Regulation kernlokalisierter mitochondrialer Gene bei der Muskeldifferenzierung

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Steffi Goffart

aus Aachen

Copy-Team, Köln

2002

Berichterstatter: Prof. Dr. Dohmen, Institut für Genetik, Universität Köln
Prof. Dr. Werr, Institut für Entwicklungsbiologie, Universität Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1
1.1 Funktion von Mitochondrien ... 2
1.2 Die Biosynthese der Mitochondrien ... 3
1.2.1 Regulation mitochondrial kodierter Gene ... 5
1.2.2 Regulation kernkodierter mitochondrialer Gene ... 5
1.3 Mitochondrienbiogenese in Muskel ... 9
1.4 Methoden zur Untersuchung von Genregulation ... 11
1.5 Auswahl der untersuchten Gene ... 13
1.5.1 Cytochrom C (*cytC*) ... 13
1.5.2 coxIV ... 13
1.5.3 mtTFA ... 14
1.6 Zielsetzung ... 14
2 Material ... 15
2.1 Geräte und Chemikalien ... 15
2.2 Organismen ... 16
2.3 Material zur Arbeit mit Bakterien ... 16
2.4 Material zur Kultivierung von Zell-Linien ... 16
2.5 Material für molekularbiologische Arbeiten ... 17
2.5.1 Puffer und Lösungen ... 17
2.5.2 Kits ... 18
2.5.3 Enzyme ... 18
2.5.4 Oligonucleotide ... 19
2.5.5 Vektoren ... 21
2.5.6 Nucleinsäuren ... 21
2.5.7 DNA-Sonden ... 22
2.5.8 Radiochemikalien ... 22
2.5.9 Antikörper ... 22
3 Methoden ... 22
3.1 Plasmide und Bakterienarbeiten ... 22
3.2 Zellkultur ... 24
3.3 Klonierung ... 25
3.4 Gelelektrophoresen ... 25

3.5 Polymerase chain reaction (PCR) ... 26
3.5.1 Primerdesign ... 26
3.5.2 PCR ... 26
3.5.3 RT-PCR ... 27
3.5.4 Modifikation von DNA-Sequenzen durch Megaprimer-PCR ... 27
3.6 Nachweis von Nukleinsäuren ... 28
3.6.1 Präparation genomischer DNA ... 28
3.6.2 Präparation von RNA aus Zellen ... 28
3.6.3 Southern Blot ... 29
3.6.4 Northern Blot ... 30
3.7 Arbeiten mit Proteinen ... 30
3.7.1 Präparation von Proteinen aus Zellen ... 30
3.7.2 Immunologische Detektion von spezifischen Proteinen durch Western Blot ... 31
3.7.3 Extraktion von Zellkern-Proteinen aus kultivierten Zellen ... 31
3.7.4 Extraktion von Zellkern-Proteinen aus Muskelgewebe ... 33
3.8 Promotoranalysen ... 34
3.8.1 Reportergen-Assay ... 34
3.8.2 Electromobility shift assay ... 35
3.8.3 Footprint assay ... 36
3.9 Physiologische und biochemische Messungen ... 38
3.9.1 Cytochromoxidase-Assay ... 38
3.9.2 Sauerstoff-Verbrauch ... 38
3.9.3 Quantifizierung von DNA-, RNA- und Proteinmengen ... 39
3.9.4 Messung endogener Metabolite des Energiestoffwechsels ... 40
3.10 Mikroskopische Verfahren ... 40
3.10.1 Elektronenmikroskopie ... 40
3.10.2 Immuncytochemie ... 40
4 Ergebnisse ... 42
4.1 Analyse der Zell-Linie C2F3 ... 42
4.1.1 Differenzierung der Zellen ... 42
4.1.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen ... 43
4.1.3 Metabolitgehalt der Zellen ... 46
4.1.4 Protein- und RNA-Gehalt der Zellen ... 47
4.1.5 Sauerstoff-Verbrauch ... 48

4.1.6 Aktivität der Cytochrom C-Oxidase ... 49
4.1.7 Proteingehalt ... 50
4.1.8 RNA-Gehalt ... 50
4.2 Analyse der Promotor-Regulation ... 53
4.2.1 Promotorkarten ... 53
4.2.2 Vorüberlegungen zur Auswahl des Reportergenassays ... 54
4.2.3 Klonierung der Promotorkonstrukte ... 56
4.2.4 Luciferase-Reportergen-Assay ... 56
4.2.5 Electromobility shift assay ... 62
4.2.6 Footprint ... 65
4.2.7 Sequenzvergleich der Promotoren ... 67
4.2.8 Mutationsstudien des *cytC*-Promotors ... 69
4.3 Vergleich von kultivierten Zellen mit Muskelgewebe ... 72
4.4 Promotoraktivität des *cytC*-Promotors bei Stimulation der AMPK ... 73
5 Diskussion ... 75
5.1 Differenzierungsgrad der Zellen ... 75
5.2 Protein- und RNA-Gehalt der Zellen ... 75
5.3 Metabolitgehalt in Myoblasten und Myotuben ... 78
5.4 Sauerstoff-Verbrauch und Cytochrom-Oxidase-Aktivität ... 80
5.5 Gehalt an mitochondrialen Proteinen und mRNAs ... 81
5.6 Analyse der Promotor-Regulation ... 83
5.6.1 Reportergen-Assay ... 85
5.6.2 Electromobility shift Assays und Footprint-Analysen ... 86
5.6.3 Mutationsanalysen ... 88
5.7 Vergleich des verwendeten Zellmodells mit Gewebe ... 89
Schlußfolgerungen ... 90
6 Ausblick ... 91
7 Zusammenfassung ... 92
8 Literaturverzeichnis ... 93
9 Anhang ... 106
9.1 Promotorkarten ... 106
9.2 Vektorenkarten ... 109
9.3 Footprint Cytochrom C Promotor –210 bis +115 bp ... 116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bild der Atmungskette und der zuführenden Stoffwechselwege 2
Abbildung 2: Modell für die Kontrolle der mitochondrialen Atmungskette 7
Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahmen von Myoblasten und Myotuben 10
Abbildung 4: Schema der Transkriptionsregulation durch Transkriptionsfaktoren 11
Abbildung 5: Prinzip der Megaprimer-Mutation 28
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie von differenzierten Myotuben 42
Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fixierten Myoblasten 44
Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von differenzierten Myotuben 45
Abbildung 9: Konzentration einiger Metabolite während der Differenzierung 46
Abbildung 10: Verhältnis von RNA und Protein zu DNA in Myoblasten und Myotuben 47
Abbildung 11: Sauerstoffverbrauch der Myoblasten und Myotuben 48
Abbildung 12: Relative cox-Aktivität in Myoblasten und Myotuben 49
Abbildung 13: Relative Proteinmengen von Cytochrom C, CoxIV und mtTFA 51
Abbildung 14: Relativer mRNA-Gehalt von *cytC*, *coxIV* und *mtTFA* 52
Abbildung 15: Halbwertszeit der Firefly-Luciferase in Myoblasten 55
Abbildung 16: Aktivität des *cytC*-Promotors im Luciferase-Assay 57
Abbildung 17: Aktivität des cox IV-Promotors im Luciferase-Assay 57
Abbildung 18: Aktivität des mtTFA-Promotors im Luciferase-Assay 58
Abbildung 19: Promotorakivität verschiedener *cytC*-Konstrukte 59
Abbildung 20: Steigerung der Promotoraktivität während der Differenzierung 59
Abbildung 21: Promotorakivität der *coxIV*-Konstrukte in Myoblasten und Myotuben 60
Abbildung 22: Steigerung der Promotoraktivität der *coxIV*-Konstrukte 60
Abbildung 23: Promotorakivität verschiedener *mtTFA*-Konstrukte 61
Abbildung 24: Steigerung der Promotoraktivität der *mtTFA*-Konstrukte 61
Abbildung 25: Electromobility Shift Assay mit der Sequenz *cytC*/-147→-113. 63
Abbildung 26: Electromobility Shift Assay mit der Sequenz *cytC*/-123→-90 63
Abbildung 27: Electromobility Shift Assay mit der Sequenz *cytC*/-95→-68 64
Abbildung 28: Footprint-Muster im Bereich –130 bis –90 des *cytC*-Promotors. 66
Abbildung 29: Sequenz des *cytC*-Promotors im Bereich von –145 bis –68 bp 67
Abbildung 30: EMSA mit modifizierten Kompetitions-Oligonukleotiden. 69
Abbildung 31: Electromibility Shift Assay mit modifizierten Sequenzen 70
Abbildung 32: Promotoraktivität von Modifikationen der *cytC*/-210-Sequenz 71
Abbildung 33: EMSA-Vergleich der kultivierten Muskelzellen mit Gewebeextrakten. 72
Abbildung 34: Promotoraktivität des *cytC*-Promotors mit AICAR 74

Abkürzungen

AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleosid
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
cpm	counts per minute
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
EGTA	Ethylenglycol-bis- (ß-aminoethylether)-N,N,N,N-tetra-acetat
FCS	fetal calf serum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
RLU	relative light units
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur (20-22° C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N;N;N';N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolette Strahlung

1 Einleitung

Mitochondrien sind in fast allen eukaryontischen Zellen zu finden. Sie besitzen eine doppelte Membranhülle, die sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut sichtbar macht. Die innere Membran ist in der Regel zur Oberflächenvergrößerung stark eingefaltet. Dem Erscheinungsbild der inneren Membran nach werden Cristae-Typ (blattförmige Auffaltung) und Tubuli-Typ (röhrenförmige Einstülpungen) unterschieden [1]. Die Gestalt von Mitochondrien variiert extrem; je nach Zelltyp und physiologischem Zustand treten eher einzelne Mitochondrien oder vernetzte Strukturen auf, die sich bewegen, teilen und miteinander verschmelzen können [2, 3, 4].

Auch die mitochondriale Masse einer Zelle ist variabel: In stark oxidativem Gewebe wie Herzmuskel beträgt der Volumenanteil bis zu 35 % [1], in Leber 18 % [6], weiße Muskulatur dagegen besitzt nur 2 % Mitochondrien [7].

Innerhalb einer Zelle ist die Verteilung der Mitochondrien in den verschiedenen subzellulären Domänen unterschiedlich: In Nervenzellen und Spermatocyten z. B. ist die überwiegende Zahl von Mitochondrien am Ort des größten Energiebedarfs, am Axon bzw. an der Geißel, lokalisiert [2]. In Nierenepithelzellen, die den Großteil ihrer Energie durch ATP-abhängigen Ionentransport verbrauchen, sind Mitochondrien in der basolateralen Membran konzentriert.

Gemeinsam mit Chloroplasten sind Mitochondrien die einzigen Organellen, die ein eigenständiges Genom besitzen. Der Endosymbiontenhypothese [8] nach deutet dies auf eine Abstammung von phagozytierten Eubakterien, die nach und nach integraler Bestandteil der eukaryontischen Zellen wurden. Für eine eigenständige Vergangenheit der Mitochondrien sprechen ihr zirkuläres Genom und eine eigene Maschinerie zur Proteinbiosynthese, die große Ähnlichkeit mit der von Bakterien aufweist [9].

Allerdings haben Mitochondrien im Laufe der Evolution ihre Selbständigkeit verloren; ein Großteil der Gene für mitochondriale Proteine wurde in den Zellkern transferiert. Die Zahl und Anordnung der im mitochondrialen Genom (mtDNA) verbliebenen Gene ist je nach systematischer Zugehörigkeit unterschiedlich.

1.1 Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien stellen ein abgetrenntes Kompartiment für den Energiestoffwechsel dar, in dem verschiedene energieliefernde Abbauprozesse zusammenlaufen und in der Oxidation der erzeugten Reduktionsäquivalente enden. Durch den Transport der bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen über in Reihe geschaltete Redox-Komplexe und die Übertragung auf Sauerstoff wird ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran erzeugt, der durch eine Protonen-transportierende ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP genutzt werden kann. Der Großteil der von einer Zelle benötigten ATP-Menge wird so in Mitochondrien erzeugt [10].

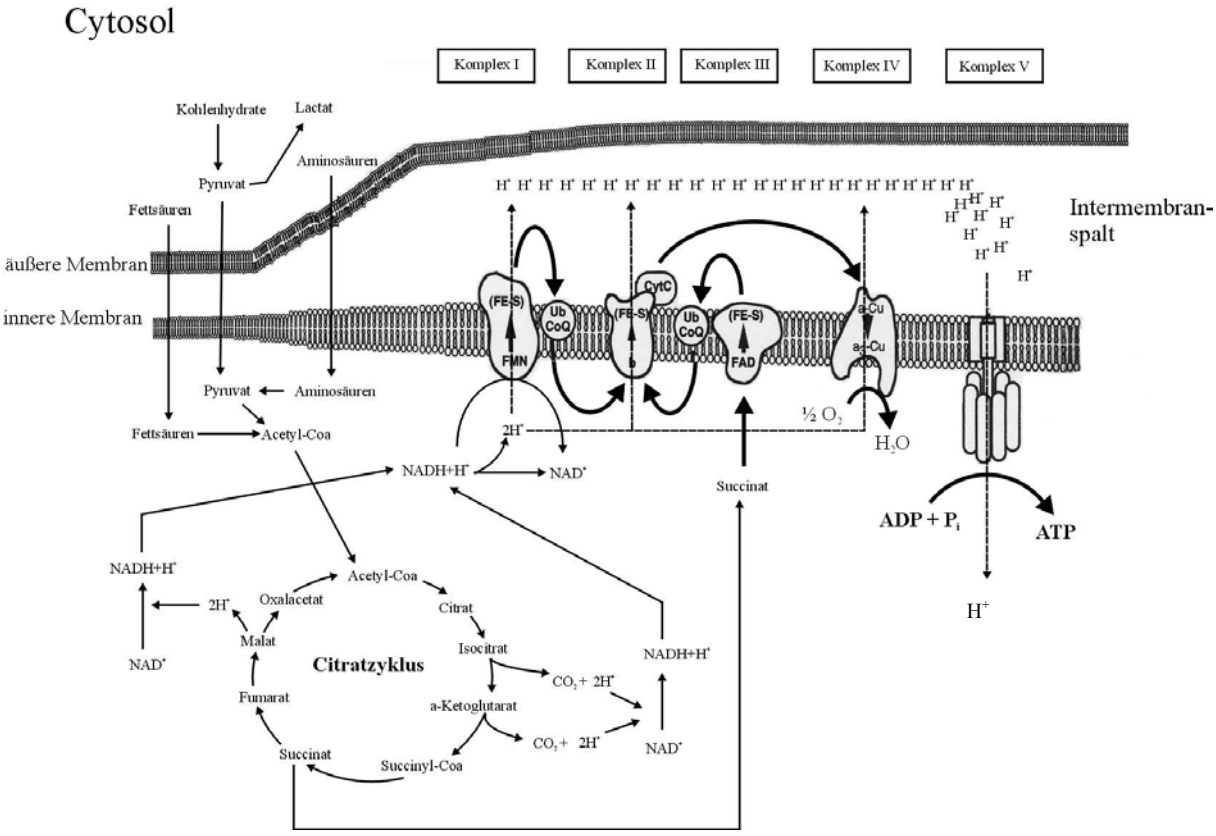


Abbildung 1: Bild der Atmungskette und der zuführenden Stoffwechselwege (nach [13])

Neben dieser Hauptfunktion, der Umsetzung von Metaboliten in ATP, finden im mitochondrialen Kompartiment auch Stoffwechselwege statt, die eng mit der Elektronentransportkette bzw. dem dadurch erzeugten Membranpotential verknüpft sind.

So wird z. B. im braunen Fettgewebe von Kleinsäugern durch einen Protonenkanal (uncoupling protein UCP-1) in der mitochondrialen Membran der Elektronentransport von der ATP-Synthese entkoppelt. Dabei wird Energie als Wärme frei, die der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur dient [11]. Das hohe Reduktionspotential der Atmungskettenkomplexe wird zur Reduktion von Fe^{3+}-Ionen bei der Hämsynthese genutzt [12].

Auch eine Vielzahl weiterer Synthesewege findet in den mitochondrialen Kompartimenten statt [13]. Unter anderem finden einige Schritte der Synthese von Nukleotiden, Pyrimidinen, Phospholipiden, Harnstoff sowie einigen Aminosäuren im mitochondrialen Kompartiment statt. Weitere Funktionen von Mitochondrien liegen in der Regulation der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration [14] und der Beteiligung an der Apoptose [15].

Störungen der mitochondrialen Funktionen wurden in den letzten Jahren immer häufiger als Ursache schwerer, degenerativer Erkrankungen von Nerven, Muskeln und anderen stark energiekonsumierenden Geweben ausgemacht. Der überwiegende Teil dieser Erkrankungen wird durch Mutationen im mitochondrialen Genom verursacht [16]. Bei einigen deutet jedoch die Vererbung nach Mendelschen Regeln auf Mutationen im Kerngenom als Auslöser für Veränderungen der mitochondrialen DNA hin [17]. Auch der Prozeß des Alterns sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Chorea-Huntington und Parkinson treten zusammen mit mitochondrialen Veränderungen auf. Hier ist jedoch der kausale Zusammenhang noch nicht aufgeklärt [18, 19, 20].

1.2 Die Biosynthese der Mitochondrien

Mitochondrien unterliegen, wie andere Zellbestandteile auch, einem ständigen “turnover”. Einerseits werden einzelne Proteine innerhalb eines Mitochondriums abgebaut, andererseits werden auch ganze Mitochondrien von Lysosomen phagozytiert [21]. Die Synthese von Mitochondrien geschieht ausschließlich durch Teilung und Abschnürung aus bereits existierenden Mitochondrien.

In allen Organismen gibt es eine Vielzahl an physiologischen Situationen, in denen sich der Energiebedarf einzelner Zellen oder Gewebe deutlich ändert.

Hierzu gehören

- die Differenzierung von Zellen während der Ontogenese [22]
- die Adaption von braunem Fettgewebe zur Wärmeregulation [23]
- Muskelaufbau durch Kraft- oder Ausdauertraining [24]
- hypoxische Bedingungen [25]
- hormonale Veränderungen [26, 27]

Auf diese Situationen reagieren Zellen mit einer Anpassung ihrer oxidativen Kapazität, teils durch Veränderung ihrer Mitochondrienmasse, teils durch Umorganisation der Mitochondrienstruktur.

Auch eine Reihe von pathophysiologischen Situationen führt zu Veränderungen bei Mitochondrien:

- Tumorbildung [28, 29]
- mitochondriale Myopathien, Entstehung von "ragged red fibers" [30]
- Über- oder Unterproduktion von Hormonen [31, 32]
- Hypertrophie, z. B. von Herzmuskel [33]
- Alter [18]
- Denervierung und Nichtgebrauch von Muskulatur [34, 35]

Die Vielzahl der für die Mitochondrienbiogenese benötigten Proteine läßt aus ökonomischen Gründen eine Regulation der energieaufwendigen Proteinexpression sinnvoll und wahrscheinlich erscheinen. Dabei ist allerdings nicht nur eine Koordination der Gene innerhalb des Mitochondriums bzw. des Kerns erforderlich. Zumindest für die Generierung der Atmungskettenkomplexe I, III, IV, und V, die sowohl aus mitochondrial kodierten als auch aus kernkodierten Untereinheiten bestehen, ist auch eine intergenomische Kommunikation und Abstimmung zwischen Kern und Mitochondrium zu erwarten.

Der überwiegende Teil der ca. 700 bis 1000 für die Mitochondrienbiosynthese benötigten Proteine wird im Zellkern kodiert und posttranslational importiert. Die korrekte Faltung der Proteine und die Bildung von Komplexen geschieht erst am Zielort [36].
Zu den kernkodierten mitochondrialen Proteinen gehören alle Faktoren für Replikation und Expression des mitochondrialen Genoms, der größte Teil der mitochondrialen Translationsmaschinerie und ca. 70 Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, die Enzyme für Krebs-Zyklus und β-Oxidation, außerdem Chaperone und Transportproteine.
Die mitochondriale DNA in Säugerzellen ist ein hochgradig ökonomisch organisiertes Genom von 16,6 kb. Es umfaßt 37 Gene, darunter die beiden mitochondrialen rRNAs, 13 Gene für Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V und alle 22 für die mitochondriale Proteinbiosynthese benötigten tRNAs. Schätzungen nach besitzen einzelne Mitochondrien ca. 2-10 ringförmige Moleküle mitochondrialer DNA [37].

1.2.1 Regulation mitochondrial kodierter Gene

Die Expression der mitochondrial kodierten Gene in Vertebraten ist zu einem beträchtlichen Teil von der Transkriptionsrate abhängig, nur geringe Modulationen der mitochondrialen Genexpression erfolgt teilweise auf RNA- und Protein-Ebene durch unterschiedliche Stabilitäten und Turnover-Zeiten [38].

Die Transkription der mitochondrialen Gene geht von zwei unabhängigen Promotoren in der "D-Loop"-Region der mtDNA aus. Die dicht hintereinander liegenden Gene jedes Strangs werden dabei als polycistronische RNA transkribiert. Die zwischen den proteinkodierenden Genen liegenden tRNAs dienen als Spleißsignal, durch prozessierende RNAsen werden die einzelnen RNAs freigesetzt und die mRNAs polyadenyliert [39]. Eine "vorzeitige" Termination der RNA-Synthese am 3'-Ende des 16S rRNA-Gens in der Mehrzahl der Transkriptionsereignisse am H-Strang führt dabei zu einer höheren Konzentration der beiden rRNAs [40].

Beide Promotoren der mitochondrialen DNA weisen Bindungsstellen für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (mtTFA) auf, der zusammen mit der mitochondrialen RNA-Polymerase essentiell für die Transkriptionsinitiation *in vitro* nachgewiesen wurde [41]. Dem kernkodierten mtTFA wird eine zentrale Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Transkription durch den Zellkern zugeschrieben.

Auch die Replikation der mtDNA wird durch mtTFA reguliert: eine kurze RNA-Spezies am leichten Strang der mtDNA dient als Startpunkt für die Neusynthese der mtDNA [39]. Den Einfluß des Kerns auf die mtDNA-Replikation bestätigt auch der Befund, daß Mitochondrien in Kernnähe eine höhere DNA-Syntheserate besitzen als weit entfernte [42].

1.2.2 Regulation kernkodierter mitochondrialer Gene

Die Regulation der mitochondrialen Biogenese mit schätzungsweise 1000 beteiligten Genen ist ein komplexer Prozeß, der präzise den jeweiligen physiologischen Bedingungen der Zelle angepaßt werden muß. Auf welche Weise dabei die Expressionskoordination der kern-kodierten Gene erfolgt, ist noch unbekannt. Erste Ansätze zur Identifizierung regulatorischer Elemente wurden durch die Analyse von Promotorregionen einzelner Gene gemacht.

Wie die meisten „house-keeping"-Gene, die in einer Zelle stets exprimiert werden, wird auch die basale Expression vieler mitochondrialer Gene durch den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 aktiviert. Dieser Aktivator gehört zur Familie der Zinkfinger-Proteine und ist an der Regulation einer Vielzahl von konstitutiven und zellspezifischen Funktionen beteiligt [43].

Je nach Gen, Zelltyp und physiologischer Situation erfolgt eine zusätzliche Aktivierung kernkodierter mitochondrialer Gene durch ein breites Spektrum an weiteren ubiquitären oder Zelltyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren.
Unklar ist bisher jedoch, welche gemeinsamen Elemente für die Koordination der mitochondrialen Gene verantwortlich sind. Ein erster Schritt zur Aufklärung war die Identifizierung der *nuclear respiratory factors* NRF-1 und NRF2:

Der Transkriptionsfaktor NRF-1 wurde über seine Aktivierungsdomäne im somatischen Cytochrom C-Promotor der Ratte entdeckt. Neben dem Einfluß einer CAAT-Box und einigen Sp1-Erkennungssequenzen ist die Bindung von NRF-1 für eine Stimulierung der Cytochrom C-Expression essentiell [44]. Die entwickelte Consensus-Sequenz führte zur Identifizierung von funktionellen NRF-1-Bindungsstellen in einer Vielzahl von kernkodierten mitochondrialen Genen, unter anderem in Komplex III und IV-Untereinheiten, der ATP-Synthase und Cytochrom C [45].
Über die Aktivierung des *mtTFA*-Gens und der an der mitochondrialen Replikationsinitiation beteiligten MRP-Endonuclease besitzt NRF-1 auch Einfluß auf Transkription und Replikation der mitochondrialen DNA und ist somit Bestandteil der intergenomischen Regulation der mitochondrialen Biogenese [46]. Die essentielle Funktion des NRF-1 für die Integrität der mtDNA wurde durch die Inaktivierung des Gens in der Maus bestätigt: NRF-1-defiziente Embryonen weisen deutlich verringerte mtDNA-Mengen auf und sterben zwischen Tag 3,5 und 6,5 [47]. Allerdings wurden auch in nicht-mitochondrialen Genen funktionelle NRF-1-Bindungsstellen identifiziert, so daß weitere Funktionen als trans-aktivierender Faktor zu vermuten sind [48].

Der ebenfalls an der Regulation kernkodierter mitochondrialer Gene beteiligte Faktor NRF-2 wurde aufgrund seiner transaktivierenden Funktion im cox IV-Promotor identifiziert [49]. Konservierte Bereiche in NRF-2-Bindungsstellen und Homologien der Sequenz zeigten die Zugehörigkeit von NRF-2 zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren. NRF–2 bindet DNA als Heterodimer. Die DNA-Bindung wird dabei von der Untereinheit α vermittelt, während die zweite Untereinheit vom Typ β oder γ die transkriptionsaktivierende Funktion besitzt. Für den humanen NRF-2 sind bisher die Untereinheiten α, β_1, β_2, γ_1 und γ_2 bekannt, bei dem identischen Faktor GAPB (GA–bindung protein) in der Maus fehlen die durch Spleißvarianten entstehenden Untereinheiten γ_1 und γ_2 [50].

Funktionelle NRF-2-Zielsequenzen wurden unter anderem in mehreren Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidase gefunden, außerdem im Gen für die β-Untereinheit der ATP-Synthase und – in Kombination mit einer NRF-1-Bindungsstelle - im mtTFA-Promotor [51, 52 46]. Dabei sind die Consensus-Sequenzen häufig tandemartig angeordnet und haben synergistische Eigenschaften, die durch die β-Untereinheiten des NRF-2 vermittelt werden [45]. Auch NRF-2 reguliert wie NRF-1 nicht-mitochondriale Gene, z.B. für einige ribosomale Proteine [53], könnte also eine allgemeinere Bedeutung als Transkriptionsregulator haben.

Neben den zahlreichen durch NRF-1, NRF-2 oder durch beide aktivierbaren kernkodierten mitochondrialen Genen existiert allerdings eine ebenso große Zahl an NRF-unabhängigen mitochondrialen Genen. Die koordinierte Regulation der Mitochondrienbiogenese erfordert demnach noch zusätzliche Faktoren, Elemente und Signalwege.

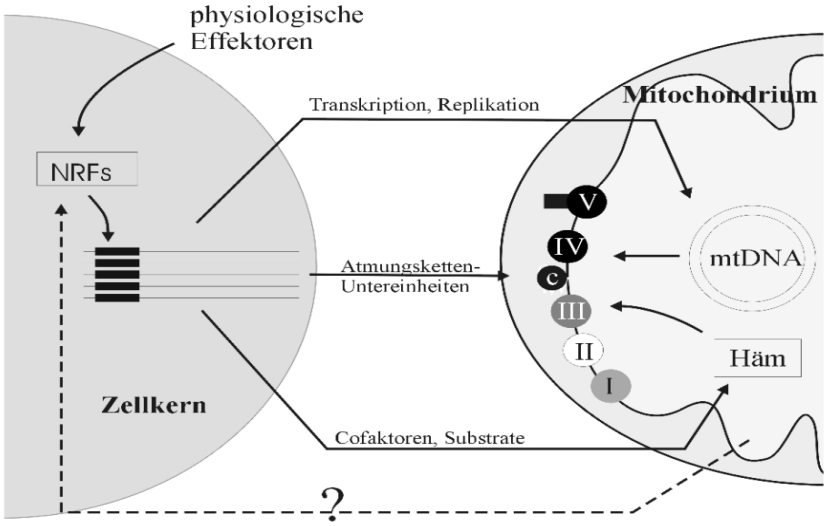


Abbildung 2: Modell für die Kontrolle der mitochondrialen Atmungskette durch kernkodierte Transkriptionsfaktoren [45].

Eine wichtige Rolle spielen dabei sogenannte Co-Aktivatoren, die durch Protein-Protein-Interaktionen indirekten Einfluß auf die Transkriptionsrate eines Gens haben. Die Vielfältigkeit der Co-Aktivator-Regulation besteht darin, daß ein Co-Aktivator verschiedenste Transkriptionsfaktoren aktivieren kann, während ein Transkriptionsfaktor wiederum von unterschiedlichen Co-Aktivatoren beinflußt werden kann.

Zwei dieser Co-Aktivatoren wurden im Zusammenhang mit der Regulation kernkodierter mitochondrialer Gene gefunden:
PGC-1, der "pPARγ coactivator 1", bindet an NRF-1, pPARα und γ, den Glucocorticoid-Rezeptor, Thyrosinrezeptor und weitere Transkriptionsfaktoren [54, 55]. Der überwiegend in mitochondrienreichen Geweben wie Herz, Muskel, Leber und braunem Fett exprimierte PGC-1 wirkt bei erhöhtem Energiebedarf zelltypspezifisch auf die Mitochondrienfunktion ein: er vermittelt z. B. in braunem Fettgewebe die Aktivierung der UCP-1-Expression in der Thermogenese. In Muskelzellen induziert PGC-1 sowohl die entkoppelte Atmung über UCP-2 als auch die ATP-Produktion, während in Herzzellen nur die ATP-gekoppelte Atmung stimuliert wird [56].
Die Expression von NRF-1 und NRF-2 wird ebenfalls von PGC-1 reguliert [57]. Bestätigend für die Rolle von PGC-1 im Energiestoffwechsel der Zelle wurde ein aktivierender Einfluß auf einen Glucose-Transporter in Muskel [58] und die Gluconeogenese in Leberzellen beschrieben [59]. PGC-1 ist zudem auf noch unbekannte Weise in den Spleißprozeß von prä-mRNA involviert [60].

Der zweite in die Regulation mitochondrialer Gene involvierte Co-Aktivator PRC (PGC-1 related coactivator) wurde durch Homologie einiger Proteindomänen zu PGC-1 gefunden. Die in PGC-1 charakterisierte N-terminale Transkriptionsaktivierungsdomäne ist auch in PRC vorhanden; zudem ist die vermutlich an der Regulation des RNA-Spleißens beteiligte C-terminale Domäne der beiden Proteine homolog. PRC aktiviert ebenso wie PGC-1 mitochondriale Gene über Bindung an NRF-1 und wird gewebespezifisch exprimiert, spielt jedoch bei der Regulation der Thermogenese in braunem Fettgewebe keine Rolle. Die größte Aktivierung der PRC- Expression wurde in proliferierenden kultivierten Zellen gefunden. Denkbar ist demnach eine Funktion von PRC in der Aktivierung der Mitochondrienbiogenese bei der Proliferation von Zellen [61].

Weitere regulatorische Elemente in den Promotoren mitochondrialer Gene wurden über Sequenzvergleiche und Homologien zwischen bekannten Promotoren prognostiziert. Hierzu gehören die konservierten Bindungsmotive Mt1, Mt3 und Mt4 [62], die sowohl in einigen kernkodierten mitochondrialen Genen als auch in der Promotorregion der mtDNA gefunden wurden. Die bisher noch nicht identifizierten Bindungspartner dieser DNA-Sequenzen könnten also sowohl Kern- als auch mitochondrial kodierte Gene regulieren [63].

Das besser untersuchte OXBOX/REBOX-Motiv wurde ebenfalls häufig in mitochondrialen Gene gefunden. Das OXBOX-Motiv bindet eine Vielzahl von bisher noch nicht charakterisierten Proteinen, besitzt aber ausschließlich in Muskel eine aktivierende Wirkung. Die überlappende REBOX-Sequenz bindet ebenfalls ubiquitäre Proteine, bisher wurde allerdings keine transkriptionssteuernde Funktion gefunden [64].

Der bisherige Wissensstand ergibt zusammenfassend ein sehr lückenhaftes Bild eines Netzwerkes von Faktoren und Elementen, die die Expression kernkodierter mitochondrialer Gene koordinieren und verknüpfen. Die Identifizierung und Analyse weiterer regulatorischer Faktoren und Mechanismen der Mitochondrienbiogenese ist erforderlich, um die fehlenden Elemente dieser Regulationskaskade zu identifizieren. Auch die Sensoren, mit denen Zellen Veränderungen ihrer Energiebilanz registrieren, sind noch unbekannt.

1.3 Mitochondrienbiogenese in Muskel

Muskeln sind aufgrund ihres hohen Energiebedarfs und der resultierenden Abhängigkeit von der mitochondrialen ATP-Produktion oft von mitochondrialen Fehlfunktionen betroffen. Es existieren mehrere unabhängige Einflüsse auf die Mitochondrienbiogenese im Muskel:

einerseits kann der Gehalt an Mitochondrien in Herz- und Skelettmuskel durch intensives Ausdauertraining um 50 bis 100 % gesteigert werden [24]. Auf eine noch unbekannte Weise aktiviert der Stimulus “Kontraktion” dabei die Expression mitochondrial und kernkodierter Proteine gleichermaßen und führt zu einem Anstieg der Mitochondrienmasse und –aktivität.

Ähnliche Einflüsse auf die Mitochondrienbiogenese haben einige Hormone. So steigert z. B. das Thyroidhormon T3 die Mitochondrienbiogenese in Muskelzellen [65].

Andererseits scheinen Mitochondrien auch bei der Differenzierung von Muskelzellen eine entscheidende Rolle zu spielen: Während der Differenzierung und Fusionierung von Myoblasten zu vielkernigen Myotuben steigt der Mitochondriengehalt deutlich an, auch ohne daß kontraktile Reize einwirken.

Muskelvorläuferzellen mit gestörter Mitochondrienbiogenese können zwar proliferieren und ihren Energiebedarf durch Glykolyse decken, sind aber in der Regel nicht mehr zur Differenzierung befähigt [66, 67, 68]. Bisher ist noch nicht geklärt, ob die steigende Mitochondrienbiogeneserate während der Muskeldifferenzierung durch ein genetisch verankertes Differenzierungsprogramm verursacht wird oder ein erhöhter Bedarf an Energie oder mitochondrialen Syntheseprodukten besteht, der die Organellenproliferation aktiviert.

Die Differenzierung von Muskelzellen ist nicht ausschließlich im Embryonalstadium präsent.

Die Regeneration von Muskel durch Differenzierung muskulärer Stammzellen, sogenannter Satellitenzellen, findet auch im ausgewachsenen Organismus statt. Die im differenzierten Muskel ruhenden Satellitenzellen werden bei Faserverletzungen, Training oder Wachstum zur Proliferation angeregt, exprimieren myogene Marker und fusionieren schließlich mit den vorhandenen Muskelfasern oder untereinander [69]. Zudem haben sie das Potential, auch Osteozyten und Adipoyten zu generieren [70].

Diese Satellitenzellen bieten durch ihre Proliferationspotenz die Möglichkeit, primäre myogene Zellen *in vitro* zu kultivieren. Bei Versorgung mit embryonalen Wachstumsstoffen durch fetales Kälberserum verbleiben die Zellen im proliferativen Myoblasten-Stadium und können z. B. im Fall der murinen Myoblastenzell-Linie C2F3 bis zu 40 Passagen kultiviert werden, bei Entzug dieser Stoffe differenzieren sie zu vielkernigen, kontraktilen Myotuben.

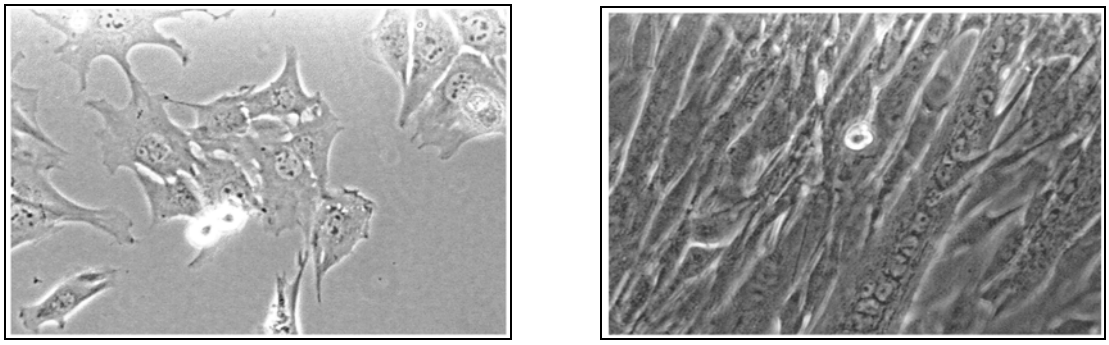


Abbildung 3: Myoblasten Myotuben

Der Vorteil einer Zellkultur gegenüber Gewebe besteht hauptsächlich in der Möglichkeit der direkten Einflußnahme auf eine homogene Zellpopulation, z. B. durch genetische Manipulationen oder Zusatz von Effektorsubstanzen. Vor allem die Transfizierbarkeit von Zell-Linien ermöglicht ein breites Spektrum von Experimenten, z. B. “Reportergen-Assays” oder die Überexpression spezifischer Proteine.

Der Nachteil der Arbeit mit kultivierten Zellen liegt in dem fehlenden organischen Umfeld, das signifikanten Einfluß auf das Verhalten der einzelnen Zellen haben kann. Obwohl es sich bei den meisten myogenen Zell-Linien um Primärzellen ohne bekannte karzinome Veränderungen handelt, sind Unterschiede zwischen Muskel und kultivierten Muskelzellen der gleichen Spezies bekannt [71]. Aus diesem Grund ist der Vergleich der an Zellkulturen erzielten Ergebnisse mit Gewebe *in vivo* notwendig, wenn auch schwierig.

1.4 Methoden zur Untersuchung von Genregulation

Die spezifische Regulation eukaryotischer Gene fndet in der Regel auf der Ebene der Transkription statt. Bekannt sind allerdings auch Einflüsse auf die RNA- und Proteinstabilität und Variationen des Spleißmusters, die zu unterschiedlichen Varianten eines Proteins führen.

Die basale Transkription von kernkodierten Genen wird in der Regel durch Protein-DNA-Interaktionen im Sequenzbereich von ca. 1 kb um das Gen herum reguliert. Im Bereich der Initiationsregion enthält die Sequenz eines Gens Bindungsmotive, die die Anlagerung der Polymerase II und der am Initiationskomplex beteiligten Faktoren (TBP, TAFs, TFIIa-f) ermöglichen. Durch die Position dieser Bindungsmotive wird der Transkriptionsstart bestimmt. Die meisten Gene enthalten in dieser Region die sogenannte TATA-Box; kernkodierte mitochondriale Gene sind allerdings, wie die meisten beständig exprimierten housekeeping-Gene, in der Regel TATA-los.

Die Sequenz von wenigen hundert Basen um den Transkriptionsstart wird als „Promotor" bezeichnet und besteht in der Regel aus mehreren konservierten Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren, die die Anlagerung der Polymerase II erleichtern und steuern. Neben ubiquitär vorkommenden Promotorelementen wie AP1, Sp1 oder CAAT-Box können hier auch Sequenzen enthalten sein, deren Bindungspartner gewebs- und situationsspezifisch reguliert werden. Jeder dieser Transkriptionsfaktoren hat direkt Einfluß auf die Bildung des Initiationskomplexes oder wirkt indirekt über die Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren. Durch die Anordnung und Interaktion der verschiedenen Transkriptionsfaktoren wird die spezifische Expression eines Gens ermöglicht [72, 73].

Sogenannte Enhancer-Elemente enthalten die gleichen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive wie Promotoren und wirken in der Regel verstärkend auf die Transkription durch den Kernpromotor, können aber mehrere Kilobasen vom regulierten Gen entfernt liegen und entziehen sich dadurch zunächst einer einfachen Analyse.

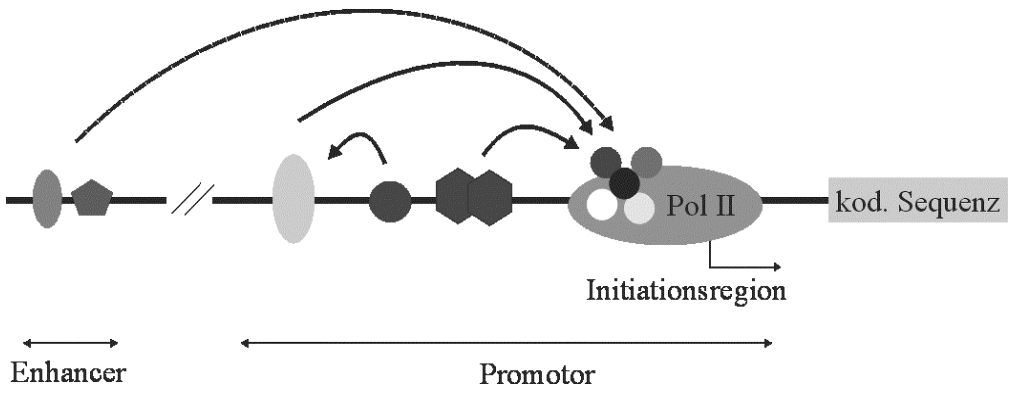


Abbildung 4: Schema der Transkriptionsregulation durch Transkriptionsfaktoren

Zur ersten Untersuchung der Expressionsregulation eines Gens bietet sich die Identifizierung und Analyse der Promotor-Sequenz an.
Potentielle Bindungsstellen für bereits bekannte trans-aktivierende Faktoren und Sequenzen ohne bekannte Funktion können dann durch Reportergen-Assay auf ihren Einfluß auf die Transkription des Gens untersucht werden. Hierbei wird in einem Expressionsvektor unter der Kontrolle des zu analysierenden Promotors ein Reportergen exprimiert, dessen Translationsprodukt anhand von Enzymaktivitäten oder Farbstoffbildung gut quantifizierbar ist und als Maß für die Aktivität des Promotors genutzt wird. Durch transiente Transfektion können auf diese Weise z.B. Serien von Promotorsequenzen mit verschiedensten Modifikationen auf ihre Funktionalität und Aktivität hin untersucht werden. So können Aussagen über die funktionalen Bereiche des Promotors gemacht werden.

Wurde die Funktionalität von Elementen nachgewiesen, deren Bindungspartner nicht eindeutig oder unbekannt ist, kann die Protein-DNA-Interaktion an diesen Sequenzbereichen durch Elektromobility shift assays (EMSA) und Footprint-Analysen näher charakterisiert werden.
Bei Elektromobility shift assays werden relativ kurze, radioaktiv markierte DNA-Sequenzen unter nativen Bedingungen mit Proteinextrakten oder aufgereinigten Proteinen inkubiert. In der anschließenden nativen Gelelektrophorese können DNA-Proteinkomplexe und ungebundene DNA durch ihre unterschiedliche Mobilität getrennt werden.
Die genaue Position einer DNA-Proteinbindung innerhalb der DNA-Sequenz wird durch Footprint-Analyse bestimmt. Hierbei wird der durch Proteinbindung sterisch vor DNase-Abbau oder Methylierung geschützte Bereich einer DNA-Sequenz genauer bestimmt.

Weitere Schritte zur Charakterisierung des Einflusses von Transkriptionsfaktoren auf die Transkription eines Gens sind Überexpression und “Knockout” spezifischer Faktoren, die potentiellen Einfluß auf die Regulation der Transkription haben, und die Beobachtung der Genexpression unter diesen Bedingungen.

1.5 Auswahl der untersuchten Gene

Um möglichst allgemeine Prinzipien bei der Regulation kernkodierter mitochondrialer Gene während der Mitochondrienbiogenese zu analysieren, wurden drei Gene ausgewählt, die auf unterschiedliche Weise an der Funktionalität der Organellen beteiligt sind.

1.5.1 Cytochrom C (*cytC*)

Cytochrom C ist als Bestandteil der Atmungskette an der Intermembranseite der inneren Membran lokalisiert und überträgt Elektronen der Ubihydrochinon-Cytochrom C-Reduktase auf die Cytochrom C-Oxidase. In Säugern wurden bisher eine ubiquitäre, somatische und eine testis-spezifische Form des Cytochrom C gefunden.

Cytochrom C wird oft als Marker der Mitochondriendichte und der oxidativen Kapazität verwendet, da sich der Cytochrom C-Gehalt parallel zu den meisten Bestandteilen der Atmungskette verändert [74] und eine ratenlimitierende Funktion im Elektronentransport wahrscheinlich ist [75].

Promotorstudien des somatischen Cytochrom C-Promotors aus Ratte in HeLa-Zellen, der Nierenkarzinomlinie CV-1 und kultivierten Kardiomyozyten ergaben eine starke Abhängigkeit der Promotoraktivität von der Bindung des Nuclear Respiratory Factors NRF-1 und Sp1 [44, 76].

1.5.2 coxIV

Der Komplex IV der Elektronentransportkette, die Cytochrom C-Oxidase, ist ebenso wie Komplex I und III aus mitochondrial und kernkodierten Proteinen aufgebaut. Die drei mitochondrialen Untereinheiten bilden dabei das katalytische Zentrum, das Elektronentransport und Proton-Translokation bewirkt, während den kernkodierten Untereinheiten regulatorische Funktionen zugeschrieben werden [77]. Für die Untereinheit IV der Cytochromoxidase sind in Mensch, Ratte und Maus zwei Isoformen bekannt, von denen eine (cox IV-2) nur in Lungengewebe in höherem Maße exprimiert wird [78].

Die ubiquitäre Form cox IV-1 in Ratte ist ein 19,5 kD großes Protein, das an der Oberfläche des Holoenzyms lokalisiert ist [79]. Vergleichbare RNA-Gehalte in verschiedenen Geweben sprechen gegen eine starke Regulation der Transkription; die höchsten Proteinexpressionsraten weisen Herz- und Skelettmuskel auf. Im Gegensatz zu Cytochrom C lösen Thyroidhormone nur einen geringen Anstieg der cox IV-mRNA aus, auch sonst unterscheiden sich die Expressionsmuster von Cytochrom C und cox IV [80, 81].

1.5.3 mtTFA

Der zur Gruppe der "High mobility group-box"-Proteine gehörende mitochondriale Transkriptionsfaktor A bindet durch zwei HMG-Domänen an die mitochondriale DNA im Bereich der Promotoren HSP und LSP, entwindet dort die helikale DNA-Struktur und initiiert die Transkription [82]. Über die Initiation eines RNA-Primers am L-Strang bildet mtTFA auch einen Regulationsmechanismus für die Replikation der mtDNA.

Die Analyse des humanen mtTFA-Promotors in COS-1-Zellen zeigte funktionale Bindestellen für die *nuclear respiratory factors* NRF-1 und NRF-2 sowie Sp1-Erkennungsstellen [46].

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Regulationsmechanismen identifiziert werden, die die koordinierte Expression der kernkodierten Gene bei der mitochodrialen Biogenese steuern. Hierzu wurde die Expressionsregulation einiger kernlokalisierter mitochondrialer Gene bei stimulierter Mitochondrienbiogenese untersucht.

Als eine solche Situation aktivierter Mitochondrienbiogenese diente die Differenzierung von Skelettmuskulatur. Hierzu mußte zunächst die Eignung der murinen Skelettmuskelzell-Linie C2F3 als Modell für die Differenzierung *in vivo* untersucht werden.

In diesem System wurde die Regulation des mitochondrialen Transkriptionsfaktors A, des Cytochrom C und der Untereinheit IV der Cytochromoxidase auf Protein, RNA- und DNA-Ebene untersucht. Nachdem die Regulation der analysierten Gene auf Transkriptionsebene nachgewiesen wurde, sollte die Transkriptionsregulation durch Promotorstudien aufgeklärt werden, wobei gemeinsame Regulationsmuster und –strukturen identifiziert und analysiert werden sollten.

2 Material

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien und Materialien

Sofern nicht angegeben, wurden alle Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. von den Firmen Merck, Sigma oder Roth bezogen.

Coelenterazin		Biotium
complete® Proteaseinhibitor-Cocktail		Roche
D-Luciferin	freie Säure	Biotium, Molecular Probes
Fugene-6	Transfektionsreagenz	Roche
Mowiol 4-88		Calbiochem
Optiprep™	60 % Iodixanol	Axis Shields
poly[dI-dC]*[dI-dC]	doppelsträngig, Na-Salz	Amersham Pharmacia
Gene Screen Plus Hybridization transfer membrane		NEN
Optitran BA-S 83 reinforced nitrocellulose		Schleicher & Schuell
Aclar™ Folie		Plano
Slide-a-Lyzer Dialyserahmen MWO 3500		Pierce

2.1.2 spezielle Geräte

Agarosegel-Kammern	Easycast	Owl Scientific
Gelscanner	CCD-Video	Raytest
Hybridisierungsofen		Amersham Pharmacia
Inkubatoren	HeraCell	Heraeus
inverses Mikroskop	DMIL	Leica
Luminometer	Sirius-1	Berthold Detetction Systems
PCR-Thermocycler	PTC-100	MJ Research Inc.
Polyacrylamidgelkammer	V14*16	Life Technologies
Sauerstoff-Elektrode	CB1D	Hansatech
SDS-PAGE-Kammer	Tall Mighty Small	Hoefer
Sequenziersystem	S4S	Owl Scientific

2.2 Organismen

Bakterienstamm: XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^{q}ZDM15, Tn10 (tet^{r})]

Zell-Linien: C2F3 murine Muskelzell-Linie [83]

HepG2 humane Hepatomazell-Linie, ATTC HB-8065

Tiere: Ratten vom Stamm Wistar Rats

2.3 Material zur Arbeit mit Bakterien

LB-Medium/Agar 1 % NaCl pH 8,0
1 % bacto-Trypton
0,5 % Hefeextrakt
(1 % bacto-Agar)

Antibiotika	Stock	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in EtOH	12,5 µg/ml

2.4 Material zur Kultivierung von Zell-Linien

DMEM mit Glutamax I, 4,5g/l Glucose, Pyridoxin	Gibco BRL Cat.No. 61965-026
Penicillin-Streptomycin 10000 IU/ml, 10000 µg/ml	Gibco BRL Cat.No. 15140-114
MEM Nonessential Amino Acids 100x	Gibco BRL Cat.No. 11140-035
Na-Pyruvat 100 mM sterilfiltriert	Gibco BRL Cat.No. 11840-048
Trypsin-EDTA 0,25%in HBSS	Gibco BRL Cat.No. 25200-056
PBS-Puffertabletten	Gibco BRL Cat.No. 18912-014
FCS (fetal calf serum)	Sigma Cat.No. F7524
Horse Serum	Gibco BRL Cat.No. 16050-098
DMSO, cell culture tested	Sigma Cat.No. D-4540
Zellkultur-Flaschen und –Schalen	Nunc, Costar Corning
Cryo-Röhrchen, Zellschaber	Costar

Zusätze zu allen Nährmedien:

1mM Na-Pyruvat
1x Nonessential Amino Acids
1 % Penicillin-Streptomycin

2.5 Material für molekularbiologische Arbeiten

2.5.1 Puffer und Lösungen

50x TAE	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA pH 8,0
10x TBE	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
10x TBST:	200 mM Tris pH 7,6 1,3 M NaCl 1 % Tween-20
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
20x SSPE	3 M NaCl 0,2 M NaH_2PO_4 0,02 M Na-EDTA pH 7,4

RNase-freies Wasser: Reinstwasser wurde mit 0,1 % DEPC versetzt und zur Inaktivierung von Nucleasen ü. N. gerührt. Das DEPC wurde durch Autoklavieren zersetzt, der entstehende Akohol durch anschließendes Rühren entfernt.

2.5.2 Kits

Aufreinigung von Nucleinsäuren:

QIAprep Spin Miniprep Kit	
QIAGEN Plasmid Midi Kit	
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	
QIAquick Gel Extraction Kit	
QIAquick PCR Purification Kit	
QIAquick Nucleotide Removal Kit	
QIAEx II Gel Extraction Kit	
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
Random Primed DNA Markierungs Kit	Roche
ECL-Kit	NEN

2.5.3 Enzyme

Proteinase K	QIAGEN
RNase A	Q-Biogene
DNase I	Roche
Taq-Polymerase	Gibco BRL, Sigma, Promega
AMV Reverse Transcriptase	Promega
T4 Polynucleotid-Kinase	New England Biolabs
Klenow-Enzym (DNA Polymerase I, großes Fragment)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Shrimp alkaline Phosphatase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs

2.5.4 Oligonucleotide

pGL3 Sequenzierprimer:

RV3 5’ CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC 3’

GL2 5’ CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA 3’

PCR-Primer:

humaner *mtTFA*-Promotor

mtTFAP-F

5’ GGT ACC ACG CGT GCT AGC CTG AAC TCC GAG CTC CAG 3’

mtTFAP-R

5’ AAG CCT TCT AGA GAG CTC TGC GAC CCT CCG GCG TGT 3’

mtTFAP-86F

5’ GGT ACC ACG CGT GCT AGC GAT CCC GGG GTA CGC TCT 3’

mtTFAP+20R

5’ AGG CTT AGA TCT CTC GAG CAT GGT ACG GGC CAT GCC 3’

consens-1

5’ GAG CTC GGT ACC GCT GCC HCA CGT CCG GCC GCG GCT CTT ATT C 3’

Ratten *coxIV*-Promotor

coxIVP-667F

5’ GGT ACC ACG CGT GCT AGC GGA TCC GCT TGC CTC CCT A 3’

coxIVP+31R

5’ AAG CCT TCT AGA GAG CTC GAC CGG AAG AGC GGG TCC C 3’

Ratten *Cytochrom C*-Promotor

cytP-633F

5’ GGT ACC ACG CGT GCT AGC AAG CTT GCC TGC ACA CCC 3’

cytP+135R

5’ AAG CCT TCT AGA GAG CTC GCA TGT CTT TGT AGG TCA 3’

cytP-177F

5’ TAC CAT GCT AGC CCG 3’

cytP-50R

5’ CTT GTT CTG CCC TCC 3’

Mismatch-Primer Cytochrom C-Promotor:

comp1f

5'GTG CCC GGC TCC TCC GCA CGT CCG GCC 3'

comp1R

5' GGC CGGACG TGC GGA GGA GCC GGG CAC 3'

compCETSF

5' GTG CCC GGC GCT GCC GCA CGA AAA GCC 3'

comp3F

5' GTG CCC GGC GCT GAA AAA AAT CCG GCC 3'

comp3R

5' GGC CGG ATT TTT TTC AGC GCC GGG CAC 3'

comp5F

5' GGC TAC GTC AAA AAG CAG TGC 3'

comp6F

5' GGC TAC GTC ACG GCA AAA TGC 3'

comp7F

5' CAG AAA ACG GCG CTG CCG CA 3'

comp8F

5' CAG TGC CAA AAG CTG CCG CA 3'

PCR-Primer für DNA-Sonden:

mouse coxIII cDNA

5' AAG ATG GTG AAC TAT GCC TG 3'

5' GCA GGT GAG TTG TTA CAC AC 3'

mouse coxIV cDNA

5' TGG CAG AAT GTT GGC TTC CA 3'

5' TTG TCA TAG TCC CAC TTG GC 3'

Oligonucleotide für Electromobility shift assays:

cyt-147 -> -113

5’ TGC TAG CGC TCC CAA TCC TGG AGC CAA TGA CAT GC 3’

5’ GCA TGT CAT TGG CTC CAG GAT TGG GAG CGC TAG CA 3’

cyt-123 -> -90

5’ CAA TGA CAT GCG GCT ACG TCA CGG CGC AGT GCC C 3’

5’ GGG CAC TGC GCC GTG ACG TAG CCG CAT GTC ATT G 3’

cyt-95 -> -68

5’ GTG CCC GGC GCT GCC GCA CGT CCG GCC 3’

5’ GGC CGG ACG TGC GGC AGC GCC GGG CAC 3’

Alle Oligonucleotide wurden bei den Firmen Sigma, MWG oder Gibco BRL in Standardreinheit synthetisiert.

2.5.5 Vektoren

pBSIIKS$^{+/-}$ (pBluescript)	Stratagene
pGL3 basic	Promega
pRL-CMV	Promega
pRL-SV40	Promega
pRCO4CAT	RC Scarpulla [84]
pRC4CAT/-631	RC Scarpulla [85]
pBSSK^{+} human mtTFA promoter	S Ohta [86]

2.5.6 Nucleinsäuren

1kb-Ladder	Gibco BRL
100 bp Marker	New England Biolabs
Hefe-RNA	Roche
Heringsspermien-DNA	Serva
Calf Thymus DNA	Amersham Pharmacia

2.5.7 DNA-Sonden

Cytochrom C	aus pRC4CAT/-631
mouse cox IV	RT-PCR-Produkt
mouse cox III	PCR-Produkt
mouse mtTFA full length cDNA	Garman, Clayton (unveröffentlicht)
human 18 S	kloniert aus PCR-Produkt
human 28 S	PCR-Produkt

2.5.8 Radiochemikalien

α^{32}P-ATP	5000 Ci/mmol	Hartmann Analytics
γ^{32}P-dCTP	5000 Ci/mmol	Hartmann Analytics

2.5.9 Antikörper

Erstantikörper:

Polyclonal cox IV	Kadenbach et al.	1:100
Polyclonal anti-mouse mtTFA	Clayton et al.	1:2000
Monoclonal anti-myogenin (F5D)	Santa-Cruz	5 µg/ml
Monoclonal anti-cytC	BD Biosciences	1:1000

Zweitantiköper:

Donkey-anti-rabbit Igg	Peroxidase-konjugiert	Dianova	1:10 000
Donkey-anti-mouse Igg	Peroxidase-konjugiert	Dianova	1:2000
Goat-anti-mouse Igg	Alexa 488-markiert	Mol. Probes	1:200

3 Methoden

3.1 Plasmide und Bakterienarbeiten

3.1.1 Anzucht von *E.coli*

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde der Recombinase-negative *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet: die Bakterien wurden in LB-Medium, bei transformierten Bakterien mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz, angeimpft und in der Regel ü. N. bei 37°C geschüttelt. Bei festen Medien wurden die Bakterien ausplattiert oder per Quadrantenausstrich vereinzelt und ü. N. bei 37°C inkubiert [87].

3.1.2 Herstellung ultrakompetenter Bakterien

E. coli XL-1 blue wurden ü. N. auf LB-Agar + Tetracyclin angezogen. 3-4 Kolonien wurden in 100 ml LB+ Tetracyclin überimpft und ca 30 h bei RT bis zu einer OD von 0,6 geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 2500 g und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 32 ml eiskaltem TB resuspendiert, erneut 10 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert.

Transformationspuffer TB:	10 mM BES pH 6,7
	15 mM $CaCl_2$
	250 mM KCl
	55 mM $MnCl_2$
	sterilfiltrieren

Das neue Pellet wurde in 8 ml TB resuspendiert, mit DMSO in einer Endkonzentration von 7% versetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Zellen wurden in 100 µl-Aliquots in flüssigem N_2 schockgefroren und bei –80°C gelagert.

3.1.3 Transformation

Ein Aliquot ultrakompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von ca. 0,1 µg der zu transformierenden DNA oder der Hälfte eines Ligationsansatzes wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und 10-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension einem Hitzeschock von 90 s bei 42° C ausgesetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika zugefügt und die Mischung 1 h bei 37° C geschüttelt.
Je nach zu erwartender Koloniedichte wurde ein Teil oder der gesamte Ansatz bei 2000 g abzentrifugiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz ausplattiert.

3.1.4 Plasmidpräparationen

Die Aufreinigung von Plasmiden aus transformierten Bakterienkulturen erfolgte nach Anleitung des jeweils verwendeten Kits. Die DNA wurde dabei mit H_2O eluiert, die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt und über eine Abschätzung im Agarose-Gel kontrolliert.
Die DNA aus Spin Minipreps wurde für Restriktionen, Ligationen und Transformationen eingesetzt, die reinere DNA aus Midi- oder Maxipräparationen zur Transfektion von Zellen.

3.1.5 Glycerolstocks

Zur dauerhaften Lagerung von transformierten Bakterien wurde 1 ml Bakteriensuspension in LB mit 15 % Glycerin versetzt und bei –80° C eingefroren. Zur Entnahme wurde mit einer sterilen Impföse etwas gefrorene Bakteriensuspension abgeschabt und auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikumzusatz ausgestrichen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit auf Zellkulturschalen oder in belüfteten Zellkulturflaschen kultiviert. C2F3-Myoblasten wurden in DMEM + 5 % FCS kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte dabei je nach Zelldichte alle zwei bis drei Tage, bei ca. 70 % Konfluenz wurden die Zellen durch kurze Inkubation mit Trypsin abgelöst, durch Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert und 1:5 bis 1:15 in DMEM verdünnt wieder ausgesät. Myotuben wurden durch Differenzierung von Myoblasten gewonnen. Dazu wurden Myoblasten 24 h nach Erreichen der Konfluenz durch Mediumwechsel zu DMEM high Glucose + 4% Horse Serum zur Differenzierung angeregt. Innerhalb von drei Tagen war die Differenzierung abgeschlossen, die Myotuben konnten bei täglichem Mediumwechsel weitere zwei bis drei Tage in Kultur gehalten werden.

3.2.2 Einfrieren, Lagerung und Auftauen

Zur längerfristigen Lagerung einer Zellkultur wurden die Zellen einer 10 cm-Schale oder Flasche trypsinisiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert und in Cryoröhrchen mit ca. 1° C/min auf –80° C abgekühlt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Cryoröhrchen in flüssigen N_2 überführt und gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Cryoröhrchen im 37° C-Wasserbad schnell aufgetaut und die Zellen in DMEM resuspendiert und ausgesät. Durch Mediumwechsel nach dem Anheften der Zellen wurden DMSO-Reste entfernt.

3.2.3 Transfektion

Die Transfektion von Myoblasten erfolgte bei 30-50 % Konfluenz mit Fugene-6. Hierzu wurde 1h vor Transfektion das Zellkulturmedium gewechselt, um die Zellen im Zustand optimalen Wachstums zu transfizieren. 15 µl Fugene-6 und 20 µg Plasmid-DNA pro 12-well-Platte wurden nach Herstelleranleitung eingesetzt.

3.3 Klonierung

Zur Erzeugung definierter DNA-Fragmente und Schnittstellen wurden Restriktionsenzyme nach Herstelleranleitung eingesetzt. Zur Kontrolle der vollständigen Restriktion und zur Abtrennung einzelner DNA-Fragmente wurde die DNA über ein Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt und das erwünschte Fragment isoliert. Zur Erzeugung von glatten Enden aus 3' oder 5' Überhängen nach einem Restriktionsverdau wurde das gereinigte DNA-Fragment mit Klenow-Enzym im mitgelieferten Puffersystem nach Anleitung inkubiert.
Um bei einer Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor die Religation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA mit Shrimp alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4-DNA-Ligase ü. N. bei RT, bei blunt end Ligationen bei 16° C. Ligationsansätze wurden anschließend direkt in Bakterien transformiert oder maximal 24 h bei 4° C aufbewahrt.

3.4 Gelelektrophoresen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 10 kb wurden 0,8 bis 2,5 %ige Agarosegele in TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet [87]. Die Proben wurden zur Färbung und Erhöhung der Dichte mit ≥1/10 Vol Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (z.B. 1Kb-Marker, Gibco) bei ca. 5-10 V/cm aufgetrennt.

DNA-Ladepuffer:	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylencyanol
	6,5 % Saccharose
	in 100 mM Na-EDTA pH 8,0

Die Dokumentation erfolgte mit einer CCD Videokamera. Eine Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte über das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN.
Kurze DNA-Fragmente und Oligonucleotide wurden über Polyacrylamidgele getrennt und aufgereinigt: Für nicht-denaturierende Elektrophoresen wurden 10-20%ige Acrylamidgele in TBE eingesetzt, die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und bei ca. 5 V/cm aufgetrennt [87]. Oligonucleotide wurden über denaturierende 15 %ige Acrylamidgele mit 7 M Harnstoff getrennt, als Ladepuffer wurde 1x TBE in Formamid + 0,5 % Bromphenolblau verwendet [87].
Die Gele wurden anschließend in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid für 1/2 h gefärbt und unter UV-Licht visualisiert. Die Extraktion aus Acrylamidgelen erfolgte mit Hilfe des QIAEx II Gel Extraction Kits.

3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

3.5.1 Primerdesign

Je nach zu amplifizierendem Fragment wurden als Primer Oligonucleotide von 15-35 bp Länge eingesetzt. Hierbei wurde die Spezifität der Bindung nur an die gewünschte Sequenz durch Datenbankscreening abgesichert und die Annealing-Temperatur der beiden Primer eines Paares in etwa gleich gewählt. Bei Bedarf wurden Restriktionsschnittstellen durch ein überhängendes Primerende in das PCR-Produkt integriert. Mismatch-Primer enthielten die Mutation in der Regel 4-5 Basenpaare vor dem 3'-Ende.

3.5.2 PCR

DNA-Fragmente bekannter Sequenz wurden durch PCR vervielfältigt [88]. Hierzu wurden Taq-Polymerasen verschiedener Hersteller mit dem zugehörigen Puffersystem verwendet:

0,5 µl Template (Gesamt-DNA-Extrakt oder 1:10 verdünnte Plasmid-Präparation)
25 mM $MgCl_2$
2,5 mM pro dNTP
0,25 µM Primer 1+2
2,5-5 U Taq-Polymerase
in 1x PCR-Puffer ohne $MgCl_2$

Temperaturprotokoll:

1.	Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2.	Denaturierung	94°C	45 s
3.	Annealing	50-60°C	45 s
4.	Elongation	72°C	1 min pro 500 bp PCR-Produkt
	40x Zyklus 2→4		
5.	Finale Elongation	72°C	10 min

Standard-PCR-Reaktionen wurden im 100 µl-Maßstab angesetzt; es wurde immer eine Negativ-Kontrolle ohne Template eingeschlossen. Die Größe und Art der PCR-Produkte wurde durch Gelelektrophorese und Restriktionsverdau kontrolliert.
Zur weiteren Verwendung wurde die DNA über das QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung aufgereinigt oder über ein Agarosegel von Primern und Nebenprodukten getrennt.

Zum Screening von Bakterienklonen nach einer Transformation wurde eine geringe Menge Bakterien direkt von einer Kolonie auf Agarmedium entnommen und in 20 µl PCR-Ansatz resuspendiert. Nach der PCR wurde der gesamte Ansatz durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Vorhandensein und Größe eines PCR-Produkts überprüft.

3.5.3 RT-PCR

Zur Erzeugung einiger Sonden für Northern Blots wurde durch RT-PCR nach Sellner et al. [89] eine cDNA erzeugt, die dann als template für weitere normale PCRs diente.

Als Maßstab wurde ein 50 µl-Ansatz eingesetzt:

100-500 ng denaturierte Gesamt-RNA
10 U AMV Reverse Transcriptase
2 U Taq-Polymerase
200 µM dNTP
500 µM Primer 1+2
0,2 mg/ml Gelatine
2,5 µl Detergens W1
in 1x Taq-Polymerase-Puffer

Temperaturprofil:

1. 42° C 30 min
2. 95° C 2 min
3. 95° C 30 s
4. 55° C 45 s
5. 72° C 45 s

30x Zyklus 3→5

3.5.4 Modifikation von DNA-Sequenzen durch Megaprimer-PCR

Mutationen in DNA-Sequenzen wurden durch PCR mit Megaprimern erzeugt [90]. Hierbei wird durch Verwendung eines normalen und eines Mismatch-Primers in einer PCR zunächst ein kleines DNA-Fragment erzeugt, das die gewünschte Mutation an einem Ende trägt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird in einer zweiten PCR als „Megaprimer“ eingesetzt und ergibt mit einem zweiten, normalen Primer ein PCR-Produkt beliebiger Größe, das die Mutation inmitten der Sequenz trägt. Diese Sequenz kann dann zur weiteren Verwendung in ein Plasmid kloniert werden.

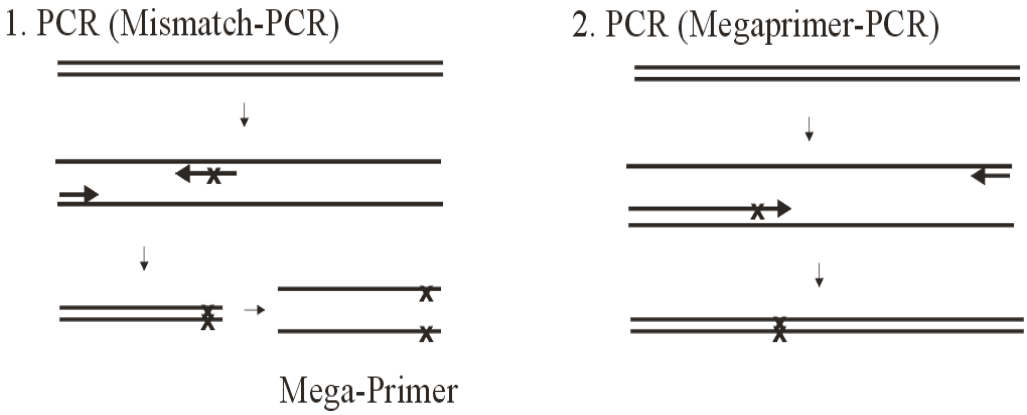


Abbildung 5: Prinzip der Megaprimer-Mutation

3.6 Nachweis von Nukleinsäuren

3.6.1 Präparation genomischer DNA

Gesamt-DNA-Extraktionen aus Gewebe oder kultivierten Zellen wurden durch Lyse in SDS-haltigen Puffer erhalten.

DNA-Lysepuffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,4
	10 mM EDTA pH 8,0
	150 mM NaCl
	0,4 % SDS

Durch Proteinase K-Verdau (0,5 mg/ml, 2-3 h bei 50° C) und RNase A-Verdau (0,5 mg/ml RNase + 0,4 M NaCl, 30 min bei 37° C) mit anschließender Phenol-Chloroformextraktion wurde die genomische DNA freigesetzt und durch Ethanolfällung aufgereinigt. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260/280 nm.

3.6.2 Präparation von RNA aus Zellen

RNA aus Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits präpariert. Hierzu wurden die Zellen auf 10-cm-Schalen angezogen, mehrfach mit angewärmtem PBS-Puffer gewaschen und dann entsprechend der Anleitung lysiert. Die Homogenisierung erfolgte über QIAShredder Säulen. Die aufgereinigte RNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration und Reinheit photometrisch bei 260/280 nm bestimmt.

3.6.3 Southern Blot

Für Southern Blots wurden 10 µg genomische DNA mit NheI vollständig verdaut und über ein 0,8 % Agarosegel 24 h aufgetrennt. Zur Visualisierung der Auftrennung wurde das Gel 30 min in 0,5 µg Ethidiumbromid in H_2O gefärbt und photographiert. Zur Erzeugung von Strangbrüchen durch Depurinierung wurde das Gel 30 min in 0,2 M HCl und mehrfach in H_2O gewaschen. Durch 2 x 15 min Inkubation in alkalischer Denaturierungslösung wurde die DNA im Gel denaturiert; die Neutralisation erfolgte 30 min in Neutralisierungslösung.

Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl
	0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	3 M NaCl
	1 M Tris pH 7,4

Die denaturierte DNA wurde durch Kapillartransfer 14-16 h auf Nylonmembran geblottet, als Trägerpuffer wurde 20x SSC verwendet. Zur Bindung der DNA an die Blotmembran wurde diese 2h bei 80°C gebacken.
Definierte DNA-Sequenzen wurden durch Hybridisierung mit homologen DNA-Sonden nachgewiesen [87], die durch Endlabeling (siehe Kap.3.8.2) oder random primed labeling (Herstelleranleitung) ^{32}P-markiert wurden.
Hierzu wurde die Membran zunächst >5h bei 65° C in Prähybridisierungslösung vorinkubiert, die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe der Sonde bei 65° C ü. N.

Prähybridisierungslösung:	10% Dextransulfat
	1 M NaCl
	1 % SDS

Durch je zwei Waschschritte in 2x SSC + 0,1 % SDS und 0,1 x SSC + 0,1 % SDS wurde unspezifisch gebundene Sonde entfernt, die Temperatur der Waschschritte (40-65° C) bestimmte dabei die Stringenz. Die spezifisch gebundene Sonde wurde autoradiographisch detektiert und densitometrisch ausgewertet.
Zur erneuten Hybridisierung eines Blots wurde restliche Radioaktivität durch zweimaliges Waschen in 0,1 % SDS (20 min, 100° C) entfernt.

3.6.4 Northern Blot

RNA-Proben für Northern Blots wurden über ein denaturierendes Agarosegel (1,2 % Agarose in 1x MOPS + 0,66 M Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt [91].

10x MOPS: 0,4 M Morpholinosulfonsäure
100 mM Na-Acetat
10 mM Na-EDTA pH 8,0

Pro Spur wurden 10 µg RNA eingesetzt, die Auftrennung erfolgte 1h bei 30 V und 3-5 h bei 80 V. Der Kapillartransfer der RNA auf Nylonmembran und die anschließende Hybridisierung mit spezifischen Sonden erfolgte analog zu Kap.3.6.3; als Trägerpuffer für den Transfer wurde 10x SSPE verwendet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms AIDA2.1 (Raytest), die Werte wurden auf die 18S oder 28S-rRNA-Menge pro Spur normiert [92].

3.7 Arbeiten mit Proteinen

3.7.1 Präparation von Proteinen aus Zellen

Gesamt-Proteinextrakte aus Zellkulturen wurden durch Lyse der Zellen in einem Detergens- und Proteaseinhibitorhaltigen HEPES-Puffer erhalten.

Totex-Proteinextraktionspuffer:
20 mM HEPES pH 7,9
400 mM NaCl
20% Glycerin
1% NP-40
1 mM $MgCl_2$
0,5 mM EDTA
0,1 mM EGTA
10 mM ß-Glycerophosphat
10 mM NaF
5 mM DTT
0,5 mM Na_3VO_4
1 mM PMSF

Hierzu wurden die Zellen nach Entfernen des Nährmediums mehrfach mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, abgeschabt und durch Zentrifugation pelletiert (5 min bei 1000 g). Das Zellpellet wurde in Totex-Puffer resuspendiert und unter häufigem Vortexen 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei -80° C schockgefroren, aufgetaut und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (5 min bei 20000 g) pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und bis zur Verwendung bei –20° C gelagert.
Die Konzentration der gelösten Proteine wurde kolorimetrisch nach Bradford [93] mit Biorad Protein Assay bestimmt, die Eichung erfolgte mit BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen in Totex-Puffer.

3.7.2 Immunologische Detektion von spezifischen Proteinen durch Western Blot

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden nach Lämmli durchgeführt [94].
Es wurden 12,5%ige SDS-Acrylamidgele eingesetzt, pro Spur wurden 20 µg Protein in TOTEX + 4 µl Lämmli-Ladepuffer aufgetragen. Für den Nachweis von nicht-membranständigen Proteinen wurden die Proben vor dem Laden 3 min bei 95° C denaturiert. Als Größenstandard wurde Benchmark Prestained Marker von Life Technologies aufgetragen.

Durch ein elektrophoretisches Naß-Blot-Verfahren wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Blotvorgang erfolgte bei Proteinen ≤80 kD für 1,5 h. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Übertragung der Proteine wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt.
Die Ponceau-gefärbte Membran wurde mehrere Stunden in 4% Milchpulver in 1x TBST blockiert. Die Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper und einem Peroxidase-markierten Zweitantikörper erfolgte ebenfalls jeweils für 2-3 h in 4% Milchpulverlösung, jeweils gefolgt von ausgiebigem Waschen in 1x TBST.
Die Bildung von Antikörper-Komplexen wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen und auf Röntgenfilm dokumentiert [95].

3.7.3 Extraktion von Zellkern-Proteinen aus kultivierten Zellen

Zur Isolation von Proteinextrakten, die Transkriptionsfaktoren in hohen Konzentrationen enthalten, wurden Zellkerne aus Zellkulturen und Geweben isoliert und für eine Proteinextraktion eingesetzt.

Die Zellen aus zehn 15cm-Schalen wurden mehrfach mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, abgeschabt und und 5 min bei 300g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde schnell in 5 Vol hypotonem Puffer resuspendiert und erneut 5 min bei 4000 g zentrifugiert. Zur Osmolyse der Zellen wurde das Pellet in 3 Vol frischem hypotonem Puffer resupendiert, 10 min auf Eis inkubiert und im Potter homogenisiert. Der vollständige Aufschluß wurde mikroskopisch durch Trypanblau-Färbung kontrolliert.

Hypotoner Puffer:
10 mM HEPES pH 7,9
1,5 mM MgCl2
10 mM KCl
0,2 mM PMSF
0,5 mM DTT

Die freigesetzten Kerne wurden 15 min bei 4000 g pelletiert und in 1/2 Vol Niedrigsalz-Puffer aufgeschwemmt. Unter ständigem Rühren wurde die Suspension langsam mit 1/2 Vol Hochsalzpuffer versetzt und 30 min gemischt. Durch 30 min Zentrifugation bei 10 000 g wurden ungelöste Bestandteile abgetrennt.

Niedrigsalzpuffer:
20 mM HEPES pH 7,9
25 % Glycerin
1,5 mM $MgCl_2$
20 mM KCl
0,2 mM EDTA
0,2 mM PMSF
0,5 mM DTT

Hochsalzpuffer:
20 mM HEPES pH 7,9
25 % Glycerin
1,5 mM $MgCl_2$
1,2 M KCl
0,2 mM EDTA
0,2 mM PMSF
0,5 mM DTT

Je nach Verwendungszweck wurde der Überstand mehrere Stunden gegen 1x Bindepuffer für Electromobility shift assays oder Footprint Assays (Kap. 3.8.2 bzw 3.8.3) dialysiert, erneut 30 min bei 10 000 g abzentrifugiert und in Aliquots schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

3.7.4 Extraktion von Zellkern-Proteinen aus Muskelgewebe

Die in Muskelgewebe enthaltenen Myofilamente stellen bei der Isolation von Zellkernen ein Problem dar, da sie beim Aufschließen der Zellen alle Organellen zerstören und eine Auftrennung verhindern. Bei der Aufreinigung nach Zak et al. [96] kann dieser Effekt durch Relaxation der Muskelfasern weitgehend verhindert werden.
Herz- und Skelettmuskelgewebe wurde direkt nach der Entnahme in feine Stücke geschnitten und 10 min in Relaxationspuffer gewaschen. Nach mehrfachem Waschen in Homogenisierungspuffer wurde das Gewebe mit einem Ultrathurrax in ca. 5 Vol Puffer homogenisiert.

Relaxationspuffer:	0,1 M KCl
	5 mM $MgCl_2$
	5 mM EGTA
	5 mM Na-Pyrophosphat
	pH 6,8
Homogenisierungspuffer:	0,25 M Sucrose
	0,05 M KCl
	5 mM $MgCl_2$
	5 mM EGTA
	1 mM Na-Pyrophosphat
	complete® Proteaseinhibitorcocktail
	pH 6,8

Durch Zentrifugation (5 min, 1000 g) wurden Zellkerne und dichtere Zellbestandteile pelletiert. Die Aufreinigung der Zellkerne erfolgte über einen Iodixanol-Gradienten [97]:
Das Pellet wurde in 30 % Iodixanol in Homogenisierungspuffer aufgenommen und mit 35 % Iodixanol unterschichtet. Durch 50 min Zentrifugation bei 5000 g und 4° C wurden die Zellkerne an der Phasengrenze angereichert und abpipettiert. Die Zellkerne wurden mehrfach in hypotonem Puffer gewaschen und dann nach Kap. 3.7.3 weiterbehandelt.

3.8 Promotoranalysen

3.8.1 Reportergen-Assay

Zur Analyse der Promotoraktivitäten wurde ein Luciferase Reportergen-Assay mit zwei Expressionsvektoren eingesetzt. Eins der Plasmide trug ein durch einen viralen Promotor gesteuertes Renilla-Luciferase-Gen, das zweite Plasmid ein durch den zu analysierenden Promotor kontrolliertes Firefly-Luciferase-Gen.
Die in 12-well-plates gewachsenen Zellen wurden bei 30-40% Konfluenz mit Fugene-6 transfiziert. Frühestens 24 h nach Transfektion wurden sie mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen, mit 200 µl Lysepuffer pro well vesetzt und 10 min bei 4° C geschüttelt.

Lysepuffer:	25 mM Gly-Gly pH 7,8
	15 mM $MgSO_4$
	4 mM EGTA
	0,2% Tween-20
	1 mM DTT
	pH 7,8

Die Zellen wurden abgeschabt, das Zell-Lysat-Gemisch in Eppis überführt und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Lumineszenzmessung bei -80° C eingefroren.

Die Enzymaktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase in diesen Zell-Lysaten wurde in einem Sirius-Luminometer als Einzelmessungen bestimmt. Je 50 µl Lysat wurde mit 400 µl des jeweilgen Puffers gemischt. Nach Injektion von 100 µl der jeweiligen Substratlösung wurde die Lichtemission über 10 s gemessen.

Firefly-Substrat:	25 mMGly-Gly pH 7,8
	15 mM $MgSO_4$
	4 mM EGTA
	2 mM DTT
	0,2 mM D-Luciferin
	pH 7,8

Renilla-Puffer: 0,5 M NaCl
0,1 M KH_2PO_4
1 mM EDTA
0,02 % (w/v) BSA
0,6 mM NaN_3
pH 7,6

Renilla-Substrat: Renilla-Puffer + 0,5 µM Coelenterazin

Pro Zeitpunkt und Zustand der Zellen wurden je zwölf Proben gemessen und die Werte gemittelt, als Nullwert wurde die Emission untransfizierter Zellen gesetzt, die der Emission bei Transfektion des Promotor-losen pGL3 basic entsprach. Der endgültige Wert wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{RLU_{Firefly}(\text{transfizierte Zellen}) - RLU_{Firefly}(\text{untransfizierte Zellen})}{RLU_{Renilla}(\text{transfizierte Zellen}) - RLU_{Renilla}(\text{untransfizierte Zellen})}$$

3.8.2 Electromobility shift assay

Die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit Promotorstrukturen wurde durch Electromobility Shift Assay (EMSA) analysiert. Hierfür wurden 20-35 bp lange, komplementäre gelgereinigte Oligonucleotide zunächst 5 min bei 95° C denaturiert und durch langsames Abkühlen zu doppelsträngigen DNA-Fragmenten hybridisiert. Durch Endlabeling mit T4-Kinase und $\gamma[^{32}P]$-ATP wurden diese radioaktiv markiert:

2 pmol/µl Doppelstrang-DNA
10 U T4-Kinase
75 µCi $\gamma[^{32}P]$-ATP [3000 Ci/mmol]
in 25 µl 1x Kinasepuffer
30-60 min 37° C

Das nicht inkorporierte ATP und die Kinase wurden über ein QIAquick Oligonucleotide Purification Kit abgetrennt, die markierte DNA in Wasser gelöst.

Die Bindereaktion erfolgte mit ca. 25 nmol radioaktiver DNA und 8 µg Kern-Proteinextrakt in 12,5 µl 1x Bindepuffer für ca. 30 min bei RT.

10x Bindepuffer:	100 mM Tris-HCl pH 7,5
	500 mM NaCl
	1 mM DTT
	1 mM EDTA
	50% Glycerin
	10 mM MgCl2
	500 mM KCl

Zur Vermeidung unspezifischer Protein-DNA-Bindung wurde diesem Ansatz 1 µg poly [dI—dC]*[dI—dC] zugefügt.
Für Kompetitionsstudien wurden außerdem 1-1000fache Mengen unmarkierter Oligo-DNA eingesetzt, teilweise mit variierten Sequenzen. Nach Ablauf der Bindezeit wurde der Ansatz mit 1 µl Bromphenolblau in 1x Bindepuffer versetzt und über ein natives Acrylamidgel aufgetrennt. Dabei wurde je nach Oligonucleotid-Länge ein 4 bis 5%iges Gel (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1) in Low ionic strength Puffer verwendet.
Anschließend wurde das Gel getrocknet und ein Autoradiogramm auf Röntgenfilm erzeugt.

Low ionic strength Puffer:	1 mM EDTA
	3,3 mM Na-Acetat
	6,7 mM Tris-HCl pH 7,5

3.8.3 Footprint assay

Durch Footprint Assays sollten DNA-Sequenzen indentifiziert werden, die durch Proteinbindung räumlich vor enzymatischem Abbau geschützt sind.
Eingesetzt wurden hierzu 100 bis 300 bp lange Doppelstrang-DNA-Fragmente mit einem endmarkierten Strang. Als besonders praktikabel erwiesen sich säulengereinigte PCR-Produkte, die durch Einsatz eines markierten und eines unmarkierten Primers erzeugt wurden (Endlabeling von Oligos Kap. 3.8.2).

Für den Bindungsassay wurden zunächst in einem 50 µl-Ansatz 10-50 µg Zellkern-Protein und 2 µg poly[dI—dC]*[dI—dC] in 1x Bindepuffer 10 min auf Eis vorinkubiert, um unspezifische Proteinbindungen an die markierte DNA zu vermeiden. Pro Ansatz wurden dann >50 000 cpm DNA zugefügt und 10 bis 20 min bei RT inkubiert.

10 x Bindepuffer:	100 mM Tris-Cl pH 7,5
	500 mM NaCl
	25 mM $MgCl_2$
	5 mM DTT

Durch Zugabe von 1-10 µg DNase I in DNase-Puffer wurde der Verdau gestartet und nach exakt 1 min bei RT durch Zugabe von 90 µl Stop-Puffer gestoppt.

DNAse-Puffer:	10 mM Tris-Cl pH 7,5
	10 mM $CaCl_2$
	10 mM $MgCl_2$
	50 % Glycerin

Stop-Lösung:	200 mM NaCl
	30 mM EDTA
	1% SDS (w/v)
	100 µg/ml Hefe-RNA

Durch zweimalige Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die Proteine aus der Mischung entfernt, die DNA wurde mit 400 µl 100 % Ethanol auf Trockeneis gefällt und 1x mit 100 µl Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 3 µl Ladepuffer aufgenommen, 4 min bei 95° C denaturiert und über ein 8 %iges denaturierendes Acrylamidgel mit 7 M Harnstoff in TBE aufgetrennt.

Ladepuffer:	100 mM NaOH
	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylencyanol
	80 % Formamid (v/v)

Als Größenstandard diente eine G+A-Sequenzreaktion nach Maxam und Gilbert [98]:
Hierzu wurden 3-6 ng markierter DNA mit 1 µg Calf Thymus DNA in einem Volumen von 10 µl mit 1 µl 4% Ameisensäure versetzt und bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf von 25 min wurden 150 µl 1M Piperidin zugefügt. Der Ansatz wurde für 30 min auf 90° C erhitzt, mit 1 ml n-Butanol gefällt und in 5-10 µl Ladepuffer aufgenommen.
Die Elektrophorese erfolgte bei 50 W für 2-5 h. Das Gel wurde anschließend getrocknet und ein Autoradiogramm ü. N. bei –80° C erzeugt.

3.9 Physiologische und biochemische Messungen

3.9.1 Cytochromoxidase-Assay

Die Aktivität der endogenen Cytochrom-Oxidase in kultivierten Zellen wurde photometrisch bestimmt. Zur Messung der Enzymaktivität wurde 60 µM reduziertes Cytochrom C in Phophatpuffer eingesetzt. Die Reduktion des Cytochrom C erfolgte durch Zugabe von kleinen Mengen 0,02 M Na-Dithionit, bis der Extinktionsquotient E_{550}/E_{565} größer als 6 war, das Dithionit wurde durch anschließende Reinigung über eine Sephadex (G50)-Säule entfernt.

Pro Ansatz wurde eine 10 cm-Schale erst mit PBS-Puffer und dann mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl Phosphatpuffer abgeschabt und durch Sonifizierung aufgeschlossen (10 s, je 0,2 s Puls, 0,6 s Pause). Zelltrümmer wurden durch 5 min Zentrifugation bei 2000 g abgetrennt und die Proteinkonzentration des Überstandes kolorimetrisch bestimmt.

Je 10 und 30 µl Überstand wurden im Photometer mit 290 µl bzw. 270 µl Cytochrom C-Lösung gemischt und sofort die Absorption bei 550 nm bestimmt. Als relative Aktivität wurde ΔE/min bestimmt.

3.9.2 Sauerstoff-Verbrauch

Der Sauerstoff-Verbrauch kultivierter Zellen mit endogenen Substraten wurde mit Hilfe einer O_2-Elektrode leicht modifiziert nach Scarpulla et al. bestimmt [76].
Je nach Zelldichte wurden die Zellen von 1-3 16 cm-Schalen mit angewärmten PBS-Puffer mehrfach gewaschen, vorsichtig abgeschabt und bei 1000 g abzentrifugiert.
Das Pellet wurde in 250 µl O_2-Puffer resuspendiert; 20 µl wurden zur späteren Bestimmung des Proteingehalts eingefroren, 200 µl zu 500 µl äquilibriertem Puffer in die Meßkammer der Elektrode gegeben.

O_2-Puffer: 30 mM Tris-HCl pH 7,4
75 mM Saccharose
50 mM KCl
0,5 mM EDTA
0,5 mM $MgCl_2$
2 mM K_3PO_4
10 mM BDM (zum Relaxieren der Myotuben)

Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration wurde zunächst ohne Zusätze gemessen, dann wurde durch Zugabe von 5 mM CCCP die Atmung der Zellen vom der ATP-Syntheserate entkoppelt. Durch Zugabe von 1 mM KCN wurde die Atmung der Zellen blockiert und die unspezifische Sauerstoff-Abnahme ermittelt.

3.9.3 Quantifizierung von DNA-, RNA- und Proteinmengen

Das Verhältnis von RNA und Protein zu DNA in kultivierten Zellen wurde durch Perchlorsäure-Extraktion bestimmt.

Eine 6 cm-Schale wurde 2-3x mit eiskaltem H_2O bidest gespült, überschüssiges Wasser abgesaugt. Durch Zugabe von 1 ml kalter 1 M Perchlorsäure wurden die Zellen denaturiert und anschließend abgeschabt.

Die Suspension wurde 1 min bei 20 000 g und 4° C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml PCA und einer Spatelspitze Seesand 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Der Überstand nach 1 min Zentrifugation wurde erneut verworfen, das Pellet in 1,3 ml PCA resuspendiert.

Durch 30 min Inkubation bei 80° C wurden DNA und RNA hydrolysiert, der verbleibende Proteinrückstand wurde abzentrifugiert, in 1 ml 1 M NaOH gelöst und die Proteinkonzentration kolorimetrisch bestimmt.

Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde zur Bestimmung von DNA- und RNA-Mengen nach Schneider eingesetzt [99].

Je 0,5 ml Überstand wurden mit 150 µl Orcinol und 0,5 ml $FeCl_3$ gemischt und in einem Reagenzglas 45 min in kochendem Wasser inkubiert. Als Nullwert und Standard dienten 1 M PCA und 100 µg/ml tRNA in PCA. Die Absorption bei 660 nm wurde zur Berechnung der RNA-Konzentration genutzt.

Die Konzentration der hydrolysierten DNA wurde durch Reaktion von 250 µl Überstand mit 500 µl frischem Diphenylamin-Reagens für 10 min bei 100° C und anschließende Absportionsmessung bei 660 nm bestimmt. Als Nullwert diente 1 M PCA, als Standards wurden 1-15 µg Lachsspermidin-DNA in 250 µl PCA verwendet.

3.9.4 Messung endogener Metabolite des Energiestoffwechsels

Der Gehalt von ATP, ADP, AMP und Creatinphosphat in kultivierten Zellen wurde durch HPLC-Auftrennung und durch enzymatische Messungen bestimmt.

Hierzu wurden 10 cm-Schalen mehrfach mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und die Zellen dann in 0,5 ml 0,6 M Perchlorsäure lysiert (mind. 150 µg Zellprotein/ml Perchorsäure). Das ausgefällte Protein wurde abgeschabt, die Perchlorsäure-Protein-Suspension quantitativ in ein Reaktionsgefäß überführt und 15 min bei 4° C und 20 000 g abzentrifugiert.

Das resultierende Pellet wurde durch Zugabe von 1 M KOH neutralisiert, in TOTEX-Puffer gelöst und die Proteinkonzentration kolorimetrisch bestimmt. Der Überstand wurde mit ca. $^1/_{10}$ Vol 5M KOH neutralisiert, ausfallendes $KClO_4$ abzentrifugiert und der Überstand bis zur Messung bei -80° C eingefroren. Die Messung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Medizin der Unikliniken Köln unter der Leitung von Prof. Dr. Fischer.

3.10 Mikroskopische Verfahren

3.10.1 Elektronenmikroskopie

Die Anzucht von kultivierten Zellen für elektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgte auf Aclar®-Folie, die Fixierung wurde für >1 h in DMEM + 1,5 % Cacodylat und 6 % Glutaraldehyd bei RT durchgeführt. Die Schnitte und Aufnahmen wurden von Prof. Neiss im Anatomischen Institut der Unikliniken Köln durchgeführt.

3.10.2 Immuncytochemie

Immuncytochemische Aufnahmen von Zellkulturen wurden mit paraformaldehyd-fixierten Zellen angefertigt. Hierzu wurden die Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen angezogen, mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen und 10 min bei 37° C in 2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach der Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 3 min bei 37° C erfolgte ein Blockierungsschritt für 1 h in 4 % Milchpulver in PBS.

Die Zellen wurden für 1 h mit Erstantikörper in PBS behandelt, dann für >30 min mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper in PBS.

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen mehrfach für einige Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Die leicht angetrockneten Deckgläschen wurden mit Mowiol auf einen Objektträger eingedeckt und ü. N. bei RT getrocknet [100].

Mowiol: 2,4 g Mowiol 4-88
6 g Glycerin
6 ml H_2O
12 ml 0,2 M Tris pH 8,5
2,5 % 1,4-diazobicyclo-(2.2.2)-octane DABCO

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Zell-Linie C2F3

Zunächst wurde die Eignung der Zell-Linie C2F3 als Modell für die Differenzierung von Skelettmuskulatur überprüft. Hierzu wurden einige physiologische und biochemische Parameter der Zellen vor, während und nach der Differenzierung analysiert, die Aufschluß über die Funktion und Biogenese der Mitochondrien geben sollten.

4.1.1 Differenzierung der Zellen

Um einschätzen zu können, welcher Prozentsatz der Zellen einer Kultur unter den eingesetzten Bedingungen differenziert, wurden Zellen einer differenzierten Kultur durch Immuncytochemie gefärbt. Als Differenzierungsmarker wurde Myogenin verwendet, da Satellitenzellen und Myoblasten diesen muskelspezifischen Transkriptionsfaktor nicht exprimieren, differenzierte Muskelzellen jedoch in hohem Maße.
Myogenin-haltige Zellkerne wurden durch Antikörperfärbung mit CY3 fluoreszenzmarkiert. Eine unspezifische Anfärbung aller Zellkerne erfolgte durch den DNA-Farbstoff DAPI. In der Regel waren 65-75 % der Zellkerne einer differenzierten Myotubenkultur Myogenin-positiv.

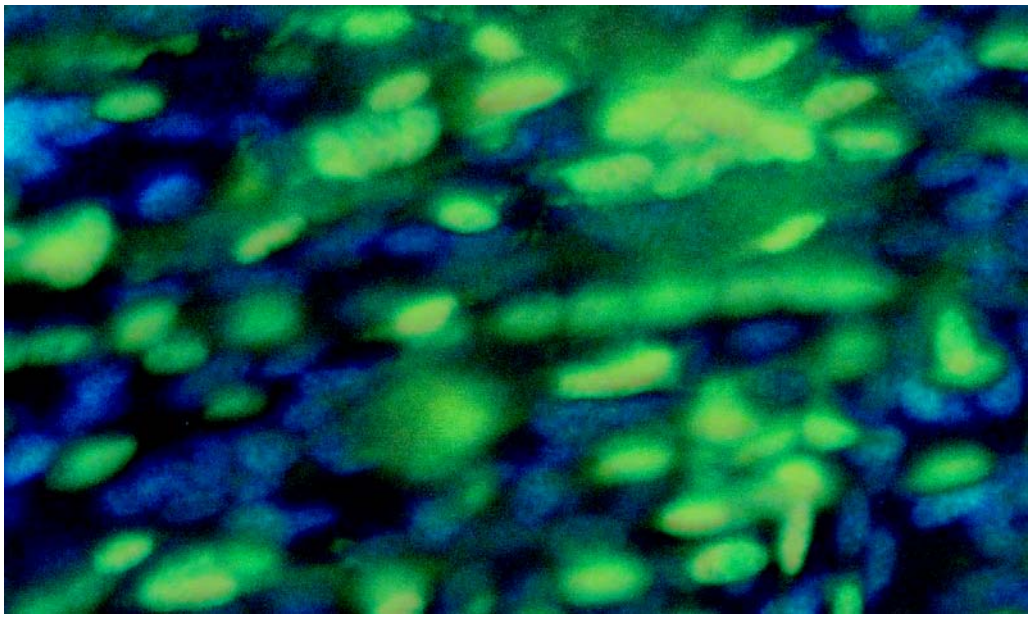


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie von differenzierten Myotuben. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen anti-Myogenin-Antikörper, einem Alexa-488-markierten anti-Maus-Zweitantikörper und 300 µM DAPI

4.1.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Eine Untersuchung der Zellorganisation von Myoblasten und Myotuben durch Elektronenmikroskopie sollte klären, ob auffällige Veränderungen der Lokalisation, Größe und Struktur der Mitochondrien mit dem erhöhten Energieumsatz der Mitochondrien einhergehen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildungen 7 und 8) zeigten sowohl in Myoblasten als auch in Myotuben eine verstärkte Lokalisation der Mitochondrien in der Umgebung des Zellkerns. Die Form der Mitochondrien blieb unverändert schlauchförmig, allerdings waren sowohl die Anzahl der Mitochondrien als auch die Dichte der Cristae innerhalb der Mitochondrien in Myotuben etwas erhöht. Auffällig war das ausgeprägte endoplasmatische Reticulum in Myotuben, das in dieser Form bisher nur bei sekretorischen Zellen beschrieben wurde. Die Funktion dieses Sekretionsapparates in Myotuben ist unbekannt.

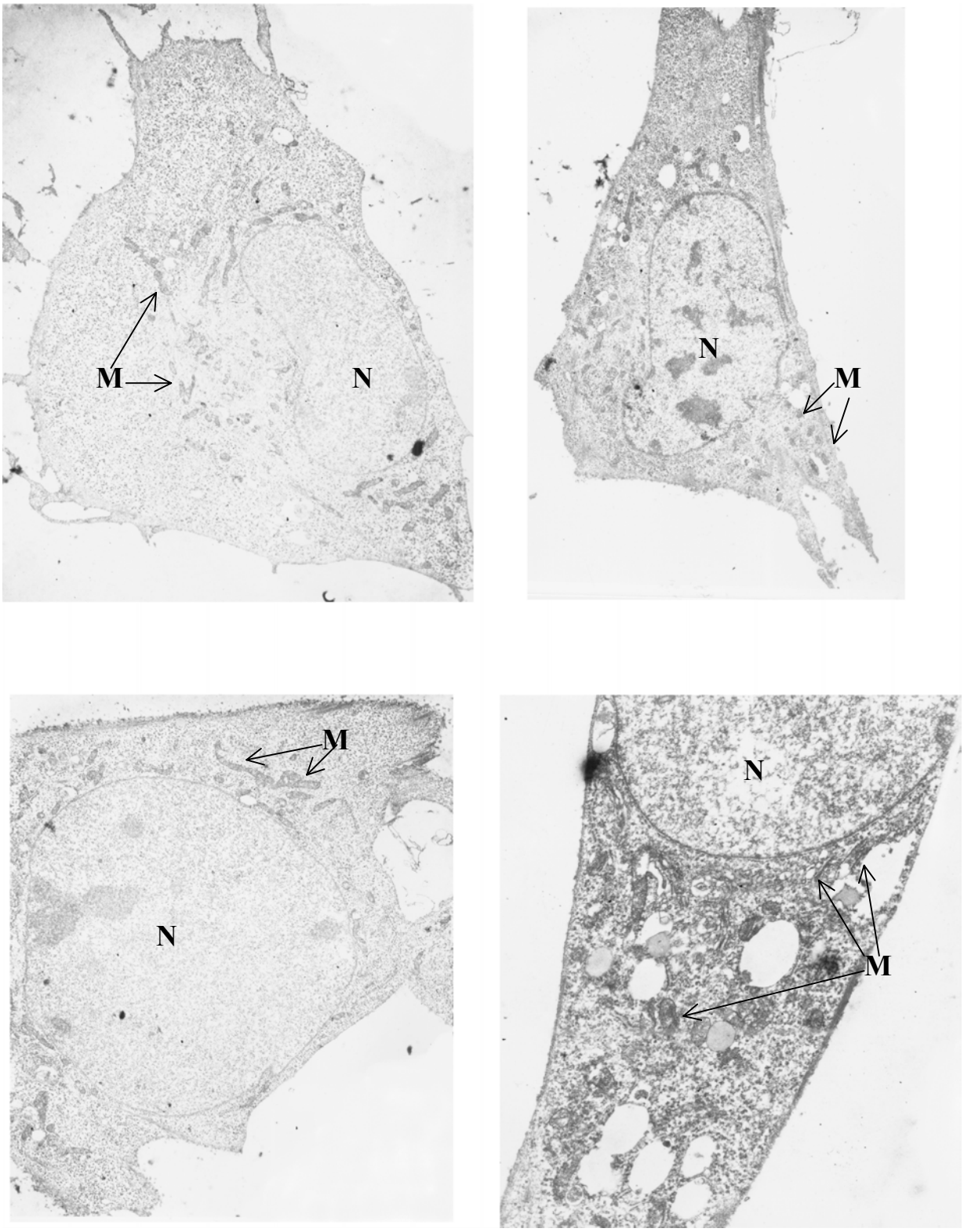


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fixierten Myoblasten (N=Nucleus, M=Mitochondrium, ER= Endoplasmatisches Reticulum)

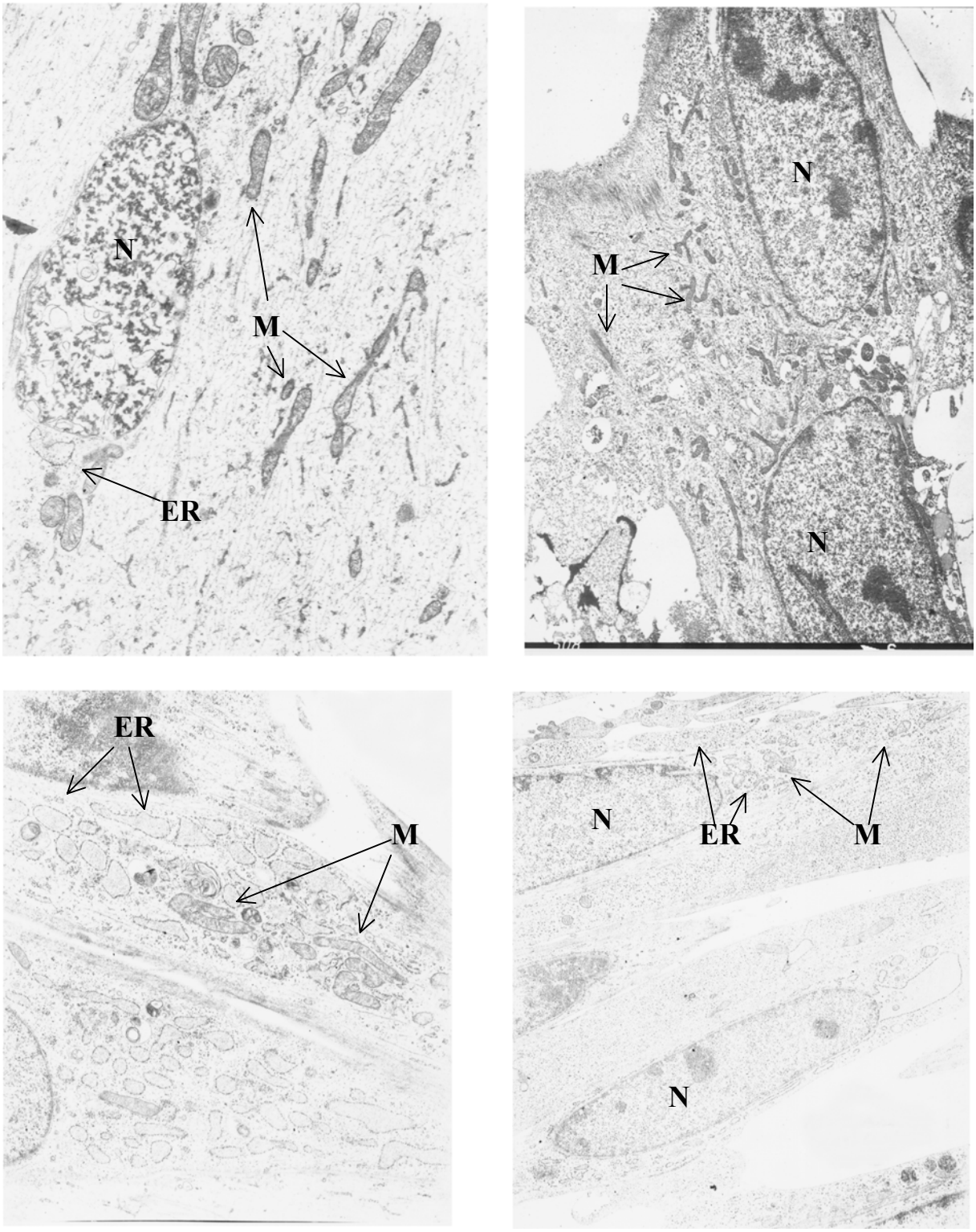


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von differenzierten Myotuben (N=Nucleus, M=Mitochondrium, ER= Endoplasmatisches Reticulum)

4.1.3 Metabolitgehalt der Zellen

Durch HPLC-Analyse konnte in Myoblasten und Myotuben der Gehalt einiger Metabolite bestimmt werden, die direkt am Energiestoffwechsel beteiligt sind. Untersucht wurden die Konzentrationen an ATP, ADP, AMP und, da es sich um Muskelzellen handelt, Creatinphosphat und Lactat.

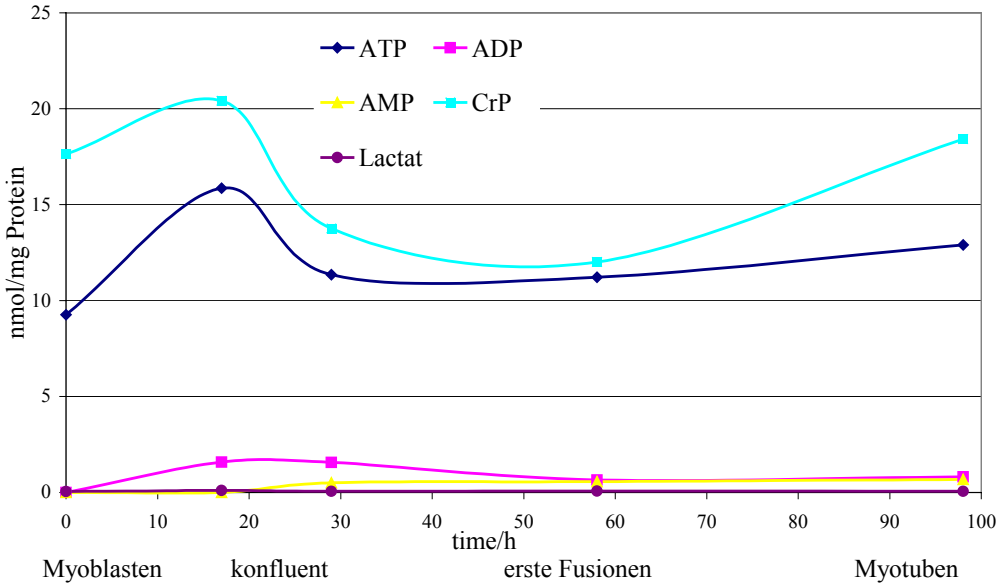


Abbildung 9: Konzentration einiger Metabolite während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben. Angegeben sind die Konzentrationen bezogen auf den Proteingehalt der Zellen (n=5).

Die Konzentration von ATP steigt in konfluenten Myoblasten zu Beginn der Differenzierung deutlich an, mit einsetzender Fusionierung sinkt sie wieder auf 120% des Myoblasten-Wertes. Parallel zum Anstieg von ATP nimmt auch der Gehalt an ADP deutlich zu, nimmt aber mit fortschreitender Differenzierung wieder etwas ab. Die Konzentration an AMP, das in Myoblasten nicht nachweisbar ist (Nachweisgrenze 0,05 nmol/mg Protein), steigt mit einsetzender Fusionierung auf 2 nmol/mg Protein an und bleibt auch in Myotuben auf diesem Niveau. Die Konzentration an Creatinphosphat verhält sich während der Differenzierung zunächst ähnlich wie die ATP-Konzentration, steigt mit zunehmendem Alter der Myotuben aber wieder an. Während der gesamten Differenzierungsphase bleibt die Konzentration an Lactat in den Zellen auf sehr niedrigem Niveau.

Zur Kontrolle der erhaltenen HPLC-Werte wurden die Proben gepoolt und enzymatischen Tests unterworfen. Die Ergebnisse bestätigten die HPLC-Daten.

4.1.4 Protein- und RNA-Gehalt der Zellen

Während der Verschmelzung der Myoblasten zu vielkernigen Synzytien findet, auch optisch sichtbar, eine Vergrößerung des Zellvolumens statt.
Durch Bestimmung des DNA-, RNA- und Proteingehalts von Myoblasten und Myotuben konnte diese Steigerung der Transkription und der Proteinbiosynthese quantifiziert werden.

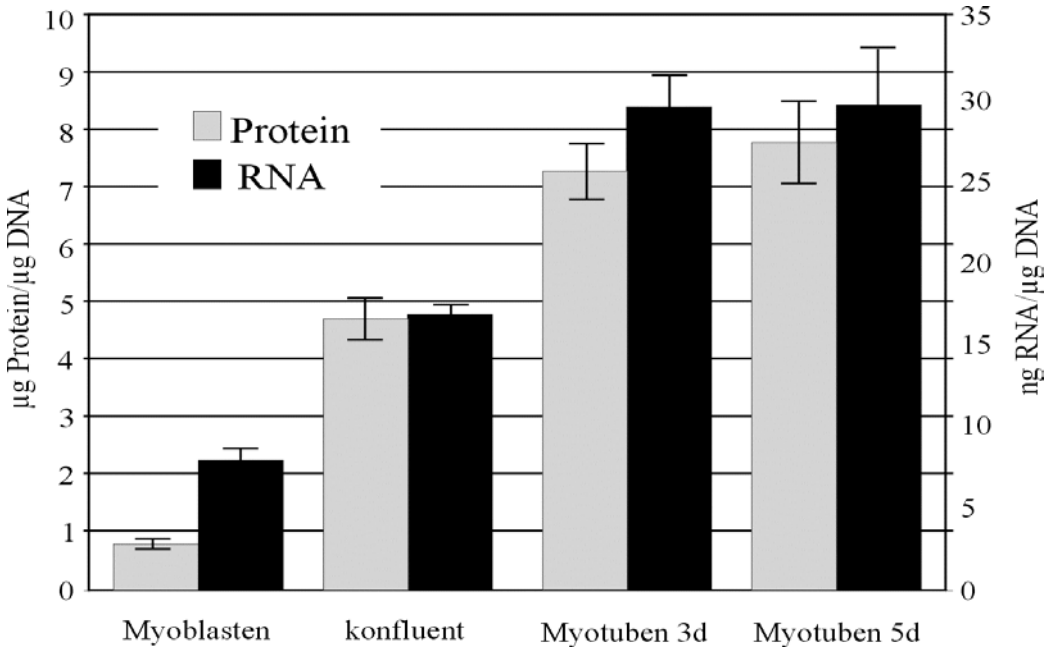


Abbildung 10: Verhältnis von RNA und Protein zu DNA in Myoblasten, differenzierenden Zellen und Myotuben (n=5)

Schon in konfluenten Zellen steigt der Gesamt-RNA-Gehalt pro DNA auf das 6,4-fache von subkonfluenten Myoblasten an; in differenzierten Myotuben beträgt der RNA-Gehalt das Zehnfache des Myoblastenwertes. Der Gehalt an Protein pro DNA ist in konfluenten Zellen doppelt so hoch wie in Myoblasten, in Myotuben 3,7 fach erhöht.
Diese Werte wurden im Nachfolgenden als Grundlage verwendet, wenn Daten pro RNA- oder Proteingehalt bestimmt wurden. Die Normierung der Daten auf den DNA-Gehalt der Zellen erfolgte durch Umrechnung der gemessenen RNA- oder Proteinkonzentration auf den zu erwartenden DNA-Gehalt.

4.1.5 Sauerstoff-Verbrauch

Der Sauerstoff-Verbrauch der kultivierten Zellen wurde durch eine Sauerstoff-Elektrode bestimmt und auf den Proteingehalt normalisiert. Gemessen wurde der Umsatz endogener Substrate in nicht-permeabilisierten Zellen, als Referenz diente die Abnahme der Sauerstoffkonzentration nach KCN-Inhibition.

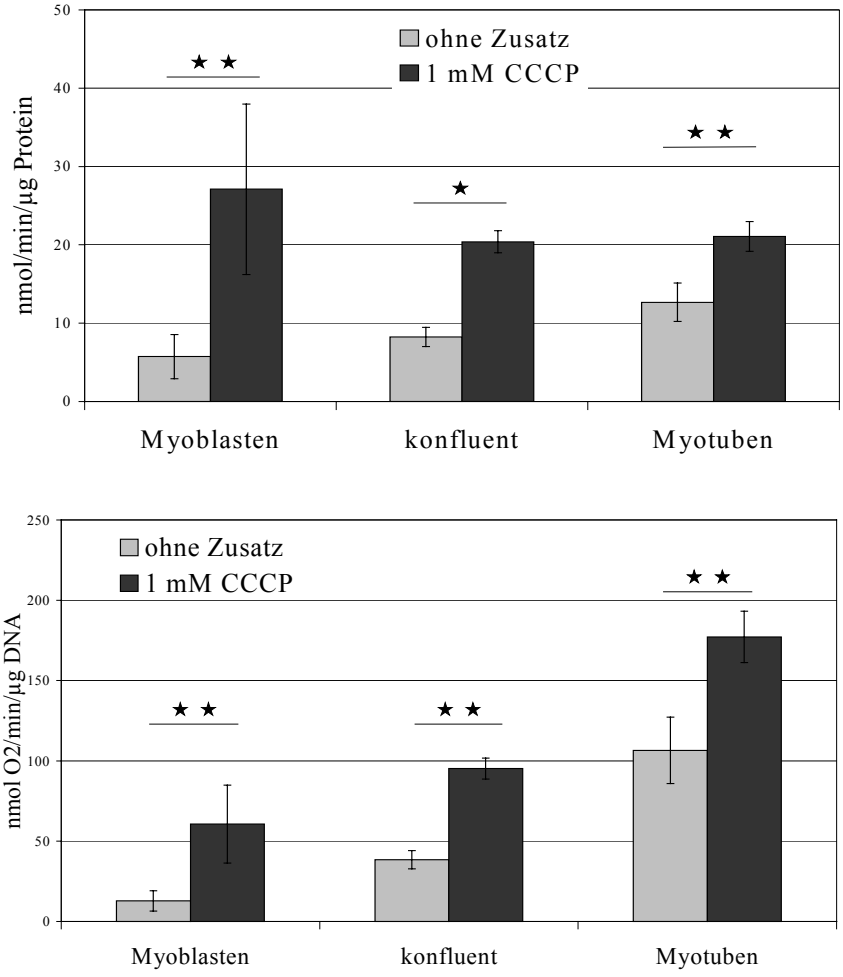


Abbildung 11: Sauerstoffverbrauch von Myoblasten, differenzierenden Zellen und Myotuben. Gemessen wurde der Sauerstoffverbruach pro Zeit in intakten Zellen mit endogegen Substraten. Durch Zugabe des Ionophors CCCP wurde der maximale Sauerstoffverbrauch bei Entkopplung des Elektronentransportkette von der ATP-Synthese gemessen. Die Normalisierung erfolgte auf den Protein- bzw. DNA-Gehalt der Zellen.
(n=6, ★ entspricht $p<0,05$, ★★ entspricht $p<0,01$, t-Test)

Der Sauerstoffkonsum der Zellen steigt während der Differenzierung kontinuierlich an. Auf den Proteingehalt der Zellen bezogen verbrauchten Myotuben ca. doppelt so viel Sauerstoff wie Myoblasten. Auf den DNA-Gehalt der Zelle umgerechnet setzen sie die 8,3fache Menge Sauerstoff gegenüber Myoblasten um. Durch Zusatz von 1 mM des Ionophors CCCP von der ATP-Synthase entkoppelt, verfünffacht sich in Myoblasten der Sauerstoffumsatz, während Myotuben mit CCCP nur den 1,6fachen Wert der gekoppelten Atmung aufweisen.

4.1.6 Aktivität der Cytochrom C-Oxidase

Zum Vergleich des Sauerstoffumsatzes der Zellen mit der maximalen Elektronentransport-Kapazität der Atmungskette wurde die gut quantifizierbare Enzymaktivität der Cytochrom C-Oxidase in Zell-Lysaten bestimmt. Die Messung erfolgte durch photometrische Bestimmung der Oxidationskinetik von reduziertem Cytochrom C und Normierung auf den Proteingehalt der eingesetzten Lysate.

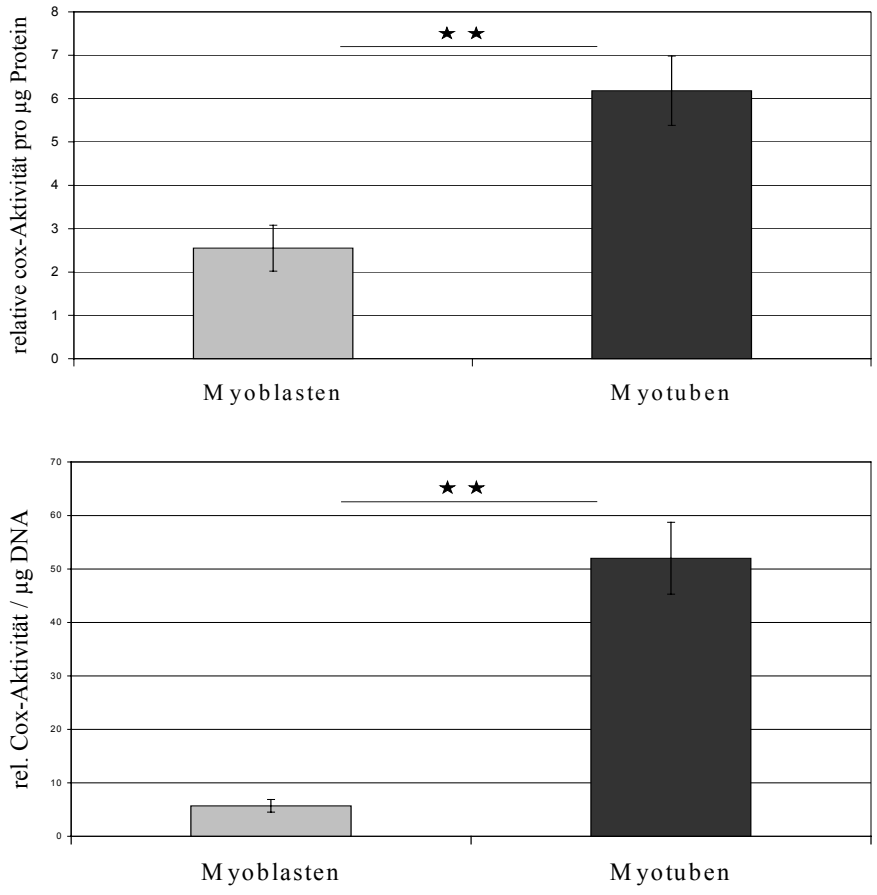


Abbildung 12: Relative Cox-Aktivität in Myoblasten und Myotuben
Bestimmt wurde die maximale Enzymaktivität der Cytochrom C-Oxidase in sonifizierten Zellen bei Überschuß an reduziertem Cytochrom C, die Normalisierung erfolgte auf den Protein- bzw. DNA-Gehalt der Extrakte. (n=5, ★★ entspricht $p<0,01$, t-Test).

Die Aktivitätsbestimmung bestätigte die Ergebnisse der Sauerstoff-Verbrauchsmessung.
Die Cytochromoxidase-Aktivität pro Protein war in Myotuben um den Faktor 2,5 erhöht, auf den DNA-Gehalt bezogen sogar um den Faktor 9. Da die Messung mit zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen an Zell-Lysat und Cytochrom C die gleichen Enzymaktivitätsraten ergaben, ist davon auszugehen, daß keine Substratlimitierung durch endogene Elektronen-akzeptoren auftritt und die bestimmte Rate die maximale Enzymaktivität des Cytochromoxidase-Komplexes darstellt.

4.1.7 Proteingehalt

Zur Bestätigung, daß die Zunahme des Sauerstoffumsatzes wirklich durch eine gesteigerte Mitochondrienbiosynthese und damit eine Zunahme der Mitochondrienmasse bedingt wird, wurden die Mengen einiger kerncodierter mitochondrialer Proteine in Gesamtproteinextrakten durch Western Blot bestimmt.
Analysiert wurden Cytochrom C und die Untereinheit IV der Cytochromoxidase als Strukturproteine der Atmungskette und der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (mtTFA) als essentieller Bestandteil des Transkriptionsapparates (Abbildung 13).
Die Quantifizierung der Western Blots ergab für CytC, CoxIV und mtTFA eine Zunahme zwischen 20 bis 50 % verglichen mit dem Gesamtproteingehalt der Extrakte. Auf den DNA-Gehalt einer Zelle bezogen ist dies allerdings eine Steigerung um den Faktor 7 bis 9.

4.1.8 RNA-Gehalt

Die Frage, ob die Steigerung der Proteingehalte durch die in Myotuben aktivierte Proteinbiosyntheserate oder durch erhöhte RNA-Mengen verursacht wird, wurde durch Northern Blot Analyse einiger RNA-Spezies untersucht (Abbildung 14).
Auf die RNA-Gesamtmenge bezogen war nur eine schwache Zunahme der analysierten messenger-RNAs nachzuweisen. Die Transkripte für *cytC* nahmen um ca. 80 % zu, während die Steigerung für *coxIV* und *mtTFA* nur 45 bzw. 25 % betrug.
Normiert man die RNA-Gehalte allerdings auf die DNA-Menge, also auf die Transkriptionsrate pro Genkopie, betrugen die RNA-Mengen in Myotuben das fünf- bis achtfache der in Myoblasten detektierten Mengen.

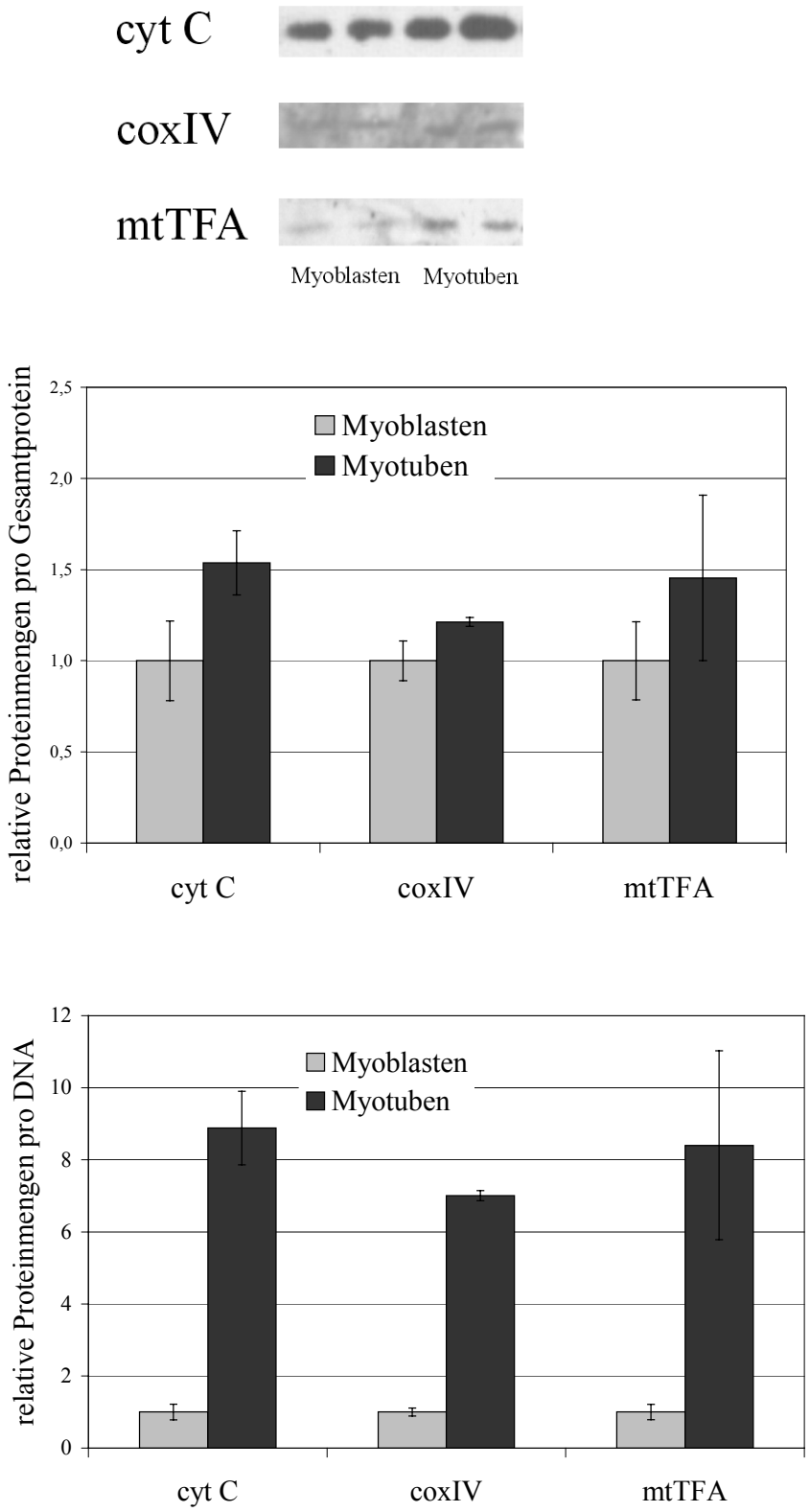


Abbildung 13: Relative Proteinmengen von Cytochrom C, CoxIV und mtTFA in Gesamtproteinextrakten von Myoblasten und Myotuben. Die Proteine wurden durch Western Blots quantifiziert und auf den Gesamtprotein- bzw. DNA-Gehalt bezogen (n=4).

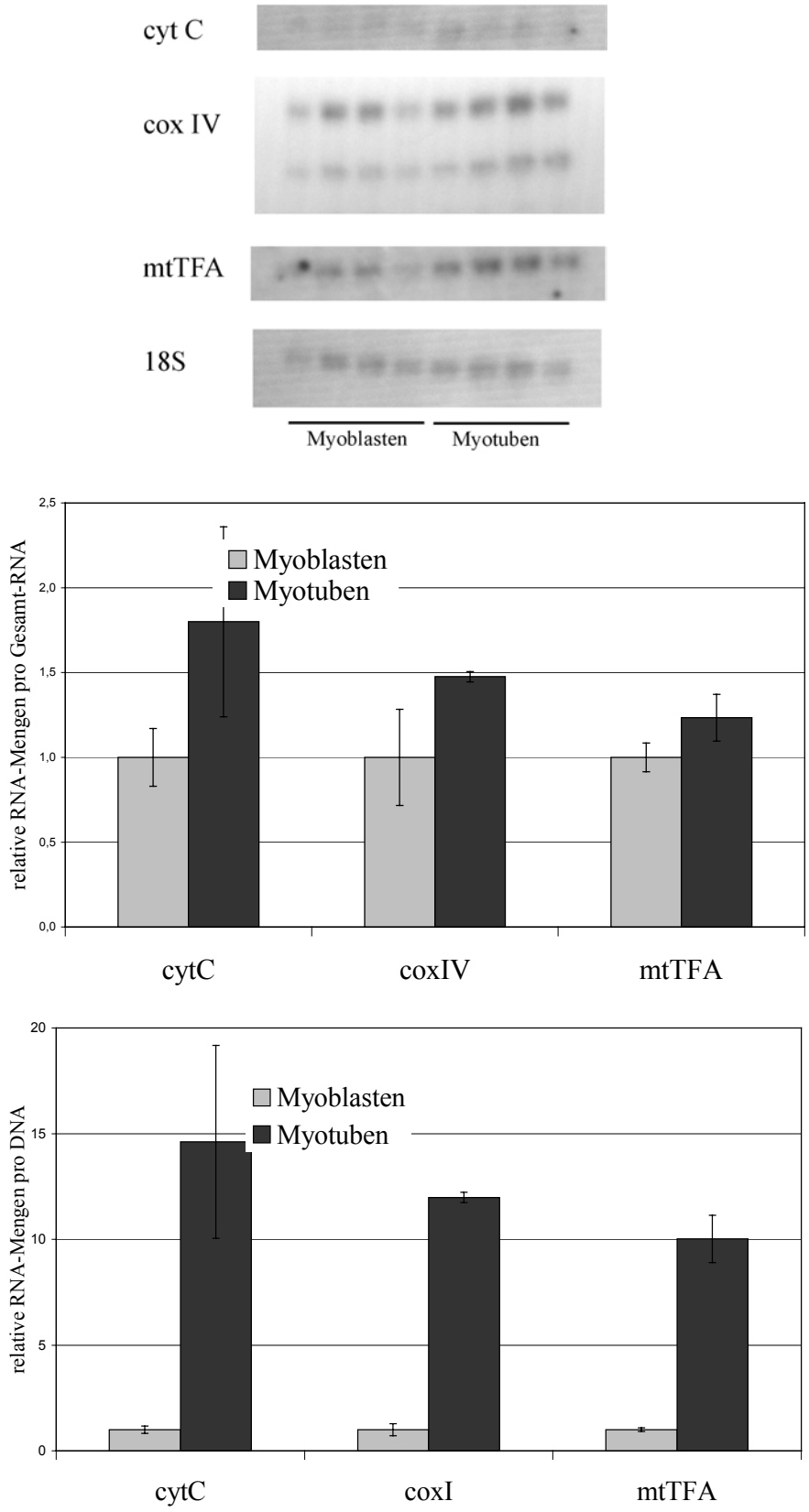


Abbildung 14: Relativer mRNA-Gehalt von *cytC*, *coxIV* und *mtTFA* in Gesamt-RNA-Extrakten von Myoblasten und Myotuben. Die mRNA-Spezies wurden durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden auf einem Northern Blot quantifiziert und auf den 18S-Gehalt bzw. den DNA-Gehalt der Zellen bezogen.

4.2 Analyse der Promotor-Regulation

Die Untersuchungen im ersten Teil dieser Arbeit gaben Anlaß zur Hypothese, daß die Steigerung der mitochondrialen Atmung in ausdifferenzierten Muskelzellen auf der Ebene der Genexpression der an der Mitochondrienbiosynthese beteiligten Gene verursacht wird.
Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Regulation wurden Promotorstudien an den drei bereits auf RNA-Ebene untersuchten kernkodierten mitochondrialen Genen *cytC*, *cox IV* und *mtTFA* durchgeführt.

4.2.1 Promotorkarten

Zur Analyse der Promotorstrukturen wurden die Sequenzen der Promotoren von *cytC* und *coxIV* aus *Rattus norvegicus* gewählt, da sie bereits in mehreren Zellmodellen untersucht wurden und die Sequenzen aus Maus noch nicht zur Verfügung standen.
Da die Sequenz des *mtTFA*-Promotors weder von Ratte noch von Maus zur Verfügung stand, wurde im Folgenden der Promotor des humanen *mtTFA* analysiert.
Zunächst wurden die Promotoren der drei Gene nach potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungssequenzen durchsucht. Für jeden Promotor wurde ein Bereich zwischen 500 und 800 bp Länge ausgewählt, der den Kernbereich des Promotors enthielt.

Für Cytochrom C wurde die Sequenz zwischen –631 bp und +135 bp gewählt, um alle Elemente einzuschließen, die in bereits untersuchten Zell-Modellen Einfluß besitzen [44, 76, 85]. Hierzu zählen vor allem eine NRF-1-Bindestelle im Bereich zwischen –166 und –149 bp und eine Sp1-Bindestelle im Intronbereich nach dem Transkriptionsstart, die beide an der Aktivierung der *cytC*-Transkription in COS-1-Zellen beteiligt sind. Im Bereich zwischen –139 und –84 liegt eine dritte Region mit zwei CAAT-Boxen, die für die basale Expressionsrate eine Rolle spielt. In Fibroblasten konnte eine Steigerung der *cytC*-Expression durch Serum auf die Aktivierung von NRF-1 und CREB zurückgeführt werden [76].
Die gesamte verwendete Sequenz wurde zunächst auf alle bekannten potentiellen Transkriptionsfaktor-consensus-Sequenzen hin untersucht. Hierzu wurde das Computer-programm *MatInspector* benutzt [101]. Neben einer Vielzahl an consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren der AP-Familie, mehreren Sp1- und CREB-sites (cAMP-responsive element binding site) und anderen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wurden zwei Bindestellen für MyoD gefunden, einem der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren der Myogenin-Familie (Übersichtskarte siehe Anhang).

Der Kernpromotor des *coxIV*-Gens liegt nach einer Analyse in HeLa-Zellen in einem relativ kleinen Bereich um den Transkriptionsstart, aus Vergleichbarkeitsgründen wurde jedoch auch hier eine 800 bp große Sequenz zwischen –675 und +31 gewählt. Auffallend sind hier die tandemartig angeordneten NRF2-Bindungsstellen direkt nach dem Transkriptionsstart, deren Funktionalität in HeLa-Zellen bereits gezeigt wurde [84].
Die Suche nach weiteren consensus-Sequenzen ergab einige potentielle Bindungsstellen für AP1, 2 und 4, außerdem zwei CREB-sites und zwei Sp1-Bindestellen (Karte siehe Anhang).

Bei dem Promotor des *mtTFA*-Gens lag der gewählte Bereich zwischen –414 und +43 bp.
Im direkten Bereich vor dem Transkriptionsstart enthält die Sequenz eine NRF1 site, drei überlappende Sp1-sites und eine Bindungsstelle für NRF2 in Folge. Weiter upstream sind unter anderem consensus-Sequenzen für AP1, 2, 4 und CREB zu finden (Karte siehe Anhang).

4.2.2 Vorüberlegungen zur Auswahl des Reportergenassays

Zur näheren Analyse von Promotorstrukturen sind Reportergenassays ein einfaches, aber aussagekräftiges Mittel. Im einfachsten Fall wird der zu analysierende Promotor in einen Expressionsvektor kloniert und kontrolliert nach transienter Transfektion in Zellen ein Reportergen, dessen Genprodukt in diesen Zellen quantifiziert werden kann.
Als Reportergene werden in der Regel β-Galactosidase, CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase) oder Luciferase eingesetzt, die sich leicht in Enzymassays messen lassen. GFP als Markerprotein wird seltener verwendet, da die quantitative Auswertung von Fluoreszenz technisch aufwendiger ist.
Der Einsatz von β-Galactosidase hat den Vorteil, daß er gut reproduzierbare Daten ergibt, allerdings ist der zugehörige Enzymassay relativ unempfindlich, für niedrige Promotoraktivitäten also weniger geeignet. Eine weiterer Nachteil dieses Assays ist, daß β-Galactosidase in kultivierten Zellen nicht abgebaut wird, über die Zeit also akkumuliert. Hierdurch sind Messungen im Zeitverlauf nicht möglich. Ähnliches gilt für Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT).
Als sehr viel sensitiverer Reporter bietet sich Firefly-Luciferase an. Da die Empfindlichkeit des Luciferase-Assays um mehrere Größenordung unter den Nachweisgrenzen von β-Galactosidase und CAT liegt, sind auch niedrige Transfektionsraten ausreichend. Hierdurch wird einerseits die Überladung der transfizierten Zellen mit dem verwendeten Promotorkonstrukt und damit die Kompetition um DNA-bindende Proteine vermieden, andererseits lassen sich so auch schlecht transfizierbare Zellen beobachten.

Diese Protein hat zudem den Vorteil einer relativ kurzen Halbwerts-Zeit, die experimentell auf ca. 6 h bestimmt wurde. Hierdurch sind Messungen der Promotoraktivität im Zeitverlauf nach der Transfektion möglich. Nachteil des Luciferase-Reportergen-Assays ist die relativ hohe Streuung der Daten, die durch die hohe Sensitivität entsteht und durch eine entsprechend hohe n-Zahl ausgeglichen werden muß.

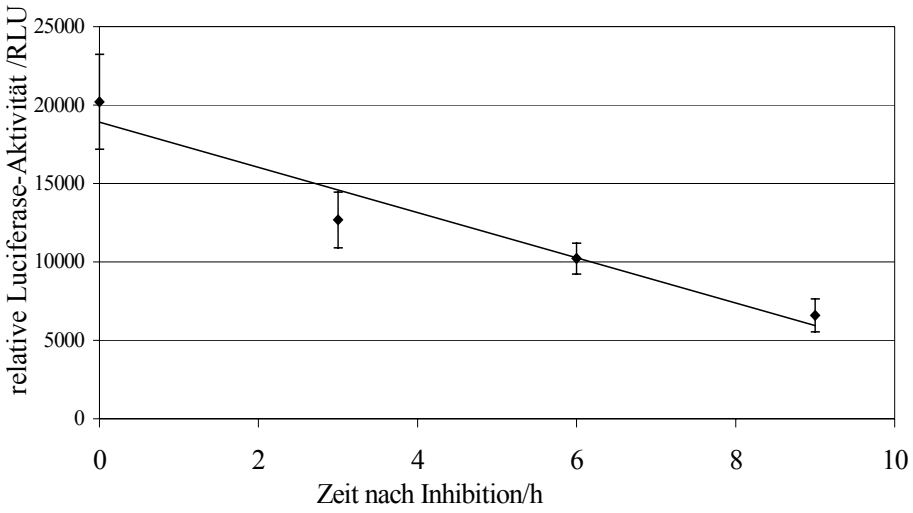


Abbildung 15: Halbwertszeit der Firefly-Luciferase in Myoblasten
Die Enzymaktivität der Firefly-Luciferase in transient Luciferase-exprimierenden Zellen wurde nach Inhibition der Proteinbiosynthese durch 10 µg/ml Cycloheximid im Zeitverlauf bestimmt (n=12).

Zur Optimierung der Transfektionsrate wurde die Transfizierbarkeit der Zellen mit verschiedenen Methoden ($CaPO_4$-Präzipitation, verschiedene kommerzielle Liposomen-reagenzien) und GFP- bzw. β-Gal-Expressionsvektoren getestet. Als besonders geeignet erwies sich die Transfektion mit Fugene-6, da hier bis zu 80 % Transfektionseffizienz in Myoblasten erreicht wurden. Bei Myotuben wurde mit keiner Methode eine nennenswerte Transfektionsrate (>2%) erzielt. Zur Lösung dieses Problems wurde im weiteren getestet, über welchen Zeitrahmen bei transienter Transfektion von Myoblasten der entsprechende Vektor in den Zellen stabil war. Sowohl GFP als auch β-Gal und Luciferase waren 10 Tage nach Transfektion durch Fluoreszenz bzw. Enzymassays nachweisbar. Die Differenzierung der transfizierten Myoblasten zu Myotuben beeinflußte die Expression des Reportergens

nicht, so daß im Folgenden stets Myoblasten transfiziert wurden, die anschließend zu Myotuben differenziert wurden.

Um Schwankungen der Transfektionseffizienz und den Abbau des Plasmids über den Zeitraum der Differenzierung einzubeziehen, wurde als interner Standard ein von viralen Promotoren gesteuerter zweiter Reportergen-Vektor cotransfiziert. Hierbei wurde aus den oben erwähnten Gründen ebenfalls eine Luciferase, die Renilla-Luciferase aus *Renilla reniformes*, eingesetzt, was u. a. den Vorteil bot, beide Reporteraktivitäten in einem Assay messen zu können.

Um auszuschließen, daß die Aktivität des viralen Promotors während der Differenzierung von Muskelzellen eigenen Schwankungen unterliegt und somit als Standard ungeeignet ist, wurden mehrere Meßreihen sowohl mit dem CMV-Promotor als auch mit dem SV40-Promotor analysiert. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse schloß einen Einfluß des zur Normalisierung verwendeten Promotors auf die Daten aus; allerdings waren die Enzymaktivitäten der Firefly-Luciferase bei Cotransfektion mit dem SV40-Promotor um den Faktor 10 niedriger, weshalb im Folgenden ausschließlich der CMV-Promotor als Vergleichsstandard verwendet wurde.

4.2.3 Klonierung der Promotorkonstrukte

Ausgehend von Plasmiden mit den Sequenzen der Promotoren wurden die ausgewählten Bereiche der Promotoren durch PCR und Klonierung in pBSIIKS$^{(+)}$ isoliert. Von jedem Promotor wurden jeweils die gesamte Sequenz und mehrere verkürzte Sequenzen in den Luciferase-Expressionsvektor pGL3 kloniert (Vektorkarten siehe Anhang).

4.2.4 Luciferase-Reportergen-Assay

Myoblasten wurden transient mit den Luciferase-Expressionsvektoren mit den unterschiedlichen Promotorkonstrukten transfiziert und die Luciferase-Aktivität in Myoblasten, konfluenten Zellen und Myotuben bestimmt. Als Promotoraktivität wurde dabei der Quotient der relativen Lichtemission der Firefly-Luciferase durch die Lichtemission der Renilla-Luciferase gewertet. Als Referenz dienten jeweils die Luciferase-Aktivitäten untransfizierter Zellen, die den Werten bei Transfektion des promotorlosen Vektors entsprachen.

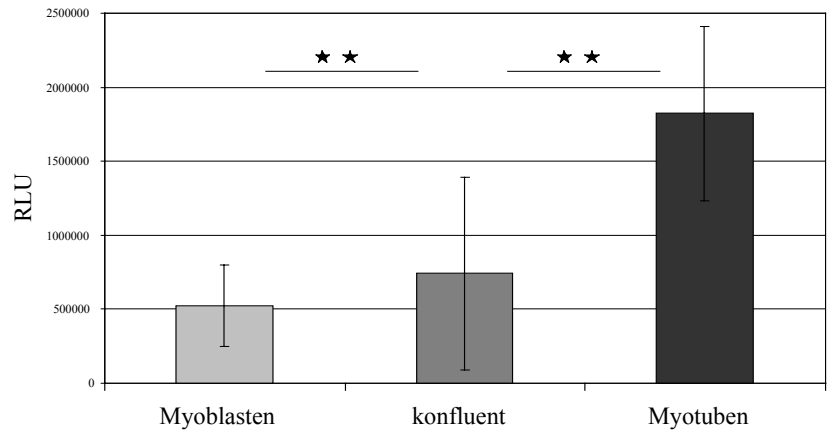


Abbildung 16: Aktivität des *cytC*-Promotors im Luciferase-Assay
Bestimmt wurde das Verhältnis der durch den *cytC*-Promotor regulierten Firefly-Luciferase-Aktivität zur durch den konstitutiv aktiven CMV-Promotor exprimierten Renilla-Luciferase in transient transfizierten Zellen. (n=12, ★★ entspricht p<0,01, t-Test)

Die Aktivität des *cytC*-Promotors änderte sich während der Differenzierung bereits in konfluenten Zellen, hier konnte eine Steigerung der Aktivität um ca. 40 % beobachtet werden. In differenzierten Myotuben stieg die Aktivität der Firefly-Luciferase weiter auf das 3,5fache der Aktivität in Myoblasten, während die Expression der Renilla-Luciferase durch den CMV-Promotor stabil blieb.

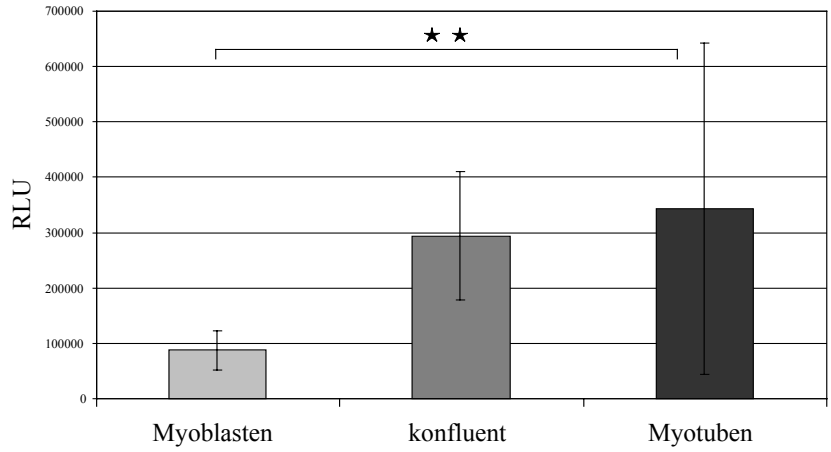


Abbildung 17: Aktivität des *coxIV*-Promotors im Luciferase-Assay
Bestimmt wurde das Verhältnis der durch den *coxIV*-Promotor regulierten Firefly-Luciferase zur konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase.
(n=12, ★★ entspricht p<0,01, t-Test)

Für den *coxIV*-Promotor wurde in konfluenten Zellen eine im Vergleich zu Myoblasten um das 3,4fache gesteigerte Promotoraktivität bestimmt. In Myotuben stieg die Promotoraktivität weiter auf das vierfache.

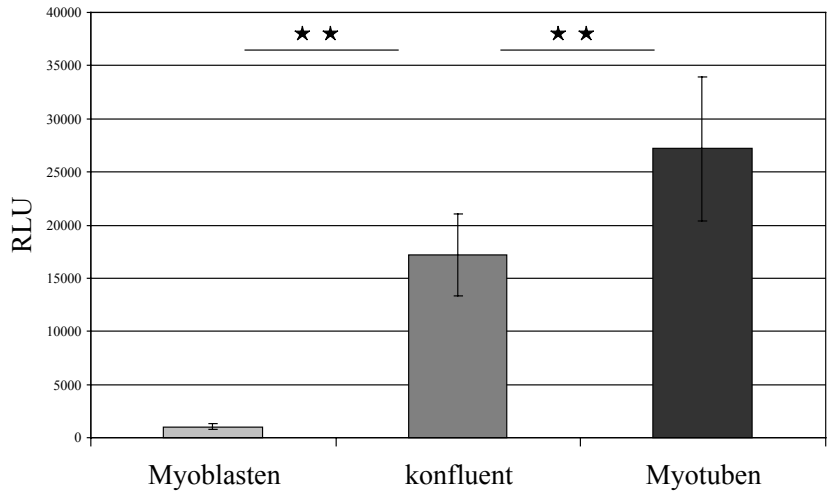


Abbildung 18: Aktivität des *mtTFA*-Promotors im Luciferase-Assay
Angegeben ist das Verhältnis der durch den *mtTFA*-Promotor regulierten Firefly-Luciferase zur konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase. (n=12, ★★ entspricht $p<0,01$, t-Test)

Die Aktivität des *mtTFA*-Promotorfragments nahm bereits in konfluenten Zellen auf das 16,5fache des Wertes in Myoblasten zu. In ausdifferenzierten Myotuben betrug die Aktivtät das 26fache der Myoblasten. In mehreren unabhängigen Experimenten wurde nicht immer eine derart starke Steigerung beobachtet, die Aktivität in Myotuben betrug aber meistens mehr als das 10fache des in Myoblasten bestimmten Wertes.

Zur näheren Identifizierung der Sequenzbereiche, die die Steigerung der Promotoraktivität auslösen, wurden die Promotorsequenzen schrittweise verkürzt und im Reportergen-Assay analysiert und verglichen. Hierbei wurden interne Restriktionsschnittstellen der Sequenzen verwendet (Klonierungsstrategien und Vektorkarten siehe Anhang).
Die Entfernung der proximalen Hälfte der *cytC*-Promotorsequenz hatte kaum Auswirkung auf die Aktivität des Promotors in Myoblasten, es konnte nur eine leichte Zunahme der Aktivität beobachtet werden. Die Entfernung weiterer 85 bp bewirkte einen Abfall der Promotoraktivität auf 8 % der Aktivität des Gesamtpromotors. Das kleinste Fragment umfaßte lediglich den Bereich von –68 bis +135 bp, und besaß eine Restaktivität von ca. 0,1 %.

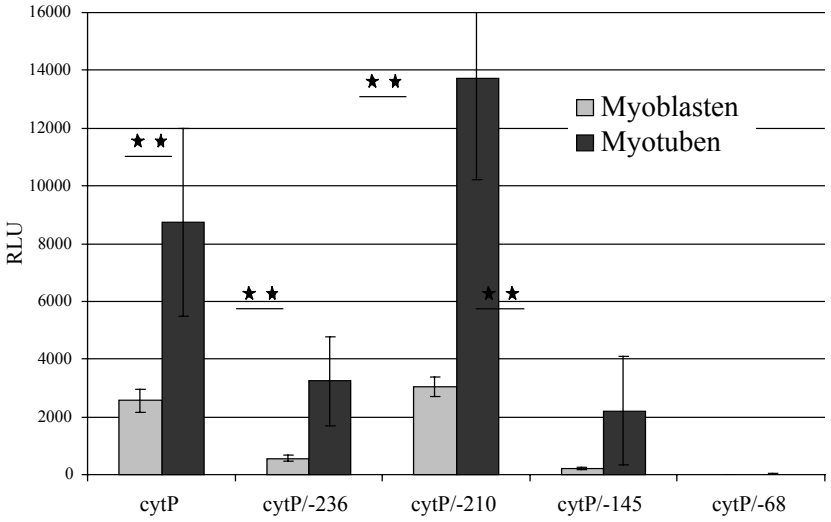


Abbildung 19: Promotorakivität verschiedener *cytC*-Konstrukte in Myoblasten und Myotuben.
Bestimmt wurde das Verhältnis der durch die unterschiedlich verkürzten Promotorsequenzen regulierten Firefly-Luciferase-Aktivität zur konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase (n=12, ★★ entspricht $p<0,01$, t-Test).

Für die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, deren Einfluß auf die Transkription sich während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben ändert, ist die basale Aktivität des Promotorkonstruktes allerdings wenig aussagekräftig. Hier ist vor allem das Verhältnis der Werte in Myotuben und Myoblasten von Interesse.

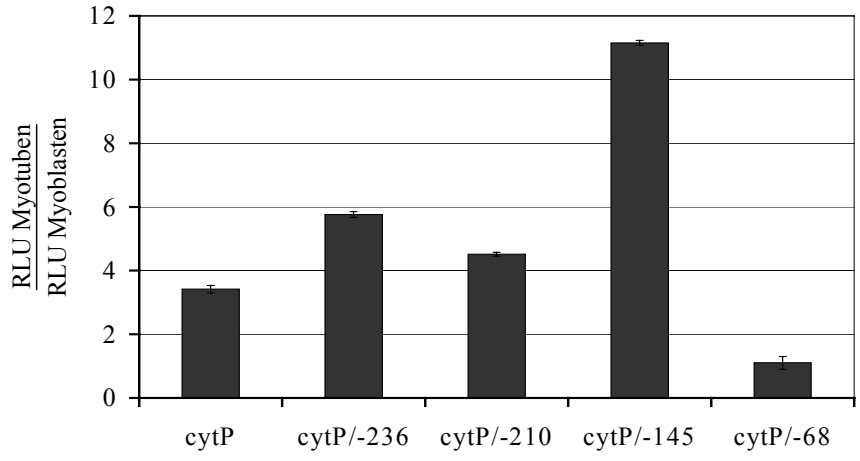


Abbildung 20: Steigerung der Promotoraktivität während der Differenzierung
Dargestellt ist der Quotient der Promotoraktivitäten der untersuchten *cytC*-Promotorkonstrukte in Myotuben und Myoblasten.

Sowohl die Ausgangssequenz als auch die verkürzten Konstrukte *cytP*/-236 und *cytP*/-210 wiesen eine deutliche Aktivierung um den Faktor 3 bis 6 auf. Bei der nächstkürzeren Sequenz *cytP*/-145, deren basale Aktivität in Myoblasten sehr viel niedriger war, war sogar eine Steigerung auf das 11fache in Myotuben zu beobachten. Das kürzeste Fragment, bei dem weitere 77 bp entfernt wurden, wies keine Aktivierung mehr auf; die Myotubenwerte entsprachen den Werten in Myoblasten.

Der *coxIV*-Promotor wurde auf die gleiche Weise analysiert, es wurden drei verschieden lange Promotorsequenzen kloniert und beobachtet:

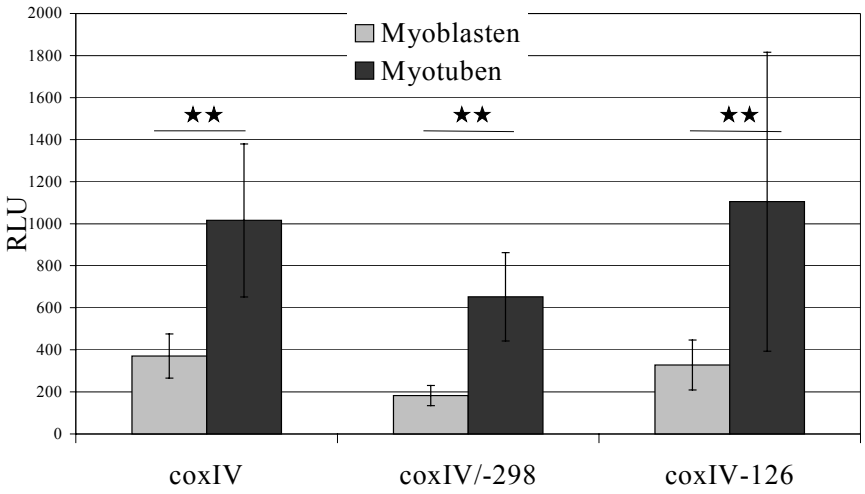


Abbildung 21: Promotorakivität der *coxIV*-Konstrukte in Myoblasten und Myotuben Bestimmt wurde das Verhältnis der durch die unterschiedlich verkürzten Promotorsequenzen regulierten Firefly-Luciferase-Aktivität zur konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase. (n=12, ★★ entspricht p<0,01)

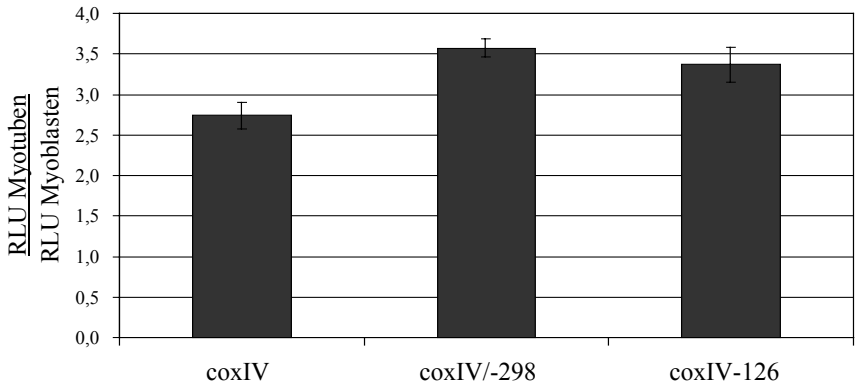


Abbildung 22: Steigerung der Promotoraktivität der *coxIV*-Konstrukte während der Differenzierung. Dargestellt ist der Quotient der Promotoraktivitäten der untersuchten *coxIV*-Promotorkonstrukte in Myotuben und Myoblasten.

Durch Verkürzung der Promotorsequenz um 377 bp bzw. 549 bp wurde kein Einfluß auf die Aktivität des Promotors ausgeübt. Auch die Steigerung der Aktivität während der Differenzierung blieb relativ unverändert.

Beim *mtTFA*-Promotor wurde die Aktivität des Gesamtpromotors mit zwei verkürzten Konstrukten verglichen, von denen eines eine Deletion im mittleren Bereich enthielt (mtTFA/D-117) und ein weiteres nur die Sequenz um den Transkriptionsstart (mtTFA/-117).

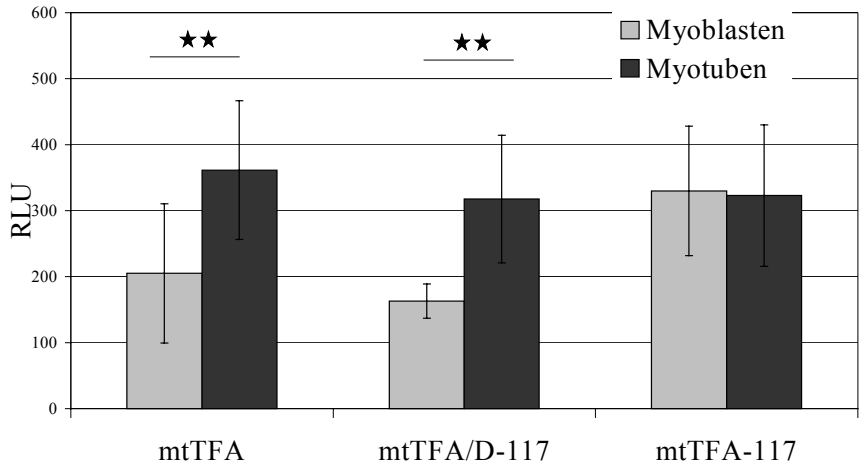


Abbildung 23: Promotorakivität verschiedener *mtTFA*-Konstrukte in Myoblasten und Myotuben. Bestimmt wurde das Verhältnis der durch die unterschiedlich verkürzten Promotorsequenzen regulierten Firefly-Luciferase-Aktivität zur konstitutiv exprmimierten Renilla-Luciferase (n=12, ★★ entspricht p<0,01).

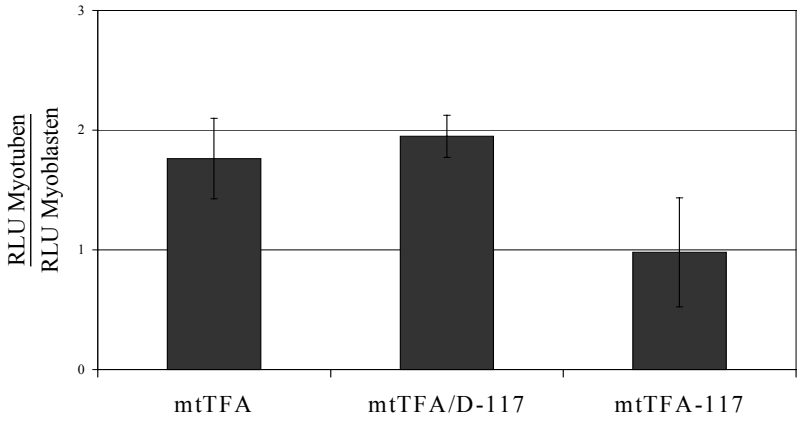


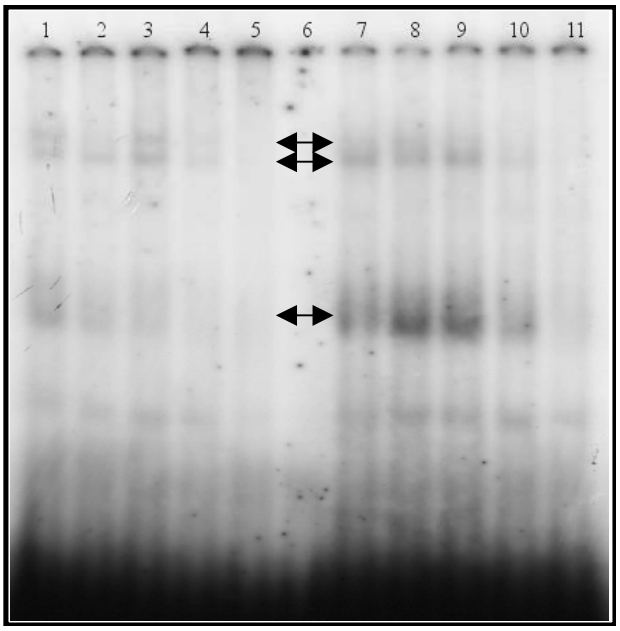
Abbildung 24: Steigerung der Promotoraktivität der *mtTFA*-Konstrukte während der Differenzierung. Dargestellt ist der Quotient der Promotoraktivitäten der untersuchten *mtTFA*-Promotorkonstrukte in Myotuben und Myoblasten.

Die Deletion einer 135 bp großen Sequenz zwischen -252 und –117 hatte weder Auswirkungen auf die basale Aktivität in Myoblasten noch auf die Steigerung der Aktivierung bei der Differenzierung zu Myotuben. Die Entfernung der in 5'-Richtung dieses Bereichs liegenden Sequenz zwischen –414 und -252 führte zu einer höheren Aktivität in Myoblasten, nicht aber in Myotuben, so daß die Steigerung während der Differenzierung nicht mehr beobachtet wurde.

4.2.5 Electromobility shift assay

Die Ergebnisse der Reportergen-Assays von *cytC* wurden als Grundlage für die Auswahl von Sequenzen des Promotors für eine Analyse durch Electromobility Shift Assay verwendet. Untersucht wurde der Bereich zwischen –145 und –68, der für eine hohe Steigerung der Promotoraktivität während der Differenzierung essentiell ist. Ziel des Assays war es, Interaktionen von Proteinen mit diesem Abschnitt der DNA zu entdecken, die sich in Myoblasten und Myotuben unterscheiden.

Die zugrundeliegende Sequenz wurde in drei 25 bis 35 bp lange überlappende Abschnitte unterteilt, am 5'-Ende radioaktiv markiert und mit Gesamtproteinextrakten aus isolierten Myoblasten- und Myotubenzellkernen inkubiert. Zum Abfangen unspezifischer DNA-Protein-Bindungen wurde den Ansätzen ein großer Überschuß einer artifiziellen DNA-Sequenz (poly[dI-dC]*poly[dI-dC]) zugesetzt.
Durch Polyacrylamidgele niedriger Ionenstärke konnten dann ungebundene Oligo-DNA und intakte Protein-DNA-Komplexe aufgetrennt werden. Die verschiedene Größe und Zahl der gebundenen Proteine verringerte dabei die Mobilität der DNA unterschiedlich stark, so daß mehrere Protein-DNA-Komplexe unterschieden werden konnten. Rückschlüsse auf die Größe, Zahl und Art der Proteine ließen sich aus diesem Assay allerdings nicht ziehen.

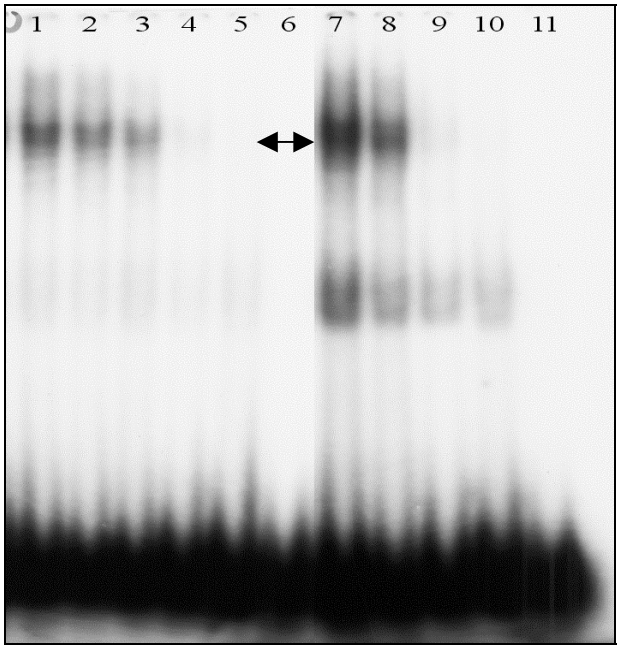


1 10 µg Myoblasten-Kernprotein
2 + 1fach unmarkierte DNA
3 + 10fach unmarkierte DNA
4 + 100fach unmarkierte DNA
5 + 1000fach unmarkierte DNA

6 Kontrolle ohne Protein

7 10 µg Myotuben-Kernprotein
8 + 1fach unmarkierte DNA
9 + 10fach unmarkierte DNA
10 + 100fach unmarkierte DNA
11 + 1000fach unmarkierte DNA

Abbildung 25: Electromobility Shift Assay mit der Sequenz *cytC*/-147→-113
Die radioaktiv markierte Sequenz von –147 bis -113 des *cytC*-Promotors wurde mit Zellkern-Proteinextrakten von Myoblasten und Myotuben inkubiert. Die entstehenden Protein-DNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt. Durch Zugabe von steigenden Mengen unmarkierter DNA derselben Sequenz wurden spezifische DNA-Proteinbindungen (Doppelpfeile) kompetitiert, während unspezifische Bindungen erhalten blieben.

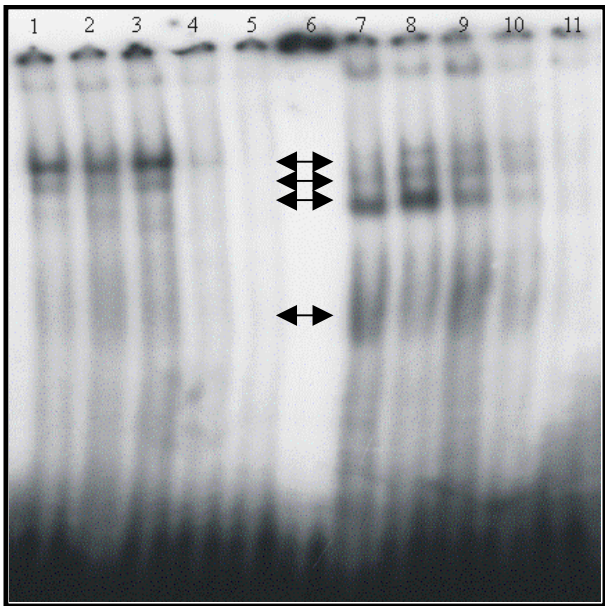


1 10 µg Myoblasten-Kernprotein
2 + 1fach unmarkierte DNA
3 + 10fach unmarkierte DNA
4 + 100fach unmarkierte DNA
5 + 1000fach unmarkierte DNA

6 Kontrolle ohne Protein

7 10 µg Myotuben-Kernprotein
8 + 1fach unmarkierte DNA
9 + 10fach unmarkierte DNA
10 + 100fach unmarkierte DNA
11 + 1000fach unmarkierte DNA

Abbildung 26: Electromobility Shift Assay mit der Sequenz *cytC*/-123→-90
Der Assay erfolgte analog zu dem in Abb. 25 dargestellten Experiment



1 10 µg Myoblasten-Kernprotein
2 + 1fach unmarkierte DNA
3 + 10fach unmarkierte DNA
4 + 100fach unmarkierte DNA
5 + 1000fach unmarkierte DNA

6 Kontrolle ohne Protein

7 10 µg Myotuben-Kernprotein
8 + 1fach unmarkierte DNA
9 + 10fach unmarkierte DNA
10 + 100fach unmarkierte DNA
11 + 1000fach unmarkierte DNA

Abbildung 27: Electromobility Shift Assay mit der Sequenz *cytC*/-95→-68
Der Assay erfolgte analog zu dem in Abb. 25 dargestellten Experiment

Im Sequenzbereich zwischen –147 und –113 bp wurden bei der Analyse des Myoblasten-Zellkernextraktes vier unterschiedliche DNA-Protein-Komplexe nachgewiesen. Durch Kompetition mit ansteigenden Mengen unmarkierter DNA der gleichen Sequenz wurde die Spezifität von drei dieser Bindungen bestätigt. Die gleichen Komplexe wurden auch bei der Verwendung von Myotuben-Protein wiedergefunden, allerdings unterschieden sich die Mengen der gebundenen Radioaktivität und damit die Menge an Protein-DNA-Komplex in den jeweiligen Banden: Der Komplex mit der größten Mobilität war stärker präsent, von den beiden Komplexen niedriger Mobilität war einer stärker, der andere schwächer vertreten.
Im Bereich zwischen –123 und –90 bp wurde nur eine spezifische Bande detektiert, deren Intensität sich bei Myoblasten- und Myotubenprotein nicht deutlich unterschied.
Der Bereich zwischen –95 und –68 bp wies vier spezifische Protein-DNA-Interaktionen auf. Drei davon bildeten eine Gruppe ähnlicher Mobilität im oberen Bereich des Gels, während die vierte Bande im Bereich mittlerer Mobilität zu finden war. Dieser Komplex war bei gleichen Proteinmengen bei Myotubenprotein in einer höheren Konzentration vorhanden als bei Myoblastenprotein. Bei den drei Banden im oberen Teil des Gels war eine interessante Verschiebung des Verhältnisses zu finden. In undifferenzierten Zellen war die obere Bande stark ausgeprägt, während die untere die niedrigste Konzentration der drei Banden aufwies. In differenzierten Myotuben dagegen war die untere Bande die deutlichste, während die obere die niedrigste Konzentration hatte.

4.2.6 Footprint

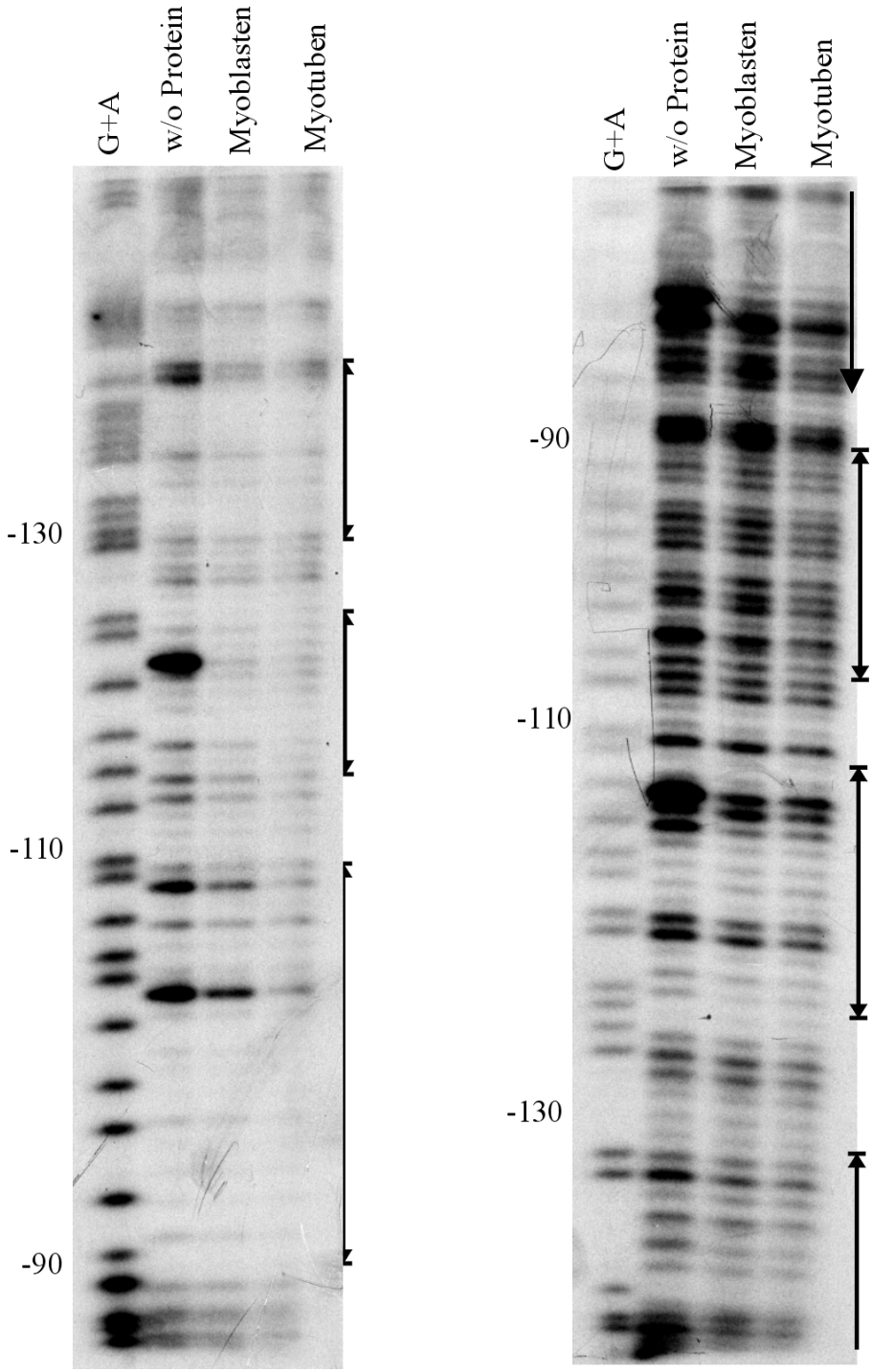
Um die im Electromobility shift detektierten Protein-DNA-Bindungen näher zu charakterisieren, wurde der Bereich zwischen –210 bp und +115 bp des *cytC*-Promotors durch "Footprint Assays" untersucht.

Auch hierbei werden radioaktiv endmarkierte DNA-Doppelstrangsequenzen mit Zellkernextrakten inkubiert, um Protein-DNA-Komplexe zu erzeugen. Nach der Bindereaktion werden die DNA-Fragmente durch DNase I enzymatisch zerschnitten und über ein Sequenzgel der Größe nach aufgetrennt. Durch Vergleich des Bandenmusters des DNA-Proteingemischs mit dem reiner DNA können Bereiche in den Sequenzen identifiziert werden, an denen die Bindung eines Proteins den Abbau der DNA inhibiert.

Der Vergleich des Footprint-Musters von Myoblasten-Protein mit Myotubenprotein ergab keine eindeutigen Unterschiede im Bindeverhalten der Proteine, da die Konzentration der bindenden Proteine im eingesetzten Extrakt zu niedrig war, um quantitative Bewertungen des Footprint-Musters vornehmen zu können.

Die Mehrzahl der detektierten Proteinbindungen konnte bereits bekannten Regulatoren der *cytC*-Genexpression zugeordnet werden; so wurde z. B. eine Proteinbindung an der NRF-1-Consensus-Sequenz nachgewiesen (Footprint-Assay der gesamten Sequenz *cytC*/-210-> +115 im Anhang).

Das Footprint-Muster im für die Aktivierung der Mitochondrienbiogenese im Muskel interessierenden Bereich –145 bis –68 bp ist in Abbildung 28 dargestellt. Es konnten vier relativ schwache Protektionsbereiche identifiziert werden. Drei der vier detektierten Proteinbindungen liegen im Bereich von funktionalen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Die vierte Proteinbindung konnte bisher nur auf dem (+)-Strang gezeigt werden und umfaßt mindestens 13 Basen, unter anderem die c-ETS-1-Consensus-Sequenz.




```
5' CCGTCCCAATCCTGGAGCCAATGACATGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCC 3'
3' GGCAGGGTTAGGACCTCGGTTACTGTACGCCGATGCAGTGCCGCGTCACGGGCCGCGACGGCGTGCAGG 5'
        CAAT        CAAT            CREB                          C-ETS-1
```

Abbildung 28: Footprint-Muster im Bereich –130 bis –90 des *cytC*-Promotors

Durch Inkubation der radioaktiv markierten Sequenz cytP/-210→+115 mit bzw. ohne Kernprotein aus Myoblasten und Myotuben und anschließenden DNaseI-Abbau wurden Bereiche der Sequenz identifziert, die von gebundenem Protein bedeckt waren.

4.2.7 Sequenzvergleich der Promotoren

Der Bereich des Cytochrom C-Promotors zwischen –145 und –60 bp enthält bei der Sequenzanalyse mit *Matinspector* neben den bereits beschriebenenen funktionalen CAAT-Bindungsstellen [85] und der CREB-site potentielle Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren der AP-Familie und für c-ETS.

```
-145       CAAT      CAAT             CREB                                  -60
GCTAGCCGTCCCAATCCTGGAGCCAATGACATGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGG
                         AP1          AP1       AP4            CETS1P54  AP2
```

Abbildung 29: Sequenz des *cytC*-Promotors im Bereich von –145 bis –68 bp. Die Kernsequenzen der von Scarpulla et al. beschriebenen CAAT-Boxen und die CREB-site sind grau unterlegt. Unterstrichen sind Kernsequenzen potentieller Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren.

Außerdem weist dieser eine palindromische Sequenz mit signifikanter Homologie auf, ein relativ häufiges Merkmal von Proteinbindungsmotiven [102].

```
                    AP4          c-ETS-1   AP2
-87                 CGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGG  -60
                     ***** * *    *    * * *****
-60                 GGGCGCCGGCCTGCACGCCGTCGCGGC  –87  invertierte Sequenz

                    GGCGCYGSCKYRCRYKCSGYCGCGG  extrahierte Palindromsequenz
                    ──────────▶ ◀──────────
```

Y = Pyrimidin C/T; R = Purin A/G; S = C/G

Der Vergleich der *cytC*-Sequenz von –145 bis –60 bp mit den Promotoren des mtTFA- und des *coxIV*-Gens zeigte Abschnitte mit deutlichen Homologien in allen drei Promotoren.
Im *coxIV*-Promotor fand sich eine 12 bp lange exakte Übereinstimmung mit der an die AP1-site anschließenden Sequenz.

```
                                  AP4       c-ETS-1   AP2
cytC      -102 ACGGCGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGG  -62
               ************
coxIV     -329 ACGGCGCAGTGC  -307
```

Auch die Palindrom-Region ist im *coxIV*-Promotor vorhanden, allerdings getrennt in zwei kurze Abschnitte mit einer Insertion von 17 Basen.

```
                    AP4          c-ETS-1                AP2
```

```
cytC      -85 GCGCTGCCGCACGTCC------------GGCCGCGGGAG    -60
                **********  *               ** ** ***
coxIV     -81 CAGCTGCCGCACCGCGATCTGAAGCTGATGGGCGTGGGCGG   -40
```

Die Homologie zum *mtTFA*-Promotor betrug 66 % in 36 bp gegenüber 49 % Homologie der gesamten Promotoren und umfaßte unter anderem die Palindrom-Sequenz.

```
                              AP4       c-ETS-1  AP2
cytC        -98   CGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGG -62
                  *** **** **  ** *****   **** ** ****
mtTFA      -515   CGCTGGGCGCGCAGCAGCCGCCGATCGGACCTCGGG -480
```

Insgesamt ergibt sich das Bild einer zweiteiligen consensus-Sequenz:

```
coxIV     ---------- ---GCTGCCG CACcgcgATC tgaagctgat GGGCGTGGG
cytC      CGCAGTGCCC GGCGCTGCCG CAC----GTC C--------- GGCCGCGGG
mtTFA     CGCTGGGCGC GCAGCAGCCG CCG----ATC G--------- GACCTCGGG
```

consensus-Sequenz: GCWGCCGCMS 4-17 bp GRMCKYGGG

Die Suche nach diesem Motiv in den Promotorsequenzen von 28 kernkodierten mitochondrialen Genen zeigte die Präsenz in 13 Genen, während die Suche in allen Sequenzen der EMBL-Datenbank eine um den Faktor 200 niedrigere Häufigkeit ergab.

4.2.8 Mutationsstudien des *cytC*-Promotors

Durch Mutationsstudien sollte die Relevanz einzelner Basenpaare der Palindromsequenz für die Proteinbindung im Cytochrom-C-Promotor untersucht werden. Hierzu wurden EMSA-Studien mit Oligonukleotiden durchgeführt, bei denen durch Austausch von 3-4 Basen die Bindesequenz zerstört wurde:

AP4 c-ETS-1	
GTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCC	cytP/-94 -> -68
GTGCCCGGCTCCTCCGCACGTCCGGCC	comp1
GTGCCCGGCGCTGCCGCACGAAAAGCC	c-ETS-1
GTGCCCGGCGCTGAAAAAAATCCGGCC	comp3

Diese veränderten Sequenzen wurden zunächst zur Kompetition der Originalsequenz im Überschuß eingesetzt. Bei Bindung der Proteine an die modifizierte Sequenz wird die Bindung an das markierte Fragment kompetitiv gehemmt, so daß das Komplexbildungsvermögen der unterschiedlichen Sequenzen anhand der Bandenintensität beurteilt werden kann.

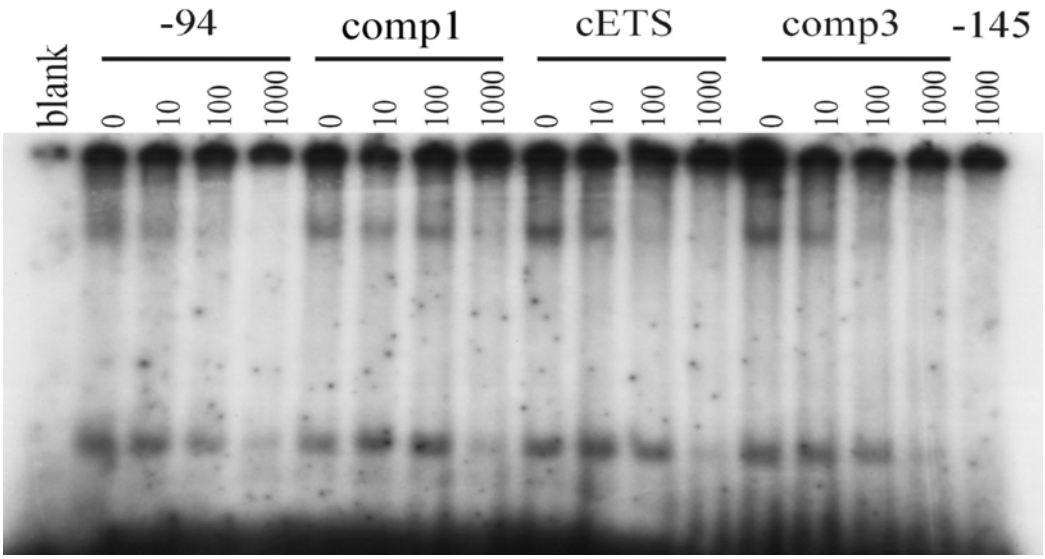


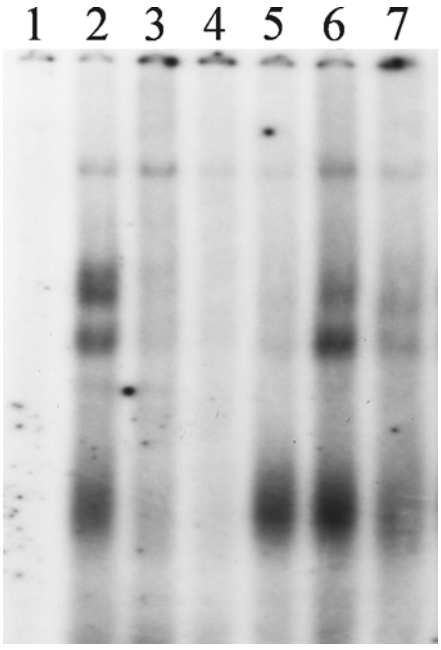
Abbildung 30: EMSA mit modifizierten Kompetitions-Oligonukleotiden.
Die radioaktiv markierte Originalsequenz wurde mit Myotuben-Zellkernprotein inkubiert, die Kompetition erfolgte mit steigenden Mengen modifizierter Sequenzen. Bei erfolgreicher Kompetition wird so die Bindung der beteiligten Proteine auch an die modifizierten Sequenzen, also die Irrelevanz der modifizierten Basen für die Proteinbindung gezeigt. Der Verlust der Kompetition dagegen bestätigt die Bedeutung der veränderten Basen für die Proteinbindung. Die erfolgreiche Kompetition mit einer fremden DNA-Sequenz (*cytP*/-145) zeigt die fehlende Spezifität der Kompetition bei 1000fachem Überschuß.

Das Prinzip dieses Kompetitionsassays beruht darauf, daß bei Austausch einzelner Basen innerhalb der Erkennungssequenz für ein spezifisch bindendes Protein die Proteinbindungsrate an die modifizierte Sequenz abnimmt. Ist also die Kompetition der Proteinbindung an die Originalsequenz durch die modifizierte Sequenz verringert, ist die Erkennungssequenz von der Mutation betroffen; ist die Kompetition weiterhin vorhanden, wurden nicht-relevante Basen substituiert.

Der Kompetitionsassay ergab für die Substitution des c-ETS-1-Motivs keine deutliche Verringerung der Proteinbinde-Eigenschaften. Die Modifikation „comp3“ verringerte die Bindeeigenschaften geringfügig. Nur für die Modifikation „comp1“ war eine deutlich verminderte Kompetition zu beobachten. Die vollständige Inhibierung der Proteinbindung bei 1000fachem Überschuß einer fremden DNA (cytP-145) zeigte, daß die Kompetition in dieser Größenordnung nicht mehr spezifisch ist.

Zur detaillierteren Überprüfung der Proteinbindung an die modifizierten Sequenzen wurden diese als radioaktiv markierte Oligonukleotide im EMSA eingesetzt.

Auch hier zeigte die Modifikation „comp1” eine verringerte Proteinbindung. Die Modifikation der c-ETS-1-Sequenz hatte kaum Auswirkungen auf die Komplexbildung, während die Modifikation comp-3 leicht schwächere Proteinbindungen erzeugte.



1. Blank
2. cytP/-94
3. cytP/-94 + 10fach cytP/-94
4. cytP/-94 + 100fach cytP/-94
5. comp1
6. cETS
7. comp3

Abbildung 31: Electromibility Shift Assay mit modifizierten Sequenzen
Die Originalsequenz wurde mit Myotuben-Zellkernprotein inkubiert und zur Identifizierung spezifischer DNA-Proteinbindungen mit steigenden Mengen unmarkierter DNA gleicher Squenz kompetitiert. Die Proteinbindung an die markierten modifizierten Sequenzen ist zum Vergleich in Spur 5-7 dargestellt.

Zur Überprüfung der Funktionalität des analysierten Bereichs wurden die Modifikationen comp1, c-ETS-1, comp3 und einige weitere Basenaustausche durch Megaprimer-PCR in den Vektor cytP/-210 eingeführt und im Reportergenassay analysiert:

```
          AP1                  AP4         c-ETS-1
TGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGGAGG   Original
TGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCCGGCTCCTCCGCACGTCCGGCCGCGGGAGG   comp1
TGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGAAAAGCCGCGGGAGG   C-ETS-1
TGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCCGGCGCTGAAAAAAATCCGGCCGCGGGAGG   comp3
TGCGGCTACGTCAAAAAGCAGTGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGGAGG   comp5
TGCGGCTACGTCACGGCAAAATGCCCGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGGAGG   comp6
TGCGGCTACGTCACGGCGCAGAAAACGGCGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGGAGG   comp7
TGCGGCTACGTCACGGCGCAGTGCCAAAAGCTGCCGCACGTCCGGCCGCGGGAGG   comp8
```

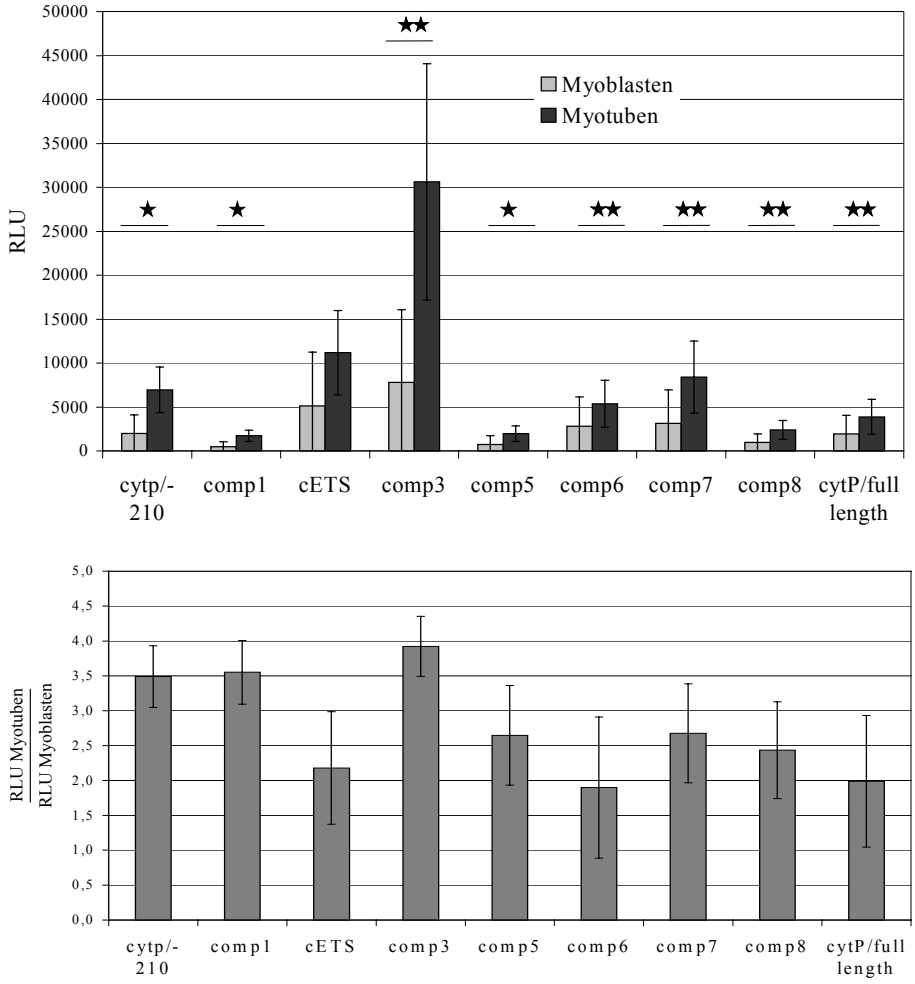


Abbildung 32: Promotoraktivität der *cytC*/-210-Sequenz mit verschiedenen Modifikationen im Luciferase-Reportergen-Assay

Dargestellt sind die Promotoraktivitäten der modifizierten Sequenzen in Myoblasten und Myotuben und die sich daraus ergebende Steigerung der Promotoraktivität während der Differenzierung. (n=12, ★★ entspricht $p<0,01$, t-Test).

Bei keiner der eingeführten Modifikationen wurde die Aktivierung der Promotoraktivität des klonierten Cytochrom C-Promotorabschnitts vollständig unterbunden. Eine reduzierte Aktivierung war jedoch in den Konstrukten comp5, 6, 7 und 8 zu beobachten, bei denen die Modifikationen die Basenpaare zwischen AP1 und AP4-Consensus-Sequenz betreffen. Ebenfalls leicht erniedrigt war die Aktivierung in dem Konstrukt, indem die c-ETS-consensus-sequenz verändert wurde. Bei den Modifikationen comp1 und comp3, bei denen die Basen vor dieser c-ETS-1-site betroffen waren, war keine Abnahme bzw. sogar eine Zunahme der Aktivierung zu beobachten.

4.3 Vergleich von kultivierten Zellen mit Muskelgewebe

Durch Vergleich des Myotuben-Proteinextrakts mit Proteinextrakten aus Ratten-Gewebe im Electromobility shift Assay sollte die Übereinstimmung der verwendeten Skelettmuskelzell-Linie C2F3 mit dem physiologischen Zustand *in vivo* analysiert werden.

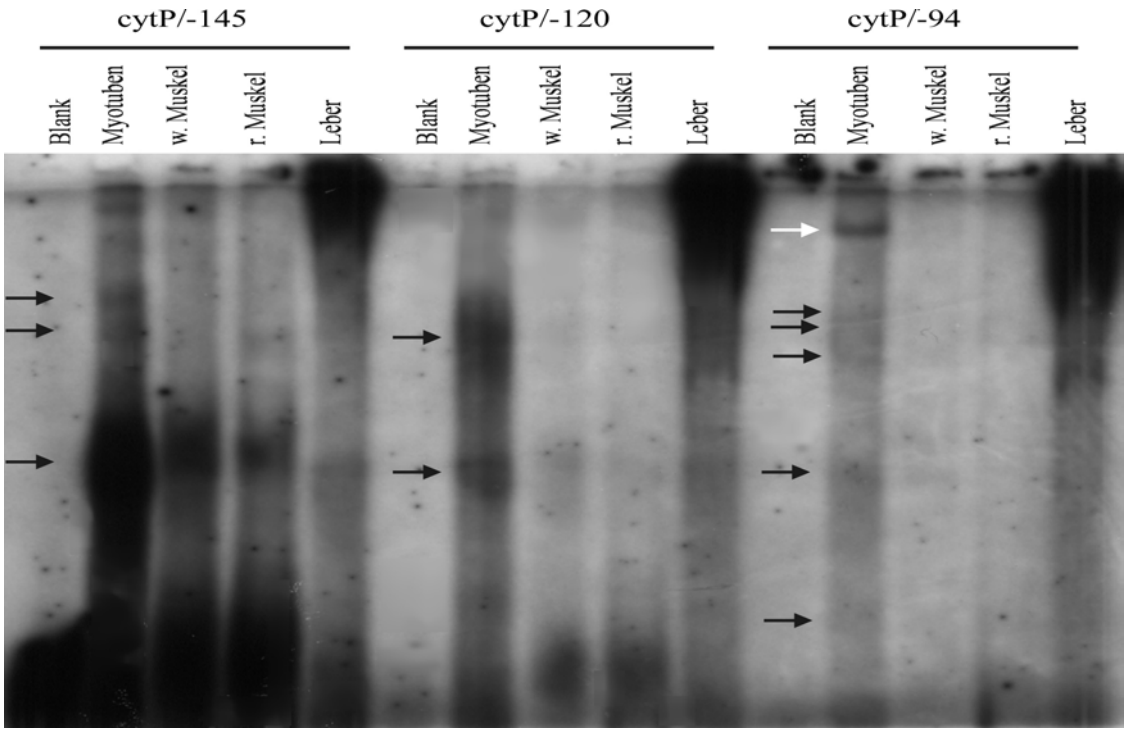


Abbildung 33: EMSA-Vergleich der kultivierten Muskelzellen mit Gewebeextrakten aus Ratte (w. Muskel = weiße Muskulatur, Quadriceps; r. Muskel = rote Muskulatur, Diaphragma). Identische, in kultivierten Zellen als spezifisch nachgewiesene Banden sind durch schwarze Pfeile markiert, unterschiedliche spezifische Banden durch weiße Pfeile.

Aufgrund der besonderen Struktur von Muskulatur war keine saubere Aufreinigung von Zellkernen aus Muskelgewebe möglich; die Proteinextrakte wurden aus einer Mischung von Zellkernen und Myofibrillen gewonnen. Durch die hieraus resultierende unterschiedliche Qualität der eingesetzten Proteinextrakte war ein quantitative Analyse der Protein-DNA-Komplexierung nicht möglich. Der qualitative Vergleich zeigte jedoch eine weitgehende Übereinstimmung im Bandenmuster der Protein-DNA-Komplexe zumindest beim Vergleich von weißem Muskel und Myotuben. Der Vergleich mit rotem Muskelgewebe war aufgrund der geringeren Proteinkonzentration im erzeugten Extrakt nicht möglich.
Bei dem Vergleich wurden nur die Banden berücksichtigt, die im Kompetitions-EMSA mit Kernprotein aus kultivierten Zellen als spezifisch erkannt wurden. Die Banden mit schwächerer Intensität in Myotuben konnten bei Proteinextrakten aus Gewebe nicht beobachtet werden. Dies wurde auf die zu erwartenden niedrigen Konzentrationen zurückgeführt und nicht als Fehlen dieser Protein-DNA-Komplexe interpretiert.
Der zum Vergleich eingesetzte Zellkern-Extrakt aus Rattenleber wies eine hohe Konzentration an Proteinen auf, die an die eingesetzten DNA-Sequenzen binden. Dadurch wurden DNA-Proteinkomplexe gebildet, die aufgrund ihrer Größe nicht über das verwendete Gel aufgetrennt wurden. Die Proteinbindung von Zellkernprotein aus Muskel und Leber ist daher nicht vergleichbar, so daß die leicht zu isolierenden Zellkernproteine aus Lebergewebe nicht als Ersatz für die Extraktion aus Muskelgewebe dienen können.
Einzelne übereinstimmende Banden zwischen Leber- und Muskelextrakten wurden jedoch gefunden. Dies spricht dafür, daß zumindest einige der an die analysierte Sequenz bindenden Proteine nicht ausschließlich in Muskelgewebe exprimiert werden.

4.4 Promotoraktivität des *cytC*-Promotors bei Stimulation der AMPK

Um die Rolle der AMP-abhängigen Kinase AMPK bei der Differenzierung von Muskelzellen zu beleuchten, wurde die endogene AMPK von Myoblasten durch Zugabe von 0,5 µM AICAR, einem AMP-Analogon, ins Medium konstitutiv aktiviert und die Promotoraktivitäten des *Cytochrom C*-Promotors mit und ohne Stimulation in Myoblasten und Myotuben verglichen.

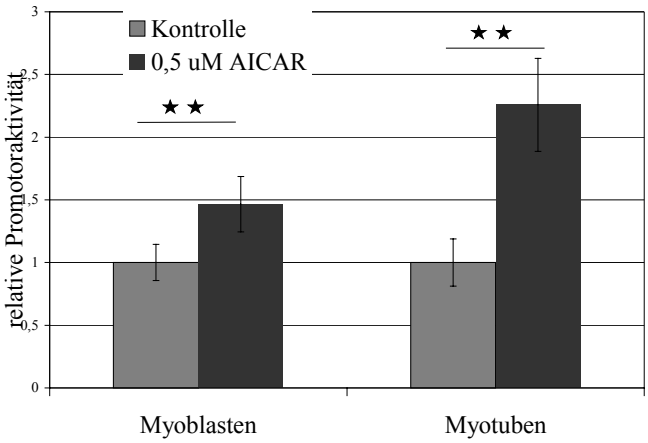


Abbildung 34: Promotoraktivität des *cytC*-Promotors mit AICAR
Durch Zusatz des AMP-Analogons AICAR wurde die endogene AMP-abhängige Kinase AMPK konstitutiv aktiviert und ihr Einfluß auf die Aktivität des *cytC*-Promotors im Reportergen-Assay analysiert.
(n=12, ★★ entspricht $p<0,01$, t-Test)

Die Promotoraktivität war mit AICAR in Myoblasten um ca. 50 % und in Myotuben um ca. 120 % höher als in Kontrollzellen ohne AICAR. Die größte Aktivierung wurde nach 12 h Inkubation mit AICAR erreicht und blieb über 24 h ohne Anzeichen eines toxischen Einflusses konstant.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation kernkodierter mitochondrialer Gene während der Differenzierung von Skelettmuskel untersucht werden. Als Modell wurde hierzu die aus muskulären Satellitenzellen erzeugte murine Myoblastenzell-Linie C2F3 verwendet, die unter entsprechenden Bedingungen zu Muskelfaser-ähnlichen Myotuben differenziert werden kann. Als Grundlage zur Untersuchung der Regulation der Genexpression wurden zunächst einige physiologische und biochemische Parameter der Mitochondrienbiogenese analysiert.

5.1 Differenzierungsgrad der Zellen

Die eingesetzten Myoblasten differenzieren unter Entzug der fetalen Wachstumsfaktoren zu vielkernigen Myotuben, die den muskelspezifischen Transkriptonsfaktor Myogenin exprimieren. Myogenin bildet mit MyoD, Myf-5 und MRF-4 die MRF-Familie von ausschließlich in Skelettmuskel exprimierten Transkriptionsfaktoren, die an die E-box, ein DNA-Motiv in vielen Promotoren skelettmuskelspezifischer Gene, binden und Heterodimere mit anderen Helix-loop-helix-Proteinen bilden. Überexpression einzelner MRF-Faktoren induziert in einem weiten Spektrum an Zellen die Differenzierung zu Muskelgewebe, während die Deletion einzelner Faktoren die Redundanz der vier bekannten Proteine gezeigt hat [103]. Während MyoD auch in Myoblasten exprimiert wird, ist die Expression von Myogenin der erste Nachweis einer beginnenden Differenzierung zu Myotuben und wird häufig als Kriterium für die Differenzierung verwendet [104].

Während in Myoblasten keine spezifische Immunfluoreszenz bei anti-Myogenin-Färbung sichtbar war, wiesen 65-75 % der Zellkerne in einer differenzierten Myotuben-Kultur die Expression von Myogenin auf, waren also differenziert (Abbildung 6, S. 42). Auch Zellen mit nur einem Zellkern und Myoblasten-förmiger Gestalt wiesen teilweise hohe Myogenin-Gehalte auf, während vielkernige Myotuben in einzelnen Fällen nur eine schwache Myogenin-Färbung der Zellkerne, dafür aber eine stärkere Färbung des Cytoplasmas zeigten.

5.2 Protein- und RNA-Gehalt der Zellen

Während der Differenzierung von Myoblasten findet nicht nur eine Fusionierung zu mehrkernigen Myotuben statt, auch das Zellvolumen vergrößert sich deutlich. Mit dieser Volumenvergrößerung einher gehen gesteigerte RNA- und Proteingehalte pro Zellkern (Abbildung 10, S.47). Diese Zunahme könnte einerseits durch eine allgemeine Aktivierung der Transkription und Proteinbiosynthese oder andererseits durch eine spezifische Aufregulation vieler einzelner Gene verursacht werden.

Eine generelle Aktivierung der Transkriptionsrate in Zellen wird in der Regel über Modulation des Initiationsvorganges reguliert. Z. B. ist die Bildung eines Holoenzym-komplexes ohne vorhergegangene DNA-Bindung bekannt, der bereits einen Großteil der Proteinkomponenten des Initiationskomplexes enthält [105]. Diese präformierten Transkriptionseinheiten sind ein ökonomischer Mechanismus, die Bildung eines inititationskompetenten Transkriptionskomplexes zu erleichtern.
Eine weitere die allgemeine Transkriptionsrate bestimmende Komponente ist die Konzentration von Mediatoren am Initiationskomplex. Dies sind Proteinkomponenten des Initiationskomplexes, die durch Interaktion mit der C-terminalen Domäne die Phosphorylierung dieser Domäne und damit die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation steuern [106]. Dieser Mechanismus moduliert z. B. die Transkriptionsrate im Verlauf des Zellzyklus [107].

Die gezielte Steuerung einzelner Gene dagegen wird in der Regel über spezifisch an die Promotorsequenz bindende Transkriptionsfaktoren bewirkt. Dies kann über Variationen der Expression dieser Transkriptionsfaktoren geschehen, wie z.B. beim Transkriptionsfaktor AP2 [108]. Auch die Modulation der trans-aktivierenden Eigenschaften von DNA-bindenden Faktoren ist ein häufiger Weg der Expressionsregulation, z. B. durch Phosphorylierung [109] oder Bindung von Inhibitoren [110]. Als Vermittler der transaktivierenden Eigenschaften der spezifischen Transkriptionsfaktoren werden zudem häufig Koaktivatoren benötigt, die eine Brückenfunktion zwischen Transkriptionsfaktor und Initiationskomplex übernehmen. Diese Koaktivatoren bilden einen weiteren Ansatzpunkt der Transkriptionsregulation [111].

Ob während der Muskeldifferenzierung die generelle Transkriptionsrate der Zellen ansteigt, ist bisher noch ungeklärt. Für die Funktionalität der differenzierten Muskelzelle ist vor allem die Synthese der Proteine des Kontraktionsapparates notwendig, aber auch die gesteigerte Expression von Ionenkanälen zur Erregungsleitung und eine Umorganisation der energieliefernden Prozesse, um dem erhöhten Energiebedarf Rechnung zu tragen. Erste Analysen belegen, daß sich das Expressionsmuster eines Großteils, allerdings nicht aller in Myoblasten exprimierten Gene während der Differenzierung ändert [112]. Dies spricht für eine gezielte Regulation einzelner Gene, schließt eine allgemeine Aktivierung der Transkription jedoch nicht aus.

Die spezifische Genaktivierung für muskelspezifische kontraktile Proteine ist schon lange bekannt [113], aber auch für einige mitochondriale Enzyme beschrieben [114]: Die drei kernkodierten Matrix-Enzyme Citratsynthase, Isocitratdehydrogenase und 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase werden bei der Differenzierung einer murinen Muskelzell-Linie in gleichem Maße aktiviert. Das glykolytische Enzym Hexokinase, das partiell mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist, zeigte ein vergleichbares Aktivierungsmuster. Die Atmungskettenenzyme Cytochromoxidase und NADH-Dehydrogenase dagegen wurden zwar ebenfalls bei beiden Differenzierungsvorgängen aktiviert, das Aktivierungsmuster unterschied sich jedoch deutlich von dem der Matrix-Enzyme, so daß bisher zwei Gruppen an koregulierten mitochondrialen Proteinen beschrieben wurden.

Diese Veränderung der stöchiometrischen Verhältnisse ebenso wie der Gehalt der Matrixenzyme bei der Differenzierung von Zellen kann auf unterschiedliche Aktivierungsmechanismen zurückzuführen sein. Ursache könnte einerseits eine unterschiedliche Sensitivität geegnüber den gleichen regulatorischen Einflüssen oder die unabhängige Regulation von Gen-Gruppen sein. Auch die Überlagerung spezifischer Regulationsmechanismen einzelner Gene mit einer allgemeinen Expressionsmodulation aller Gene könnte zu dem beobachteten unterschiedlichen Expressionsmuster von mitochondrialen Genen während der Muskeldifferenzierung führen.

Neben der Fragestellung, ob Gen-Aktivierungsphänomene in der Muskeldifferenzierung durch selektive Regulation oder allgemeine Stimulation der Expression verursacht werden, ergeben sich aus den beobachteten Steigerungen der RNA- und Proteingehalte bei der Fusionierung von Myoblasten zu Myotuben auch verschiedene Interpretationsmöglichkeiten der folgenden Daten. Bei Normierung der Werte auf den Protein- bzw. RNA-Gehalt der Zellen wird die Möglichkeit der spezifischen Regulation einzelner Gene vernachlässigt. Andererseits ist eine Beziehung der Daten auf die Einheit “Zelle” beim Vergleich einzelzelliger Myoblasten mit vielkernigen Myotuben nicht möglich. Als entsprechendes Äqivalent bietet sich daher eine Betrachtung der Ergebnisse im Hinblick auf den Zellkern, also die Kopienzahl der entsprechenden Gene, an. Da sich die Menge an DNA pro Zellkern unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle nicht ändert, ist auch eine vereinfachte Normierung auf den Gehalt an DNA möglich.

5.3 Metabolitgehalt in Myoblasten und Myotuben

Die Konzentrationsbestimmung der am Energiehaushalt der Zelle direkt beteiligten Nucleoside ATP, ADP und AMP sollte zur Einschätzung des zellulären Energiestatus dienen und Hinweise auf mögliche interne Signalmoleküle geben, die als Sensor Änderungen der Energiebilanz detektieren. Um den muskelspezifischen Hintergrund zu berücksichtigen, wurde auch die Konzentration an Creatinphosphat und Lactat analysiert (Abbildung 9, S.46).
Die Kontrolle der Atmung in Mitochondrien wird u. a. durch das Angebot an ADP bzw. das Konzentrationsverhältnis von ATP zu ADP bestimmt [10]. Dieses Verhältnis ist in Zellen eines Typs strikt reguliert und beeinflußt die Aktivität verschiedenster Stoffwechselprozesse. Bei Verschiebung der Bilanz wird das Gleichgewicht durch die von der Adenylat-Kinase katalysierte Dissoziation von zwei ADP-Molekülen zu einem ATP- und einem AMP-Molekül wieder ins Gleichgewicht gebracht [115].
Die Werte sind allerdings vor dem Hintergund zu betrachten, daß die gemessene ADP-Konzentration nicht den Gehalt an freiem ADP einer Zelle wiederspiegelt, da ein Großteil des ADP-Pools durch Bindung an Proteine am Energieumsatz unbeteiligt ist, durch die hier angewandte Perchlorsäureextraktion jedoch freigesetzt und damit in die Messung einbezogen wird. Aus diesem Grund entsprechen die Werte nicht dem tatsächlichen Verhältnis von ATP zu freiem ADP von ca. 200:1 und können daher nicht zur Beurteilung des Energiestatus herangezogen werden.
Auffällig ist aber die deutliche Steigerung der AMP-Konzentration von Werten unterhalb der Nachweisgrenze (<0,05 nmol/mg) auf 2 nmol/mg Protein AMP. Für Herzmuskulatur wurde eine normale Konzentration von 30 pmol/ml beschrieben [116].

Zur weiteren Einschätzung des zellulären Energiestatus wurden in differenzierenden Zellen die Konzentrationen an Creatinphosphat und Lactat gemessen. Lactat, das Endprodukt der Glykolyse, diente als Indikator für den anaeroben Stoffwechsel der Zellen, während das Creatin/Creatinphosphat-System in differenzierten Muskelzellen als Speicher für aktiviertes Phosphat dient, das durch Creatinkinase auf ADP übertragen werden kann [115]. Die reziproke Expressionsregulation von glykolytischen und mitochondrialen Transkripten wurde sowohl bei der Differenzierung von primären humanen Myoblasten als auch unter Hypoxie beschrieben [117]. Die Analyse der Creatinphosphat-Konzentration ergab schon in Myoblasten hohe Creatinphosphat-Werte, obwohl die Expression der Creatinkinase und damit die Funktionalität des Creatinphosphat-Speichers erst mit der Differenzierung der Zellen einsetzt [118].

Im Lauf der Differenzierung schwanken die Werte für Creatinphosphat parallel zum ATP-Gehalt der Zellen und nehmen mit zunehmendem Alter der Myotuben zu. Die zu allen Zeitpunkten der Differenzierung geringen zellulären Lactat-Konzentrationen sprechen gegen eine steigende Rate an anaerober Energiegewinnung.
In der vergleichbaren Myoblastenzell-Linie C2C12 wurde von Leary et al. [119] der Anteil der oxidativen Phosphorylierung an der gesamten ATP-Produktion auf ca. 30 % in Myoblasten bestimmt, während der Differenzierung wurde keine deutliche Änderung des Gesamtenergieumsatzes beobachtet, aber ein steigender Anteil der mitochondrialen Energieproduktion, die in differenzierten Myotuben schließlich 60 % zur gesamten ATP-produktion beitrug.

Insgesamt ergeben die Konzentrationen der beobachteten Metabolite eine Veränderung des Energiestatus der Zellen schon bei einsetzender Differenzierung: eine leichte Abnahme der ATP- und Creatinphosphat-Konzentration geht einher mit einem extremen Anstieg der AMP-Konzentration.
AMP ist bereits als Signalmolekül für Veränderungen des Energieniveaus einer Zelle bekannt: In hypertrophierten Rattenherzen wurde der Effekt einer steigenden AMP-Konzentration auf die AMP-abhängige Kinase (AMPK) beschrieben [116]. AMPK gilt als Schlüsselenzym für die Regulation einiger Energiestoffwechselwege, z. B. aktiviert sie die Glycogenolyse und die Fettsäure-Oxidation in Muskel [120] und inhibiert die Gluconeogenese in Leber [121]. Die meisten regulatorischen Funktionen übt AMPK über Phosphorylierung von Enzymen aus, allerdings wurde auch der Einfluß von AMPK auf die Genexpression von UCP im Muskel nachgewiesen [122]. Gerade im Muskel wurde eine hohe Expression einer AMPK-Isoform und die Regulation der Creatinkinase durch AMPK beschrieben [123]. Bei chronischer Stimulation der AMPK in adulten Ratten durch ein Creatinphosphat-Analogon wurde die Aktivierung der mitochondrialen Biogenese durch NRF-1 beobachtet [124]. Dementsprechend könnte die beobachtete Steigerung der AMP-Konzentration in differenzierenden Myoblasten über die Aktivierung der AMP-Kinase eine Signalkaskade auslösen, die in der Aufregulation der Mitochondrienbiogenese endet und somit zu einer Deckung des steigenden Energiebedarfs führt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die endogene AMPK in Myoblasten und Myotuben durch das AMP-Analogon AICAR konstitutiv aktiviert und der Einfluß auf die Expressionrate des Cytochrom C-Promotors im Reportergen-Assay analysiert.

Der beobachtete Anstieg der Promotoraktivität auf das Doppelte in Myotuben zeigte jedoch, daß die Steigerung der mitochondrialen Biogenese bei der Differenzierung von Myoblasten nicht allein auf eine Aktivierung der AMPK zurückzuführen ist. Eine solche Funktion der AMPK bei der Muskeldifferenzierung *in vivo* wurde hiermit jedoch nicht ausgeschlossen, da die Expression von AMPK in kultivierten Zellen in der Regel deutlich geringer als in vergleichbarem Gewebe ist [125]. Da jedoch in dieser Arbeit die Zunahme der mitochondrialen Biogenese in kultivierten Muskelzellen über die AMPK-induzierbare Aktivierung hinaus gezeigt wurde, existiert zumindest in diesen Zellen ein weiterer, AMPK-unabhängiger Weg der Aktivierung.

5.4 Sauerstoff-Verbrauch und Cytochrom-Oxidase-Aktivität

Während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben steigt der Sauerstoff-Verbrauch der Zellen kontinuierlich an (Abbildung 11, S.48). Auf den Proteingehalt bezogen verdoppelt sich der Sauerstoff-Verbrauch während der Differenzierung. Diese Werte liegen in der Größenordung der in der verwandten Zell-Linie C2C12 beobachteten Zunahme des Sauerstoff-Verbrauchs um 60 % [119]. Zieht man allerdings auch die steigende Proteinmenge pro Zellkern während der Differenzierung in Betracht, so steigt der Sauerstoffverbrauch pro µg DNA in Myotuben auf das 11-fache des Wertes in Myoblasten.
Auch in kultivierten Zellen, die in der Regel einen Großteil ihres Energiebedarfs über Glykolyse decken, führen die Differenzierungsprozesse demnach zu einer Steigerung der Zellatmung und einer Abnahme der glykolytischen ATP-Produktion. Diese Kopplung der Muskeldifferenzierung an Veränderungen des Metabolismus könnte erklären, warum Myoblasten, deren Atmungskette durch mtDNA-Depletion oder Inhibitoren gehemmt wurde, nicht mehr zur Differenzierung fähig sind [126, 127, 128].

Interessant ist die unterschiedliche maximale Verbrauchsrate bei Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese. Während in Myoblasten durch Zusatz des Ionophors CCCP der Sauerstoff-Verbrauch um den Faktor 5 gesteigert wird, beträgt die Steigerung in Myotuben nur 1,6. Bezogen auf die Gesamt-Proteinmenge bleibt der maximale Sauerstoff-Vebrauch also ungefähr konstant. Die normale Atmungsrate in Myotuben liegt also deutlich näher an der maximalen Auslastung der Atmungskette als in Myoblasten.
Dies kann durch ein in Relation zur Enzymaktivität niedrigeres Substratangebot begründet sein, da die Messung des Sauerstoff-Verbrauchs mit endogenen Substraten in intakten Zellen erfolgte und hier eine Ratenlimitierung des Elektronenflusses durch die Diffusionsgeschwindigkeit von Cytochrom C [75] oder ADP [129, 130] diskutiert wird.

Denkbar ist aber auch ein höherer Energiebedarf, der nicht vollständig durch eine Steigerung der Atmungskettenenzym-Kapazität ausgeglichen wird, so daß die vorhandene „Reserveleistung“ geringer wird.

Zur Eingrenzung dieser Möglichkeiten wurde zusätzlich die maximale Enzymaktivität der Cytochrom-Oxidase in Zell-Lysaten bestimmt (Abbildung 13, S.49). Cytochromoxidase weist als einziger Komplex der Atmungskette gewebespezifische Isoformen einzelner Untereinheiten und damit eine zusätzliche Möglichkeit der Aktivitätsregulation auf [131]. Die koordinierte Expression und Regulation der einzelnen Untereinheiten dieses Komplexes wird noch kontrovers diskutiert [132, 133, 134]. Zudem ist Cytochromoxidase der Komplex der Atmungskette mit den größten Übetragungsfehlern (“slippage”) des Elektronentransports zum Protonengradienten [135], eine hohe Cytochromoxidase-Aktivität führt somit zu einer geringeren Effizienz der oxidativen Energiegewinnung [136, 137]. Aufgrund dieser Besonderheiten ist die Aktivität des Komplexes IV in der Atmungskette von besonderem Interesse.
Die Cytochromoxidase-Aktivität in Myotuben war gegenüber Myoblasten um den Faktor 2,5 erhöht, auf den DNA-Gehalt der Zellen normalisiert sogar um den Faktor 9. Unter der Annahme, daß die Enzymaktivität ausschließlich durch die Enzymmenge und nicht durch noch unbekannte Aktivierungsmechanismen bestimmt wird, bedeutet dies eine spezifische Zunahme der Cytochromoxidase über den steigenden Gesamt-Proteingehalt der Zelle hinaus. Damit wird eine Begrenzung des maximalen Sauerstoff-Verbrauchs durch Substrat-Limitierung oder einzelne schrittmachende Komponenten der Atmungskette wahrscheinlich.
Letztendlich zeigte auch der elektronenmikroskopische Vergleich von Myoblasten und Myotuben keine auffällige Veränderung der Lokalisation und Form der Mitochondrien, bestätigte aber die zum steigenden Cytoplasma-Volumen parallele Zunahme der Mitochondrienzahl in Myotuben.

5.5 Gehalt an mitochondrialen Proteinen und mRNAs

Zur weiteren Bestätigung, daß die beobachtete Zunahme der Mitochondrienmasse und -aktivität mit steigenden Mengen mitochondrialer Proteine einhergeht, wurde der Proteingehalt dreier kernkodierter mitochondrialer Proteine bestimmt (Abbildung 13, S.51).
Cytochrom C wurde analysiert, da einerseits der Cytochrom C-Gehalt einer Zelle gut mit der mitochondrialen Aktivität korreliert [138], und Cytochrom C andererseits durch seine Rolle bei der Einleitung der Apoptose auch eine wichtige Funktion abseits der mitochondrialen Energiegewinnung besitzt [139].

Die Untereinheit IV der Cytochrom C-Oxidase wurde als einzige kernkodierte Untereinheit der Cytochromoxidase gewählt, von der ein homologes Protein in Hefe bekannt ist [140], eine zentrale Funktion demnach wahrscheinlich ist. Die koordinierte Regulation von *coxIV* mit anderen mitochondrialen Proteinen ist umstritten. Zumindest für die Serum-induzierte Aktivierung in Fibroblasten wurde ein unterschiedliches Verhalten von *cytC* und *coxIV* gezeigt [76], so daß der Vergleich gerade dieser beiden Proteine interessant ist.
Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (mtTFA) wurde aufgrund seiner Funktion bei der Transkription mitochondrial kodierter Gene untersucht. Eine Zunahme der *mtTFA*-Expression geht mit einer Zunahme der mitochondrialen Transkriptionsrate einher [141, 142] und hat zudem Einfluß auf die Replikation der mtDNA [143], so daß durch mtTFA eventuell die koordinierte Expression von Kern- und Mitochondriengenom erfaßt werden kann.
Bezogen auf die Gesamtproteinmenge wurde eine geringe Steigerung der spezifischen Proteinmengen über die allgemeine Proteinzunahme hinaus beobachtet. Bezogen auf den DNA-Gehalt, also die Kopienzahl der Gene, nehmen die Proteinmengen allerdings auf das sechs- bis neunfache zu, so daß von einer starken Aktivierung ihrere Syntheseraten auszugehen ist.
Durch Analyse der mRNA-Mengen (Abbildung 15, S.52) sollte gezeigt werden, ob diese Zunahme durch eine verlängerte Proteinhalbwertszeit, also Stabilisierungsmechanismen, durch die allgemein steigende Proteinbiosyntheserate oder durch erhöhte RNA-Mengen verursacht wird. Eine solche Translationsaktivierung durch die 3'-untranslatierte Region der mRNA ist z. B. für die katalytische β-Untereinheit der ATP-Synthase bekannt [144]. RNA-Stabilisierung wurde ebenfalls für mitochondriale Gene beschrieben, z. B. für die leberspezifische Isoform *coxVIa* [145].
Auch bei dem Vergleich der mRNAs mit dem Gesamt-RNA-Gehalt wurde eine Steigerung von nur 20 bis 70 % in Myotuben beobachtet. Normalisiert auf den DNA-Gehalt der Zelle ist dies allerdings eine Zunahme um den Faktor 10 bis 15.

Die Zunahme von *cytC*, *coxIV* und mtTFA-mRNA bei der Muskeldifferenzierung entspricht also ungefähr der beobachteten Proteinzunahme, so daß davon auszugehen ist, daß weder Proteinstabilisierung noch erhöhte Proteinsynthese-Raten Ursache für die zunehmende Mitochondrienaktivität sind, sondern eine Aktivierung der Transkription und/oder eine Stabilisierung von mRNA. Vergleichbare Werte wurden für die Differenzierung weiterer Myoblastenzell-Linien beschrieben [146].

5.6 Analyse der Promotor-Regulation

Studien an vielen Zelltypen haben gezeigt, daß Zelldifferenzierung hauptsächlich durch Transkriptionsregulation spezifischer Gene erreicht wird [147, 148, 149]. Die Regulation der Transkription stellt die einfachste und effektivste Kontrolle über die Proteinsynthese dar, da keine weiteren Zwischenprodukte entstehen.
Daher wurde zur Aufklärung der Aktivierung der Mitochondrienbiogenese bei der Differenzierung von Myoblasten zunächst die Regulation der drei betrachteten Gene untersucht.

Hierzu wurden zunächst die Promotorregionen der drei gewählten Gene untersucht und durch Sequenzanalysen verglichen:
Alle drei Promotoren besitzen funktionelle Bindungsmotive für einen oder beide *nuclear respiratory factors* NRF1 und NRF2 [45]. Diese Transkriptionsfaktoren sind an der Transkriptionsregulation vieler kernkodierter mitochondrialer Gene beteiligt, haben aber auch regulatorische Funktionen in nicht-mitochondrialen Genen.
Zudem sind im *cytC* und *mtTFA*-Promotor funktionelle Sp1-sites nachgewiesen, auch der *coxIV*-Promotor weist zwei Sp1-consensus-Sequenzen auf.
Sp1 als ubiqitärer Aktivator bindet in der Regel an GC-Boxen in housekeeping-Genen, die an den Grundfunktionen der Zelle beteiligt sind und stets exprimiert werden. Sp1 aktiviert die Initiation des Transkriptosoms über eine glutaminreiche Aktivierungsdomäne [102], die Rate der Aktivierung ist dabei hauptsächlich von der Anzahl und Lokalisierung der Sp1-Bindungen in der Promotorregion des Gens abhängig. Auch viele, wenn nicht alle mitochondrialen Gene werden durch Sp1 aktiviert [150]. Eine Rolle als einziger Regulator für die situationsabhängige Aktivierung der mitochondrialen Gene während der Muskeldifferenzierung ist für Sp1 allerdings unwahrscheinlich, da die Aktivierung durch gesteigerte Sp1-Expression auch nicht-mitochondriale housekeeping-Gene betrifft und andere Aktivierungsmechanismen von Sp1, z. B. durch Interaktion mit weiteren Faktoren, nicht bekannt sind.
Die Promotoren von *cytC* und *coxIV* weisen zudem, im Gegensatz zu mtTFA, je zwei Bindestellen für Faktoren der MyoD-Familie auf, muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung zu Muskelzellen steuern. Neben der Kontrolle der Muskeldifferenzierung hat MyoD, wie Überexpressionsexperimente in Mäusen gezeigt haben, auch einen aktivierenden Einfluß auf die Rate des oxidativen Metabolismus in Muskel [151].
Zudem enthalten alle drei Promotoren ein CREB-Motiv (cAMP-responsive element).

In Myoblasten wurde bisher die Aktivierung der mitochondrialen Atmung durch Phosphorylierung einer Untereinheit von Komplex I über die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA gezeigt [152]. cAMP könnte demnach eine Rolle als Sensor des Energiestatus einer Zelle spielen und über Phosphorylierungen die Modulation der Mitochondrienaktivität katalysieren. Die Funktionalität von cAMP auch als Transkriptionsregulator wurde für eine CREB-site im *cytC*-Gen bei der Serumaktivierung von HeLa-Zellen und der elektrischen Stimulation von Kardiomyocyten ebenfalls gezeigt [76, 153].

Weitere in allen drei Promotoren mehrfach vertretene Motive binden Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie und der AP-Familie (AP1, AP2 und AP4).
Die Transkriptionsaktivatoren der GATA-Familie sind vor allem für ihre Funktion bei der Transkription hämatopoetischer Gene bekannt [154]. Die Proteine GATA-4, -5 und -6 allerdings regulieren die gewebespezifische Expression von Genen auch in anderen mesodermalen und endodermalen Geweben wie Herz, Leber und Lunge [155]. In Skelettmuskulatur wurde bisher anscheinend keine Expression von Faktoren der GATA-Familie gefunden.

Die Gruppe der "Activator proteins" (AP) umfaßt eine Vielzahl an DNA-bindenden Proteinen, die eine transkriptionsaktivierende Funktion besitzen und über Leucinzipper dimerisieren.
Unter AP1 werden Heterodimere von Jun- und Fos-Proteinen, Jun-ATF-Dimere und Jun-Homodimere zusammengefaßt, die an die Zielsequenz TGAGTCA binden [156]. Diese Transkriptionsaktivatoren sind in allen untersuchten Zelltypen bekannt und werden durch eine Vielzahl von Einflüssen stimuliert, z. B. Umweltstreß und Strahlung, aber auch Cytokine, mitogene Wachstumsfaktoren und neoplastische Transformation. Die Spezifität der Reaktion auf diese Einflüsse wird vermutlich durch die Bandbreite der möglichen Dimere vermittelt [157]. Außerdem wird die Bindung und Transkriptionsaktivierung von AP1-Dimeren stark durch die kooperative Interaktion mit weiteren Faktoren beeinflußt, hier sind z. B. NF_NB und Glucocorticoidrezeptor zu nennen. AP1-Bindungsmotive treten häufig als Tandem mit Bindestellen für Faktoren der ETS-Familie auf, möglicherweise erleichtert AP1 die Anlagerung der ETS-Proteine an ihre relativ kurze Erkennungssequenz und vermittelt so die kooperative Funktion. Entsprechende funktionale Tandems von AP1 und ETS wurden z. B. im Gen für Typ1 Collagenase gefunden [158]. In Hefen ist eine Untergruppe der AP-1-Proteine, die yAP-1-Proteine, als Sensoren für oxidativen Streß der Zelle identifiziert worden, die Funktionalität der homologen Proteine in Eukaryonten muß jedoch noch gezeigt werden [159].

Die drei bisher bekannten Faktoren der AP-2-Familie binden ebenfalls als Dimer an eine palindromische Erkennungssequenz und aktivieren die Transkriptionsinitiation über eine prolinreiche Region am Aminoterminus. AP-2 gilt als regulierender Faktor bei Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose, die Regulation der Aktivität erfolgt z. B. über Retinolsäure und cAMP [160].
AP-4, ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, bildet ebenfalls Dimere, ein zusätzlicher Leucin-Zipper in der Proteinstruktur spricht jedoch für ausgeprägte Interaktionen mit weiteren Faktoren [161].

Insgesamt weisen alle drei Promotoren zwei Abschnitte mit hoher Homologie auf:
Die Homologe Region 1 (siehe Promotorkarten im Anhang) umfaßt ca 35 bp und liegt im *cytC*-Promotor nahe am Transkriptionsstart bei –100 bp, während sie im *coxIV*- und im *mtTFA*-Promotor ca. 350 bp vom Transkriptionsstart entfernt liegt (-387 bp bzw. -332 bp).
Der zweite Homologie-Bereich umfaßt ca. 20 bp und liegt im *cytC*-Promotor relativ weit vom Transkriptionsstart entfernt bei –325 bp, im *coxIV*-Promotor bei – 172 bp und im *mtTFA*-Promotor bei –104 bp.

5.6.1 Reportergen-Assay

Die Analyse der klonierten Promotor-Ausschnitte im Luciferase-Reportergen Assay zeigte eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben (Abbildungen 17-25, S. 57ff). Die klonierten *cytC*- und *coxIV*-Promotorsequenzen wurden um den Faktor 3,5 aktiviert, die Promotoraktivität von *mtTFA* wurde sogar auf über 10fache Werte aktiviert.
Diese Steigerungen der Transkription im Reportergen-Assay liegen unter den gemessenen Anstiegen der mRNA-Spezies während der Differenzierung. Diese Unterschiede können aber z. B. durch eine Übersättigung der transfizierten Zellen mit dem Reportergen-Vektor und dadurch auftretende Kompetition um Transkriptionsfaktoren entstehen. Vor allem aber können auch das Fehlen von Enhancer-Strukturen in nicht-klonierten Bereichen der Promotoren oder Einflüsse der RNA-Stabilität der mRNAs diese Unterschiede verursachen. Dennoch bestätigen die Meßwerte die Eignung des verwendeten Reportergen-Systems zur detaillierteren Analyse der Promotor-Regionen, durch die das oder die aktivierenden Elemente bei der Muskeldifferenzierung identifiziert werden sollen.

Die sequentielle Verkürzung der Promotorsequenzen ergab Hinweise auf die Lokalisation der gesuchten Bereiche. Als Maß wurde dabei die beobachtete Steigerung der basalen Promotoraktivität während der Differenzierung verwendet: Im *cytC*-Promotor wurde eine Aktivierung nur dann beobachtet, wenn die Sequenz zwischen –145 und –68 bp im analysierten Promotor enthalten war. Im *mtTFA*-Promotor war dies die Sequenz zwischen –414 und –252 bp. Für den *coxIV*-Promotor konnte bestimmt werden, daß der gesamte in C2F3-Zellen funktionale Promotor, also auch die aktivierenden Elemente, zwischen –126 und +31 bp liegen.

Auffällig ist die Übereinstimmung des im *cytC*-Promotor für die Aktivierung eingegrenzten Bereichs mit der homologen Region I, die auch im *coxIV*- und *mtTFA*-Promotor vorhanden ist. Im Bereich dieser homologen Region befinden sich im *Cytochrom C*-Promotor Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren AP4, c-ETS-1 und AP2.

c-ETS-1 gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, die eine konservierte DNA-Bindungsdomäne enthalten [162, 163]. ETS-1 ist bisher vor allem für die Regulation der Angiogenese und durch die onkogene Wirkung in Leukämien bekannt [164, 165]. Zur Familie der ETS-Proteine gehört allerdings auch der an der Regulation kernkodierter mitochondrialer Proteine beteiligte NRF-2 (bzw. der homologe Faktor GABP in Maus) [49]. Zudem liegt der beschriebene Bereich in der bei Scarpulla et al. [44, 85] beschriebenen “aktivierenden Region 2”, die in den Nierenzell-Linien COS-1 und CV-1 einen deutlichen Beitrag zur Promotoraktivität leistet.

Die vergleichbare Region im *mtTFA*-Promotor liegt ebenfalls innerhalb der Sequenz, die im Reportergen-Assay als auslösend für die Aktivierung während der Differenzierung bestimmt wurde. Der Computer-Analyse nach enthält sie Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren AP2 und 4, nicht jedoch für c-ETS-1. Im *coxIV*-Promotor liegt die homologe Region außerhalb des Minimalpromotors im 5’-Bereich der klonierten Promotorsequenz, allerdings findet sich ein kurzer homologer Abschnitt im *coxIV*-Promotor innerhalb dieser Sequenz (s. Kap. 4.2.7, S. 67ff).

5.6.2 Electromobility shift Assays und Footprint-Analysen

Im Folgenden wurde die Analyse der Promotorstrukturen durch EMSA-Studien der Protein-DNA-Interaktionen fortgesetzt. Hierbei wurden die Untersuchungen auf den Cytochrom C-Promotor konzentriert. Analysiert wurde der Bereich zwischen –145 und –68 bp, der im Reportergen-Assay essentiell für eine Aktivierung der Cytochrom C-Transkription bei der Muskeldifferenzierung war (Abbildungen 26-28, S. 63f).

Hierbei wurden ausschließlich quantitative Unterschiede der detektierten DNA-Proteinkomplexe festgestellt, so daß ein nur in Myoblasten oder differenzierten Myotuben aktives Regulatorprotein als Auslöser der steigenden Expression mitochondrialer Gene auszuschließen ist.

Ingesamt wurden im untersuchten Sequenzbereich acht DNA-Protein-Komplexe gefunden, die unterschiedliche Konzentrationen in Myoblasten und Myotuben besaßen. Hierbei wurden in sechs Fällen Zunahmen der Komplexbindung beobachtet, nur bei zwei Banden wurde in Myoblasten eine stärkere Bindung von Proteinen an das markierte DNA-Fragment gefunden als in Myotuben.

Zur Art und Anzahl der beteiligten Proteine konnte keine Aussage getroffen werden, da ausschließlich Gesamt-Proteinextrakte eingesetzt wurden.

Im Bereich –145 bis –113 bp wurden drei spezifische Protein-DNA-Bindungen gezeigt, eine sehr deutliche Konzentrationszunahme nach der Differenzierung wurde bei einem dieser Komplexe detektiert. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich zwei funktionale CAAT-Boxen und eine AP1-site.

Die überlappende Sequenz von –123 bis -90 zeigte nur eine eindeutig spezifische Proteinbindung, die nur leichte Konzentrationsunterschiede zwischen Myoblasten und Myotuben zeigte. Innerhalb dieser Sequenz liegt ebenfalls die AP-1 site, außerdem eine potentielle Octamer-Sequenz und das bereits beschriebene CREB-Bindungsmotiv [76].

Im Bereich –95 bis –68 bp wurden Konzentrationsverschiebungen bei vier Banden beobachtet, davon drei im Bereich hoher Mobilität. Dieser Bereich entspricht ungefähr der beschriebenen Homologen Region I und enthält Bindestellen für AP4 und c-ETS-1, über deren Funktionalität bisher nichts bekannt ist.

Die im EMSA beobachteten Protein-DNA-Interaktionen sollten durch Footprint-Analysen definierten Sequenzabschnitten der DNA zugeordnet werden. Hierzu wurden die Bindungssequenzen von Proteinen aus Kernextrakten der analysierten Zellen durch DNase-Abbau identifiziert. Als Hindernis stellte sich dabei die extrem schwache Protein-DNA-Bindung heraus, die entweder durch geringe Mengen der DNA-bindenden Proteine oder durch sehr geringe Bindungsaffinitäten von Protein und DNA verursacht wurde. Aufgrund des dadurch schwachen Footprint-Musters war ein quantitativer Vergleich von Myoblasten und Myotuben nicht sinnvoll. Die Identifizierung des durch Protein bedeckten Sequenzbereichs war allerdings eingeschränkt möglich.

Die Region –150 bis –95 bp war beinahe vollständig vor DNase I-Abbau geschützt (Abbildung 28, S. 66). Ursache könnte die Bindung von Proteinen an die bereits beschriebenen zwei CAAT-Motive in diesem Bereich der Sequenz sein. Direkt im Anschluß, im Bereich um –100 bp, war eine weitere Proteinbindungsregion von nur wenigen Basen Länge identifizierbar, eventuell die in [76] beschriebene CREB-site.

Eine weitere Proteinbindung im Bereich von –90 bis –70 bp umfaßte unter anderem die c-ETS-1-consensus-Sequenz, für die in den bisher untersuchten Zellmodellen keine Funktionalität beschrieben wurde.

Die innerhalb dieses Bereichs gefundene Palindrom-Sequenz unterstützt die Annahme, dass in diesem Bereich ein regulatorisches Proteindimer unbekannter Art bindet.

5.6.3 Mutationsanalysen

Die Funktionalität der Proteinbindung im Bereich zwischen –100 und –68 bp des Cytochrom C-Promotors wurde durch Mutationsstudien in Electromobility Shift Assays und im Reportergen-Assay analysiert.

Die EMSA-Studien, durch die der Vergleich der Proteinbindung an modifizierte Sequenzen erfolgte (Abbildung 30Abbildung 31, S. 69f), deuten dabei auf eine Bedeutung der AP4-site bei –84 bp für die Proteinbindung in diesem Bereich: Modifikationen der am Bindungsmotiv beteiligten Basen verursachen eine schwächere Proteinbindung an das eingesetzte DNA-Fragment. Die benachbarten Basen, deren Substitution im Fragment “comp3” analysiert wurde, haben eine geringere Wirkung auf die Bildung von Protein-DNA-Komplexen mit dieser Sequenz, während Mutationen des 8 bp entfernten c-ETS-consensus-Motiv keinen Einfluß auf die Proteinbindung hatten.

Die Analyse der gleichen Region im Reportergen-Assay (Abbildung 32, S. 71) ergab, daß die Veränderung der AP4-site die basale Promotoraktivität in proliferierenden Myoblasten insgesamt deutlich verringerte, die Aktivierung des Promotors während der Muskeldifferenzierung jedoch unverändert blieb. Mutationen der 16 Basen vor dem AP4-Motiv führten zu einer Abnahme der Promotoraktivierung bei gleichbleibender basaler Transkriptionsrate, während die Substitution der folgenden Basen sowohl eine deutlich gesteigerte basale Promotoraktivität als auch eine höhere Aktivierbarkeit bewirkte.

Da die Modifikation der AP4-Site einen Abfall der basalen Promotoraktivität zur Folge hat, ist die alleinige Bindung des aktivierenden Faktors AP4 an diesen Abschnitt des *cytC*-Promotors auszuschließen.

An die AP4-site bzw. die direkt folgenden Basen könnte jedoch ein Protein binden, das nicht als Aktivator während der Differenzierung funktioniert, sondern im Gegenteil die Expression des Gens in Myoblasten stärker als in Myotuben reprimiert.
Die Substitution der Bindungsstelle würde dann einerseits die beobachtete gesteigerte Promotoraktivität in Myoblasten auslösen, da hier die Repression wegfällt. Andererseits bedeutet dies gleichzeitig den Verlust der Promotoraktivierung bei der Differenzierung.
Die palindromische Sequenz dieses Bereichs deutet dabei auf ein Dimer als funktionaler Repressor.

Diese Inhibition erklärt auch im *mtTFA*-Promotor die Steigerung der Promotoraktivität in Myoblasten bei Deletion des Bereichs zwischen –414 und –252 bp, die ebenfalls mit dem Verlust der Aktivierbarkeit in Myotuben während der Differenzierung einhergeht.
Auch die Daten der *cytC*- und *coxIV*-Promotoraktivitäten im Reportergen-Assay lassen sich in diesem Sinne interpretieren:
Die Deletion des beschriebenen Bereichs im *cytC*-Promotor betrifft neben der Repressor-Bindestelle auch einige aktivierende Domänen (CAAT-Boxen, CREB-site) und führt somit zu einer insgesamt verringerten Promotoraktivität.
Im *coxIV*-Promotor wurde die homologe Sequenz im Bereich von –90 bis –50 bp duch die Deletionsstudien nicht berührt; dementsprechend war auch die Aktivierung des Promotors bei bzw. die Inhibierung der Expression vor der Differenzierung der Zellen unbeeinflußt.

Die Suche nach dem Auftreten der aus diesen Ergebnissen und dem Sequenzvergleich der drei Promotoren entwickelten consensus-Sequenz in den Genen anderer kernkodierter Proteine ergab die häufige Präsenz in den Promotorsequenzen kernkodierter Gene. Eine Analyse der Funktionalität erfolgte bisher allerdings noch nicht.

5.7 Vergleich des verwendeten Zellmodells mit Gewebe

Ein kritischer Punkt bei allen experimentellen Analysen an kultivierten Zellen ist die Relevanz der erhaltenen Daten für das Verhalten einer Zelle *in vivo*, das heißt, im gewebespezifischen und physiologischen Kontext.
Allerdings ist es eine experimentelle Herausforderung, diese Vergleichbarkeit des verwendeten Zellmodells mit der differenzierenden Skelettmuskulatur im Embryo oder auch nur im ausgereiften Muskel aufzuzeigen, da die hier verwendeten Reportergenassays nur mit großem Aufwand im Tier durchführbar sind. Als erster möglicher Ansatz wurde daher ein Electromobility Shift Assay mit Kernproteinen aus differenzierten Myotuben und Muskulatur gewählt.

Da sich die saubere Präparation von Zellkernen aus Muskel der Maus als äußerst schwierig erwies, wurde Gewebe aus Ratte zum Vergleich mit Maus-Zellen eingesetzt, um mehr Material verwenden zu können. Trotzdem enthielten die erzeugten Proteinextrakte nur geringe Konzentrationen an Kernproteinen, so daß die Qualität der erzeugten Electromobility shifts (Abbildung 33, S. 72) relativ schlecht war. Die Aussagekraft des EMSA ist daher eingeschränkt, dennoch läßt sich die vergleichbare Elektromobilität einiger Komplexe in kultivierten Zellen und Muskel erkennen. Dies ist ein erster Beleg dafür, daß die beobachteten Regulatoren der Genexpression in kultivierten Zellen auch im differenzierten Muskelgewebe präsent sind. Eine Absicherung der Vergleichbarkeit von kultivierten Zellen mit Muskelgewebe sollte jedoch durch weitere Analysen erfolgen.

Schlußfolgerungen

Die hier postulierte Regulation der untersuchten repräsentativen Gene durch einen Repressor führt zu einem Modell, in dem Zellen ihre mitochondriale Biogenese auf einem möglichst niedrigen Niveau halten. Vorteil dieser strikten Kontrolle wäre einerseits der ökonomische Umgang mit Ressourcen, da mitochondriale Gene ca. 10-20 % der von einer Zelle exprimierten Gene ausmachen. Andererseits sprechen auch die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursachten Schäden in einer Zelle für die Vermeidung "unnötiger" Mitochondrienaktivität. Diese freien Radikale entstehen nicht nur durch UV-Strahlung, sondern vor allem auch durch den Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette und die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff durch die Atmungskettenkomplexe I und III [166] und verursachen oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA. Die vielfältigen Mechanismen, die zum Schutz vor mitochondrialen ROS entstanden sind, betonen dabei die Bedeutung dieser oxidativen Schäden für eine Zelle [167, 168].

Demnach ist es für eine Zelle durchaus sinnvoll, die Energieproduktion durch Mitochondrien sehr eng dem aktuellen Bedarf anzupassen und bei Änderung der energetischen Bilanz auch die mitochondriale Masse bzw. Aktivität entsprechend anzugleichen. Während der Muskeldifferenzierung muß also ein Sensor den gesteigerten Energieverbrauch der Zellen registrieren und die Hemmung der Genexpression reduzieren, was zu dem beobachteten Anstieg der Transkription und Translation führt. Dieses Signalmolekül ist zur Zeit noch unbekannt, eine mögliche Rolle in diesem Zusammenhang könnte AMP zukommen, allerdings wird auch die Funktion der ROS als Mediator der mitochondrialen Auslastung diskutiert [169].

Unberührt von der hier dargelegten Hypothese der Inhibitionsregulation verbleiben allerdings die bereits beschriebenen Regulationen der Promotoraktivität durch andere Faktoren und Signalwege wie z. B. hormonelle Einflüsse, z. B. von Thyroxin [80] oder die Änderung physiologischer Bedingungen wie bei der Kälteadaption von braunem Fettgewebe [23]. Insgesamt ergibt sich also ein weitgespanntes Netzwerk von Signalkaskaden und Effektoren, dessen Komponenten erst zu einem kleinen Teil bekannt sind.

6 Ausblick

Innerhalb dieser Studie wurde ein neues Sequenzelement als potentielles Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiv identifiziert, dessen Interaktionspartner im Zellkern von murinen Muskelzellen noch unbekannt sind. Die Identifizierung der an diese Sequenz bindenden Proteine durch Aufreinigung und Ansequenzieren wird Auskunft darüber geben, ob es sich um ein neues Bindemotiv für bereits bekannte Transkriptionsregulatoren handelt oder ein noch unbekannter Faktor die Expression der hier untersuchten kernkodierten mitochondrialen Proteine beeinflußt. Das Expressionsmuster des so identifizierten Proteins in unterschiedlichen Geweben kann durch Protein bzw. RNA-Nachweise analysiert werden, damit können erste Rückschlüsse auf die Korrelation von Mitochondriengehalt und Expression des Faktors in verschiedenen Zelltypen gezogen werden.
Vor allem aber ist die Funktionalität des bzw. der Proteine bei der Regulation unterschiedlicher mitochondrialer Gene interessant, um das noch lückenhafte Wissen über die koordinierte Regulation der Mitochondrienbiosynthese zu vervollständigen.
Hierzu wäre nach der Identifizierung des entsprechenden Gens der Ansatz des *gene targeting* von großer Bedeutung: Durch Modulation der spezifischen Expression kann die Bedeutung des Proteins für die Kontrolle des Energiehaushaltes einer Zelle untersucht werden. Dabei reicht das Spektrum der Einflußnahme von der totalen Deletion des Gens im transgenen Maus-Modell über gewebespezifische und konditionelle Repression bis zur Überexpression.

Der zweite wichtige Ansatz zur Erforschung der Biogeneseregulation von Mitochondrien ist die Identifizierung der Signalmoleküle, die als Sensor den Energiestatus einer Zelle erfassen und eine entsprechende Rückkopplung auf die Expression mitochondrialer Proteine triggern. Hier stellt AMP den Ausgangspunkt einer potentiellen Signalkette dar, deren Bedeutung für die Zelle aber noch belegt werden muß.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten regulatorische Mechanismen identifiziert werden, die die mitochondriale Aktivität bzw. den Mitochondriengehalt bei der Muskeldifferenzierung steuern.
Hierzu wurde zunächst die Eignung der Zell-Linie C2F3 als Modell für die Mitochondrienbiogenese bei der Muskeldifferenzierung überprüft und bestätigt. Während der Differenzierung von Myoblasten dieser Zell-Linie zu differenzierten Myotuben steigt die mitochondriale Atmung pro Zellkern, gemessen an Sauerstoffverbrauch und Aktivität der Cytochromoxidase, um den Faktor 8 bis 9 an. Ursache hierfür ist eine gesteigerte Genexpression der an der Mitochondrienbiogenese beteiligten Proteine, wie am Beispiel der Gene für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A, Cytochrom C und der Untereinheit IV der Cytochromoxidase gezeigt wurde.
Durch Promotorstudien konnten die Bereiche der Promotoren eingegrenzt werden, die an der Aktivierung der Genexpression beteiligt sind. Im *Cytochrom C*-Promotor wurde so ein Sequenzelement von 24 bp identifiziert, das an der Bildung eines Protein-DNA-Komplexes beteiligt ist und eine reprimierende Wirkung auf die Transkriptionsrate des Gens in Myoblasten vermittelt. Sequenzvergleiche zeigten die Anwesenheit dieser Basenfolge auch in den Effektorbereichen der beiden anderen untersuchten Promotoren.
Die hieraus resultierende Hypothese führt die Expressionssteigerung kernkodierter mitochondrialer Gene während der Muskeldifferenzierung auf die abnehmende Hemmung der Transkription durch einen noch unbekannten Repressor zurück.

8 Literaturverzeichnis

[1] Fawcett (1973). Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle. Urban & Schwarzenberg, München.

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

[3] Soltys BJ, Gupta RS (1994). Changes in mitochondrial shape and distribution induced by ethacrynic acid and the transient formation of a mitochondrial reticulum. J Cell Physiol 159, 281-94.

[4] Kayar SR, Hoppeler H, Mermod L, Weibel ER. (1988). Mitochondrial size and shape in equine skeletal muscle: a three-dimensional reconstruction study. Anat Rec 222, 333-9.

[5] Page E, McCallister LP (1973). Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. Am J Cardiol 31,172-81.

[6] Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. J Cell Biol 42, 68-91.

[7] Eisenberg BR, Kuda AM (1975). Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. J Ultrastruct Res 51, 176-87.

[8] Cavalier-Smith T (1987). The origin of eukaryotic and archaebacterial cells. Ann NY Acad Sci 503, 17-54.

[9] Lang BF, Gray MW, Burger G (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. Annu Rev Genet 33, 351-97.

[10] Karlson P, Doenecke D, Koolman J (1994). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

[11] Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. Biochim Biophys Acta1504, 82-106.

[12] Gattermann N (2000). From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. Leuk Res 24, 141-51.

[13] Fernandez-Moreno MA, Bornstein B, Petit N, Garesse R (2000). The pathophysiology of Mitochondrial Biogenesis: Towards Four Decades of Mitochondrial DNA Research. Mol Genet Metab 71, 481-95.

[14] Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. Crit Rev Biochem Mol Biol 36,107-260.

[15] Zamzami N, Kroemer G (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 67-71.

[16] Shanske AL, Shanske S, DiMauro S (2001). The other human genome. Arch Pediatr Adolesc Med 155(11),1210-6.

[17] Zeviani M, Petruzella V, Carrozzo R (1997). Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signalling. J Bioenerg Biomembr 29, 121-30.

[18] Camougrand N, Rigoulet M (2001). Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. Respir Physiol 128, 393-401.

[19] Pollack M, Leeuwenburgh C (2001). Apoptosis and aging: role of the mitochondria. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 56, B475-82.

[20] Markesbery WR (1999). The role of oxidative stress in alzheimer disease. Arch neurol 56,1449-52.

[21] Langer T, Neupert W (1996). Regulated protein degradation in mitochondria. Experientia 52, 1069-76.

[22] Cuezva JM, Ostronoff LK, Ricart J, Lopez de Heredia M, Di Liegro CM, Izquierdo JM (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. J Bioenerg Biomembr 29, 365-77

[23] Klingenspor M, Ivemeyer M, Wiesinger H, Haas K, Heldmaier G, Wiesner RJ (1996). Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaption. Biochem J 316, 607-13.

[24] Hood DA (2001). Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. J Appl Physiol 90, 1137-57.

[25] Sauleda J, Garcia-Palmer F, Wiesner RJ, Tarraga S, Harting I, Tomas P, Gomez C, Saus C, Palou A, Agusti AG (1998). Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 157, 1413-7.

[26] Raikhinstein M, Hanukoglu I (1993). Mitochondrial-genome-encoded RNAs: Differential regulation by corticotropin in bovine adrenocortical cells. Proc Natl Acad Sci USA 90, 10509-13.

[27] Marone JR, Falduto MT, Essig DA, Hickson RC (1994). Effects on glucocorticoids and endurance training on cytochrome oxidase expression in skeletal muscle. J Appl Physiol 77, 1685-90.

[28] Torroni A, Stepien G, Hodge JA, Wallace DC (1990). Neoplastic transformation is associated with coordinate induction of nuclear and cytoplasmic oxidative phosphorylation genes. J Biol Chem. 265, 20589-93.

[29] Glaichenhaus N, Leopold P, Cuzin F (1986). Increased levels of mitochondrial gene expression in rat fibroblast cells immortalized or transformed by viral and cellular oncogenes. EMBO J 5, 1261-5.

[30] Shoubridge EA (1994). Mitochondrial DNA diseases: histological and cellular studies. J Bioenerg Biomembr 26, 301-10.

[31] Zoll J, Ventura-Clapier R, Serrurier B, Bigard AX (2001). Response of mitochondrial function to hypothyroidism in normal and regenerated rat skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil 22,141-7.

[32] Tata JR (1966). The regulation of mitochondrial structure and function by thyroid hormones under physiological conditions. In: regulation of metabolic processes in mitochondria (Tager JM et al. HRSG), 489-507, Elsevier, Amsterdam.

[33] Gibbs C (1999). Respiratory control in normal and hypertrophic hearts. Cardiovasc Res 42, 567-70.

[34] WicksKL, Hood DA (1991). Mitochondrial Adaptions in denervated muscle: relationships to performance. Am J Physiol 260, C841-851.

[35] Desplanches G, Kayar SR, Sempore B, Flandrois R, Hoppeler H (1990). Rat soleus muscle ultrastructure after hindlimb suspension. J Appl. Physiol 69, 504-508.

[36] Glick B, Schatz G (1991). Import of proteins unto mitochondria. Annu Rev Genet 25, 21-44.

[37] Wiesner RJ, Ruegg JC, Morano I (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. Biochem Biophys Res Commun 183, 553-9.

[38] Gelfand R, 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, 497-501.

[39] Clayton DA (2000). transcription and replication of mitochondrial DNA. Human Reprod 15 (Suppl. 2), 11-7.

[40] Dubin DT, Montoya J, Timko KD, Attardi G (1982). Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa mitochondrial ribosomal RNAs. J Mol Biol 1, 1-19.

[41] Fisher RP, Clayton DA (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. Mol Cell Biol 8, 3496-509.

[42] Davis AF, Clayton DA (1996). In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. J Cell Biol 135, 883-93.

[43] Suske G (1999). The SP-family of transcription factors. Gene 238, 291-300.

[44] Evans MJ, Scarpulla RC (1989). Interaction of Nuclear factors with mutiple sites in the somatic cytochrome C promoter. J Biol Chem 264, 14361-68.

[45] Scarpulla RC (1997). Nuclear control of respiratory Chain Expression in mammalian cells. J Bioenerg Biomembr 29, 109-119.

[46] Virbasius JV, Scarpulla RC (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 91, 1309-13.

[47] Huo L, Scarpulla RC (2001). Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. Mol Cell Biol 21, 644-54.

[48] Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC (1993). Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. Genes Dev 7, 2431-45.

[49] Virbasius JV, Scarpulla RC (1991). Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. Mol Cell Biol 11, 5631-38

[50] Gugneja S, Virbasius JV, Scarpulla RC (1995). Four structurally distinct, non-DNA-bindung subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. Mol Cell Biol 15, 102-11.

[51] Bachman NJ, Yang TL, Dasen JS, Ernst RE, Lomax MI (1996). Phylogenetic footprinting of the human cytochrome c oxidase subunit Vb promoter. Arch Biochem Biophys 333, 152-62.

[52] Villena JA, Martin I, Vinas O, Cormand B, Iglesias R, Mampel T, Giralt M, Villarroya F (1994). ETS transcription factors regulate the expression of the gene for the human mitochondrial ATP synthase beta-subunit. J Biol Chem 269, 32649-54.

[53] Genuario RR, Kelley DE, Perry RP (1993). Comparative utilization of transcription factor GABP by the promoters of ribosomal protein genes rpL30 and rpL32. Gene Expr 3, 279-288.

[54] Knutti D, Kaul A, Kralli A(2000). A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functionl genetic screen. Mol Cell Biol 20, 2411-22.

[55] Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, McDonnell DP (2000). Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. J Biol Chem 275, 16302-08.

[56] Knutti D, Kralli A (2001). PGC-1, a versatile coactivator. Trends Endocrin Metabol 12, 360-365.

[57] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant V et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and function through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell 98, 115-24.

[58] Michael LF, Wu Z, Cheatham B, Puigserver P et al. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. PNAS 98, 3820-5.

[59] Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. Nature 413, 179-83.

[60] Monsalve M et al. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing trough the thermogenic coactivator PGC-1. Mol Cell 6, 307-16.

[61] Andersson U, Scarpulla RC (2001). PGC-1-related coactivator, anovel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. Mol Cell Biol 21, 3738-49.

[62] Suzuki H, Hosokawa Y, Nishikimi M, Ozawa T (1990). Existence of common homologous elements in the transcriptional regulatory regions of human nuclear genes and mitochondrial gene for the oxidative phosphorylation system. J Biol Chem 271, 2112-20.

[63] Suzuki H, Suzuki S, Kumar S, Ozawa T (1995). Human nuclear and mitochondrial Mt element-binding proteins to regulatory regions of the nuclear respiratory genes and to the mitochondrial promoter region. Biochem Biophys Res Commun 213, 204-10.

[64] Chung AB, Stepien G, Haraguchi Y, Li K, Wallace DC (1992). Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase β subunit. J Biol Chem 267, 21154-61.

[65] Short KR, Nygren J, Barazzoni R, Levine J, Nair KS (2001). T(3) increases mitochondrial ATP production in oxidative muscle despite increased expression of UCP2 and -3. Am J Physiol Endocrinol Metab 280, E761-9.

[66] Korohoda W, Pietrzkowski Z, Reiss K (1993). Chloramphenicol, an inhibitor of mitochondrial protein synthesis, inhibits myoblast fusion and myotube differentiation. Folia Histochem Cytobiol 31, 9-13.

[67] Hamai N, Nakamura M, Asano A (1997). Inhibition of mitochondrial Protein Biosynthesis Impaired C2C12 Myoblast Differentiation. Cell Struct Function 22, 421-31.

[68] Herzberg NH, Zwart R, Wolterman RA, Ruiter JPN, Wanders RJA, Bolhuis PA, van den Bogert C (1993). Differentiation and proliferation of respiratory-deficient human myoblasts. Biochim Biophys Acta 1181, 63-67.

[69] Hawke TJ, Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J Appl Physiol 91, 534-51.

[70] Asakura A, Komaki M, Rudnicki M (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. Differentiation 68, 245-53.

[71] Yan Z, Booth FW (1998). Cytochrome C promoter activity in soleus and white vastus lateralis muscles in rats. J Appl Physiol 85, 973-8.

[72] Lewin B (1994). Genes V. Oxford University Press, Oxford.

[73] Werner T (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. Mam Genome 10, 168-175.

[74] Winder WW, Baldwin KM, Holloszy JO (1974). Enzymes involved in ketone utilization in different types of muscle: adaption to exercise. Eur J Biochem 47, 461-7

[75] Gupte SS, Hackenbrock CR (1988. The role of cytochrome C diffusion in mitochondrial electron transport. J Biol Chem 263, 5248-53.

[76] Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC (2000). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. J Biol Chem 275, 13134-41.

[77] Kadenbach B, Merle P (1981). On the function of multiple subunits of cytochrome c oxidase from higher eukaryotes. FEBS Letters 135, 1-11.

[78] Huttemann M, Kadenbach B, Grossman LI (2001). Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome C oxidase. Gene 267, 111-23.

[79] Merle P, Jarausch J, Trapp M, Scherka R, Kadenbach B (1981). Immunological and chemical characterization of rat liver cytochrome c oxidase. Biochim Biophys Acta 669, 222-30.

[80] Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R (1992). Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. Mol Endocrinol. 6, 1458-67.

[81] Virbasius JV, Scarpulla RC (1990). The rat cytochrome C oxidase subunit IV gene family: tissue-specific and hormonal differences in subunit IV and cytochrome C mRNA expression. Nucl Acids Res 18, 6581-6.

[82] Shadel GS, Calyton DA (1997). Mitochondrial DNA Maintenance in Vertebrates. Ann Rev Biochem 66, 409-435.

[83] Clemen CS, Hofmann A, Zamparelli C, Noegel AA (1999). Expression and localisation of annexin VII (synexin) isoforms in differentiating myoblasts. J Muscle Res Cell Motil 20, 669-79.

[84] Virbasius JV, Scarpulla RC (1991). Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. Mol Cell Biol 11, 5631-8.

[85] Evans MJ, Scarpulla RC (1988). Both upstream and intron sequence elements are required for elevated expression of the rat somatic cytochrome c gene in COS-1 cells. Mol Cell Biol 8, 35-41.

[86] Tominaga K, Akiyama S, Kagawa Y, Ohta S (1992). Upstream region of a genomic gene for human mitochondrial transcription factor 1. Biochim Biophys Acta 1131, 217-9.

[87] Ausubel FM, Brent R, Kongston RE, Moore DE, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1990). Short protocols in molecular biology, 2nd Edition. J. Wiley & Sons, New York

[88] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-91.

[89] Sellner LN, Coelen RJ, Mackenzie JS (1992). Reverse trabscriptase inhibits Taq polymerase activity. Nucl Acids Res 20, 1487-90.

[90] Sambrrok J, Russel DW (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

[91] Fourney RM, Miyakoshi J, Day RS, Paterson MC (1988). Northern blotting efficient RNA staining and transfer. Focus 10, 5-7.

[92] Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA (1994). Comparison of Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase and 28S-Ribosomal RNA Gene Expression as RNA Loading Controls For Northern Blot Analysis of Cell Lines of Varying Malignant Potential. Anal Biochem 216, 223-6.

[93] Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein-dye binding. Annals Biochem 72, 248-54.

[94] Lämmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of thh head of bacteriophage R4. Nature 277, 680-5.

[95] Harlow, E. and Lane, D. (Eds.), Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988.

[96] Zak R, Etlinger J, Fischman DA (1972). Studies on the fractionation of skeletal and heart muscle. In: Research in muscle development and the muscle spindle. Eds: Banker BQ, Przybylski PS, van der Meulen JP, Victor M. Excerpta Medica, Amsterdam.163-174.

[97] Graham J, Ford T, Rickwood D (1994). The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. Anal Biochem 220, 363-73.

[98] Maxam AM, Gilbert W (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol. 65, 499-559.

[99] Schneider WC (1960). Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods Enzymol.65, 499-559.

[100] Osborn M, Weber K. (1982). Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. Methods Cell Biol. 24, 97-132.

[101] Genomatix, www.genomatix.de

[102] Krauss G (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Wiley-VCH, Weinheim

[103] Rudnicki MA, Jaenisch R (1994). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. BioEssays 17, 203-9.

[104] McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT (2001). Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. Proc Natl Acad Sci USA 98, 13699-704.

[105] Koleske AJ, Young RA (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. Trends Biochem Sci 20, 113-6.

106 Riedl T, Egly JM (2000). Phosphorylation in transcription: the CTD and more. Gene Expr 9, 3-13.

107 Bensaude O, Bonnet F, Casse C, Dubois MF, Nguyen VT, Palancade B (1999). Regulated phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain (CTD). Biochem Cell Biol 77, 249-55.

108 Williams T, Tjian R (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. Genes Dev 5, 670-82.

109 Hunter T, Karin M (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. Cell 70, 375-87.

110 Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 377, 397-404.

111 Guarente L (1995). Transcriptional coactivators in yeast and beyond. Trends Biochem Sci 20, 517-21.

112 Gogos JA, Thompson R, Lowry W, Sloane BF, Weintraub H, Horwitz M (1996). Gene trapping in differentiating cell lines: regulation of the lysosomal protease cathepsin B in skeletal myoblast growth and fusion. J Cell Biol 134, 837-47.

113 Devlin RB, Emerson CP (1978). Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. Cell 13, 599-611.

114 Moyes CD, Mathieu-Costella OA, Tsuchiya N, Filburn C, Hansford RG (1997). Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. Am J Physiol 272, C1345-51.

115 Stryer L (1995). Biochemistry – 4th Edition. W. H. Freeman and Company, New York.

116 Tian R, Musi N, D'Agostino J, Hirshman MF, Goodyear LJ (2001). Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. Circulation 104, 1664-9.

117 Webster KA, Gunning P, Hardeman E, Wallace DC, Kedes L (1990). Coordinate reciprocal trends in glycolytic and mitochondrial transcript accumulations during the in vitro differentiation of human myoblasts. J cell Physiol 142, 566-73.

118 Bolhuis PA, de Zwart HJ, Ponne NJ, de Jong JM (1985). Free-energy carriers in human cultures muscle cells. Muscle Nerve 8, 22-6.

119 Leary SC, Battersby BJ, hansford RG,Moyes CD (1998). Interactions between bioenergetics and mitochondrial biogenesis. Biochim Biophys Acta 1365, 522-30.

[120] Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. EMBO J 17,1688-99.

[121] Vincent MF, Marangos P, Gruber HE, Van den Berghe G (1991). Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII, Part B. Plenum Press, New York.

[122] Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, Vallega G, Pilch PF (2000). UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia and AMP-activated protein kinase. Am J Physiol Endocrinol Metab 279, E622-9.

[123] Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. EMBO J 17, 1688-99.

[124] Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab 281, E1340-6.

[125] David Carling, London, persönliche Mitteilung.

[126] Korohoda W, Pietrzkowski Z, Reiss K (1993). Chloramphenicol, an inhibitor of mitochondrial protein synthesis, inhibits myoblast fusion and myotube differentiation. Folia Histochem Cytobiol 31, 9-13.

[127] Hamai N, Nakamura M, Asano A (1997). Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C2C12 myoblast differentiation. Cell Struct Funct 22, 421-31.

[128] Sobreira C, King MP, DavidsonMM, Park H, Koga Y, Miranda AF (1999). Long-term analysis of differentiation in human myoblasts repopulated with mitochondria harbouring mtDNA mutations. Biochem Biophys Res Com 266, 179-86.

[129] Tiivel T, Kadaya L, Kuznetsov A, Käämbre T, Peet N, Sikk P, Braun U, Ventura-Clapier, Saks V, Seppet EK (2000). Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo. Mol Cell Biochem 208, 119-28.

[130] Kay L, Li Z, Mericskay M, Olivares J, Tranqui L, Fontaine E, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Samuel JL, Rappaport L, Usson Y, Leverve X, Paulin D, Saks VA (1997). Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo An analysisi of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. Biochom Biophys Acta 1322, 41-59.

[131] Lenka N, Vijayasarathy, Mullick Jayati, Avadhani NG (1998) Structural organisation and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. Prog Nucl Acids Res 61, 309-37.

[132] Williams RS, Garcia-Moll M, Mellor J, Salmons S, Harlan W (1987). Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression nuclear genes encoding mitochondrial proteins. J Biol Chem 262, 2764-7.

[133] Luciakova K, Li R, Nelson BD (1992). Differential regulation of the transcript levels of some nuclear-encoded and mitochondrial-encoded respiratory-chain components in response to growth activation. Eur J Biochem 207, 253-7.

[134] Luciakova K, Nelson BD (1992). Transcript levels for nuclear-encoded mammalian mitochondrial respiratory-chain components are regulated by thyroid hormone in an uncoordinated fashion. Eur J Biochem 207, 247-51.

[135] Huttemann M, Arnold S, Lee I, Muhlenbein N, Linder D, Lottspeich F, Kadenbach B (2000). Turkey cytochrome c oxidase contains subunit VIa of the liver type associated with low efficiency of energy transduction. Eur J Biochem 267, 2098-104.

[136] Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM (2001) Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. J Biol Chem 276, 46104-10.

[137] Frank V, Kadenbach B (1996). Regulation of the H+/e- stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. FEBS Lett 382, 121-4.

[138] Connor MK, Irrcher I, Hood DA (2001). Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome C involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells. J Biol Chem 276, 15898-904.

[139] Zamzami N, Kroemer G (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 67-71.

[140] Speijer D, Breek CK, Muijsers AO, Groenevelt PX, Dekker H, de Haan A, Benne R (1996). The sequence of a small subunit of cytochrome c oxidase from Crithidia fasciculata which is homologous to mammalian subunit IV. FEBS Lett 381, 123-6.

[141] Clayton DA (1998). Nuclear-mitochondrial intergenomic communication. Biofactors 7, 203-5.

[142] Gordon JW, Rungi AA, Inagaki H, Hood DA (2001). Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. J Appl Physiol 90, 389-96.

[143] Gensler S, Weber K, Schmitt WE, Perez-Martos A, Enriquez JA, Montoya J, Wiesner RJ (2001). Mechanism of mammalian mitochondrial DNA replication: import of mitochondrial transcription factor A into isolated mitochondria stimulates 7S DNA synthesis. Nucleic Acids Res 29, 3657-63.

[144] Di Liegro CM, Bellafiore M, Izquierdo JM, Rantanen A, Cuezva JM (2000). 3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function in vivo as enhancers of translation. Biochem J 352, 109-15.

[145] Thames EL, Newton DA, Black SA Jr, Bowman LH (2000). Role of mRNA stability and translation in the expression of cytochrome c oxidase during mouse myoblast differentiation: instability of the mRNA for the liver isoform of subunit VIa. Biochem J 351, 133-42.

[146] Lomax MI, Coucouvanis E, Schon EA, Barald BF (1990). Differential expression of nuclear genes for cytochrome c oxidase during myogenesis. Muscle Nerve 13, 330-7.

[147] Buckingham ME, Dexter TM. (1997). Differentiation and gene regulation. From the regulation of growth, differentiation, and death in vitro to the onset and maintenance of differentiation in vivo. Curr Opin Genet Dev 7, 577-81.

[148] Maniatis T, Weintraub H (1992). Gene expression and differentiation. Curr Opin Genet Dev 2, 197-8.

[149] Wieland S (1997). Genexpression. Grundlagen und Pathogenese. Dtsch. med Wschr. 122, 1457-60.

[150] Zaid A, Li R, Luciakova K, Barath P, Nery S, Nelson BD (1999). On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverese mammalian oxidative phosphorylation genes. J Bioenerg Biomembranes. 31, 129-35.

[151] Hughes SM, Chi MMY, Lowry OH, Gundersen K (1999). Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. J Cell Biol 145, 633-42.

[152] Technikova-Dobrova Z, Sardanelli AM, Speranza F, Scacco S, Signorile A, Lorusso V, Papa S (2001). Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of mammalian mitochondrial proteins: enzyme and substrate characterization and functional role. Biochemistry 40, 13941-7.

[153] Xia Y, Buja M, Scarpulla RC, McMillin JB (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and diferentiation. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 11399-404.

[154] Weiss MJ, Orkin SH (1995). GATA transcription factors: Key regukators of hematopoiesis. Exp Hematol 23, 99-107.

[155] Moltekin JD (2000). The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. J Biol Chem 275, 38949-52.

[156] Van Dam H, Castellazzi (2001). Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. Oncogene 20, 2453-64.

[157] Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. 20, 2378-89.

[158] Wisdom R (1999). AP-1: one switch for many signals. Exp Cell Res 253, 180-85.

[159] Toone WM, Morgan BA, Jones N (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. Oncogene 20, 2336-46.

[160] Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. Gene 260, 1-12.

[161] Aranburu A, Carlsson R, Persson C, Leanderson T (2001). Transcription factor AP-4 is a ligand for immunoglobulin-$_K$ promoter E-box elements. Biochem J354,431-8

[162] Macleod K, Leprince D, Stehelin D (1992). The ets gene family. Trends Biochem Sci 17, 251-6.

[163] Tymms MJ, Kola I (1994). Regulation of gene expression by transcription factors Ets-1 and Ets-2. Mol Reprod Dev 39, 208-14.

[164] Sato Y (2001). Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. Cell Struct Funct 26, 19-24.

[165] Dhulipal PD (1997). Ets oncogene family. Indian J Exp Biol 35, 315-22.

[166] Casteilla L, Rigoulet M, Penicaud L (2001). Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. IUBMB Life 52, 181-8.

[167] Skulachev VP (2000). Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "it is better to die than to be wrong". IUBMB Life 49, 365-73.

[168] Mitra S, Boldogh I, Izumi T, Hazra TK (2001). Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. Environ Mol Mutagen 38, 180-90.

[169] Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82, 47-95.

9 Anhang

9.1 Promotorkarten

9.1.1 Cytochrom C-Promotor

```
                    A GCTTGCCTGC ACACCCTCCT TGTTTTTTCT -601
                                   SRY         CEBPB

ACAAACTAGG GGAAGAAAAC AGGGATAAGA TCCCGTCTGC CACATGTACC -551
         CEBPB          GATA    GATA        USF MyoD

GCACCATCCC CAGCTTTGAG GCTTTCACTG GGAGAACAGA AGATGGTTTA -501
           AP4

ACAGAGTGAA GGTCACCAGC ATGAGTCCGG TGCAGTTACG CTAGTCAGGG -451
            AP1                                AP1

AATCTAGACC AAGCCTGGGT AAAGGTCGCC TTCAGACTGG GCGGCGG-TC -401
                                            SP1/GC

TTAGCACTAC CCGTGGGCGG AGGCAGAAGG AGTCCTAAGA GCCGGTGTTA -351
         AP1    SP1
         CEBPB  GC

CCTGAGCCCA GCCGCACCCA AATCCCGAGG GAGCGACCAC CCCGCTACTC -301
        AP4              AP2

GCTCCTCCCC AACACGCAGG CCGGAGGGTG ACGTCATCCA CGTCCACGCC -251
 GC SP1                    AP2  CREB/ATF
    GC                         AP1  AP1

TTACGTCCAA GGGCCTGTCG TAAGTGTCGG GCAAACGAGG CCTCTAGAGG -201
                  CEBPB        CEBPB              NRF2

AAGGGCGCCC TCTCGGTACA ACCTACCATG CTAGCCCGCA TGCGCGCGCA -151
                                   AP2

CCTTGCTAGC GCTCCCAATC CTGGAGCCAA TGACATGCGG CTACGTCACG -101
              CAAT        CAAT  AP1 Oct     CREB/ATF

GCGCAGTGCC CGGCGCTGCC GCACGTCCGG CCGCGGGAGG GCAGAACAAG  -51
              AP4       c-ETS-1    AP2          MyoD

TGTGGTTGCA TTGACACCGG TACATAGGCG CGGGCCGGCG TGTCCTTGGG   -1
USF         AP1

CTAGAGAGCG GGACGTCTCC CTAAGAGTCT GATCCTTTGT GGTGTTGACC  +50
                                 GATA            AP1

AGCCCGGACC GGTGAGCGCG CGACGGGGAC GCGGGGCGGG AAGAGGGCGA +100
           USF                   AP2SP1 NRF2
                                       GC

GGAGACCGAG GCAGGCCTGA CCTACAAAGA CATGCG                    +135
                  AP1
```

9.1.2 CoxIV-Promotor

```
                                        GGATCCGCT TGCCTCCCTA -651
                                                        GATA

TCCCGAGCGC TGCCTTTAAG AATGTACACC ACACTCGGTT TCTTGGTAAT -601
         AP4

TTTACGAAAC TTCGAGAGCT CGCTCGTTAG GCTGCGTACT CGGGAGCAGG -551
 CEBPB
    CEBPB

CGCTCCTCCT CCCTCGAAGG GCGCCTGACT TCGCCCAGCC CAGAACCCCG -501
                           AP1

CCGTGGCCCC GAGCTTACTA GGGTGAGCGC CACCTCCAGC ATGGGCGTCA -451
                                                CREB/ATF
                                                     AP1

GAGCCAGCGT GCCGTGGAAG AGCGGGATGC AGTCCACGAA GAGAGTGTGG -401

TTGCCCGCGC CGGGAGGATG CTCCTTGCGC GGCCTCTGCC TCTCTGCCAC -351

CAGAAGCCCG TTGACGGCGC AGTGCGGGTA CTTGGCGCCG TGTAGCACCA -301
      AP2 CREB/ATF
            AP1

TCTTGCAGTA GGCCTGGGTG GTCAGCTTCA CGCCAGGCAT GCTGAGCCTA -251
 CEBPB               AP1/AP4

GCTGCTCGCG TCGCGACCAA CGCACCACAG TACGAAACAC GACCCCACTG -201
AP4

CACGCTAAGA TGAGCTCCCA CCACCAGCTA CAGCCTCCCG CCTCAGTCCG -151
                           AP4                     SP1

CCCGCCGGAA AGCGTAGTCG CTAGCTAGCG TCTGCCAGAA AGCAGCGCGG -101
  AP2                                       AP4

CCTGCTCGGC CTTTCGCGAC AGCTGCCGCA CCGCGATCTG AAGCTGATGG  -51
           CEBPB   MYOD MYOD       GATA      AP4
            E2F       AP4

GCGTGGGCGG GGCTTCTTCG ATTCCCGCGA TGCTTCGCGG CACCGTCTTG   -1
    SP1/GC

CTCTTCCGGT GCGGGACCCG CTCTTCCGGT C
   NRF2                 NRF2
```

9.1.3 mtTFA-Promotor

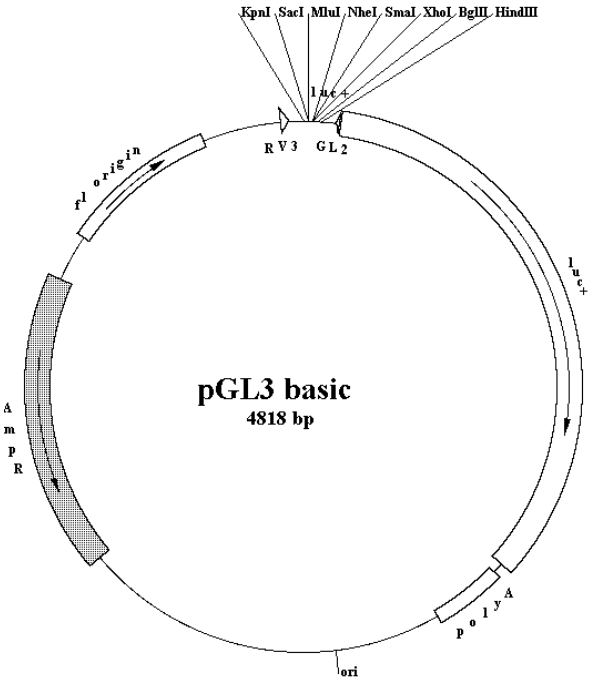
```
                                                AGCT CCAGCCCTGG -401

CTTGAACTGA GACGCTCCGC TGGGCGCGCA GCAGCCGCCG ATCGGACCTC -351
                       AP2/4     AP4

GGGGTCCTGG ATGCAGGACT GTCTGTTACG TACAGCCCTT GTGACCGTCA -301
                                CREB          USF   CREB/ATF
                                                      AP1

CGGGCGGATA CCGGCCAACG CCGGGTTGGG GTGAGGCCGC CGCCGCGGTC -251
USF    GATA

CCTCCATCAC CCTCCTGGCC CGGCAGAGGA ACCCACTGCT CCGGGCGGCC -201
                                               AP2

GGGGACAGAG GTGGCTCAAC AGAGCCGCCT CGAAGCCAGA GCCCTCCGCA -151

GGCTAGAGGA TTGCGGTTTC CCTTCATCTC CGCGGCTCTT ATTCCTCCCC -101
                            GATA

CGCGAGGCCG CCCACCGGGG TACGCTCTCC CGCGCCTGCG CCAATTCCGC  -51
         SP1 AP2                              NRF1       SP1
                                                          GC

CCCGCCCCGC CCCCATCTAC CGACCGGATG TTAGCAGATT TCCCATAGTG   -1
   SP1   SP1          NRF2
   GC    GC

CCTCGCTAGT GGCGGGCATG ATAACACACG CCGGAGGGTC GCA         +43
                      GATA               AP2
```

AP1	Activator Protein 1	ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktoren
AP2	Activator Protein2	
AP4	Activator Protein 4	
ATF	Activating Transcription Factor	
CAAT	CAAT-Box Binding Protein	
CEBPB	CCAAT/Enhancer Binding Protein β	
c-ETS-1	c-ETS-1, Transkriptionsfaktor aus der ETS-Familie	
CREB	cAMP-responisve element binding site	
E2F	E2F-myc activator, Zellzyklus-regulator	
GATA	GATA-bindende Faktoren	
GC	GC-reiche Region	
MyoD	MyoD, muskelspezifischer Transkriptionsfaktor aus der Myogenin-Familie	
NRF1	nuclear respiratory factor 1, häufig in mitochondrialen Genen	
NRF2	nuclear respiratory factor 2, häufig in mitochondrialen Genen, ETS-Familie	
Oct	Octamer Binding Factor 1	
SP1	SP1, ubiquitärer Aktivator in housekeeping-Genen	
USF	Upstream Stimulating Factor	

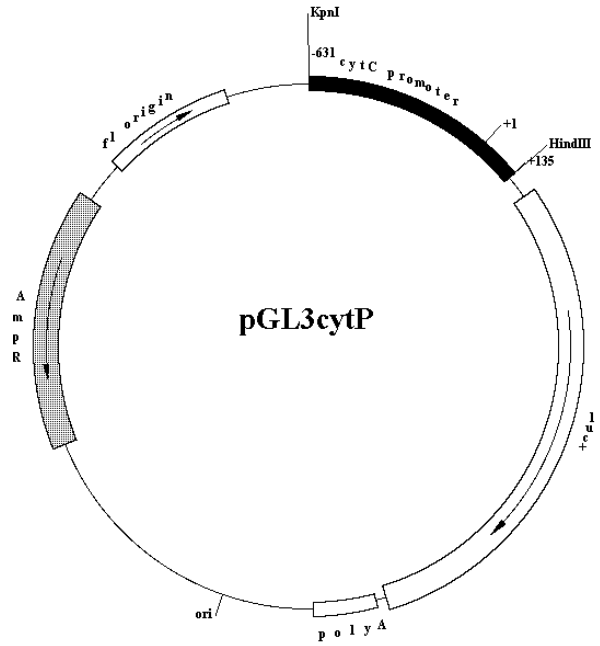
Homologe Region I

Homologe Region II

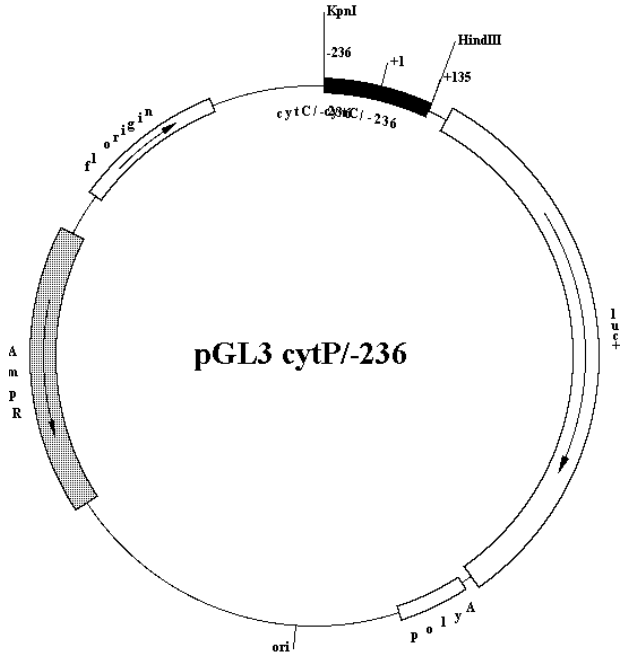
9.2 Vektorenkarten



pGL3 basic
Promega
EMBL Acc.-No. U47295



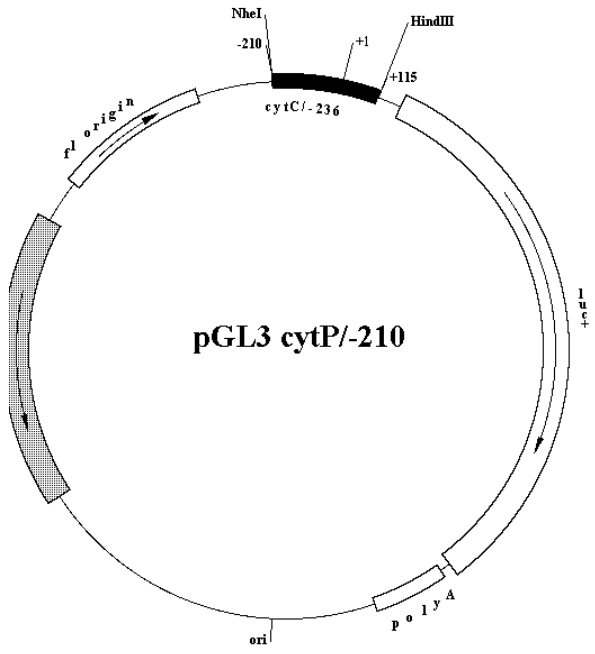
pGL3cytP
Insert aus PCR-Produkt
(KpnI/HindIII geschnitten),
kloniert in KpnI/HindII-Schnittstellen
des Vektors pGL3 basic



pGL3cytP/-236

Insert bei Restriktion von pGL3cytP mit NheI und HindIII entstanden,

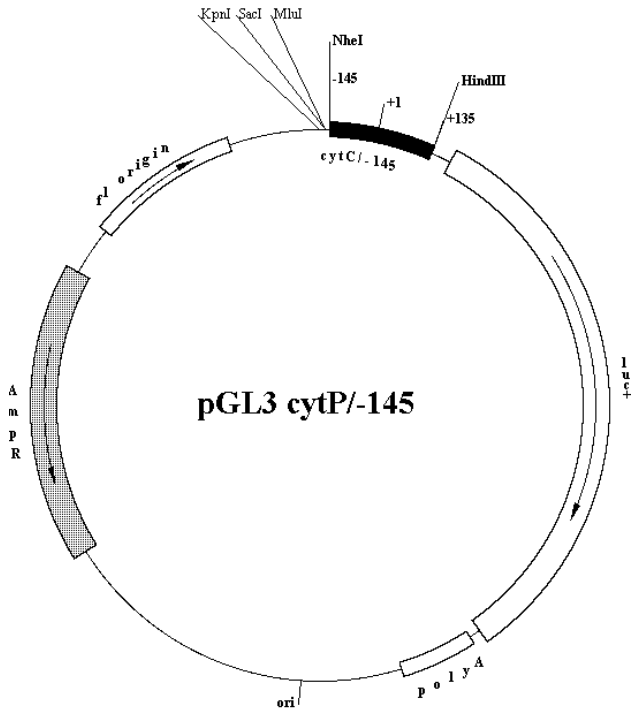
kloniert in pGL3(HindIII, SacI->blunt)



pGL3cytP/-210

Insert aus Restriktion von pGL3cytP mit StuI,

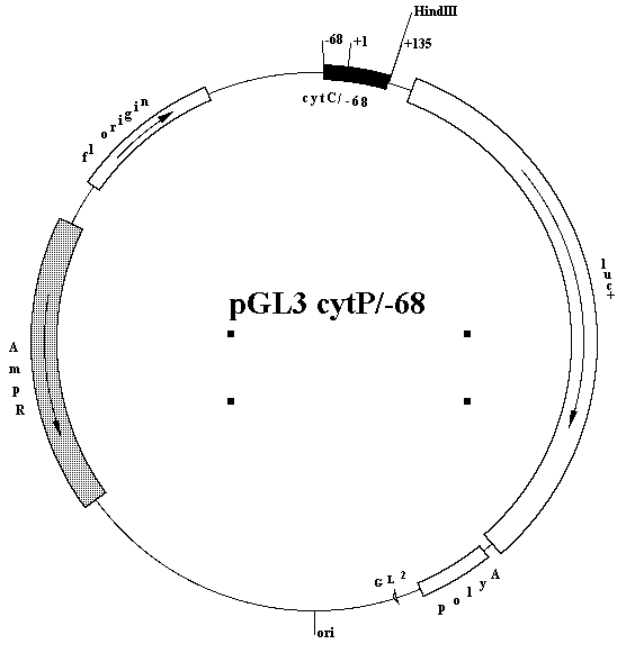
kloniert in pGL3 (SmaI)



pGL3cytP/-145

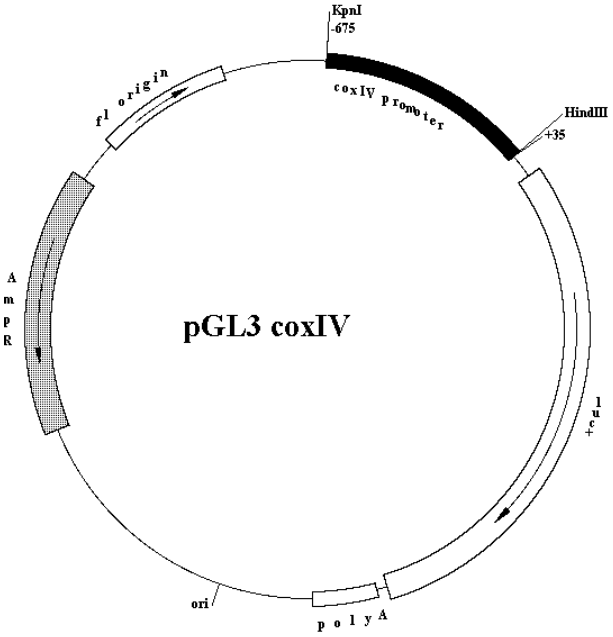
Insert aus Restriktion von pGL3cytP mit NheI und HindIII,

kloniert in pGL3 (NheI, HindIII)

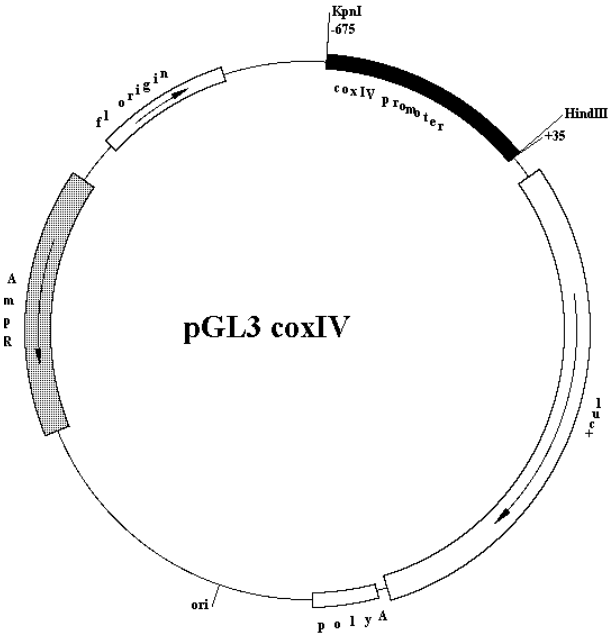


pGL3cytP/-68

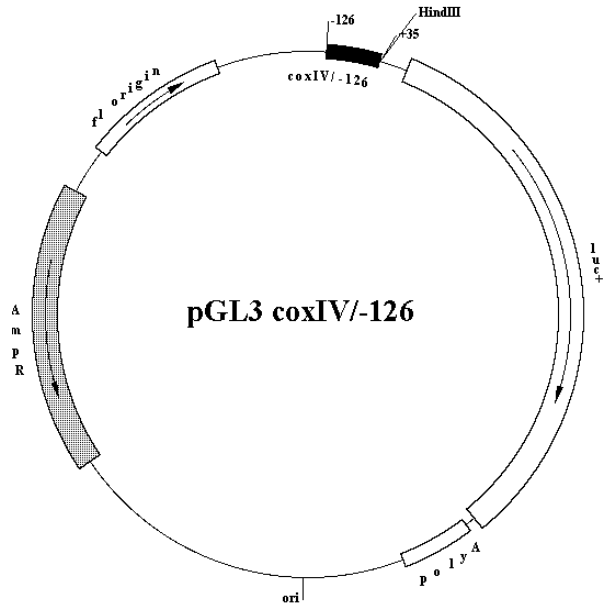
enstanden durch Verdau von pGL3 cytP mit SacII und KpnI und Religation nach Glätten der Enden mit Klenow-Enzym



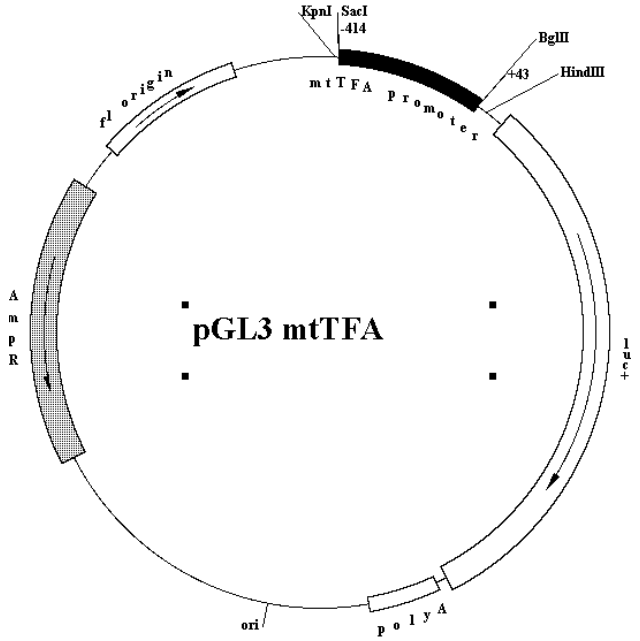
pGL3coxIV
Insert aus PCR-Produkt
(KpnI/HindIII geschnitten),
kloniert in KpnI/HindII-Schnittstellen des
Vektors pGL3 basic



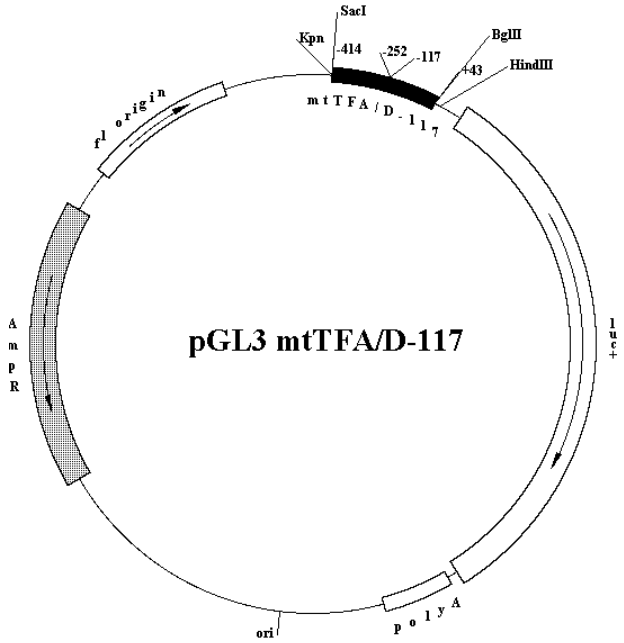
pGL3coxIV/-298
enstanden durch Verdau von pGL3coxIV
mit StuI und KpnI und Religation nach
Glätten der Enden mit Klenow-Enzym



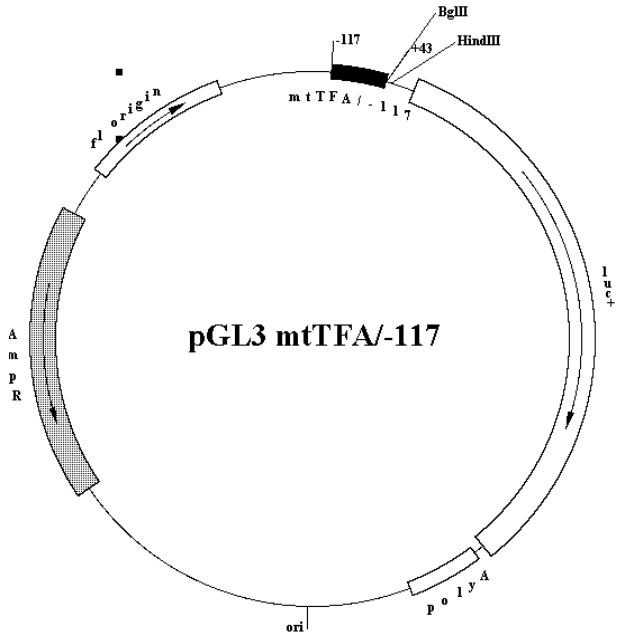
pGL3coxIV/-126
enstanden durch Verdau von pGL3coxIV mit NheI und KpnI und Religation nach Glätten der Enden mit Klenow-Enzym



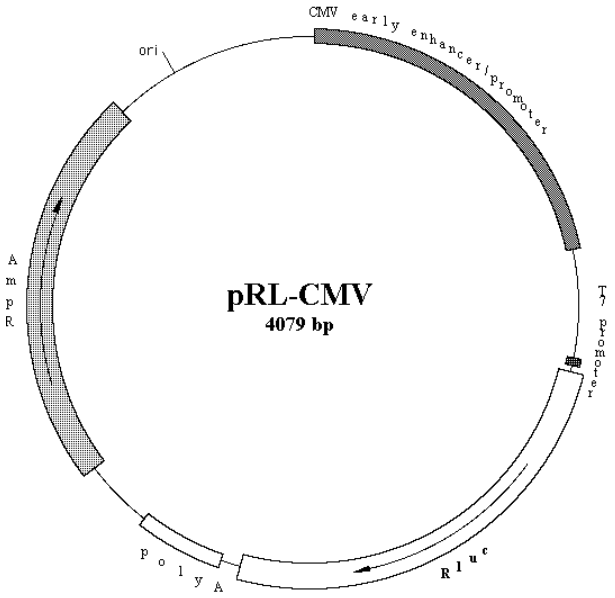
pGL3 mtTFA
Insert aus PCR-Produkt (SacI/BglII geschnitten), kloniert in SacI/BglII-Schnittstellen des Vektors pGL3 basic



pGL3mtTFA/D-117
entstanden aus pGL3 mtTFA durch Verdau mit SacII und Religation



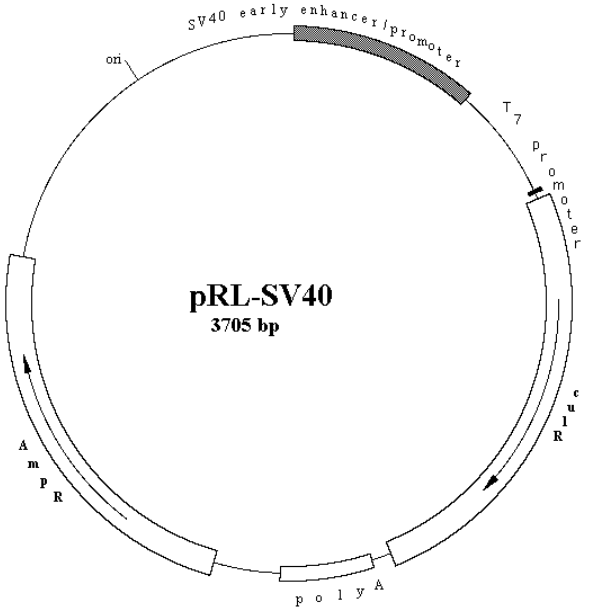
pGL3mtTFA/-117
enstanden durch Verdau von pGL3mtTFA mit KpnI und SacII und Religation nach Glätten der Enden mit Klenow-Enzym



pRL-CMV

Promega

EMBL Acc.-No. AF025843

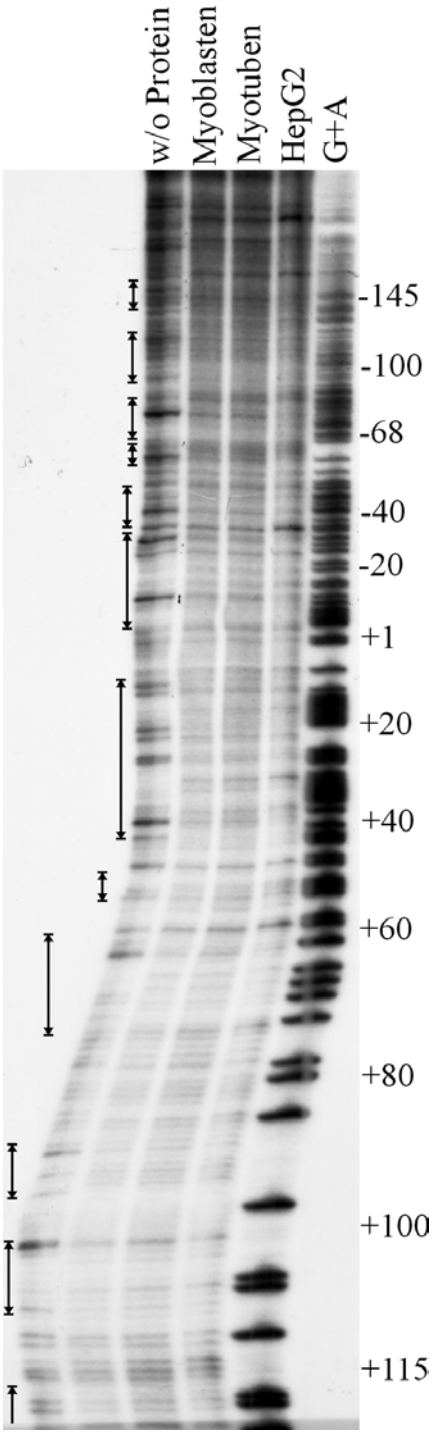


pRL-SV40

Promega

EMBL Acc.-No. AF025845

9.3 Footprint Cytochrom C Promotor –210 bis +115 bp



Erklärung

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 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. R.J. Wiesner (Institut für Vegetative Physiologie) betreut worden.

Danksagungen

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gilt natürlich Herrn Prof. Dr. R. J. Wiesner, der mich mit Engagement, Kompetenz und guter Laune betreut und in die Tiefen der „Mito-Manie“ eingeweiht hat.
Danke auch an Dr. Ying-Hue Lee, der ich einige spannende Methoden und einen Einblick in die Tücken von Promotoranalysen verdanke.

Ein großes „Dankeschön“ geht an alle Kollegen der Vegetativen Physiologie, denen ich die gute Arbeitsatmosphäre und eine Unmenge an Tips und kleinen und großen Hilfen in jeder Lebenslage verdanke.

Herzlichen Dank auch an meine Prüfer Herrn Prof. Dr. Dohmen und Herrn Prof. Dr. Werr für die Übernahme der Gutachten und für die Zeit, die sie schon im Vorfeld der Abgabe investiert haben.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Neiss und Frau Rohrmann von Institut für Anatomie der Unikliniken Köln für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Herrn Prof. Fischer und Frau July vom Institut für Experimentelle Medizin der Unikliniken Köln für die HPLC-Messungen, die sie zügig und unkompliziert für mich durchgeführt haben.

Lebenslauf

Steffi Goffart

geboren am 14.6.1974 in Aachen

1984-1993	St.-Ursula-Gymnasium in Aachen
1993	Abitur
10/1993 bis 9/1998	Studium der Biologie an der RWTH Aachen
9/1998	Diplom in Biologie
10/1998 bis 2002	Promotionsstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln im Institut für Vegetative Physiologie der Universität zu Köln
8.7.2002	mündliche Promotionsprüfung
8/2002	wiss. Angestellte am Institut für Vegetative Physiologie