Dazu zählen:

- Gehirn (Epilepsie, Ataxie, mentale Retardierung, Schlaganfall-ähnliche Episoden)
- Muskulatur (Myopathie, Kardiomyopathie)
- Endokrine Organe (Hypothyreose, Hypoparathyreoidismus, Diabetes mellitus)
- Sinnesorgane (Retinitis pigmentosa, Innenohrschwerhörigkeit)

Neben dem Auftreten schwerer degenerativer Erkrankungen von Nerven, Muskeln und anderen stark energiekonsumierenden Geweben werden auch der Prozess des Alterns sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Chorea-Huntington und Parkinson in Zusammenhang mit mitochondrialen Veränderungen gebracht.

Mitochondriopathien können in jedem Alter auftreten (Leonard and Schapira, 2000). Jedoch manifestieren sich Defekte der nukleären DNA meist in der frühen Kindheit, mtDNA-Mutationen zu einem späteren Zeitpunkt der Kindheit oder erst im Erwachsenenleben.

Durch das Vorhandensein eines eigenständigen Genoms der Mitochondrien kann eine erste Unterteilung mitochondrialer Erkrankungen in zwei Gruppen erfolgen, basierend auf Mutationen nukleärer DNA oder Defekte durch Mutationen der mtDNA, die sowohl rRNA und tRNA als auch Proteine betreffen können.

### 3.5.1.1 Mitochondriale Erkrankungen durch nukleäre DNA-Mutationen

Ca. 1.500 im Zellkern codierte Proteine werden in die Mitochondrien importiert und übernehmen dort die verschiedensten Funktionen. Eine Unterteilung der Mutationen, die direkt die Atmungskette betreffen erfolgt in:

1. Gene für Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Mutation in Komplex II-Untereinheit SDHA (Leigh-Syndrom), verschiedenen Komplex I-Untereinheiten (NDUFV1 (Leigh-Syndrom), NDUFS2 (Kardio-, Enzephalomyopathie))).
2. Gene für Proteine, die eine Rolle bei Import, Assembly und Qualitätskontrolle der Atmungskettenkomplexe spielen (Transporterprotein TIMM8, Assembly-Protein SURF1 (Leigh-Syndrom), Paraplegin, eine AAA-Protease-Untereinheit der inneren mitochondrialen Membran (Rugarli and Langer, 2006) (Hereditäre Spastische Paraplegie)).
3. Defekte der an der Replikation und Stabilität der mtDNA beteiligten Enzyme, die zu Deletionen und Depletionen im mt-Genom führen. (Mutationen der DNA-Polymerase  $\gamma$  (POL G: PEO), der Twinkle Helikase (C10ORF2: PEO) und des Adenin-Nuklease-Translokators (ANT1:PEO)).

### 3.5.1.2 Mitochondriale Erkrankungen durch mtDNA-Mutationen

Mutationen der mtDNA, die zu einem Defekt der Proteinsynthese führen, sind in der Regel *rearrangements*, Mutationen in tRNA Genen oder Mutationen in rRNA-Genen. Im Gegensatz dazu betreffen nur 38% der mitochondrialen Mutationen proteincodierende Gene und führen zu einem Aktivitätsverlust einer einzelnen betroffenen Komplex-Untereinheit.

58 % der 115 pathologischen Mutationen betreffen tRNA-Gene, die selbst nur 10 % des mitochondrialen Genoms ausmachen.

Die Mehrheit der tRNA-Mutationen sind heteroplasmatisch und zum Teil mit *ragged red fibres* (RRF), einer erhöhten Mitochondrienakkumulation, im Skelettmuskel assoziiert. Gewöhnlich zeigt sich ein neuromuskulärer oder kardiologischer Phänotyp. rRNA-Mutationen gehen in der Regel mit Aminoglycosid-induzierter, nicht-syndromischer Taubheit (Prezant et al., 1993) und Kardiomyopathie (Arbustini et al., 1998) einher.

Sind Komplex I-Untereinheiten (ND1, 2, 4, 6) betroffen, resultiert dies oft nicht in einem multisystemischen Defekt, sondern mit Fokus auf den optischen Nerv (LHON = Lebers Hereditäre Optikusatrophie). Cytochrom b-Mutationen äußern sich mit Belastungsintoleranz und Myalgie sowie COX-positive RRF im Skelettmuskel (Bennett et al., 2009). Komplex IV-Defekte haben einen multisystemischen Phänotyp und Mutationen der ATPase werden in der Regel mit dem NARP- und Leigh-Syndrom assoziiert (Barrientos et al., 2002).

Die 4977 bp lange *common deletion* tritt in Folge von KSS, CPEO des Alterungsprozesses besonders in Geweben mit hohem Energieverbrauch und niedriger Teilungsrate auf (Wallace, 1992).

### 3.5.2 Prävalenz und Pathophänotyp mitochondrialer Erkrankungen

Die Prävalenz mitochondrialer Erkrankungen mit 4,7 Patienten:100.000 bei Neugeborenen entspricht in der Größenordnung den Daten von Erwachsenen ab 18 Jahren mit 12,4:100.000, wenn man die Tatsache mit einbezieht, dass viele Erkrankungen sich erst im Erwachsenenalter manifestieren. Dies entspricht also im Durchschnitt einer Inzidenz von 1:8.500 (Chinnery et al., 2000).

Der Pathophänotyp mitochondrialer Erkrankungen ist extrem heterogen und betrifft einzelne Gewebe, davon bevorzugt Gewebe mit hohem Energieverbrauch, kann jedoch auch systemisch in Erscheinung treten. In den Geweben können mosaikartig nur einzelne Zellen betroffen sein, wenn die Mutation in der frühen Oogenese eingetreten ist und durch Segregation eine sehr hohe Mutationslast an einzelne Zellen weitergegeben wird.

Durch die Heterogenität und unterschiedliche Ausprägung des Schweregrads kommt es klinisch zu ausgesprochen vielgestaltigen Kombinationen unterschiedlicher Symptome. Typische Kombinationen werden zu Mischbildern (Syndromen) zusammengefasst, die wiederum durch unterschiedliche Mutationen hervorgerufen werden können.

- Chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie (CPEO)

Spät einsetzende progrediente Augenbewegungsstörungen zumeist aufgrund einzelner Deletionen der mtDNA (Moraes et al., 1989).

- Kearns-Sayre-Syndrom

Zusätzlich neben den Symptomen einer CPEO treten degenerative Veränderungen der Netzhaut und eine Kardiomyopathie mit Reizleitungsstörungen ebenfalls im Zusammenhang mit Deletionen in der mtDNA auf (Kearns, 1965).

- Myoklonus-Epilepsie mit *ragged red fibres* (MERRF)

Neben einer Epilepsie treten auch schwere neurologische Symptome und Demenz sowie Muskelschwäche auf. Der Großteil der Fälle ist auf drei Punktmutationen im Gen der tRNA<sup>Lys</sup> (A8344G, T8356C, G8363A) zurückzuführen.

- Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und Schlaganfall (MELAS)-Syndrom

Zusätzlich zu den im Namen erwähnten Symptomen sind die Patienten oft kleinwüchsig und leiden zusätzlich unter Migräne oder Diabetes mellitus. Mehrere unterschiedliche Punktmutationen (A3243G, T3271C, A3251G) im Gen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> sind dafür ursächlich (Hirano et al., 1992).

- Leber'sche hereditäre Optikusneuroretinopathie (LHON)

Eine spezielle Form einer Sehnervschädigung mit Netzhautveränderungen, zumeist durch Mutationen in mitochondrialen Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette (Mackey et al., 1996).

- Leigh-Syndrom (NARP)

auch *subakute nekrotisierende Enzephalomyopathie* genannt, tritt bereits im ersten bis zweiten Lebensjahr mit geistiger Retardierung, Muskelschwäche und Ataxie in Erscheinung. Es sind verschiedene mitochondriale und nukleäre Mutationen beschrieben, die zu diesem Syndrom führen (Ciafaloni et al., 1993).

- Mitochondriale Myopathie (MM)

MM tritt im Zusammenhang zahlreicher Syndrome, wie z.B: MELAS auf (Überblick in DiMauro, 2006). Eine Prävalenz von 50% wurde in einer Studie mit MELAS-Patienten (Karppa et al., 2005) beschrieben. Die in dieser Arbeit untersuchte Mutation A3302G der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> wurde ursprünglich mit dem klinischen Phänotyp einer isolierten mitochondrialen Myopathie beschrieben (s. 3.5.5).

### 3.5.3 Heteroplasmie und Schwellenwert

Eine Zelle enthält einige hundert bis zu mehreren tausend mtDNA-Moleküle. Heteroplasmie kann sich sowohl in Form unterschiedlicher Nukleotide als auch in unterschiedlichen mtDNA-Molekülen (intermitochondrial) äußern. Übersteigt der Grad der Heteroplasmie einen spezifischen Schwellenwert, tritt der klinische Phänotyp auf.

Der Schwellenwert ist abhängig von der Schwere der Störung sowie der Wichtigkeit der oxidativen Phosphorylierung als Energielieferant des betrachteten Zelltyps. Das bedeutet für metabolisch sehr aktive Gewebe einen niedrigeren Schwellenwert (Taylor et al., 2000). tRNA-Mutationen weisen in der Regel einen relativ hohen Schwellenwert von ca. 80% auf, Mutationen in proteincodierenden Genen der mtDNA bewirken manchmal schon bei ca. 50 % einen pathogenen Phänotyp.

Heteroplasmiegrade sind nicht immer stabil und können sich verlagern. Das geschieht sowohl auf zellulärer Ebene durch mitotische Segregation, als auch auf mitochondrialer Ebene, indem mutierte mtDNA einen Vor- oder Nachteil bei der Replikation aufweist und sich so im Laufe der Zeit durchsetzt bzw. verdrängt wird.

Eine Steigerung der Replikationsrate eines mtDNA-Moleküls im Vergleich zu einem anderen resultiert dann in einer Änderung des Heteroplasmiegrads innerhalb der Zelle, *intracellular drift* genannt (Jenuth et al., 1996).

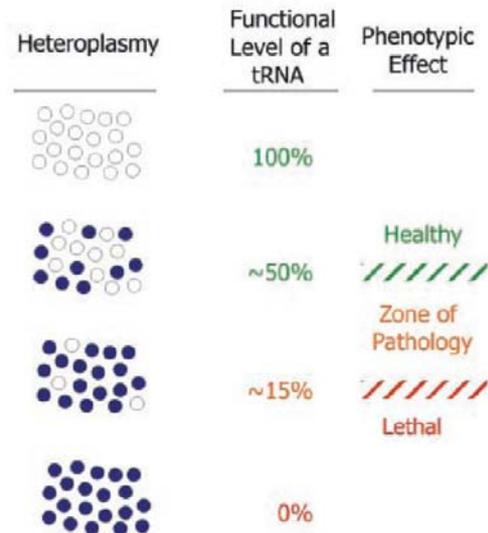


Abb. 11 Veranschaulichung der Heteroplasmie.

Heteroplasmie wird durch das Vorhandensein vieler mtDNA-Moleküle pro Mitochondrium bzw. viele Mitochondrien pro Zelle möglich. Dabei liegen sowohl Populationen mit mutierter wie auch Wildtyp-Sequenz in der Zelle vor. Überschreitet der prozentuale Anteil der mutierten DNA einen zell- bzw. gewebespezifischen Schwellenwert tritt ein phänotypischer Effekt ein, bei weiterer Zunahme wirkt die Mutation schließlich letal (Levinger et al., 2004a).

Der Heteroplasmiegrad schwankt jedoch in unterschiedlichen Geweben und selbst in benachbarten Zellen (Shoubridge, 1994) und bedingt die häufig unterschiedliche Erstmanifestation von Symptomen, selbst bei Patienten mit gleichem Genotyp (de Vries et al., 1994). Der Heteroplasmiegrad mutierter mtDNA kann sich im Alter erhöhen (Weber et al., 1997). Dies erklärt die Tendenz zur Progredienz der Erkrankung mit fortschreitendem Alter.

Bei der Übertragung der Mutation auf die nächste Generation können durch den Effekt des genetischen Flaschenhalses (*genetic bottleneck*) bei der Oogenese starke Änderungen des Mutationsgehalt und somit der Schwere der Erkrankung bei den Nachkommen auftreten (Poulton et al., 1998).

### 3.5.4 Mutation der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>

Das Gen, das die mitochondriale tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> codiert, ist ein sogenannter *hot spot* für Mutationen. Von 150 dokumentierten pathogenen Mutationen des mt-Genoms treten allein über 20 Mutationen im Gen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> auf. Die Basenaustausche oder auch Basendeletionen betreffen 18 der 76 Nukleotide innerhalb dieser tRNA.

Dabei sind die Basen des Anticodon bis auf eine detektierte Mutation am wenigsten betroffen, da dies zu einer nicht tolerierbaren Störung des Translationsapparates durch mangelnde Codonerkennung führen würde (Moraes et al., 1993b)

Obwohl in humanen Mitochondrien Leucin mit 16 % die am häufigsten verwendete der insgesamt 20 Aminosäuren darstellt, wird das UUR-Codon weitaus weniger verwendet als das CUN-Codon (UUR: 12%; CUN: 88%). Das Vorkommen eines stärker frequentierten Iso-Akzeptors kann daher bewirken, dass Mutationen in der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> weniger letal sind und daher häufiger auftreten. Ebenso ist die im Vergleich zu anderen mt-tRNAs höhere strukturelle Stabilität, die eine größere Toleranz für destabilisierende Mutationen ermöglicht, möglicherweise ein Grund für die Anhäufung der Mutationen in der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>.

Die klinische Symptome von tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Mutationen sind entsprechend divers. Diese sind, neben weiteren komplexen Syndromen, MELAS, Kardiomyopathie, PEO, Diabetes und Taubheit (Servidei, 2004).

In Tabelle 2 sind einige von ihnen aufgelistet, eine ständige Aktualisierung der Daten ist unter <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mitosyn.html> zu finden:

A

Phänotyp	Mutation
MELAS	A3243T, A3243G, A3252G, C3256T, G3244A, T3258C, T3271C, T3291C
MM	G3242A, A3243G, A3243T, T3250C, A3254G, A3280G, A3288G, A3302G
KSS	G3249A, G3255A
MERRF	G3255A
PEM	3271 del T
CPEO	C3254T
MMC	A3260G, C3303T
DMDF	A3243G
DM	A3243G, T3271C

B

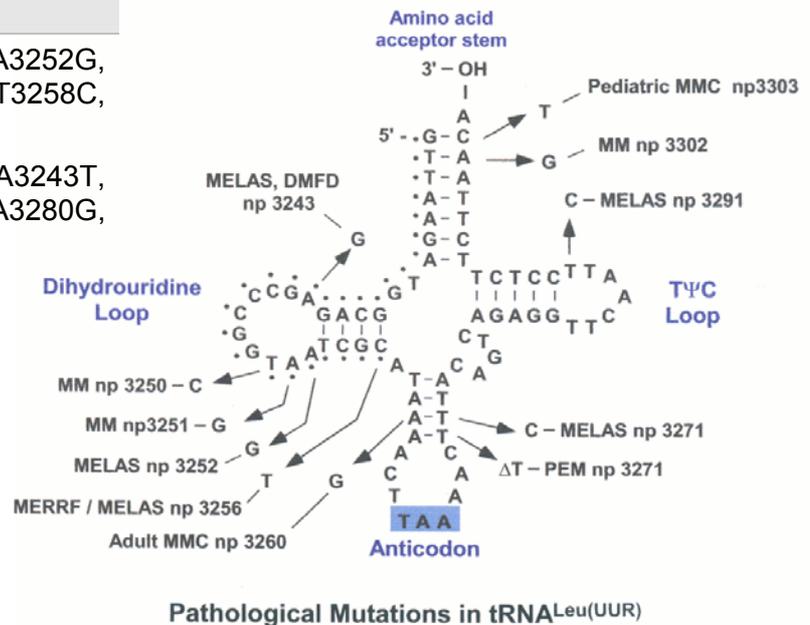


Abb. 12 Mutationen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und ihre Phänotypen.

(aus: MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2009)

A) Zuordnung der im tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Gen lokalisierten Mutationen zu den wichtigsten klinischen Phänotypen mitochondrialer Erkrankungen.

B) Darstellung einiger Mutationen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und ihre entsprechenden resultierenden Phänotypen. (MM: Mitochondrial Myopathy; MMC: Maternal Myopathy and Cardiomyopathy; PEM: Progressive Enzephalopathie ; MELAS: Mitochondrial encephalomyopathie, lactic acidosis, and stroke-like episodes; MERRF: Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber; DMFD: Diabetes Mellitus and Deafness)

Eines der dominantesten Charakteristika dieser tRNA Mutationen ist die Abwesenheit von COX-negativen *ragged red fibres*, die bei einem Großteil der Patienten mit tRNA-Mutationen vorhanden sind (Petruzzella et al., 1994).

### 3.5.5 A3302G-Mutation der mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>/klinische Deskription der Fälle

Von den 20 verschiedenen Mutationen des *hot spot* tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gehört die Mutation an Position nt3302 zu den bislang relativ wenig untersuchten mitochondrialen tRNA-Defekten.

Auf molekularer Ebene handelt es sich um eine A→G-Transition, die am Aminoacylierungs-Stamm der mitochondrialen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> lokalisiert ist und bislang im Verdacht stand, über eine veränderte RNA-Prozessierung zu einer Störung der mitochondrialen Translation zu führen (Bindoff et al., 1993).

Dabei beschränkt sich der Defekt ganz spezifisch auf Skelettmuskelgewebe, was mit gewebespezifischen Unterschieden des RNA-Prozessierungsmechanismus zusammenhängen könnte. Die ersten pathophysiologischen Untersuchungen an dieser Mutation wurden 1993 an Patientenbiopsien durchgeführt und ergaben multiple Störungen der Atmungskette, die überwiegend Komplex I betreffen.

Der Nukleotidaustausch an Position 3302 wurde bislang bei zwölf Personen mit teilweise verwandtschaftlicher Beziehung diagnostiziert und äußert sich klinisch in einem schweren gewebespezifischen Atmungskettendefekt aufgrund einer mitochondrialen Myopathie mit letalem Ausgang (Bindoff et al., 1993; van den Bosch et al., 2004; Hutchison et al., 2005).

Obwohl im Muskel der Patientin die A3302G Mutation in homoplasmatischen Mengen vorliegt und eine isolierte Myopathie diagnostiziert wurde, zeigte die Analyse der Fibroblasten trotz des Mutationsgehalts in diesem Gewebe keinen biochemischen Defekt (Watmough et al., 1990). Die Gewebespezifität der A3302G-Mutation wurde von Bindoff nach Auffinden von unterschiedlichen Prozessierungsintermediaten der Transkriptionsvorstufe RNA19 in Muskel und Fibroblasten, mit einer veränderten Schnittfolge der Endonukleasen RNase P und RNase Z erklärt (siehe Abb. 13). Erfolgt der erste Schnitt mit dem 5'-schneidenden Enzym RNase P, so entsteht ein 16S+tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Intermediat, wird zuerst 3'-terminal der tRNA durch die RNase Z geschnitten, ergibt sich ein tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>+ND1-Intermediat. Schließlich werden unter normalen Bedingungen beide Intermediate in die drei einzelnen Produkte prozessiert. Die A3302G-Mutation ist unmittelbar am 3'-Ende der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> lokalisiert und steht daher im Verdacht, einen inhibitorischen Effekt auf die Prozessierung auszuüben. Da die Endonukleasen die spezifische Schnittstelle der tRNA über deren Faltung in eine dreidimensionale Struktur erkennen, kann die Mutation die Prozessierung sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende der tRNA stören.

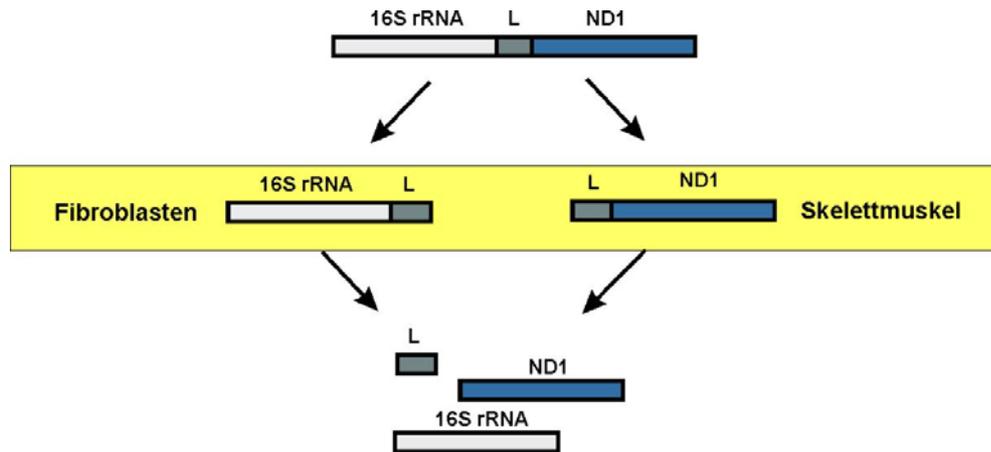


Abb. 13 Gewebsspezifische Prozessierung von RNA19

Schema der Prozessierungswege der Transkriptionsvorstufe RNA19, die die Transkripte 16S rRNA, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (L) und ND1 enthält. Zur Erklärung der gewebespezifischen Pathogenität der Mutation A3302G in Muskel wurden unterschiedliche Prozessierungswege postuliert. Angezeigt sind die zwei Wege der Prozessierung, die sich aus der Schnittfolge der prozessierenden Endonukleasen RNase P und RNase Z ergeben und entsprechend unterschiedliche Intermediate aufweisen. Nach Bindoff erfolgt der linke Weg in Fibroblasten über den ersten Schnitt am 3'-Ende der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und ergibt das 16S+ tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Intermediat, der rechte Weg soll in Muskelzellen ablaufen und durch die Aktivität der RNase P ein tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>+ND1-Intermediat erzeugen.

Im Zuge neuerer Untersuchungen von Hutchison et al., 2005, wurden jedoch zusätzliche Symptome im Zusammenhang mit der A3302G-Mutation bei der Anamnese vier weiterer Patienten diagnostiziert, so dass die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass die Mutation mehr als nur eine Myopathie verursacht und daher besser, wie bei den anderen der Fall, als eine Enzephalomyopathie angesehen werden sollte.

### 3.5.6 Das Zybridmodell

Mutationen der mitochondrialen DNA sind nicht nur in eine Vielzahl von unterschiedlichen Krankheiten involviert, wobei sie zumeist einen ernsten multisystemischen Defekt hervorrufen. Eine weitere typische Eigenschaft ist die hohe Variabilität bzw. die große Bandbreite an Symptomen, in der sich die gleiche Mutation in unterschiedlichen Individuen darstellt. Andererseits können auch ganz unterschiedliche Mutationen in verschiedenen Individuen einen gleichen Phänotyp bewirken. Diesen Effekt findet man auch in unterschiedlichen Geweben und Zellarten.

Um die Pathomechanismen von Mutationen der mtDNA zu analysieren, kann es von Vorteil sein, diese isoliert von sekundären Einflüssen zu betrachten. Durch das Zybridsystem können die Auswirkungen einer Mutation in einem anderen, eventuell neutralen Zell-Hintergrund untersucht werden. Zudem ermöglicht die Untersuchung verschiedener Mutationen bei Heteroplasmiegraden in einem konstanten, definierten Zellhintergrund eine bessere Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten.

Der zentrale Nutzen dieses Systems in dieser Arbeit sollte jedoch sein, dass eine mitochondriale Mutation mit gewebsspezifischem Effekt unter Muskel-Kulturbedingungen in einer Zelllinie untersucht werden kann, die die gleiche Herkunft aufweist wie das betroffene Gewebe. Somit ermöglicht das System zusätzlich im umgekehrten Fall die Untersuchung des Einflusses des zellulären Hintergrundes auf die Pathogenität der mtDNA-Mutation.

King und Attardi stellten mit der Methode der Fusion zweier verschiedener Zelllinien zu Zybridzellen ein effizientes Werkzeug bereit, um Mitochondrien in einem spezifischen Zellhintergrund zu studieren (King and Attardi, 1989).

Bei der zur Generierung des Zybridsystems verwendeten Zelllinie handelt es sich um eine embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie, die von Dr. Vergani, Padua, Italien zur Verfügung gestellt wurde. Die Generierung der Zybride mit homoplasmatischem Gehalt der A3302G-Mutation erfolgte im Labor von Prof. Wiesner durch Dr. Maniura Weber, die aus Vergleichszwecken mitgeführten RD-Zellen mit der homoplasmatischen A3243G-Mutation stammen ebenfalls aus dem Labor von Dr. Vergani.

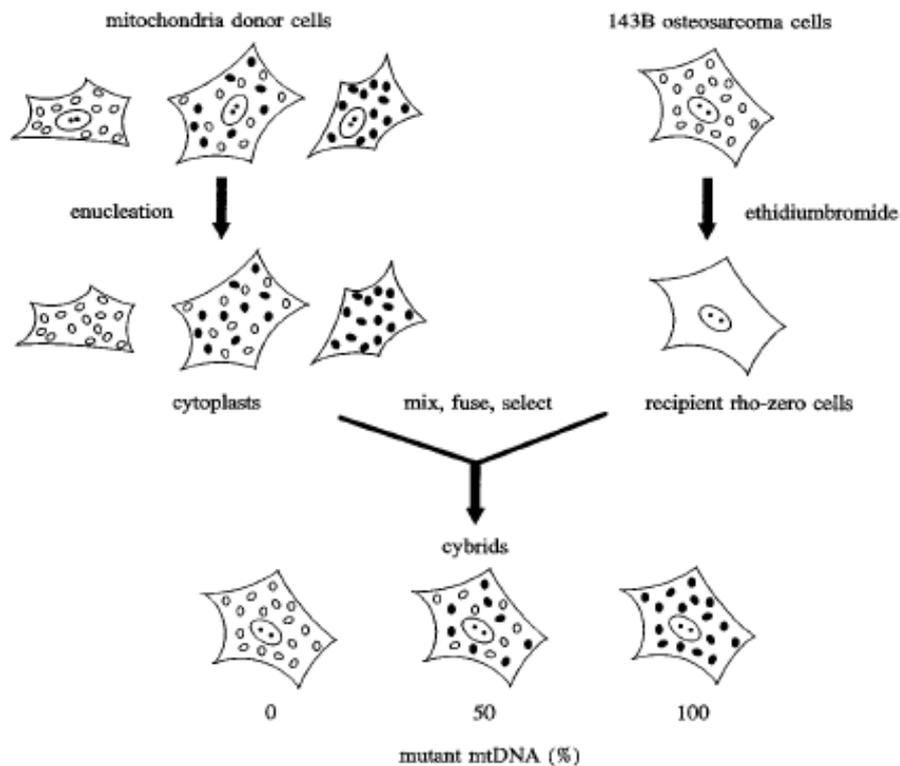


Abb. 14 Schema der Zybridherstellung.

(Quelle: van den Ouweland et al., 1999). Die schwarzen Punkte und kleinen Kreise symbolisieren in diesem Bild mtDNA und nicht Mitochondrien.

Die mtDNA der Akzeptorzellen wurde durch Langzeit-Behandlung mit Ethidiumbromid eliminiert. Ethidiumbromid ist ein lipophiles Kation, das durch die zwei Membranen des Mitochondriums in die Matrix gelangt und dort mit dem relativ frei zugänglichen mtDNA-Molekül interagiert. Dabei interkaliert es in die Doppelhelix des negativ geladenen DNA-Moleküls an. Dadurch wird eine Replikation der DNA verhindert, da Enzyme, Replikationsfaktoren und ähnliche Moleküle nicht mehr binden können (King and Attardi, 1989).

Die Zellteilung findet jedoch nach wie vor statt und führt bereits nach wenigen Zyklen zu einer starken Reduktion des Gehaltes an mitochondrialer DNA in der Zelle. Eine vollständige Eliminierung der mtDNA kann schließlich erreicht werden und die als *rho<sup>0</sup>* bezeichneten Zellen sind nun auf anaerobe Energiegewinnung durch die zytosolische Glykolyse angewiesen. Diese Zellen verlieren also die Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung, dabei muss jedoch betont werden, dass sie weiterhin Mitochondrien enthalten (in Abb. 6 nicht gezeigt).

Die von Patienten stammenden Donorzellen werden enukleiert und enthalten als sogenannte Zytoplasten nur noch die mitochondriale DNA. E nukleierung erfolgt durch Zentrifugation unter Gabe des Actin-Polymerisationsinhibitors Cytochalasin B, der das Zytoskelett zerstört.

Die Fusion von Zytoplast und *rho*<sup>0</sup>-Zellen wird durch Zusatz von Polyethylenglykol erreicht, dass durch sein hohes Dipolmoment die Hydrathüllen von den Membranen abzieht und somit hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht. Es entstehen eine Reihe von Zybridzelllinien, die den gleichen nukleären Hintergrund, aber einen unterschiedlichen Anteil an mtDNA-Moleküle mit Mutation enthalten (King and Attardi, 1989).

In dieser Arbeit wurde die embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie RD für die Herstellung von *rho*<sup>0</sup>-Zellen benutzt und dient in den durchgeführten Versuchen als Kontrolle und Referenzwert.

*Rho*<sup>0</sup>-Zellen sind nur dann noch überlebensfähig, wenn man sie mit Uridin und Pyruvat supplementiert, da die Zellen die Energie in Form von ATP auf dem Weg der anaeroben Atmung, der Glykolyse, bereitstellen, was die Zugabe von Pyruvat als zytosolischen NADH-Oxidationsmittel erfordert. Durch die fehlende Atmungskette ist die Pyrimidinsynthese gestört, da das Schlüsselenzym Dihydroorotat-Dehydrogenase ausfällt, die die Ubichinon-abhängige Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat katalysiert (Loffler et al., 1997).

## 4 Zielsetzung

Wie bereits erwähnt, zeigen mitochondriale Zytopathien eine große klinische Variabilität, die von einer ebenso großen genetischen Heterogenität begleitet wird. Dazu äußern sich ihre Pathophänotypen in einer überraschenden Zellspezifität, d.h. jede Mutation beeinträchtigt nur die Funktion einer begrenzten Zahl von Geweben. Die Ursache hierfür ist unbekannt.

In dieser Arbeit wird die Transition A3302G in der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (MTTL1) untersucht, die zu einer isolierten, letalen Myopathie führt. Um die pathophysiologischen Konsequenzen der Mutation zu studieren, werden transmitochondriale Zybridzellen mit der mtDNA einer Patientin verwendet. Dabei wird die Möglichkeit genutzt, diese Mutation in einer Rhabdomyosarkom-Zelllinie unter proliferierenden, aber vor allem auch unter postmitotischen Bedingungen zu untersuchen, um der Situation *in vivo* so nahe wie möglich zu kommen.

## 5 Material

### 5.1 Chemikalien und Geräte

#### 5.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumacetat	Sigma
PageBlue Protein Staining Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford Reagenz	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Roth
BSA (Bovine Serum Albumin, fatty acid free)	Sigma
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
Casyton <sup>®</sup>	Innovatis (Reutlingen)
Complete <sup>®</sup> Mini EDTA-free Proteaseinhibitor-Cocktail	Roche (Grenzach)
Dithiothreitol	Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma
Eisessig	Roth
Ethanol	Roth
Glyzerin	Roth
Glyzin	Roth
H <sub>2</sub> O-a.a.i.	Berlin Chemie (Berlin)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
Harnstoff	Merck
HCl	Roth
Hepes	Sigma
Fluorescence Mounting Medium	DAKO (Hamburg)

---

KCl	Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
Mannitol	USB (Staufen)
Methanol	Roth
Mg <sub>2</sub> Cl	Merck
MOPS	Sigma
Natriumacetat	Roth
NaCl	USB
NaF	Sigma
Na <sub>2</sub> -EDTA	Sigma
Na <sub>2</sub> -EGTA	Sigma
Na <sub>3</sub> -Citrat	Roth
Na <sub>3</sub> -VO <sub>4</sub>	Sigma
NP40	Sigma
PBS	Gibco™/Invitrogen (Karlsruhe)
Peressigsäure	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ponceau Färbung	Serva (Heidelberg)
Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)	Roth
Sucrose	Roth
SYBR® Green I nucleic acid gel stain	Invitrogen
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint	Roth
N,N,N',N'-Tetramethyldiamine (TEMED)	Roth
Tris Base	Roth
Tris HCl	Roth
Trizol	Invitrogen
Tween® 20	USB
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus Perkin Elmer Life Sciences Inc. (Rodgau-Jügesheim)	
- Enhanced Luminol	NEL 104
- Oxidizing Reagent	NEL 105

Xylencyanol FF	Merck
Fixierer GBX Processing Chemicals Kodak	Sigma
Entwickler GBX Processing Chemicals Kodak	Sigma

Alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Roth, Invitrogen (Invitrogen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

### 5.1.2 Lösungen

Coomassie	8 Stk.	Tabletten Serva Blue R
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig
DNA-Loading dye (10 x)	50 % (v/v)	Glyzerin
	20 mM	EDTA
	0,06 % (w/v)	Xylencyanol FF
	0,06 % (w/v)	Bromphenolblau
	180 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
Elutionspuffer	0,5 M	NH <sub>4</sub> Ac
	1mM	EDTA
	0,1%	SDS
Entfärber I	50 % (v/v)	Ethanol 96 %
	7 % (v/v)	Eisessig
Entfärber II	5 % (v/v)	Ethanol 100 %
	7 % (v/v)	Peressigsäure
MACS-Medium 1	1 x	PBS (-Mg,-Ca)
	10 mM	EDTA
MACS-Medium 2	1 x	PBS (-Mg,-Ca)
	10 mM	EDTA
	0,05 % (v/v)	Trypsin (w/o Phenol red)

MACS-Homogenisationspuffer	67 mM	Sucrose
	50 mM	Tris/HCl pH 7,4
	50 mM	KCl
	10 mM	EDTA
	0,2 % (w/v)	BSA (fatty acid free)
MACS-Waschpuffer	0,25 M	Sucrose
	3 mM	EGTA/Tris
	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
MACS-Inkubationspuffer	50 mM	Tris
	50 mM	KCl
	10 mM	EDTA
	0,2 % (w/v)	BSA (fatty acid free)
Messmedium E	0,3 M	Mannitol
	10 mM	KCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,1 % (w/v)	BSA
	10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
MOPS (10 x)	0,4 M	MOPS
	0,1 M	Natriumacetat
	0,01 M	EDTA (pH 8,0)
PCA-Extraktionspuffer	0,3 M	Perchlorsäure
	1 mM	EDTA (pH 8)
RNase-freies Wasser	0,1 % (v/v)	DEPC in MQ-H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer	0,4 % (w/v)	SDS
	0,5 M	Tris (pH 6,8)
SDS-Probenpuffer (6 x)	125 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	3 mM	EDTA
	20 % (v/v)	Glyzerin
	9 % (w/v)	SDS
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	10 % (v/v)	β-Merkaptoethanol
SDS-Laufpuffer (10 x)	250 mM	Tris Base
	2 M	Glyzin
	1 % (w/v)	SDS

SSC (20 x)	0,3 M	Na <sub>3</sub> -Citrat
	3 M	NaCl
TAE	40 mM	Tris Base
	40 mM	Essigsäure
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O MQ- H <sub>2</sub> O
TBE	89 mM	Tris Base
	89 mM	Borsäure
	2 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
TBS (10 x)	1,5 M	NaCl
	200 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
TBS-T (1 x)	1 x	TBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20 (v/v)
TE	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8,0)
TOTEX-Puffer	20 mM	Hepes pH 7,9
	400 mM	NaCl
	20 %	Glyzerin
	1 % (v/v)	NP40
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
	0,5 mM	Na <sub>2</sub> -EGTA
	10 M	β-Glycero-P
	10 M	NaF
	5 mM	DTT
	0,5 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	1 mM	PMSF
	Trenngel-Puffer	0,4 %
1,5 M		Tris (pH 8,8)
tRNA-Proben-Puffer	50 %	Glyzerin
	20 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
	0,06 %	Xylencyanol FF
	0,06 %	Bromphenolblau
	180 mM	Tris/HCl (pH 7)

tRNA-Aminoacylierungsgel	6,5 % (f.c.)	Acrylamid 40 %, (19:1)
	8 M	Harnstoff
	0,1 M	NaOAc (pH 5,0)

## Northern Blot Waschlösungen

Waschlösung I	2 x	SSC
	0,1 % (v/v)	SDS

Waschlösung II	0,1 x	SSC
	0,1 % (v/v)	SDS

Western Blot Stripping-Puffer	100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	50 mM Tris/HCl (pH 6,8)	
	2 % (v/v)	SDS

Western-Blot-Puffer	25 mM Tris Base	
	192 mM	Glyzin
	20 % (v/v)	Methanol
	1 % (v/v)	SDS

## 5.1.3 Zellkulturmaterialien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)	Gibco™
Einfriermedium	10 % DMSO in FBS
FBS (Fötales Rinder Serum)	PAA (Pasching, Österreich)
Na-Pyruvat	Gibco™
Penicillin/Streptomycin Lösung (100 U/ml; 10 $\mu$ g/ml)	Gibco™
PBS	Gibco™
Plasmocin	Invivogen (San Diego, California)
Trypsin-EDTA	Gibco™
Uridin	Sigma

## 5.1.4 Geräte

Agarosegel-Kammer (EasyCast)	Owl Scientifics (Portsmouth, USA)
CASY <sup>®</sup> 1 Modell TT Zellzähler	Schärfe System (Reutlingen)
Fluoreszenzmikroskop (Axiophot)	Zeiss (Göttingen)
Geltrockner Model 583	BioRad (München)
Genie Blotter Tank-Blotkammer	Idea Scientific Company (USA)
Glas-Homogenisator	B.Braun (Melsungen)
Hybridisierungssofen	Amersham Pharmacia (UK)
Carestream Molecular Imaging	Gel Logic 2000 (New Haven, USA)
Inkubator HeraCell	Heraeus (Hahnau)
Medical X-Ray Film (Super RX)	Fuji (Düsseldorf)
Mikrotiterplattenleser (µQuant)	BioTek Instruments (Winooski, USA)
Mikro-Zentrifuge (1K17)	Sigma
NB-Membrane (GeneScreen Plus®) (Wellesly, USA)	PerkinElmer Life Sciences Inc.
O <sub>2</sub> Control Box (CB1-D3)	Hansatech (King's Lynn, UK)
Oxygen electrode (DW1)	Hansatech
PAGE-System Tall Mighty Small	Hoefer (San Francisco, USA)
PCR-Thermocycler	MJ Research (Waltham, USA)
PhosphorImager	Molecular Dynamics
Scientific Imaging Film, Biomax MR, Single Emulsion	Kodak (Stuttgart)
SDS-PAGE-Kammer Tall Mighty Small	Hoefer
Spektrophotometer	Beckman (Krefeld)
Szintillationszähler LS 6500	Beckman
Teflon Pistil	B.Braun (Melsungen)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
UV-Crosslinker UVC500	Hoefer
UV-Küvette	Eppendorf
WB-Membrane (Optitrat BA-S 85 Reinforced NC)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell
Zentrifuge (4K15)	Sigma
Zentrifuge (5417C)	Eppendorf

## 5.2 Material für molekularbiologische Arbeiten

### 5.2.1 Kits

Hyperfilm ECL (Western Blot)	GE Healthcare (München)
Hyperfilm MP (Northern Blot)	GE Healthcare
Qiaquick PCR Purification Kit (Cat. 28106)	Qiagen (Hilden)
Random Primed DNA-Labeling Kit	Boehringer (Mannheim)
Gel filtration column	Clontech (San Jose, USA)
Pure-Link RNA Mini Kit	Invitrogen

### 5.2.2 Enzyme und Marker

Hae III	R0108S, 10.000 U/ml	New England (Frankfurt a. M.)	Biolabs
Mse I	R0525S, 10.000 U/ml	New England Biolabs	
Taq-Polymerase	EP0282	Fermentas	
Jump Start Accu Taq- Polymerase	D5809, 2,5 U/μl	Sigma	
Proteinase K	E00491, lot. 1401, 600 U/ml	Fermentas	
Klenow-Fragment	EP0051, 10.000 U/ml	Fermentas	
1 kb DNA-ladder	GeneRuler™, #SM0311	Fermentas	
100 bp DNA ladder plus	GeneRuler™, #SM0321	Fermentas	
Prestained Protein ladder	PageRuler™, #SM0671	Fermentas	

### 5.2.3 Nukleotide und Oligonukleotide

dNTP Mix, 10 mM	R0191, lot. 8401	Fermentas
Bezeichnung	5'- Position	Sequenz
3302-sense Primer	Nt 3232	5'-TAA GAT GGC AGA GCC CG-3'
3302-antisense Primer	Nt 3957	5'-TGC GGC GTA TTC GAT GTT-3'
3243-sense Primer	Nt 292 8	5'-CCT AGG GAT AGC GCA-3'
3243-antisense Primer	Nt 3305	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAT TGT TAA GAA GAG GAA TTG-3'
Leucin-Sonde sense	Nt 3232	5'-TAA GAT GGC AGA GCC CG-3'
antisense	Nt 3305	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAT TGT TAA GAA GAG GAA TTG-3'
D11S533 sense		5'-GCC TAG TCC CTG GGT GTG GTC
D11S533 antisense		5'-GGG GGT CTG GGA ACA TGT CCC C
Mycoplasma-B		5'-GGCGAATGGGTGAGTAACAC
Mycoplasma-A		5'-CGGATAACGCTTGCGACCTAT

### 5.2.4 Radiochemikalien

[ <sup>35</sup> S]-L-Methionine (37 TBq/mmol)	Hartmann Analytics
[α- <sup>32</sup> P]-dCTP (185 TBq/mmol)	Hartmann Analytics

## 5.2.5 Antikörper

### 5.2.5.1 Erster Antikörper

Antikörper	Firma, Artikel-Nr.	Endkonzentration
Anti-human- $\beta$ -Actin (goat)	Sigma A1978	0,5 $\mu$ g/ml
Anti-human Complex I, 15 kDa SU (mouse)	Molecular Probes A21342	0,1 $\mu$ g/ml
Anti-human Complex I, 39 kDa SU (mouse)	Molecular Probes A11140	0,5 $\mu$ g/ml
Anti-human Complex II, 70 kDa SU (mouse)	Molecular Probes A11142	0,1 $\mu$ g/ml
Anti-human-Complex III core 2 (mouse)	Molecular Probes A11143	0,4 $\mu$ g/ml
Anti-human-Complex IV, SU I (mouse)	Molecular Probes A6403	2 $\mu$ g/ml
Anti-human-Complex IV, SU II (mouse)	Molecular Probes A6404	2 $\mu$ g/ml
Anti-human-Complex IV, SU IV (mouse)	Molecular Probes, A21347	0,5 $\mu$ g/ml
anti- $\alpha$ -sarcomeric actin (mouse ascites)	Sigma M2172	0,15 $\mu$ g/ml
anti myogenin F5D (mouse)	Santa Cruz sc-12732	0,5 $\mu$ g/ml
Anti-myosin light chain 20 kD (mouse ascites)	Sigma M4401	1:1000

### 5.2.5.2 Zweiter Antikörper

Antikörper	Firma, Artikel-Nr.	Endkonzentration
Anti-mouse IgG (H+L) (goat); HRP-conjugated	Dianova 115-035-003	1:10000
Anti-mouse IgG, IgM (goat); HRP-conjugated	Dianova 115-035-044	1:10000
Anti-rabbit (goat), HRP- conjugated	Dianova 111-035-003	1:10000
Anti-goat (donkey), HRP- conjugated	Dianova 705-035-003	1:10000

### 5.3 Zelllinien

143B: Humane Osteosarcomzellen

143B/3302 100 %:

homoplasmatische Zybrid-Zellen; Durch Fusion von 143B *rho*<sup>0</sup>-Zellen mit entkernten A3302G-Patientenfibroblasten wurden Klone isoliert, die zu 100 % die A3302G Mutation in ihrer mtDNA enthalten.

143B/3302 70%:

heteroplasmatische Zybrid-Zellen; Durch Fusion von 143B *rho*<sup>0</sup>-Zellen mit entkernten A3302G-Patientenfibroblasten wurden Klone isoliert, die zu 70 % die A3302G Mutation in ihrer mtDNA und zu 30 % das Wildtyp-Molekül enthalten.

RDWT: Humane embryonale Rhabdomyosarkomzellen

RD3302: Zybrid-Zellen; Mitochondrien aus Osteosarkomzybridzellen mit der A3302G-Mutation wurden in einen Rhabdomyosarkom-Hintergrund gebracht und RD-Zell-Klone, mit homoplasmatischen Gehalt der 3302-Mutation wurden isoliert.

RD3243: Zybrid-Zellen, Mitochondrien aus Osteosarkomzybridzellen mit der A3243G-Mutation wurden in einen Rhabdomyosarkom-Hintergrund gebracht und RD-Zell-Klone, mit homoplasmatischen Gehalt der 3243-Mutation wurden isoliert. Diese Zellen wurden uns durch Frau Dr. Lodovica Vergani, Neuromuscular Center, Department of Neurological Science, Padua, Italien) zur Verfügung gestellt.

## 6 Methoden

### 6.1 Zellkultur

#### 6.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden konstant unter folgenden Bedingungen gehalten:

5 %	CO <sub>2</sub>
95 %	Luftfeuchtigkeit
37 °C	Wachstumstemperatur

Die Kultivierung erfolgt in DMEM-Medium mit Zugabe von 10 % FBS, 2,5 M Na-Pyruvat, 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 200 mM Uridin.

Na-Pyruvat dient den Zellen sowohl als Nährstoff wie auch als Oxidationsmittel für zytosolisches NADH.

Desweiteren sind Zellen mit Mutationen in der mitochondrialen DNA, die zu einem Defekt der Atmungskette führen, auf die externe Zugabe von Uridin angewiesen, da das für die Uridinsynthese zuständige Enzym Dihydroorotat Dehydrogenase über Ubichinon an die Atmungskette gekoppelt ist. Die Kontrollzelllinien wurden mit den gleichen Substanzen supplementiert um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

#### 6.1.2 Einfrieren, Auftauen und Passagieren von Zellen

Zellpellets wurden in FBS supplementiert mit 10 % DMSO resuspendiert und bei –80 °C in einem Isopropyl-Behälter schrittweise über Nacht herunter gekühlt. Die Langzeit Kryokonservierung erfolgt bei –196 °C in Flüssigstickstoff.

Zum Auftauen von Zellen werden diese kurz im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Zum Abtrennen des Einfriermediums werden die Zellen zentrifugiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf 10 cm Kulturschalen ausgesät.

Zellen wurden in der Regel bei Erreichen von 90 % Konfluenz, Zellen mit Mutation schon bei 70-80 % Konfluenz trypsinisiert und zu mindestens 5 % Konfluenz wieder ausgesät.

### 6.1.3 Zellzählung

Die Zellzahl wurde in der Regel mit dem Casy-Zellzählgerät bestimmt. Die Zellen wurden dazu geerntet, zentrifugiert, das Pellet mit PBS gewaschen und in einer der Konfluenz entsprechenden Menge an PBS resuspendiert. 10 bzw. 100 µl der Suspension wurden dann in 10 ml Casyton Messmedium gemessen.

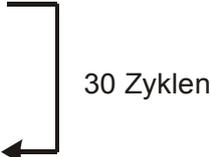
Das Casy Zellzählgerät leitet einzelne Zellen durch eine definierte Pore und detektiert diese mittels Pulsfeld-Analyse. Zusätzlich kann durch die Amplitude des Widerstands das Zellvolumen gemessen werden. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert als die Zellzahl genommen.

### 6.1.4 Nachweis des 143B-Längenpolymorphismus

Um die Fusion von mutierter mtDNA aus 143B-Zybriden mit Rhabdomyosarkomazellen nachzuweisen, wurde ein Längenpolymorphismus an Locus D11S533 der nukleären DNA genutzt, welcher sich durch eine repetitive Hexanukleotidsequenz charakteristischer Länge für 143B-Zellen darstellt. Dabei zeigen 143B-Zellen nach Amplifikation dieser Region eine Bande bei 530 bp, RD-Zellen jedoch bei 438 bp.

PCR-Programm:

Stufe	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	2 Min.
2.	94 °C	30 Sek.
3.	60 °C	30 Sek.
4.	72 °C	1 Min.
5.	72 °C	10 Min.
6.	4 °C	∞



Jeweils 10 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 6 x Orange Loading dye (Fermentas) vermischt, auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht detektiert.

### 6.1.5 Mycoplasmen-Kontamination

#### 6.1.5.1 Mycoplasmen-Behandlung

Zellen mit Mycoplasmakontaminationen wurden einer mehrwöchigen Behandlung mit Plasmocin (Invivogen) unterzogen. Dabei handelt es sich um ein Kombinationsprodukt aus zwei verschiedenen Antibiotika, die sowohl gegen extrazelluläre wie auch intrazelluläre Mycoplasmen gerichtet sind. 37,5 µg/ml Plasmocin wurde dem Kulturmedium zugesetzt und kontaminierter Zellen über 1-2 Wochen bei regelmäßigen Mediumwechsel damit versorgt.

Um ein Wiederaufkeimen der bekämpften Kontamination zu verhindern, wurden die Zellen weitere 2 Wochen mit 12 µg/ml Plasmocin behandelt. Während der gesamten Behandlungsphase und bis mehrere Wochen danach wurden keine weiteren Antibiotika wie Penicillin und Streptomycin zugesetzt um eine Maskierung einer wiederaufkeimenden Kontamination zu umgehen.

Die Zellen wurden nach der Behandlung eine gewisse Zeit in Kultur gehalten und dann Medium-Überstand zum Nachweis der erfolgreichen Behandlung mittels PCR entnommen.

#### 6.1.5.2 PCR zum Nachweis von Mycoplasmenkontaminationen

Um Mycoplasmenkontaminationen auszuschließen, wurde zur Kontrolle eine PCR mit dem universellen Mycoplasmen-Primerpaar AB (Sigma) durchgeführt, die bei Mycoplasmenkontamination der Zelle eine 500 bp-große Sequenz amplifizieren. Dazu wurde ein Aliquot Medium nach frühestens 2 Tagen den Zellkulturschalen entnommen und im Brutschrank bei 37°C über Nacht gelagert. 2 µl dieses Mediums wurde dann als Template für die PCR eingesetzt. Weiterhin wurde eine Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O sowie eine Positivkontrolle, die aus einer früheren positiv getesteten Kultur entstammte, mitgeführt.

##### PCR-Ansatz

1 x	Taq-Polymerase-Puffer
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,25 mM	dTNP
0,2 mM	Mycoplasma-Primer A
0,2 mM	Mycoplasma-Primer B
5 U	Taq-Polymerase

Die resultierenden Amplifikate wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Kontaminierte Zellkulturen zeigten eine Bande bei 500 bp, nicht kontaminierte Kulturen hingegen keine.

## 6.2 Nukleinsäuren

### 6.2.1 RNA-Extraktion

#### 6.2.1.1 RNA aus Zelllinien

Zellen wurden trypsinisiert und zentrifugiert und das Pellet mit PBS gewaschen. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Invitrogen RNA Pure-Link-Kit gemäß Herstellerangaben. Die Quantifizierung der RNA erfolgte dann am Photometer in 0,2 M Tris pH 7,2.

Bei großen Präparationsmengen erfolgte eine Phenolextraktion mit Trizol (Invitrogen). Dazu wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber von der Schale gekratzt, zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in entsprechender Menge Trizol resuspendiert und nach Herstellerangaben extrahiert. Das resultierende RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und schließlich in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Schwer lösliche Pellets wurden auf 60 °C erhitzt.

Das resultierende RNA-Pellet wurde anschließend in 30 µl 0,1 M Natriumacetat-Puffer/1 mM EDTA pH 4,5 resuspendiert.

Zur Untersuchung der Aminoacylierung von tRNA, wurde das resultierende RNA-Pellet in 30 µl 0,1 M Natriumacetat pH 4,5/1 mM EDTA resuspendiert.

### 6.2.2 RNA aus Gewebe

RNA wurde aus unterschiedlichen humanen Gewebeproben extrahiert. Muskelproben wurde aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Haut aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie und Herzventrikel sowie -vorhof aus der Klinik III für Innere Medizin der Universität Köln zur Verfügung gestellt.

Das tiefgefrorene Gewebe wurde gewogen und dann unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zermörsert. Dabei wurde ein Antauen der Proben unbedingt vermieden. Das Pulver wurde zusammen mit einem Volumen Trizol in ein Reaktionsgefäß überführt und gründlich durch Pippettieren gelöst. Im Anschluss wurde es mit einem Glas-Teflon-Homogenisator mit mehreren Stößen, entsprechend der Gewebeart, weiter aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt und wiederholtem Aufschließen des restlichen Gewebepellets wurde die Überstände vereint und die Trizol-Extraktion gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### 6.2.3 DNA-Extraktion

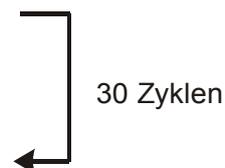
DNA aus Zellen wurde mit dem Qiagen DNA-Extraction Kit gewonnen und mit MQ-H<sub>2</sub>O eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

## 6.2.4 PCR

PCR wurde in der Regel in dem MJ Research PTC-100 Thermo Cycler durchgeführt. Es wurde Reagenzien von Fermentas eingesetzt und eine BSA stabilisierte Taq-Polymerase. Zur Amplifikation der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> wurde die Jump Start Accu Taq-Polymerase (2,5 U/μl) von Sigma benutzt.

### Programm 1: Amplifikation der tRNA<sup>Leucin(UUR)</sup>-Sequenz

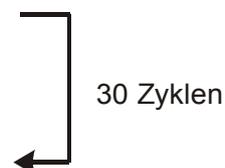
Stufe	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	2 Min.
2.	94 °C	30 Sek.
3.	52,4 °C	30 Sek.
4.	72 °C	1 Min.
5.	72 °C	10 Min.
6.	4 °C	∞



30 Zyklen

### Programm 2: Charakterisierung A3302G Transversion

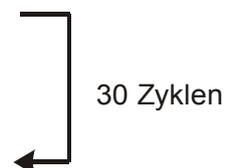
Stufe	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	2 Min.
2.	94 °C	30 Sek.
3.	53,7 °C	30 Sek.
4.	72 °C	1 Min.
5.	72 °C	10 Min.
6.	4 °C	∞



30 Zyklen

### Programm 3: Charakterisierung A3243G Transversion

Stufe	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	2 Min.
2.	94 °C	30 Sek.
3.	48 °C	30 Sek.
4.	72 °C	1 Min.
5.	72 °C	10 Min.
6.	4 °C	∞



30 Zyklen

Programm 4: Nachweis des 143B Polymorphismus

Stufe	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	2 Min.
2.	94 °C	30 Sek.
3.	60 °C	30 Sek.
4.	72 °C	1 Min.
5.	72 °C	10 Min.
6.	4 °C	∞



30 Zyklen

Programm 5: Detektion von Mycoplasma-Kontamination

Stufe	Temperatur	Zeit
1.	94 °C	1 Min.
2.	60 °C	1 Min.
3.	72 °C	1,5 Min.
4.	4 °C	∞



30 Zyklen

PCR-Produkte wurden mit dem Qiagen Purification Kit aufgereinigt, mit dem Photometer quantifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese verifiziert. Die Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

### 6.2.5 Agarose Gelelektrophorese

In der Regel wurden je nach erwarteter Bandengröße oder Auftrennungsbedarf 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese lief in einer OWL Midi oder Mini Gelkammer in TAE-Puffer bei 80-100 mA. Ca. 2-10 µg der Proben wurden mit 10 x DNA-Ladepuffer von Fermentas vermischt. Die Geldokumentation erfolgte an der Gelologic-Station T2000 und durch Kodak-Software, die densitometrische Auswertung mit der Programm AIDA.

### 6.2.6 RFLP-Analyse

Zur Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihres Heteroplasmiegrades an A3302G- bzw. A3243G-Mutation wurde ein diagnostische Restriktionsanalyse mit entsprechenden Restriktionsenzymen vorgenommen (Sambrook et al., 1989). Dabei wurde DNA an spezifischen Erkennungsstellen von Endonukleasen geschnitten. Verändert die Mutation die spezifischen Erkennungssequenz, und somit die Schnittstelle, resultiert dies in einem veränderten Bandenmuster.

### 6.2.6.1 MseI-Verdau

Der Ansatz erfolgte mit einem Endvolumen von 15 µl:

PCR-Probe (1 µg)	10 µl
10 x NEB-Puffer 4	1,5 µl
10 x BSA (1 mg/µl)	1,5 µl
MseI (10.000 U/ml)	2 µl

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 6.2.6.2 HaeIII-Verdau

Der Ansatz erfolgte mit einem Endvolumen von 15 µl:

PCR-Probe (1 µg)	10 µl
10 x NEB-Puffer 4	1,5 µl
Hae III (10.000 U/ml)	1,5 µl
H <sub>2</sub> O-MQ	2 µl

Der Verdau erfolgte 1-2 Stunden bei 37 °C.

### 6.2.7 DNA-PAGE

Um eine genaue Unterscheidung der zum Teil sehr nahe beieinanderliegenden RFLP-Produkte zu erreichen, wurden diese in einem 6 % igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Es wurde das Elektrophoresesystem Tall Mighty Small von Hoefer für 12,5 x 10 cm lange Gelen sowie 1 x TBE als Laufpuffer verwendet.

#### 6 %iges Acrylamidgel:

AA/BA 40 % (37,5:1)	9,96 ml
H <sub>2</sub> O-MQ	25,87 ml
10 x TBE	3,636 ml
10 % APS	120 µl
TEMED	48 µl

Die Konzentration der PCR-Proben betrug in der Regel 0,05 µg/µl. 200 ng wurden auf das Gel aufgetragen. Dazu wurden die Probe mit MQ-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl gebracht und mit 2 µl Probenpuffer (O'range Loading dye, Fermentas) versetzt. Das Gel der MseI geschnittenen Proben lief bei 100 V bis die Lauffront das Gel-Ende erreicht hatte, die mit HaeIII geschnittenen Proben 30 Minuten länger.

### 6.2.8 Sybrgreen Färbung

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Moleküle wurden durch 15-minütige Inkubation bei Dunkelheit in Sybrgreen-Färbelösung (1 x Sybrgreen-Lösung in MQ-H<sub>2</sub>O; Invitrogen) angefärbt. Im Anschluss wurde bei Bedarf ein 10 minütiger Waschschrift durchgeführt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert, die quantitative Auswertung der Banden erfolgte mit dem Programm AIDA.

### 6.2.9 Szintillations-Zählung

Durch Flüssigkeitsszintillation wurde der Einbau des radioaktiven Nukleotids der Northern Blot Sonden quantifiziert. 1 µl der radioaktiven Probe wurde mit 5 ml Szintillationscocktail (Rotiscint, Roth) vermischt und gegen einen Nullwert aus reiner Scintillationsflüssigkeit gemessen.

### 6.2.10 Photometrie von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA wurden am Spektrophotometer in UV-Kunststoffküvetten durchgeführt. Als Messmedium wurde 0,2 M Tris pH 7,2 verwendet. Es wurde die Absorption bei 260 nm bestimmt sowie zusätzlich der Absorptions-Quotient 260/280 nm als Nachweis der Reinheit der Probe ermittelt. Dieser sollte nach (Sambrook et al., 1989) zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Es gilt: 1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989)

### 6.2.11 Northern Blot

RNA-Extrakte wurden zur Analyse der Expression auf 1,2 %igen Agarosegelen in einer Midi Owl Elektrophoresekammer aufgetrennt und über Nacht auf Nitrozellulosemembran transferiert.

Die Agarose wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O geschmolzen und dann MOPS und Formaldehyde laut nachfolgendem Rezept zugefügt.

1,2 %iges Agarosegel:

1,2 % (w/v)	Agarose
1 x	MOPS
2,2 M	Formaldehyd

Die Proben wurden mit Fermentas RNA Loading dye versetzt und 15 min. bei 65 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte dann in 1 x MOPS-Laufpuffer in a.a.i.-H<sub>2</sub>O für 3-4 Std. bei 80 V. Als Marker wurde Ribo Ruler high range von Fermentas benutzt.

Im Anschluss wurde das Agarosegel 2 x 10 min. in H<sub>2</sub>O geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen und durch Saugtransfer in 10 x SSC Blotpuffer über Nacht geblottet. Zur Fixierung erfolgte ein Cross-linking 1 min. 120.000 µJ/cm<sup>2</sup>

Um den Marker sowie die 28S- und 18S-rRNA sichtbar zu machen, wurde das Gel in 0,04 % Methylenblau und 0,5 M NaOAc pH 5,2 inkubiert, dann kurz in MQ-H<sub>2</sub>O entfärbt.

Nach mehrstündiger Prähybridisierung, wurde die Membran mit unterschiedlichen Sonden (Siehe Tabelle in 5.2.3) hybridisiert und auf einem P-imager Screen wie auch auf Kodak X-Ray-Filmen exponiert.

### 6.2.12 Saure denaturierende PAGE

Um Information über den Aminoacylierungs-Zustand der tRNA der unterschiedlichen Zell-Linien zu erhalten, wurde ein saures, denaturierendes Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff als denaturierendes Agens verwendet (Chomyn 1996).

Die Maße des Gels betragen 60 x 20 cm und war 1 mm dick. Alle Puffer wurden mit a.a.i.- bzw. DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

6,5 %iges saures, denaturierendes Acrylamidgel:

6,5 % (w/v)	Acrylamid (19:1)
8 M	Harnstoff
0,1 M	NaOAc (pH 5,0)
0,5 % (w/v)	APS
0,35 % (v/v)	TEMED

Vor dem Laden des Gels wurden der Harnstoff aus den Proben-Taschen entfernt. Die Elektrophorese fand unter konstanten Bedingungen bei 4 °C im Kühlraum statt. Nach einer 60 minütigen Vorlaufphase bei 30 mA erfolgte der Lauf für insgesamt 52 Stunden bei 30 mA.

Der Puffer wurde regelmäßig zweimal täglich gewechselt und ein zusätzliches Pumpsystem sorgte für eine durchgängige Umwälzung zwischen den beiden Puffertanks.

Die Proben wurden unterschiedlich vorbereitet. Zum Erhalt der aminoacylierten tRNA wurden 10 µg der RNA in 0,3 M NaOAc pH 4,5 /1 mM EDTA aufgenommen, dann das gleiche Volumen an Probenpuffer hinzugefügt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Proben zu jeder Zeit auf Eis gehalten wurden.

Ein anderer Teil der Proben wurde deaminoacyliert und dazu ebenfalls 10 µg RNA in 0,3 M NaOAc pH 4,5 /1 mM EDTA aufgenommen, dann jedoch das doppelte Volumen an 0,5 M Tris pH 9 zugefügt und 15 Min. bei 75 °C inkubiert, danach wurde die Probe wieder auf Eis gelagert. Anschließend wurden noch das 2,25-fache Volumen an Probenpuffer zugefügt. Die Proben wurden gut vermischt und mit Ladespitzen sorgfältig aufgetragen.

Nach dem Lauf wurde das untere Drittel des Gels in Höhe der Banden der beiden Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau auf 20 x 20 cm zurechtgeschnitten und in einer großen Tankblotchkammer auf Nitrocellulosemembran (Genescreen) übertragen. Als Blotpuffer wurde 0,25 x TBE verwendet, Laufzeit betrug 15 min. bei 150 mA dann 30 min. bei 500 mA.

Nach dem Blotten wurde die Membran auf Whatmanpapier transferiert und in einem UV-Crosslinker 1 min. mit 120000 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

Die Membran wurde dann über Nacht bei 55 °C hybridisiert.

### 6.2.13 Native PAGE

Zur Analyse der tRNA unter nativen Bedingungen wurde ein 1,5 cm dickes, 20 x 20 cm großes 8 %-iges Polyacrylamidgel eingesetzt. Alle verwendeten Puffer wurden speziell für das Arbeiten mit RNA nur mit a.a.i.-H<sub>2</sub>O bzw. DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt. Das Gel lief ca. 4 h bei 20 mA in einer gekühlten OWL Gelkammer, als Laufpuffer wurde 1 x TBE benutzt.

#### 8 %-iges natives Acrylamidgel:

1 x TBE

8% Acrylamid (29:1)

1,4 % TEMED

0,35 % APS

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennte tRNA wurde mittels Elektroblothing auf eine Nitrocellulosemembran (Genescreen) übertragen. Als Blot-Puffer wurde 0,25 x TBE eingesetzt, in dem zuvor Schwämme, Membran sowie das Whatmanpapier equilibriert wurden. Der Transfer erfolgte zuerst bei 15 Minuten bei 150 mA, anschließend 30 Minuten bei 500 mA.

Zur Fixierung der tRNA auf der Membran erfolgte eine UV-Bestrahlung von 120 mJ/cm<sup>2</sup> für 1 min. im UV-Crosslinker (Sambrook et al., 1989).

#### 6.2.14 Random primed Labeling (RPL) der PCR-Sonden

Bei den Sonden, die zur Hybridisierung des Northern Blots verwendet wurden, handelt es sich um aufgereinigte PCR-Produkte, die intern mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP markiert wurden. Dazu wurde das Random primed labeling (RPL)-Kit von Roche gemäß Anleitung verwendet, für die nachfolgende Aufreinigung das Nucleotide Removal Kit von Clontech. Der erfolgreiche Einbau von Radioaktivität wurde im Szintillationszähler verifiziert. Die Sonde wurde in 10 ml Hybridisierungslösung gegeben und vor der Verwendung 5 min. im Wasserbad aufgeköcht.

#### 6.2.15 Hybridisierung

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für 10 Stunden in ca. 10 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C unter ständiger Rotation im Drehofen.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei sondenspezifischer Temperatur.

Der Blot wurde der Glasröhre entnommen und zweimal für je 15 Minuten in niedrigstringenter Waschlösung bei 55 °C, dann erfolgte, falls notwendig, ein zusätzlicher Waschschrift mit Waschlösung I. Diese enthält eine niedrige Salzkonzentration, die eine starke Ablösung der unspezifisch gebundenen radioaktiven Sonde bewirkt, Waschlösung II hat eine hohe Salzkonzentration und bewirkt damit eine schwächere Abtrennung der Sonde. Der Blot wurde in Folie eingeschweißt und exponiert.

#### 6.2.16 RNase-Protection Assay

Ribonuclease Protection Assay (RPA) ist eine hochsensitive und spezifische Methode zur Detektion von RNA-Spezies. Der Ansatz basiert auf der großen Geschwindigkeit und der hohen Bindungseffizienz an die korrespondierenden Promotoren der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen SP6, T7 und T3. Ein cDNA-Fragment wird dazu hinter den Bakteriophagenpromotor in ein Plasmid geklont und kann so als Vorlage für die Synthese radioaktiv markierter anti-sense RNA-Sonden verwendet werden. Diese Sonde wird dann zu einer RNA-Probe gegeben und bildet ein Doppelstrangmolekül mit der komplementären Sequenz des zu detektierenden RNA-Moleküls. Ein darauffolgender RNase-Verdau mit den Enzymen RNase A und T1 führt zu einem vollständigen Abbau einzelsträngiger RNA. Übrig bleibt die gesuchte RNA-Spezies, die in einem Acrylamidgel aufgetrennt und radioaktiv detektiert und somit einer quantitativen Analyse zugeführt werden kann.

### 6.2.16.1 Sonden-Herstellung und -Markierung

Die Synthese der Sonden erfolgte durch die Transkription von Plasmid Template DNA mit RNA Polymerase aus Bakteriophagen SP6 bzw. T7. Die Plasmide pHL2/XbaI und pH2/EcoRI, die die Sequenz der Gene für tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> bzw. tRNA<sup>Glu</sup> inklusive der 5'Leader- und der 3'-Trailersequenz enthielten, wurden von Prof. Walter Rossmanith zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide waren mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen bereits geschnitten worden, zudem enthielten sie unterschiedliche Transkriptionspromotoren so dass zur Synthese des Transkripts bei pHL2 die T7-RNA-Polymerase und bei pH2 die SP6 RNA-Polymerase verwendet wurde. Folgender Transkriptionsansatz wurde vorbereitet und mit 1 µl Plasmid (50 ng/µl) bei 39 °C für 90 Minuten inkubiert.

#### ***In vitro*-Transkriptionsansatz**

0.5 µl	H <sub>2</sub> O
2.0 µl	5 x <i>in vitro</i> -Transkriptionspuffer (Promega)
1.0 µl	5 mM ACG-Mix
0.5 µl	Rnasin plus 40 U/µl
4.0 µl	[α <sup>32</sup> P]-UTP 800 Ci/mmol
1.0 µl	T7 RNA-Polymerase (Fermentas) 20 U/µl bzw. SP6 RNA-Polymerase (Promega) 20 U/µl
9.0 µl	Σ

Die Reaktion wurde mit 50 µl Guanidinium-Mix gestoppt und 2.5 µl Lineares Polyacrylamid zugegeben. Die Transkripte wurden mit 150 µl 100 % Ethanol über Nacht bei 4°C gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g wurde die RNA mit 70 % Ethanol präzipitiert, pelletiert und luftgetrocknet. Zur Lösung des Pellets in F2-Probenpuffer erfolgte eine Inkubation 10 Minuten bei 60 °C dann 3 Minuten bei 90 °C im Thermomixer.

### 6.2.16.2 Gelextraktion der markierten *in vitro*-Transkripte

Ein 8 %iges Harnstoff-Polyacrylamidgel diente zur Aufreinigung der Sonden und der Abtrennung nicht eingebauter radioaktiver Nukelotide. Das 1 cm dicke Gel wurde für einen 10 minütigen Vorlauf bei 600 V gestartet. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE, der Harnstoff wurde vor Auftragung der Proben aus den Ladetaschen entfernt. Das Gel lief 20 Minuten bei 200 V zum Probeneinlauf und dann ca. 1,5 Stunden bei 600 V.

Zum Ausschneiden der Sonden wurden diese zuerst mit Hilfe des Phosphorimager Screens lokalisiert und dann mit einem Skalpell aus dem Gel herausgenommen und in ein mit Elutionspuffer vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt und wahlweise über Nacht bei Raumtemperatur oder 2-3 Stunden bei 45 °C inkubiert. Das Eluat wurde dann in eine neues Reaktionsgefäß überführt und die Radioaktivität mit dem Geigerzähler abgeschätzt.

#### 6.2.16.3 Probenvorbereitung

DNase-Verdau der RNA-Proben erfolgte nach folgendem Protokoll:

<b>DNase-Digestion-Mix</b>	<b>26 x</b>
1 M Tris pH 7.6	0,2 µl
100 mM DTT	0,5 µl
1 M MgCl <sub>2</sub>	0,05 µl
10 µg/µl <i>S. cerevisiae</i> tRNA	0,5 µl
RNAsin 40 U/µl	0,2 µl
DNase I 10 U/µl	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	5,35 µl

7 µl des Verdau-Ansatzes wurden mit 1 µg RNA verdünnt in 3 µl bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Ein Volumen der Probe, die ca. 60.000 Zerfälle pro Minute (cpm) entspricht wurde entnommen, die Reaktion mit GUA-Mix gestoppt, LPA hinzugegeben und 100 % Ethanol 30 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert, dann zentrifugiert. Das mit 70 %igen Ethanol gewaschene Pellet wurde nach dem Trocknen in 10 µl Hybridisierungspuffer 10 Minuten bei 45 °C im Thermoschüttler gelöst. Dann wurden die Proben 5 Minuten auf 90 °C erhitzt und bei 45 °C über Nacht inkubiert.

#### Hybridisierungspuffer

80 %	Formamid
40 mM	PIPES (pH 6,4)
1 mM	EDTA
400 mM	NaCl

Auf die Proben wurde 100 µl, auf die Negativ-Kontrolle 110 µl RNase Restriktionspuffer gegeben, dann bis auf die Kontrolle 10 µl RNase-Mix hinzugefügt und 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nachfolgend erfolgte die Deaktivierung der Enzyme durch 30 Minuten Inkubation bei 37 °C mit 6 µl 10 % SDS und 4 µl Proteinase K (10 mg/ml).

RNase-Restriktionspuffer:

600 mM	NaCl
10 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
5 mM	EDTA

RNase-Mix:

300 µl	RNase Restriktionspuffer
1 µl	RNase A (50 U/ml)
2 µl	T1-RNase (366 U/ml)

Die Nukleinsäurepräzipitation erfolgte durch Zufügen von 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol. Durch die 10 minütige Zentrifugation bei 22.000 x g wurden die Proben durch Trennung in zwei Phasen aufgereinigt. Die obere Phase, die die Nukleinsäuren enthielt wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 10 µl F2-Probenpuffer bei 45 °C gelöst und dann 3 Minuten bei 90 °C denaturiert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie zuvor beschrieben mit einem 8%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel. Das Gel wurde 40 Minuten bei 80 °C im Vakuum-Geltrockner getrocknet und auf Phosphorimager-Screen exponiert.

### 6.2.17 Real time qPCR

Für die Real-Time qPCR wurden RNA-Extrakte mit einer Konzentration von 0,25 µg/µl verwendet, die zur Vermeidung möglicher DNA-Verunreinigungen zuerst DNase verdaut wurden.

DNase-Verdau

1 x	DNase-Puffer
1 U/µl	RNase-Inhibitor (Rnasin)
0,07 U/µl	DNase I (RNase-frei)

Die Proben wurden bei jedem nun folgenden Schritt wegen der geringen Volumina kurz abzentrifugiert und immer in einem Eisbad abgekühlt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde 1 µl 10 mM EDTA (Endkonzentration 2 mM) zugegeben und 5 Minuten bei 90 °C gekocht. Die cDNA Synthese wurde dann nach 5 minütiger Inkubation bei 70 °C mit dem zugegebenen Primer mit folgendem Protokoll durchgeführt:

cDNA-Synthese:

1 x	RevertAid M-MuLV reaction buffer
0,5 U/ $\mu$ l	dAGCT mix
0,5 U/ $\mu$ l	RNase-Inhibitor (RNasin)
10 U/ $\mu$ l	RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase

Die Inkubation erfolgte für 90 Minuten bei 42 °C. Dann wurden die Proben 1:100 mit 0,5 x TE-Puffer auf eine Konzentration von 1,25  $\mu$ g/ml verdünnt und weitere 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert.

Die Real-Time qPCR wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten in einem MX3005P Thermocycler von Stratagene durchgeführt und mit der MX Pro Software ausgewertet.

### 6.2.18 Autoradiographie

Die Detektion radioaktiver Sonden auf Northern Blots sowie Chemilumineszenz Meerettich-Peroxidase assoziierter Antikörper auf Western Blots erfolgte über Autoradiographie mit hypersensitiven Filmen. Zusätzlich wurden Northern Blots zur quantitativen Auswertung auf P-imager screens exponiert, zur Maximierung des Signals auch bis zu mehreren Tagen bei –80 °C.

Die Expositionsdauer der Immunfluoreszenz-markierten Proteine war stark vom jeweiligen Antikörper abhängig und variierte zwischen 3 Sekunden und 24 Stunden. Die Expositionsdauer der radioaktiven Proben lag zwischen 12 Stunden und 2 Tagen.

## 6.3 Proteine

### 6.3.1 Protein-Extraktion

Zellen wurden zwei mal mit PBS gewaschen und 5 Minuten bei 200 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einem zweifachen Volumen Totex-Puffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis unter wiederholtem Vortexen inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben über Nacht bei –80 °C gelagert, am folgenden Tag auf Eis aufgetaut und wiederum 10 Minuten wiederholt bei 4 °C inkubiert und gevortext. Die ungelösten Zellbestandteile wurden bei 15.000 x g, 4°C für 10 Minuten in der gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert, das Zelllysate abgenommen und bei –20 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde, anhand einer 0-10  $\mu$ g/ml BSA-Eichreihe, mit dem Biorad Protein Assay nach (Bradford, 1976) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät, ermittelt. Der die Absorption beeinflussende Extraktionspuffer, wurde zum Ausgleich der Eichreihe und dem Blindwert in entsprechender Menge zugefügt.

### 6.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die denaturierende Auftrennung der Proteine nach (Laemmli, 1970). wurde das Hoefer Elektrophoresesystem Tall Mighty Small für 10 x 10,5 cm große Gele verwendet. Die Dicke der Gele betrug 1 mm, das Sammelgel enthielt 4 %, das Trenngel 12,5 % Acrylamid.

	<b>Trenngel 12,5 % (30 ml)</b>	<b>Sammelgel 4 % (15 ml)</b>
H <sub>2</sub> O	4,24 ml	3,12 ml
AA/BA 40 % (37,5:1)	3,14 ml	0,48 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	2,5 ml	1,2 ml
TEMED	6,6 µl	4,8 µl
APS 10 %	100 µl	24 µl

Die Proben wurden mit Lämmli Probenpuffer versetzt und 10 min. bei 90 °C aufgeköcht und im Anschluss auf Eis gelagert. In der Regel wurden 40 µg Protein aufgetragen.

Die Elektrophorese lief unter konstanten Bedingungen bei 15-20 mA in Lämmli-Laufpuffer. Im Anschluss wurden die Proteine auf Whatmanpapier übertragen und im Vakuumtrockner 2 Stunden bei 80 °C getrocknet.

### 6.3.3 Immunoblotting

Das Blotting fand unter konstanten Bedingungen für 90 Minuten bei 20 mA statt. Bei der verwendeten Membran handelte es sich um eine Nitrocellulosemembran (Genescreen).

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulose werden zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Dazu wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5 % Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Alle Antikörper wurden in 5 % Magermilchpulver in TBS-T wie angegeben verdünnt (siehe Tabelle in 5.2.5).

Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C unter stetiger Rotation. Vor und nach Inkubation und Blockierung erfolgten jeweils Wachschriffe mit TBS-T für insgesamt bis zu 40 Minuten.

Um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wird ein Spezies-spezifischer Sekundär-Antikörper verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase [horse raddish peroxidase (HRP)-Konjugat (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)] gekoppelt ist. Er wurde 1,5 Stunden auf der Membran belassen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe verstärkter Chemolumineszenz.

Hierfür wurden je 1 ml Luminol-Reagenz und oxidierendes Reagenz auf die Membran gegeben und für genau zwei Minuten inkubiert. Das oxidierte Luminol dient nun als Substrat der Meerrettich-Peroxidase und wird zu einem Fluoreszenzlicht-emittierenden Produkt umgesetzt, das durch Auflegen eines Röntgenfilmes (BIOMAX™, Kodak, Fernwald) nachgewiesen werden kann. Die Expositionsdauer variiert dabei sehr stark zwischen drei Sekunden und 24 Stunden in Abhängigkeit von eingesetztem Antikörper und Qualität des Blots.

#### 6.3.4 Blot-Stripping

Um gebundene Erst- und Zweit-Antikörperkomplexe von der Blot-Membran abzulösen und damit eine erneute Antikörper-Inkubation zu ermöglichen, wurde diese für 30 Minuten bei 55°C im Wasserbad unter permanenten Schütteln in ausreichend Stripping-Puffer inkubiert. Danach erfolgten ein Waschschriff mit TBS-T und ein erneutes Blockieren über Nacht mit 5 %iger Milch in TBS-T.

#### 6.3.5 Tricin-SDS-PAGE

Die Verwendung von Tricin-SDS-Gelen ermöglichte eine verbesserte Auflösung von Proteinen im niedermolekularen Bereich. Insbesondere Membranproteine wurden gleichmäßig gut und mit hoher Bandenschärfe aufgetrennt. Dazu wurde eine Kammer mit zwei getrennten Pufferbehältern benötigt.

Anodenpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS

Acrylamid: 30 % (v/v) AA/BA 29:1

Puffer: 3 M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % (w/v) SDS

2 x Probenpuffer: 0,9 M Tris/HCl pH 8,45, 0,24 % (v/v) Glycerol, 0,08 % (v/v) SDS, 0,015 % (w/v) Coomassie, 0,005 % (w/v) Phenolrot

10% iges Tricingel:		4%iges Sammelgel
10 ml	AA/BA 30 % (v/v) 29:1	1,25 ml
10 ml	Puffer	2,5 ml
3,1 ml	Glycerol	-
6,8 ml	MQ-H <sub>2</sub> O	6,25 ml
100 ml	10 %APS	50 µl
40 µl	TEMED	20 µl

Die Proben wurden mit 2 x Probenpuffer versetzt, 5 min. bei 90 °C inkubiert, kurz auf Eis gekühlt und aufgetragen. Der Einlauf der Proben ins Sammelgel fand bei 30 mA statt. Das Gel lief dann bis zu 3 Stunden bei konstant 60 mA, bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte.

## 6.4 Biochemische und physiologische Messungen

### 6.4.1 Wachstum

Zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate wurden jeweils 20.000 Zellen in 6-Loch-Platten (Fläche/well: 9,62 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Zellzahl wurde jeden Tag zur gleichen Zeit am Casy-Zellzählgerät in Dreifachbestimmung ermittelt. Ein Mediumwechsel erfolgte täglich. Die Verdopplungszeit wurde mit folgender Formel bestimmt:  $t_D = \ln 2/b$ ,

wobei b der Exponent der halblogarithmischen Kurve aus der Auftragung von Zellzahl gegen die Zeit ist.

### 6.4.2 Laktat-Messung

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden zu gleichen Zellzahlen in 6-Loch-Platten ausgesät, dabei handelte es sich jeweils um eine Dreifachbestimmung der Zellen für einen 0-Stunden Kontrollwert und einen 24-Stunden-Messwert der Anreicherung von Laktat im Medium pro Zellzahl. Den Zellen wurde zuerst 24 Std. Zeit gegeben um an der Zellkulturschale anzuwachsen. Dann wurde bei den sogenannten "0-Stunden"-Proben die Zellzahl bestimmt und bei den "24-Stunden"-Proben das Medium erneuert. Diese Zellen inkubierten weitere 24 Stunden und wurden dann nach Entnahme einer Mediumprobe ebenfalls gezählt.

Die Mediumproben wurden dann mit einem automatischen Blutanalysesystem (Institut für Experimentelle Medizin, Universität Köln, Prof. J.H. Fischer) gemessen, auf die zuvor ermittelte Zellzahl normiert und statistisch ausgewertet.

### 6.4.3 Adeninnukleotid-Bestimmung

Zellen wurden für eine fünffach-Bestimmung des Adeninnukleotidgehalts so ausgesät, dass die 10 cm-Schalen nach 24 Stunden ca. 90 % konfluent waren. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Schale auf Eis platziert. 500 µl einer Perchlorsäure-Lösung (3 M PCA, 1 mM EDTA) wurden auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber innerhalb weniger Sekunden abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und unmittelbar in Flüssigstickstoff schockgefroren. Zur Weiterbehandlung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 15 min. bei 21.000 x g bei 4 °C zentrifugiert.

Die Nukleotid-Messung erfolgte mit dem sauren Überstand, der dazu zuerst durch Gabe entsprechender Mengen 2 M KOH-Lösung neutralisiert, die ausgefallene Lauge abzentrifugiert und der resultierende Überstand quantifiziert wurde. Der Nukleotidgehalt der Proben wurde im Institut für Experimentelle Medizin der Universität Köln von Herrn Dr. Fischer in einer Reversed-Phase-HPLC ermittelt.

Das Pellet diente zur Bradford-Bestimmung, da die Proteinkonzentration als Referenz zu den Nukleotidmessungen benötigt wurde. Dazu wurden zuerst die Pellets in je 200 µl 0,1 M NaOH über Nacht bei Raumtemperatur gelöst. Dieses Lysat wurde ebenfalls an der Feinwaage gewogen und dann die Proteinkonzentration quantifiziert. Dabei wurde bedacht, die entsprechende Menge an NaOH-Lösung auch der Eichreihe und dem Blindwert zuzufügen. Es wurde die Adeninnukleotidkonzentration pro mg Protein, die Energieladung ECP (Energy Charge Potential) (der molare Gehalt an hoch energetischen Bindungen in der Adeninnukleotid-Fraktion) der Zelle mit der Formel  $ECP = \frac{[ATP + 0,5 \times ADP]}{TAN}$  sowie der gesamt Adeninnukleotidgehalt TAN (Total Adenine Nucleotides) mit  $TAN = ATP + ADP + AMP$  errechnet.

### 6.4.4 RNA-Prozessierungs-Assay

#### 6.4.4.1 Herstellung von Mitochondrien-Extrakten

Mit der MACS-Beads-Methode (siehe 6.5.2) isolierte Mitochondrien wurden zuerst mit einer bestimmten Menge an Puffer A (ca. 30 µl/10<sup>7</sup> Zellen) durch Pipettieren gelöst, dann mit dem gleichen Volumen an Puffer B lysiert. Die Extrakte inkubierten 10 min. bei wiederholtem Vortexen und wurden dann 10 min. bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Alle Schritte fanden bei 4 °C statt.

**Puffer A**

20 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
15%	Glycerin
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.2%	Proteinase inhibitor cocktail

**Puffer B**

200 mM	KCl
20 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
15%	Glycerin
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0.2%	Proteinase inhibitor cocktail
2%	Tween-20

**6.4.4.2 *In vitro*-Transkription und radioaktive Markierung**

Als Substrat für den Nachweis des RNase-Restriktion dienen *in vitro*-Transkripte und Plasmide, die von Prof. Rossmannith aus Wien zur Verfügung gestellt wurden.

Die *in vitro* transkribierte mitochondriale pre-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> von 156 nt Länge enthielt 35 nt einer poly-linker-Sequenz, gefolgt von 12 3' terminalen Nukleotiden der 16S-rRNA, der Sequenz der tRNA und endete mit einer Rsa I Restriktionsstelle 34 Nukleotide hinter dem 3'-Ende der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> in Bereich der NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1 (ND1).

Zum Vergleich der tRNA-Prozessierung wurde ein weiteres Transkript der tRNA für Glutamat hergestellt.

Die *in vitro*-Transkription wurde gemäß nachfolgendem Rezept durchgeführt.

<b>Transkriptions-Mix</b>	
0,5 µl	H <sub>2</sub> O
2,0 µl	5 x <i>in vitro</i> -Transkriptionspuffer
1,0 µl	5 mM ACG-Mix
0,5 µl	RNasin plus 40 U/µl
4,0 µl	α <sup>32</sup> P-UTP 800 Ci/mmol
1,0 µl	T3 RNA-Polymerase 17 U/µl oder SP6 RNA-Polymerase (Promega) 20 U/µl

Zu einem Mikroliter Plasmid wurden neun Mikroliter Transkriptions-Mix hinzugefügt und 90 Min. bei 39 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Guanidinium-Mix (4 M Guanidine thiocyanate, 1 M NH<sub>4</sub>·acetate, 10 mM EDTA) gestoppt und 5 % lineares Polyacrylamid als Trägermaterial für die eingesetzten kleinen Volumina beigemischt. Das Transkript wurde über Nacht mit 100 % Ethanol präzipitiert und im Anschluss mit 70 %-igem Ethanol gefällt.

#### 6.4.4.3 Gelextraktion der markierten Sonde

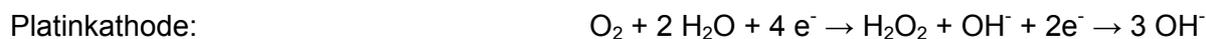
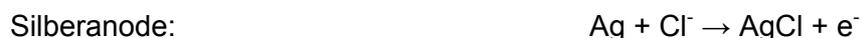
Das Pellet wurde in Ladepuffer gelöst, aufgeköcht und, nach 10 Min. Vorlauf bei 600 V, auf ein 8 %iges Urea-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Einlauf der Proben ins Gel erfolgte bei 200 V, dann lief das Gel weitere 90 Minuten bei 600 V. Schließlich wurden die Banden zuerst durch eine kurze Exposition auf dem Phosphorimager-Schirm lokalisiert und dann ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß mit Elutionspuffer (0,5 M NH<sub>4</sub>Ac, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS) gegeben und 2-3 Stunden bei 45 °C im Schüttler inkubiert.

#### 6.4.5 Polarographie

##### 6.4.5.1 Allgemeiner Aufbau und Funktionsweise der Apparatur

Der zur Messung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen verwendete Polarograph (Hansatech) ist nach dem Prinzip der Clark-Elektrode aufgebaut, dabei befinden sich in einer Messkammer eine Platin-Kathode und eine Silber/Silberchlorid-Anode in einer KCl-reichen Elektrolytlösung.

Durch Anlegen einer polarisierenden Spannung wird der Elektrolyt ionisiert, folgende elektrochemische Reaktionen finden statt:



Der Sauerstoff wird an der Kathode zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und weiter zu OH<sup>-</sup>-Ionen reduziert. An der Anode findet eine Oxidation von Silber zu Silberchlorid statt. Daraus resultiert ein Strom, dessen Stärke proportional zu der Sauerstoffkonzentration in der Lösung ist.

Das Reaktionsvolumen betrug 250 µl. Die Messungen erfolgten in einer luftdicht verschlossenen und auf 37 °C temperierten Kammer bei gleichmäßigem Rühren mit 850 U/min. Eine Nullwert Eichung wurde vorab durch Hinzufügen von Natriumdithionit, das O<sub>2</sub> vollständig reduziert, durchgeführt.

Die Ausgangskonzentration des verwendeten Puffers entsprach der einer voll gesättigten Lösung und lag so bei 37 °C bei einem Wert von ca. 216 nmol O<sub>2</sub>/ml. Die Clark-Elektrode ist bei der verwendeten Apparatur durch eine sauerstoffdurchlässige PTFE-Membran mit der Reaktionskammer verbunden. Die Zugabe der Substrate und Chemikalien erfolgte über eine Mikroliterspritze. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Messkammer mehrfach mit MQ-Wasser und 70 % Ethanol gespült. Die Werte wurden an einem Linseis Plotter aufgezeichnet und mit Excel ausgewertet.

#### 6.4.5.2 Polarographische Messung von Zellen

An zwei Clark-Elektroden wurde der Sauerstoffverbrauch intakter Zellen anhand der Verstoffwechslung endogener Substrate ebenso wie der Sauerstoffverbrauch von mit Digitonin permeabilisierten Zellen bei externer Zugabe verschiedener Substrate gemessen.

Die Zellen wurden bis Erreichen von ca. 80% Konfluenz kultiviert. 24h vor der Ernte erfolgte ein Mediumwechsel, um die Zellen optimal mit Nährstoffen anzureichern. Das zur Messung eingesetzte Pellet enthielt schließlich ca.  $10^6$ - $10^7$  Zellen und wurde in PBS resuspendiert. Die genaue Zelldichte in der Suspension wurde mit dem Casy Counter Zellzählgerät bestimmt.

Die Messungen wurden nach der von Rustin et al. beschriebenen Methode in zwei Messkammern durchgeführt (Rustin et al., 1999).

Die erste Messung der permeabilisierten Zellen diente der Analyse der Pyruvatoxidation via Komplex I (MPox), welche neben der Atmungskette auch die Pyruvatdehydrogenase und den Krebszyklus umfasst. Geringe Mengen an Malat (50 mM) zur Aufrechterhaltung des Citratzyklus und NAD<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor werden hinzugegeben, um eine Limitierung der Sauerstoffverbrauchsraten durch diese Reagentien auszuschließen. Der ermittelte Messwert entspricht *state 4* der Atmung, also der Zustand nach vollständiger Phosphorylierung des zur Verfügung stehenden ADPs. Durch externe Zugabe von ADP erfolgt dann ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, der als *state 3* bezeichnet wird. Aus diesen Parametern erhält man Rückschlüsse auf den Respiratorischen Kontrollindex (RCI) ( $\text{state3}/\text{state4}$ ), der eine Aussage über die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Bildung ermöglicht. Bei Schäden der mitochondrialen Innenmembran ist er verändert, da durch den entstehenden Protonenrückfluss ohne ATP-Synthese eine erhöhte State 4-Atmung zu verzeichnen wäre. Je kleiner der Zahlenwert ist, desto geringer ist der Kopplungsgrad, bzw. desto ausgeprägter ist die Schädigung der inneren mitochondrialen Membran.

Schließlich erfolgte die Messung der Malat-Glutamat-Oxidation (MGox) mit der Gabe von jeweils 500 mM Malat und Glutamat. Die Verbrennung von Malat erfolgt über den Citratzyklus durch die Umwandlung zu Oxalacetat. Die Zugabe von Glutamat bewirkt, dass Oxalacetat nicht als Endprodukt akumuliert, sondern über die Aspartat-Aminotransferase weitermetabolisiert wird. Ein auffälliger Wert bei der MPox-Messung bei einem normalen MGox-Wert kann somit Rückschlüsse auf einen Defekt der Pyruvatdehydrogenase geben.

KCN ist ein Inhibitor des Komplex IV und erlaubt den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von den extramitochondrialen, in der Zelle sauerstoffverbrauchenden Vorgängen zu separieren. Die KCN-insensitive Atmung beruht dabei größtenteils auf Oxidase und Oxygenasereaktionen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle.

Die zweite Messreihe dient der Analyse der vier nachfolgenden Komplexe der Atmungskette mit Ausnahme von Komplex I. Dieser wird dazu durch Rotenon inhibiert. Die Zugabe von ATP bewirkt zum einen die Aktivierung des Komplex V über die extramitochondriale Umwandlung zu ADP und führt gleichzeitig zu einer Deplatziierung von Oxalacetat, das sonst als natürlicher Antagonist die Succinatdehydrogenase inhibiert. Die Einspeisung der Elektronen des Substrats Succinat erfolgt nun via Komplex II.

Die Hemmung von Komplex V durch Oligomycin bewirkt einen Abfall der Atmungskettenaktivität durch einen Rückstau an  $H^+$  im intermembranären Spalt der Mitochondrien.

Erst durch physikalische Entkopplung der inneren Membran durch CCCP wird diese durchlässig für  $H^+$ , der Rückstau wird wieder abgebaut und führt zu einer Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs. Dieser wird nun als Succinatoxidation (Sox) gemessen. Auch hier erlaubt der Vergleich der Oxidationsraten nach Gabe von Oligomycin mit der nach Entkopplung durch CCP Rückschlüsse auf die Kopplung von Oxidation und Phosphorylierung und ebenfalls auf die Integrität der inneren mitochondrialen Membran.

Blockiert man nun Komplex II mit dem spezifischen Inhibitor Malonat, kann die Atmungskette ab Komplex III untersucht werden. Glycerin-3-Phosphat schleust Elektronen über die G3P-Dehydrogenase in den Pool der Quinone und damit die Atmungskette ein. Diese  $O_2$ -Verbrauchsrate (GPox) gibt daher Rückschlüsse über den Verbrauch von G3P-DH, Komplex III und IV der Atmungskette.

Zu der Zellsuspension in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l wurden die Reagenzien in unten aufgelisteten finalen Konzentration zugefügt. Der Sauerstoffgehalt in der Reaktionskammer mit einem Volumen von 250  $\mu$ l Zellsuspension betrug 54 nmol.

#### 1. Messung: MPox, MGox:

10 mM Pyruvat, 0,2 mM Malat, 1 mM  $NAD^+$ , 10 mM Malat, 10 mM Glutamat, 1,5 mM KCN

#### 2. Messung: Sox, GPox:

10 mM Succinat, 0,6 mM ATP, 4  $\mu$ M Rotenon, 3  $\mu$ M Oligomycin, 2,5  $\mu$ M CCP, 10 mM Malonat, 10 mM Glycerin-3-Phosphat, 1,5 mM KCN

Die Darstellung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte graphisch auf Millimeterpapier über einen Schreiber/Plotter. Dabei bedeutete in dem Diagramm mit der Zeit in Sekunden auf der X-Achse sowie Sauerstoff in nmol auf der Y-Achse, ein steiler Anstieg der Steigung einen starken Sauerstoffverbrauch und ein Abflachen der Kurve eine niedrige Aktivität der Atmungskette bis hin zum völligen Stillstand nach Zugabe der Inhibitoren.

#### 6.4.5.3 Polarographische Messung an isolierten Mitochondrien

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs diente zum Nachweis der Funktionalität und Unversehrtheit isolierter Mitochondrien. Wiederum wurden die einzelnen Komplexe der Atmungskette über die Oxidation verschiedener Substrate näher analysiert.

Die Mitochondrien-Isolation erfolgte dafür an RDWT-Zybriden nach der MACS-Beads-Methode (siehe 6.5.2). Die Mitochondrien-Suspension (4,5 µg/µl) wurde über die Messung des Proteingehalts quantifiziert.

Bei der ersten Messreihe wurden 20 µg, in der zweiten 50 µg in einem Gesamtvolumen von 250 µl an Messmedium E eingesetzt. Die Abfolge der Substrate war identisch zu der Messung intakter Zellen, nur dass hier auf die Zugabe von Digitonin verzichtet wurde, da es sich ja um isolierte Mitochondrien handelte.

#### 6.4.6 Spektrophotometrie

Die spezifische Auswirkung von Mutationen der mitochondrialen DNA auf einzelne Komplexe der Atmungskette kann durch spektroskopische Aktivitätsmessungen an durch einen Gefrier-Tau-Schritt gewonnenen Zelllysaten untersucht werden. Im Gegensatz zur Methode der Polarographie können hier durch definierte gekoppelte Assays einzelne Atmungskettenkomplexe unabhängig voneinander angesprochen werden und die quantitative Umsetzung eines Substrates spektrophotometrisch erfasst werden.

Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % herangezogen und das Medium 24 Stunden vor der Ernte erneuert. Das resultierende Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und die genaue Zellzahl der Suspension mit dem Zellzählgerät bestimmt.

Der Versuch wurde an einem Varian Cary 50 Scan Spektrophotometer (Varian Inc. Spectroscopy Instruments, Mulgrave, Australien) durchgeführt und umfasste die Messung der Aktivität der Succinat-Ubichinon-Dichlorphenol Indophenol-Reduktase (KII), Succinat-Cytochrome c-Reduktase (KII+KIII), Decylubichinon-Cytochrom c-Reduktase (KIII) und Cytochrom c- Oxidase (KIV). Zusätzlich wurden die Aktivität der Enzyme des Citratzyklus, Aconitase, Citrat-Synthase und Fumarase erfasst.

Die Werte der Spektrophotometrischen Messung wurde auf die Proteinkonzentration der Probe bezogen, die jeweils im Anschluss nach der Bradfordmethode ermittelt wurde. Alle Messungen wurden nach der in Rustin et al. veröffentlichten Methode durchgeführt (Rustin et al., 1999).

Die Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität in Mitochondrienextrakten, die zur Untersuchung der tRNA-Prozessierung mit den in 6.4.4 beschriebenen RNA-Prozessierungs-Essays eingesetzt wurden, erfolgte an einem Beckmann DU-600 Spektrophotometer (Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA).

Die Citrat-Synthase ist das am häufigsten benutzte Markerenzym der Mitochondrienmatrix. Bei einer Schädigung tritt das Enzym aus dem Mitochondrium aus und ist daher auch ein wichtiger Indikator für die Integrität der Mitochondrien.

#### 6.4.6.1 Hoechst 33342-Färbung

Die Zellkerne von Muskelzellen fusionieren im Zuge ihrer Entwicklung von Myoblasten zu Myotuben

Der Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 wurde als Nachweis der Differenzierung durch Anfärben der Zellkerne der verschiedenen Rhabdomyosarkomzelllinien nach Behandlung mit dem Differenzierung induzierenden Agens TPA eingesetzt.

Die vorbehandelten Zellen wurden auf der Kulturschale kurz mit PBS gewaschen und mit einem Überschuss an 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach 10 bis 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten drei weitere Waschschrte.

Der in PBS vorverdünnte Hoechst 33342-Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M auf die Zellen gebracht und 30-60 Minuten inkubiert. Bevor das Mounting Medium aufgetragen wurde, erfolgten drei weitere Waschschrte mit PBS. Die Messung erfolgte an einem Inversen Fluoreszenzmikroskop bei 461 nm Wellenlänge. Vor und zwischen der Prozedur blieben die Zellen lichtgeschützt bei 4 °C.

#### Mounting Medium:

2,4 g	Polyvinylalkohol (Mowiol)
6 g	Glycerol
6 ml	H <sub>2</sub> O
12 ml	0,2 M Tris (pH 8,5)
2,5 %	1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octan

## 6.5 Mitochondrien-Extraktion

### 6.5.1 Herstellung von Lysaten aus Gewebe

Humaner Adduktoren-Muskel aus dem Oberschenkel wurden von der Klinik für Orthopädie der Universität Köln zur Verfügung gestellt. Die Probe wurde sofort nach Entnahme auf Eis in MACS-Puffer 1 überführt und gewaschen. Fett und anderes Gewebe wurden mit einem Skalpell entfernt und abgewaschen und der Muskel in kleine Stücke geschnitten. Der anschließende Proteolyse mit MACS-Puffer 2 erfolgte im Kaltraum bei 30 minütiger Rotation. Die nachfolgende 5 minütige Zentrifugation bei 200 x g ergab ein Pellet, das zur weiteren Homogenisierung 1:5 bis 1:10 mit Homogenisierungspuffer resuspendiert und mit dem Elektropotter mit 10 Stößen bei 1.600 rpm zerkleinert wurde. Dieser wurde dann bei 1.000 x g 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das verbleibende Pellet noch einmal in Homogenisierungspuffer resuspendiert und gepottet. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereint und die Mitochondrien 10 Minuten bei 8.000 x g bei 4 °C pelletiert.

Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen an Waschpuffer resuspendiert und ein Aliquot für die Proteinbestimmung entnommen. Die restlichen Mitochondrien wurden daraufhin mit Inkubationspuffer auf eine Konzentration von 200 µg/ml Protein verdünnt.

$4 \times 10^7$  Zellen wurden in 15 cm Schalen herangezogen, mit PBS gewaschen und nach 5 minütiger Inkubation mit Trypsin geerntet. Das Zellpellet wurde dann in PEB-Puffer resuspendiert und, wie in 6.5.2 beschrieben, weiter verwendet.

#### PEB-buffer:

1 x	PBS (-Mg,-Cl)
2 mM	EDTA
0,5 %	BSA (fatty acid free)

### 6.5.2 Mitochondrien-Extraktion

Zur hocheffizienten und schnellen Isolierung von Mitochondrien wurden Micro-Beads der Firma Milteny eingesetzt. Dabei handelt es sich um superparamagnetische Partikel von ca. 50 nm Größe, die an monoklonale Antikörper gekoppelt werden. Der Antikörper erkennt spezifisch ein Transportprotein der äußeren Mitochondrienmembran, TOM22, und ermöglicht somit eine magnetische Aufreinigung von Mitochondrien aus Zell sowie auch Gewebe-Lysaten.

Zellen wie auch Gewebe wurden individuell vorbereitet (siehe 6.5.1) und mit den Antikörpern 30 min. bei 4 °C unter permanenter Rotation inkubiert. 5-10 µg MACS-Beads wurden pro 400 µg Zell- oder Gewebe-Lysat eingesetzt, daher erfolgte zuvor eine Konzentrationsbestimmung mit der Bradford-Methode am Photometer.

Eine mit Metallsträngen durchzogene MACS-Säule wurde an einem starken Magneten, dem sogenannten MACS-Separator angebracht, mit Waschpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die vorbereiteten Lysate auf die Säule gegeben. Durch die magnetische Anziehung verblieben die an die Beads gekoppelten Antikörper-assoziierten Mitochondrien auf der Säule, wobei Zelltrümmer und andere Partikel durch mehrere Waschschrte von der Säule gewaschen wurden. Schließlich wurde die Säule von dem Magneten entfernt und die Mitochondrien konnten mit geringem Puffervolumen, dass mit einem Stempel durch die Säule gedrückt wurde, eluiert werden. Die extrahierten Mitochondrien verblieben in einem intakten, respirierenden Zustand, wie durch anschließende polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs verifiziert werden konnte.

## 6.6 Statistische Auswertung

Zur Errechnung der statistischen Signifikanz der Messwerte wurde ein zweiseitiger Student's t-Test mit ungepaarter, ungleicher Verteilung durchgeführt. Der P-Wert wurde als signifikant dargestellt, wenn dieser kleiner oder gleich 0,5 war. Generell erfolgt die Fehlerangabe in dieser Arbeit als Standardabweichung.

## 6.7 Software

AIDA 2.1	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhard
Fast PCR	Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki
Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty Ltd., Australien
Stratagene MxPro 4.01 Real-Time qPCR software	Stratagene (La Jolla, Kalifornien)
Kodak Molecular Imaging Software	Kodak (Stuttgart)

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Genetische Charakterisierung der Zybridzelllinien

#### 7.1.1 Diagnostischer Restriktionsverdau

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Falle der RD3302-Zybride in unserem Labor fusioniert und bis zum Zeitpunkt der Untersuchung kryokonserviert. Die RD3243-Zybride wurden freundlicherweise von Dr. Lodovica Vergani, Neuromuscular Center, Department of Neurological Science, Padua, Italien zur Verfügung gestellt. Bei der als Wildtyp (RDWT) bezeichneten RD-Zelllinie handelt es sich um käuflich erwerbliche humane embryonale Rhabdomyosarkomzellen. Von diesen Zellen wurden *rho*<sup>0</sup>-Zellen hergestellt, die zur Fusion mit Mitochondrien aus 143B-Zybriden mit einer Mutation an nt3302 wie auch nt3243 verwendet wurden (s. Punkt 3.5.6) (Vergani et al, 2007).

Die RD3302-Zybride enthalten eine Transition von Adenin zu Guanin an Position nt3302 der mitochondrialen DNA, die damit am 3'-terminalen Ende der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> lokalisiert ist. Um nachzuweisen, dass die verwendete Zelllinie diese Mutation in ihrem Genom aufweist, wurde eine analytische Restriktion mit dem Enzym Endonuklease Mse I durchgeführt. Dazu wurde eine 725 bp lange mtDNA-Sequenz von nt3232 bis nt3957 amplifiziert und anschließend selektiv degradiert. Das Enzym Mse I erkennt die palindromische 4-Basen-Sequenz T|TAA und schneidet die Wildtyp-mtDNA in 4 Fragmente (s.Abb. 15). Die Mutation an Position 3302 entfernt eine der drei MseI-Restriktionsstellen, der enzymatische Abbau der mutierten DNA ergibt somit also nur drei Fragmente. Die Identifizierung der jeweils größten unterschiedlichen Fragmente, beim Wildtyp von 486 bp und bei der Mutante von 521 bp Länge, ist hinreichend zur Charakterisierung der mutierten Zybridzellen. In Abb. 15 sind die Restriktionsschnittstellen wie auch das resultierende Fragment, das zur Unterscheidung von Wildtyp und Mutanten verwendet wurde, schematisch dargestellt.

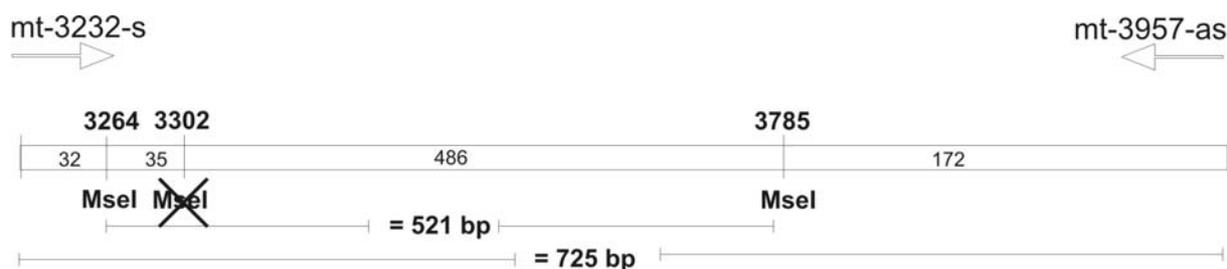


Abb. 15 Schema des diagnostischen Restriktionsverdaus.

Mse I -Restriktionsstellen auf dem 725 bp langen Ampklifikat des entsprechenden mitochondrialen DNA-Abschnitts. Durch den Basenaustausch an Position nt3302 in RD3302-Zybriden fällt an diesem Punkt eine Schnittstelle des Enzyms weg. Es entstehen folgende Fragmente mit denen Mutante und Wildtyp unterschieden werden können: WT: 486 bp, 172 bp, 35 bp, 32 bp; MT: 521 bp, 172 bp, 32 bp.

Abbildung Abb. 16 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsprodukte, die den Nachweis für den Besitz der Mutation erbringen. Das ungeschnittene PCR-Produkt wurde als Kontrolle in Bahn 1 aufgetragen. Bahn 6 und 7 enthalten Proben der beiden Osteosarkom-Zybridzelllinien, die die Mutation an nt3302 zu 70 % bzw. zu 100 % aufweisen. Bei den heteroplasmatischen Zybridzellen (Bahn 6) sind somit beide Fragmente der mutierten wie auch der Wildtyp-Version zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Restriktion zu erkennen. Gezeigt ist der Laufunterschied der Fragmente mit 521 bp Länge aus Zellen mit der Mutation an nt3302 in Bahn 3, 6 und 7 im Vergleich zu den 486 bp großen Fragmenten der Wildtyp-Zellen in Bahn 2 und 5. Die Zelllinie RD3243 (Bahn 4) ergibt unter diesen Diagnosebedingungen die gleiche Bande wie der Wildtyp, da sich die Transition an nt3243 nicht auf Restriktionsstellen des Enzyms Mse I auswirkt. Ein Nachweis durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym HaeIII, welches durch eine zusätzlich Schnittstelle die Mutation an nt3243 charakterisiert, erfolgte an dieser Stelle nicht, da die Beschreibung der Zybridzelllinie RD3243 bereits in der Veröffentlichung Vergani et al., 2007 durchgeführt wurde.

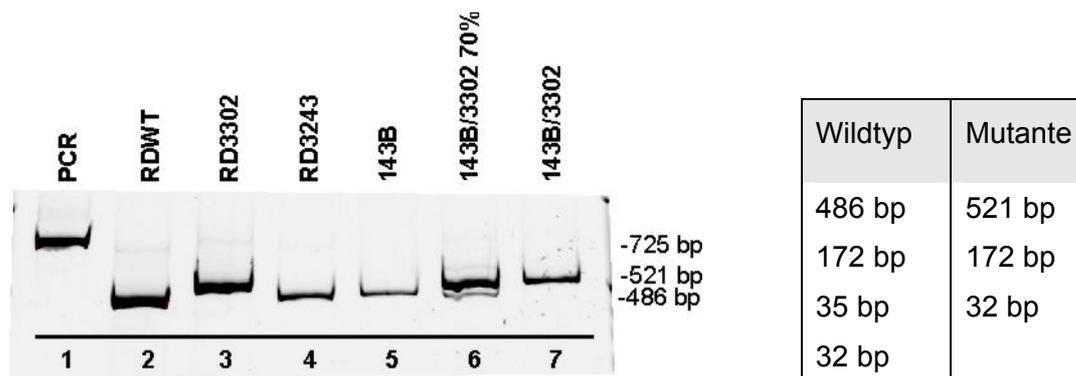


Abb. 16 Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente.

Links: Darstellung der zwei diskriminierenden Fragmente aus der Restriktionsanalyse der Rhabdomyosarkom-Zelllinien mit der Mutation an Position nt 3302 bzw. nt3243 der mitochondrialen DNA sowie dem Wildtyp. Zur Kontrolle wurden die Osteosarkomzelllinie 143B und ihre korrespondierenden 3302-Mutanten, die die Mutation zu homoplasmatischen (100 %) bzw. heteroplasmatischer (70 %) Anteilen enthalten, ebenfalls gezeigt. Rechts: Auflistung der Fragmentgrößen von Wildtyp und Mutante. Die Mutation an nt3302 eliminiert eine der drei spezifischen Restriktionsstellen des Enzyms Mse I, das dadurch resultierende größere 521 bp-Fragment wird zur Unterscheidung der Mutanten vom Wildtyp verwendet.

### 7.1.2 Bestimmung des Heteroplasmiegrades der RD3302-Zybride

Mit der angewandten Methode zur Charakterisierung der Mutante ist eine quantitative Aussage über den genauen Anteil an Wildtyp-DNA allerdings nur eingeschränkt möglich, daher wurde zur präzisen Einschätzung des Heteroplasmiegrades eine Sequenzierung eines die gesamte tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> umfassenden PCR-Produktes durchgeführt.

Das Elektropherogramm in Abb. 17 zeigt einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin an der Position 41 des analysierten PCR-Fragments, die dem Mutationsort nt3302 der mtDNA entspricht. Den Grad der Mutation kann man annähernd als homoplasmatisch bezeichnen, da an der entsprechenden Position nur ein deutlicher Peak detektiert wurde, der das Guanin-Nukleotid repräsentiert. Nur geringe Anteile des Signals des an Position 40 lokalisierten Nukleotids Adenin reichen in das nachfolgende Signal hinein. Durch die Sequenzierung kann somit der Mutationsgehalt bis zu einer Lesegenauigkeit von mindestens 98,5 % definiert werden (Shendure and Ji, 2008).

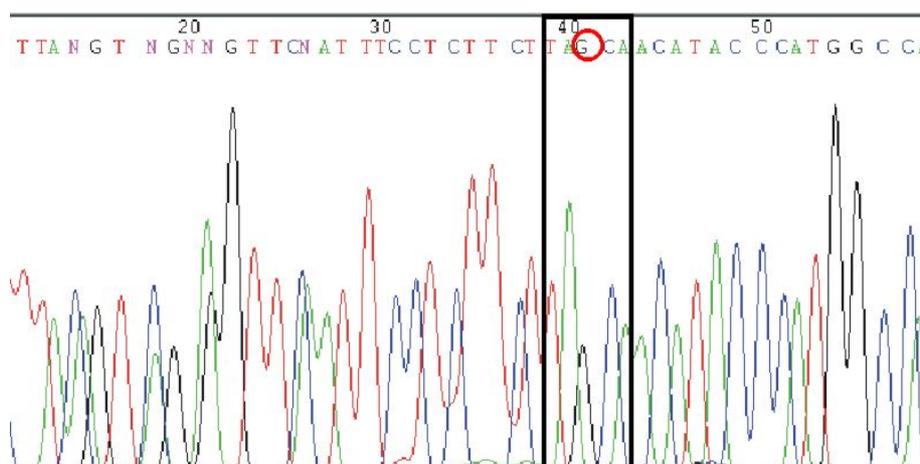


Abb. 17 Sequenzierung des tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Gens aus RD3302-Zellen.

Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus der Rhabdomyosarkomzelllinie RD3302 zum Nachweis der AG Transition an Position nt3302 der mtDNA. Die Position nt3302 der mtDNA entspricht in dieser Darstellung Nucleotid 41 des analysierten PCR-Fragments. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm Chromas.

Die RD3243-Zybride sind ebenfalls homoplasmatisch bezüglich der Mutation an nt3243. Dies wurde bereits von Dr. Lodovica Vergani nachgewiesen und veröffentlicht (Vergani et al., 2007).

### 7.1.3 Nachweis des Rhabdomyosarkom-Hintergrundes in mutierten RD-Zybriden

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die RD-Zybride die Mitochondrien mit mutierter mtDNA aus Osteosarkomazellen enthalten, wurde nun im DNA-Fingerprint verifiziert, ob es sich bei dem nukleären Hintergrund des Akzeptors um den der Rhabdomyosarkomzelllinie handelt.

Dazu wurde eine an dem Genort D11S533 auf Chromosom 11q13 des nukleären Genoms lokalisierte, hoch repetitive Sequenz aus Hexanucleotiden genutzt, die durch ihren hohen Polymorphismusgrad ein eindeutiges Merkmal verschiedener Individuen darstellt.

Mittels PCR-Analyse konnte durch einen Längenpolymorphismus zwischen 143B und RD-Genom unterschieden werden.

Dabei ergibt sich bei den 143B-Zellen eine Bande bei ca. 550 bp, bei RD-Zellen jedoch bei ca. 500 bp. Die unterschiedliche Größe der PCR-Amplifikate zeigt deutlich, dass die verschiedenen RD-Zybride homozygot in Bezug auf ihren nukleären Hintergrund, d.h. die gleiche Akzeptorzelllinie verwendet wurde. Zudem wird ausgeschlossen, dass das Kerngenom der Donorzelllinie 143B bei der Fusion übernommen wurde.

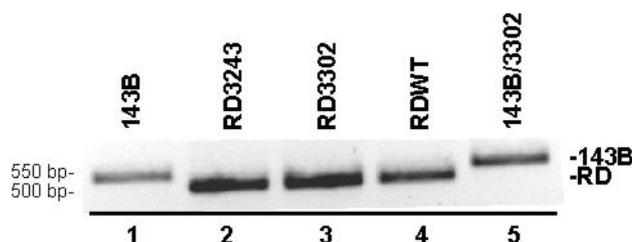


Abb. 18 Genetische Charakterisierung der nukleären Zellhintergrunds.

Dargestellt sind die PCR-Fragmente aus Donor- und Akzeptorzellen sowie der resultierenden transformierten RD-Zybridzellen. PCR-Produkte des Locus D11S533 wurden auf einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande der 143B-Zellen und 143B-3302-Zybride kann eindeutig von der Bande der Zellen mit dem nukleären Rhabdomyosarkom-Hintergrund unterschieden werden.

## 7.2 Biochemische Charakterisierung der RD3302-Zellen

### 7.2.1 Wachstum

Das Zellwachstum als erster äußerer Indikator des pathologischen Einflusses der Mutation, konnte schon während der Kultivierung der Zellen als verlangsamt beobachtet werden. Die experimentelle Bestimmung der Verdopplungszeit mit dem Casy Zellzähl-Gerät über einen Zeitraum von bis zu 150 Stunden bestätigte diese Beobachtung.

Der andeutungsweise sigmoide Verlauf der Wachstumskurve zeigte zudem, dass die RD3302-Zellen eine verlängerte stationären Phase bis über 24 Stunden nach der Aussaat aufwiesen, und die exponentielle Wachstumsphase erst nach ca. 50 Stunden erreichen. In dieser Phase ist die Abweichung der Proliferationsgeschwindigkeit der RD3302-Zellen nicht ganz so stark wie zu Beginn von der Geschwindigkeit der Wildtypzellen, jedoch konnte man auch hier erkennen, dass der Graph im weiteren Verlauf flacher wird. Dieses Ergebnis spiegelt sich dann auch in den errechneten Verdopplungszeiten wider. Für RDWT-Zellen ergab sich, dargestellt in Diagramm B in Abbildung Abb. 19, eine Teilungs-Geschwindigkeit von  $22 (\pm 1,3)$  Stunden, die damit im Rahmen der für diese Zelllinie bereits publizierten Werte lag (Loh, Jr. et al., 1992; [www.wipo.int](http://www.wipo.int) : wo/1992/016560). Diese entsprechen damit auch annähernd der Verdopplungszeit der 143B-Zellen. Das stark verlangsamte Wachstum der RD3302-Zellen zeigte sich in einer 1,7 fachen Erhöhung der Verdopplungszeit auf  $36 (\pm 1,8)$  Stunden.

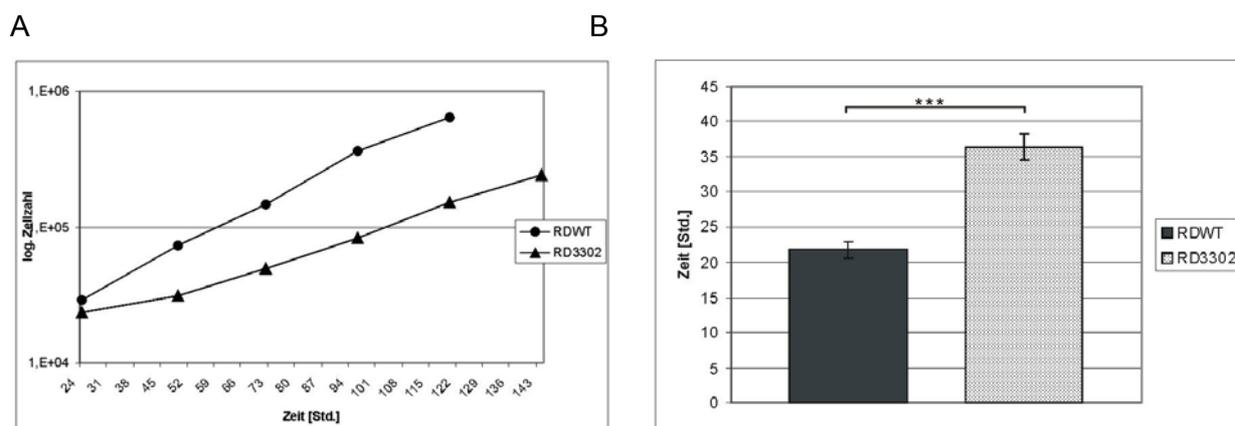


Abb. 19 Messung des Wachstums der RDWT und RD3302 über einen Zeitraum von 160 Stunden.

A) Logarithmische Auftragung der Zellzahl gegenüber der Zeit.

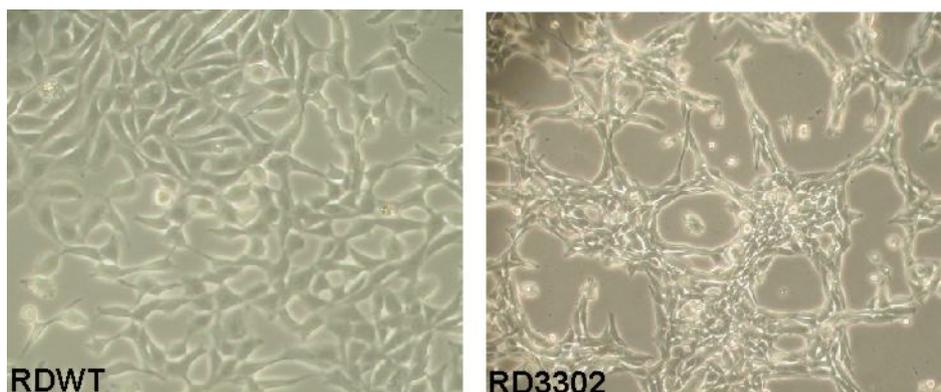
B) Errechnung der Verdopplungszeit aus der Steigung der Regressionsgeraden der Graphen aus A).

(Probenzahl n=3).  $p > 0,05$ , \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$

In Abb. 19 ist der graphische Verlauf des Wachstums über den Messzeitraum von 160 Stunden dargestellt.

Die Verzögerung des Anfangswachstums nach der Aussaat verstärkte sich zudem bei geringer Zellzahl zum Start des Experiments deutlich. Die Zellen zeigten zudem nach einer längeren stationären Phase ein vom Wildtyp abweichendes Wachstumsmuster mit einer wabenförmigen Verteilung, gezeigt in Abb. 20. Zudem konnte die Konfluenz der Wildtyp-Zellen auch nach längerer Zeit nicht erreicht werden, da es bei RD3302 im Bereich um die Aussparungen zu einer lokalen Ansammlung der Zellen kam, welche dann wiederum zu Stress und daraufhin zuerst zur Ablösung der Zellen vom Schalenboden und schließlich zum Zelltod führte. In der Stressphase nahm die Größe der Zellen deutlich ab und es zeigten sich lange, schmale Fortsätze. Dieser visuelle Eindruck konnte durch Messungen mit dem Casy Zellzähl-Gerät, das auch die Zellgröße erfasst, bestätigt werden, wie in Abb. 20 gezeigt wird.

A)



B)

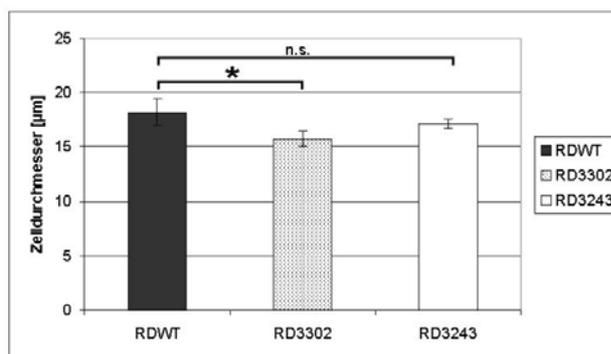


Abb. 20 Morphologische Veränderungen der RD3302-Zellen.

A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien RDWT und RD3302 unter 200 facher Vergrößerung. Die Zelllinien unterscheiden sich morphologisch und zeigen im Laufe des Wachstums eine unterschiedliche Verteilung auf dem Boden der Zellkulturschale. B) Statistische Auswertung der durchschnittlichen Zellgröße gemessen am Casy-Zellzählgerät. Für  $n=6$  wurde eine signifikante Verkleinerung der RD3302-Zybride detektiert. Die Zellgröße von RD3243 ist unverändert zum Wildtyp.  $p > 0,05$ , \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$

## 7.2.2 Laktatmessung

Zellen können flexibel auf Störungen im Stoffwechsel reagieren. Bei einem Defekt der Atmungskette erfolgt in der Regel eine Umstellung der Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse. Damit wird die Energiebereitstellung für die Zelle gesichert. Da die Glykolyse den Cofaktor  $\text{NAD}^+$  für die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat benötigt, ist eine Regeneration von  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$  erforderlich, um die Reaktionskette am Laufen zu halten. Dies geschieht durch die Reduktion des Endprodukts Pyruvat zu Lactat unter Aufnahme zweier Elektronen von  $\text{NADH}$ , dass dadurch zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird und wieder in die Glykolyse eingeschleust werden kann. Die Laktatmenge wurde nun in Anbetracht eines wahrscheinlichen negativen Effektes auf die Atmungskette durch die Mutation der mitochondrialen DNA in den Rhabdomyosarkomzellen überprüft.

Die Durchführung der Laktatmessung erfolgte mit einem Metabolit-Analysegerät ABL16/EMP105, ( $n=4$ ).

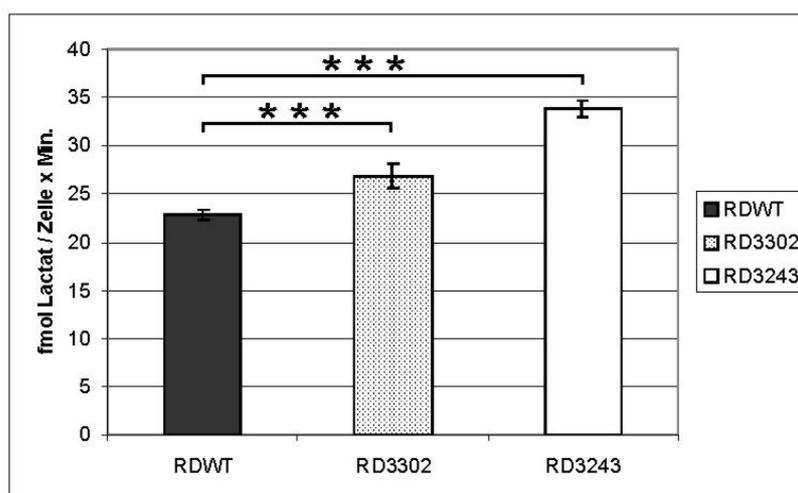


Abb. 21 Laktat-Akkumulation im Zellkulturmedium der RD-Zelllinien nach 24 Stunden Inkubation.

Die mit einem Metabolit-Analyser ermittelten Werte wurden vierfach parallel bestimmt und auf die Zellzahl und Zeit bezogen. Beide Zelllinien zeigen im Zuge ihres Atmungskettendefekts einen signifikanten ( $p < 0,001$ ) Anstieg der Laktatkonzentration im Vergleich zum Wildtyp (24 fmol/Zelle x Min.), der bei der RD3243-Zelllinie (34 fmol/Zelle x Min.) stärker ausfällt als bei RD3302 (27 fmol/Zelle x Min.).

Bei beiden Mutanten zeigt sich nach 24 Stunden Wachstum eine zu RDWT signifikant erhöhte Laktatkonzentration im Überstand, die bei RD3243 mit 147 % deutlicher ausfällt als bei RD3302 mit 113 % (Abb. 21).

### 7.2.3 Energiestatus der Zybridzellen

Alle Mutationen der mitochondrialen DNA betreffen direkt oder indirekt den Atmungskettenapparat und hängen somit unmittelbar mit dem Energiestatus der Zelle zusammen. Durch die Beobachtung des verlangsamten Wachstums der an nt3302 mutierten Zybride und dem moderaten, jedoch signifikanten Anstieg der extrazellulären Laktatkonzentration, erfolgte die Analyse des Adeninnukleotidhaushaltes als logische Konsequenz.

In Anbetracht der Instabilität der Adeninnukleotide wurde bei der Perchlorsäure-Extraktion der Zellen besonders auf eine große Schnelligkeit der Zellyse Wert gelegt, um die Stoffwechselvorgänge möglichst abrupt zu stoppen und den Erhalt der energiereichen Nukleotide gewährleistet.

Die Quantifizierung der verschiedenen Adeninnukleotide erfolgte über *reverse phase*-HPLC im Institut für Experimentelle Medizin und wurde auf den Proteingehalt, der aus einer Fraktion der Proben ermittelt wurde, bezogen. Die ermittelten Werte sind in Abb. 22 veranschaulicht.

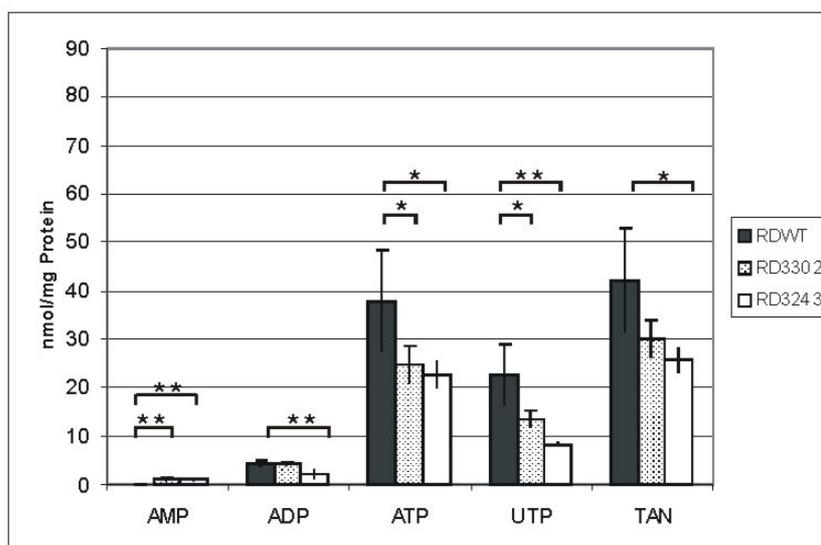


Abb. 22 Diagramm zur Darstellung des Nukleotidsgehaltes in RD-Zellen.

Die Messung der verschiedenen Adeninnukleotide sowie von Uridintriphosphat erfolgte chromatographisch und wurde auf den Proteingehalt der Probe geeicht (nmol Nucleotide/mg Protein). Als TAN (Total Adenine Nucleotides) wurde die Gesamtheit der Adeninnukleotide zusammengefasst, um die Reduktion des Gehalts in den mutierten Zellen zu verdeutlichen.

Das niedrige Verhältnis von AMP und ADP zu der energiereichen Verbindung ATP (siehe Abb. 23) dient als Bestätigung für die schnell durchgeführte Extraktion, bei der die fragilen energiereiche Bindungen optimal konserviert wurden.

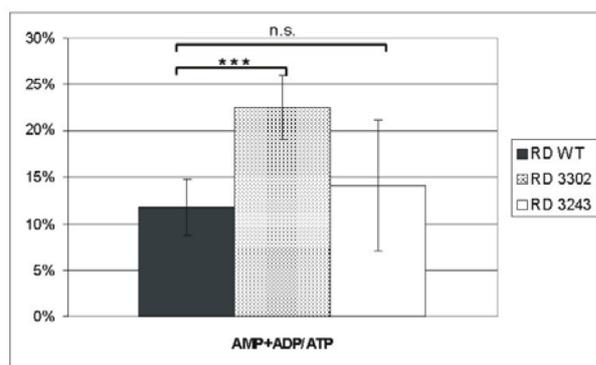
Unter dem Begriff TAN (Total Adenine Nucleotides) wird der Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden in der Zelle zusammengefasst. Dieser Wert ist bei RD3243 mit  $p < 0,05$  signifikant erniedrigt, jedoch bei RD3302 nicht signifikant verändert. Eine Erniedrigung des Gesamtadeninnukleotidgehaltes erfolgt in der Regel über die Deaminierung von AMP zu Inosin 5'-Monophosphat (IMP) (Sabina et al., 1990; Imai and Honjo, 1965). Ein alternativer Weg ist die Dephosphorylierung zu Adenosin durch die AMP-Aminohydrolase, der jedoch nur in Herzmuskel vorkommt. IMP kann weiter abgebaut und ausgeschieden werden oder über einen anderen Reaktionsweg wieder in AMP umgewandelt werden. Unter normalen Umständen reguliert dieser Purinnukleotidzyklus den relativen Gehalt an AMP, ADP und ATP, um somit stets einen hohen Energiestatus der Zellen zu erhalten.

Zusätzlich zu den Veränderungen des Adeninnukleotidgehaltes zeigt sich zudem eine leichte Umverteilung der Verhältnisse. Im Gegensatz zu Wildtypzellen, die annäherungsweise kein AMP aufweisen, ist dieser in beiden Mutanten gleichartig geringfügig, jedoch signifikant, erhöht. Beim Vergleich des ADP-Gehaltes zeigt RD3302 keine Veränderung zum Wildtyp, aber dafür RD3243 eine signifikante Reduktion. Der steady state-Gehalt an ATP ist bei RD3302 um 35 % und bei RD3243 um 40 % reduziert.

Somit unterscheiden sich beide mutierten RD-Zybride in Bezug auf den Energiehaushalt nicht deutlich voneinander. Verglichen mit dem Wildtyp ist jedoch eine deutliche Verringerung des ATP-Niveaus zu resümieren, die jedoch im Vergleich zu den selben Mutationen in Osteosarkomzybriden eher moderat ausfällt (Kleist-Retzow et al., 2007).

Die relative Konzentration der Adeninnukleotide wird durch den Energiestatus der Zelle bestimmt, sowie durch das Enzym Adenylat Kinase, dass die Reaktion  $ADP \rightarrow ATP + AMP$  katalysiert.

A)



B)

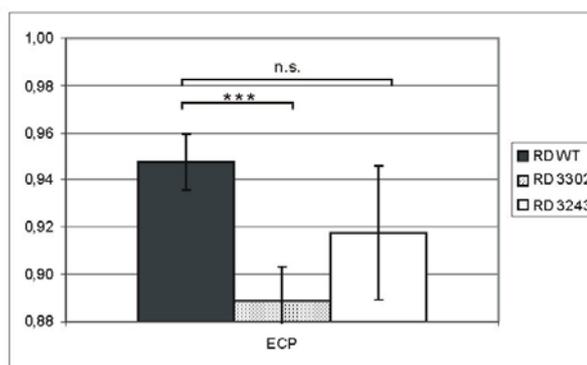


Abb. 23 Energiegehalt der RD-Zellen.

A) Darstellung der Relation des Energieträgers ATP zu den beiden weniger energiereichen Nukleotiden ADP und AMP (Angaben in %). Das Diagramm zeigt eine signifikante Erhöhung bei den RD3302-Zybriden zu Gunsten von AMP und ADP. Bei den RD3243-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. B) Dementsprechend zeigt sich, bei der Darstellung des Energieladungspotentials ECP (dimensionslos), das sich aus der Formel  $(ATP + 0,5 \cdot ADP) / TAN$  errechnet und den Gehalt an energiereichen Bindungen der Adeninnukleotide in der Zelle repräsentiert, eine mit  $p < 0,001$  signifikanten Erniedrigung bei den RD3302 und eine tendenzielle Reduktion bei RD3243, die jedoch nicht signifikant ist ( $p = 0,05$ ).  $p > 0,05$ , \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$

Als Maß für den Phosphorylierungsgrad wurde das Energieladungspotential (ECP) dargestellt (Abb. 23) das mit der Formel  $[ATP + 0,5 \cdot (ADP)] / [ATP + ADP + AMP]$  errechnet wurde (Atkins, 1968). Dabei zeigt sich zuerst einmal, dass die RDWT-Zellen mit 0,95 im oberen Bereich der allgemein formulierten Normalwerte des Potentials zwischen 0,7 und 1,0 (Gupta et al., 2001, Sellevold et al., 1986) liegen. Das Potential der RD3302-Zybride liegt zwar noch in dem allgemein definierten Normbereich, weicht jedoch signifikant vom Wildtyp mit einer Reduktion auf 0,89 ab. Der Wert der RD3243-Zellen ist nicht signifikant erniedrigt.

Obwohl damit alle drei Zelllinien im allgemeinen Normbereich der ECP-Werte liegen, muss man diesen in Hinsicht auf das hohe Potential der Wildtypzellen relativieren und die starke Reduktion als pathologisch bewerten. Das zeigt auch ganz klar eine andere Darstellung der Energieverhältnisse, die sich aus der Formel  $AMP + ADP / ATP$  ergibt, mit der man die Relation des hochenergetischen ATP zu den niederenergetischen ADP und AMP verdeutlichen kann. Es zeigt sich bei RD3302 eine signifikante Verdopplung im Vergleich zum Wildtyp. Das bedeutet, dass RD3302 im Fazit eine weitaus niedrigere Energieladung aufweist als RDWT. Auch die Ratio der RD3243-Zellen ist erhöht, jedoch nicht zu dem Ausmaß wie in RD3302-Zellen und nicht signifikant zu den Werten des Wildtyps.

Alle drei Zelllinien weisen einen relativ hohen Gehalt an UTP auf. Ein hoher Gehalt an UTP ist als für entartete Tumorzellen typisch beschrieben worden und scheint auch für diese Tumorzelllinien zuzutreffen. In beiden Mutanten ist jedoch der Gehalt an UTP im Vergleich zur Wildtypzelllinie erniedrigt. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich ebenso eine Konsequenz aus der generellen Reduktion des Energieladungspotentials in diesen Zellen (De Abreu et al., 1982).

#### 7.2.4 Polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs

Die Untersuchung der Atmungskette der Zellen in ihrem funktionellen Zusammenhang erfolgte durch die polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs an einer Clark-Elektrode. Die Atmung als zentrale Funktion der Mitochondrien ist ein wichtiger Indikator für den Zustand der Zellen und beschreibt damit die direkten Auswirkungen, die die Mutation der mitochondrialen tRNA auf deren Funktion haben. Nach den eher moderaten Veränderungen bei Laktatsynthese und Adeninnukleotidgehalt, sollte nun eine Untersuchung der Atmungskette als primärer physiologischer Wirkungsort der Mutation erfolgen.

Die Untersuchung umfasste sowohl den Sauerstoffverbrauch intakter Zellen durch die Oxidation endogener Substrate, wie auch nach externer Zugabe diverser Substrate (Pyruvat, Malat, Succinat und Glycerin-3-Phosphat) an permeabilisierten Zellen. Frisch hergestellte Zellsuspensionen der beiden Zelllinien RDWT und RD3302 wurden nach Eichung und Vorbereitung der Elektrode in der Polarographiekammer über einen längeren Zeitraum gemessen.

Dabei zeigt sich, dass die RD3302-Zybride im Vergleich zur Kontrollzelllinie RDWT einen um über 60 % verringerten Sauerstoffverbrauch bei der Oxidation endogener Substrate aufweisen. Ob dieses Ergebnis auf eine pathologisch veränderte Atmungskette zurückzuführen war, wurde durch die nachfolgenden Messungen weiterführend untersucht.

Nach Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin konnten durch Zufügen diverser Substrate die einzelnen Atmungskettenkomplexe im Zusammenspiel mit weiteren mitochondrialen Stoffwechselprozessen charakterisiert und als Multienzymapparat unter *in situ* Bedingungen analysiert werden. Dabei schleusen Pyruvat und Malat Elektronen via Komplex I, Succinat über Komplex II und Glycerin-3-Phosphat schließlich über Ubichinon in die Atmungskette ein. Die Oxidation von Glycerin-3-Phosphat wird durch das Enzym G3P-Dehydrogenase katalysiert, welches an der Innenseite mit der mitochondrialen Membran assoziiert ist und dort über  $\text{FADH}_2$  Ubichinon reduziert und dadurch Elektronen zu Komplex III transferiert.

Der Einsatz von zwei verschiedenen Substraten für Komplex I ermöglicht Rückschlüsse auf verschiedene der Atmungskette vorgeschaltete Stoffwechselwege, darunter die Pyruvatdehydrogenase und auch den Tricarboxyl-Zyklus. Der Pyruvatdehydrogenase-(PDH-)komplex ist das Bindeglied zwischen Glykolyse und Citratzyklus und katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA.

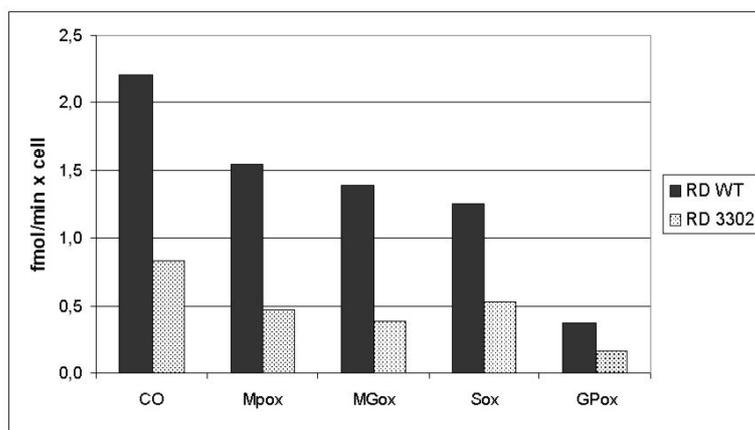


Abb. 24 Graphische Darstellung des Sauerstoffverbrauchs der RD3302-Zybride im Vergleich zum Wildtyp.

Es wurden jeweils Einzelmessungen durchgeführt, bei der sowohl die Verwendung endogener Substrate (CO) als auch die Metabolisierung extern zugegebener Substrate in Digitonin-permeabilisierten Zellen detektiert wurde. Die Charakterisierung von Komplex I erfolgte nach Zugabe von Pyruvat in Gegenwart von Malat (MPox) sowie von Malat in der Gegenwart von Glutamat (MGox), die Charakterisierung von Komplex II entsprechend nach Zugabe von Succinat (Sox) und von Komplex III und IV nach der Zugabe von Glycerin-3-Phosphat (GPox). Der Sauerstoffverbrauch ist in fmol pro Minute pro Zelle angegeben. (n=1).

Der Sauerstoffverbrauch der an nt3302 mutierten Zellen nach Zugabe von Pyruvat wie auch Malat sind um 70 % bzw. 72 % deutlich im Vergleich zu den Werten des Wildtyps erniedrigt.

Bei der nachfolgenden Messung war die Aktivität nach Hinzufügen von Succinat bzw. Glycerin-3-Phosphat ebenfalls mit 59 % bzw. 58 % deutlich, jedoch nicht so drastisch wie bei der vorherigen Messung, erniedrigt. Vergleicht man nun den Sauerstoffverbrauch bei Gabe von NADH-verknüpften Substraten mit der Oxidationsrate von Substraten, die Elektronen über einen nachfolgenden Komplex in die Atmungskette einspeisen, zeigen die RD3302-Zellen eine Verminderung der Relativwerte im Vergleich zu den Wildtypzellen. Diese Differenz wird allgemein als ein Indikator für einen Komplex I-Defekt angesehen.

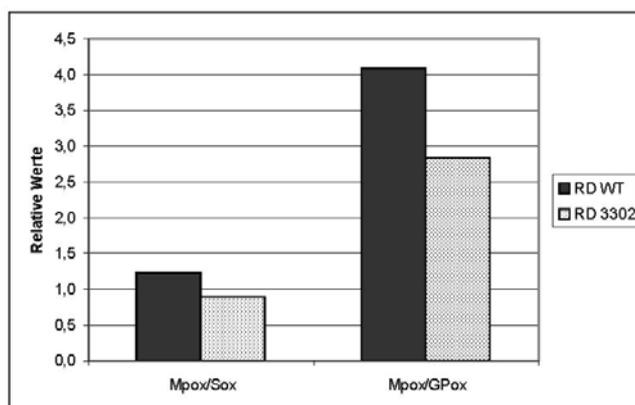


Abb. 25 Relative Werte des Sauerstoffverbrauchs.

Zur Verdeutlichung eines Komplex I-Defekts wurde der Sauerstoffverbrauch bei NADH-vernüpften Substraten, die Elektronen über Komplex I in die Atmungskette einspeisen, mit den Werten nach Gabe von Succinat bzw. G3P, in Relation gesetzt. Diese übertragen Elektronen an einem späteren Punkt in die Atmungskette. Bei RD3302 ist dieser Quotient erniedrigt, was damit für einen Komplex I-Defekt spricht.

Setzt man den Sauerstoffverbrauch nach Gabe der Komplex I-Substrate Malat/Pyruvat in Relation zu den Werten nach Succinat- bzw. G3P-Zugabe, so zeigt sich, dass es sich nicht um eine gleichförmige Reduktion der Gesamtaktivität handelt, sondern die relative Komplex I-Aktivität im Vergleich zur Wildtypzelllinie RDWT deutlicher reduziert ist.

Im Vergleich mit den in vorherigen Arbeiten ermittelten Daten von Wildtyp und Mutante der Osteosarkomzelllinie (Kleist-Retzow et al., 2007) zeigt der RD-Wildtyp deutlich niedrigere Werte, sowohl bei der Veratmung endogener Substrate (143B: 4 fmol, RDWT: 2,2 fmol), wie auch nach Zugabe von Pyruvat (143B: 4,2 fmol, RDWT: 1,5 fmol), Malat (143B: 5,1 fmol, RDWT: 1,4 fmol) und Succinat (143B: 6,3 fmol, RDWT: 1,3 fmol). Anscheinend unterscheiden sich diese Zelllinien generell in ihren Atmungskettenkapazitäten bzw. in der Ausnutzung bestimmter Reaktionswege zur Energiegewinnung.

### 7.2.5 Spektrophotometrische Messung der Enzym-Aktivität

Die Ergebnisse, die durch die Polarographie gewonnen wurden, wurden zusätzlich ergänzt durch die spektrophotometrische Aktivitätsmessung einzelner Komplexe unabhängig vom Zusammenspiel der Atmungskette. Die maximale Enzymaktivität wurde durch die Quantifizierung des Substratumsatzes über eine Veränderung der Absorption eines an den Komplex gekoppelten Essays analysiert.

Die Messung umfasste Komplex II + III über die Succinat-Cytochrome c Reduktase-Aktivität (SCCR), Komplex II alleine über die Succinat-Ubichinon-Dichlorphenol Indophenol-Reduktase-Aktivität (SQDR), Komplex III über die Decylubichinon-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität (QCCR) sowie Komplex IV über die Cytochrom c-Oxidase-Aktivität (COX).

Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Enzyme des Citratzyklus, Aconitase, Citrat-Synthase und Fumarase, als Referenz erfasst.

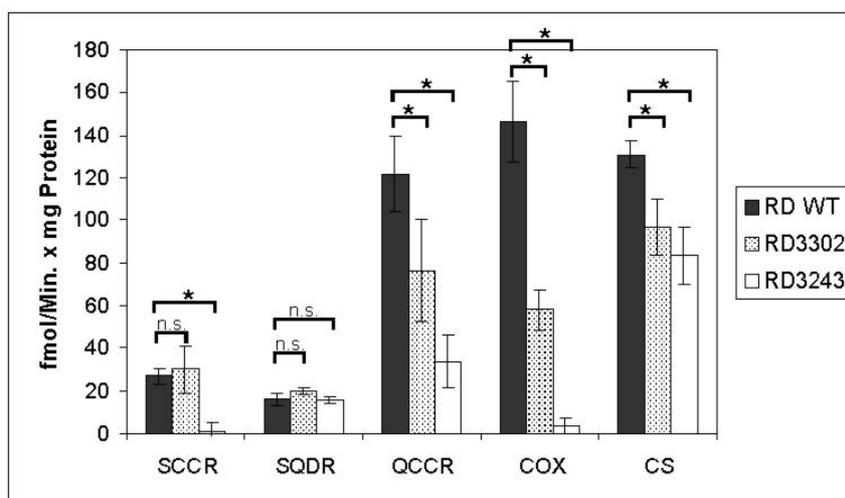


Abb. 26 Spektrophotometrie der RD-Zellen.

Aktivität der Atmungskettenkomplexe sowie des Markerenzym Citrat-Synthase (CS) der beiden RD-Zybride mit der Mutation an nt3302 und nt3243 im Vergleich zu der Wildtypzelllinie RDWT. Die Aktivität von Komplex II & III (SCCR), Komplex II (SQDR), Komplex III (QCCR) und Komplex IV (COX) ist in fmol pro Minute pro mg Protein angegeben. (n=4, MW±SD). Die Signifikanzabschätzung erfolgte mittels T-Test mit ns: nicht signifikant, p > 0,05, \*: P<0,05, \*\*: p<0,01.

Bei der kombinierten Messung von Komplex II und III (SCCR) weicht nur der Werte von RD3243 statistisch signifikant vom Wildtyp ab. Im Gegensatz dazu zeigt RD3302 keine Veränderung zur Kontrolle. Die unabhängige Messung des ausschließlich nukleär codierten Komplex II demonstriert deutlich das typische Bild von Zellen mit mitochondrialer DNA-Mutation. Die Aktivität beider mtDNA-Mutanten befindet sich im Normbereich und zeigt keine Beeinträchtigung der maximalen Enzymaktivität. Die Werte von Komplex III hingegen weichen wieder bei beiden Mutanten vom Wildtyp ab, wobei auch hier die RD3243-Zybride einer drastischere Reduktion als RD3302-Zellen aufweisen, die sich ja schon in der SCCR Messung andeutete.

Am stärksten wirken sich beide Mutationen auf Komplex IV der Atmungskette auf. Dessen Aktivität ist deutlich reduziert, wiederum bei RD3243 gravierend auf nur 2 % der Wildtypaktivität, bei RD3302 moderater auf 40 %.

Die Aktivität der Citrat-Synthase wurde als Referenz gemessen. Es handelt sich um ein Schlüsselenzym des Citratzyklus, das die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA katalysiert. Um die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe der verschiedenen Zelllinien miteinander zu vergleichen, wurde das Verhältnis zur Citrat-Synthase-Aktivität gebildet, welche häufig als ein indirektes Maß für den absoluten Mitochondriengehalt der Zelle verwendet wird.

Die Citrat-Synthase-Aktivitäten der beiden Mutanten weichen leicht von den Werten für RDWT ab. RD3302 ist um 24 %, RD3243 um 34 % reduziert. Bezieht man nun die Werte der Atmungskettenkomplexe auf die Werte der Citrat-Synthase-Messung und somit auf die Mitochondrienanzahl, ergeben sich nur geringfügige Änderungen der Absolut-Werte. Die Relation der Werte für die Aktivität der einzelnen Atmungskettenkomplexe der beiden Mutanten zu der Kontrollzelllinie bleibt bestehen.

#### 7.2.6 Steady state-Gehalt von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe

Die mitochondriale DNA codiert für 13 Proteine der Atmungskette. Die Auswirkung der tRNA-Mutation auf das steady state-Niveau der Komplexe bzw. einzelner repräsentativer Untereinheiten wurde durch Immunoblotting mit spezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht.

Der steady state-Gehalt der mitochondrial-codierten Proteine wird bestimmt durch das Zusammenspiel von Synthese und Abbau im Mitochondrium. Eine Mutation der tRNA, als wichtiger Bestandteil des Proteinsyntheseapparates, kann die Translation direkt oder indirekt negativ beeinflussen z.B. durch Inhibierung des Ribosoms, Beladung mit einer unpassenden Aminosäure oder fehlende Aminoacylierung, oder sie kann durch eine herabgesetzte Kinetik den Einbau falscher Aminosäuren begünstigen/bewirken. Defekte Proteine werden unmittelbar nach der Synthese erkannt und degradiert. Eine Störung des Proteinsyntheseapparates spiegelt sich daher auch in der Konzentration der Protein im Mitochondrium wider.

Die densitometrische Auswertung erfolgte zuerst durch Normierung auf das in allen Zelllinien abundant exprimierte Protein  $\beta$ -actin, dann wurde das prozentuale Verhältnis der Bandenstärke zur jeweiligen Kontrollzelllinie 143B bzw. RDWT errechnet.

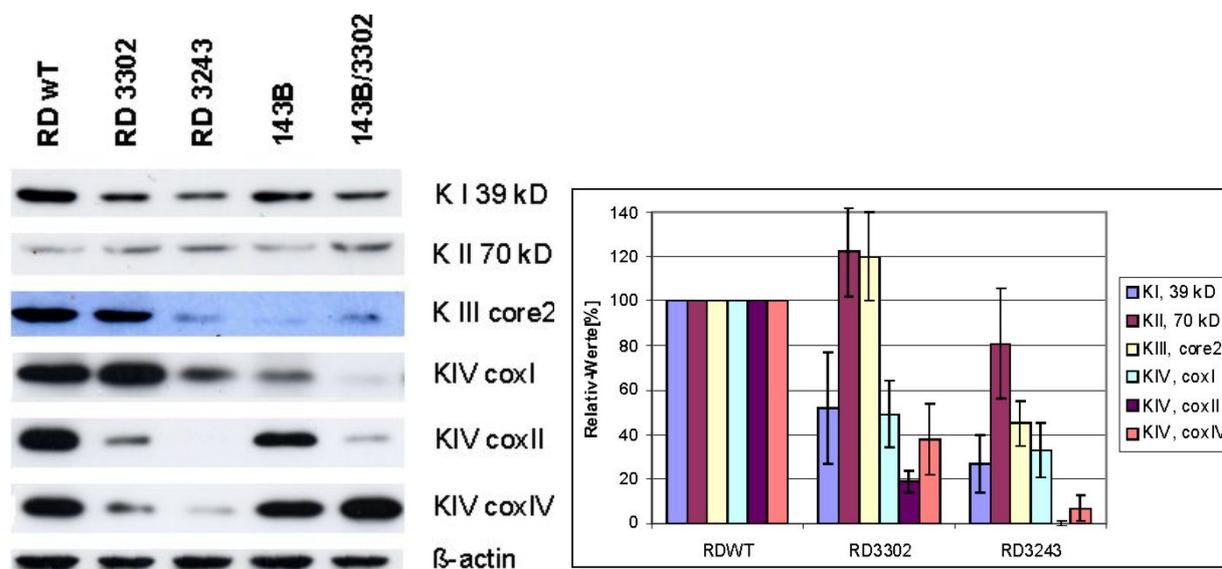


Abb. 27 Protein-steady state-Gehalt in Zybridzellen

A) Western Blot zur Untersuchung des steady state-Gehaltes von Proteinuntereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe. Die Detektion von  $\beta$ -actin erfolgte, um Beladungsunterschiede in der nachfolgenden Auswertung rechnerisch auszugleichen. Weitere Antikörper zur Detektion von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe waren: Komplex I, Untereinheit 39 kD; Komplex II, Untereinheit 70 kD; Komplex II, Untereinheit core2; Komplex IV, Untereinheiten I, II, IV. Bei allen Untereinheiten mit Ausnahme der 70 kD Untereinheit von Komplex II und der Untereinheit IV von Komplex IV handelt es sich um mitochondrial codierte Proteine. B) Diagramm der densitometrischen Auswertung. Während die kerncodierte Untereinheit des Komplex II in Konzentrationen vorliegt, die dem Wildtyp entsprechen, zeigt sich bei beiden Mutanten eine Reduktion der drei Untereinheiten von Komplex IV und der Untereinheit von Komplex I. RD3243 zeigt zusätzlich eine Reduktion der Untereinheit von Komplex III.

Abb. 27 zeigt die Auftrennung der Proteinextrakte von den drei RD-Zelllinien sowie zum Vergleich auch der beiden 143B-Zelllinien im Western Blot. Dieser wurde mit sechs verschiedenen Antikörpern, gegen sowohl mitochondrial als auch kerncodierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe der RD- und 143B-Zybride, inkubiert. Um einen Einfluß von Beladungsunterschieden zu minimieren, wurde bei der Auswertung auf das Signal des Referenzproteins  $\beta$ -actin standardisiert.

Beide RD-Mutanten zeigten eindeutig eine Reduktion der 39 kDa-Untereinheit von Komplex I. Dieses Ergebnis stimmt mit den Werten der homoplasmatischen Osteosarkomzelllinie 143B/3302 überein, die ebenfalls einen deutlich verminderten Gehalt an dieser Untereinheit von Komplex I zeigte.

Komplex II der mitochondrialen Atmungskette ist gänzlich kerncodiert und sollte somit von Defekten des mitochondrialen Syntheseapparates nicht betroffen sein. Stimmig dazu erweist sich die 70 kDa Untereinheit von Komplex II als unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Das trifft ebenso bei 143B/3302 zu.

Die Detektion der Untereinheit core 2 als repräsentative Darstellung von Komplex III ergab ein sehr heterogenes Bild. RD3243 weist eine deutliche Reduktion des steady state-Gehaltes auf, wohingegen diese bei RD3302 nahezu unverändert zum Wildtyp vorliegt. Die Osteosarkomazybride zeigen ebenfalls keine Veränderung im Vergleich zu 143B, die Zelllinien weisen jedoch im absoluten Vergleich mit den Rhabdomyosarkom-Zelllinien beide einen geringeren Gehalt an dieser Untereinheit auf.

Zur Analyse von Komplex IV der Atmungskette standen Antikörper gegen drei Untereinheiten zur Verfügung. Zwei davon gegen die mitochondrial codierte Untereinheiten COX I und COX II, sowie einer gegen die kerncodierte Untereinheit COXIV. Der Gehalt an COXI divergiert stark bei den unterschiedlichen Zelllinien. Während bei RD3302 keine Veränderungen erkennbar sind, zeigt RD3243 eine leichte Reduktion des steady state-Niveaus und 143B/3302 eine gravierende Reduktion, die in meinen vorhergehenden Arbeiten bereits auf 8 % reduziert verglichen zu der Kontroll-Zelllinie 143B detektiert wurde.

Ebenso unterschiedliche Resultate ergab die Detektion von COXIV. Diesmal war die Untereinheit in beiden RD-Zybriden deutlich reduziert, im Gegenteil dazu in den 143B-Zybriden unverändert stark in der Zelle vorhanden.

Die Untereinheit COXII war in allen drei Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen stark reduziert.

### 7.2.7 Akkumulation der tRNA-Vorstufe RNA19

Zu den auffälligsten Merkmalen der Mutation an tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gehört die Akkumulation der Prozessierungsvorstufe RNA19, die die Transkripte der drei Gene für ND1, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und 16 S rRNA umfasst. 1993 erfolgte die erste Beschreibung einer Patientin mit nahezu homoplasmatischem Gehalt der Mutation in Muskel und zu hohem Heteroplasmiegrad in Fibroblasten durch Bindoff et al., 1993 bei der er eine 1000 fache Erhöhung von RNA19 in entsprechenden Gewebeproben detektierte.

Um die Zybride auf eine Ansammlung von RNA19 zu untersuchen, wurde ein Northern Blot mit RNA-Extrakten der drei RD-Zelllinien sowie als Vergleich dazu der 143B- und 143B/3302-Zellen durchgeführt.

Zur Größenordnung und Identifizierung der Banden wurde zuvor ein RNA-Marker auf das Gel aufgetragen und nach dem Blotting auf der Membran angefärbt, dieser ist jedoch nicht radioaktiv und somit nicht auf der Exposition sichtbar.

Als Beladungskontrolle diente die Hybridisierung mit einer 28 S rRNA-Sonde, die zeigt, dass vergleichbare Mengen der einzelnen Proben aufgetragen wurden.

Als Sonde wurde ein PCR-Produkt innerhalb der Sequenzen des ND1-Gens verwendet, das sowohl RNA19 als auch ND1 detektierte. Das Signal für ND1 diente dadurch als interne Bezugsgröße, so dass das Verhältnis RNA19/ND1 der verschiedenen Zelllinien miteinander verglichen werden konnte.

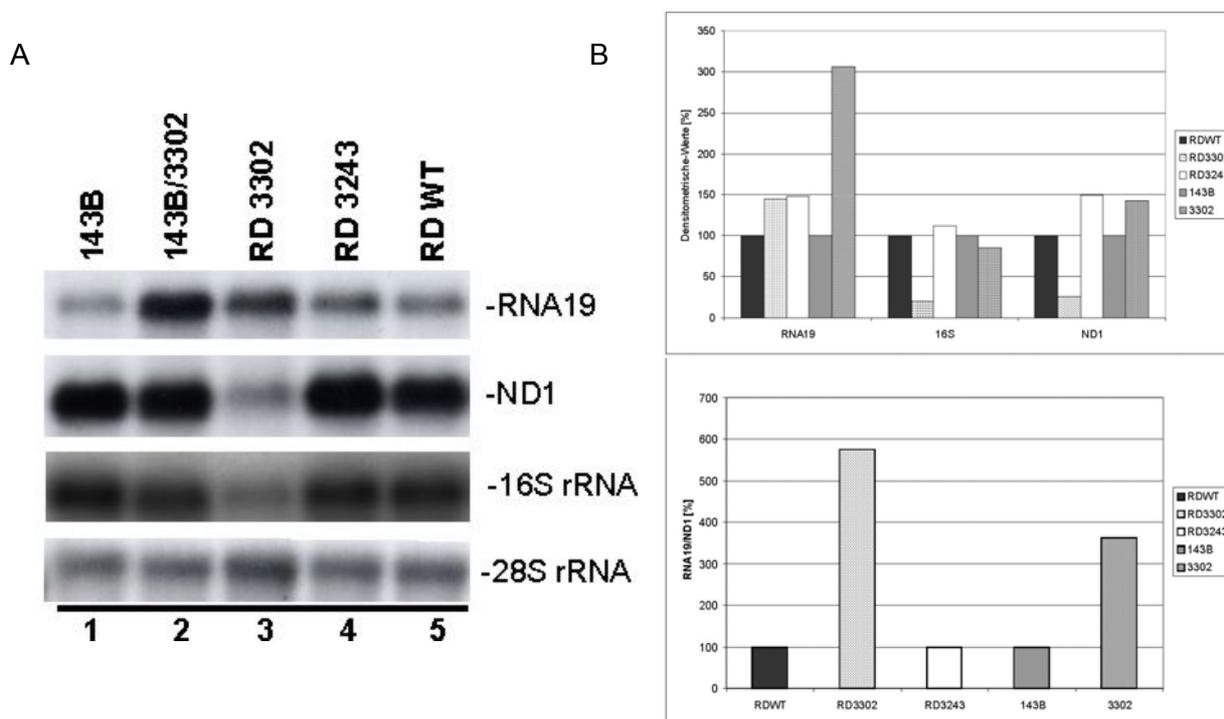


Abb. 28 A) Northern Blot zur Darstellung der RNA19-Akkumulation in Zybridzellen.

Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Wildtypzellen mitgeführt sowie der RD-Zybrid mit der Mutation an nt3243. Die Membran wurden mit einem radioaktiv markierten PCR-Produkt, dessen Sequenz innerhalb des ND1-Gens liegt, hybridisiert und auf einem P-imager screen exponiert. DA die Vorstufe auch das Transkript von ND1 enthält, zeigt die Sonde zwei Signale, für ND1 und RNA19. Bildet man nun das Verhältnis von RNA19 zu ND1, kann man die relative Menge in den Proben der verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen. B) Das Diagramm zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung des mit den Sonden gegen ND1 und 16S rRNA hybridisierten Northern Blots. Die dargestellten Werte wurden auf 28S rRNA normalisiert und auf die jeweilige Kontrollzelllinie bezogen. Ein deutliches Ergebnis ist die Reduktion von ND1-mRNA und 16S rRNA bei RD3302. Die übrigen Signale weichen nicht nennenswert vom Wildtyp ab, mit Ausnahme des RNA19-Signals bei 143B/3302, das sich auch bezogen auf ND1 um dreifach erhöht erweist (siehe C). C) Es konnte bei beiden an nt3302 mutierten Zybridzelllinien eine Akkumulation der Prozessierungsvorstufe RNA19 relativ zu dem ND1-Transkript gezeigt werden. Diese fiel bei RD3302 mit fast 600 % doppelt so stark aus wie bei 143B/3302. Die RD3243-Zybride zeigen keine RNA19-Akkumulation.

Die Exposition des hybridisierten Northern Blots in Abb. 28 A) zeigt auf einer Höhe von 1 kb das Signal für die mRNA von ND1, der mitochondrial codierten Untereinheit von Komplex I der Atmungskette. Die gleiche gegen ND1 gerichtete Sonde detektiert auf einer Höhe von 2,6 kb das Signal für die Transkriptionsvorstufe RNA19.

Auch bei den beiden Wildtypzelllinien in Bahn 1 und 5 konnte ein Signal detektiert werden, was bestätigt, dass RNA19 als eine normale Vorstufe in Zellen vorliegt. Diese wird jedoch unter normalen Bedingungen zügig durch die spezifischen RNasen weiterprozessiert und ergibt schließlich die drei Endprodukte 16S rRNA, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und die mRNA des Gens ND1. Eine Anhäufung der RNA-Vorstufe, wie sie sich bei beiden nt3302 mutierten Zelllinien darstellt, lässt somit eine Beeinflussung der Prozessierungsvorgänge in den Mitochondrien vermuten.

Auffällig ist, dass sich die beiden mutierten Zelllinien 143B/3302 und RD3302 (Bahn 2 und 3), trotz der gleichen Mutation, bezogen auf die Expression von ND1 und 16S rRNA deutlich unterscheiden. Beide RNA-Spezies sind deutlich reduziert in RD3302, wohingegen dies in 143B/3302 nicht der Fall ist.

Die densitometrische Auswertung des Northern Blots in Abb. 28 B) zeigt bei beiden an nt3302 mutierten Zybridzelllinien einen Anstieg der RNA19/ND1-Ratio, die bei RD3302 jedoch nur um das 5,8 fache und bei 143B/3302 um das 3,6 fache, bezogen auf die jeweiligen Wildtypen, erhöht ist und damit bei weitem nicht das Ausmaß der in Patientengewebe akkumulierten Vorstufe erreicht.

Die RD-Zybride mit der Mutation an nt3243 zeigten keinen besonderen Phänotyp in diesem Experiment. Obwohl auch bei dieser Mutation eine Akkumulation von RNA19 in 143B-Zybriden beschrieben wurde (King et al., 1992), stellt sich die RNA19/ND1-Ratio als nahezu identisch zum Wildtyp heraus.

### 7.2.8 Untersuchung der Aminoacylierung von tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>

Eine wichtige Eigenschaft von tRNA-Molekülen ist ihre charakteristische 3D-Struktur, in die sie sich nicht nur nach ihrer Fertigstellung auffalten, sondern die auch während des Prozessierungsvorgangs nach der Transkription zur Erkennung der Schnittstellen beiträgt. Die 3D-Struktur ist auch maßgeblich für die Erkennung durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verantwortlich, die spezifisch ihre passende tRNA nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erkennen. Mutationen haben je nach Lokalisation innerhalb des tRNA-Gerüsts keine bis gravierende Auswirkungen auf die Faltung von Stämmen und Schleifen, die durch die Basenpaarungen komplementärer Nukleotide geformt werden.

Die Mutation an nt3302 befindet sich unmittelbar am 3'-Ende des Aminosäure-Akzeptorstammes der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. In einem sauren Harnstoff Acrylamidgel erreicht man eine exakte Auftrennung im niedermolekularen Bereich sowie eine Konservierung der Aminosäureanbindung an die tRNA. So erhält man Aufschluss über Strukturveränderungen und Beeinträchtigungen der Aminosäure-Bindungseigenschaften der tRNA.

Die Proben der drei RD- sowie der beiden 143B-Zelllinien wurden jeweils unter sauren Bedingungen zum Erhalt der Aminosäureanbindung vorbereitet sowie ein Aliquot parallel dazu unter basischen Bedingungen erhitzt, wodurch die Deacylierung der tRNA bewirkt wurde. Beide Proben der Zelllinie 143B wurden gemeinsam auf Bahn 9 des Gels in Abb. 29 aufgetragen, um so als Größenmarker der acylierten und der deacylierten tRNA-Variante zu dienen.

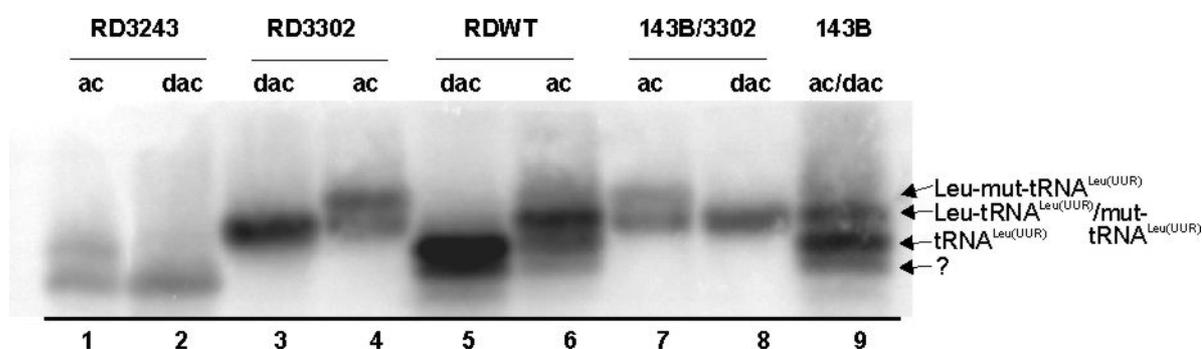


Abb. 29 Demonstration der veränderten Laufeigenschaften der A3302G--mutierten tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>.

Die Auftrennung von jeweils 15 µg RNA erfolgte in einem 6,5 % igen Acrylamidgel unter sauren denaturierenden Bedingungen. Die RNA-Proben wurden zum Erhalt der Acylierung (ac) in Natriumacetat bei pH 4,5 gelöst bzw. durch Aufkochen in Tris pH 6,8 deacyliert (dac). Zur Darstellung des durch die Aminosäurebindung resultierenden Laufunterschiedes der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> in der Elektrophorese wurden die acylierte und die deacylierte RNA-Proben von 143B gemeinsam auf Bahn 9 aufgetragen. Der Grad der Aminoacylierung von mutierter und Wildtyp-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> wurde durch Hybridisierung des Northern Blots mit einer radioaktiv markierten PCR-Sonde detektiert und durch Exposition auf einen P-Imager Schirm visualisiert.

Dabei migriert die acylierte tRNA aufgrund der anhängenden Aminosäure langsamer in der Gelelektrophorese und weist somit eine Bande auf, die oberhalb der Bande der deacylierten tRNA verläuft. Da die tRNA auch in Wildtypzellen *in vivo* nicht vollständig acyliert vorliegt, kann man bei den unter sauren Bedingungen präparierten Proben beide Banden der beladenen und unbeladenen tRNA erkennen. Jedoch dominiert die aminoacylierte tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mit einem Verhältnis von 85:15 eindeutig (Maniura-Weber et al., 2006).

Zusätzlich zu den beiden Banden ist unterhalb der deacylierten tRNA in der Regel eine weitere jedoch sehr schwache Bande erkennbar (als "?" gekennzeichnet), die erfahrungsgemäß mit der Leucin-Sonde detektiert wird und deren Identität unbekannt ist. Diese erscheint regulär in den unter basischen Bedingungen hergestellten Extrakten der beiden Wildtypzelllinien RDWT und 143B (Bahn 5 bzw. 9), und auch bei Zellen mit der 3243-Mutation.

Vermutlich handelt es sich um eine in geringeren Mengen vorkommende Faltungsvariante der tRNA. Auch bei Hybridisierung mit einigen anderen tRNA-Sonden konnte eine jeweils vergleichbare Bande detektiert werden.

Die beiden Zelllinien mit der Mutation an nt3302 zeigen ein verändertes Migrationsmuster. Beide Banden, sowohl die acylierte als auch die deacylierte Variante der tRNA, sind gleichermaßen nach oben verschoben (Bahnen 3 und 4 für RD3302; Bahnen 7 und 8 für 143B/3302). Indem man von den unter sauren Bedingungen gewonnenen Proben das Verhältnis der oberen zur unteren Bande erstellt, ergibt sich der Grad der Aminoacylierung. Dieser ist bei den an nt3302 mutierten Zellen niedriger als bei den Kontrollzellen.

Die RD-Zybride mit der Mutation an nt3243 weisen sowohl in der acylierten Form in Bahn 1 als auch in der deacylierten Form in Bahn 2 ein dem Wildtyp entsprechendes Laufverhalten auf. Jedoch kann man auch hier in Bahn 1 erkennen, dass unter sauren Bedingungen ein größerer Anteil der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> in deacylierter statt in acylierter Form vorliegt und somit die 3243-Mutation zwar keinen Einfluss auf die Migration, so doch einen negativen Effekt auf den Aminoacylierungsgrades hat.

### **7.3 Auswirkung der 3302-Mutation auf die tRNA-Prozessierung *in vitro***

#### **7.3.1 RNase P-Assay**

Bei der mitochondrialen Transkription wird die mtDNA in mehrere polyzistronische RNA-Fragmente umgeschrieben. Die weitere Prozessierung in die einzelnen Transkripte erfolgt dann durch die Endonukleasen RNase P und RNase Z, deren spezifischen Schnittstellen am 5' bzw. 3' Ende der mt-tRNAs lokalisiert sind. Da die tRNA-Gene im mitochondrialen Genom punktuell zwischen den einzelnen Protein- und rRNA-codierenden Genen verteilt sind, führt diese Prozessierung zu einer Trennung der verschiedenen Transkripte.

Um den Einfluß der am 3'-Terminus des tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Genes lokalisierten Mutation auf die Prozessierung zu untersuchen, wurde ein assay mit einem *in vitro*-Transkript der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> durchgeführt, das sowohl über eine 5'-Leader- wie auch eine 3'-Trailer-Sequenz verfügt und somit eine der Transkriptionsvorstufe RNA19 ähnliche Variante darstellt. Dazu wurde das rekombinante Enzym Rnase P verwendet und durch Probenentnahme nach unterschiedlichen Inkubationszeiten eine Veränderung der Prozessierungskinetik durch die Mutation an Position nt3302 des *in vitro*-Transkriptes ermittelt. Zum Vergleich wurde die Mutation an Position nt3243, die nicht direkt an den Restriktionsstellen der Prozessierung lokalisiert ist, sondern sich im Dihydrouridin-Loop der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> befindet, ebenfalls untersucht. Da der räumlichen tRNA-Struktur ebenfalls eine Rolle bei der exakten Positionierung des Enzyms an den Schnittstellen zugeordnet wird, ist die 3243-Mutation in den *in vitro*-Transkripten ebenfalls von Interesse.

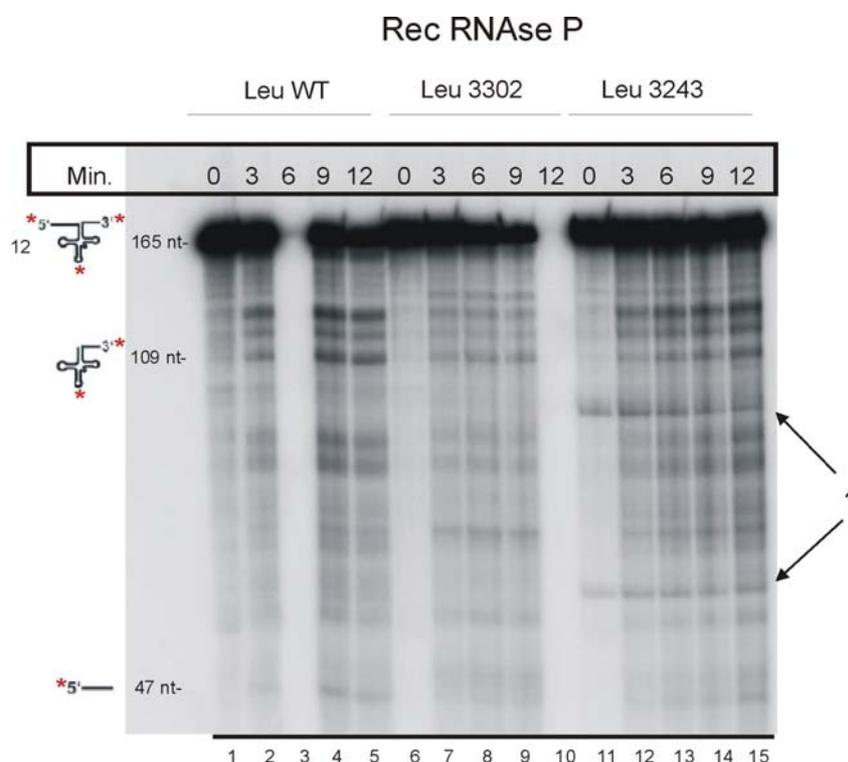


Abb. 30 Kinetik des *in vitro*-Transkripts der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mit Wildtyp-Sequenz, A3302G und A3243G-Mutation. Das Transkript trägt zudem eine 5'-Leader und eine 3'-Trailer-Sequenz, um die Bedingungen einer RNA19-Prozessierung nachzustellen. Alle *in vitro*-Transkripte wurden intern radioaktiv markiert und in einem Prozessierungs-Essay mit rekombinanter RNase P unterschiedlich lange verdaut. Nach 3, 6, 9 und 12 Minuten wurden Proben aus dem Ansatz entnommen und die Reaktion gestoppt. Die 0-Minuten Probe wurde durch Entnahme vor Zugabe des rekombinanten Enzyms simuliert. Die Analyse der Restriktionsprodukte erfolgte durch denaturierenden Acrylamidgellelektrophorese (6%iges Gel) und Autoradiographie. Die Banden korrespondierend zu dem unprozessierten Transkript und 5'-geschnittenem RNaseP-Produkt sind bezeichnet.

Durch die densitometrische Auswertung der Banden, die den prozessierten Transkripten entspricht, zeigt sich, dass beide *in vitro*-Transkripte mit Mutation eine veränderte Kinetik im Vergleich zu der Wildtyp-Variante aufweisen. Diese ist sowohl bei der A3302G-Mutation als auch bei der A3243G-Mutation verlangsamt.

Das bedeutet, dass beide Mutationen, obwohl sie unterschiedlich im Gen der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> lokalisiert sind, einen negativen Effekt auf die Substraterkennung oder den Restriktionsvorgang haben. Jedoch muss unterstrichen werden, dass es sich um *in vitro*-Bedingungen handelt und diese Resultate nur einen Anhaltspunkt zu dem Pathomechanismus der Mutation liefern. Die komplexen Vorgänge *in vivo* können von den *in vitro*-Ergebnissen deutlich abweichen.

Bei den mit "?" gekennzeichneten Banden der Größe von 61 und 95 Nukleotiden handelt es sich um Artefakte der 3243-Probe, die auch schon in vorherigen Arbeiten detektiert wurden, (Rossmannith and Karwan, 1998b). Diese Banden sind gleichermaßen in allen Proben einschließlich der "0-Minuten"-Probe erkennbar und können sich daher nicht um abweichende Restriktionsprodukte des Experiments handeln.

### 7.3.2 RNase Protection-Assay (RPA)

Die sensitive Methode des RNase Protection-Assays wurde zur Detektion von RNA-Intermediaten angewendet, die zumeist in geringerer Konzentration als die jeweiligen Endprodukte in der Zelle vorliegen, da sie als Zwischenstufe rasch weiterprozessiert werden. Eine einzelsträngige, radioaktiv markierte Sonde bindet dabei an das komplementäre Intermediat und schützt dieses somit vor dem nachfolgenden Abbau durch die RNA-Einzelstrang verdauenden Enzyme RNase A und T1. Nach der Auftrennung auf einem denaturierenden Acrylamidgel wurden die unterschiedlich großen protektierten Fragmente am Phospho-Imager detektiert.

Die unterschiedlichen Größen der Fragmente kommen durch die Wahl der RNA19-Sequenz als Sonde zustande, die zu den verschiedenen prozessierten Intermediaten komplementär ist. Da diese jedoch durch die Prozessierung kürzer sind als das Vorstufenfragment und einzelsträngige überhängende RNA-Sequenzen durch die Enzyme abgedaut werden, ergibt sich daraus die endgültige Größe.

Es wurde die Prozessierungsintermediate der Transkriptionsvorstufe RNA19 in RNA-Proben aus unterschiedlichen Geweben untersucht. Dabei handelt es sich um Gewebeproben von Muskel (Musculus vastus lateralis) und kultivierte Vorhaut-Fibroblasten, sowie Proben der Zelllinien HeLa, RDWT, RD3302, RD3243, 143B und 143B/3302.

Der aufgrund der von Bindoff et al., 1993 gewonnenen Daten als gewebespezifisch postulierte Prozessierungsweg, sollte in diesem Versuch in jeweils zwei Muskel- und zwei Fibroblastenproben nachvollzogen werden. Zusätzlich wurden die RD-Zybride, sowie die 143B-Zybride in das Experiment miteinbezogen, um zu untersuchen, ob eventuelle Prozessierungsunterschiede der Gewebe auch in den gewählten Zellmodellen zum tragen kommen.

Eine Aussage über den Prozessierungsweg in den verschiedenen Proben ist nur durch Detektion des entsprechenden Intermediats zu treffen. Das bedeutet für den in Fibroblasten postulierten Weg, bei dem zuerst am 3'-Ende durch das Enzym RNase Z geschnitten wird, ein 84 Nukleotide großes Fragment, bei einer muskelspezifischen Prozessierung mit einer 5'-Prozessierung durch RNase P, ein 75 Nukleotide großes Fragment.

Bei den mitgeführten Kontrollen handelt es sich bei Kontrolle 1 um einen Ansatz ohne RNA-Sonde, der Ansatz von Kontrolle 2 enthält die radioaktivmarkierte Sonde jedoch keine Ribonuklease.

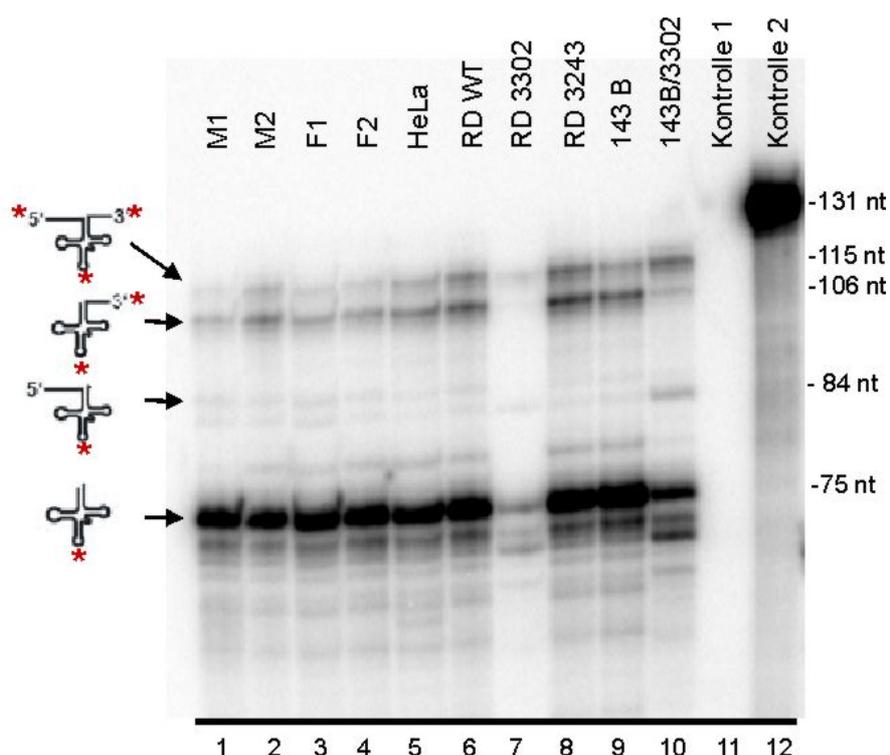


Abb. 31 RNase Protection Assay.

Analyse von RNA-Intermediaten, die bei dem Prozessierungsvorgang der *in vitro* generierten Transkriptionsvorstufe der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, die sowohl 5'- als auch 3'-Sequenzen umfasst, in unterschiedlichen Gewebeproben und Zelllinien entstehen.

Die unterschiedlich protektierten Intermediate sind nach elektrophoretischer Auftrennung und Exposition in Abb. 31 dargestellt. Bei Kontrolle 2 in Bahn 12 erscheint die Bande der unverdauten radioaktiven Sonde mit einer Größe von 131 Nukleotiden, Spur 11 hingegen zeigt keine Signale, da bei dieser Kontrolle keine Sonde hinzugefügt wurde.

In allen Spuren der verschiedenen Gewebe- und Zellkultur-Proben lassen sich mehrere deutliche Banden erkennen. Das Fehlen einer Bande auf Höhe der in Kontrolle 2 erkennbaren unverdauten RNA-Sonde weist auf einen vollständigen Verdau einzelsträngiger RNA hin. Bei der obersten Bande handelt es sich um das 115 bp große RNA19-Fragment, das entsprechend der fehlenden Klonierungssequenzen kleiner als die zu Beginn eingesetzte Sonde ist. Relativ nah darunter läuft eine Bande, die mit 106 Nukleotiden dem 5'-verdauten Intermediat entspricht, also dem, das theoretisch zuerst durch RNase P geschnitten wurde.

Die sehr starke Bande in der Mitte des Gels zeigt das final prozessierte Produkt, die durch RNase P am 5'- und durch RNaseZ am 3'-Ende verdaute tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Dieses liegt, im Vergleich zu den in geringen steady state-Niveau vorliegenden Intermediaten, die ja als Zwischenstufe weiter prozessiert werden, als Endprodukt der Prozessierungsreaktion in deutlich höherer Konzentration vor.

Zwischen den deutlich erkennbaren Banden zeigen sich zwei schwächere Banden, die man aus zwei Gründen dem RNase Z verdauten Intermediat zuordnen kann. Zum einen wegen der Größe von 106 bp und zum anderen wegen einer 3302-Mutations-spezifischen Eigenart, die auch bei den vollständig prozessierten Endprodukt in beiden an nt3302 mutierten Zelllinien auffällt. Bei beiden Proben tritt eine weitere Bande auf, die in kurzem Abstand unter der erwarteten Bande migriert. Die am 3'-Ende lokalisierte Mutation dieser beiden Proben führte an diesem Ende zu einer unvollständigen Sondenbindung und somit zu einem Aufklappen zu zwei Einzelsträngen, die folglich von den Restriktionsenzymen abgebaut wurden. Somit führt die Mutation an nt3302 zu einem Artefakt in diesem Experiment, dass daher keine qualitative Aussage über den Prozessierungsweg zulässt. Zudem konnten keinerlei Unterschiede zwischen dem Bandenmuster der Muskel- und Fibronlastenproben festgestellt werden.

#### 7.4 Differenzierung der RD-Zybride

Da es sich bei Muskelgewebe um terminal differenzierte Zellen handelt, wurde eine Rolle des Differenzierungszustands der RD-Zybride bei der Pathogenität der A3302G-Mutation in Betracht gezogen. Die Überlegung war, dass unter differenzierungsbedingten Veränderungen von Metabolismus und Expression, die Mutation einen größeren Effekt auf den Proteinsyntheseapparat haben könnte.

Daher wurden die Zellen unterschiedlich lange mit dem Phorbolester TPA behandelt, der als Induktor der Differenzierung von Rhabdomyosarkomzellen beschrieben wurde (Bouché et al., 1993).

Um das für die Muskeldifferenzierung charakteristische Verschmelzen einzelner Myoblasten zu einem Synzytium multinukleärer Myotuben zu erfassen, wurden die Zellkerne der präparierten Zellen mit *Sytox green* angefärbt. Bei der Fluoreszenzmikroskopie sollte so die Anzahl polynukleären spindelförmiger Zellen bestimmt werden.

Sowohl nach 9 als auch nach 11 Tagen Differenzierung konnten nahezu keine vielkernigen Myotuben detektiert werden. Zwar traten einige Veränderungen der Zellmorphologie und ein differenzierungsbedingter Arrest der Zellteilung auf, jedoch konnte in keiner der spindelförmigen, Tuben-ähnlichen Zellen des Wildtyp oder der Mutante mehr als ein Kern festgestellt werden.

Eine tendentielle Umstellung auf das Differenzierungsprogramm auf Ebene des Zellmetabolismus sollte dann in einer Western Blot-Analyse anhand der Detektion charakteristischer Differenzierungsfaktoren untersucht werden.

Bei den Proben handelte es sich um Wildtyp- und an nt3302 mutierte Rhabdomyosarkomzybride, die über einen konstanten Zeitraum von neun Tagen dem Differenzierungsinduktor TPA ausgesetzt waren (Bouche et al., 1993). Als Negativkontrolle wurde der unbehandelte Proteinextrakt von RD-Wildtypzellen aufgetragen. Die Detektion von  $\beta$ -actin wurde als Beladungskontrolle verwendet. Als Marker der Differenzierung wurde Antikörper gegen a-sarkomerisches Aktin verwendet, das im Zuge der Differenzierung von Muskelzellen exprimiert wird. Ebenso wie Myogenin, ein Transkriptionsfaktor, der an der Aktivierung muskelspezifischer Gene beteiligt ist und dessen Expression im Normalfall bei der Differenzierung ebenfalls hochreguliert wird. Dies wird jedoch im Fall von Rhabdomyosarkomzellen als Teil der tumorbedingten Änderungen in der Zelle konstant während aller Entwicklungsphasen exprimiert. Um diese zellspezifische Eigenschaft ebenfalls an den RD-Zybriden nachvollziehen zu können, wurde noch zusätzlich ein Antikörper gegen Myogenin eingesetzt.

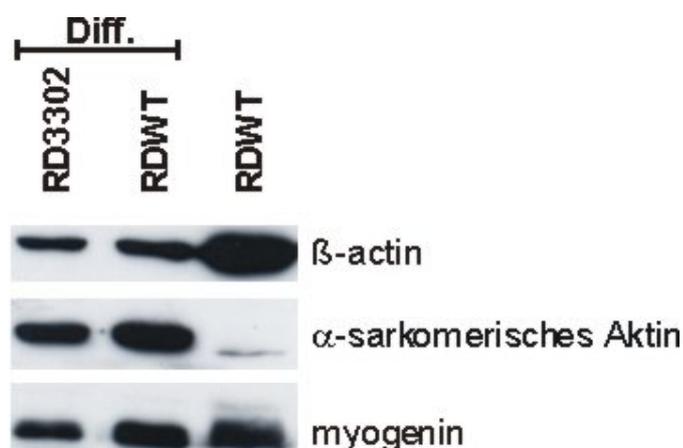


Abb. 32 Western Blot zum Nachweis der Differenzierung von RD-Zybriden.

Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch 9-tägige Behandlung mit dem Phorbolster TPA. Eine Probe von RDWT im undifferenzierten Zustand wurde als Negativkontrolle verwendet.  $\beta$ -actin dient hier als Ladekontrolle. Die Expression von  $\alpha$ -sarkomerischen Aktin ist ein Indikator für Muskeldifferenzierung genau wie Myogenin. Jedoch ist im speziellen Fall der Rhabdomyosarkomzelllinie Myogenin aufgrund tumorbedingter Veränderungen im Zellmetabolismus konstant exprimiert.

$\alpha$ -sarkomerisches Aktin kann wie erwartet in undifferenzierten RDWT-Zellen nicht nachgewiesen werden, bei der schwach sichtbaren Bande in Abb. 32 handelt es sich um ein unspezifisches Signal. Deutliche Mengen des Proteins können hingegen bei den über 9 Tage differenzierten Zellen nachgewiesen werden und sprechen so für einen Wechsel in ein Differenzierungsprogramm beider Zybride.

Myogenin ist, wie bereits in der Literatur beschrieben, unabhängig vom Differenzierungszustand in Rhabdomyosarkomzellen konstant exprimiert.

## 8 Diskussion

### 8.1 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Erkrankungen infolge von Mutationen der mitochondrialen DNA sind in der Regel multisystemisch und betreffen überwiegend Gewebe mit hohem Energiebedarf.

In dem speziellen Fall der A3302G-Mutation der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> zeigte sich ein nahezu exklusiver Effekt auf Skelettmuskel, obwohl die Mutation auch zu einem hohen Heteroplasmiegrad in anderen Geweben vorhanden ist (Watmough et al., 1990).

In dieser Arbeit wurde deshalb ein muskelspezifisches Zybridmodell verwendet, um sich der *in vivo*-Situation im Skelettmuskel des Patienten anzunähern und den Pathomechanismus im Kontext gewebsspezifischer Einflüsse zu untersuchen.

Im genaueren sollte nachvollzogen werden, inwiefern sich der Ablauf der posttranskriptionalen Prozessierung von primären mtDNA Transkripten in den Geweben und den Zellmodellen unterscheidet.

## 8.2 Mitochondriale Myopathie

Zahlreiche mtDNA Mutationen sind mit dem Symptom der Skelettmuskel-Myopathie assoziiert, jedoch tritt dieses gewöhnlich in Verbindung mit anderen Organdefekten wie zumeist des Gehirn und Nervensystems auf. Die gut untersuchte A3243G-Mutation bewirkt einen multi-organischen Phänotyp mit Enzephalopathie, Laktatazidose und Krämpfen zusätzlich zu einer Myopathie des Skelettmuskels.

MtDNA Mutationen die ausschließlich den Skelettmuskel betreffen sind dagegen selten. Die molekularen Ursachen können unterschiedlich sein, so präsentiert sich eine durch eine Mutation des nukleären TK2-Gens bewirkte Depletion der mtDNA als isolierte MM (Mandel et al., 2001), jedoch wird dieser Phänotyp zumeist durch Mutation in den mt-tRNA-Genen verursacht. Mittlerweile wurden zahlreiche Mutationen mitochondrialer tRNAs in diesem Zusammenhang beschrieben und sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

tRNAPhe	T618C, A606G
tRNA <sup>Leu</sup> (UUR)	T3250C, A3251G, A3280G, A3288G, 3302G
tRNA <sup>Gln</sup>	4370insA
tRNAMet	T4409C
tRNA <sup>Trp</sup>	G5521A
tRNA <sup>Ala</sup>	C5650A
tRNACys	T8514C
tRNA <sup>Ser</sup> (UCN)	G7497A
tRNA <sup>Lys</sup>	A8344G, T8362G
tRNA <sup>Gly</sup>	T10010C, G10014A
tRNA <sup>Leu</sup> (CUN)	A12320G ,G12334A
tRNA <sup>Glu</sup>	T14709C
tRNA <sup>Thr</sup>	15940delT
tRNA <sup>Pro</sup>	G15990A

Abb. 33 mt-tRNA-Mutationen mit dem Phänotyp der Mitochondrialen Myopathie

aus: Chinnery et al., 1997; Hadjigeorgiou et al., 1999; Dey et al., 2000; Shoffner, 2001; Sternberg et al., 2001; Vives-Bauza et al., 2001; Nishigaki et al., 2002; Horvath et al., 2003; McFarland et al., 2004

Es zeigt sich, dass auch einige geläufige tRNA-Mutationen wie z.B. die A8344G-Mutation der tRNA<sup>Lys</sup>, die normalerweise mit dem MELAS-Syndrom diagnostiziert werden, sich mitunter mit einer isolierten mitochondrialen Myopathie präsentieren.

### 8.3 Deskription der klinisch bekannten Fälle mit A3302G-Mutation

Die A3302G-Mutation der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> ist eine seltene Mutation und wurde bislang in 12 Fällen aus sechs nicht-verwandten Familien beschrieben.

Der erste Fallbericht einer Patientin (P1) mit A3302G-Mutation wurde 1990 von Watmough et al. publiziert und postulierte einen Zusammenhang des diagnostizierten Atmungsketten-defekts mit der mitochondrialen Fettsäure-Oxidation. Der klinische Phänotyp wurde mit Muskelschwäche, Laktatazidose, intramuskulärer Lipidakkumulation und Belastungs-intoleranz beschrieben (Watmough et al., 1990).

Untersuchung der Atmungskettenkomplexe ergab einen drastischen Ausfall der Komplex I Aktivität (<5 %) und eine etwas mildere Reduktion der Komplexe III und IV (63 % bzw. 30 % im Vergleich zur Kontrolle). Die Patientin zeigte desweiteren in der Skelettmuskelbiopsie eine Anhäufung von Mitochondrien in Form von *ragged red fibres* sowie eine Akkumulation neutraler Lipide.

Die maternale Vererbung der Krankheit zeigt sich in der Familiengeschichte. Sowohl Mutter als auch zwei Geschwister verstarben an einem kardiorespiratorischen Defekt und konnten mit gleichen Symptomen diagnostiziert werden.

Erst 2004 wurden zwei weitere Fälle der A3302G-Mutation bekannt, bei denen sowohl die Mutter (P2) als auch der Sohn (P3) mit mitochondrialer Myopathie (MM) diagnostiziert wurden (van den Bosch et al., 2004). Bei beiden bewirkte die Mutation eine doppelseitige Gesichtslähmung, externe Ophthalmoplegie und Schwächung des Schultergürtels sowie einen Herzphänotyp. In allen Geweben des Sohnes wurde ein höherer prozentualer Mutationsgehalt als bei der Mutter detektiert, konkret im Muskel waren dies 96 % beim Sohn und 67 % bei der Mutter. Die allgemein schwereren Symptome des Sohnes, der schließlich an einem respiratorischen Defekt und kardialer Arrhythmie verstarb, lassen einen Zusammenhang zwischen Mutationsgehalt und der klinischen Manifestation vermuten.

Analyse des Muskels ergab ebenfalls einen kombinierten Komplex I und IV Defekt und *ragged red fibres*, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei der ersten Patientin. Alle drei Fälle zeigten überwiegend die gleichen Symptome, so konnte der fehlende Herzphänotyp bei der ersten Patientin durch erneute Auswertung der Patientendaten nachträglich hinzugefügt werden (Hutchison et al., 2005).

Der klinische Phänotyp der A3302G-Mutation wurde 2005 erneut erweitert durch die Fallbeschreibung 4 weiterer Patienten, von denen drei in verwandtschaftlicher Beziehung standen (Hutchison et al., 2005). Myopathie des Skelettmuskels, Komplex I-Defekt, *ragged red fibres*, Laktatazidose und Belastungsintoleranz waren auch hier, soweit die Untersuchungsdaten vorlagen, allgemein vorhanden. Leider lag nur bei einem Patienten eine umfassendere Anamnese sowie eine Muskelbiopsie vor, in der nahezu homoplasmatische Mengen der Mutation detektiert wurden. Bei den anderen drei miteinander verwandten Patienten wurde nur in Blut, Lymphozyten bzw. Mundschleimhaut nach der Mutation gesucht und diese dort wie erwartet nur zu einem geringem prozentualen Anteil gefunden.

Zusätzlich zu den klassischen Symptomen wurden in dieser Veröffentlichung noch weitere phänotypische Erscheinungen diagnostiziert und dem Krankheitsbild der A3302G-Mutation zugesprochen. Genannt wurden neben Ptosis (hängendes Augenlid) und PEO (progressive externe Ophthalmoplegie; bei einem Patienten) sowie auch Migräne, Depression und Hörverlust. Im Gegensatz zu den vorgenannten Fällen konnte bei keinem der Patienten ein Herzphänotyp diagnostiziert werden.

Zwei weitere Fälle, diesmal mit einem frühen Ausbruch der Erkrankung im Kindesalter, wurden von Shoffner et al., 1993 und Hahn et al., 2007. erwähnt. Letzterer beschreibt ein 4-jähriges Kind mit Komplex I-Defekt, Myopathie, Belastungsintoleranz und Laktatazidose.

Ob die zusätzlich zu den "klassischen" Phänotypen einer mitochondrialen Myopathie beschriebenen klinischen Zustände wie Migräne, Depression und Schädigung der Augenmuskulatur sowie des Hörvermögens im direkten Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der A3302G-Mutation stehen, ist bislang nicht klar. Jedenfalls wird in allen Arbeiten vermutet, dass die Skelettmuskelspezifität der Mutation durch gewebsspezifische Unterschiede in der Prozessierung des primären Transkripts RNA19 (siehe Abb. 34) zu einer schweren Störung der Proteinsynthese und der Oxidativen Phosphorylierung führt.

#### 8.4 Hypothese des gewebsspezifischen Pathomechanismus

Bindoff formulierte anhand der Daten der von Watmough et al. beschriebenen Patientin (P1) einen möglichen gewebsspezifischen Pathomechanismus, der durch eine unterschiedliche Restriktions-Abfolge der Endonukleasen RNase P und RNase Z in Muskel und Fibroblasten zum Tragen kommt und in Abb. 34 schematisch veranschaulicht ist (Bindoff et al., 1993).

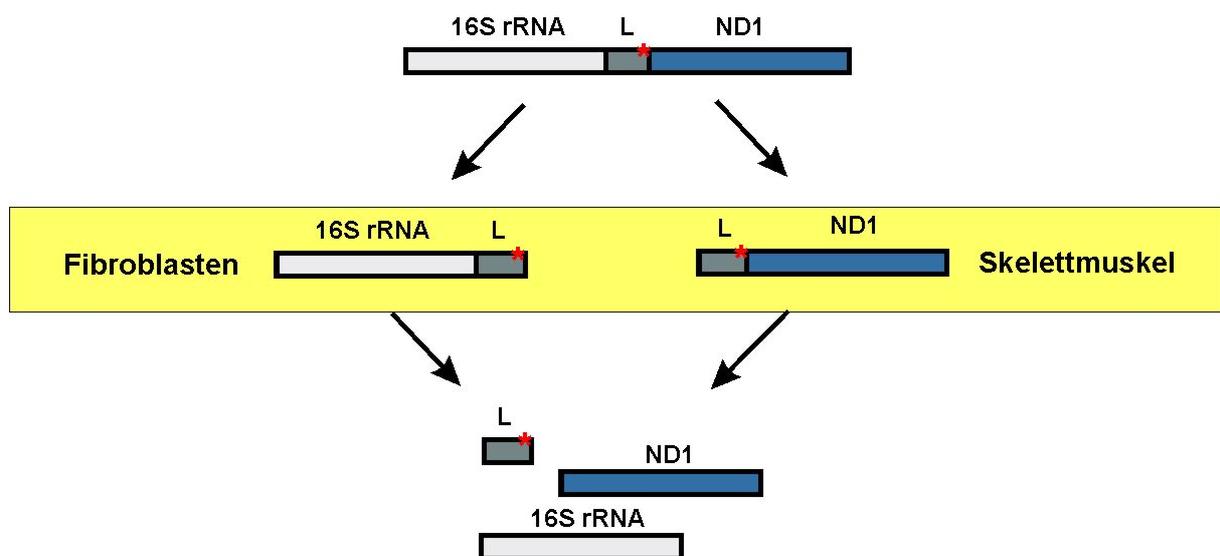


Abb. 34 Mögliches Prozessierungsschema in Muskel und Fibroblasten.

Durch eine von Fibroblasten unterschiedliche Schnittrihenfolge der Restriktionsendonucleasen RNase P und RNase Z in Muskel, wird eine Verstärkung des pathologischen Effekts der A3302G-Mutation am 3'-Ende der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> vermutet. Durch die veränderte Reihenfolge der Prozessierung entstehen die gewebsspezifische Intermediate 16S rRNA + tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> in Fibroblasten und tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> + ND1-mRNA in Muskel. Die Position der A3302G-Mutation in der tRNA ist mit \* gekennzeichnet.

Wie bereits in Kapitel 3.4.1 der Einleitung beschrieben, erfolgt die Prozessierung der polyzistronischen Transkriptionsvorstufen durch exakte Restriktion an den 5'- und 3'-Enden der regelmäßig zwischen den Abschnitten für mRNA und rRNA eingefügten tRNA-Sequenzen.

Bindoff et al. zeigte in einer Northern Blot-Analyse von Muskel- und Fibroblasten-Proben der Patientin mit der A3302G-Mutation zwei divergierende Intermediate bei der Prozessierung der Transkriptionsvorstufe RNA19 (siehe Abb. 35). Alle drei RNA-Spezies konnten jeweils auch in gesundem Geweben der Kontrollen detektiert werden und kommen daher scheinbar in natürlicher Weise vor. Der pathologische Effekt zeigt sich daher in der starken Akkumulation der Intermediate mit besonderer Auswirkung auf den Gehalt der Transkriptionsvorstufe RNA19. Diese tritt in beiden Geweben der Patientin mit der A3302G-Mutation verstärkt auf und ist im Muskel sogar bis zu 1.000-fach erhöht.

So scheint der pathologische Effekt der Mutation erst vor dem Hintergrund eines gewebespezifischen Prozessierungsmechanismus im Muskel zum Tragen zu kommen, Fibroblasten hingegen zeigen keinen Defekt.

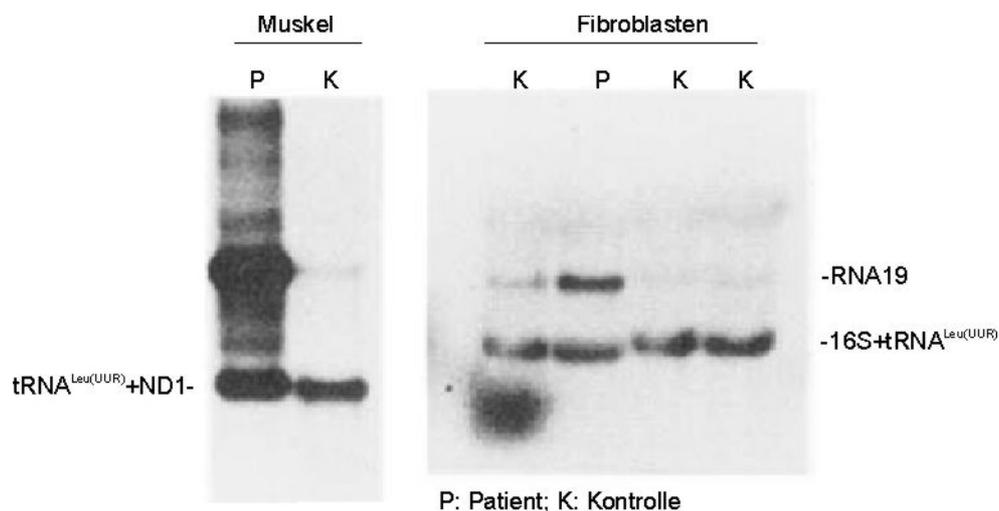


Abb. 35 Northern Blot Analyse von Prozessierungsvorstufe und -Intermediaten.

Untersucht wurden Proben des Skelettmuskels und von kultivierten Fibroblasten der Patientin mit der A3302G-Mutation und verschiedenen gesunden Kontrollpersonen. Die Membranen wurden mit einer Sonde gegen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> hybridisiert. Drei unterschiedliche Signale konnten detektiert werden. Die Transkriptionsvorstufe RNA19 bestehend aus einem polyzistronischen RNA-Molekül, das die Information für 16S-rRNA, tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> und ND1 enthält. Zusätzlich erkennt man die unterschiedlichen Prozessierungsvorstufen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>+ND1 in Muskel und 16S rRNA+tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> in Fibroblasten und postulierte daher eine unterschiedliche Prozessierungsfolge in den beiden Geweben.

## 8.5 Die Transkriptionsvorstufe RNA19

RNA19 ist eine Transkriptionsvorstufe, die in unterschiedlichen Gewebeproben gesunder Patienten nachgewiesen werden kann. Je nach Organ unterscheidet sich jedoch das steady state-Niveau des Moleküls. So zeigen Muskel, Leber und Milz ein schwächeres Signal als andere Gewebe wie Gehirn, Niere und Uterus, besonders hohe Konzentrationen findet man in der Herzprobe in Abb. 36. Diese Unterschiede lassen sich vor allem durch eine unterschiedliche Prozessierungseffizienz sowie gewebsspezifische Faktoren erklären. Anhand des Northern Blots in Abb. 36 könnte man beim Skelettmuskel auf eine hohe Geschwindigkeit bei der Umsetzung der Transkriptionsvorstufe in die einzelnen maturierten RNA-Moleküle schließen, bei Herz, Gehirn, Niere und Uterus scheint die Prozessierung jedoch erheblich langsamer zu erfolgen, im Zuge dessen die Vorstufe akumulierte. Daraus könnte man schließen, dass diese rasche Prozessierung im Skelettmuskel essentiell ist (und auch in Leber und Milz) und dieser deshalb sehr stark auf eine drastische mutationsbedingte Verlangsamung reagieren könnte und somit zu einem deutlichen Pathophänotyp führt. Muskel gehört zu den Geweben mit dem stärksten Energiebedarf, der auch noch in weiten Bereichen schwanken kann und weist somit einen sehr aktiven und anpassungsfähigen Metabolismus auf, der eine stockende Versorgung mit  $tRNA^{Leu(UUR)}$ , ND1-mRNA und 16S-rRNA weniger tolerieren würde. Leber ist im Gegensatz dazu ein höchst regenerierfähiges Organ und Milz enthält viele stark proliferierende Zellen.

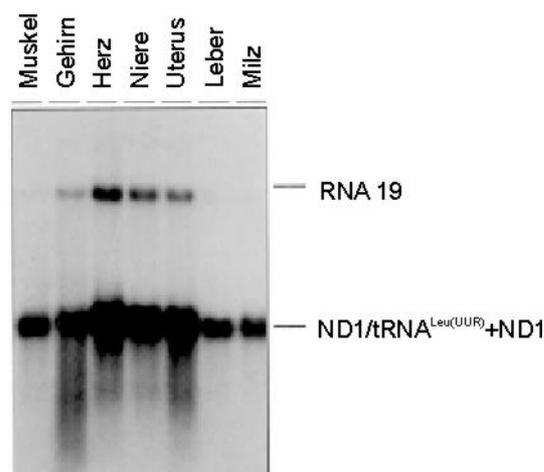


Abb. 36 Northern Blot-Analyse der Transkriptionsvorstufe RNA19 in normalen humanen Gewebeproben.

Sowohl RNA19 als auch ND1 bzw. ND1+Leu hybridisieren mit einer ND1-Sonde. Es zeigt sich, dass einige Gewebe schon unter normalen Bedingungen ein höheres steady state-Niveau der Transkriptionsvorstufe RNA19 aufweisen. Diese Variation lässt sich vermutlich durch gewebsspezifische Faktoren oder mitochondriale RNA-Prozessierungskapazität erklären (Koga et al., 2003).

## 8.6 Das Zybridmodell

Mitochondriale Defekte präsentieren sich zumeist mit einem diversen Spektrum von Phänotypen. Verschiedene Mutationen können einen identischen Phänotyp hervorrufen, andersherum zeigt sich die gleiche Mutation in verschiedenen Patienten in unterschiedlicher Schwere und Symptomatik. Als eine Erklärung werden gewebsspezifische Faktoren angenommen, die den Effekt der Mutation individuell beeinflussen.

Zur Analyse des exklusiven Muskelpathophänotyps der A3302G Mutation in der mitochondrialen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> wurden aus einer Rhabdomyosarkomzelllinie generierte Zybride eingesetzt (Vergani et al., 2000; Vergani et al., 2007). Diese sollten durch die Expression muskelspezifischer Isoenzyme und Faktoren die *in vivo*-Situation im Patienten widerspiegeln und so ein Modell zur detaillierten Analyse der gewebsspezifischen Vorgänge darstellen.

Prinzipiell ist der Einsatz eines Zellmodells in der Erforschung mitochondrialer Erkrankungen ein durchaus gängiges Verfahren. Jedoch weist es auch zahlreiche Schwachstellen auf, die zu Einschränkungen bei der Interpretation der erworbenen Resultate führen.

So erweist sich die Analyse der A3302G-Mutation in Zybridzelllinien als schwierig, bedingt durch die großen Unterschiede genereller und spezifischer Natur zwischen der *in vivo*-Situation im Patienten und den *in vitro*-Bedingungen der Zellkultur.

Zum einen ist das allgemein die umfassende Versorgung mit Nährstoffen unter optimierten Bedingungen in der Zellkultur im Gegensatz zu der Versorgung im intakten menschlichen Organismus. Zum anderen ist ein Zeitfaktor zu berücksichtigen, der *in vivo* zu einer verstärkten Pathogenität führen kann. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt in einem Zeitfenster von Wochen, während die mutierten Zellen, v.a. die terminal differenzierten, im Körper über mehrere Jahre existieren und sich somit der Phänotyp der Mutation maximal manifestieren kann. Bis auf die zwei Fälle mit einer Erkrankung im frühen Kindesalter ist diese Mutation bei den anderen zehn Fällen erst im jungen Erwachsenenalter oder später in Erscheinung getreten.

Studien an TFAM k.o.-Mäusen (Larsson et al., 1998), bei denen die mtDNA und damit die Atmungskette letztlich komplett eliminiert wird, bestätigen diese Annahme. Mauslinien mit einem Skelettmuskel-spezifischen TFAM-k.o. zeigten einen Abstand von mehreren Wochen bis Monaten zwischen TFAM-k.o. und dem Auftreten eines schweren Atmungskettendefekts (Wredenberg et al., 2002). Diese Zeitspanne ist wahrscheinlich durch die Turnover-Raten von TFAM-Transkript und -Protein sowie der mtDNA und mitochondrial codierten Atmungskettenuntereinheiten zu erklären. Ähnliches findet sich bei Herz- bzw. Neuronenspezifischem knock-out (Wang et al., 1999; Sorensen et al., 2001).

Es wurde bereits vor einiger Zeit gezeigt, dass Zelllinien auf eine Inhibition der mtDNA-Expression mit einem dramatischen Anstieg in der Stabilität mtDNA-codierter Transkripte reagieren (England et al., 1978; Lansman and Clayton, 1975). Der verzögerte Ausbruch der Krankheit in ihrer ganzen symptomatischen Schwere kann möglicherweise auch durch entsprechende Kompensationsmechanismen wie die Erhöhung des Mitochondriengehalts (RRF) erklärt werden.

Weitere Einschränkungen ergeben sich im speziellen Fall daraus, dass die RD-Zellen einige wichtige muskelspezifische Charakteristika, wie die Fähigkeit zur eigenständigen Differenzierung, nicht aufweisen (siehe Kapitel 8.6.1). Ein weiterer Punkt ist, dass die Zybride aus einer Tumorzelllinie generiert wurden, deren genomische DNA häufig aneuploid sind und deren entartetes Wachstum zumeist mit einer Umstellung des Metabolismus einhergeht.

### 8.6.1 Differenzierung von Muskelzellen

Im Zuge der Zelldifferenzierung fusionieren proliferierende Myoblasten zu postmitotischen Myotuben, die sich schließlich zu Muskelfasern zusammenfinden. Myogenese ist nicht nur ein exklusiver Prozess in der frühen Entwicklung, sondern bewirkt lebenslang Muskelwachstum und -Regeneration durch Proliferation von Satellitenzellen und nachfolgender Fusionierung zu Fasern, ähnlich des Entwicklungsprogramms embryonaler Muskelzellen (Cornelison, 2008). Während der Muskelentwicklung laufen tiefgreifende Veränderungen des Zellmetabolismus ab, die mit einem hohen Energieverbrauch verbunden sind.

Herzberg et al. fand anhand einer Kurzzeit-Behandlung mit EtBr an kultivierten Muskelzellen heraus, dass Myoblasten mit einem Atmungskettendefekt eine gestörte Fähigkeit zur Fusionierung zu Myotuben haben, wahrscheinlich in Folge einer mangelnden ATP-Bereitstellung (Herzberg et al., 1993). Wiederholungen mit Langzeit-EtBr-Behandlung zeigten jedoch, dass langfristig eine Umstellung auf anaerobe Energiebereitstellung ausreichend ist, um Myoblasten-Differenzierung zu gewährleisten (Sobreira et al., 1999).

In der Schlussfolgerung könnte auf Grund ersterer Erkenntnis die Annahme gemacht werden, dass sich die A3302G-Mutation im Patienten über die Störung der ATP-Bereitstellung massiv auf die Skelettmuskeldifferenzierung auswirkt und so die Gewebespezifität der Mutation plausibel machen. Die Aufrechterhaltung der Differenzierung durch anaerobe Energiebereitstellung scheint diese Hypothese zu widerlegen. Berücksichtigt man jedoch die bereits zuvor erwähnten Unterschiede von *in vivo*- und *in vitro*-Bedingungen, besteht durchaus die Möglichkeit einer massiven energetischen Krise unter *in vivo*-Bedingungen.

Die mutierten RD-Zybride zeigten zwar im Zuge der Differenzierungsinduktion mit dem Phorbolester TPA morphologische Veränderungen und einen gewissen Wachstumsarrest, jedoch konnte im ihrem Falle im Gegensatz zu den WT-RD-Zellen kein ausreichender Differenzierungsgrad erreicht werden, die eine weitere Analyse der Auswirkung der Mutation gerechtfertigt hätte.

Durch weiterführende Untersuchung an differenzierten RD-Zybriden hätte man den Fokus auf die, trotz ähnlich hohem Mutationsgehalt, unterschiedliche Pathogenität in Muskel und Fibroblasten richten können (siehe Bindoff et al., 1993). Einer der zentralen Unterschiede zwischen diesen Geweben ist aber, dass es sich bei Fibroblasten um hochproliferierende Zellen mit hohem Turn-over handelt. Skelettmuskel hingegen besteht zum größten Teil aus postmitotisch ausdifferenzierten Zellen, in denen über einen langen Zeitraum die Mutationsbedingten Störungen vorliegen und akumulieren können, bis sie dann schließlich eine gewisse Toleranzgrenze überschreiten.

### **8.7 Vergleich der Ergebnisse von RD- und 143B-Zybriden**

Der Zellhintergrund ist ein entscheidender Faktor für die Heterogenität des Phänotyps, sowohl in unterschiedlichen Geweben der betroffenen Patienten als auch in unterschiedlichen Zybridsystemen. Der Phänotyp der A3302G-Mutation unterscheidet sich in zahlreichen Punkten zwischen Osteosarkomzybriden und Rhabdomyosarkomzybriden.

Der starke Einfluss des Zellhintergrunds auf die Pathogenität einer mitochondrialen Mutation spiegelt sich auch in den zum Teil sich widersprechenden Ergebnissen verschiedener Gruppen wieder. Auch unterschiedlich Veröffentlichungen über vergleichende "Zybridologie" zeigen klare Differenzen. Nukleärer genetischer Hintergrund, entwicklungsphysiologische Eigenschaften, mitochondrialer Haplotyp sowie epigenetische Effekte können allesamt die pathologischen Folgen der Mutation in unterschiedlichen Zelltypen beeinflussen (Übersicht in Jacobs and Holt, 2000).

Im Allgemeinen fällt bei der Betrachtung beider Zybridsysteme auf, dass die A3302G-Mutation durchgehend einen deutlich schwerwiegenderen pathologischen Effekt in Osteosarkomzellen bewirkt.

### 8.7.1 Sauerstoffverbrauch

Der polarographisch ermittelte Sauerstoffverbrauch in RD3302-Zellen ist moderat um ca. 50% reduziert, wohingegen bei den 143B/3302-Zellen nahezu keine Atmung detektiert werden konnte. Die spektrophotometrische Analyse der maximalen Enzymkapazität zeigte daraufhin starke Unterschiede in der Aktivität von Komplex IV. Diese war in 143B/3302-Zellen bis auf verbleibende 5% reduziert, bei RD3302-Zellen hingegen nur um die Hälfte. Die Verminderung der Aktivitäten von Komplex III und dem mitochondrialen Matrixprotein Citrat-Synthase fiel bei beiden Zybridzelllinien ähnlich moderat aus, mit im Schnitt 60% Restaktivität bei Komplex III und 75% bei der CS. Keine Veränderung zeigten beide, wie erwartet, bei dem ausschließlich kerncodierten Komplex II, der von Störungen des mitochondrialen Proteinsyntheseapparates primär nicht betroffen ist.

### 8.7.2 LaktatAkkumulation

Ein nahezu totaler Ausfall der oxidativen Phosphorylierung lässt auf eine metabolische Umstellung auf anaerobe Energiegewinnung durch Glykolyse schließen. Diese ist in der Regel mit einem Anstieg der Laktatkonzentration verbunden, bei dessen Produktion der zur Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat notwendige Cofaktor NAD regeneriert wird. Bei den Rhabdomyosarkomzybriden konnte ein signifikanter, jedoch verglichen mit 143B/3302 nur sehr geringer Anstieg der Laktatkonzentration ermittelt werden (RDWT: 24 fmol/Zelle x Min.; RD3302 27 fmol/Zelle x Min.). Bei den Osteosarkomzellen zeigte sich immerhin nahezu eine Verdopplung der Laktatkonzentration (143B: 28 fmol/Zelle x Min.; 143B/3302: 52 fmol/Zelle x Min.). Diese Unterschiede zwischen den Zybridzelllinien unterstreichen den oben diskutierten unterschiedlichen nukleären Hintergrund.

Wichtig bei der Analyse von Zellkulturmodellen ist noch die Tatsache, dass unter *in vitro*-Bedingungen eine Ansäuerung des Mediums durch Laktat kein Problem darstellt, jedoch *in vivo* einen starken pathogenen Effekt in Form einer Laktat-Azidose auslöst, wie es auch bei Patienten mit dem MELAS-Syndrom der Fall ist.

### 8.7.3 Energiehaushalt der Zelle

Alle energieverbrauchenden Prozesse in Zellen sind direkt oder indirekt auf die Hydrolyse von ATP zu ADP angewiesen (Boyer, 1998). Das Energieladungspotential ECP, das das Verhältnis von ATP, ADP und AMP darstellt, repräsentiert den molaren/stöchiometrischen Anteil an hochenergetischen Verbindungen im Gesamtpool der Adeninnukleotide (Atkinson, 1968) und ist somit ein Maß für den Energiegehalt der Zelle ( $ECP = (ATP + 0,5 \cdot ADP) / TAN$ ).

Die Frage, wie sich der Defekt der Oxidativen Phosphorylierung und eine kompensatorische Umschaltung auf anaerobe ATP-Synthese auf den Energiegehalt der Zelle auswirken, wurde durch eine HPLC-Analyse der Adeninnukleotidmetabolite untersucht. Zwar zeigen die mutierten Osteosarkomzybride einen im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduzierten Abfall des ATP- und ADP-Gehalts, jedoch ohne Auswirkungen auf die stöchiometrischen Verhältnisse der Adeninnukleotide (Abb. 22). Im Gegensatz dazu zeigen RD3302-Zybride eine Reduktion des ATP-Gehalts um 36%, die sich in einer moderaten, aber signifikanten Verminderung des Energieladungspotentials äußert (siehe Abb. 23).

Eine moderate Senkung des Energiegehalts der Zelle kann im Zuge einer metabolischen Anpassung an eine verstärkte oder exklusive anaerobe Energiegewinnung erfolgen, da hohe ATP-Konzentrationen zu einer Hemmung der PFK der Glykolyse führen und ADP diese stimuliert (Atkinson, 1968). Eine geringfügig reduzierte Konzentration des ATP muss also keine direkte Auswirkung einer gestörten Atmungskette und einer daraus folgenden blockierten aeroben Energiegewinnung sein, da diese unter *in vitro*-Bedingungen durch die Glykolyse kompensiert werden kann. *In vivo* sieht die Situation anders aus: Da hier keine so optimale Versorgung mit Nährstoffen und vor allem Entsorgung von Laktat und  $H^+$  vorliegt, kann im Patienten solch eine metabolische Umstellung die Situation verschärfen und zu der Pathogenität der Mutation beitragen.

Die RD-Zybride entstammen einer embryonalen Rhabdomyosarkom-Zelllinie, die mit einem aggressiven malignen Tumorwachstum assoziiert ist. Diese Zellen sind stark glykolytisch und stillen ihren Energieverbrauch per se durch anaerobe Energiegewinnung (Warburg Effekt; WARBURG, 1956). Im Vergleich zu HeLa- und 143B-Zellen mit einem durchschnittlichen Sauerstoffverbrauch von 4-5 fmol/Zelle x Min. atmen RD-Zellen aber nur halb so viel (2 fmol/Zelle x Min.). Diese grundlegende Eigenschaft ermöglicht es RD-Zybriden eventuell, einen Oxphos-Defekt besser zu kompensieren und ist auch eine mögliche Erklärung für den minderschweren Phänotyp, verglichen zu den Auswirkungen in 143B-Zybriden. Alternative Stoffwechselwege wie der Katabolismus von Glutamin, das routinemäßig in hohen Konzentrationen allen Zellkulturmedien zugesetzt wird, könnten hier verstärkt aktiviert sein.

#### 8.7.4 Akkumulation der Transkriptionsvorstufe RNA19

Wird eine Ansammlung der Transkriptionsvorstufe RNA19 in mutierten Zellen im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle detektiert, lässt dies Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung der Prozessierung zu.

In RD3302-Zybriden zeigte sich eine 6 fache Akkumulation von RNA19/ND1 im Vergleich zu RDWT, zusätzlich dazu war der Gehalt an tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> reduziert. Dieses moderate Bild entspricht in keiner Weise der Situation *in vivo*. Bei Muskel-Proben der Patientin (P1) konnte dagegen eine bis zu 1000 fache Akkumulation von RNA19 gemessen werden (Bindoff et al., 1993). Dieser große Unterschied in einer der zentralen Charakteristika der A3302G-Mutation lässt sich wiederum durch die starken glykolytischen Eigenschaften der Zelllinie erläutern. Es ist anzunehmen, dass im Zuge einer reduzierten oxidativen Phosphorylierung auch eine Verminderung der mitochondrialen Proteinsynthese und damit aller anderen Vorgänge vorliegt. Aus diesem Grund würde sich der Prozessierungsdefekt quantitativ nicht so stark in RD-Zybriden auswirken.

Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse an Osteosarkomzybriden gedeckt. 143B/3302-Zybride weisen im Northern Blot verglichen zu 143B-Zellen eine ähnliche Ansammlung an RNA19 auf.

Humaner Skelettmuskel hingegen ist eines der Mitochondrien-reichsten und respiratorisch aktivsten Gewebe. Dass die gleiche Mutation in diesem Gewebe eine ungleich stärkere RNA19-Akkumulation bewirkt als in den Zelllinien, ist daher durchaus möglich.

Bei RD3302-Zellen geht die Akkumulation der RNA19 zudem mit einer Reduktion sowohl des ND1-Gehaltes als auch des 16S-rRNA-Gehaltes als logische Konsequenz einer verminderten Prozessierung der Vorstufe einher, die in 143B/3302-Zellen so nicht auftritt. Eventuell könnte diese Zelllinie mit einer Erhöhung der Halbwertszeit der Transkripte durch deren Stabilisierung gegenregulieren. Eine Stabilisierung der mRNA im Zuge einer Störung der mitochondrialen Proteinsynthese wurde bereits beschrieben (England et al., 1978; Lansman and Clayton, 1975).

### 8.7.5 Aminoacylierung der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>

Der Grad der Aminoacylierung in A3302G mutierten Zellen ist, genauso wie das Migrationsverhalten bei der Elektrophorese, ein Anzeichen für strukturelle Veränderungen, die die Mutation bei der tRNA bewirkt. Diese direkte Auswirkung einer Mutation auf das betroffene Molekül sollte daher nicht so stark von den metabolischen Charakteristika der verschiedenen Zelllinien beeinflusst werden. Dies ist bei den beiden Zybridlinien auch der Fall. Sowohl 143B- als auch RD-Zellen zeigen, dass im Wildtyp die tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> zu 85% aminoacyliert vorliegt. Der Grad der Aminoacylierung unter dem Einfluss der A3302G-Mutation ist auf maximal 50 %, sowohl in RD3302 als auch in 143B/3302 reduziert.

Weitergehende Untersuchung des Laufunterschieds in 143B/3302-Zybriden durch eine Kombination verschiedener elektrophoretischer Techniken zeigen, dass die Mutation sich auf die Sekundär- und/oder Tertiär-Struktur des tRNA-Moleküls auswirkt. Wie bereits zuvor in *in vitro*-Experimenten an verschiedenen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>-Mutationen beschrieben, zeigen sich keinerlei Veränderungen in der Wahl der Prozessierungsorte, wohl aber bei der Prozessierungseffizienz (Rossmanith und Karwan, 1998). Eine Veränderung der Ladung durch den Basenaustausch konnte ebenfalls durch den Vergleich der Laufeigenschaften der nativen tRNAs mit *in vitro* generierten Transkripten ausgeschlossen werden (Maniura-Weber et al., 2006).

Die mutationsbedingten Strukturänderungen können nicht nur ursächlich für den verminderten Aminoacylierungsgrads verantwortlich sein, sondern auch einen zusätzlichen Effekt darstellen, der neben dem noch verminderten Gehalt an tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, zu der Pathogenität der Mutation beiträgt.

### 8.7.6 Protein steady state-Gehalt

Die Untersuchung des steady state-Gehalts mitochondrialer Atmungskettenuntereinheiten ergab gute Übereinstimmungen mit den Daten der spektrophotometrischen Messungen. Dabei sind vor allem Komplex I und Komplex IV in ihrer Aktivität beeinträchtigt, was sich auch in der Reduktion der entsprechenden Untereinheiten zeigt. Komplex III ist weder im Western Blot noch in der Spektrophotometrischen Analyse beeinträchtigt.

Eine Auffälligkeit ergibt sich im Vergleich des Gehalts der mitochondrial synthetisierten Untereinheit I des Komplex IV. Diese ist in RD3320-Zellen nur leicht reduziert, fehlt jedoch fast vollständig in 143B/3302-Zellen. Dies erklärt womöglich, warum die mutierten Osteosarkomzybride eine um 94% verminderte COX-Aktivität aufweisen, RD3302-Zellen hingegen eine moderate Reduktion von 59 %. Umgekehrt zeigen RD3302-Zellen im Vergleich zu 143B/3302-Zellen deutlich niedrigere Mengen der Untereinheit COXIV. Diese Differenzen sind wahrscheinlich wiederum durch den unterschiedlichen Zellhintergrund in RD-Zellen zu erklären, da es sich bei der Untereinheit IV um ein kerncodiertes und im Zytoplasma synthetisiertes Protein handelt.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutation auf einzelne Untereinheiten ist auch ein Hinweis auf den dualen Effekt der tRNA Mutation. Zum einen stört eine defekte tRNA den gesamten Translationsapparat systemisch, zum anderen wirkt sich die Mutation wahrscheinlich stärker auf Proteinkomplexe aus, die über einen höheren Turnover verfügen und daher ständiger Neusynthese bedürfen. Ebenso kann der Leucin-Gehalt bei dem Grad der Betroffenheit eine Rolle spielen. Es zeigt sich, dass die beiden Untereinheiten mit dem höchsten relativen Leucingehalt Untereinheiten des Komplex I sind (ND6: 55 %; ND3: 28%).

Dazu weisen die Komplexe I und IV mit 15% bzw. 23% den höchsten Anteil mitochondrial codierter Untereinheiten auf und sind von einer Störung des mitochondrialen Proteinsynthesapparates generell besonders betroffen. Auch bei anderen mitochondrialen tRNA-Mutationen zeigt sich, dass Komplex I und Komplex IV im Fokus der Erkrankung stehen.

Natürlich ist der drastische Effekt auf Komplex I, der vor allem in nahezu allen Patienten diagnostiziert wurde, auch auf den reduzierten Gehalt an ND1-mRNA durch die gestörte RNA19-Prozessierung zurückzuführen.

## 8.8 Möglicher Mechanismus der A3302G-Mutation

Der Pathomechanismus, der dieser Mutation zu Grunde liegt, ist mit Sicherheit sehr viel vielschichtiger als initial vermutet und eine Summe der verschiedenen Einflüsse, die der Defekt der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> bewirkt.

Eine direkte Auswirkung der A3302G-Mutation auf die Prozessierung der tRNA wird bei *in vitro*-Analysen deutlich. Eine Auflistung wichtiger Daten dieser Experimente ist in Abb. 37 dargestellt.

tRNA-Mutation	tRNA Bildung	RNase P-Prozessierung	RNase Z-Prozessierung	CCA-Addition
WT	100 %	100 %	100 %	100 %
A3302G	65 %	74 %	30 %	102 %
C3303T	66 %	71 %	32 %	18 %
A3243G	19 %	19 %	45 %	102 %

Abb. 37 Zusammenfassung der aus der *in vitro*-Analyse der mitochondrialen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gewonnenen Daten (aus: Rossmannith and Karwan, 1998a; Levinger et al., 2004b).

Trotz ihrer Nähe zu der CCA-Additionsstelle scheint die Mutation keinerlei störenden Einfluss auf diese Reaktion zu haben (Abb. 37, Tabelle, letzte Spalte). Wahrscheinlich ist der Akzeptorstamm durch die zahlreichen Watson-Crick-Basenpaarungen in seiner Sekundärstruktur relativ stabil, so dass die Erkennung des CCA-addierenden Enzyms nicht beeinträchtigt ist.

Jedoch existieren mutationsbedingte strukturelle Veränderungen dieser tRNA, die in dem unterschiedlichen Migrationsverhalten in der Elektrophorese zum Vorschein kamen (siehe Abb. 29) Diese können in der Tat einen tiefgreifenden Effekt auf Enzyme des Reifungsprozesses haben, deren Funktion sehr stark auf der Erkennung der dreiminimalen Gestalt der tRNA basiert. So ist die Aminoacylierungseffizienz im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

Es zeigt sich, dass die A3302G-Mutation die 5'-Prozessierungseffizienz durch die RNase P nur um 26 % vermindert, im Gegensatz zu den drastischen Auswirkungen, die die MELAS-Mutation A3243G hat (s. Abb. 37, letzte Zeile). Einen deutlich gravierenderen Einfluss zeigt die Mutation jedoch am 3'-Ende, wo sie ja auch lokalisiert ist. Die Effizienz der RNase Z-Prozessierung ist stark beeinträchtigt und um 70 % reduziert. Letztendlich erweist sich die *in vitro*-Bildung der tRNA aus der Transkriptionsvorstufe nur moderat um 35 % vermindert und steht somit in Diskrepanz zu dem drastischen Prozessierungsdefekt der *in vivo*-Daten im Patienten (Watmough et al., 1990).

Obwohl der Großteil der beschriebenen Defekte relativ moderat ausfallen, können sie doch einen kumulativen Effekt auf die Zelle und den Organismus haben. Die Beeinträchtigung verschiedener Schritte der tRNA-Reifung und der Aminoacylierungseffizienz können den Gehalt an funktionaler tRNA, der der mitochondrialen Proteinsynthese zur Verfügung steht, dramatisch reduzieren.

Die Abfolge der Prozessierungsereignisse ist bereits eingehend untersucht worden und zahlreiche *in vitro*-Experimente haben gezeigt, dass die Prozessierung am 3'-Ende durch die RNase Z erst in Folge eines prozessierten 5'-Ende ablaufen kann, da es möglicherweise zu sterischen Hinderungen durch die 5'-Leadersequenz der tRNA kommen kann (Kunzmann et al., 1998). Dies steht klar im Gegensatz zu den von Bindoff postulierten gewebsspezifischen Unterschieden der Prozessierungsabfolge, bei der im Muskel zuerst RNase P am 5'-Ende aktiv wird, wohingegen in Fibroblasten der erste Schritt durch die RNase Z erfolgen soll.

Der gewebsspezifische Effekt der Mutation im Patienten ist zum einen sicherlich auf den hohen nahezu homoplasmatischen Mutationsgehalt in Muskel zu beziehen. Da der Schwellenwert mitochondrialer tRNA-Mutationen sehr hoch liegt, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass trotz des ebenfalls sehr hohen Heteroplasmiegrades in Fibroblasten dort die Schwelle zum Auftreten pathologischer Symptome noch nicht überschritten wurde. Da es sich bei Fibroblasten um hochproliferierende Zellen handelt, die einem permanenten Austausch unterliegen, können defekte Zellen relativ zügig ersetzt werden und so verhindern, dass sich, wie in ausdifferenzierten Geweben, die pathologischen Effekte der Mutation akumulieren. Die überwiegend postmitotischen Zellen des Skelettmuskelgewebes haben ihre Teilung im Zuge der terminalen Differenzierung zu vielkernigen Myotuben eingestellt. So ist es durchaus möglich, dass die mutationsbedingten Defekte in Muskelzellen akumulieren und so viel schwerer zum Tragen kommen.

Die ähnlichen *in vitro*-Eigenschaften bei der 5'- und 3' Prozessierung von tRNA<sup>Leu(UU)</sup> mit der C3303T-Mutation spiegeln sich auch in dem Pathophänotyp der Patienten wieder, die ebenfalls eine Myopathie des Skelettmuskels zeigen (Bruno et al., 1999). Zusätzlich dazu zeigt sich jedoch noch eine Kardiomyopathie, die eventuell eine gewebsspezifische Auswirkungen der drastischen Störung bei der CAA-Addition in C3303T-mutierten *in vitro*-Transkripten ist.

Der Phänotyp der A3243G-Mutation zeigt neben der Myopathie noch Auswirkungen auf das Nervensystem, z.B. mit Schlaganfall-ähnlichen Symptomen. Die drastische Reduktion aller Vorgänge bei der tRNA-Prozessierung (Abb. 37) könnte bei dieser Mutation die Vielzahl an pathologischen Effekten erklären. Nur die CCA-Addition ist wie bei der A3302G-mutation unverändert. Typischerweise zeigt sich auch bei dem MELAS-Syndrom kein Herzphänotyp.

Möglicherweise könnte es eine muskelspezifische Isoform der RNase Z geben, die durch die nahe am 3'-Ende lokalisierte Mutation besonders stark beeinflusst wird, z.B. durch eine niedrigere Affinität oder Effizienz des Enzyms, was eine Verringerung der Reaktionseffizienz und damit einen schwerwiegenden Phänotyp zur Folge hat.

Letztendlich bleibt der Pathomechanismus der A3302G-Mutation hypothetisch und multifaktoriell. Es stellte sich heraus, dass das verwendete Zellkulturmodell nicht geeignet war, der Komplexität der mitochondrialen Störung im vollem Umfang gerecht zu werden. Eventuell scheint gerade der Unterschied zwischen einer aggressiv proliferierenden Muskeltumorzelle in Zellkultur und postmitotisch ausdifferenzierten Skelettmuskelgewebe *in vivo* eine Schlüsselrolle bei dem letalen Effekt der A3302G-Mutation zu spielen.

## Literaturverzeichnis

Anderson,S., Bankier,A.T., Barrell,B.G., de Bruijn,M.H., Coulson,A.R., Drouin,J., Eperon,I.C., Nierlich,D.P., Roe,B.A., Sanger,F., Schreier,P.H., Smith,A.J., Staden,R., and Young,I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.

Arbustini,E., Diegoli,M., Fasani,R., Grasso,M., Morbini,P., Banchieri,N., Bellini,O., Dal Bello,B., Pilotto,A., Magrini,G., Campana,C., Fortina,P., Gavazzi,A., Narula,J., and Vigano,M. (1998). Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* 153, 1501-1510.

Barrell,B.G., Anderson,S., Bankier,A.T., de Bruijn,M.H., Chen,E., Coulson,A.R., Drouin,J., Eperon,I.C., Nierlich,D.P., Roe,B.A., Sanger,F., Schreier,P.H., Smith,A.J., Staden,R., and Young,I.G. (1980). Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3164-3166.

Barrell,B.G., Bankier,A.T., and Drouin,J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282, 189-194.

Barrientos,A., Barros,M.H., Valnot,I., Rotig,A., Rustin,P., and Tzagoloff,A. (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286, 53-63.

Bennett,J.L., Blanchet,M.R., Zhao,L., Zbytnuik,L., Antignano,F., Gold,M., Kubes,P., and McNagny,K.M. (2009). Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *J. Immunol.* 182, 5507-5514.

Bereiter-Hahn,J. and Voth,M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198-219.

Bianchi,K., Rimessi,A., Prandini,A., Szabadkai,G., and Rizzuto,R. (2004). Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 119-131.

Bindoff,L.A., Howell,N., Poulton,J., McCullough,D.A., Morten,K.J., Lightowlers,R.N., Turnbull,D.M., and Weber,K. (1993). Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. A potential disease mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 19559-19564.

Bjork,G.R. (1995). Genetic dissection of synthesis and function of modified nucleosides in bacterial transfer RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50, 263-338.

Bodyak,N.D., Nekhaeva,E., Wei,J.Y., and Khrapko,K. (2001). Quantification and sequencing of somatic deleted mtDNA in single cells: evidence for partially duplicated mtDNA in aged human tissues. *Hum. Mol. Genet.* 10, 17-24.

- Bogenghagen,D. and Clayton,D.A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11, 719-727.
- Bogenghagen,D.F., Rousseau,D., and Burke,S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* 283, 3665-3675.
- Bouche,M., Senni,M.I., Grossi,A.M., Zappelli,F., Polimeni,M., Arnold,H.H., Cossu,G., and Molinaro,M. (1993). TPA-induced differentiation of human rhabdomyosarcoma cells: expression of the myogenic regulatory factors. *Exp. Cell Res.* 208, 209-217.
- Bruno,C., Kirby,D.M., Koga,Y., Garavaglia,B., Duran,G., Santorelli,F.M., Shield,L.K., Xia,W., Shanske,S., Goldstein,J.D., Iwanaga,R., Akita,Y., Carrara,F., Davis,A., Zeviani,M., Thorburn,D.R., and DiMauro,S. (1999). The mitochondrial DNA C3303T mutation can cause cardiomyopathy and/or skeletal myopathy. *J. Pediatr.* 135, 197-202.
- Capaldi,R.A., Aggeler,R., Gilkerson,R., Hanson,G., Knowles,M., Marcus,A., Margineantu,D., Marusich,M., Murray,J., Oglesbee,D., Remington,S.J., and Rossignol,R. (2002). A replicating module as the unit of mitochondrial structure and functioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 192-195.
- Chan,D.C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79-99.
- Chang,D.D. and Clayton,D.A. (1987). A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* 235, 1178-1184.
- Chen,Q.P. and Li,Q.T. (2001). Effect of cardiolipin on proton permeability of phospholipid liposomes: the role of hydration at the lipid-water interface. *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 201-206.
- Chen,X.J. and Butow,R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815-825.
- Chen,X.J., Wang,X., Kaufman,B.A., and Butow,R.A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714-717.
- Chinnery,P.F., Johnson,M.A., Taylor,R.W., Lightowlers,R.N., and Turnbull,D.M. (1997). A novel mitochondrial tRNA phenylalanine mutation presenting with acute rhabdomyolysis. *Ann. Neurol.* 41, 408-410.
- Chinnery,P.F., Johnson,M.A., Wardell,T.M., Singh-Kler,R., Hayes,C., Brown,D.T., Taylor,R.W., Bindoff,L.A., and Turnbull,D.M. (2000). The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.* 48, 188-193.
- Christianson,T.W. and Clayton,D.A. (1988). A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation in vitro. *Mol. Cell Biol.* 8, 4502-4509.
- Ciafaloni,E., Santorelli,F.M., Shanske,S., Deonna,T., Roulet,E., Janzer,C., Pescia,G., and DiMauro,S. (1993). Maternally inherited Leigh syndrome. *J. Pediatr.* 122, 419-422.

- Clayton,D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693-705.
- Cornelison,D.D. (2008). Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity. *J. Cell Biochem.* 105, 663-669.
- Croteau,D.L., Stierum,R.H., and Bohr,V.A. (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat. Res.* 434, 137-148.
- Dairaghi,D.J., Shadel,G.S., and Clayton,D.A. (1995). Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 127-134.
- De Abreu,R.A., Van Baal,J.M., De Bruyn,C.H., Bakkeren,J.A., and Schretlen,E.D. (1982). High-performance liquid chromatographic determination of purine and pyrimidine bases, ribonucleosides, deoxyribonucleosides and cyclic ribonucleotides in biological fluids. *J. Chromatogr.* 229, 67-75.
- de Vries,D., de,W., I, Ruitenbeek,W., Begeer,J., Smit,P., Bentlage,H., and van Oost,B. (1994). Extreme variability of clinical symptoms among sibs in a MELAS family correlated with heteroplasmy for the mitochondrial A3243G mutation. *J. Neurol. Sci.* 124, 77-82.
- Dey,R., Tengan,C.H., Morita,M.P., Kiyomoto,B.H., and Moraes,C.T. (2000). A novel myopathy-associated mitochondrial DNA mutation altering the conserved size of the tRNA(Gln) anticodon loop. *Neuromuscul. Disord.* 10, 488-492.
- DiMauro,S. (2006). Mitochondrial myopathies. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18, 636-641.
- Droge,W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47-95.
- Dubrovsky,E.B., Dubrovskaya,V.A., Levinger,L., Schiffer,S., and Marchfelder,A. (2004). *Drosophila* RNase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo. *Nucleic Acids Res.* 32, 255-262.
- ENGEL,W.K. (1963). ADENOSINE TRIPHOSPHATASE OF SARCOPLASMIC RETICULUM TRIADS AND SARCOLEMMA IDENTIFIED HISTOCHEMICALLY. *Nature* 200, 588-589.
- England,J.M., Costantino,P., and Attardi,G. (1978). Mitochondrial RNA and protein synthesis in enucleated African green monkey cells. *J. Mol. Biol.* 119, 455-462.
- ERNSTER,L., IKKOS,D., and LUFT,R. (1959). Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 184, 1851-1854.
- Falkenberg,M., Gaspari,M., Rantanen,A., Trifunovic,A., Larsson,N.G., and Gustafsson,C.M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* 31, 289-294.
- Fernandez-Silva,P., Enriquez,J.A., and Montoya,J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol* 88, 41-56.

- Fish,J., Raule,N., and Attardi,G. (2004). Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science* 306, 2098-2101.
- Florentz,C., Sohm,B., Tryoen-Toth,P., Putz,J., and Sissler,M. (2003). Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1356-1375.
- Fridovich,I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.
- Fukui,H. and Moraes,C.T. (2008). The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci.* 31, 251-256.
- Gelfand,R. and Attardi,G. (1981). Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells: the mature ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable. *Mol. Cell Biol.* 1, 497-511.
- Gilkerson,R.W., Schon,E.A., Hernandez,E., and Davidson,M.M. (2008). Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. *J. Cell Biol.* 181, 1117-1128.
- Gray,M.W., Burger,G., and Lang,B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Green,D.R. and Kroemer,G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.
- Gruber,J., Schaffer,S., and Halliwell,B. (2008). The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand? *Front Biosci.* 13, 6554-6579.
- Gupta,R.C., Milatovic,D., and Dettbarn,W.D. (2001). Nitric oxide modulates high-energy phosphates in brain regions of rats intoxicated with diisopropylphosphorofluoridate or carbofuran: prevention by N-tert-butyl-alpha-phenylnitronone or vitamin E. *Arch. Toxicol.* 75, 346-356.
- Gyllensten,U., Wharton,D., Josefsson,A., and Wilson,A.C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255-257.
- Hadjigeorgiou,G.M., Kim,S.H., Fischbeck,K.H., Andreu,A.L., Berry,G.T., Bingham,P., Shanske,S., Bonilla,E., and DiMauro,S. (1999). A new mitochondrial DNA mutation (A3288G) in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with familial myopathy. *J. Neurol. Sci.* 164, 153-157.
- Helm,M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res.* 34, 721-733.
- Hermann,G.J. and Shaw,J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 265-303.

- Herzberg,N.H., Zwart,R., Wolterman,R.A., Ruiter,J.P., Wanders,R.J., Bolhuis,P.A., and van den,B.C. (1993). Differentiation and proliferation of respiration-deficient human myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 63-67.
- Hirano,M., Ricci,E., Koenigsberger,M.R., Defendini,R., Pavlakis,S.G., DeVivo,D.C., DiMauro,S., and Rowland,L.P. (1992). Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul. Disord.* 2, 125-135.
- Holt,I.J., Lorimer,H.E., and Jacobs,H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515-524.
- Horai,S., Kondo,R., Murayama,K., Hayashi,S., Koike,H., and Nakai,N. (1991). Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 333, 409-416.
- Horvath,R., Lochmuller,H., Scharfe,C., Do,B.H., Oefner,P.J., Muller-Hocker,J., Schooser,B.G., Pongratz,D., Auer,D.P., and Jaksch,M. (2003). A tRNA(Ala) mutation causing mitochondrial myopathy clinically resembling myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* 40, 752-757.
- Hutchison,W.M., Thyagarajan,D., Poulton,J., Marchington,D.R., Kirby,D.M., Manji,S.S., and Dahl,H.H. (2005). Clinical and molecular features of encephalomyopathy due to the A3302G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Arch. Neurol.* 62, 1920-1923.
- Hyvarinen,A.K., Pohjoismaki,J.L., Reyes,A., Wanrooij,S., Yasukawa,T., Karhunen,P.J., Spelbrink,J.N., Holt,I.J., and Jacobs,H.T. (2007). The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 35, 6458-6474.
- Ibba,M. and Soll,D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617-650.
- Iborra,F.J., Kimura,H., and Cook,P.R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC. Biol.* 2, 9.
- Imai,K. and Honjo,M. (1965). Synthesis of 5-substituted pyrimidine nucleosides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 13, 7-16.
- Jacobs,H.T. and Holt,I.J. (2000). The np 3243 MELAS mutation: damned if you aminoacylate, damned if you don't. *Hum. Mol. Genet.* 9, 463-465.
- Janssen,R.J., Nijtmans,L.G., van den Heuvel,L.P., and Smeitink,J.A. (2006). Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J. Inherit. Metab Dis.* 29, 499-515.
- Jenuth,J.P., Peterson,A.C., Fu,K., and Shoubridge,E.A. (1996). Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 14, 146-151.
- Kaneda,H., Hayashi,J., Takahama,S., Taya,C., Lindahl,K.F., and Yonekawa,H. (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4542-4546.

- Karppa,M., Herva,R., Moslemi,A.R., Oldfors,A., Kakko,S., and Majamaa,K. (2005). Spectrum of myopathic findings in 50 patients with the 3243A>G mutation in mitochondrial DNA. *Brain* 128, 1861-1869.
- Kearns,T.P. (1965). External Ophthalmoplegia, Pigmentary Degeneration of the Retina, and Cardiomyopathy: A Newly Recognized Syndrome. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 63, 559-625.
- Khrapko,K., Bodyak,N., Thilly,W.G., van Orsouw,N.J., Zhang,X., Collier,H.A., Perls,T.T., Upton,M., Vijg,J., and Wei,J.Y. (1999). Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res.* 27, 2434-2441.
- King,M.P. and Attardi,G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500-503.
- King,M.P., Koga,Y., Davidson,M., and Schon,E.A. (1992). Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Mol. Cell Biol.* 12, 480-490.
- Kirino,Y., Goto,Y., Campos,Y., Arenas,J., and Suzuki,T. (2005). Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 7127-7132.
- Kleist-Retzow,J.C., Hornig-Do,H.T., Schauen,M., Eckertz,S., Dinh,T.A., Stassen,F., Lottmann,N., Bust,M., Galunska,B., Wielckens,K., Hein,W., Beuth,J., Braun,J.M., Fischer,J.H., Ganitkevich,V.Y., Maniura-Weber,K., and Wiesner,R.J. (2007). Impaired mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels. *Exp. Cell Res.* 313, 3076-3089.
- Koga,A., Koga,Y., Akita,Y., Fukiyama,R., Ueki,I., Yatsuga,S., and Matsuishi,T. (2003). Increased mitochondrial processing intermediates associated with three tRNA(Leu(UUR)) gene mutations. *Neuromuscul. Disord.* 13, 259-262.
- Kudin,A.P., Bimpong-Buta,N.Y., Vielhaber,S., Elger,C.E., and Kunz,W.S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 4127-4135.
- Kunzmann,A., Brennicke,A., and Marchfelder,A. (1998). 5' end maturation and RNA editing have to precede tRNA 3' processing in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 108-113.
- Kussmaul,L. and Hirst,J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 7607-7612.
- Lansman,R.A. and Clayton,D.A. (1975). Mitochondrial protein synthesis in mouse L-cells: effect of selective nicking of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 99, 777-793.

- Larsson,N.G., Wang,J., Wilhelmsson,H., Oldfors,A., Rustin,P., Lewandoski,M., Barsh,G.S., and Clayton,D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* 18, 231-236.
- Lee,D.Y. and Clayton,D.A. (1998). Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J. Biol. Chem.* 273, 30614-30621.
- Leonard,J.V. and Schapira,A.H. (2000). Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 355, 299-304.
- Levinger,L., Morl,M., and Florentz,C. (2004a). Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Res.* 32, 5430-5441.
- Levinger,L., Oestreich,I., Florentz,C., and Morl,M. (2004b). A pathogenesis-associated mutation in human mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) leads to reduced 3'-end processing and CCA addition. *J. Mol. Biol.* 337, 535-544.
- Lill,R. and Kispal,G. (2000). Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 352-356.
- Loffler,M., Jockel,J., Schuster,G., and Becker,C. (1997). Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol. Cell Biochem.* 174, 125-129.
- Loh,W.E., Jr., Scrabble,H.J., Livanos,E., Arboleda,M.J., Cavenee,W.K., Oshimura,M., and Weissman,B.E. (1992). Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 1755-1759.
- Lopez,M.F., Kristal,B.S., Chernokalskaya,E., Lazarev,A., Shestopalov,A.I., Bogdanova,A., and Robinson,M. (2000). High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation. *Electrophoresis* 21, 3427-3440.
- LUFT,R., IKKOS,D., PALMIERI,G., ERNSTER,L., and 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.
- Mackey,D.A., Oostra,R.J., Rosenberg,T., Nikoskelainen,E., Bronte-Stewart,J., Poulton,J., Harding,A.E., Govan,G., Bolhuis,P.A., and Norby,S. (1996). Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 481-485.
- Manam,S. and Van Tuyle,G.C. (1987). Separation and characterization of 5'- and 3'-tRNA processing nucleases from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 262, 10272-10279.
- Maniura-Weber,K., Helm,M., Engemann,K., Eckertz,S., Mollers,M., Schauen,M., Hayrapetyan,A., Kleist-Retzow,J.C., Lightowlers,R.N., Bindoff,L.A., and Wiesner,R.J. (2006). Molecular dysfunction associated with the human mitochondrial 3302A>G mutation in the MTTL1 (mt-tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)) gene. *Nucleic Acids Res.* 34, 6404-6415.

Margulis L. Symbiosis in Cell Evolution. Freeman and Company, San Francisco . 1-1-1981.

Ref Type: Generic

Mattenberger,Y., James,D.I., and Martinou,J.C. (2003). Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 538, 53-59.

McFarland,R., Schaefer,A.M., Gardner,J.L., Lynn,S., Hayes,C.M., Barron,M.J., Walker,M., Chinnery,P.F., Taylor,R.W., and Turnbull,D.M. (2004). Familial myopathy: new insights into the T14709C mitochondrial tRNA mutation. *Ann. Neurol.* 55, 478-484.

MITCHELL,P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Montoya,J., Gaines,G.L., and Attardi,G. (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151-159.

Moraes,C.T., Ciacci,F., Bonilla,E., Ionasescu,V., Schon,E.A., and DiMauro,S. (1993a). A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat. Genet.* 4, 284-288.

Moraes,C.T., Ciacci,F., Bonilla,E., Ionasescu,V., Schon,E.A., and DiMauro,S. (1993b). A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat. Genet.* 4, 284-288.

Moraes,C.T., DiMauro,S., Zeviani,M., Lombes,A., Shanske,S., Miranda,A.F., Nakase,H., Bonilla,E., Werneck,L.C., Servidei,S., and . (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* 320, 1293-1299.

Murphy,M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13.

Nagaike,T., Suzuki,T., Tomari,Y., Takemoto-Hori,C., Negayama,F., Watanabe,K., and Ueda,T. (2001). Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *J. Biol. Chem.* 276, 40041-40049.

Nakanishi,K. and Nureki,O. (2005). Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. *Mol. Cells* 19, 157-166.

Nashimoto,M., Tamura,M., and Kaspar,R.L. (1999). Minimum requirements for substrates of mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease. *Biochemistry* 38, 12089-12096.

Nass,M.M. (1968). Mitochondrial DNA: advances, problems, and goals. *Science* 165, 25-35.

Nishigaki,Y., Bonilla,E., Shanske,S., Gaskin,D.A., DiMauro,S., and Hirano,M. (2002). Exercise-induced muscle "burning," fatigue, and hyper-CKemia: mtDNA T10010C mutation in tRNA(Gly). *Neurology* 58, 1282-1285.

Ojala,D., Montoya,J., and Attardi,G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.

Patel,V.B., Cunningham,C.C., and Hantgan,R.R. (2001). Physiochemical properties of rat liver mitochondrial ribosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 6739-6746.

Pesole,G., Gissi,C., De Chirico,A., and Saccone,C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 48, 427-434.

Petruzzella,V., Moraes,C.T., Sano,M.C., Bonilla,E., DiMauro,S., and Schon,E.A. (1994). Extremely high levels of mutant mtDNAs co-localize with cytochrome c oxidase-negative ragged-red fibers in patients harboring a point mutation at nt 3243. *Hum. Mol. Genet.* 3, 449-454.

Poulton,J., Macaulay,V., and Marchington,D.R. (1998). Mitochondrial genetics '98 is the bottleneck cracked? *Am. J. Hum. Genet.* 62, 752-757.

Prezant,T.R., Agapian,J.V., Bohlman,M.C., Bu,X., Oztas,S., Qiu,W.Q., Arnos,K.S., Cortopassi,G.A., Jaber,L., Rotter,J.I., and . (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.* 4, 289-294.

Rorbach,J., Soleimanpour-Lichaei,R., Lightowers,R.N., and Chrzanowska-Lightowers,Z.M. (2007). How do mammalian mitochondria synthesize proteins? *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1290-1291.

Rossmannith,W., Freilinger,M., Roka,J., Raffelsberger,T., Moser-Thier,K., Prayer,D., Bernert,G., and Bittner,R.E. (2008). Isolated cytochrome c oxidase deficiency as a cause of MELAS. *J. Med. Genet.* 45, 117-121.

Rossmannith,W. and Karwan,R.M. (1998a). Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) associated with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 433, 269-274.

Rossmannith,W. and Karwan,R.M. (1998b). Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) associated with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 433, 269-274.

Rugarli,E.I. and Langer,T. (2006). Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia. *Trends Mol. Med.* 12, 262-269.

Rustin,P., Kleist-Retzow,J.C., Chantrel-Groussard,K., Sidi,D., Munnich,A., and Rotig,A. (1999). Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 354, 477-479.

Sabina,R.L., Morisaki,T., Clarke,P., Eddy,R., Shows,T.B., Morton,C.C., and Holmes,E.W. (1990). Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J. Biol. Chem.* 265, 9423-9433.

- Schwartz,M. and Vissing,J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* *347*, 576-580.
- Schwartz,M. and Vissing,J. (2003). [Paternal inheritance of mitochondrial DNA]. *Ugeskr. Laeger* *165*, 3627-3630.
- Sellevoold,O.F., Jynge,P., and Aarstad,K. (1986). High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue. *J. Mol. Cell Cardiol.* *18*, 517-527.
- Servidei,S. (2004). Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul. Disord.* *14*, 107-116.
- Shendure,J. and Ji,H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1135-1145.
- Shitara,H., Hayashi,J.I., Takahama,S., Kaneda,H., and Yonekawa,H. (1998). Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* *148*, 851-857.
- Shoffner,J.M. (2001). Molecular analysis of oxidative phosphorylation diseases for detection of mitochondrial DNA mutations. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* *Chapter 9*, Unit.
- Shoubridge,E.A. (1994). Mitochondrial DNA diseases: histological and cellular studies. *J. Bioenerg. Biomembr.* *26*, 301-310.
- Sobreira,C., King,M.P., Davidson,M.M., Park,H., Koga,Y., and Miranda,A.F. (1999). Long-term analysis of differentiation in human myoblasts repopulated with mitochondria harboring mtDNA mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *266*, 179-186.
- Sohm,B., Frugier,M., Brule,H., Olszak,K., Przykorska,A., and Florentz,C. (2003). Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J. Mol. Biol.* *328*, 995-1010.
- Sorensen,L., Ekstrand,M., Silva,J.P., Lindqvist,E., Xu,B., Rustin,P., Olson,L., and Larsson,N.G. (2001). Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J. Neurosci.* *21*, 8082-8090.
- Spacciapoli,P., Doviken,L., Mulero,J.J., and Thurlow,D.L. (1989). Recognition of tRNA by the enzyme ATP/CTP:tRNA nucleotidyltransferase. Interference by nucleotides modified with diethyl pyrocarbonate or hydrazine. *J. Biol. Chem.* *264*, 3799-3805.
- Steinberg,S., Leclerc,F., and Cedergren,R. (1997). Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *J. Mol. Biol.* *266*, 269-282.
- Steitz,T.A. and Steitz,J.A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 6498-6502.

- Sternberg,D., Chatzoglou,E., Laforet,P., Fayet,G., Jardel,C., Blondy,P., Fardeau,M., Amselem,S., Eymard,B., and Lombes,A. (2001). Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain* 124, 984-994.
- Sun,F., Huo,X., Zhai,Y., Wang,A., Xu,J., Su,D., Bartlam,M., and Rao,Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121, 1043-1057.
- Sutovsky,P., Moreno,R.D., Ramalho-Santos,J., Dominko,T., Simerly,C., and Schatten,G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371-372.
- Szabadkai,G. and Rizzuto,R. (2004). Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett.* 567, 111-115.
- Szymanski,M., Deniziak,M.A., and Barciszewski,J. (2001). Aminoacyl-tRNA synthetases database. *Nucleic Acids Res.* 29, 288-290.
- Taanman,J.W. (1997). Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 151-163.
- Takaku,H., Minagawa,A., Takagi,M., and Nashimoto,M. (2003). A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 31, 2272-2278.
- Taylor,R.W., Wardell,T.M., Lightowlers,R.N., and Turnbull,D.M. (2000). Molecular basis for treatment of mitochondrial myopathies. *Neurol. Sci.* 21, S909-S912.
- Tomecki,R., Dmochowska,A., Gewartowski,K., Dziembowski,A., and Stepien,P.P. (2004). Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Res.* 32, 6001-6014.
- Towpik,J. (2005). Regulation of mitochondrial translation in yeast. *Cell Mol. Biol. Lett.* 10, 571-594.
- Trifunovic,A., Wredenberg,A., Falkenberg,M., Spelbrink,J.N., Rovio,A.T., Bruder,C.E., Bohlooly,Y., Gidlof,S., Oldfors,A., Wibom,R., Tornell,J., Jacobs,H.T., and Larsson,N.G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Twig,G., Elorza,A., Molina,A.J., Mohamed,H., Wikstrom,J.D., Walzer,G., Stiles,L., Haigh,S.E., Katz,S., Las,G., Alroy,J., Wu,M., Py,B.F., Yuan,J., Deeney,J.T., Corkey,B.E., and Shirihai,O.S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433-446.
- van den Bosch,B.J., de Coo,I.F., Hendrickx,A.T., Busch,H.F., de Jong,G., Scholte,H.R., and Smeets,H.J. (2004). Increased risk for cardiorespiratory failure associated with the A3302G mutation in the mitochondrial DNA encoded tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene. *Neuromuscul. Disord.* 14, 683-688.

- van den Ouweland, J.M., Maechler, P., Wollheim, C.B., Attardi, G., and Maassen, J.A. (1999). Functional and morphological abnormalities of mitochondria harbouring the tRNA(Leu)(UUR) mutation in mitochondrial DNA derived from patients with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) and progressive kidney disease. *Diabetologia* 42, 485-492.
- Veltri, K.L., Espiritu, M., and Singh, G. (1990). Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J. Cell Physiol* 143, 160-164.
- Vergani, L., Malena, A., Sabatelli, P., Loro, E., Cavallini, L., Magalhaes, P., Valente, L., Bragantini, F., Carrara, F., Leger, B., Poulton, J., Russell, A.P., and Holt, I.J. (2007). Cultured muscle cells display defects of mitochondrial myopathy ameliorated by anti-oxidants. *Brain* 130, 2715-2724.
- Vergani, L., Prescott, A.R., and Holt, I.J. (2000). Rhabdomyosarcoma rho(0) cells: isolation and characterization of a mitochondrial DNA depleted cell line with 'muscle-like' properties. *Neuromuscul. Disord.* 10, 454-459.
- Vives-Bauza, C., Gamez, J., Roig, M., Briones, P., Cervera, C., Solano, A., Montoya, J., and Andreu, A.L. (2001). Exercise intolerance resulting from a muscle-restricted mutation in the mitochondrial tRNA(Leu (CUN)) gene. *Ann. Med.* 33, 493-496.
- von Heijne, G. (1986). Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett.* 198, 1-4.
- Votyakova, T.V. and Reynolds, I.J. (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 79, 266-277.
- Wallace, D.C. (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 1175-1212.
- Wallace, D.C., Brown, M.D., Melov, S., Graham, B., and Lott, M. (1998). Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* 7, 187-190.
- Walther, D.M. and Rapaport, D. (2009). Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 42-51.
- Wang, J., Wilhelmsson, H., Graff, C., Li, H., Oldfors, A., Rustin, P., Bruning, J.C., Kahn, C.R., Clayton, D.A., Barsh, G.S., Thoren, P., and Larsson, N.G. (1999). Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat. Genet.* 21, 133-137.
- Wang, Y. and Bogenhagen, D.F. (2006). Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 281, 25791-25802.
- WARBURG, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Watmough, N.J., Bindoff, L.A., Birch-Machin, M.A., Jackson, S., Bartlett, K., Ragan, C.I., Poulton, J., Gardiner, R.M., Sherratt, H.S., and Turnbull, D.M. (1990). Impaired mitochondrial beta-oxidation in a patient with an abnormality of the respiratory chain. *Studies in skeletal muscle mitochondria. J. Clin. Invest* 85, 177-184.

Weber,K., Wilson,J.N., Taylor,L., Brierley,E., Johnson,M.A., Turnbull,D.M., and Bindoff,L.A. (1997). A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 373-380.

Wiesner,R.J., Zsurka,G., and Kunz,W.S. (2006). Mitochondrial DNA damage and the aging process: facts and imaginations. *Free Radic. Res.* 40, 1284-1294.

Wittenhagen,L.M. and Kelley,S.O. (2003). Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 28, 605-611.

Xia,D., Yu,C.A., Kim,H., Xia,J.Z., Kachurin,A.M., Zhang,L., Yu,L., and Deisenhofer,J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277, 60-66.

Yaffe,M.P. (1999). Dynamic mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 1, E149-E150.

Yang,M.Y., Bowmaker,M., Reyes,A., Vergani,L., Angeli,P., Gringeri,E., Jacobs,H.T., and Holt,I.J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* 111, 495-505.

Zeviani,M. and Di Donato,S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* 127, 2153-2172.

## Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Prof. Dr. Wiesner für die Aufgabenstellung, die Realisierung meiner Auslandsaufenthalte und für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Langer danke ich für die Übernahme der externen Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Montoya für den Forschungsaufenthalt in seinem Labor und seine väterliche Betreuung bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Walter Rossmann für den wunderbaren und lehrreichen Forschungsaufenthalt in Wien und seinen unermüdlichen persönlichen Einsatz, mir alle meine Experimente zu ermöglichen. Ich möchte mich bei Christa, Andrea, Andreas und Esther dafür bedanken, dass sie mich so herzlich und hilfsbereit im Labor und darüberhinaus empfangen haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. Fischer für die Durchführung der ATP- und Laktat-Messungen in seinem Institut, Dr. Michael für die Muskelproben und Dr. Vergani für die Überlassung der RD-Zybride.

Und natürlich möchte ich mich vor allem bei meiner Laborfamilie bedanken. Ihr habt mit mir Stress und Launen ertragen, viel gelacht und Spaß gehabt und so den Laboralltag schön gemacht.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt und mir die Promotion überhaupt ermöglicht hat.

Marco, Hugo, Michael: Ich danke euch, dass jeder auf seine spezielle Art mir das Durchhalten leichter gemacht habt.

## **Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf Wiesner in der Zeit von April 2005 bis März 2009 am Institut für Vegetative Physiologie der medizinischen Fakultät der Universität Köln angefertigt.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Rudolf Wiesner betreut worden.

Sabrina Eckertz