

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
(Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biochemische und biophysikalische Untersuchungsmethoden bei
verschiedenen Formen hereditärer Myopathien: Myofibrilläre
Myopathien und mitochondriales DNA-Depletionssyndrom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefanie Bulst
aus
München
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Maggie Walter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Tim M. Strom
Prof. Dr. Jochen Herms

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Rita Horváth
Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2010

meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Bulst, S.*, Levin, J.*, Thirion, C., Schmidt, F., Bötzel, K., Krause, S., Pertl, C., Kretzschmar, H., Walter, M. C., Giese, A., Lochmüller, H. Divergent molecular effects of desmin mutations on protein assembly in myofibrillar myopathy. *JNEN*, in press.

*equal contribution

Bulst, S., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Müller-Ziermann, S., Koehler, U., Thirion, C., Walter, M. C., Stewart, J. D., Chinnery, P. F., Lochmüller, H., Horváth, R. (2009) *In vitro* supplementation with dAMP/dGMP leads to partial restoration of mtDNA levels in mitochondrial depletion syndroms. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1590-1599.

Walter, M. C., Reilich, P., Huebner, A., Fischer, D., Schröder, R., Vorgerd, M., Kress, W., Born, C., Schoser, B. G., Krause, K. H., Klutzny, U., **Bulst, S.**, Frey, J. R., Lochmüller, H. (2007) Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. *Brain* **130**, 1485-1496.

Inhaltsverzeichnis

A	Zusammenfassung	1
B	Myofibrilläre Myopathien (MFM)	5
1	Einleitung	5
1.1	Myofibrilläre Myopathien (MFM).....	5
1.1.1	Definition der MFM	5
1.1.2	Desminopathien.....	6
1.2	Desmin (<i>DES</i>)	9
1.3	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	10
2	Zielsetzung	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Chemikalien	14
3.2	Molekulargenetische Methoden	14
3.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	14
3.2.1.1	Prinzip der PCR.....	14
3.2.1.2	PCR-Primer	14
3.2.1.3	PCR-Reaktionsbedingungen	14
3.2.2	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	15
3.2.3	Sequenzanalyse	15
3.2.4	Klonierung der verwendeten Plasmide	16
3.2.4.1	Klonierung von PCR-Produkten in den pEGFP-N1-Vektor	16
3.2.4.2	Einführung der Mutationen R350P, E413K und R454W in den Desmin-pEGFP-N1-Vektor	16
3.2.4.3	Klonierung von Desmin-pEGFP-N1-Vektoren ohne EGFP	17
3.2.5	Ligation	17
3.2.6	Transformation von Bakterien	17
3.2.7	Bakterienkultur.....	17
3.2.8	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien	18
3.3	Zellkultur.....	18

3.3.1	Transfektion von HEK 293-Zellen zur Aggregationsanalyse mittels SIFT	18
3.3.2	Transfektion von SW 13-Zellen für Immunfluoreszenz	18
3.4	Immunfluoreszenz	19
3.5	Herstellung der Proteinextrakte	19
3.6	FCS und SIFT	21
3.6.1	FCS (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie)	21
3.6.2	SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets)	21
3.6.3	Messaufbau	22
3.6.4	Messbedingungen und Justage	23
3.6.5	Auswertungsverfahren	24
3.6.5.1	Autokorrelationsanalyse	24
3.6.5.2	FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis)	28
3.6.5.3	SIFT-Auswertung	29
3.7	Proteinchemische Methoden	31
3.7.1	Aufkonzentration der Proteine	31
3.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (Western Blot)	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Überprüfung der klonierten Plasmide	33
4.1.1	Filamentbildung in transfizierten SW 13-Zellen	33
4.1.2	Proteinexpression in transfizierten HEK 293-Zellen	35
4.2	Bestimmung der Ausgangskomponenten im Proteinextrakt	36
4.3	<i>de novo</i> Aggregationsstudien	39
4.4	Analyse nativer Zelllysate	41
4.5	Analyse des dominant-negativen Effekts der Mutation R350P auf die Filamentbildung von Wildtyp-Desmin	42
4.5.1	Immunfluoreszenz	42
4.5.2	Einzelmolekülfluoreszenzanalyse	43
5	Diskussion	45
5.1	Kein Einfluss des Fluoreszenz-Tags auf die Desmin-Filamentbildung	45
5.2	Veränderte Filamentbildung durch Desminmutationen	46
5.2.1	Unterschiede in der <i>de novo</i> Aggregation	47
5.2.2	Desmin liegt in nativen Proteinextrakten in bestimmten Spezies vor	49

5.3	Dominant-negativer Effekt der Mutation R350P auf die Filamentbildung.....	50
5.4	Ausblick	51
C	Das mitochondriale DNA-Depletionssyndrom (MDS).....	53
1	Einleitung	53
1.1	Das mitochondriale DNA-Depletionssyndrom (MDS).....	53
1.1.1	Definition des MDS	53
1.1.2	Pathogenetische und klinische Einteilung des MDS.....	55
1.1.2.1	Die myopathische Form	55
1.1.2.2	Die enzephalomyopathische Form.....	55
1.1.2.3	Die hepato-zerebrale Form.....	56
1.2	Die mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie (MNGIE) ...	57
1.3	Mitochondrien	57
1.3.1	Aufbau und Funktion	57
1.3.2	Aufbau und Replikation der mitochondrialen DNA (mtDNA).....	59
2	Zielsetzung	63
3	Material und Methoden	64
3.1	Patienten	64
3.2	Zellkultur	64
3.3	Chemikalien	65
3.4	Molekulargenetische Methoden	65
3.4.1	DNA-Extraktion	65
3.4.2	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	65
3.4.3	mtDNA-Depletionstest mittels real-time PCR.....	66
3.4.3.1	Prinzip der real-time PCR	66
3.4.3.2	PCR-Primer	66
3.4.3.3	LightCycler PCR-Reaktionsbedingungen	67
3.4.4	mtDNA-Deletionentest mittels LongRange-PCR	67
3.4.4.1	Prinzip der LongRange-PCR.....	67
3.4.4.2	PCR-Primer	68
3.4.4.3	PCR-Reaktionsbedingungen	68

3.4.5	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	68
3.4.6	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).....	69
3.4.6.1	Prinzip der CGH.....	69
3.4.6.2	Reaktionsbedingungen.....	69
3.5	Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivität.....	69
3.5.1	Biochemische Messung.....	69
3.5.1.1	Isolierung der Mitochondrien aus Myoblasten.....	69
3.5.1.2	Bestimmung der NADH Coenzym Q Oxidoreduktase-Aktivität (Komplex I).....	70
3.5.1.3	Bestimmung der Succinat Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivität (Komplex II/III kombiniert).....	71
3.5.1.4	Bestimmung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität (Komplex IV).....	72
3.5.1.5	Bestimmung der Citratsynthase.....	73
3.5.1.6	Bestimmung des nichtkollagenen Proteins.....	74
3.5.2	Histochemische Färbung der Cytochrom c Oxidase.....	74
3.5.3	WST-Test.....	75
3.6	Immunfluoreszenz.....	75
4	Ergebnisse.....	77
4.1	Patienten.....	77
4.2	Erzeugung von mtDNA-Depletion in DGUOK- und POLG-defizienten Myotuben.....	78
4.3	Substitution der Nukleosidmonophosphate bei mtDNA-Depletion.....	79
4.3.1	dAMP/dGMP Substitution bei DGUOK-defizienten Myotuben.....	79
4.3.2	dAMP/dGMP Substitution bei POLG- und TYMP-defizienten Myotuben.....	81
4.3.3	dAMP/dCMP/dGMP/dTMP Substitution bei POLG-defizienten Myotuben.....	81
4.3.4	dAMP/dCMP/dGMP Substitution bei TYMP-defizienten Myotuben.....	82
4.4	Toxizitätsuntersuchungen der Nukleotide.....	83
4.4.1	Zelltoxizität.....	83
4.4.2	Auswirkungen auf die DNA-Stabilität.....	85
4.5	Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenkomplexe.....	86
4.5.1	Biochemische Messung.....	86
4.5.2	Cytochrom c Oxidase-Färbung.....	87
4.5.3	WST-Test.....	87
4.6	Verstärkung der mtDNA-Depletion.....	89

4.6.1	Ethidiumbromid (EtBr)	89
4.6.2	Nukleosidische Reverse-Transkriptions-Inhibitoren (NRTI).....	90
4.6.2.1	Biochemische Messung der Atmungskettenkomplexe	93
5	Diskussion	94
5.1	Entwicklung eines Zellkulturmodells zur näheren Untersuchung von mtDNA-Depletion	94
5.2	Substitution der Nukleosidmonophosphate führt zu einer Verbesserung der mtDNA-Depletion <i>in vitro</i>	95
5.3	Sind Nukleosidmonophosphate toxisch?	98
5.4	Kann der Effekt eines verminderten mtDNA-Gehalts durch die Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenkomplexe gemessen werden?	100
5.5	Durch Verstärkung der mtDNA-Depletion <i>in vitro</i> werden funktionelle Defekte detektierbar	101
5.6	Ausblick	103
D	Literaturverzeichnis.....	104
E	Anhang	116
1	Verzeichnis der verwendete Abkürzungen	116
2	Danksagung.....	119
3	Lebenslauf.....	121
4	Ehrenwörtliche Erklärung	124

A Zusammenfassung

Unter dem Begriff Myopathien versteht man eine Reihe von äußerst heterogenen Krankheitsbildern, denen eine primäre Erkrankung des Muskels zugrunde liegt. Das Leitsymptom von Myopathien ist eine Muskelschwäche, die sich akut, subakut oder chronisch entwickeln kann. Myopathien besitzen eine heterogene Ätiologie; es werden erworbene und hereditäre Formen unterschieden. Zu den Ursachen hereditärer Myopathien gehören angeborene Defizienzen oder Defekte von Bestandteilen der Skelettmuskulatur. Hierzu zählen Strukturproteine des Zytoskeletts und Enzyme, die für die Funktion des Muskels von Bedeutung sind. Je nach Art der Erkrankung können auch andere Organsysteme mit betroffen sein.

Viele seltene Erkrankungen sind derzeit nicht zufriedenstellend und kausal therapierbar. Um spezifische Therapieansätze entwickeln zu können, ist eine exakte genetische Diagnostik von großer Bedeutung. Eine verbesserte Genotyp-Phänotyp-Korrelation trägt entscheidend zur verbesserten Beratung der Patienten hinsichtlich individueller Prognose, Berufswahl und Kinderwunsch bei. Mit den Fortschritten der molekularen Medizin zeichnen sich für viele dieser Erkrankungen neue Therapieansätze ab (z.B. für Muskeldystrophien: Gentherapie, Stammzellen). Aber auch innovative, pharmakologische Ansätze könnten bei seltenen Erkrankungen zum Einsatz kommen (z.B. für Spinale Muskelatrophie: Valproinsäure).

Ziel dieser Arbeit war anhand zweier Beispiele die Entwicklung neuer Therapiestrategien bei hereditären Myopathien aufzuzeigen. Am Beispiel der Myofibrillären Myopathien (MFM) sollten drei ausgewählte Missense-Mutationen im Desmin-Gen mit Hilfe der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie näher untersucht und so neue Ansatzpunkte für eine Therapiestrategie gefunden werden. MFM bilden pathogenetisch und klinisch eine heterogene Gruppe von relativ seltenen hereditären Erkrankungen der Skelettmuskulatur mit häufiger kardialer Beteiligung. Sie werden u.a. verursacht durch genetische Veränderungen im Desmin-Gen (primäre Desminopathien). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, wie die verschiedenen Mutationen zu Fehlfunktionen der Muskelzellen auf molekularer Ebene führen. Dazu wurden die Assemblierungs- und Aggregations-Kinetiken in Echtzeit, sowie die Eigenschaften der gebildeten Proteinaggregate von fluoreszenz-markiertem Desmin hoch sensitiv auf Einzelmolekülebene untersucht. Des Weiteren sollten die Effekte der einzelnen Mutationen auf die frühe Desmin-Assemblierung und –Aggregation näher charakterisiert und so ein System entwickelt werden, mit dem bereits beschriebene, wie auch neue Mutationen im

Desmin-Gen bei Patienten mit primärer Desminopathie molekular klassifiziert werden können. Für diese Untersuchungen wurden Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt.

In vergleichenden *de novo* Aggregationsstudien konnte ein unterschiedliches Aggregationsverhalten der drei Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Desmin detektiert werden. Alle Mutanten bildeten kleinere Partikel als der Wildtyp und führten zu einer Störung der Desmin-Filamentbildung. Die Analyse nativer Proteinextrakte ergab, dass die drei Mutanten und Wildtyp-Desmin in bestimmten, eindeutig voneinander unterscheidbaren, fluoreszierenden Spezies in den transfizierten Zellen vorlagen.

In weiteren Versuchen wurde der dominant-negative Effekt der Mutation R350P auf die Filamentbildung von nicht mutiertem Desmin untersucht. In Ko-Transfektionsstudien von wt-Des-GFP und R350P ohne GFP konnte mittels Kolo-kalisation in der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass bei Anwesenheit der Mutante, auch das wildtyp-Protein in die Aggregate gezogen wird und so nicht mehr in der Lage ist, ein reguläres Filamentnetzwerk zu bilden. Die Messungen mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie ergaben, dass schon 20% mutiertes Protein ausreicht, um die Assemblierung des Wildtyps zu stören. Da betroffene Patienten meistens sowohl ein Wildtyp als auch ein mutiertes Allel tragen, kommt es zur Biosynthese beider Proteinspezies. Das mutierte Protein interagiert sehr effizient mit dem Wildtyp und kann so zu einer Störung der Desmin-Filamentbildung und zur pathologischen Proteinaggregation beitragen.

Der Einsatz der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie ermöglichte es zum ersten Mal, das unterschiedliche Aggregationsverhalten von Desminmutationen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse stellen die Basis für eine detaillierte und funktionelle Klassifizierung der unterschiedlichen Mutationen im Desmin-Gen dar und können helfen, die klinische Manifestation der unterschiedlichen Phänotypen zu erklären. Des Weiteren könnte dieser Ansatz Auswirkungen auf mögliche diagnostische und therapeutische Strategien nicht nur von primären Desminopathien, sondern evtl. auch für andere Formen von Myopathien mit pathologischer Proteinaggregation haben.

Am Beispiel des mitochondrialen DNA-Depletionssyndroms (MDS) sollten die verschiedenen Pathomechanismen näher untersucht und mögliche Therapieansätze im Zellkulturmodell entwickelt werden. Das MDS wird definiert als eine Reduktion der mitochondrialen DNA (mtDNA) im Vergleich zur nukleären DNA (nDNA) in unterschiedlichen Geweben. Es handelt sich dabei um eine Gruppe klinisch heterogener

Erkrankungen, die eine häufige Ursache von schweren Hepatoenzephalopathien, von Enzephalomyopathien und von ca. 50% der kombinierten Atmungskettendefekte im Kindesalter sind. Das MDS wird u.a. durch Mutationen in der Desoxyguanosinkinase (*DGUOK*), in der mtDNA-Polymerase gamma (*POLG*) und in der Thymidinphosphorylase (*TYMP*) verursacht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Zellmodell entwickelt werden, das es ermöglicht, mtDNA-Depletion in Muskelzellen der betroffenen Patienten zu quantifizieren und funktionelle Defekte der Mitochondrien biochemisch zu messen. Des Weiteren sollten durch Substitution der Nucleosidmonophosphate mögliche therapeutische Wege gefunden werden, abhängig von dem zugrunde liegenden Pathomechanismus der mutierten Gene, die mtDNA-Depletion zu verringern und deren Auswirkungen auf die Aktivität der Atmungskettenkomplexe der Mitochondrien zu untersuchen.

Nach Ausdifferenzierung der Myoblasten zu Myotuben konnte in den Patientenzellen eine mtDNA-Depletion mittels real-time PCR detektiert werden. Die kombinierte Zugabe der Nucleosidmonophosphate Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP) und Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP) zu dem Fusionsmedium führte bei Patientenzelllinien mit Mutationen im *DGUOK*-Gen zu einer hoch signifikanten Zunahme der mtDNA. Des Weiteren konnte durch die Substitution aller vier Nucleosidmonophosphate die mtDNA-Depletion in *POLG*-defizienten Zellen aufgehoben werden, im Gegensatz zu Patientenmyotuben mit einem genetischen Defekt im *TYMP*-Gen. Hier kam es zu keiner Zunahme des mtDNA-Gehalts.

In Supplementationsanalysen mit ansteigenden Konzentrationen dAMP/dGMP konnten keine toxischen Effekte der Nucleotide detektiert werden. Diejenigen Zellen, die mit hohen Dosen an dNTPs behandelt worden waren, zeigten keine mtDNA-Deletionen mittels LongRange-PCR und auch keine chromosomalen Veränderungen, die mit der Array-CGH-Analyse festgestellt werden konnten. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse kann man also davon ausgehen, dass keine toxischen Effekte der Nucleotidsubstitution die mtDNA-Synthese beeinträchtigen.

In dem für diese Arbeit entwickelten Zellkulturmodell war es nicht möglich, in unbehandelten Patientenmyotuben einen funktionellen Defekt der Atmungskette in Folge der mtDNA-Depletion zu messen. Um die mtDNA-Depletion zu verstärken wurden *DGUOK*-defiziente Zellen mit nucleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) behandelt. Diese Substanzen interagieren selektiv mit der mtDNA-Polymerase gamma (*POLG*) und führen so zu Störungen der mtDNA-Replikation, in deren Folge mtDNA-Depletion entsteht. Im Gegensatz zu den unbehandelten Patientenzellen, wurde in den mit Didanosin kultivierten

Myotuben biochemisch eine verringerte Aktivität der Cytochrom c Oxidase gemessen, die sich durch die Substitution von dAMP/dGMP wieder steigern ließ.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Zellkulturmodell ermöglicht es, das mtDNA-Depletionssyndrom auf molekularer Ebene näher zu untersuchen und die zugrunde liegenden Pathomechanismen aufzuklären. Mögliche Therapieansätze könnten so entwickelt und deren Auswirkungen auf zellulärer sowie auf molekularer Ebene überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Substitution der Nukleosidmonophosphate als Therapiestrategie beim mtDNA-Depletionssyndrom, verursacht durch Mutationen im *DGUOK*- oder *POLG*-Gen anbietet. Des Weiteren könnte dies nicht nur ein Ansatz zur Behandlung von MDS sein, sondern könnte ebenso die Nebenwirkungen im Rahmen einer HIV-Therapie, die durch den Einsatz von nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) entstehen, reduzieren.

B Myofibrilläre Myopathien (MFM)

1 Einleitung

1.1 Myofibrilläre Myopathien (MFM)

1.1.1 Definition der MFM

Bei Myofibrillären Myopathien handelt es sich um eine Gruppe klinisch und genetisch heterogener Erkrankungen der Skelettmuskulatur, häufig mit kardialer Beteiligung, die vor allem autosomal-dominant, selten autosomal-rezessiv, vererbt werden. Morphologisch werden sie charakterisiert durch ein Auflösen der Myofibrillen, die Ablagerung myofibrillärer Abbauprodukte, eine veränderte Expression zahlreicher, intramuskulärer Proteine und durch intrazelluläre, desminpositive Proteinaggregate (Ferrer and Olivé, 2008). Klinisch kommt es typischerweise zu einer langsam progressiven Muskelschwäche mit unterschiedlicher Verteilung der Paresen - man unterscheidet einen distalen, einen scapulooperonealen und einen Gliedergürtel-Phänotyp mit potentiell begleitender Kardiomyopathie, pulmonaler Beteiligung sowie peripherer Neuropathie. (Selcen et al, 2004; Walter et al., 2007).

Bisher konnten bei betroffenen Patienten Mutationen in Genen identifiziert werden, die entweder für Komponenten der Z-Scheibe kodieren oder daran beteiligt sind, deren Struktur aufrecht zu erhalten: Desmin (*DES*), Myotilin (*MYOT*, *TTID*), ZASP (*LDB3*), Filamin C (*FLNC*) und alpha-B-Crystallin (*CRYAB*) (Ferrer and Olivé, 2008). Allerdings zeigen viele Patienten einen ähnlichen morphologischen und klinischen Phänotyp, bei denen Mutationen in den bislang bekannten Genen bereits ausgeschlossen wurden. Aus diesem Grund muss es weitere, bisher nicht identifizierte Gene geben, die an der Entstehung von MFM beteiligt sind. Dies spricht für eine weitere genetische Heterogenität der MFM.

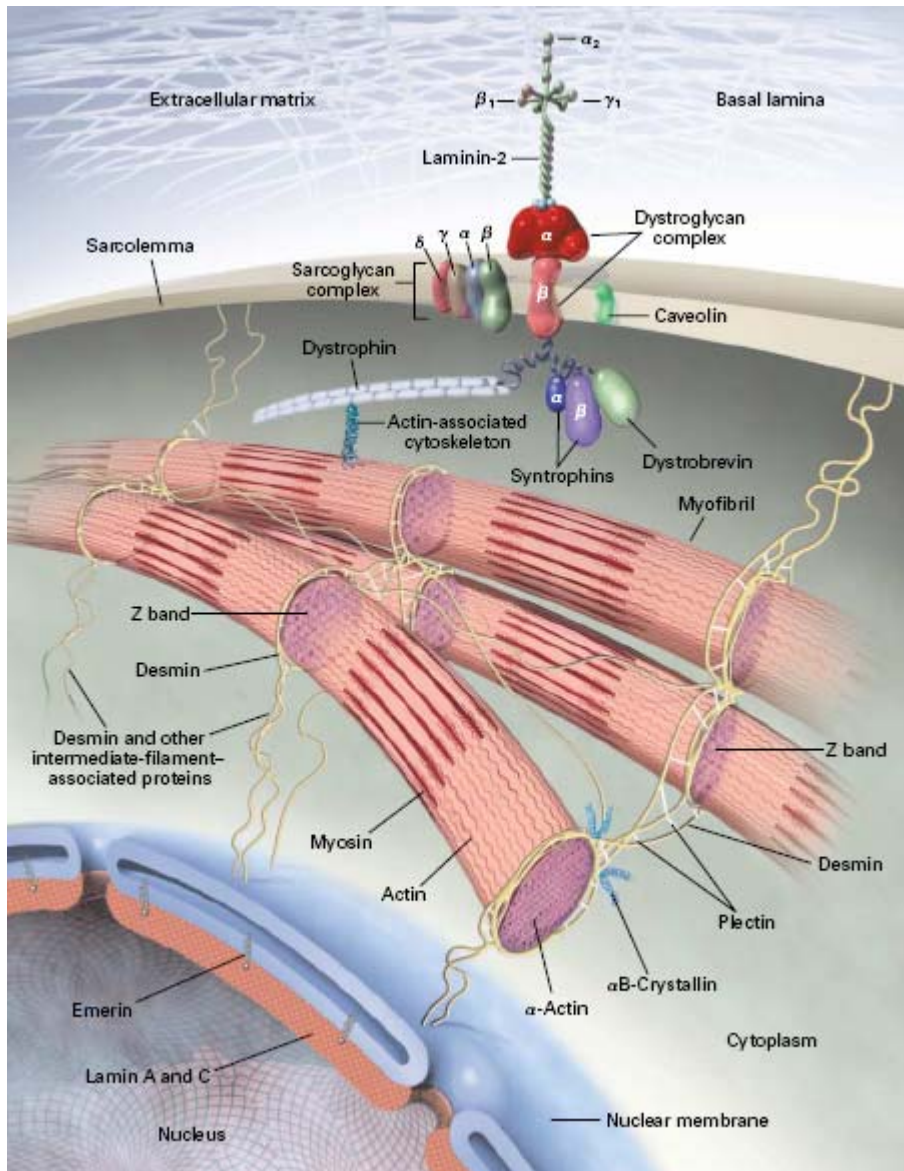


Abbildung 1: Übersicht der Intermediärfilamente und Proteine des Zytoskeletts, die die extrazelluläre Matrix mit Strukturproteinen der Muskelzelle verbinden. Genetische Veränderungen dieser Strukturproteine sind u.a. für die Entstehung von Myopathien verantwortlich.

(Dalakas et al., 2000)

1.1.2 Desminopathien

Primäre Desminopathien sind eine genetisch definierte Subgruppe der Myofibrillären Myopathien und werden durch Mutationen im Desmin-Gen auf Chromosom 2q35 verursacht. Diese Erkrankungen wurden früher primäre Desminopathien oder Desmin-Aggregationsmyopathien genannt, da es zu einer Akkumulation von Desmin in den Myofibrillen kommt (Ferrer and Olivé, 2008). Die klinischen Phänotypen erstrecken sich über ein weites Spektrum. Innerhalb einer Familie treten scapuloperoneale, Gliedergürtel- und

distal betonte Verteilungsmuster der Muskelschwäche mit variierender kardialer oder respiratorischer Beteiligung auf (Walter et al., 2007). Auch reine Kardiomyopathien sind bekannt. Es kommt zu einem progressiven, verheerenden Verlauf mit schwerer körperlicher Behinderung und deutlich eingeschränkter Lebenserwartung. Für diese hereditären Myopathien existiert bis heute noch keine kausative Therapie (Selcen et al., 2004).

Die meisten Patienten zeigen ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster. Es sind allerdings sowohl Patienten mit einer autosomal-rezessiven Vererbung, als auch Patienten ohne ersichtliche Familienanamnese dokumentiert worden.

Desminopathien sind die bisher am besten untersuchte Untergruppe an Erkrankungen innerhalb der Myofibrillären Myopathien. Durch Transfektionsexperimente und *in vitro*-Assemblierungsstudien konnten Einblicke in die molekulare Pathogenese der Desminmutationen gewonnen werden. So scheint es, dass ein Großteil der Desminmutanten mit genetischen Veränderungen innerhalb der rod-Domäne unfähig ist, *de novo* ein Intermediärfilamentgerüst zu bilden. Sie formen stattdessen anormale Intermediärfilamentstrukturen, bringen ein bestehendes Intermediärfilamentgerüst zum Kollaps und führen zur Ablagerung von anormalen, Desmin-positiven Proteinaggregaten (Bär et al., 2006; Bär et al., 2005). Diese Erkenntnisse implizieren, dass sowohl die beeinträchtigte Filamentbildung als auch die gestörten Filament-Filament-Interaktionen durch Mutationen im Desmin-Gen die Schlüsselereignisse der molekularen Pathogenese bei Desminopathien sind.

Desminmutationen scheinen einen sehr toxischen Effekt auf das Desminfilamentsystem zu haben. Allerdings weiß man noch nicht, warum sich die klinischen Symptome der progressiven Muskelschäden erst so spät in den Patienten manifestieren. Hinzu kommt, dass in jüngsten Versuchen festgestellt wurde, dass bestimmte Desminmutanten nicht in der Lage sind Intermediärfilamente (IF) zu bilden, wenn sie alleine vorliegen, aber in 1:1 Mischungen mit nicht mutiertem Protein ein korrektes Filamentgerüst *in vitro* formen (Bär et al., 2007). Es scheint unwahrscheinlich, dass einzig die unmittelbaren Effekte der Desminmutationen auf die Assemblierung der Desmin-Intermediärfilamente die komplexe humane Pathologie verursachen. Alternativ dazu könnten durch genetische Veränderungen des Desmin-Gens die Interaktionen zwischen Bindungspartnern beeinträchtigt werden und so sowohl die strukturelle und funktionelle Organisation des extrasarkomerischen Zytoskeletts als auch intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst werden. Dieser Erklärungsansatz wird durch die Beobachtung untermauert, dass Mutationen in Genen, die für Linkerproteine des Zytoskeletts in Muskelzellen kodieren, wie z.B. Plectin, Filamin C, ZASP, FHL 1 und Myotilin, ebenfalls zu ähnlichen, Desmin-positiven, zytoplasmatischen Proteinaggregaten führen (Schröder et al.,

2004; Schröder et al., 2002; Kley et al., 2007; Schessl et al., 2008). Weitere Studien zeigten, dass das Desmin-Plectin-Filamin-System eine essentielle Rolle in der subzellulären Positionierung der Mitochondrien spielt (Capetanaki, 2002; Konieczny and Wiche, 2008). Beweise für strukturelle und biochemische Fehlfunktionen der Mitochondrien wurden in Patientenmuskulatur mit Desminopathien, Plectinopathien und Filaminopathien gefunden (Schröder et al., 2002; Kley et al., 2007; Schröder et al., 2003). Störungen der ATP-Produktion könnten so die strukturelle Unversehrtheit der Myofibrillen und das stark ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) beeinträchtigen. Ein weiterer Aspekt für die Rolle der Mitochondrien in der Krankheitsentstehung ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die damit verbundene Oxidation und Nitrierung von Desmin und anderen Proteinen des Zytoskeletts. Dieser Effekt wurde in Desminopathien und Myotilinopathien gezeigt (Schröder et al., 2003). Eine direkte Verbindung zwischen den Proteinkontroll-Mechanismen und den pathologischen Desminaggregaten wurde in einer Studie bewiesen, die zeigte, dass Desminmutanten die proteolytische Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) beeinträchtigen (Janué et al., 2007). Umgekehrt sind Mutationen in Genen, die für die molekularen Chaperone alpha B-Crystallin und VCP kodieren, beteiligt an der Entstehung der Desmin-positiven Proteinaggregate. Besonders Mutationen im VCP-Gen schreibt man einen Einfluss auf die Funktionen des UPS zu (Weihl et al., 2007). Da das UPS und die Autophagozytose im umgekehrten Verhältnis zueinander stehen, zeigen Patienten mit genetischen Veränderungen im VCP-Gen Zeichen einer gesteigerten Autophagozytose (Hübbers et al. 2007). Diese Beobachtung spricht für eine direkte, molekulare Interaktion zwischen dem UPS und dem autophagozytotischen System. Sogenannte „rimmed vacuoles“ und „non-rimmed vacuoles“ sind nicht nur morphologischen Marker autophagozytotischer Prozesse, sondern finden sich auch als charakteristische Kennzeichen in Muskelbiopsien von Patienten mit Mutationen in Desmin, Filamin C, Plectin, FHL1, Myotilin und ZASP (Schröder et al., 2004; Fischer et al., 2006).

Die letzten Jahre haben viele neue Erkenntnisse über die Pathogenese Myofibrillärer Myopathien gebracht. Allerdings müssen noch der genaue molekulare Signalweg und die einzelnen Schritte aufgeklärt werden, die von einem individuellen Gendefekt zu einer progressiven Muskelerkrankung führen.

1.2 Desmin (*DES*)

Desmin ist ein 53 kDa schweres, muskelspezifisches Intermediärfilament-(IF) Protein der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur und besteht aus 476 Aminosäuren. Es wird durch das Desmin-Gen (*DES*) kodiert, welches neun Exons und acht Introns einschließt (Li et al., 1989). Desmin ist eine wichtige, strukturelle Komponente der muskulären Zytoarchitektur und bildet ein drei-dimensionales Gerüst rund um die myofibrillären Z-Scheiben. Es verbindet den gesamten kontraktile Apparat mit dem subsarcolemmalen Zytoskelett, dem Zellkern und anderen Organellen (Fuchs and Weber, 1994; Small and Gimona, 1998). Das Desmin-Molekül besitzt eine, für IF-Proteine charakteristische Struktur und umfasst drei Domänen. Die ausgedehnte zentrale α -helikale coiled-coil rod-Domäne wird von einer nicht-helikalen, aminoterminalen head-Domäne und einer carboxyterminalen tail-Domäne flankiert (Geisler et al., 1982). Die zentrale rod-Domäne besteht aus vier α -helikalen Segmenten (1A, 1B, 2A, 2B), die durch drei kurze Polypeptidlinker voneinander getrennt werden. Es wurde gezeigt, dass die rod-Domäne eine kritische Rolle in der Dimerisierung und in der weiteren Assemblierung von Desmin spielt (Herrmann and Aebi, 2004). Im Gegensatz dazu erlauben Mutationen in der tail-Domäne meistens eine korrekte Filament-Bildung und beeinflussen stattdessen Zelltyp-spezifische Funktionen (Bär et al., 2007).

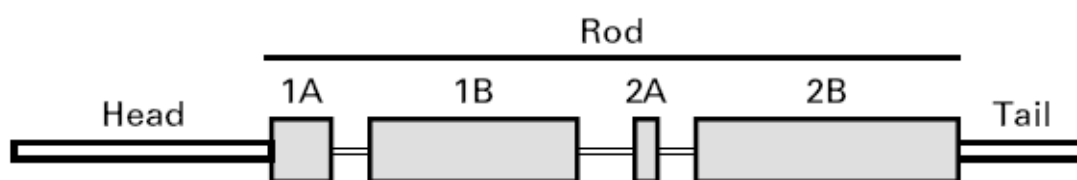


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von Desmin. Die Kästchen stellen die vier konservierten α -helikalen Subdomänen (1A, 1B, 2A, 2B) dar, die durch nicht-helikale Linker voneinander getrennt werden. Die helikale rod-Domäne wird von der nicht-helikalen N-terminalen head-Domäne und der C-terminalen tail-Domäne flankiert.

Die Desmin-Assemblierung beginnt mit der Bildung von parallelen coiled-coil Dimeren, die im nächsten Schritt antiparallele Tetramere formen. Die Tetramere verbinden sich zu sogenannten „unit-length-filaments“ (ULF), welche sich anschließend longitudinal zu langen Filamenten anlagern (Bär et al., 2007).

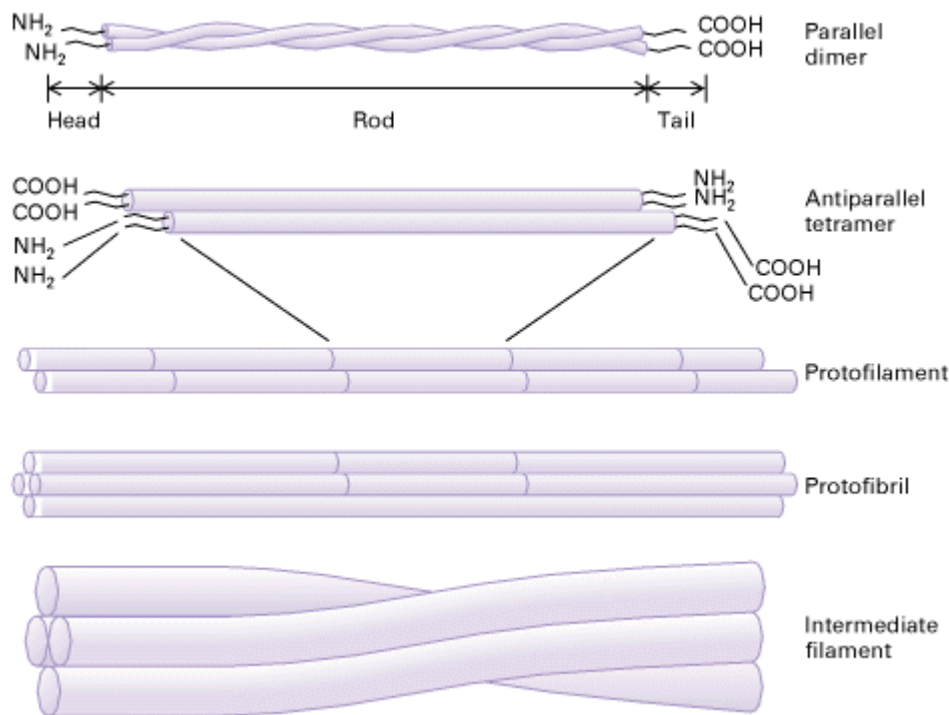


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Assemblierung von Intermediärfilamenten. Parallele Dimere bilden antiparallele Tetramere, die sich an ihren Enden zu Protofilamenten aneinander anlagern. Protofilamente formen Protofibrillen die schließlich die fertigen Intermediärfilamente bilden.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.figgrp.5550>

Für den Assemblierungsprozess werden keine weiteren Kofaktoren benötigt. Die Bildung der Intermediärfilamente findet unter physiologischen Bedingungen spontan statt (Parry and Steinert, 1995). Intermediärfilamente sind die strukturelle Basis für die Bildung des dreidimensionalen Desminnetzwerks in allen ausgereiften Muskelzellen (Bär et al., 2004) und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Aufgaben der quergestreiften Muskelfasern (Bär et al., 2005).

1.3 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Die fluoreszenzbasierte Einzelmolekülspektroskopie wurde konzeptionell vor mehr als 30 Jahren zur Analyse chemischer Reaktionen und Messung von Diffusionsprozessen entwickelt (Ehrenberg et al., 1976; Magde et al., 1974). Durch die Messungen wird die Signalfuktuation, die durch eine kleine Anzahl von Molekülen ausgelöst wird, erfasst und analysiert.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) basiert technisch auf einem konfokalen Mikroskop, in dem Laserlicht in ein Volumen von ca. 10^{-15} Liter fokussiert wird (Rigler, 1995; Eigen and Rigler, 1994). Im Fokus angeregte Fluorophore senden Photonen aus, die mit

einem hochempfindlichen Detektor erfasst werden (siehe Material und Methoden). Erst dieser Aufbau ermöglicht die Anwendung des theoretischen Konzepts für die Detektion und Analyse einzelner Moleküle.

Mit FCS sind fluoreszenzmarkierte Teilchen in vielen Parametern wie Anzahl, Helligkeit und lateralem Diffusionskoeffizienten erfassbar (Rigler, 1995). Dies ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen im Bereich der Grundlagenforschung, so dass sich die FCS im Laufe der späten 90er Jahre zunehmend als Methode zur Untersuchung dynamischer Prozesse bei kleinsten, d.h. submikromolaren Konzentrationen etablierte (Schwille et al., 1997).

Die Entwicklung der zwei-Farben-FCS eröffnete weitere Möglichkeiten (Eigen and Rigler, 1994; Schwille et al., 1997). Sie wird eingesetzt, um die Hybridisierung von DNA, Enzymkinetiken und Aggregationskinetiken zu verfolgen. (Kolterman et al., 1998; Winkler et al., 1999).

Typischerweise wird die FCS benutzt, um die Eigenschaften von kleinen monomeren Proteinen und Polynukleotiden bei nano- bis picomolaren Konzentrationen zu messen (Schwille et al., 1997). Dabei wird der Messbereich durch die Konzentration der messbaren Teilchen in der Probenlösung limitiert. Ein weiterer limitierender Faktor, der vor allem bei Messungen mit vergleichsweise großen Proteinaggregaten eine Rolle spielt, ist die mit steigender Partikelgröße sinkende Diffusionsgeschwindigkeit. Dadurch finden Fokusdurchtritte der Teilchen seltener statt.

Um auch große, seltene Teilchen erfassen zu können, wurde die SIFT-Technik (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) entwickelt, mit der helle Teilchen auch in weit subpicomolaren Konzentrationen erfasst werden können (Bieschke et al., 2000). Durch Scannen der Probe mit einer Fokusgeschwindigkeit von 1-10 mm/s, wird die Teilchenanzahl, die den Fokus passiert, gegenüber der statischen Messung deutlich erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode bei der Detektion vom krankheitsassoziierten Prionprotein (PrP^{SC}) mit Antikörpern sensitive und hoch spezifische Ergebnisse liefert (Giese et al., 2000).

Die große Anzahl erfassbarer Parameter zeigt, dass FCS und SIFT für Untersuchungen von Wechselwirkungen und Aggregationsprozessen von Proteinen besonders geeignet sind. Diese Aggregationsprozesse spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese nicht nur von myofibrillären Myopathien, sondern auch bei einer Vielzahl an neurogenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, dem Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. FCS und SIFT sind die für diese Arbeit zentralen Untersuchungsmethoden. Die theoretischen Grundlagen, sowie die technische Realisierung sind im Kapitel Material und Methoden, unter 3.6 ausführlich dargestellt.

2 Zielsetzung

Ein Großteil der bisher identifizierten Mutationen im Desmin-Gen sind Missense-Mutationen, die zu einem Austausch einzelner Aminosäuren führen (Goldfarb et al., 2004, Bär et al., 2004, Paulin et al., 2004). Die meisten von ihnen befinden sich in der hoch konservierten Aminosäuresequenz der zweiten Hälfte der zentralen α -helikalen coiled-coil rod-Domäne. (Herrmann et al., 2000). Alle Mutationen werden mit Desminaggregaten in Myofibrillen betroffener Patienten in Zusammenhang gebracht. Dies stellt das pathognomonische Merkmal von Desminopathien dar (Goldfarb et al., 2004).

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden drei krankheitsverursachende Desminmutationen ausgewählt. Auswahlkriterien waren ihre unterschiedliche Lage im Desmin-Gen (rod-Domäne versus tail-Domäne), ihr bereits beschriebenes, unterschiedliches Aggregationsverhalten *in vitro* (Bär et al., 2007, Bär et al., 2005) und die verschiedenen Phänotypen, mit denen diese Mutationen in Zusammenhang gebracht werden. Patienten mit der Mutation R350P zeigen ein Gliedergürtel-, scapuloperoneal oder distal betontes Verteilungsmuster der Muskelschwäche (Walter et al., 2007), während die beiden Mutationen E413K und R454W zu restriktiven Kardiomyopathien führen (Bär et al., 2007).

Obwohl die Akkumulation von aggregiertem Desmin einen einheitlichen histopathologischen Befund darstellt, muss immer noch aufgeklärt werden, wie die verschiedenen, identifizierten Mutationen auf molekularer Ebene bei den betroffenen Patienten zu Fehlfunktionen der Muskelzellen führen. Prinzipiell könnte die Erkrankung durch einen Funktionsverlust („lack of function“) aufgrund der fehlerhaften Assemblierung regulärer Desminfilamente oder durch die Entstehung eines neomorphischen Effekts aufgrund der Bildung „toxischer“ intrazellulärer Aggregate verursacht werden.

Durch den Einsatz der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten Proteinen soll im Rahmen dieser Arbeit die Desmin-Aggregation quantitativ auf Einzelmolekülebene näher untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Effekte der einzelnen Mutationen auf die frühe Desmin-Assemblierung und -Aggregation näher zu charakterisieren und so ein System zu entwickeln, mit dem bereits beschriebene, wie auch neue Mutationen im Desmin-Gen bei Patienten mit primärer Desminopathie molekular charakterisiert und klassifiziert werden können. Diese

Informationen sollen dazu dienen, die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu verbessern, die genetische Beratung der Patienten zu optimieren und eine Prognose über den weiteren Krankheitsverlauf zu ermöglichen.

Ein besseres Verständnis der molekularen Signalwege könnte zu neuen Therapieansätzen führen, da bis heute nicht geklärt ist, ob eine Verbesserung der physiologischen Filamentbildung oder aber eine Reduktion der pathologischen Aggregate wichtiger ist, um eine normale Zellfunktion aufrecht zu erhalten. Die Tatsache, dass die Desmin-Assemblierung auf unterschiedliche Weise durch die einzelnen Mutationen beeinflusst wird und diese zu unterschiedlichen Phänotypen (z.B. vorwiegende Beteiligung der Skelettmuskulatur versus vorwiegende kardiale Beteiligung) führen, zeigt, dass verschiedene Signalwege vorhanden sein müssen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammten, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich oder Roth.

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.1.1 Prinzip der PCR

Für die Generierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurde sowohl die gesamte, als auch nur bestimmte Abschnitte der Desmin-cDNA, flankierende Regionen der Plasmid-DNA und zum Teil auch neue Basensequenzen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction = PCR) amplifiziert. Das von Mullis entwickelte Verfahren ermöglicht die exponentielle *in vitro* Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte (Mullis, 1990).

3.2.1.2 PCR-Primer

Die verwendeten Primer wurden entworfen, basierend auf der in der Genbank veröffentlichten Sequenzen des Desmin-Gens (www.genome.ucsc.edu) und bei Metabion, (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

3.2.1.3 PCR-Reaktionsbedingungen

Standard-PCR-Protokoll:

Ein typischer PCR-Ansatz enthält in 50 µl Reaktionsvolumen:

5 µl Accu Prime Reaction Mix

50 pmol sense Primer

50 pmol antisense Primer

10-50 ng DNA

2,5 Units Accu Prime DNA-Polymerase

H₂O ad 50 µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt.

Ein typisches PCR-Programm umfasst:

1. 95°C : 2 min	Denaturierung der DNA
2. 25 Zyklen: (1) 95°C : 15 sec (2) 55°C : 30 sec (3) 72°C : 3 min	Aufschmelzen der DNA Doppelstränge Anlagern der Primer (Annealing) Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)
3. 72°C : 7 min	Abschließende Extension

Um zusätzlich zur Amplifikation eine neue Restriktionsschnittstelle oder eine Mutation in ein PCR-Produkt einzufügen, wurden sogenannte Mismatch-Primer mit entsprechend modifizierten Basen verwendet.

3.2.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Proben wurden durch Gelelektrophorese auf Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen aufgetrennt. Dabei wurden die Konzentrationen der Gele, abhängig von den zu trennenden Fragmentlängen, zwischen 1% und 4% gewählt. Die Gelbereiche mit den gewünschten PCR-Fragmenten wurden ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) oder High Pure PCR Purification Kit (Roche) entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers extrahiert.

3.2.3 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte durch die Firma Eurofins Medigenomix GmbH (Ebersberg, Deutschland) mit DNA-Sequenziergeräten der Firma Applied Biosystem (Darmstadt, Deutschland) und fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren. Die Verifizierung der erhaltenen Sequenz erfolgte computergestützt online über den Server des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nih.gov/BLAST/).

3.2.4 Klonierung der verwendeten Plasmide

3.2.4.1 Klonierung von PCR-Produkten in den pEGFP-N1-Vektor

Der Desmin-pDS5-Vektor wurde von Prof. H. Herrmann (Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Herrmann et al., 1999). Die Desmin-Wildtyp-cDNA wurde in die beiden Schnittstellen *KpnI* und *AgeI* des pEGFP-N1-Vektors (BD Biosciences Clontech, USA) subkloniert, welcher auch für das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) kodiert. Dazu wurde ein PCR-Fragment (Fragmentlänge ca. 1400 bp) mit den Primern Des-frag_s: 5'-TATTAGGTACCCGCCACCATGGCCCAGGCCTACTGGTCC-3' und Des-frag_{as}: 5'-TTGATACCGGTCCTGAGAGCACTTCATGCTGCTGC-3' aus der Plasmid-DNA amplifiziert und so zusätzlich die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *AgeI* eingeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *AgeI* geschnitten und in den mit *KpnI* und *AgeI* linearisierten pEGFP-N1-Vektor ligiert. Die Basensequenz wurde durch direkte Sequenzierung des Plasmids überprüft.

3.2.4.2 Einführung der Mutationen R350P, E413K und R454W in den Desmin-pEGFP-N1-Vektor

Um die strukturellen Konsequenzen der Mutationen R350P, E413K und R454W zu untersuchen wurden sie durch ortsgerichtete (site-directed)-Mutagenese eingeführt (Ho, S.N. et al., 1989). Dazu wurden die Mismatch-Primer R350P_s: 5'-TGATGAGGCAGATGCcGGAATTGGAGGACCG-3' und R350P_{as}: 5'-CGGTCCTCCAATTCCgGCATCTGCCTCATCA-3', E413K_s: 5'-TGCTGGAGGGAGAGaAGAGCCGGATCAATCTC-3' und E413K_{as}: 5'-GAGATTGATCCGGCTCTtCTCTCCCTCCAGCA-3', R454W_s: 5'-AGACCATCGAGACAtGGGATGGGGAGGTCGTC-3' und R454W_{as}: 5'-GACGACCTCCCCATCCCaTGTCTCGATGGTCT-3' verwendet. Die klein geschriebenen Basen geben den eingeführten Mismatch an. Bei den erhaltenen Klonen wurde das eingebaute Teilstück sequenziert, um die Orientierung des Inserts und das Vorhandensein der jeweiligen Mutation zu kontrollieren und um unerwünschte Sequenzveränderungen durch die PCR auszuschließen.

3.2.4.3 Klonierung von Desmin-pEGFP-N1-Vektoren ohne EGFP

Um den Einfluss des GFP-Tags auf das Aggregationsverhalten von Desmin abschätzen zu können, wurden Desmin-pEGFP-N1-Plasmide mit fehlendem GFP-Tag kloniert. Dazu wurde mit den beiden Primern GFP_s: 5'-CCGGTCTACTAATGAGC-3' und GFP_{as}: 5'-GGCCGCTCATTAGTAGA-3' ein Fragment mit einer Stopcassette durch Hybridisierung gebildet. Das Fragment wurde anschließend in den mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *NotI* geschnittenen pEGFP-N1-Vektor ligiert und sequenziert.

3.2.5 Ligation

Die Ligation von Insert und Vektor bei der Klonierung wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden bei 16°C über Nacht inkubiert. Vor der Transformation in *E. coli* wurde die T4-Ligase 5 min bei 65°C inaktiviert.

3.2.6 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man das Verfahren zur Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Die Transformation der kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (Invitrogen) wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C).

3.2.7 Bakterienkultur

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α verwendet (Invitrogen). Die Bakterien wurden bei 37°C in LB (Luria-Bertani)-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin, Endkonzentration 100 μ g/ml oder Kanamycin, Endkonzentration 50 μ g/ml) zur Selektion oder auf LB-Platten kultiviert.

3.2.8 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Quiagen, 3ml Bakterienkultur) bzw. für größere Plasmidmengen mit Hilfe des QIAprep Maxiprep Kits (Quiagen, 250ml Bakterienkultur) entsprechend dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

3.3 Zellkultur

Für die Analyse des Aggregationsverhaltens der Desminmutanten im Vergleich zum Desmin-Wildtyp wurde die humane Nebennierenkarzinom-Zelllinie SW 13 und die humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie HEK 293 verwendet. Beide Zelllinien exprimieren kein endogenes Desmin. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM-Medium (supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum und 2 mM Glutamin) kultiviert. Die Medien und Reagenzien für die Zellkultur wurden von den Firmen Gibco/Invitrogen sowie PAA Laboratories GmbH bezogen.

3.3.1 Transfektion von HEK 293-Zellen zur Aggregationsanalyse mittels SIFT

24 Stunden vor der Transfektion wurden 1×10^6 HEK 293-Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät, so dass sie bei der Transfektion eine etwa 50%ige Konfluenz aufwiesen. Die Transfektion von 8 µg Plasmid-DNA wurde mit dem Reagenz Polyplus jet PEI™ entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion durch Abschaben geerntet und sofort zu Proteinextrakten weiterverarbeitet.

3.3.2 Transfektion von SW 13-Zellen für Immunfluoreszenz

24 Stunden vor der Transfektion wurden 1×10^5 SW 13-Zellen in 6-well-Platten ausgesät, die pro Well 3 Deckgläschen enthielten. Bei Transfektion hatten die Zellen eine 50-60%ige Konfluenz. Die Transfektion wurde mit dem Reagenz FuGENE 6 (Roche, Mannheim) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion gefärbt.

3.4 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie auf unbeschichteten Deckgläschen kultiviert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und mit 3,7% Paraformaldehyd in 1xPBS fixiert (15 min bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen, die mit den Desmin-Konstrukten ohne GFP-Tag transfiziert worden waren, mit 0,1% Triton X-100 in 1xPBS permeabilisiert (10 min bei Raumtemperatur), dreimal mit 1xPBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 3% Triton X-100 und 5% Pferdeserum in 1xPBS blockiert (1 Stunde bei Raumtemperatur).

Der erste Antikörper (anti-Desmin; rabbit polyclonal; CellSignaling, Danvers, USA), 1:25 verdünnt mit 3% Triton X-100 und 5% Pferdeserum in 1xPBS, wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal mit 1xPBS (5 min bei Raumtemperatur) gewaschen und der zweite Antikörper (1:200; anti-rabbit IgG; Dianova, Hamburg) auf die Zellen gegeben (1 Stunde bei Raumtemperatur).

Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid H 33258 (40 µg/ml) gefärbt. In den Zellen, die mit den Desmin-GFP-Konstrukten transfiziert worden waren, wurden die Zellkerne direkt nach der Permeabilisierung angefärbt. In diesen Zellen diente die Expression von GFP als ein Marker für eine erfolgreiche Transfektion.

Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS (5 min bei Raumtemperatur) wurden die Deckgläschen mit Dako® Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt. Die Zellen wurden mit einem Leica Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Kamera analysiert und fotografiert.

3.5 Herstellung der Proteinextrakte

Für die FCS/SIFT-Messungen wurden aus den transfizierten HEK 293-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion Proteinextrakte hergestellt.

Für *de novo* Aggregationsanalysen wurde auf die Zellen 1xPBS gegeben und diese durch Abschaben geerntet. Nach einem Zentrifugationsschritt (20000 g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet mit 0,03% DNase I recombinant, RNase-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer 9,5 M Harnstoff-Lösung homogenisiert und nochmal zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand in Cellulose Dialysecups (Slide-A-Lyzer® Mini Dialysis Units; 10,000 MWCO; Pierce, Rockford, USA) überführt und über Nacht bei 4°C in einen Tris-Puffer (Zusammensetzung s.u.) dialysiert. Die dialysierten

Harnstoffextrakte wurden bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiter verarbeitet. Dazu wurden sie zentrifugiert (120000 g, 30 min) und der Überstand 1:5 mit dem Tris-Puffer verdünnt. Das Fehlen von größeren Aggregaten wurde durch eine SIFT-Messung überprüft. Unmittelbar vor der Messung wurde die Stammlösung 1:1 mit dem Assembly-Puffer (AB; Zusammensetzung s.u.) verdünnt und so die Aggregation initiiert. Für die Koaggregationsstudien von mutiertem und Wildtyp-Desmin wurden die Desminspezies kurz vor der Zugabe des Assembly-Puffers gemischt. Die Aggregatbildung wurde in jeder Messung über mindestens 50 Minuten in 4 unabhängigen Proben pro Versuch gemessen.

Für direkte Messungen der Proteinaggregate in physiologischen Zellhomogenaten, wurden nicht-denaturierte Proteinextrakte mit einem 1% NP-40-Puffer (Zusammensetzung s.u.) hergestellt. Dazu wurden die Zellpellets in einem 1%NP-40-Puffer aufgenommen, 10 Minuten auf Eis inkubiert, homogenisiert und nach Zentrifugation (20000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen. Die Proteinextrakte wurden entweder direkt im Anschluss gemessen oder bei -80°C aufbewahrt.

Alle Messlösungen enthielten 20-80 nM Desmin-GFP in 20 μl Probenvolumen. Für die Versuche wurden 384-Well-Platten der Firma Evotec-Technologies verwendet. Um eine Verdunstung zu vermeiden, wurden die Wells während der Messung mit Tesa-Film verschlossen.

Tris-Puffer:

- 5 mM Tris-HCl (pH 8,4)*
- 1 mM EDTA*
- 0,1 mM EGTA*
- 1 mM DTT*

1% NP-40-Puffer:

- 50 mM Tris-HCl (pH 7,6)*
- 1% NP-40*
- 150 mM NaCl*
- 1 mM EDTA*

Assembly-Puffer:

- 45 mM Tris-HCl (pH 7,0)*
- 100 mM NaCl*

3.6 FCS und SIFT

FCS (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie) und SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets, Messmethoden zur Detektion von Einzelmolekülen und Aggregaten), sind die zentralen Methoden dieser Arbeit. Das theoretische Konzept der FCS wurde von P. Schwille ausführlich beschrieben (Schwille, 1997). Die theoretische Basis der SIFT-Technik findet sich in allen Einzelheiten bei Bieschke und Giese (Bieschke et al., 2000).

3.6.1 FCS (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie)

Die FCS beruht auf einer Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals aus einem offenem Volumenelement, das durch die konfokale Abbildung eines oder mehrerer in einem Fokus gebündelter Anregungslaser definiert wird. Die FCS erfasst fluoreszierende Teilchen in Lösung mit einem stationären Fokus. Die Auswertung des gemessenen Signals wird im Rahmen dieser Arbeit mit der Autokorrelationsanalyse (siehe 3.6.5.1) durchgeführt. Auf diese Weise können aus nur einer Messung Informationen zu Teilchenanzahl, Diffusionsgeschwindigkeit und spezifischer Helligkeit der Teilchen in Lösung gewonnen werden. Anhand der in der Messlösung detektierten Teilchen kann deren Konzentration bestimmt werden. Diffusionsgeschwindigkeit und spezifische Helligkeit der Einzelpartikel lassen u.a. einen Schluss auf die Größe der Teilchen zu (siehe 3.6.5).

3.6.2 SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets)

Für das SIFT-Verfahren wird ein mobiler Fokus verwendet, der pro Messung einmal durch das Messgefäß mäandriert. Im verwendeten Insight II Reader wird dieses Ziel durch einen Beams Scanner realisiert (Giese et al., 2004; Giese et al., 2005). Durch den mobilen Fokus wird das untersuchte Volumen erheblich erhöht. Dies steigert die Sensitivität der Messtechnik gegenüber sehr großen, seltenen und langsamen Teilchen, wie zum Beispiel Proteinaggregaten, stark. Die untere Detektionsgrenze hängt sehr von der Helligkeit der gesuchten Teilchen ab und liegt für sehr helle Teilchen sogar im attomolaren Bereich (Bieschke, et al., 2000; Giese et al., 2000).

Das Fluoreszenzsignal wird in sukzessive aufgezeichnete Zeitintervalle konstanter Länge (im Mikro- bis Millisekundenbereich), sogenannten „bins“ unterteilt. Anhand der Intensitätsverteilung kann das hochintense Signal der markierten Zielmoleküle vom

Hintergrund analytisch abgetrennt werden. Für die großen, sehr langsam diffundierenden Zielmoleküle wird die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus nicht mehr durch die Diffusionszeit (τ_{Diff}), sondern im Wesentlichen durch die Scangeschwindigkeit bestimmt, weswegen alle Zielmoleküle auf der gleichen Anzahl bins abgebildet werden. Daher ist die Anzahl hochintenser bins ein direktes Maß für die Konzentration hochmarkierter Zielmoleküle.

Das mit dem mobilen Fokus aufgenommene Signal wird mit der FIDA-Analyse (siehe 3.6.5.2) und der SIFT-Auswertung (siehe 3.6.5.3) analysiert.

3.6.3 Messaufbau

Alle Messungen dieser Arbeit, die auf konfokaler Einzelmolekülspektroskopie basieren, wurden mit Insight II Readern der Firma Evotec OAI aus Hamburg, Deutschland, durchgeführt. Mit diesen Geräten sind FCS- und SIFT-Messungen durchführbar. Diese Reader sind im Grundaufbau konfokale Mikroskope. In ihnen wird Laserlicht, in diesem Fall Licht eines Argon-Ionen-Lasers der Wellenlänge 488 nm (und falls benötigt, Licht eines Helium-Neon-Lasers der Wellenlänge 633 nm), im Messgerät des Probenträgers zu einem Fokusvolumen von etwa einem Femtoliter fokussiert. Die in den Insight II Readern verwendeten Probenträger, 24-Well-Probenträger sowie 96- und 384-Well-Platten der Firma Evotec, besitzen einen Glasboden und sind mit einem Metallrahmen zum Schutz gegen Verformungen ausgestattet. Die in den Probenträgern befindlichen Messgefäße fassen ein Volumen von jeweils 30 μl .

Zur optischen Kontrolle der Position des Laserfokus sind die FCS-Reader mit einer über Spiegel mechanisch zuschaltbaren Videokamera ausgestattet. Mit dieser wird der Fokus auf seine Idealposition, die sich ca. 150 μm über dem Glasboden der Probenträger in der Messlösung befindet, eingestellt.

Der Brennpunkt des Lasers bildet das offene Messvolumen der FCS. Die im Fokusvolumen angeregten fluoreszierenden Teilchen senden Photonen aus, die über zwei dichroische Spiegel und ein 70 μm großes Pinhole zu zwei Einzelphotonendetektoren, sogenannten Avalanche-Photo-Dioden (APD), geleitet werden (Abbildung 4). Die APDs liegen bis 1000 kHz Gesamthelligkeit in einem Bereich, in dem sie lineare Messergebnisse liefern. Um eine gute Auswertbarkeit der Messungen zu gewährleisten, sollte dieser Bereich nie verlassen werden.

Die Messapparatur ist über die Steuerungssoftware FCS+plus_control der Firma Evotec steuerbar. Mit ihr kann man sowohl den mobilen Probenträgertisch, als auch über

Schrittmotoren das Pinhole bewegen. Da die Insight II Reader Wasserimmersionsobjekte verwenden, besitzen sie eine zeitgesteuerte automatische Immersionswasserzufuhr.

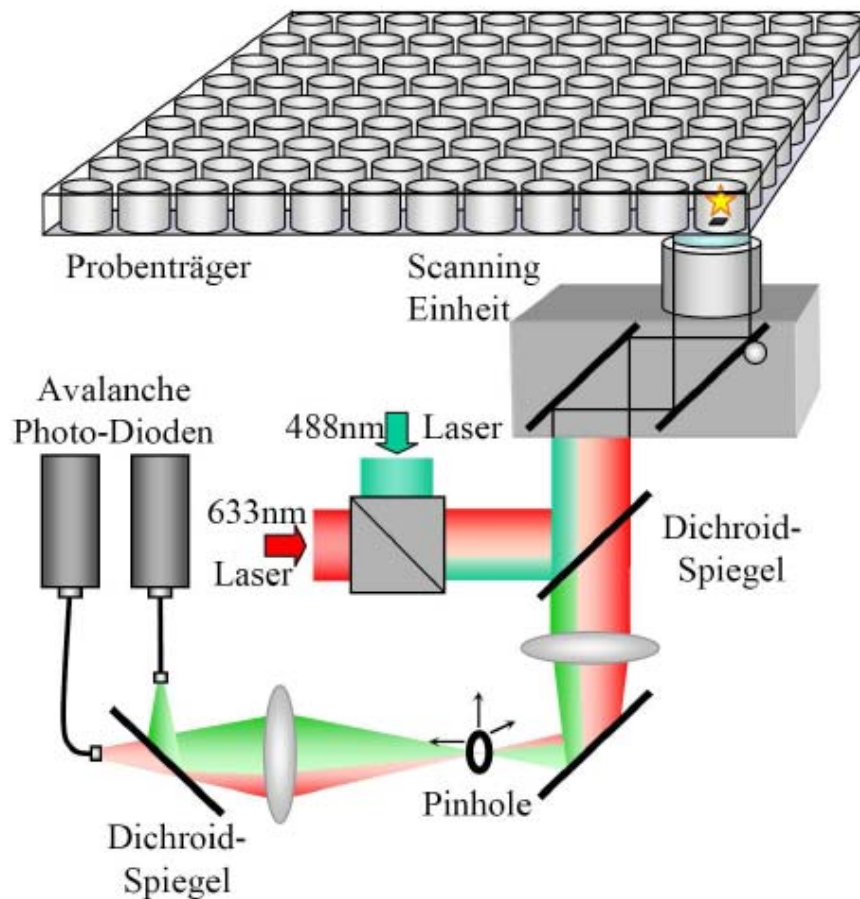


Abbildung 4: Messaufbau eines zwei-Farben-FCS-Readers mit Scanning-Einheit für SIFT-Messungen und einem Multiwell-Proben-träger. Das Laserlicht wird über einen Dichroism-Spiegel, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert und die Optik eines konfokalen Mikroskops besitzt, in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht kommt über denselben Weg zurück, passiert jedoch den zweifarbenen Spiegel und wird über ein Pinhole zu Photonendetektoren, den Avalanche-Photo-Dioden, geleitet.

3.6.4 Messbedingungen und Justage

Für die Inbetriebnahme und Justage wurde stets nach einem festen Schema vorgegangen.

Der Laser wurde 20 Minuten vor Beginn der Justage eingeschaltet, da er erst nach dieser Aufwärmzeit seine Anregungsenergie stabil hält. Um die Messungen im linearen

Detektionsbereich der APDs durchführen zu können (siehe 3.6.3), wurde für alle Messungen die Anregungsenergie von 200 μW gewählt.

Neben der Überprüfung der Laserleistung ist die Justage des Pinholes und der Glasfaserleitungen der wichtigste Teil der Justage. Sie müssen vor jeder Messung neu justiert werden. Zur Justage wurde eine Messlösung aus freiem Farbstoff mit bekannten Messparametern verwendet. Anhand des Vergleichs mit diesen Parametern wurde die Pinholeposition und die Position der Glasfaserleitungen manuell oder mit Hilfe des Kontrollprogramms so eingestellt, dass man eine optimale Fokusabbildung erzielt.

Ein bedeutender Kontrollparameter für die Readereichung ist die CPP, „counts per particle“. Dieser Wert beschreibt die Helligkeit der Farbstoffmoleküle und ist daher unabhängig von der jeweiligen Farbstoffkonzentration der Eichlösung. Anhand der Diffusionsgeschwindigkeit (siehe 3.6.5.1) lässt sich die Abbildungsschärfe des Fokus beurteilen, da die Teilchen scheinbar langsamer durch den Fokus diffundieren, wenn dieser unscharf abgebildet wird.

Die Axis Ratio (siehe 3.6.5.1) drückt die Fokusform des Laserstrahlfokus im Verhältnis Länge zu Breite aus. Zu große oder zu kleine Werte der Axis Ratio weisen auf eine schlechte Justage des Messgerätes hin.

Nach jeder Inbetriebnahme und Justage des Messgerätes wurde eine Justagemessung mit der bekannten Farbstofflösung durchgeführt. Die Messwerte wurden zu Kontrollzwecken notiert. Für die Messung selbst wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Chemikalien mit Ausnahme des GFP-Tags nicht fluoreszierten. Für die Messdauer wurde, um eine gute Auswertbarkeit der Daten zu gewährleisten, darauf geachtet, dass sie nicht weniger als das Tausendfache der Diffusionszeit der langsamsten Teilchen beträgt. Für alle FCS-, SIFT- und Justagemessungen dieser Arbeit wurden Messzeiten von 10 Sekunden verwendet.

3.6.5 Auswertungsverfahren

3.6.5.1 Autokorrelationsanalyse

Das Prinzip der Autokorrelation ist das Folgende: Die Messzeit jeder Einzelmessung wird in Zeitfenster von 50 ns unterteilt. Diese Zeitfenster können entweder den Zahlenwert 1 oder den Zahlenwert 0 annehmen, je nachdem, ob ein oder mehrere Photonen detektiert wurden oder nicht. Man erhält also eine Zahlenreihe von aufeinanderfolgenden Einsen und Nullen. Jede dieser Einsen und Nullen enthält für ein Zeitfenster von 50 ns die Aussage „mindestens ein Photon detektiert“ = 1, oder „kein Photon detektiert“ = 0. Für den Selbstvergleich, „auto-, Korrelation, wird jedes Zeitfenster mit anderen Zeitfenstern, die in Zeitabständen aus

Vielfachen des kleinsten Abstandes von 50 ns entfernt liegen, multipliziert. Die verwendeten Zeitabstände nennt man Korrelationszeiten. Die Multiplikation der Zeitfenster wird mit verschiedenen Korrelationszeiten über den gesamten Datensatz durchgeführt. Dabei variieren die Korrelationszeiten von 50 ns, bei denen also benachbarte Zeitfenster multipliziert werden, bis zu mehreren Sekunden. Die Ergebnisse der Multiplikation werden für jede Korrelationszeit einzeln addiert. Diese Summe gibt die Häufigkeit wieder, mit der in einer Korrelationszeit Photonen detektiert werden. Nach Normierung der Werte auf die durchschnittliche Häufigkeit, mit der pro Korrelationszeit Photonen detektiert werden, werden die Ergebnisse auf der Y-Achse eines Graphen, der die Korrelationszeiten auf der X-Achse trägt, aufgetragen. Die X-Achse dieses Graphen wird typischerweise logarithmisch angezeigt. Zur weiteren Auswertung wird an die Autokorrelationsfunktion eine andere, mathematisch bekannte Kurve angepasst. Die aus der Autokorrelationsfunktion zu berechnenden Parameter sind für diese Kurve bekannt. Die angepasste Kurve wird im Englischen „Fit“ genannt, im Folgenden wird diese Nomenklatur übernommen.

Bei der Angabe der aus der Autokorrelationsfunktion berechneten Parameter wird angenommen, dass diese mit der Kurve des Fits identisch sind. Kontrolliert wurde diese Annahme bei der Auswertung anhand des Qualitätsparameters χ^2 , der den Unterschied zwischen Daten und Fit und damit die Glaubwürdigkeit der Parameter angibt. χ^2 wird als Residualkurve angezeigt, die idealerweise zufällig um Null verteilt liegt (Abbildung 5).

Die anhand des Fits aus der Autokorrelation bestimmten Parameter sind unter anderem die mittlere Diffusionszeit der Partikel, die mittlere Helligkeit der Partikel, genannt CPP (= counts per particle), und die Partikelzahl. Die Gesamthelligkeit der Probe I_{tot} wird unabhängig von der Autokorrelationsfunktion bestimmt.

Die mittlere Diffusionszeit (τ_{Diff}) der Partikel ist definiert als der halbmaximale Wert der an die Autokorrelationsfunktion angefitzten Kurve auf der Y-Achse (s.o.). Für globuläre Partikel gleicher Dichte, wie es Proteinmoleküle näherungsweise sind, lässt sich so aus der mittleren Diffusionszeit die ungefähre Masse der Partikel berechnen. Dabei gilt $\tau_{\text{Diff}} \sim \sqrt[3]{M}$. Auf diese Weise kann also das Molekulargewicht (M) aus der Autokorrelationsfunktion berechnet werden, wobei aus der Formel hervorgeht, dass sich die Masse eines Moleküls bei doppelter Diffusionszeit verachtfacht. Bei Aggregationsprozessen lassen sich auf diese Weise die Anzahl der Monomere in einem Aggregat abschätzen.

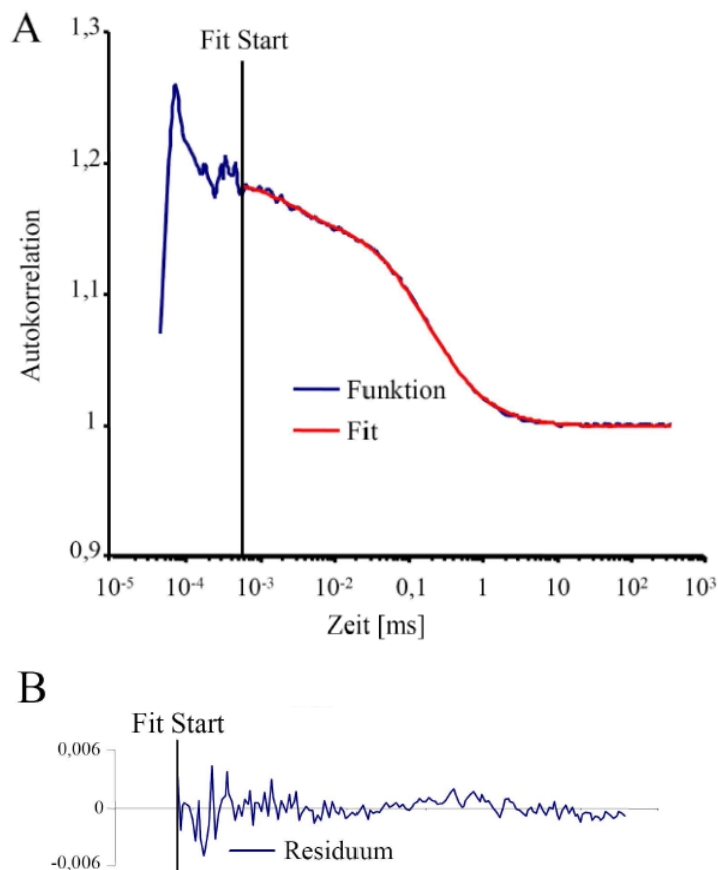


Abbildung 5: (A) Typische Autokorrelationsfunktion einer FCS-Messung. Die Y-Achse zeigt die Autokorrelationswerte und die X-Achse die Korrelationszeiten an. Die rote Kurve stellt den Fit dar. (B) Zeigt die Residualkurve, welche die Abweichung der Autokorrelationsfunktion vom Fit darstellt.

Die Partikelzahl (N) ist besonders für Aggregationsstudien ein interessanter Wert, da die Teilchenanzahl während der Aggregation abnimmt, wohingegen die Parameter für die Teilchengröße wie CPP (s.u.) und Diffusionszeit zunehmen. Die inverse Amplitude der Autokorrelation entspricht nach Einführung einer Normalisierungskonstanten der Partikelzahl (Abbildung 5).

Die Gesamtintensität I_{tot} ist ein Wert, der direkt aus dem, vom Einzelphotonendetektor gemessenen Wert hervorgeht. Die Intensität ist der in Kilohertz (kHz) angegebene Mittelwert der Photonenzählrate des verwendeten Detektors.

CPP (counts per particle) ist ein Wert zur Beschreibung der mittleren Helligkeit der einzelnen Partikel. Er berechnet sich aus der Intensität des gemessenen Signals pro Anzahl der Partikel. Die CPP ist besonders für die Eichung des Messgerätes ein wichtiger Parameter, da die CPP von den Farbstoffkonzentrationen in der Eichlösung weitgehend unabhängig ist und sich daher gut mit Vorwerten vergleichen lässt.

Ein weiterer wichtiger Signalanteil ist die Triplett-Fraktion. Die Herkunft der Triplett-Fraktion erklärt sich anhand der Vorgänge bei der Entstehung von Fluoreszenz. Fluoreszenz entsteht, wenn eines der Elektronen des fluoreszierenden Moleküls durch Energie des Laserstrahls angeregt seine Elektronenschale verlässt, in eine höher gelegene Elektronenschale angehoben wird und bei der Rückkehr auf das Ausgangsenergieniveau die überschüssige Energie u.a. in Form eines Photons wieder abgibt. Das energetische Zurückfallen findet sehr schnell, im Mittel nach nur 1-6 ns statt, so dass ein Molekül während es sich im Fokus befindet, viele tausend Anregungszyklen durchlaufen kann. Die dabei ausgesendeten Photonen haben eine etwas geringere Energie und eine etwas größere Wellenlänge als die für die Anregung benötigte Laserenergie. Diesen Unterschied nennt man Stokes-Shift. Er ist für jeden Fluoreszenzfarbstoff hinsichtlich benötigter Anregungsenergie und schließlich ausgesandter Photonen charakteristisch. Statt regulär in die höhere Elektronenschale angehoben zu werden, kann das Elektron jedoch mit einer unter anderem von der Anregungsintensität und den Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes abhängigen Wahrscheinlichkeit in den sogenannten Triplett-Zustand übergehen. Er dauert mit ca. 2-10 μ s in etwa tausendmal länger an als der normale Anregungszustand. Die mittlere Verweildauer der Elektronen im Triplett-Zustand nennt man Triplett-Zeit (Ttrip). Beim Verlassen des Triplett-Zustandes wird kein Photon ausgesandt, also ist der Fluoreszenzfarbstoff während dieser Zeit dunkel. Die Triplett-Fraktion wird bei der Analyse der Daten durch die Auswertungssoftware FCS+plus_Eval 2.0 berücksichtigt.

Anhand des Fittes lässt sich auch die Fokusform des Lasers und damit das Messvolumen beschreiben. Dies geschieht mit der Axis Ratio (AR). Die Axis Ratio ist das Verhältnis der Längsachse zur Querachse des länglichen Fokus. Die AR ist ein Parameter zur Beurteilung der Justage des Messgerätes.

Neben einem Fit für nur eine Komponente kann man als Berechnungsgrundlage auch annehmen, dass die Probe mehrere Teilchenspezies (= Komponenten) enthält. Aus einem Mehrkomponenten-Fit erhält man pro Komponente eine eigene Diffusionszeit und ihren prozentualen Anteil an der Gesamthelligkeit der Teilchen. Die Summen der Prozentwerte aller Teilchenspezies eines Mehrkomponenten-Fits ergeben somit immer 100% (Ehrenberg et al., 1976; Schwille et al., 1997; Evotec OAI., 2001; Bacia and Schwille, 2003; Meseth et al., 1999; Haustein and Schwille, 2003).

3.6.5.2 FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis)

FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis) ist eine Methode zur Analyse der spezifischen Helligkeit einzelner fluoreszierender Moleküle in Proben mit heterogenen Helligkeitsprofilen. FIDA wurde benutzt, um mit SIFT (siehe 3.6.2) gewonnene Daten zu analysieren, da sich die mit dem mobilen Fokus ermittelten Daten nicht sinnvoll mit der Autokorrelationsanalyse auswerten lassen. Die Basis der FIDA-Analyse ist die statistische Analyse von Photonenzahlen, die in Zeitfenstern von typischerweise 40 μs während der Messung erfasst werden. Diese Zeitfenster werden im Folgenden „bins“ genannt (siehe 3.6.2). Aus allen detektierten Photonen werden durch einen FIDA-Multikomponentenfit verschiedene fluoreszierende Partikelspezies aufgelöst.

Die Identifikation der einzelnen Partikelspezies wird auf der Basis der unterschiedlichen spezifischen molekularen Helligkeiten der Partikel erreicht. Für jede Komponente des Partikelgemisches gilt: I_x ist die Intensität der Fluoreszenz [kHz], c_x ist die Konzentration, also die durchschnittliche Anzahl der Teilchen im Fokusbereich, und q_x ist die spezifische Helligkeit [kHz] der molekularen Fluoreszenz, also die von jedem einzelnen Teilchen verursachte mittlere Fluoreszenz. Daraus folgt, dass jede Partikelart, die eine charakteristische, von den anderen unterschiedliche Fluoreszenz zeigt, im Fit nach ihrer spezifischen Helligkeit (q) und Konzentration (c) charakterisiert wird (siehe Abb. 7). Dabei entsprechen die spezifische Helligkeit der CPP und die Konzentration der Partikelzahl der Autokorrelationsanalyse (siehe 3.6.5.1)

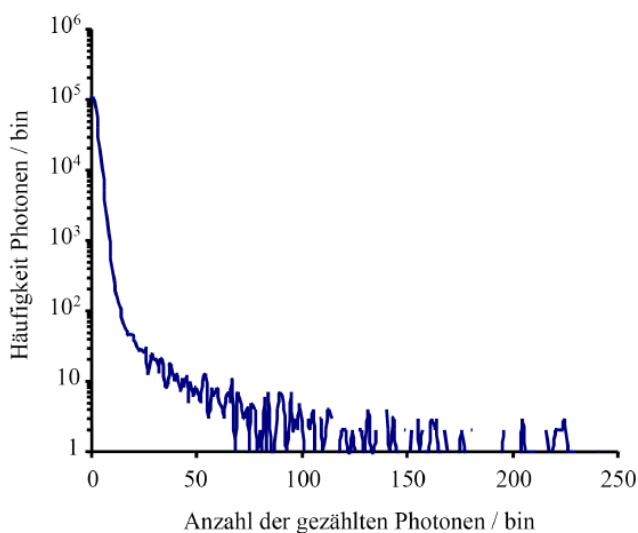


Abbildung 6: Typische FIDA-Kurve einer Messung mit Beamscanner. Die X-Achse zeigt die Anzahl der pro 40 μs detektierten Photonen und die Y-Achse die Häufigkeit dieses Ereignisses an. An der Kurve selbst erkennt man, dass die Probe einige Aggregate enthält, für die bis über 200 Photonen pro bin detektierbar sind.

Die zur Analyse der Daten verwendete Auswertungssoftware, FCS+plus_Eval 2.0 der Firma Evotec OAI, erlaubt die gleichzeitige Auswertung von bis zu vier Partikelspezies, mit unterschiedlichen Konzentrationen und Helligkeiten.

Der Qualitätsparameter χ^2 gibt, wie auch bei der Autokorrelationsanalyse, die Übereinstimmung der Daten mit dem Fit an und damit, ob die durchgeführte Datenanalyse aussagekräftig ist. Je kleiner χ^2 ist, desto besser ist der Fit. Ein idealer Fit hat in FIDA den χ^2 Wert 1, aber auch Werte bis 2 sind generell akzeptabel. Nur bei Messungen von sehr inhomogenen Lösungen sollte man χ^2 Werte bis zu 10 erwarten. Die Abweichungen vom Fit im Einzelnen werden, wie am Beispiel der Autokorrelationsfunktion gezeigt, in der sogenannten Residualkurve unter dem Fit dargestellt (Abbildung 5B). Bei einem sehr guten Fit sollte sie zufällig um Null verteilt liegen. Dies wurde bei meiner Datenanalyse stets beachtet.

Um die Mengenverhältnisse von Desmin-Dimeren, -Tetrameren und größeren Aggregaten in nicht-denaturierten Zelllysaten zu bestimmen, wurde ein Dreikomponenten-Fit verwendet. Dazu wurden die Partikelhelligkeiten von Desmin-Dimeren und -Tetrameren in einem Dreikomponenten-Fit gemessen, die Werte festgesetzt und anschließend für den gesamten Datensatz verwendet.

3.6.5.3 SIFT-Auswertung

Die Daten der SIFT-(Scanning for Intensely Fluorescent Targets) Messung können auch als Intensitätshistogramm dargestellt werden, wobei die X- und Y-Achsen die gezählten Photonen der beiden Detektoren anzeigen. Mit dieser Darstellungstechnik entstehen Punktwolken, die einen guten Eindruck über die, während der Aggregation ablaufenden Prozesse und die Qualität der Messung vermitteln. Die so gewonnenen Daten werden mit dem 2D-SIFT Softwaremodul (Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland) weiter analysiert. Zur Datenanalyse mit diesem Verfahren wird zuerst die Größe des Punktwolkenanteils, der aus nicht aggregiertem Desmin besteht anhand von Parallelproben, die nicht aggregiertes Protein enthalten, festgelegt. Dieser in der linken unteren Ecke der Punktwolkendarstellung gelegene Bereich, dessen Größe auch automatisch von der Software festgelegt werden kann, wird in der weiteren Analyse als separater Sektor betrachtet. Danach wird der verbliebene Teil der 2D-Punktwolkendarstellung in gleich große Segmente unterteilt und die Anzahl der Punkte in jedem einzelnen dieser Segmente von der Software aufsummiert.

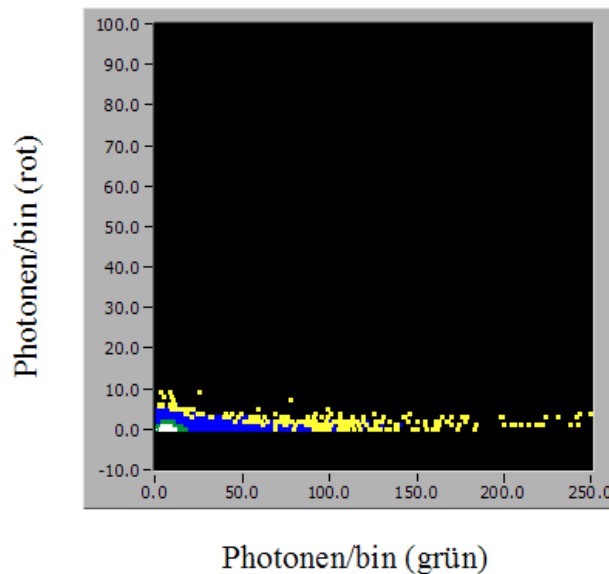


Abbildung 7: Beispiel für ein Intensitätshistogramm einer SIFT-Auswertung. Die Y-Achse zeigt die Photonenzahl/bin für den roten Kanal bis zu einem Maximum von 100 Photonen und die X-Achse die Photonenzahl/bin für den grünen Kanal bis max. 250 Photonen an. Die einzelnen Ereignisse werden je nach Helligkeit und Häufigkeit farbcodiert als Punkte dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur mit grün fluoreszierenden Partikeln gearbeitet. Aus diesem Grund sind detektierbare Signale nur im grünen Kanal vorhanden.

Neben einer einfachen Aufsummierung der im Segment enthaltenen Punkte kann man auch eine photonengewichtete oder distanzgewichtete Summe errechnen lassen. Dabei wird berücksichtigt, dass Punkte, die peripherer im Segment liegen, mehr Photonen repräsentieren, also durch größere Aggregate verursacht wurden. Die größte erfassbare Photonenzahl pro Teilchen ist mit 255 Photonen pro 40 μ s in beiden Kanälen gleich. Die Häufigkeit der identifizierten Teilchenspezies wird anhand ihrer Fluoreszenzcharakteristik ermittelt. Die Anzahl hochintensiver bins ist ein direktes Maß für die Anzahl bzw. Konzentration großer Aggregate (siehe 3.6.2).

3.7 Proteinchemische Methoden

3.7.1 Aufkonzentration der Proteine

Von den dialysierten Harnstoffextrakten wurden jeweils 50 µl mit 250 µl kaltem (4°C) Methanol versetzt und die Proteine bei -20°C 30 Minuten gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (5000 g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 24 µl 1x Laemmli-Auftragspuffer (Zusammensetzung s.u.) in 1% Glycerin bei 37°C auf dem Schüttler resuspendiert und die Proteine nach Zugabe von 6 µl 5x Laemmli (6% SDS) 15 Minuten bei 95°C denaturiert (Laemmli, 1970).

5x Laemmli-Auftragspuffer:

- 20 mM Tris-HCl pH 6,8*
- 30% Glycerin*
- 6% SDS*
- 5% Mercaptoethanol*
- 0,03% Bromphenolblau*

3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (Western Blot)

Die Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Probenvolumina betragen jeweils 30 µl. Zum Abschätzen der Proteingrößen wurde bei jedem Lauf eine Proteinstandardlösung aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 1,5 Stunden (30 min bei 80V und 1 Std. bei 120V). Nach Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels wet-blotting (0,45 µm; Bio-Rad) wurden die unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Dazu wurde die Membran 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver in TBS-T geschwenkt und anschließend 3x 30 min mit TBS-T gewaschen. Über Nacht erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers (anti-Desmin, rabbit polyclonal; CellSignaling, Danvers, USA), verdünnt 1:1000 in TBS-T, bei 4°C. Die Membran wurde wieder 3x 30 min mit TBS-T gewaschen und der zweite Antikörper (goat anti-rabbit, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase; Jackson ImmunoResearch, USA), verdünnt 1:1000 in TBS-T, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Enzymaktivität mit dem CDP-Star Chemilumineszenz System (Tropix, Bedford, MA) und Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) gemäß den Herstellerempfehlungen sichtbar gemacht.

Sammelgel: *5% Acrylamid*
 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)
 0,15% SDS
 0,1% APS
 0,07% TEMED

Trenngel: *10% Acrylamid*
 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8)
 0,15% SDS
 0,05% APS
 0,035% TEMED

Laufpuffer: *25 mM Tris*
 200 mM Glycin
 1% SDS

1x TBS-T: *200 mM Tris-HCl (pH 8)*
 5 M NaCl
 0,2% Tween 20

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der klonierten Plasmide

4.1.1 Filamentbildung in transfizierten SW 13-Zellen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aggregationsanalysen wurde die Filamentbildung von ausgewählten Desminmutanten mit der des Wildtyps verglichen. Dazu wurden drei Desminmutationen ausgesucht, aufgrund ihrer Lage im Desmin-Gen, ihres vorher schon beschriebenen unterschiedlichen Aggregationsverhaltens und wegen ihrer verschiedenen klinischen Phänotypen (Bär et al., 2005; Bär et al., 2007). Für Transfektionsstudien und Fluoreszenzmikroskopie wurde die Desmin-cDNA C-terminal mit einem GFP-Tag versehen.

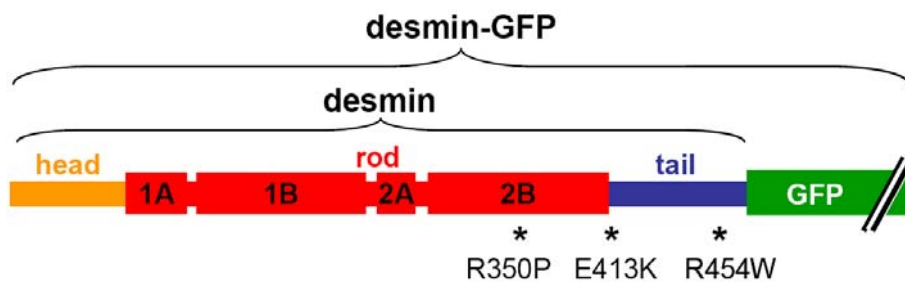


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Desmin-Gens, das sich aus einer head-, rod- und tail-Domäne zusammensetzt. Für die Aggregationsanalysen mittels Fluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und Scanning for Intensely Fluorescent Targets (SIFT) wurde ein C-terminaler GFP-Tag verwendet. Die Sternchen zeigen die Position der ausgesuchten Mutationen an.

Um die Filamentbildung der Desminmutanten in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden SW 13-Zellen mit den Desmin- und Desmin-GFP-Konstrukten transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen, die mit Desmin ohne GFP transfiziert worden waren, mit einem polyklonalen anti-Desmin Antikörper gefärbt. Mit Hilfe eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops wurde anschließend die Filamentbildung der Konstrukte fotografiert und miteinander verglichen.

Wie bereits in der Literatur beschrieben (Bär et al., 2005; Bär et al., 2007) formte wt-Desmin ein reguläres, zelluläres Netzwerk, im Gegensatz zu den beiden Mutationen R350P und E413K, die punktförmige Aggregate bildeten, die über das gesamte Zytoplasma verteilt vorlagen. Die Mutation R454W zeigte eine Filamentstruktur, die dem Wildtyp sehr ähnlich war (Abbildung. 9).

Um einen möglichen Einfluss des GFP-Tags auf das Aggregationsverhalten abschätzen zu können, wurden diese Versuche mit Desmin-GFP wiederholt. Es konnten visuell keine Unterschiede festgestellt werden. Die mit Desmin-GFP oder mit Desmin jeweils transfizierten Zellen zeigten eine sehr ähnliche Filamentbildung. Dies lässt darauf schließen, dass der C-terminale GFP-Tag die Desmin-Filamentbildung in diesen Zellen nicht beeinflusst.

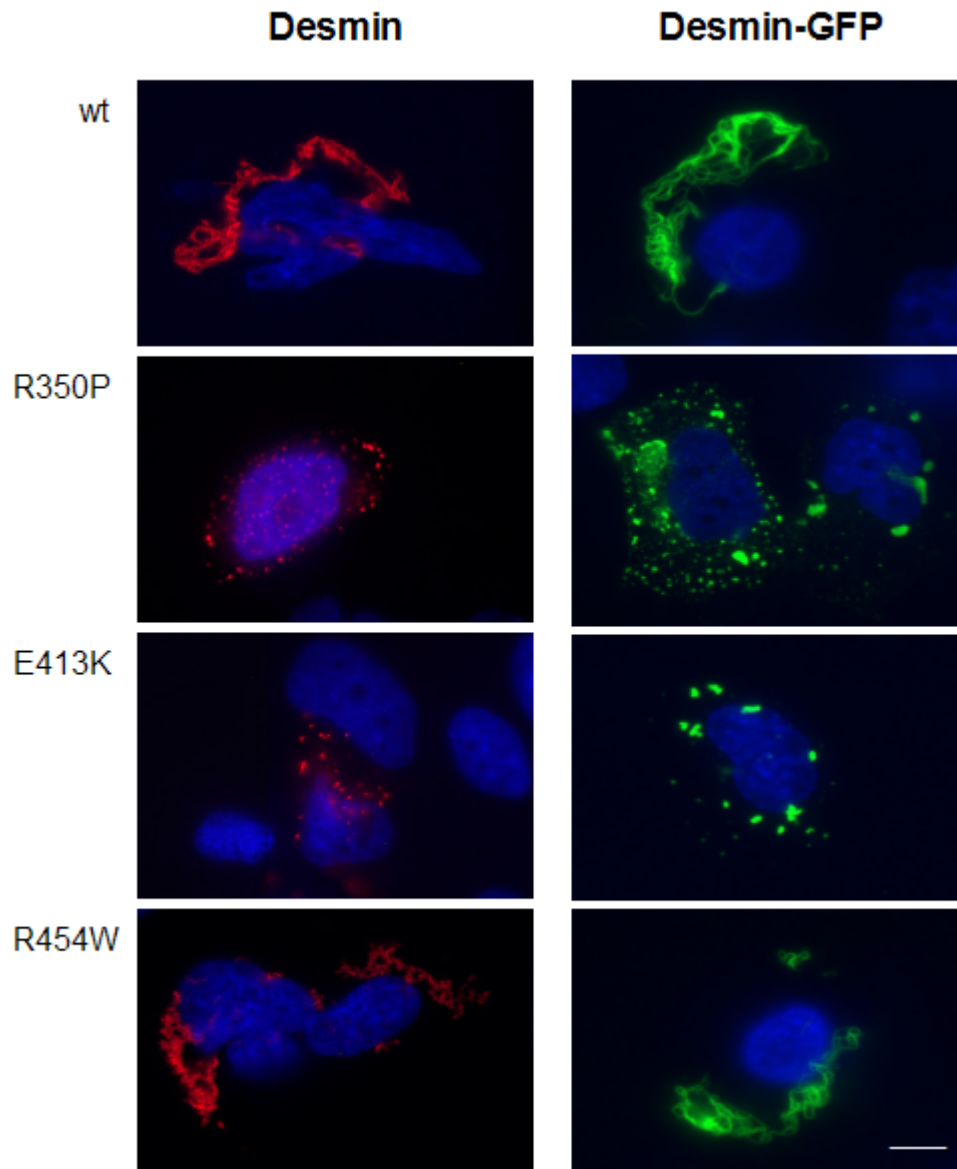


Abbildung 9: In der linken Spalte ist die Filamentbildung von Desmin in SW 13-Zellen dargestellt, die mit den wt-Desmin-, R350P-Desmin-, E413K-Desmin- und R454W-Desmin-Konstrukten 48 Stunden zuvor transfiziert worden waren. Dazu wurde Desmin mit einem polyklonalem anti-Desmin Antikörper gefärbt. Die Mutanten R350P und E413K bildeten punktförmige Aggregate, im Gegensatz zu der Mutation R454W, die eine ähnliche Filamentstruktur zeigte wie der Wildtyp. In der rechten Spalte ist die Filamentbildung von Desmin in SW 13-Zellen dargestellt, die mit den Desmin-GFP-Fusionsproteinkonstrukten wt-Des-GFP, R350P-Des-GFP, E413K-Des-GFP und R454W-Des-GFP transfiziert worden waren. Es war kein Unterschied im Aggregationsverhalten zwischen Desmin und den jeweiligen Desmin-GFP Fusionsproteinen erkennbar. Maßstabsbalken 5 μm .

4.1.2 Proteinexpression in transfizierten HEK 293-Zellen

Die Proteinexpression von Desmin und dem Fusionsprotein Desmin-GFP in transfizierten HEK 293-Zellen wurde außerdem noch durch einen Western Blot überprüft. Dazu wurden die Proteinextrakte nach einer Aufkonzentration elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine nach abgeschlossener Gelelektrophorese immunologisch sichtbar gemacht. Man erhielt Banden bei den erwarteten molekularen Massen der Desmin-Konstrukte (53 kDa) und der Desmin-GFP-Konstrukte (80 kDa). Es konnten außerdem keine Abbauprodukte detektiert werden und es kam zu keiner Spaltung von Desmin-GFP in Desmin- und GFP-Fragmente. Des Weiteren konnte durch diesen Western Blot bestätigt werden, dass die verwendeten Zellen kein endogenes Desmin exprimieren, welches die Aggregationsanalyse beeinflussen könnte und dass alle vorhandenen Desminmoleküle mit einem GFP-Tag versehen sind. Dies sind wichtige Voraussetzungen für alle folgenden Versuche.

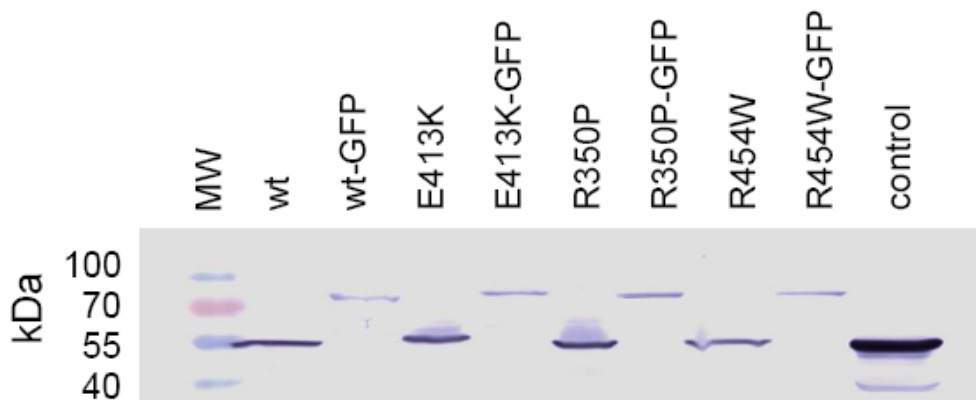


Abbildung 10: Der Western Blot transfizierter HEK 293-Zellen zeigte Banden bei den erwarteten molekularen Massen von Desmin und dem Fusionsprotein Desmin-GFP. Es wurden keine verkürzten Desmin-Fragmente bzw. endogenes Desmin der transfizierten Zellen detektiert. Als Kontrolle wurde der Gesamtproteinextrakt aus Muskelzellen aufgetragen.

4.2 Bestimmung der Ausgangskomponenten im Proteinextrakt

Für die *de novo* Aggregationsstudien wurden die Lysate transfizierter HEK 293-Zellen verwendet. Nach der Renaturierung der Proteine durch Dialyse, wurden die Lysate einer Ultrazentrifugation unterworfen, um alle großen Aggregate zu entfernen. Dies wurde routinemäßig durch SIFT-Messungen bestätigt. Um vor der Zugabe des Assembly-Puffers die einwandfreie Faltung der Proteine zu überprüfen und die Oligomerisation zu bestimmen wurden die Einzelmolekülfluoreszenzanalysen FCS und FIDA angewandt (Abbildung 11A, B). Als Vergleich wurden die Lysate von Zellen verwendet, die nur mit GFP transfiziert worden waren. Die erfolgreiche Renaturierung der Proteine aus Zellen, transfiziert nur mit GFP und aus Zellen, die mit Desmin-GFP transfiziert worden waren, wurde durch das Fluoreszenzsignal des GFP angezeigt. Zur Analyse der Partikelgröße wurden sowohl die Diffusionszeiten mittels FCS (Haustein and Schwille, 2007), als auch die Partikelhelligkeiten mittels FIDA (Kask et al., 2000) gemessen. Die Diffusionszeit globulärer Partikel kann verwendet werden, um die molekulare Masse des jeweiligen Partikels zu bestimmen. Dabei ist die Diffusionszeit proportional zur Kubikwurzel (dritte Wurzel) der molekularen Masse. Anhand der gemessenen Diffusionszeiten, kann man davon ausgehen, dass Desmin-GFP als ein ca. 200 kDa schweres, molekulares Teilchen durch die Probe diffundiert. Dies entspricht ungefähr der Größe eines Dimers. Allerdings hat die Größenbestimmung der mit GFP markierten Proteine durch Messung der Diffusionszeit zwei entscheidende Einschränkungen: zum einen setzt das mathematische Model ein kugelförmiges Protein voraus, was im Falle von Desmin nicht zutreffend ist und zum anderen können FCS-Messungen der Diffusionszeit der mit GFP markierten Proteine durch Bleichen des Farbstoffs beeinflusst werden, da große Moleküle sehr lange im Laserfokus bleiben. Aus diesen Gründen wurde die Partikelhelligkeit mittels FIDA in gescannten Messungen bestimmt. Scannen reduziert das Bleichen auf ein Minimum, da die Zeit, die die Moleküle im Laserfokus verweilen um mehr als eine Zehnerpotenz verkürzt wird. Des Weiteren gilt für die mit GFP markierten Proteine, dass eine Zunahme der Partikelhelligkeit direkt proportional mit der Anzahl an GFP-Fluorophoren ist. Die Partikelhelligkeit von Desmin-GFP betrug 24,2 kHz, verglichen mit 11,0 kHz für GFP alleine, spricht dieser Wert dafür, dass Desmin-GFP in der Probe vor allem als Dimer vorlag (Abbildung 11B). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden in einem weiteren, unabhängigen Versuch Harnstoff-Proteinextrakte von wt-Des-GFP und wt-Desmin ohne GFP in den Verhältnissen 1:0, 1:1 und 1:5 (vol/vol) vor der Dialyse gemischt. Die durchschnittliche Partikelhelligkeit war im Vergleich zu den Proben, die Desmin-GFP unverdünnt enthielten in den Mischungen 1:1 und 1:5 reduziert. In der Mischung, die das

unmarkierte Desmin in einem 5fachen Überschuss enthielt, war die Partikelhelligkeit (17,65 kHz) nahezu identisch mit dem Wert von GFP alleine (16,24 kHz) und betrug ca. die Hälfte von unverdünnten Desmin-GFP Extrakten (31,0 kHz). Daraus lässt sich schließen, dass in den Stammlösungen, die für die anschließenden *de novo* Aggregationsstudien verwendet wurden, Desmin-GFP vorrangig als Dimer vorlag. Diese Ergebnisse wurden ebenso für die hier untersuchten Mutationen gefunden (Abbildung 12C).

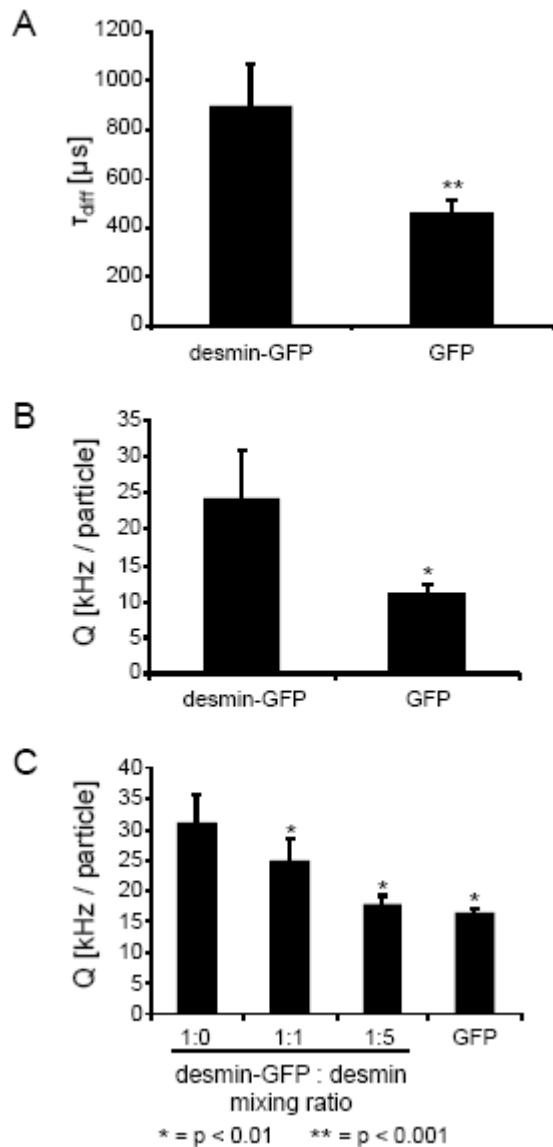


Abbildung 11: Desmin lag als Ausgangskomponente für alle weiteren *de novo* Aggregationsstudien als Dimer in den dialysierten Harnstoffproteinextrakten vor.

(A) Die Messung der Diffusionszeit von renaturiertem Desmin-GFP und GFP alleine mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zeigte, dass Desmin-GFP ungefähr den doppelten hydrodynamischen Radius (Stokesradius) von GFP hat. Dies stimmt mit der gemessenen molekularen Masse von ungefähr 200 kDa überein

und spricht für Teilchen mit der Größe von Desmin-GFP-Dimeren. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Proben dargestellt, die jeweils fünfmal gemessen wurden.

(B) Eine genauere Bestimmung des Aggregationszustandes von Desmin-GFP wurde durch die Messung der molekularen Helligkeit (Q) mittels Fluorescence Intensity Distribution Analysis (FIDA) erhalten. Für Desmin-GFP wurde die doppelte molekulare Helligkeit von GFP alleine gemessen, was auch für das Vorliegen von Desmin-GFP überwiegend in Form von Dimeren spricht. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Versuchen mit je 3-4 Proben dargestellt, die jeweils fünfmal gemessen wurden.

(C) Durch die zunehmende Verdünnung von Desmin-GFP mit Desmin ohne GFP vor der Renaturierung, konnte die molekulare Helligkeit der Partikel um die Hälfte des Ausgangswertes reduziert werden. Dies ist ein weiterer Punkt, der für das Vorhandensein von Desmin-GFP-Dimeren spricht. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Proben dargestellt, die jeweils fünfmal gemessen wurden.

4.3 *de novo* Aggregationsstudien

Für die vergleichenden *de novo* Aggregationsstudien wurden wt-Desmin-GFP und die Desminmutanten-GFP mit dem Assembly-Puffer verdünnt und der Aggregationsverlauf über einen längeren Zeitraum gemessen.

Eine Einkomponenten-FIDA-Analyse ergab, dass R350P-Des-GFP wesentlich kleinere Partikel bildete als der Wildtyp und die beiden anderen Mutanten. Die Mutanten E413K und R454W zeigten nur eine Tendenz, kleinere Partikel als der Wildtyp zu bilden. Der Aggregationsprozess aller Desminspezies fand überwiegend unmittelbar nach Zugabe des Assembly-Puffers statt. Anschließend verlief die Aggregation wesentlich langsamer in den folgenden 45 Minuten der Messung.

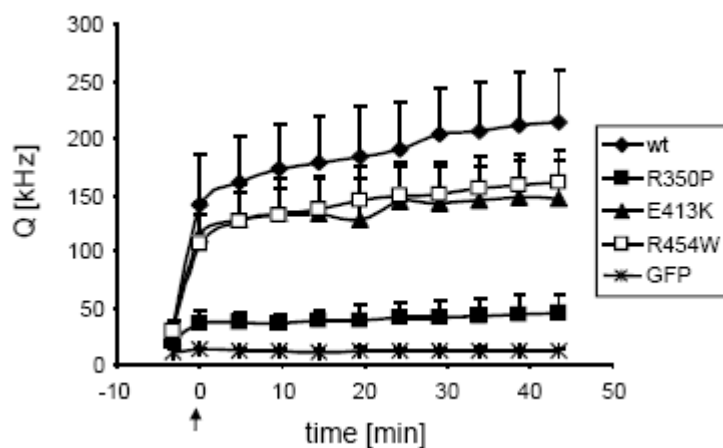


Abbildung 12: Darstellung des Zeitverlaufs der *de novo* Aggregation von renaturiertem Desmin-GFP. Das Diagramm zeigt die Zunahme hellerer Partikel mit der Zeit, d.h. Zunahme der Aggregation. Nach Zugabe des Assembly-Puffers aggregierte Desmin-GFP unmittelbar und nur noch relativ wenig in den nächsten 45 Minuten. R350P-Des-GFP formte wesentlich kleinere Aggregate als wt-Des-GFP, während sich die beiden anderen Mutanten nicht so deutlich vom Wildtyp unterschieden. GFP alleine blieb stabil als Monomer vorliegend. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der ersten Messung an. Für jeden Messpunkt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 parallelen Proben dargestellt.

In Abbildung 13 ist die mittlere Partikelhelligkeit vor und nach 45-minütiger Aggregation dargestellt. Die beiden Mutanten R350P-Des-GFP ($p < 0,01$) und E413K-Des-GFP ($p < 0,05$) besitzen eine signifikant geringere Partikelhelligkeit verglichen mit wt-Des-GFP. Im Gegensatz zu R454W-Des-GFP, welches nur eine nicht-signifikante Tendenz zeigt, kleinere Partikel, d.h. mit geringerer Partikelhelligkeit, zu bilden.

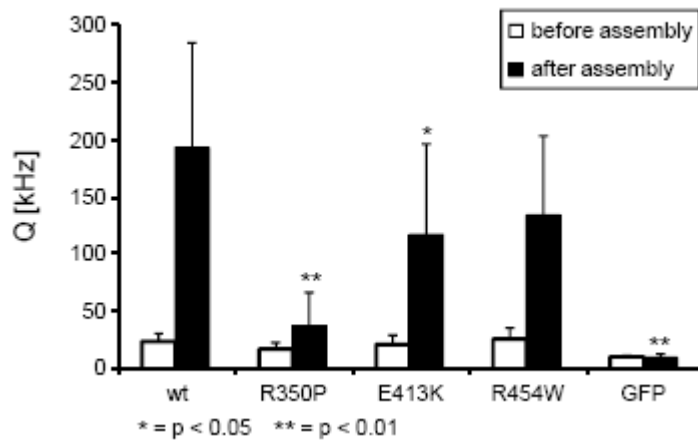


Abbildung 13: Die durchschnittliche Partikelhelligkeit (Q) von Desmin-GFP-Aggregaten nach 45minütiger Aggregation wurde durch die Mutationen beeinflusst. R350P-Des-GFP und E413K-Des-GFP bildeten signifikant kleinere Partikel als der Wildtyp, im Gegensatz zu R454W-Des-GFP, das nur eine Tendenz zeigte, kleinere Aggregate zu formen. GFP lag während der gesamten Messung stabil als Monomer vor. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-4 parallelen Proben dargestellt.

Diese Ergebnisse wurden durch die Messung der Diffusionszeiten (τ_{Diff}) eine Stunde nach Initiierung der Aggregation mittels FCS-Analyse bestätigt. Die Werte für die Partikelgröße waren für wt-Des-GFP am größten und für R350P-Des-GFP am niedrigsten. Die Partikelgrößen von R413K-GFP und R454W-Des-GFP lagen in dem Bereich dazwischen.

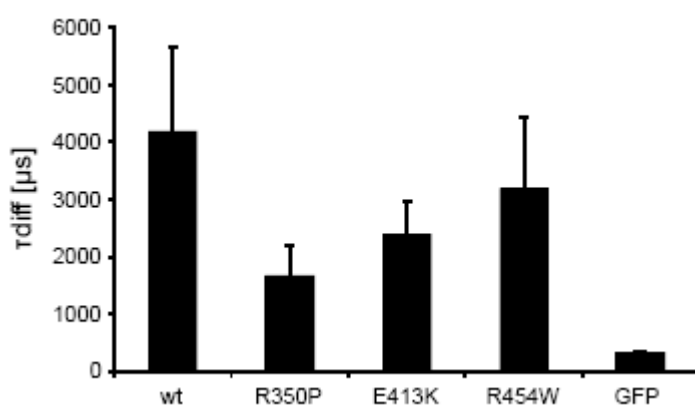


Abbildung 14: Durch Messung der Diffusionszeiten (τ_{Diff}) nach erfolgter Aggregation mittels FCS-Analyse konnte wiederholt bestätigt werden, dass die Größe der gebildeten Teilchen von den Mutationen beeinflusst wurde. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-4 parallelen Proben dargestellt.

4.4 Analyse nativer Zelllysate

Um den Effekt der ausgewählten Mutationen auf die frühe Filamentbildung und Aggregation von Desmin näher zu untersuchen, wurden native Zelllysate direkt analysiert. Dazu wurden transfizierte HEK 293-Zellen mit einem 1% NP-40-Puffer aufgeschlossen, zentrifugiert und die vorhandenen Aggregate untersucht. Die Fluoreszenzanalyse ergab, dass der Wildtyp und die Mutanten in unterschiedlichen Komponenten in der Zelle vorlagen. Mittels eines freien Dreikomponenten-FIDA-Fits wurde das für wt-Des-GFP erhaltene Signal ausgewertet. Es setzte sich aus dem Signal einer Partikelspezies mit einer doppelt so großen molekularen Helligkeit wie GFP alleine, aus Teilchen mit einer molekularen Helligkeit, die viermal so groß war wie GFP alleine und aus einer sehr hellen Komponente zusammen. Das bedeutet, dass wt-Des-GFP in der Zelle als Dimere, als Tetramere und gebunden in große Aggregate/Filamente vorlag. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die nativen Zelllysate von Zellen, transfiziert mit Wildtyp- und mutierten Desmin-GFP-Konstrukten mittels eines Dreikomponenten-FIDA-Fits mit festgesetzten Helligkeiten für Dimere und Tetramere analysiert. Ein Anteil von 5% des gesamten Desmin in der Zelle lag in allen untersuchten Extrakten in Form von Aggregaten vor, die größer als Tetramere waren. Dieser relativ geringe Prozentsatz an großen Partikeln lässt sich durch den vorgeschalteten Zentrifugationsschritt erklären. Die molekulare Partikelhelligkeit der großen Aggregate betrug zwischen 587 kHz für R350P-Des-GFP und 951 kHz für E413K-Des-GFP.

Bemerkenswerterweise waren in den Proteinextrakten der vier verschiedenen Desminspezies große Unterschiede in den Anteilen an Dimeren und Tetrameren zu beobachten. So bestand wt-Des-GFP vor allem aus Tetrameren (Dimere: 16,0%; Tetramere: 76,7%), im Gegensatz zu Proteinextrakten mit R350P-Des-GFP, in denen hauptsächlich Dimere vorlagen (Dimere: 68,7%; Tetramere: 25,8%). R454W-Des-GFP enthielt auch einen etwas höheren Anteil an Dimeren als wt-Des-GFP (Dimere: 29,2%; Tetramere: 66,5%), wohingegen E413K-Des-GFP eine starke Tendenz aufzeigte, vor allem Tetramere zu bilden (Dimere: 2,6%; Tetramere: 94,3%). Dies deutet darauf hin, dass die Mutation R350P (und in einem etwas geringeren Maß R454W) während des Aggregationsprozesses die Anlagerung der Dimere aneinander zu Tetrameren negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte die Mutation E413K zu einem größeren Anteil an Tetrameren, was für die Bildung von hyper-stabilen Tetrameren und/oder für die Hemmung einer weiteren Aggregation auf diesem Niveau spricht.

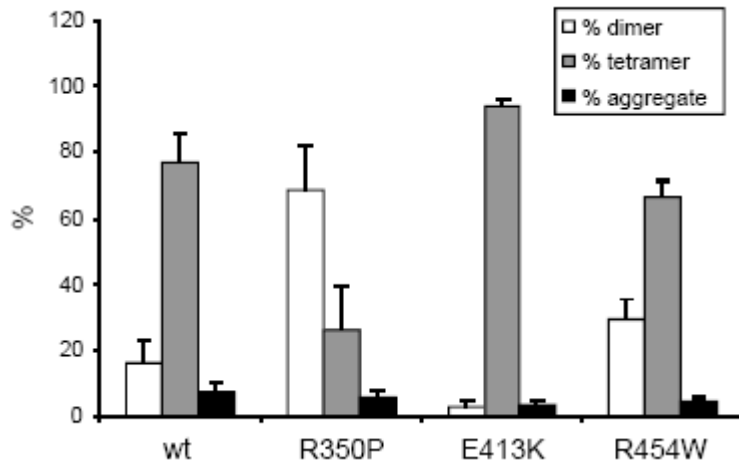


Abbildung 15: Messung nativer Zelllysate von Zellen, transfiziert mit Wildtyp- und mutiertem Desmin-GFP-Konstrukten mittels Dreikomponenten-FIDA-Analyse. Es wurden beachtliche Unterschiede in der Komponenten-Zusammensetzung innerhalb der Zelle beobachtet. Alle untersuchten Proteinextrakte enthielten ca. 5-10% große Aggregate. Der Wildtyp formte ca. 20% Dimere und hauptsächlich Tetramere. Die Mutante R350P-Des-GFP bildete überwiegend Dimere, im Gegensatz zu E413K-Des-GFP. In diesen Extrakten lagen vor allem Tetramere vor. R454W-Des-GFP verhielt sich ähnlich wie der Wildtyp. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-4 parallelen Proben dargestellt.

4.5 Analyse des dominant-negativen Effekts der Mutation R350P auf die Filamentbildung von Wildtyp-Desmin

4.5.1 Immunfluoreszenz

Da Patienten mit einer Mutation im Desmin-Gen sowohl nicht mutiertes Protein als auch ein mutiertes Allel exprimieren, wurden in weiteren Versuchen, die Ko-Expression bzw. Ko-Aggregation von Wildtyp- und mutiertem Desmin untersucht. Dazu wurden Zellen mit wt-Des-GFP und nicht markiertem R350P gleichzeitig transfiziert. Dieses Experimentdesign ermöglichte es, einen potentiell dominant-negativen Effekt der Mutation R350P auf die Filamentbildung des nicht mutierten Proteins zu untersuchen, da nur letzteres durch GFP-Fluoreszenz sichtbar ist. Die Ko-Transfektion zeigte, dass durch die Anwesenheit von R350P sämtliches, nicht mutiertes Protein in die Aggregate gezogen wird und keine Filamente entstanden. Die Ko-Expression von Wildtyp Desmin / R350P bildete intrazellulär ein ähnliches Aggregationsmuster wie Zellen, die nur mit R350P transfiziert worden waren. Diese Zellen waren 48 Stunden nach der Transfektion mit einem anti-Desmin-Antikörper gefärbt worden. In den ko-transfizierten Zellen konnte keine Bildung regelmäßiger Filamente von wt-

Des-GFP detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Anwesenheit der Mutante R350P die physiologische Desmin-Filamentbildung unterdrückt wurde.

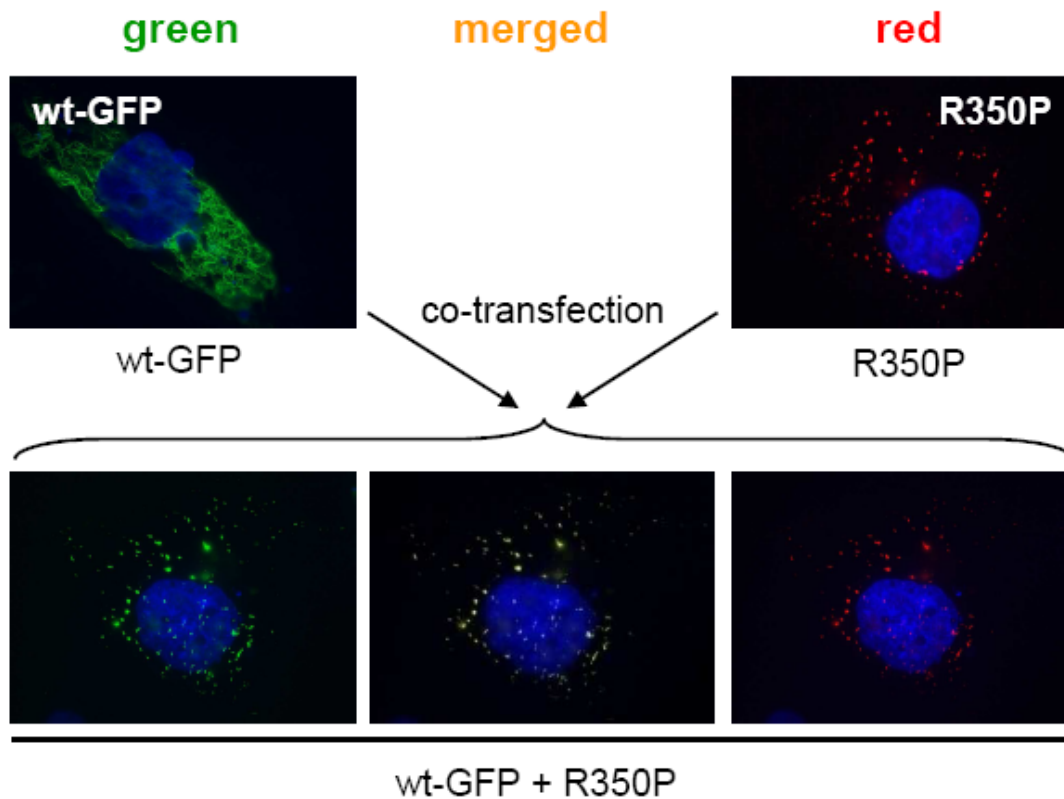


Abbildung 16: Dominant-negativer Effekt der Mutation R350P auf die Filamentbildung von nicht mutiertem Desmin. wt-Des-GFP formte im Gegensatz zu R350P ein regelmäßiges, filamentäres Netzwerk. Die Mutation R350P hingegen bildete punktförmige Aggregate, die sich unregelmäßig im gesamten Zytoplast verteilen. Nach Ko-Transfektion der beiden Konstrukte lag wt-Des-GFP ebenfalls in Form von punktförmigen Aggregaten vor und es kam zu keiner Filamentbildung in diesen Zellen. Das Übereinanderlegen der beiden Bilder bestätigte die Ko-Lokalisation von wt-Des-GFP und R350P.

4.5.2 Einzelmolekülfluoreszenzanalyse

Um diese Interaktionen auch auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde die Ko-Aggregation von wt-Des-GFP und R350P-Des-GFP in unterschiedlichen stöchiometrischen Mengen mittels Einzelmolekülfluoreszenzanalyse analysiert. Diese Versuche zeigten, dass schon 20% mutiertes Desmin ausreicht, um die Filamentbildung des Wildtyps zu beeinflussen. Die durchschnittliche Größe der Aggregate nahm mit zunehmender Menge R350P-Des-GFP in der Probe ab. Schon bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 bildeten sich Partikel, die sich in ihrer Größe nicht von denen unterschieden, die bei der unverdünnten

Mutante entstanden. Daraus kann man schließen, dass die Mutation R350P auf molekularer Ebene zu einem dominant-negativen Effekt führte und so die Filamentbildung des nicht mutierten Proteins direkt beeinflusste.

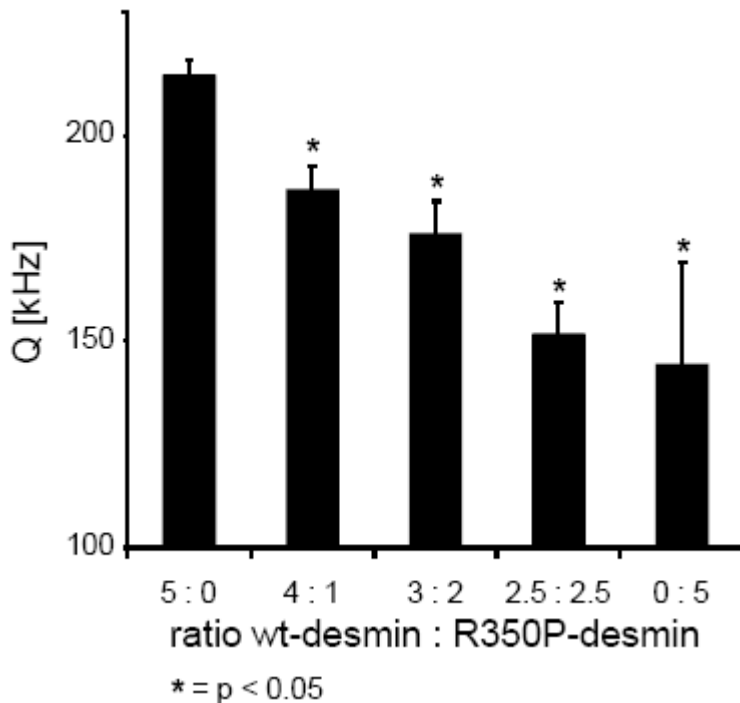


Abbildung 17: Die Ko-Aggregation in de novo Aggregationsstudien zeigte, dass die Mutation R350P die Aggregation des nicht mutierten Proteins dosisabhängig beeinflusst. Schon 20% Mutante führten zu der Bildung kleinerer Partikel. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 entstanden Partikel auf dem Größenniveau der unverdünnten Mutante. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Proben dargestellt, die jeweils fünfmal gemessen wurden.

5 Diskussion

Die Akkumulation von Desminaggregaten in Muskelfasern ist der charakteristische histopathologische Befund von Patienten mit Myofibrillärer Myopathie. Bis heute sind die molekularen Signalwege, wie die vorhandenen Desminaggregate zu Fehlfunktionen der Muskelzelle führen, nicht vollständig geklärt. Für die einzelnen, krankheitsverursachenden Mutationen im Desmin-Gen sind eine Reihe unterschiedlicher Phänotypen (z.B. vorwiegende Beteiligung der Skelettmuskulatur versus vorwiegende kardiale Beteiligung) und verschiedene Auswirkungen auf die Desmin-Assemblierung *in vitro* beschrieben worden (Bär et al., 2007; Bär et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen Mutationen unterschiedliche Reaktionswege initiieren. Prinzipiell könnte ein Funktionsverlust („lack of function“) aufgrund der fehlerhaften Assemblierung regulärer Desminfilamente oder die Entstehung eines neomorphen Effekts aufgrund der Bildung „toxischer“ intrazellulärer Aggregate zu der Erkrankung führen. Von einem neomorphen Effekt spricht man, wenn eine Mutation eine neue, dominante Genfunktion verursacht, die sich von der ursprünglichen Funktion unterscheidet.

Um ein Grundgerüst für die molekulare Klassifikation von bereits beschriebenen, wie auch neuen Mutationen erstellen zu können, müssen die Effekte der einzelnen krankheitsverursachenden Mutationen auf die frühen Assemblierungsschritte und auf die Aggregation von Desmin näher untersucht werden. Des Weiteren kann ein detailliertes Wissen über die Pathogenese auf molekularer Ebene die Entwicklung neuer – ggf. mutationsspezifischer – Therapiestrategien fördern und zum Beispiel klären, ob die Verstärkung der physiologischen Desmin-Filamentbildung oder die Inhibierung der pathologischen Bildung von Desminaggregaten das primäre Ziel einer Therapie sein sollte. Bis heute ist noch nicht geklärt, ob die Proteinaggregate zunächst nicht eine protektive Funktion erfüllen und erst ab einem gewissen Stadium pathologisch werden.

5.1 Kein Einfluss des Fluoreszenz-Tags auf die Desmin-Filamentbildung

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass sich die verschiedenen Messmethoden der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wie zum Beispiel FCS, FIDA und SIFT hervorragend dazu eignen, die Prozesse der krankheitsverursachenden Proteinaggregation auf

molekularer Ebene näher zu analysieren (Opherk et al., 2009). Diese Technik ermöglicht es, die Assemblierungs-Kinetiken fluoreszenzmarkierter Proteine in Echtzeit und die molekulare Zusammensetzung der Proteinaggregate zu bestimmen. Für die Gewinnung der benötigten fluoreszenzmarkierten Proteine wurden Zellen mit Desmin-GFP-Konstrukten transfiziert, nach 48 Stunden lysiert und die Proteinextrakte hergestellt. Um einen evtl. Einfluss des Fluoreszenz-Tags auf die Desmin-Assemblierung ausschließen zu können, wurde die Filamentbildung / Aggregation der Fusionsproteine mit dem Verhalten der entsprechenden Konstrukte ohne GFP-Tag in Zellkultur Experimenten verglichen.

Wie bereits in der Literatur beschrieben (Bär et al., 2005; Bär et al., 2007; Pruszczyk et al., 2007) formte wt-Desmin ein reguläres Filamentnetzwerk, im Gegensatz zu den beiden Mutanten R350P und E413K, die punktförmige Aggregate bildeten, die über das gesamte Zytoplasma verteilt vorlagen. Die Mutante R454W zeigte eine regelmäßige Filamentstruktur, die dem Wildtyp sehr ähnlich war. Ein identisches Muster wurde in Zellen gefunden, die das Desmin-GFP-Fusionsprotein exprimierten (Abbildung 9). Daraus lässt sich schließen, dass der GFP-Tag die intrazelluläre Assemblierung und Aggregatbildung von Desmin nicht beeinflusst und somit das Fusionsprotein für Messungen mittels Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt werden kann. Im Gegensatz zu Proteinen, die sekundär fluoreszenzmarkiert worden sind, z.B. mit einem Antikörper, kann man sich bei der Verwendung des GFP-Tags sicher sein, dass jedes Desminmolekül fluoreszenzmarkiert vorliegt und nur mit einem Fluoreszenzmolekül verbunden ist, da Desmin-GFP als Fusionsprotein exprimiert wird. Dies wurde durch einen Western Blot überprüft. So ist jedes Desminmolekül für das Detektionssystem des FCS Readers messbar. Des Weiteren eignet sich der GFP-Tag gut für Messungen mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie, da er sehr resistent gegenüber Bleichen ist. Dadurch wird eine präzise und detaillierte Bestimmung der Größe und Zusammensetzung der Desminpartikel möglich.

5.2 Veränderte Filamentbildung durch Desminmutationen

Um die Effekte der unterschiedlichen Mutationen auf die Desmin-Assemblierung mit Einzelpartikelfluoreszenzanalyse zu messen, wurden zwei sich ergänzende Versuchsstrategien angewandt. Zum einen wurden die Eigenschaften der *de novo* Aggregation *in vitro* untersucht. Dazu wurde Desmin aus transfizierten Zellen gewonnen und mit Harnstoff denaturiert um, wie bereits beschrieben, Monomere zu erzeugen (Parry and Steinert, 1995; Bär et al., 2005). Die Messungen wurden nach der anschließenden Renaturierung durchgeführt.

Zum anderen wurde der Aggregationszustand von Desmin in transfizierten Zellen auf Einzelmolekülebene gemessen. Hierzu wurden native Proteinextrakte untersucht.

5.2.1 Unterschiede in der *de novo* Aggregation

Für die Analyse der *de novo* Aggregation wurde zuerst die Partikelgröße von Desmin-GFP nach der Renaturierung bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Diffusionszeit und die Partikelhelligkeit von Desmin-GFP mit GFP-Monomeren verglichen. Desmin-GFP war doppelt so hell wie GFP alleine, woraus sich schließen lässt, dass Desmin-GFP bei Start der *de novo* Aggregation in Form von Dimeren vorlag. Diese Ergebnisse wurden durch den Vergleich der Diffusionszeiten untermauert. Beide Messungen zeigten, dass Desmin-GFP nach der Renaturierung vor allem in Form von Dimeren vorlag (Abbildung 11). Dies wurde außerdem durch die Analyse der Partikelhelligkeit von Proben bestätigt, in denen Desmin-GFP mit nicht-markiertem Protein vor der Renaturierung in verschiedenen Verhältnissen (1:1, 1:5) gemischt worden war (Abbildung 11c). Die gemessenen Partikelhelligkeiten betragen in allen Proben ein- bis zweimal der Helligkeit eines GFP-Monomers. Diese Ergebnisse weichen von bisher veröffentlichten Daten ab. Es ist bekannt, dass die Assemblierung von Desmin mit der Bildung von parallelen coiled-coil Dimeren beginnt, die sich anschließend zu antiparallelen Tetrameren verbinden. Für rekombinant hergestelltes Wildtyp-Desmin in hohen Konzentrationen wurde gezeigt, dass es vor allem in Form von Tetrameren vorliegt (Bär et al., 2005). In den hier beschriebenen Messungen wurde aber Desmin in nanomolaren Konzentrationen eingesetzt. Des Weiteren wurde bereits früher beschrieben, dass die Bildung der Intermediärfilamente *in vitro* stark von der Proteinkonzentration abhängt (Mücke et al., 2004). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen wurden hier Zelllysate verwendet, die eine Menge an potentiellen Interaktionspartnern enthalten können, von denen gezeigt wurde, dass sie auch die Bildung der Intermediärfilamente beeinflussen (Perng et al., 2004). Dies könnte eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse sein. In allen weiteren Versuchen wurde angenommen, dass die *de novo* Aggregation von Desmin-GFP-Dimeren ausgeht.

Die Auswirkungen auf molekularer Ebene der individuellen Desminmutationen auf die Intermediärfilamentbildung sind bisher noch nicht geklärt. Um dies besser verstehen zu können wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kinetiken der *de novo* Aggregation der Desmin-GFP-Fusionsproteine gemessen. Die IF-Assemblierung wurde durch Erhöhung der Ionenkonzentration initiiert (Perng et al., 2004) und die Proteinaggregation über einen

bestimmten Zeitraum hinweg verfolgt. Interessanterweise bildeten alle untersuchten Mutanten Partikel mit einer kleineren Durchschnittsgröße als der Wildtyp (Abbildungen 12-14). Vor allem die Mutante R350P formte wesentlich kleinere Partikel als der Wildtyp. Dies ist mit bereits früher veröffentlichten Daten übereinstimmend, die zeigten, dass die Mutation R350P schon auf der Stufe der Unit-Lenght-Filamentbildung (ULF) die Desmin-Assemblierung stört (Bär et al., 2005).

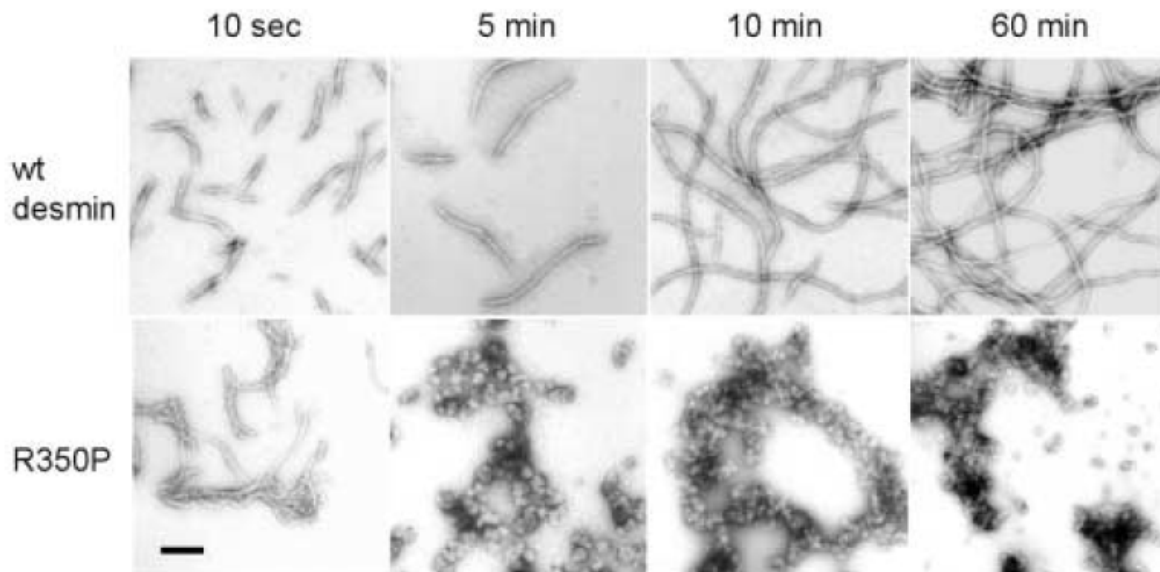


Abbildung 18: Darstellung der *in vitro* Assemblierung von wt-Desmin im Vergleich zu R350P-Desmin im Elektronenmikroskop. Die Assemblierung wurde durch die Zugabe von Salz initiiert und zu bestimmten Zeitpunkten (10 s, 5 min, 10 min, 60 min) fotografiert. R350P stört die Assemblierung schon in einem sehr frühen Stadium und führt zur Bildung von unregelmäßigen ULFs (siehe 10 s), die anschließend die Tendenz zeigen zu verklumpen. Im Gegensatz zu wt-Desmin; hier kommt es zur Ausbildung eines regulären Filamentnetzwerks. (Maßstabsbalken = 100 nm) (Bär et al., 2005)

Die Mutante E413K führte ebenso zur Bildung signifikant kleinerer Partikel, während die Mutante R454W nur eine nicht-signifikante Tendenz zeigte, kleinere Partikel zu formen. Dies deutet darauf hin, dass auch die Mutation R454W die Filamentbildung unter diesen Reaktionsbedingungen beeinflusst, obwohl sich ihr Verhalten zuvor in transfizierten Zellen nicht vom Wildtyp unterscheiden ließ (Abbildung 9). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass alle hier untersuchten Mutationen des Desmin-Gens zu veränderten Assemblierungs-Eigenschaften auf molekularer Ebene führten, die mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie gemessen werden konnten. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenzmikroskopie, die keine zuverlässige Detektion zuließ.

5.2.2 Desmin liegt in nativen Proteinextrakten in bestimmten Spezies vor

Um die Effekte der Desminmutationen auf die frühe Filamentbildung zu untersuchen, wurden die verschiedenen Oligomer- und Aggregatspezies in nativen Zelllysaten quantifiziert. Die Messungen mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie ermöglichten es zum ersten Mal, die molekulare Struktur von Desminfilamenten, die direkt aus Zellen stammen, zu analysieren. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine zusätzlichen Aufreinigungs-, De- und Renaturierungs- oder Aufkonzentrationsschritte mehr nötig sind. Des Weiteren stehen diese Zellen parallel zur Fluoreszenzmikroskopieanalyse des Desmin-IF-Gerüsts zur Verfügung.

Die Messungen mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie zeigten, dass die fluoreszierenden Teilchen in der Probe eindeutig voneinander unterscheidbare, fluoreszierende Spezies bildeten. Das Fluoreszenzsignal in nativen Zellextrakten setzte sich aus Dimeren, Tetrameren und größeren Aggregaten zusammen. Sowohl in den Proteinextrakten mit Wildtyp-Desmin, als auch mit allen drei Mutanten waren 5% des gesamten Desmin-Anteils in Form von großen Aggregaten enthalten (Abbildung 15). Der niedrige prozentuale Anteil dieser Desmin-Fraktion lässt sich durch den Zentrifugationsschritt vor der Aggregationsanalyse erklären. Interessanterweise wurden jedoch große Unterschiede bzgl. der relativen Mengen an Dimeren und Tetrameren gefunden. Während Wildtyp-Desmin vor allem in Form von Tetrameren vorlag, bildete die Mutante R350P hauptsächlich Dimere. Die Mutante R454W zeigte ebenfalls einen höheren Anteil an Dimeren als Wildtyp-Desmin, im Gegensatz zu E413K, die eine starke Tendenz zur Bildung von Tetrameren aufwies. Dies sind Hinweise darauf, dass sich die Mutante E413K auf molekularer Ebene grundlegend anders verhält als die beiden anderen Mutanten. Sie scheint vor allem hyper-stabile Tetramere zu bilden und/oder blockiert die weitere Assemblierung auf dem Niveau der Tetramere. Im Gegensatz zu R350P (und in einem geringeren Grad die Mutation R454W), die schon die Filamentbildung auf dem Niveau der Verbindung von Dimeren zu Tetrameren behindert.

Interessanterweise konnten diese Unterschiede der Assemblierungs-Eigenschaften nicht vollständig durch die Fluoreszenzmikroskopieanalyse der transfizierten Zellen detektiert werden (Abbildung 9). Während die konfokale Einzelmolekülspektroskopie fundamentale Unterschiede in der Bildung von kleinen Oligomeren aufdeckte, zeigten die beiden Mutanten R350P und E413K in der Fluoreszenzmikroskopieanalyse einen nahezu identischen zellulären Phänotyp, der durch das Vorhandensein von pathologischen, punktförmigen, intrazellulären Ablagerungen gekennzeichnet war. Darüber hinaus zeigte die Mutante R454W, die bei der

Einzelmolekülanalyse kleiner Oligomere einen weniger ausgeprägten, aber qualitativ ähnlichen Phänotyp wie die Mutante R350P hatte, einen nicht detektierbaren zellulären Phänotyp, obwohl auch diese Mutation bei Patienten zu einer Desminopathie mit vorwiegend kardialen Phänotyp führt.

Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie ermöglichte also eine sehr sensitive und detaillierte funktionelle Analyse der Desminmutationen im Stadium der frühen Assemblierung. Für die Entwicklung evtl. Therapiemöglichkeiten muss geklärt werden, welche Auswirkungen die gestörte frühe Assemblierung der Desmin-Intermediärfilamente auf die Bildung des Zytoskeletts und somit auf die strukturelle und funktionelle Organisation der Muskelzelle und auf intrazelluläre Signalkaskaden ausübt. Des Weiteren sollte die Korrelation der einzelnen Mutationen mit den verschiedenen Phänotypen auf molekularer Ebene beleuchtet werden, um zu klären, aus welchen Gründen die klinischen Symptome der progressiven Muskelschäden sich erst im höheren Lebensalter bei Patienten manifestieren. Ein besseres Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Korrelation würde dazu beitragen, die genetische Beratung der Patienten zu optimieren und eine Prognose über den weiteren Krankheitsverlauf zu ermöglichen.

5.3 Dominant-negativer Effekt der Mutation R350P auf die Filamentbildung

Betroffene Patienten zeigen vor allem ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster der Desminopathien. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Bildung von einer neuen, „toxischen“ Aggregatspezies zu einem neomorphen Effekt kommt. Da Patienten mit einer primären Desminopathie sowohl Wildtyp-Desmin, als auch mutiertes Desmin exprimieren, muss man auf die Frage eingehen, welche Interaktionen zwischen den beiden Proteinspezies und deren Auswirkungen auf die Pathologie der Krankheit entscheidend sind. Ein dominant-negativer Effekt der Mutation R350P auf die Filamentbildung von Wildtyp-Desmin wurde bereits in früheren Publikationen gezeigt. Allerdings wurde er bis heute noch nicht auf molekularer Ebene vollständig analysiert (Bär et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der dominant-negative Effekt von der Mutation R350P auf die Filamentbildung von nicht mutiertem Desmin in Ko-Transfektionsstudien nachgewiesen. Dazu wurden Zellen sowohl mit wt-Des-GFP als auch mit R350P ohne GFP transfiziert und mittels eines Fluoreszenzmikroskops analysiert (Abbildung 16). Um die zugrunde liegenden

molekularen Mechanismen besser verstehen zu können, wurde die Ko-Assemblierung auch in Mischungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von wt-Des-GFP und R350P-Des-GFP mittels Einzelmolekülspektroskopie bestimmt. Diese Messungen zeigten, dass schon 20% mutiertes Protein in der Mischung ausreichen, um die Assemblierung des Wildtyps signifikant zu stören. Die durchschnittliche Größe der entstandenen Desminaggregate nahm mit ansteigender Menge an mutiertem Protein ab. Schon ein Mischungsverhältnis von 1:1 führte zu der Entstehung von Partikeln mit ähnlicher Größe der Aggregate, die in unverdünnten Proben der Mutante enthalten waren. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass es für evtl. Therapiemöglichkeiten wichtig wäre, den Gehalt an mutiertem Desmin in den Zellen zu verringern. Im Gegensatz dazu, würde eine Erhöhung der Wildtyp-Desmin-Konzentration wenig ändern, da mindestens 90% des gesamten Desmins als Wildtyp vorliegen müssten, um eine korrekte Desmin-Filamentbildung zu ermöglichen.

Die Desminmutationen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, zeigten alle deutliche Unterschiede in ihrem Verhalten auf molekularer Ebene. Die Zerstörung des Desmin-IF-Zytoskeletts und die Bildung von pathologischen Proteinaggregaten findet *in vivo* in einer komplexen Umgebung statt. Durch die Messmethoden SIFT, FIDA und FCS konnten die *de novo* Desmin-Filamentbildung in renaturierten Proteinextrakten und die schon gebildeten Proteinaggregate in nativen Zelllysaten analysiert werden. Dadurch konnten die Effekte der Desminmutationen auf das Filamentnetzwerk auf molekularer Ebene in Muskelzellen gemessen und die Unterschiede zwischen den Mutationen bestimmt werden. Diese Erkenntnisse tragen dazu bei, die molekularen Mechanismen der Entstehung von Desminopathien besser zu verstehen und könnten für die Entwicklung möglicher Therapiestrategien wichtig sein.

5.4 Ausblick

Zahlreiche humane Erkrankungen werden durch die Akkumulation abnormal gefalteter Proteine verursacht. Fehler bei der Proteinfaltung können durch posttranslationale Modifikationen und durch pathologische Mutationen entstehen (Soto and Estrade, 2008; Levin et al., 2009; Wolschner et al., 2009). Für viele dieser Erkrankungen – einschließlich der primären Desminopathien – ist der genaue Zusammenhang zwischen der Aggregatbildung und den Fehlfunktionen der Zelle noch nicht vollständig geklärt (Aguzz et al., 2007; Thomas and Beal, 2007; Yankner and Lu, 2009). Die Interaktionen von unmodifiziertem und

mutiertem Protein in Zusammenhang mit Aggregatbildung können sowohl zu der Entstehung eines dominant-negativen Effekts, als auch zu einem neomorphen Effekt in heterozygoten Mutationsträgern führen.

In diesem Zusammenhang hat sich die konfokale Einzelmolekülspektroskopie als eine verlässliche Methode heraus gestellt, Proteinaggregate *in vitro* und in Zellkulturversuchen untersuchen zu können.

Die Desminmutationen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, zeigten alle deutliche Unterschiede in ihrem Verhalten auf molekularer Ebene. Aus diesem Grund könnten die hier gewonnenen Ergebnisse die Basis für eine detaillierte und funktionelle Klassifizierung der unterschiedlichen Mutationen im Desmin-Gen darstellen und helfen, die klinische Manifestation der unterschiedlichen Phänotypen zu erklären (Strach et al., 2008). Des Weiteren könnte dieser Ansatz Auswirkungen auf mögliche diagnostische und therapeutische Strategien nicht nur von primären Desminopathien, sondern evtl. auch für andere Formen von Myopathien mit pathologischer Proteinaggregation haben.

Durch den Einsatz der Einzelmolekülspektroskopie können mögliche stille Mutationen und Polymorphismen, die in genetischen Tests gefunden werden, funktionell von Mutationen, die die Assemblierung von Desmin oder anderer zellulärer Proteine stören, abgegrenzt und hinsichtlich ihres Krankheitswerts eingeordnet werden. Diese Methode ist sehr kosten- und zeiteffizient, da eine Aufreinigung der Proteine dazu nicht nötig ist. Vielleicht wird sie zukünftig ein nützliches, klinisches Hilfsmittel in der Beurteilung neuer Desminmutationen bzgl. deren Auswirkungen auf die Proteinaggregation darstellen. Patienten erhielten dadurch rascher ihre Diagnose und könnten besser über den weiteren Verlauf der Erkrankung aufgeklärt werden.

Es hat sich außerdem gezeigt, dass sich die Einzelmolekülspektroskopie sehr gut dazu eignet, Aggregations-modifizierende Substanzen durch den Einsatz einer großen Substanz-Bibliothek in molekularen Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln. Dadurch könnten neue, krankheits-modifizierende Therapieansätze gefunden werden (Giese et al., 2005; Bertsch et al., 2008; Kostka et al., 2008), wie zum Beispiel die medikamentöse Auflösung der pathologischen Proteinaggregate.

C Das mitochondriale DNA-Depletionssyndrom (MDS)

1 Einleitung

1.1 Das mitochondriale DNA-Depletionssyndrom (MDS)

1.1.1 Definition des MDS

Das mitochondriale DNA-Depletionssyndrom (MDS) wird definiert als eine Reduktion der mitochondrialen DNA (mtDNA) im Vergleich zur nukleären DNA in unterschiedlichen Geweben. Es handelt sich dabei um eine Gruppe klinisch heterogener Erkrankungen, die autosomal-rezessiv vererbt werden. Das MDS ist eine häufige Ursache von schweren Hepatoenzephalopathien, von Enzephalomyopathien und von ca. 50% der kombinierten Atmungskettendefekte im Kindesalter (Sarzi et al., 2007). Kinder mit einem MDS können symptomatisch werden mit einer Myopathie, mit Leberfunktionsstörungen im Säuglingsalter oder mit einer Multisystembeteiligung. Übereinstimmend mit den unterschiedlichen Phänotypen, kann die mitochondriale DNA-Depletion anfangs nur einzelne Gewebe betreffen, wie zum Beispiel die Skelettmuskulatur oder die Leber, und sich später auf weitere Organe (Herz, Gehirn, Niere) ausdehnen (Sarzi et al., 2007; Alberio et al., 2007). Durch den reduzierten mtDNA-Gehalt, kommt es u.a. zu einer unzureichenden Synthese der Atmungskettenkomplexe I, III, IV, und V in diesen Zellen (Moraes et al, 1991; Hirano et al., 2000; Spinazzola et al, 2005). Die vorliegenden mtDNA-Moleküle sind dabei weder mutiert noch deletiert (Carrozzo et al., 2005). Bisher wurden in ca. 70% aller MDS-Fälle Mutationen in 9 nukleär kodierten Genen (*DGUOK*, *MPV17*, *POLG*, *TYMP*, *TK2*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*, *PEO1*) identifiziert, die fast alle entweder an der Synthese oder an der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Nukleotid-Pools beteiligt sind (Spinazzola et al., 2009; Rahman and Poulton 2009, Rotig and Poulton 2009 Sarzi et al., 2007).

Gen	Protein	Klinischer Phenotyp	Pathomechanismus
<i>TK2</i>	Thymidinkinase 2	Myopathie, Hypotonie, erhöhte CK, chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)	Mangel an Nucleotiden
<i>RRM2B</i>	Ribonucleotidreduktase M2B	Hypotonie, renale Tubulopathie, respiratorische Beteiligung, Diarrhoe, Laktatazidose,	gestörte <i>de novo</i> Synthese der Nucleotide
<i>SUCLA2</i>	β -Untereinheit der Succinyl-CoA Ligase	Hypotonie, Laktatazidose, Leigh-ähnliches Syndrom, Dystonie	Störung der Nucleosid-diphosphat-Kinase (NDPK)
<i>SUCLG1</i>	α -Untereinheit der Succinyl-CoA Ligase	Hypotonie, letale infantile Laktatazidose	Störung der Nucleosid-diphosphat-Kinase (NDPK)
<i>DGUOK</i>	Desoxyguanosinkinase	Hypotonie, Hypoglykämie, Nystagmus, Leberversagen	Mangel an Nucleotiden
<i>POLG</i>	mtDNA-Polymerase gamma	Alpers-Huttenlocher Syndrom, Myopathie, Leberversagen, CPEO, Poliodystrophie, Epilepsia partialis continua	Störung der mtDNA Replikation
<i>PEO1</i>	mtDNA-Helikase Twinkle	Enzephalopathie, Myopathie, Hypotonie, CPEO, sensorische Neuropathie, Ataxie, Epilepsie	Störung der mtDNA Replikation
<i>MPV17</i>	MPV17	Hypotonie, Hypoglykämie, Leberversagen, Ataxie, Neuropathie, Dystonie	unbekannte Funktion
<i>TYMP</i>	Thymidinphosphorylase	MNGIE (Mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie): periphere Neuropathie, CPEO, intestinale Pseudoobstruktion, Leukenzephalopathie	Störung des Nucleotidpools

Tabelle 1: Das mtDNA-Depletionssyndrom: Zusammenfassung der bisher bekannten Gene, Phänotypen und Pathomechanismen.

Drei verschiedene Formen des MDS werden klinisch unterschieden: die myopathische, die enzephalomyopathische und die hepato-zerebrale Form. Ca. 60% des myopathischen MDS und ca. 80% des hepato-zerebralen MDS werden durch Mutationen in den bekannten Genen verursacht. Aus diesem Grund muss es noch weitere, bisher nicht identifizierte Gene geben, die für den reibungslosen Ablauf der mtDNA-Synthese essentiell sind. Dies spricht für eine weitere genetische Heterogenität des MDS.

1.1.2 Pathogenetische und klinische Einteilung des MDS

1.1.2.1 Die myopathische Form

Das myopathische MDS wird durch genetische Veränderungen in der Thymidinkinase 2 (*TK2*) oder in der Ribonukleotidreduktase M2B (*RRM2B*) verursacht. Betroffene Kinder werden gewöhnlich nach einer unauffälligen Schwangerschaft geboren. Die Symptomatik des myopathischen MDS beginnt meist im ersten Lebensjahr mit Trinkschwäche, Entwicklungsverzögerung, Hypotonie, Muskelschwäche und in manchen Fällen mit chronisch-progressiver externer Ophthalmoplegie (CPEO) oder Zeichen einer Enzephalopathie. Ein wichtiger Marker für die Diagnose ist die häufig erhöhte Serum-Kreatinkinase (CK), da dies relativ ungewöhnlich für andere mitochondriale Myopathien ist. Der Tod tritt gewöhnlich im Säuglingsalter oder im frühen Kindesalter ein, aufgrund von Lungenversagen oder Infektionen. Es wurden allerdings schon Patienten beschrieben, die bis ins Teenager-Alter überlebten (Morales et al., 1991; Oskoui et al., 2006). Muskelfasern von Patienten mit sehr frühem Beginn der Symptome und progressivem Verlauf der Krankheit zeigen eine vollständige Cytochrom c Oxidase (COX) Defizienz, im Gegensatz zu Patienten mit späterem Beginn, bei denen ein Mosaik aus COX-negativen und COX-positiven Fasern vorliegt. Mitochondrien aus Muskelzellen zeigen stets biochemische Defekte aller, durch die mitochondriale DNA kodierten Atmungskettenkomplexe.

1.1.2.2 Die enzephalomyopathische Form

Die enzephalomyopathischen Formen der mtDNA-Depletion werden oft durch Defekte der Succinyl-CoA Ligase im Citratzyklus verursacht. Durch Mutationen im *SUCLA2*-Gen kommt es in vielen Familien zu einem hohen Laktatgehalt im Blut, schwerer psychomotorischer Retardierung mit Muskelhypotonie, Schwerhörigkeit und generalisierten Anfällen, gefolgt von Kontrakturen, Dystonie und milder Ptose. Eine moderate mtDNA-Depletion (ca. 30%) in

der Skelettmuskulatur wurde beschrieben (Elpeleg et al., 2005; Carrozzo et al., 2007; Ostergaard et al., 2007). Die zweite, sehr schwere Form, verursacht durch Mutationen im *SUCLG1*-Gen in einer Familie führte zu kombinierten mtDNA-Depletionen in der Skelettmuskulatur und in der Leber, zu dysmorphen Veränderungen, zu konnataler Laktatazidose und zum Tod nach wenigen Tagen. Vor kurzem wurde eine zweite Familie mit einer Mutation in *SUCLG1* und einem ähnlichen Phänotyp wie bei *SUCLA2*-Defekten beschrieben. (Ostergaard 2009). Mutationen in *SUCLA2* und *SUCLG1* sind durch moderate bis gravierende Methylmalonazidosen gekennzeichnet.

1.1.2.3 Die hepato-zerebrale Form

Die hepato-zerebrale Form ist das wahrscheinlich am häufigsten vorkommende MDS und wird durch genetische Veränderungen in den vier Genen *DGUOK*, *MPV17*, *PEO1* (*Twinkle*) und *POLG* verursacht. *DGUOK* kodiert für die Desoxyguanosinkinase (DGUOK), *MPV17* für ein kleines Membranprotein in den Mitochondrien mit bisher ungeklärter Funktion, *PEO1* für die mtDNA-Helikase und *POLG* für die mtDNA-Polymerase gamma (POLG) (Spinazzola et al., 2008). Die Symptomatik des hepato-zerebralen MDS beginnt zwischen der Geburt und dem 6. Monat und führt meist innerhalb des ersten Jahres zum Tod. Patienten mit Mutationen im *POLG*-Gen haben in der Regel einen späteren Beginn und überleben länger. Kinder mit einem hepato-zerebralem MDS leiden für gewöhnlich unter anhaltendem Erbrechen, Entwicklungsstörungen, Hypotonie und Hypoglykämie, assoziiert mit progressiven neurologischen Symptomen. Histochemisch findet man eine reduzierte Aktivität der Cytochrom c Oxidase, kombiniert mit einer verminderten Aktivität der durch die mtDNA kodierten Atmungskettenkomplexe in der Leber.

Eine besondere Form des hepato-zerebralen MDS ist das Alpers-Huttenlocher Syndrom. Diese früh einsetzende, meistens tödlich verlaufende Erkrankung wird charakterisiert durch Leberversagen, durch andauernde Anfälle, die sich zu generalisierten Anfällen, myoklonischen Anfällen, Epilepsia partialis continua und einem Status epilepticus entwickeln und durch globale neurologische Schäden. Die Leberfunktionsstörungen sind für gewöhnlich progressiv und führen zu einer microvesikulären Steatosis, bis hin zu chronischem Leberversagen.

1.2 Die mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie (MNGIE)

MNGIE ist durch eine Befundkonstellation aus peripherer Neuropathie mit gastrointestinaler Motilitätsstörung, chronisch-progressiver externer Ophthalmoplegie (CPEO) mit Ptosis und Leukenzephalopathie gekennzeichnet (Hirano et al., 1994). Die viszerale Symptomatik ist durch wechselnde Phasen mit Diarrhoen, Obstipation, intestinaler Pseudoobstruktion und Gastroparesen charakterisiert, die zu chronischer Malnutrition und Kachexie führen. Typische Begleitsymptome sind eine sensomotorische Polyneuropathie und Myopathie. MNGIE manifestiert sich bei den meisten Patienten erst im Erwachsenenalter. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv (oder selten –dominant) vererbt und beruht auf nukleären Mutationen im Thymidinphosphorylase-Gen (*TYMP*) auf Chromosom 22q (Nishino et al., 1999). Dieses Enzym katalysiert die reversible Abspaltung eines Phosphatrests von Thymidin zu Thymin und 2-Desoxyribose 1-Phosphat. Da MNGIE-Patienten meist eine Depletion bzw. multiple Deletionen der mtDNA aufweisen, vermutet man, dass auch hier Störungen im mitochondrialen Nukleotidpool einen direkten Einfluss auf die Replikation oder Stabilität des mitochondrialen Genoms haben.

1.3 Mitochondrien

1.3.1 Aufbau und Funktion

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen. Sie kommen in unterschiedlicher Anzahl in allen sauerstoffverbrauchenden Geweben vor. Organe mit besonders hohem Sauerstoffverbrauch verfügen über besonders viele Mitochondrien. Beispiele hierfür sind Muskelzellen, Nervenzellen, Kardiomyozyten und einige Epithelzellen. Mitochondrien erscheinen im Elektronenmikroskop als runde oder ovale Organellen mit einem relativ konstanten Durchmesser um 1 µm und variabler Länge. Die jeweilige Form ist vom Zelltyp abhängig und stark variabel. Sie werden durch zwei hoch spezialisierte Membranen vom Zytosol abgegrenzt. Die äußere mitochondriale Membran ist relativ durchlässig für verschiedene Stoffwechselintermediate. Für korrekt gefaltete Proteine ist sie undurchlässig, allerdings können durch Kanäle aus Proteinkomplexen noch nicht gefaltete Vorläufer der meisten mitochondrialen Proteine in das Innere der Mitochondrien gelangen. Des Weiteren ist sie am Import aktivierter Fettsäuren in die Mitochondrien beteiligt. Zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran liegt mit einer Breite von

wenigen Nanometern der relativ enge Intermembranraum. Dieser enthält Enzyme, die Nukleotide unter ATP-Verbrauch phosphorylieren. Die innere mitochondriale Membran umschließt die Matrix. Dort befinden sich Enzyme für den Zitratzyklus, für die β -Oxidation der Fettsäuren und das mitochondriale Genom mit den zugehörigen tRNAs und Ribosomen. Die innere Membran ist undurchlässig, selbst für kleinste Teilchen wie Protonen und verfügt über einen, für eine Membran ganz ungewöhnlichen, hohen Proteinanteil von ca. 70%. Durch zahlreiche Einstülpungen, sogenannte Cristae, ist die Oberfläche stark vergrößert. Hier befinden sich u.a. die Komplexe I-V der Atmungskette.

Neben ihrer Rolle im Energiestoffwechsel sind Mitochondrien an einer Vielzahl weiterer wichtiger zellulärer Funktionen beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose), der für die Entwicklung und Gewebemöostase des Organismus essentiell ist. Hierbei wird das Hämprotein Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt und die Caspasen-abhängige Kaskade der Apoptose ausgelöst. Eine weitere wichtige Funktion der Mitochondrien ist die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern. Als Kofaktoren verschiedener mitochondrialer, zytosolischer und nukleärer Proteine sind sie essentiell für zahlreiche enzymatisch katalysierte Elektronentransferreaktionen (Craig et al., 1999; Lill and Muhlenhoff, 2005). Darüber hinaus sind in der mitochondrialen Matrix Enzyme und Systeme lokalisiert, die u.a. an der Häm biosynthese, an der Synthese einiger Lipide, an der Stickstoffentgiftung und an einigen Schritten des Aminosäuremetabolismus beteiligt sind (Scheffler et al., 2001). Durch ihre Fähigkeit Calciumionen aufzunehmen und später wieder abzugeben, greifen Mitochondrien außerdem in die Calcium-Homöostase der Zelle ein (Zucker et al., 1999). Die Hauptfunktion der Mitochondrien besteht jedoch in der Bereitstellung von ATP und der damit gekoppelten Endoxidation von Substraten. Dazu wird notwendiges mitochondriales Acetyl-CoA durch Fettsäureoxidation und durch dehydrierende Decarboxylierung von Pyruvat bereitgestellt. Dieses wird nun im Rahmen des Citratsäurezyklus oxidativ abgebaut und die dabei freigesetzten Elektronen werden auf NAD^+ und FAD übertragen. Mit Hilfe der dabei entstandenen Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 werden die Elektronen dann in die Atmungskette eingeschleust.

Die bei der schrittweisen Übertragung der Elektronen des gebundenen Wasserstoffs auf den Sauerstoff freiwerdende Energie wird von den Atmungskettenkomplexen I, III und IV genutzt, um Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum zu transportieren, und so einen elektrochemischen Protonengradienten aufzubauen. Beim Rückfluss der Protonen über den Komplex V entsteht unter Ausnutzung der freiwerdenden Energie aus

Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (Pi) Adenosintriphosphat (ATP) (Löffler, 2003).

Komplex I	NADH-Coenzym Q Oxidoreduktase
Komplex II	Succinat-Coenzym Q Oxidoreduktase
Komplex III	Coenzym Q Cytochrom c Oxidoreduktase
Komplex IV	Cytochrom c Oxidase
Komplex V	ATP-Synthase

Table 2: Die fünf Atmungskettenkomplexe

1.3.2 Aufbau und Replikation der mitochondrialen DNA (mtDNA)

Die mitochondriale DNA ist zirkulär aufgebaut und umfasst 16 569 Basenpaare. Diese kodieren für zwei Gene der ribosomalen RNA (rRNA), 22 Gene der transfer RNA (tRNA), die für die mitochondriale Proteinbiosynthese benötigt werden und 13 Proteine der Atmungskette. Dabei handelt es sich um hydrophobe Untereinheiten der Enzymkomplexe I, III, IV und V. Das nukleäre Genom kodiert für die nicht mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, alle übrigen mitochondrialen Proteine, zahlreiche Struktur- und sogenannte „assembly“-Proteine sowie Stabilitäts- und Funktionsregulatoren der Atmungskette. Darüber hinaus sind für die intergenomische Kommunikation, die mitochondriale Replikation, Transkription und Translation notwendige Faktoren nukleär kodiert und werden aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien importiert (Löffler, 2003).

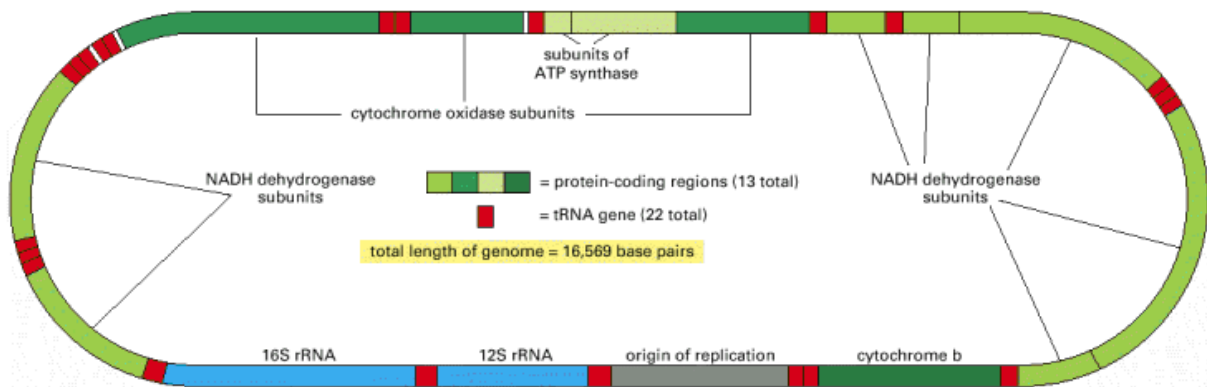


Abbildung 19: Das humane mitochondriale Genom enthält 2 rRNA-Gene, 22 tRNA-Gene und 13 Protein-kodierende Sequenzen.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mboc4.figgrp.2615>

In einer Zelle sind zwischen 1000 und 10 000 Kopien der mtDNA enthalten. Dabei können neben normalen mtDNA-Molekülen auch mutierte mtDNA-Moleküle vorliegen (Heteroplasmie). Liegen nur normale oder veränderte mtDNA-Moleküle vor, bezeichnet man dies als Homoplasmie.

Für die Aufrechterhaltung des mtDNA-Gehalts sind etliche kernkodierte Faktoren notwendig, die entweder für eine ausgewogene Bereitstellung der Desoxynukleotide (dNTPs) für die mtDNA-Synthese sorgen, an der Replikation selbst beteiligt oder Bestandteile des mitochondrialen Replisoms sind (Alberio et al., 2007). Die Identifikation einiger krankheitsverursachender Mutationen in Genen, die für Enzyme oder Proteine kodieren, die am Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, betont die Notwendigkeit, die Eigenschaften und die Herkunft der mtDNA-Bausteine zu verstehen (Spinazolla et al., 2005). Der dNTP-Pool für das nukleäre Genom wird im Zytosol synthetisiert und vermutlich anschließend passiv durch Poren in den Zellkern transportiert (Mathews and Song, 2007). Im Gegensatz dazu, ist die Bereitstellung der dNTPs für das mitochondriale Replisom ein wesentlich komplexerer Prozess, der durch den Zellzyklus reguliert wird. Der erste Anhaltspunkt, dass Unterschiede in der Bereitstellung der dNTPs für das nukleäre und das mitochondriale Genom existieren, fand sich 1976, als Bogenhausen und Clayton (Bogenhausen and Clayton, 1976) zeigten, dass die mitochondriale DNA-Replikation in kultivierten Mauszellen in Gegenwart von Antimetaboliten nahezu uneingeschränkt weiter lief, während die nukleäre DNA-Replikation stark inhibiert wurde. Die Inkubation von Mitochondrien, isoliert aus Rattenleber, mit exogenen dNTPs führte zu einem Einbau der Nukleotide in die mitochondriale DNA. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die Synthese der Desoxyribonukleotide im Zytosol

stattfindet und dass diese anschließend in die Mitochondrien transportiert werden (Karol and Simpson, 1968; Enríquez et al., 1994). Spätere Studien zeigten, dass der Transport der Nukleosidmonophosphate unabhängig vom ATP/ADP-Carrier verläuft (Ferraro et al., 2006), und dass eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem mitochondrialen und dem nukleären dNTP-Pool existiert (Leanza et al., 2008). Desoxyguanosinnukleotide können problemlos vom Zytosol in die Mitochondrien gelangen. Die gleiche Studie zeigte außerdem, dass beim Ausbleiben der mtDNA-Synthese, der dGTP-Pool konstant bleibt, indem vermehrt dGMP abgebaut wird. Dabei wird vermehrt Desoxyguanosin in das Zellkulturmedium ausgeschieden, um eine Akkumulation toxischer Mengen zu vermeiden (Leanza et al., 2008). Die mitochondrialen dNTPs werden *de novo* durch Reduktion von Ribonukleotiden durch die Ribonukleotidreduktase und durch die Wiederverwertung der Desoxyribonukleoside gebildet. Diese stammen aus zugeführten Nährstoffen oder aus dem intrazellulären Abbau der DNA (Löffler, 2003). Vier verschiedene Desoxynukleosidkinasen katalysieren ihre Phosphorylierung zu den entsprechenden Monophosphaten (dNMPs), die anschließend durch Monophosphat- und Diphosphatkinasen zu Di- und Tri-Phosphaten, den Bausteinen für die DNA- und RNA-Synthese, umgesetzt werden (Wang et al., 2003; Sandrini et al., 2005). Zwei Desoxynukleosidkinasen, die Thymidinkinase 1 und die Desoxycytidinkinase sind im Zytosol lokalisiert. Ihre Produkte müssen erst in die Mitochondrien gelangen, um für die mtDNA-Synthese verfügbar zu sein. Die beiden anderen Enzyme, die Thymidinkinase 2 und die Desoxyguanosinkinase sind innerhalb der Mitochondrien lokalisiert (Leanza et al., 2008). Ihre Substratspezifität erlaubt es, dass Desoxythymidin und Desoxycytidin von der Thymidinkinase 2 und Desoxyguanosin und Desoxyadenosin von der Desoxyguanosinkinase phosphoryliert werden (Rampazzo et al., 2004; Gazziola et al., 2001).

Enzyme	Edukte
Thymidinkinase 1 (TK 1)	Desoxythymidin
Desoxycytidinkinase (DCK)	Desoxycytidin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin
Thymidinkinase 2 (TK 2)	Desoxythymidin, Desoxycytidin
Desoxyguanosinkinase (DGUOK)	Desoxyadenosin, Desoxyguanosin

Tabelle 3: Desoxynukleosidkinasen

In früheren Untersuchungen wurde beschrieben, dass die mtDNA-Synthese in *DGUOK*-defizienten Fibroblasten nur in der S-Phase stattfindet, während in Kontrollfibroblasten die

mtDNA-Synthese unabhängig vom Zellzyklus ist (Taanman et al., 2003; Saada, 2008). Durch Serumreduktion wurde die Zellteilung inhibiert und die Zellen gelangten in einen ruhenden Zustand. Der mtDNA-Gehalt fiel dabei in *DGUOK*-defizienten Zellen deutlich, während er in den Kontrollzellen stabil blieb. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Abnahme der mtDNA in ruhenden, *DGUOK*-defizienten Fibroblasten durch die Zugabe von dAMP und dGMP vermindert werden konnte, was vermuten lässt, dass Substratlimitation mtDNA-Depletion in *DGUOK*-defizienten Zellen auslöst.

2 Zielsetzung

Gene, die durch das nukleäre Genom kodiert werden, und deren genetische Veränderungen eine Störung der mtDNA-Replikation verursachen, können in zwei Kategorien unterteilt werden: Gene, die für Proteine kodieren, die die mtDNA-Replikation direkt betreffen und Gene, die das ausgewogene Verhältnis des mitochondrialen Nukleotidpools beeinflussen. Bei beiden Formen kommt es durch den verringerten mtDNA-Gehalt in den Zellen zu Funktionsstörungen der Mitochondrien.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die verschiedenen Pathomechanismen, die dem mitochondrialen DNA-Depletionssyndrom zugrunde liegen, näher untersucht und mögliche, neue Therapieansätze entwickelt werden.

Hierfür soll ein Zellmodell in Myoblasten ähnlich wie von Taanman et al., 2003 in Fibroblasten entwickelt werden, dass es ermöglicht, mtDNA-Depletion in Muskelzellen zu messen und funktionelle Defekte der Mitochondrien biochemisch zu detektieren. Mit Hilfe von *in vitro* erzeugten Myotuben soll dabei der Differenzierungsaspekt berücksichtigt werden.

Zu diesem Zweck werden Patientenmyoblasten mit Mutationen im *DGUOK*-Gen, im *TYMP*-Gen und im *POLG*-Gen näher analysiert. Mutationen in diesen Genen führen zu einer Stoffwechselerkrankung: dem mitochondrialen DNA-Depletionssyndrom.

Beim mitochondrialen DNA-Depletionssyndrom ist die Reduktion des mtDNA-Gehalts gewebespezifisch nachweisbar. Betroffen sind vorallem die Skelettmuskulatur und die Leber. Eine geringe Erhöhung der mtDNA-Kopienanzahl (von 10% auf 20%) kann schon zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome führen. Aufgrund dessen sollen im Rahmen dieser Arbeit durch Substitution der Nukleosidmonophosphate Wege gefunden werden, abhängig vom zugrunde liegenden Pathomechanismus des mutierten Gens, die mtDNA-Depletion zu verringern. Des Weiteren sollen die Auswirkungen der mtDNA-Depletion auf die Aktivität der Mitochondrien untersucht und so mögliche, zukünftige Therapiestrategien aufgezeigt werden

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

	<u>Myoblasten</u>	<u>Mutation</u>	<u>Klinik</u>
Kontrollen:	Kontrolle 1 (c1)	-	-
	Kontrolle 2 (c2)	-	-
Patienten:			
DGUOK	Patient 1 (p1)	homozygot c.705+1_4delGTAA	Hepatoenzephalopathie
	Patient 2 (p2)	homozygot p.S52F	Hepatoenzephalopathie
POLG	Patient 3 (p3)	compound heterozygot p.A467T/p.K1191N	Alpers-Huttenlocher Syndrom
	Patient 4 (p4)	homozygot p.T251I+p.P587L cis	chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)
TYMP	Patient 5 (p5)	homozygot p.E289A	MNGIE

Tabelle 4: Verwendete Myoblasten

3.2 Zellkultur

Die verwendeten Patientenmyoblasten wurden von der Muskelbank (Muscle-Tissue-Culture-Collection; MTCC) des Friedrich-Baur-Instituts in München zur Verfügung gestellt. MTCC ist eine zentrale Serviceeinrichtung des deutschen Muskeldystrophie-Netzwerks MD-Net und Partner der EuroBioBank und von Treat-NMD.

Die Myoblasten wurden in lamininbeschichteten Kulturschalen mit Skeletal Muscle Growth Medium (SGM) (supplementiert mit 15% fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 0,06% Gentamycin) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Ausdifferenzierung und Fusion in mehrkernige Myotuben wurden die Myoblasten in 12-Wellplatten ausgesät. Bei 70% Konfluenz wurde das SGM-Medium durch ein serumreduziertes Fusionsmedium (Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), supplementiert mit 2% Pferdeserum (normal 5%) und 2 mM Glutamin) ersetzt. Nach 6 Tagen in Kultur wurden die Myotuben durch Abschaben geerntet, bei -80°C aufbewahrt oder sofort weiter verarbeitet (DNA-Extraktion).

Für die Supplementationsstudien wurde dem Fusionsmedium 200 μM bzw. 400 μM dAMP/dGMP, dAMP/dCMP/dGMP und dAMP/dCMP/dGMP/dTMP zugesetzt. Um die Depletion zu verstärken wurde zu den Zellkulturmedien (SGM- und Fusionsmedium) jeweils 50 ng/ml EtBr, 5 μM bzw. 50 μM bzw. 300 μM Didanosin bzw. Stavudin gegeben.

Die Medien und Reagenzien für die Zellkultur wurden von den Firmen Gibco/Invitrogen sowie PAA Laboratories GmbH bezogen. Die Desoxynukleosidmonophosphate und die antiretrovirale Wirkstoffe stammten von Sigma-Aldrich.

3.3 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammten, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich oder Roth.

3.4 Molekulargenetische Methoden

3.4.1 DNA-Extraktion

Aus den geernteten Zellen wurde die DNA mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.4.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Mit dem Lösungsmittel der Nukleinsäure-Probe wurde der Nullabgleich durchgeführt. Die DNA-Probe wurde 1:100 verdünnt und bei den Wellenlängen von 260 und 280 nm (260 nm = Absorptionsmaxima von DNA und RNA; 280 nm = Absorptionsmaxima von Proteinen bzw. der enthaltenen aromatischen Aminosäuren) gemessen. Eine OD-Einheit entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (doppelsträngige DNA). Aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ lässt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmen.

Zur Berechnung verwendete Faktoren:

1 OD_{260} entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige DNA oder RNA

1 OD_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA

1 OD_{260} entspricht 33 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotide

3.4.3 mtDNA-Depletionstest mittels real-time PCR

3.4.3.1 Prinzip der real-time PCR

Das Testprinzip der real-time PCR beruht auf einer normalen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), d.h. mittels zweier genspezifischer Primer (kurze, synthetisch hergestellte, definierte Starter-DNA Stücke) wird das zu untersuchende Fragment vervielfältigt. Zusätzlich ist allerdings noch die Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „real time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von den erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Quantifizierung ein DNA-Farbstoff (SYBR Green) verwendet. Dieser interkaliert in die DNA, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz. Durch die Verwendung von Standards mit bekannten Konzentrationen an Ausgangsmaterial, wurde die Menge des in der Probe ursprünglich vorhandenen Target-DNA bestimmt.

3.4.3.2 PCR-Primer

Für den mtDNA-Depletionstest wurden 2 Primerpaare verwendet, mit denen PCR-Fragmente des mitochondrialen *ATP6*-Gens (von Deletionen meistens nicht betroffen) und des nukleären *GAPDH*-Gens („housekeeping-Gen“) amplifiziert wurden. Der Gehalt an mtDNA im Verhältnis zur nukleären DNA wurde gemessen.

mtDNA 80 bp Fragment – im *ATP6*-Gen (m.8981-m.9061):

mito fw 5`-ACC AAT AGC CCT GGC CGT AC-3`

mito rev 5`-ATG ACC TTG CCC ACA GCC T-3`

nukleäres 62 bp Fragment – in Exon 8 des *GAPDH*-Gens (c.4280-4342):

nuc fw 5`-CGG GGC TCT CCA GAA CAT C-3`

nuc rev 5`-ATG ACC TTG CCC ACA GCC T-3`

3.4.3.3 LightCycler PCR-Reaktionsbedingungen

PCR-Ansatz mit 10 µl Reaktionsvolumen:

mitochondriales DNA Fragment:

1 µl SYBR Green-Reagenz 1 (LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche)

5 pmol Primer mito fw

5 pmol Primer mito rev

10 ng DNA

0,8 µl MgCl₂

5,2 µl H₂O

nukleäres DNA Fragment:

1 µl SYBR Green-Reagenz 1 (LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche)

5 pmol Primer nuc fw

5 pmol Primer nuc rev

10 ng DNA

0,4 µl MgCl₂

5,6 µl H₂O

Die PCR wurde im LightCycler 2.0 Instrument, Roche, Mannheim durchgeführt.

PCR-Programm:

1. 95°C : 10 min	Denaturierung der DNA
2. 45 Zyklen:	
(1) 95°C : 5 sec	Aufschmelzen der DNA Doppelstränge
(2) 54°C : 9 sec	Anlagern der Primer (Annealing)
(3) 72°C : 30 sec	Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)

3.4.4 mtDNA-Deletionentest mittels LongRange-PCR

3.4.4.1 Prinzip der LongRange-PCR

Bei der LongRange-PCR wird ein 9976 bp langes Fragment der mtDNA amplifiziert, um evtl. vorhandene Deletionen nachweisen zu können.

3.4.4.2 PCR-Primer

lr-fw 5`-GCT ATA GTG GAG GCC GG-3`

lr-rev 5`-GAG GGT TGA TTG CTG TAC TTG CTT GTA AGC-3`

3.4.4.3 PCR-Reaktionsbedingungen

PCR-Ansatz mit 30 µl Reaktionsvolumen:

16,25 µl H₂O

5 pmol Primer lr-fw

5 pmol Primer lr-rev

dNTP-Mix (Bioline), Endkonzentration: 0,75 mM je dNTP

5 µl Long Amp Buffer (New England Biolabs)

1 µl Long Amp Taq (New England Biolabs)

100 ng DNA

PCR-Programm:

1. 94°C : 2 min	Denaturierung der DNA
2. 30 Zyklen: (1) 94°C : 15 sec (2) 60°C : 30 sec (3) 68°C : 15 min	Aufschmelzen der DNA Doppelstränge Anlagern der Primer (Annealing) Synthese des DNA Doppelstranges (Extension)
3. 68°C : 10 min	Abschließende Extension

3.4.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR Proben wurden durch Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid-haltigen 0,8%igem Agarosegel 3 Stunden bei 130 Volt aufgetrennt.

3.4.6 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

3.4.6.1 Prinzip der CGH

Bei der CGH wird die Fluoreszenzintensität zweier genomischer DNA-Proben miteinander verglichen, indem man sie kompetitiv an DNA-Fragmente binden lässt.

Diese Analysenmethode macht sich zunutze, dass nach einer Hybridisierung die Fluoreszenzintensität an einem speziellen Locus mit der Zahl der gebundenen Sondenfragmente korreliert. Diese Fluoreszenzintensität lässt sich mit den sensitiven Kamerasystemen der meisten Fluoreszenzmikroskope exakt quantifizieren und computergesteuert auswerten. Die Methode wird eingesetzt, um Deletionen und Amplifikationen von DNA-Sequenzen im Genom nachzuweisen und zu kartieren.

3.4.6.2 Reaktionsbedingungen

Jeweils 400 ng der extrahierten DNA und einer Referenz-DNA wurden markiert und auf BAC Arrays (CytoChip V2.1, BlueGnome, Cambridge) entsprechend den Angaben des Herstellers 21 Stunden hybridisiert. Anschließend wurden die Arrays dreimal jeweils für 10 Minuten mit 0,5% Tween in 1x PBS gewaschen, 30 Minuten in 50% Formamid in 2x SSC bei 42°C inkubiert und abschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen und 3 Minuten bei 200 g zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotanta 460R, Tuttlingen).

Die Fluoreszenz wurde mit dem PerkinElmer ProScan Array HT Microarray Scanner gemessen und die Intensitätsverhältnisse mit der BlueFuse 3.5 Array CGH Software (BlueGnome, Cambridge) quantifiziert.

3.5 Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivität

3.5.1 Biochemische Messung

3.5.1.1 Isolierung der Mitochondrien aus Myoblasten

Die Isolierung der Mitochondrien aus Muskelzellen erfolgte nach der von Bentlage et al., 1996 beschriebenen Methode. Die mit Trypsin passagierten Zellen wurden nach Zugabe von 3 ml fötalem Kälberserum (FCS) zentrifugiert (600 g, 4°C, 5 min) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 1x PBS gewaschen (600 g, 4°C, 5 min), der Überstand dekantiert und das Zellpellet gewogen. Nach Zugabe des 10-fachen

Volumens 10 mM Tris (pH 7,4) wurde das Pellet homogenisiert und die Suspension bei 1500 rpm gepottert (IKA® RW 20 digital).

Zur Stabilisierung der Mitochondrien wurde eine 1,5 M Saccharose-Lösung dazu gegeben, das Homogenisat in ein Eppendorf-Cup überführt und zentrifugiert (600 g, 4°C, 10 min). Der Überstand – enthält die Mitochondrien – wurde wieder in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert und nochmal zentrifugiert (10000 g, 4°C, 10 min). Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl SEKT-Puffer suspendiert und durch einen zweiten Zentrifugationsschritt (10000 g, 4°C, 10 min) gewaschen und in 65 µl SEKT-Puffer aufgenommen.

SEKT-Puffer:

250 mM Saccharose
2 mM EGTA
40 mM KCl
20 mM Tris (pH 7,4)

Zur Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivitäten wurden Ansätze gewählt, in denen der Substratumsatz photometrisch bestimmt werden konnte.

3.5.1.2 Bestimmung der NADH-Coenzym Q Oxidoreduktase-Aktivität (Komplex I)

Der Multienzymkomplex NADH Coenzym Q Oxidoreduktase überträgt Elektronen von NADH auf Ubichinon. Gleichzeitig wird NADH zu NAD^+ oxidiert.

Bei der Messung der NADH Coenzym Q Oxidoreduktase-Aktivität wurde die Oxidation von NADH bei 334 nm photometrisch verfolgt.

Für die Bestimmung wurden 35 Minuten vor der Messung 225 µl H_2O vorgelegt und bei laufendem Vortexer 25 µl Decylubiquinon dazu getropft. Die Lösung wurde bis zur späteren Verwendung auf Eis gelagert. Zusätzlich wurde eine 2%ige Rotenon-Lösung frisch hergestellt (2 mg/ml in 100% Ethanol).

2 ml einer 50 mM Kaliumphosphat-Lösung, 10 mg BSA und 1,54 ml H_2O wurden gemischt und mit 100 µl einer 0,2 M MgCl_2 -Lösung und 80 µl einer 10 mM NADH-Lösung versetzt. Davon wurden 480 µl mit 2 µl Antimycin (2 mg/ml 100% Ethanol) in Halbmikroküvetten 10 Minuten im Spektralphotometer (UV-Visible-Spectrophotometer, Varian, Cary 50) auf 30°C erwärmt und nach Zugabe von 15 µl der oben hergestellten Decylubiquinon-Lösung die Extinktionsabnahme bei der Wellenlänge 334 nm gemessen. Durch die Zugabe von

Antimycin wird die Cytochrom c Oxidase gehemmt. Bei dieser Reaktion wird Ubichinol (entsteht bei Komplex I) oxidiert und Cytochrom c reduziert.

Während der ersten 6 Minuten (Vorlauf) wurde eine Nulllinie erstellt. Anschließend wurden 20 µl Mitochondriensuspension dazu gegeben und die Extinktionsabnahme 2 Minuten lang gemessen. In der nächsten Minute hatte man Zeit 2 µl Rotenon dazu zu geben und die Extinktionsabnahme wurde weitere 3 Minuten lang gemessen. Durch die Zugabe vom Rotenon wurde die Reaktion abgestoppt.

Auswertung: Die Extinktionsabnahme nach Zugabe des Rotenons wird von der Extinktionsabnahme der Probe abgezogen und anschließend mit dem Faktor F multipliziert.

$$F = \frac{517 \times 1000}{6,18 \times 20} \text{ U/L} \quad F = 4183 \text{ U/L}$$

517 = Gesamtvolumen in der Küvette [µl]

1000 = bezogen auf 1000 ml

6,18 = molarer spektraler Absorptionskoeffizient

20 = Probeneinsatz [µl]

3.5.1.3 Bestimmung der Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase-Aktivität (Komplex II/III kombiniert)

Die Succinat Coenzym Q Oxidoreduktase (Komplex II) oxidiert Succinat zu Fumarat. Eine weitere Komponente des Enzymkomplexes ist die prosthetische Gruppe FAD. Von ihr werden die bei der Oxidation freigesetzten Elektronen übernommen und auf Ubichinon übertragen. Dabei entsteht Ubichinol, welches durch die Cytochrom c Reduktase (Komplex III) oxidiert und Cytochrom c reduziert wird.

Bei dieser Messung werden Komplex II und III kombiniert bestimmt, indem die Reduktion von Cytochrom c durch die Succinat Cytochrom c Oxidoreduktase bei 550 nm photometrisch verfolgt wird.

Für die Bestimmung wurde eine Mischung aus 2 ml einer 1 M KPO₄-Lösung pH 7,5, 2 ml einer 0,1 M EDTA-Lösung, 1 ml einer 0,2 M NaN₃-Lösung und 95 ml H₂O hergestellt. Davon wurden 4 ml mit 0,6 ml Cytochrom c (14 mg/ml), 20 µl einer 60 mmol Succinat-Lösung und 1 µl Rotenon in Halbmikroküvetten 10 Minuten im Spektralphotometer (UV-Visible-

Spectrophotometer, Varian, Cary 50) auf 30°C erwärmt und nach Zugabe von 20 µl Mitochondriensuspension die Extinktionszunahme bei der Wellenlänge 550 nm gemessen.

Auswertung: Die Extinktionszunahme wird mit dem Faktor F multipliziert.

$$F = \frac{501 \times 1000}{21,1 \times 20} \text{ U/L} \quad F = 1187,2 \text{ U/L}$$

501 = Gesamtvolumen in der Küvette [µl]

1000 = bezogen auf 1000 ml

21,1 = molarer spektraler Absorptionskoeffizient

20 = Probeneinsatz [µl]

3.5.1.4 Bestimmung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität (Komplex IV)

Cytochrom c Oxidase katalysiert die Oxidation von Cytochrom c mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor.

Bei der Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität wurde die Oxidation von Cytochrom c bei 550 nm photometrisch verfolgt.

Zuerst wurde reduziertes Cytochrom c hergestellt. Dafür wurden 578 mg Cytochrom c in 52 ml einer 50 mM KPO₄-Lösung, pH 7,4 gelöst. Danach wurde das gelöste Cytochrom c durch die Zugabe von 100 µl 1,15 M Na-Dithionit-Lösung reduziert (Farbumschlag von rot nach hellrot) und anschließend unter Eiskühlung und Rühren auf dem Magnetrührer 4 Stunden Stickstoff durchgeleitet, um überschüssiges Dithionit zu entfernen. Von dieser Lösung wurden Aliquots bei -80°C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

Für die Bestimmung wurden 395 µl Wasser, 45 µl reduziertes Cytochrom c und 50 µl einer 0,1 M KPO₄-Lösung, pH 7,0 in Halbmikroküvetten 10 Minuten im Spektralphotometer (UV-Visible-Spectrophotometer, Varian, Cary 50) auf 30°C erwärmt und nach Zugabe von 10 µl Mitochondriensuspension die Extinktionsabnahme bei der Wellenlänge 550 nm 180 Sekunden lang gemessen. Bei einer Messung wurde anstatt der Mitochondriensuspension 10 µl SETH-Puffer (250 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris, 50 I.E Heparin, pH 7,4) dazu gegeben, um den Leerwert zu bestimmen. Nach 180 Sekunden wurde durch die Zugabe von K₃ [Fe(CN)₆] das restliche Cytochrom c vollständig oxidiert.

Auswertung:

$$C = \frac{K \times S \times 1000 \times 500}{10} \text{ U/L}$$

$$K = \ln (E_1 - E_{ox}) - (E_2 - E_{ox})$$

$$S = (E_{1(LW)} - E_{ox(LW)}) / 21,1$$

C = Enzymaktivität [U/L]

500 = Gesamtvolumen in der Küvette [μ l]

1000 = bezogen auf 1000 ml

21,1 = molarer spektraler Absorptionskoeffizient

10 = Probeneinsatz [μ l]

K = oxidiertes Cytochrom c

S = Konzentration von reduziertem Cytochrom c

3.5.1.5 Bestimmung der Citratsynthase

Als Bezugsgröße wurde die Citratsynthase-Aktivität gemessen. Sie katalysiert die Kondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat.

Für die Bestimmung wurde eine Mischung aus 1,5 ml einer 0,1 M Triethanolaminhydrochlorid-Lösung (TRAM) pH 8,5, 20 μ l Malatdehydrogenase (MDH), 40 μ l einer 10 mM Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Lösung (APAD) und 80 μ l einer 70 mM Malat-Lösung hergestellt.

Davon wurden 500 μ l in Halbmikroküvetten 10 Minuten im Spektralphotometer (UV-Visible-Spectrophotometer, Varian, Cary 50) auf 30°C erwärmt und nach Zugabe von 10 μ l Mitochondriensuspension und 10 μ l Acetyl CoA die Extinktionszunahme bei der Wellenlänge 366 nm gemessen.

Auswertung: Die Extinktionszunahme wird mit dem Faktor F multipliziert.

$$F = \frac{520 \times 1000}{9,1 \times 10} \text{ U/L} \quad F = 5714,3 \text{ U/L}$$

520 = Gesamtvolumen in der Küvette [μ l]

1000 = bezogen auf 1000 ml

9,1 = molarer spektraler Absorptionskoeffizient

10 = Probeneinsatz [μ l]

3.5.1.6 Bestimmung des nichtkollagenen Proteins

Als zweite Bezugsgröße wurde das nichtkollagene Protein gemessen.

Für die Bestimmung wurden die Lösungen A, B und C hergestellt.

A: 2 ml 65 mM $C_4H_4O_6NaK$ + 0,1 ml 0,22 M $CuSO_4$

B: 5 ml 0,2 M Na_2CO_3 + 0,1 ml Lösung A

C: 1 ml Phenol + 1 ml H_2O

10 μ l der Mitochondriensuspension wurde mit 1000 μ l 0,45 M Trichloressigsäure gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (18000 g, RT, 3 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment in 1000 μ l Lösung B gelöst. Anschließend wurden 100 μ l Lösung C dazu gegeben, 25 Minuten bei 37°C inkubiert und die Extinktion bei der Wellenlänge 578 nm gemessen.

3.5.2 Histochemische Färbung der Cytochrom c Oxidase

Bei dieser Färbung wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch die Cytochrom c Oxidase zu einem braunen Präzipitat oxidiert. Dies dient als Marker für die Enzymaktivität.

Die Zellen wurden auf mit Laminin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Kurz vor der Färbung wurden sie dreimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten getrocknet. Es folgten 15 Minuten Inkubation in Medium A bei Raumtemperatur. Danach wurden sie mit 10% Saccharose in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,6 gewaschen und 2 Stunden in Medium B bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden jeweils 5 Minuten mit 10% Saccharose in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,6, mit 1x PBS und abschließend mit H_2O gewaschen und mit Dako® Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

Die Färbung wurde mit einem Leica Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Kamera analysiert und fotografiert.

Medium A:
99,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,6)
10 g Saccharose
28 mg CoCl₂

Medium B:
10 ml 10% Saccharose in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,6)
10 mg Cytochrom c Type V
10 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)
2,0 mg Katalase
pH 7,4 mit einstellen mit 1 M NaH₂PO₄* 7 H₂O (pH 8,8)
sterilfiltriert

3.5.3 WST-Test

Der WST-Test basiert auf der enzymatischen Spaltung von einem Tetrazoliumsalz (Natriumsalz von 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen Disulfonat) zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen.

Die Myoblasten wurden in 96-Well-Platten ausgesäht (10⁴ Zellen pro Well) und am nächsten Tag wurde die Ausdifferenzierung zu Myotuben gestartet, indem das SGM-Medium durch serumreduziertes Fusionsmedium ersetzt wurde. Die Messung der metabolischen Aktivität wurde nach 6-tägiger Fusion mit dem WST-1 Cell Proliferation Assay Kit (Roche, Mannheim) laut Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Menge des gebildeten Farbstoffs korreliert mit der Menge an mitochondrialen Dehydrogenasen und damit mit der mitochondrialen Aktivität. Die optische Dichte wurde an einem Spektralphotometer (spectra MAX 250, MWG-BIOTECH) bei der Wellenlänge 450 nm gemessen und die prozentuale metabolische Aktivität durch Vergleichswerte einer gesunden Kontrolle ermittelt.

3.6 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Myoblasten auf lamininbeschichteten Deckgläsern kultiviert. Für die Ausdifferenzierung und Fusion in mehrkernige Myotuben wurde bei 70% Konfluenz das SGM-Medium durch serumreduziertes Fusionsmedium ersetzt.

Nach 6-tägiger Fusion wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 3,7% Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert (15 min bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in 1x PBS permeabilisiert (10 min bei Raumtemperatur), dreimal mit 1x PBS (jeweils 5 min bei Raumtemperatur) gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Pferdeserum in 1x PBS blockiert (1 Stunde bei Raumtemperatur). Der erste Antikörper (anti-beta-Dystroglykan, Maus monoklonal; Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK), 1:20 verdünnt mit 5% Pferdeserum in 1x PBS, wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal mit 1x PBS (jeweils 5 min bei Raumtemperatur) gewaschen und der zweite Antikörper (1:200; anti-mouse IgG; Sigma) auf die Zellen gegeben (1 Stunde bei Raumtemperatur).

Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid H 33258 (40 µg/ml) gefärbt. Nach dreimaligem waschen mit 1x PBS (jeweils 5 min bei Raumtemperatur) wurden die Deckgläschen mit Dako® Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

Die Färbung wurde mit einem Leica Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Kamera analysiert und fotografiert.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Myoblasten von Patienten untersucht, die genetische Veränderungen im Desoxyguanosinkinase-Gen (*DGUOK*), im Polymerase gamma-Gen (*POLG*) und im Thymidinphosphorylase-Gen (*TYMP*) haben.

Bei Patient 1 (p1) handelt es sich um einen aus der Türkei stammenden Jungen mit einer homozygoten Deletion c.705+1_4delGTAA im *DGUOK*-Gen. Er war das 1. Kind konsanguiner Eltern (Cousin/Cousine 1. Grades). Zwischen dem 3. und 6. Monat entwickelte er ein akutes Leberversagen, muskuläre Hypotonie und einen Nystagmus. Er starb mit 9 Monaten an einem tödlichen Leberversagen.

Patient 2 (p2) trägt die homozygote Mutation p.S52F im *DGUOK*-Gen. Bei diesem Patienten handelt es sich um einen deutschen Jungen, der im Alter von 7 Wochen ein akutes Leberversagen, muskuläre Hypotonie und einen Nystagmus entwickelte. Er starb mit 18 Monaten an einer Hepatoenzephalopathie.

Patient 3 (p3) trägt die compound heterozygoten Mutationen p.A467T/p.K1191N in den Exonuklease- und Polymerasedomänen des *POLG*-Gens. Er entwickelte das Alpers-Huttenlocher Syndrom und verstarb mit 18 Monaten an Leberversagen

Die Patientin 4 (p4) hat die *POLG* Mutationen p.T251I (Exonukleasedomäne) und p.P587L (Linkerregion), die in einem Allel (cis) in homozygoter Form vorliegen. Sie leidet unter einer spät beginnenden CPEO.

Bei Patient 5 (p5) handelt es sich um einen 32 jährigen Patienten mit MNGIE-Syndrom. Im Teenageralter entwickelte er eine periphere Neuropathie und später, mit 32 Jahren eine schwere gastrointestinale Pseudoobstruktion mit einer Ophthalmoparese, Laktatazidose und eine Leukenzephalopathie. Er ist ein homozygoter Anlageträger der *TYMP* Mutation p.E289A.

4.2 Erzeugung von mtDNA-Depletion in DGUOK- und POLG-defizienten Myotuben

Durch die 6-tägige Ausdifferenzierung und Fusion der Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben kam es zu einer hoch signifikanten ($p < 0,01$) Abnahme der mtDNA in den Patientenmyotuben mit Mutationen im *DGUOK*-Gen (p1, p2) und im *POLG*-Gen (p3). Im Gegensatz zu den Kontrollzellen und den Patientenzellen mit Mutation im *TYMP*-Gen (p5), bei denen der mtDNA-Gehalt sich nicht signifikant veränderte.

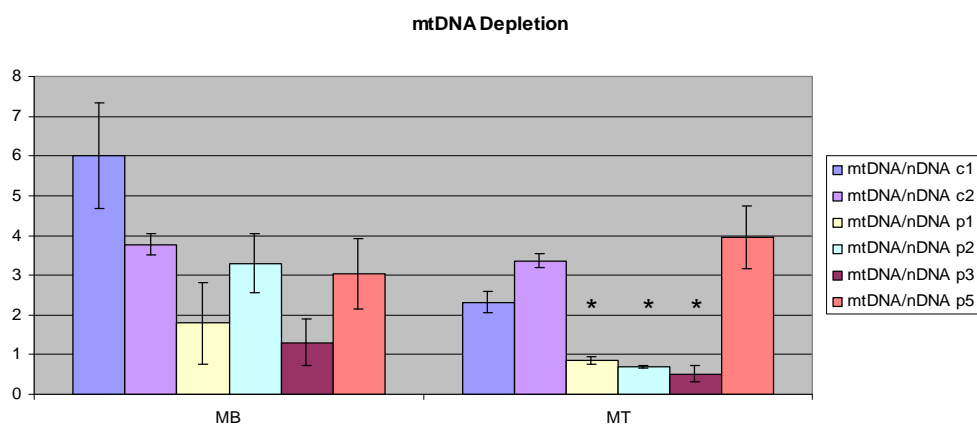


Abbildung 20: Im Vergleich zu den Myoblasten zeigten die Patientenmyotuben p1, p2 und p3 nach 6 Tagen Fusion eine hoch signifikante ($p < 0,01$) Abnahme der mtDNA. In den Kontrollzellen c1 und c2 und in den Patientenmyotuben p5 kam es zu keiner signifikanten Veränderung des mtDNA-Gehalts.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden. Der signifikante Unterschied zwischen den Myoblasten und Myotuben des gleichen Genotyps ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Während der Fusion nahm der mtDNA-Gehalt gleichmäßig bis zum 5. Tag ab und blieb anschließend konstant. Zu diesem Zeitpunkt waren nahezu alle Zellen zu Myotuben ausdifferenziert.

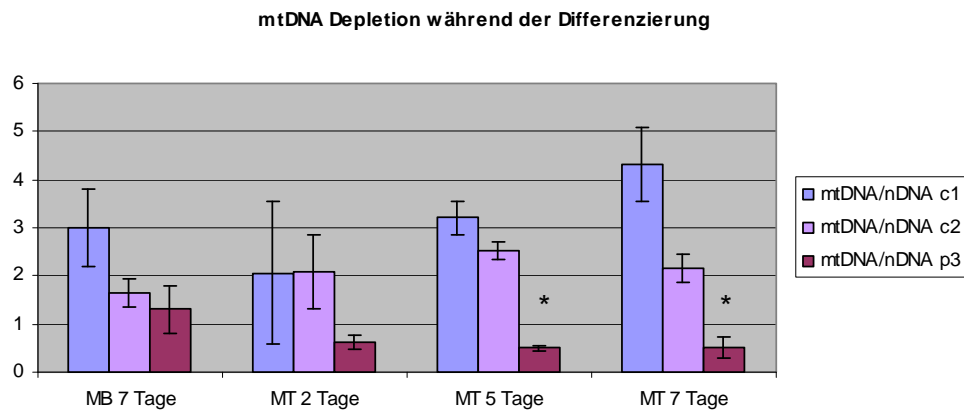


Abbildung 21: Im Gegensatz zu den Kontrollzellen, nahm das Verhältnis mtDNA/nDNA in den Patientenzellen (hier anhand des POLG-Patienten (p3) dargestellt) während der ersten 5 Tage der Fusion gleichmäßig ab und blieb danach konstant. An Tag 5 und 7 war die Abnahme im Vergleich zu den Myoblasten signifikant ($p < 0,05$) und ist mit einem Stern gekennzeichnet. Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden.

Da Myotuben nur eine begrenzte Zeit kultiviert werden können, wurden sie in allen weiteren Versuchen 6 Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurde die DNA extrahiert und das Verhältnis mtDNA/nDNA mittels real-time PCR bestimmt.

4.3 Substitution der Nukleosidmonophosphate bei mtDNA-Depletion

4.3.1 dAMP/dGMP Substitution bei DGUOK-defizienten Myotuben

Die kombinierte Zugabe der Nukleosidmonophosphate Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP) und Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP) zu dem Fusionsmedium führte bei zwei unabhängigen Patientenzelllinien mit Mutationen im *DGUOK*-Gen (p1, p2) zu einer hoch signifikanten ($p < 0,01$) Zunahme der mtDNA. Durch die Substitution konnte der mtDNA-Gehalt auf das Niveau der Myoblasten gebracht werden. Die Kontrollzellen zeigten nur einen leichten, nicht signifikanten ($p > 0,05$) Anstieg des Quotienten mtDNA/nDNA. Die Aufhebung der mtDNA-Depletion in DGUOK-defizienten Zellen war dosisabhängig. Der höchste mtDNA-Gehalt wurde durch die Zugabe von 200 μM bzw. 400 μM dAMP/dGMP erreicht. Eine Erhöhung der Dosis führte zu keiner weiteren Zunahme der mtDNA. Die Substitution von dAMP oder dGMP alleine hatte einen geringeren Effekt, was darauf hindeutet, dass eine genetische Veränderung im *DGUOK*-Gen die Biosynthese beider Purinnukleotide beeinträchtigt.

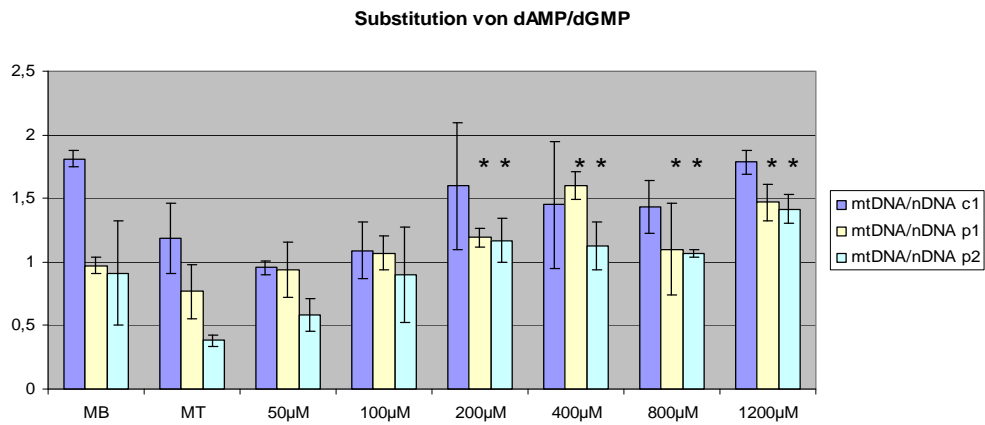


Abbildung 22: In zwei unabhängigen *DGUOK*-defizienten Zelllinien (*p1*, *p2*) konnte eine Erhöhung des mtDNA-Gehalts auf Myoblasten-Niveau durch die Zugabe von 200 µM bzw. 400 µM dAMP/dGMP erreicht werden. Eine größere Dosis führte zu keiner weiteren Zunahme der mtDNA.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden. Der hoch signifikante Unterschied zwischen den nicht-supplementierten und supplementierten Myotuben des gleichen Genotyps ist mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,01$).

4.3.2 dAMP/dGMP Substitution bei POLG- und TYMP-defizienten Myotuben

Die Substitution von 200 μM bzw. 400 μM dAMP/dGMP bei Patientenmyotuben mit Mutationen im *POLG*- bzw. *TYMP*-Gen (p3, p5) führte, wie bei den Kontrollzellen, zu einem leichten, aber nicht signifikanten ($p > 0,05$) Anstieg der mtDNA.

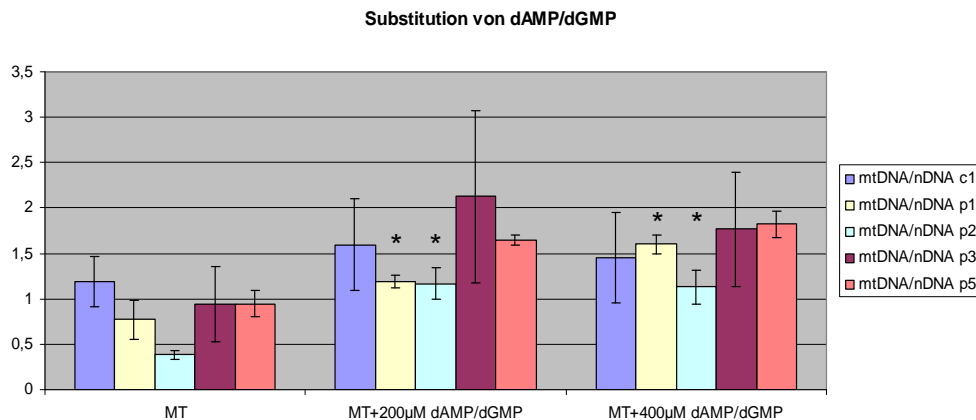


Abbildung 23: Die Zunahme der mtDNA war in *DGUOK*-defizienten Myotuben (p1, p2), supplementiert mit 200 μM bzw. 400 μM dAMP/dGMP im Vergleich zu nicht-supplementierten Zellen stets hoch signifikant ($p < 0,01$). In den Kontrollzellen, sowie in den Patientenmyotuben mit Mutationen im *POLG*- und im *TYMP*-Gen (p3, p5) konnte ein ähnlicher, aber weniger ausgeprägter Effekt beobachtet werden, der keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$) erreichte.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden. Der hoch signifikante Unterschied zwischen den nicht-supplementierten und supplementierten Myotuben des gleichen Genotyps ist mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,01$).

4.3.3 dAMP/dCMP/dGMP/dTMP Substitution bei POLG-defizienten Myotuben

Bei Defekten der Desoxyguanosinkinase ist die ausgewogene Bereitstellung von Desoxyadenosinmonophosphat und Desoxyguanosinmonophosphat für die mtDNA-Synthese gestört, während bei genetischen Veränderungen des *POLG*-Gens die mtDNA-Synthese direkt beeinträchtigt wird. Aufgrund der unterschiedlichen Pathomechanismen bei Defekten der Desoxyguanosinkinase und der Polymerase gamma, wurden in weiteren Versuchen *POLG*-defiziente Myotuben (p3, p4) mit allen vier Nukleosidmonophosphaten supplementiert.

Die kombinierte Zugabe von dAMP/dCMP/dGMP/dTMP führte in Patientenmyotuben mit jeweils einer Mutation in der Polymerase- und in der Linkerdomäne des *POLG*-Gens (p3) und

in Patientenmyotuben mit jeweils einer Mutation in der Exonuklease- und in der Linkerdomäne des *POLG*-Gens (p4) zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Zunahme der mtDNA auf Myoblasten-Niveau. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen, die keinen signifikanten Anstieg zeigten.

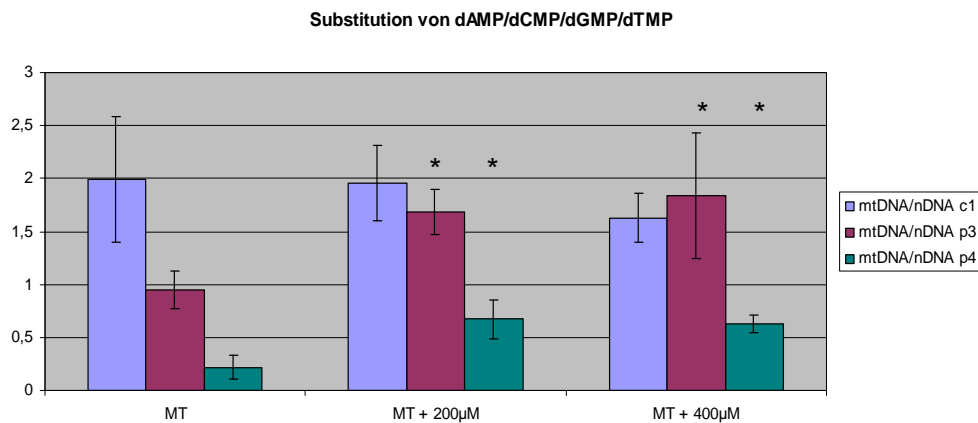


Abbildung 24: Die Zunahme der mtDNA war in den Patientenmyotuben (p3, p4), supplementiert mit 200 µM bzw. 400 µM dAMP/dCMP/dGMP/dTMP im Vergleich zu den nicht-supplementierten Zellen stets signifikant ($p < 0,05$). In den Kontrollzellen kam es zu keiner Veränderung der Werte.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden. Der signifikante Unterschied zwischen den nicht-supplementierten und supplementierten Myotuben des gleichen Genotyps ist mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4.3.4 dAMP/dCMP/dGMP Substitution bei TYMP-defizienten Myotuben

Bei Defekten der Thymidinphosphorylase kommt es durch den gestörten Abbaumechanismus zu einem pathologischen Anstieg der Thymidinmonophosphat-Konzentration. Dadurch können sekundäre mtDNA-Depletionen, mtDNA-Deletionen und/oder Mutationen der mtDNA entstehen. Um das Gleichgewicht der 4 Nucleosidmonophosphate zu verbessern, wurden die Patientenzellen mit einem genetischen Defekt im *TYMP*-Gen (p5) mit 200 µM bzw. 400 µM der anderen drei Nucleotide (dAMP/dCMP/dGMP) substituiert. Allerdings kam es dadurch zu keiner signifikanten ($p > 0,05$) Änderung des mtDNA/nDNA-Quotienten. Die DNA un behandelter Patientenmyotuben (p5) wurde außerdem mittels LongRange-PCR auf mtDNA-Deletionen getestet. Auch hierbei wurden keine Veränderungen detektiert (Abbildung 27).

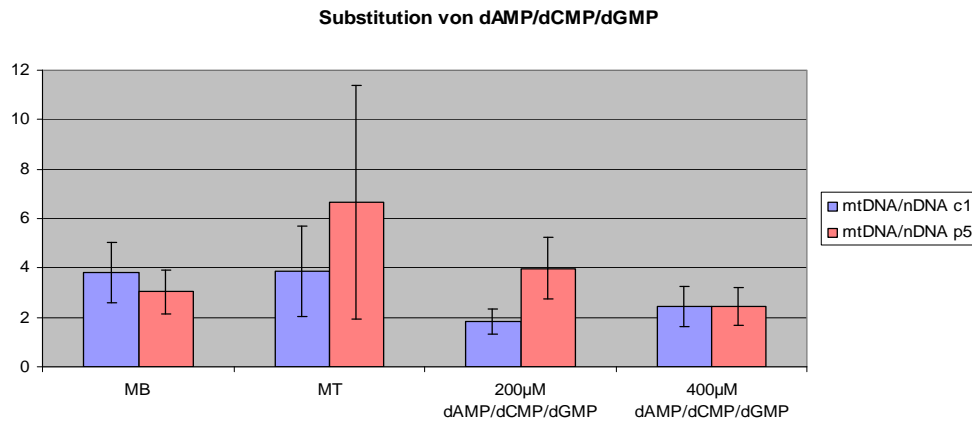


Abbildung 25: In den TYMP-defizienten Patientenmyotuben (p5) kam es durch die Zugabe von 200 µM bzw. 400 µM dAMP/dCMP/dGMP zu keiner signifikanten Änderung des mtDNA/nDNA-Quotienten.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden.

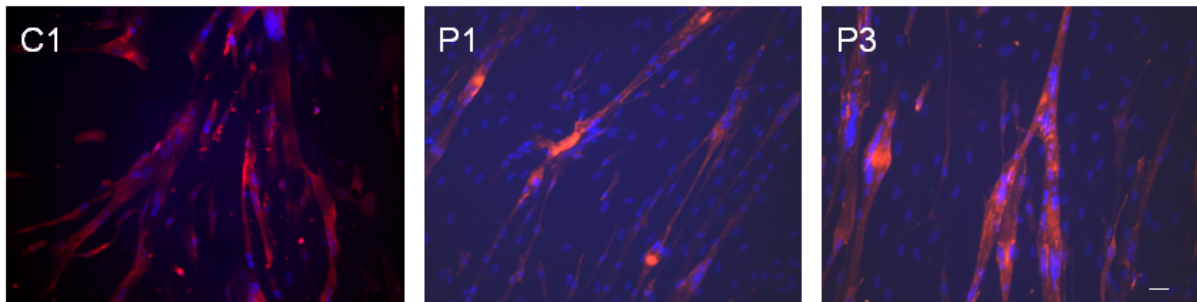
4.4 Toxizitätsuntersuchungen der Nukleotide

4.4.1 Zelltoxizität

Um einen evtl. toxischen Effekt der Nukleotide dAMP/dGMP auf die Zellen ausschließen zu können, wurden Supplementationsanalysen mit ansteigenden Konzentrationen dAMP/dGMP durchgeführt. Es wurde der Bereich zwischen 50 µM - 1200 µM dAMP/dGMP untersucht (Abbildung 22).

Bis zu einer Dosis von 800 µM dAMP/dGMP wurden keine toxischen Effekte in Form von morphologischen Zellveränderungen, einer verringerten Zellteilungsrate oder einer beeinträchtigten Fusionskapazität gefunden. Allerdings führte die Zugabe von 1200 µM dAMP/dGMP zum Fusionsmedium zu einer verminderten Fusion der Myoblasten zu Myotuben bei gleichbleibendem mtDNA-Gehalt. Die verringerte Fusionsfähigkeit wurde anhand einer Beta-Dystroglykan Färbung detektiert. Beta-Dystroglykan wird nur in ausdifferenzierten Myotuben exprimiert und ist somit ein Marker für die Fusion der Myoblasten.

unbehandelte Myotuben



Myotuben nach Zugabe von 1200µM dAMP/dGMP

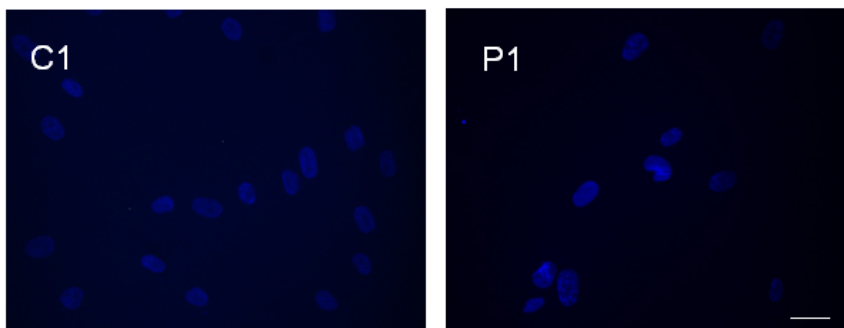


Abbildung 26: In der oberen Zeile ist die Färbung unbehandelter Kontrollzellen und DGUOK-defizienter Patientenzellen (p) zu sehen. Die verminderte Fusionskapazität, der mit 1200 µM dAMP/dGMP supplementierten Kontrollmyoblasten und DGUOK-defizienten Patientenmyoblasten (p1) ist in der unteren Zeile durch eine negative Beta-Dystroglykan Färbung dargestellt. (Maßstabsbalken 50 µm)

4.4.2 Auswirkungen auf die DNA-Stabilität

Um evtl. negative Auswirkungen einer hohen Dosis dAMP/dGMP (1200 μ M) auf die Stabilität der DNA detektieren zu können, wurde mit der extrahierten DNA der behandelten Myotuben eine LongRange-PCR durchgeführt um multiple mtDNA-Deletionen sichtbar zu machen. Außerdem wurde die Vergleichende Genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) eingesetzt, um Deletionen und Amplifikationen von DNA-Sequenzen im Genom nachzuweisen und zu kartieren.

Es wurden weder Deletionen der mtDNA, noch Veränderungen der nukleären DNA festgestellt.

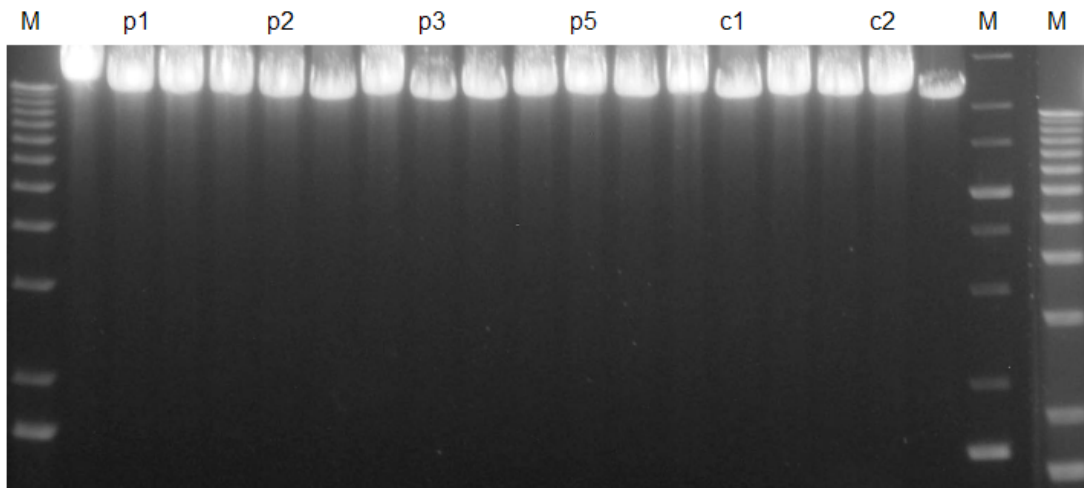


Abbildung 27: Sowohl die Patientenmyotuben p1- p3 nach Substitution mit 1200 μ M dAMP/dGMP, als auch die unbehandelten Patientenzellen (p5) mit genetischen Veränderungen im TYMP-Gen zeigten keine multiple mtDNA-Deletionen mittels LongRange-PCR nach 6-tägiger Fusion. Von jedem Genotyp (Patientenzellen p1-p3, p5; Kontrollzellen c1 und c2) wurden 3 PCR-Ansätze aufgetragen.

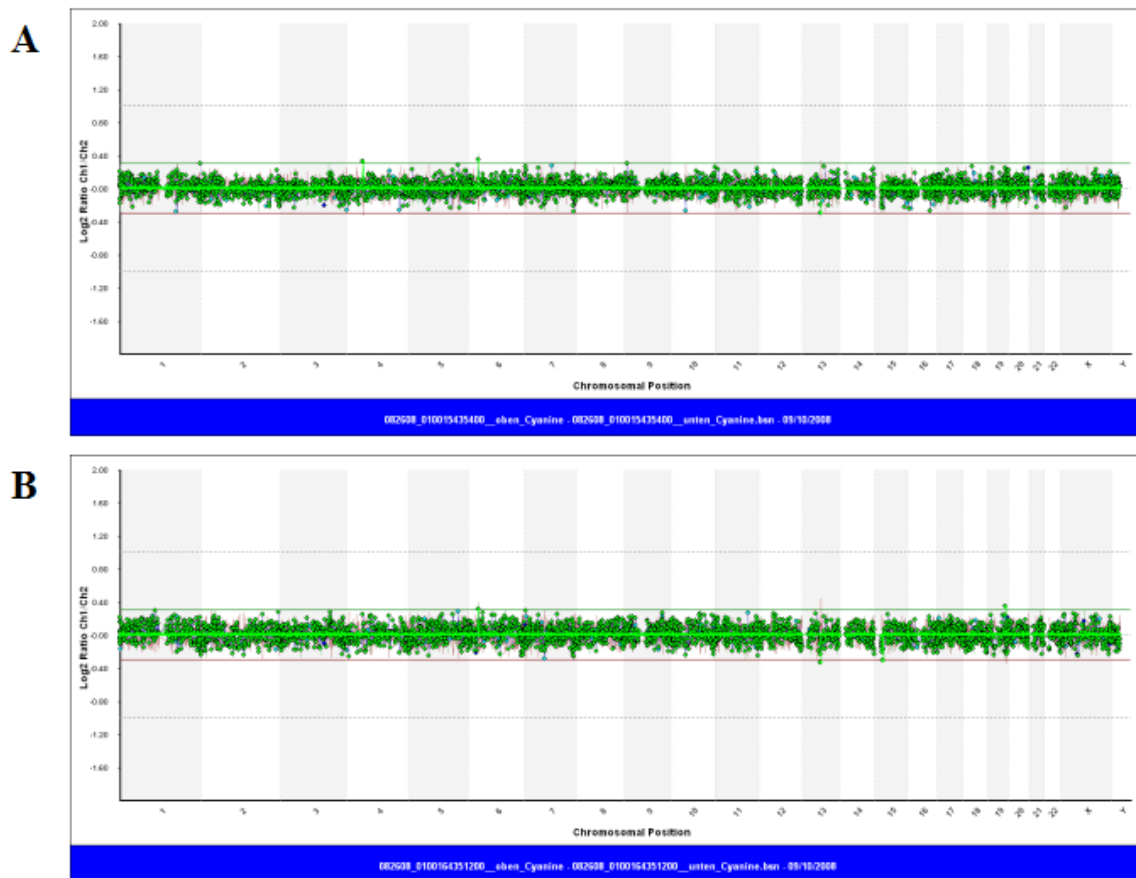


Abbildung 28: Nach Inkubation mit 1200 μM dAMP/dGMP zeigten weder die Referenz DNA (A), noch die Patienten DNA (B) eine chromosomale Veränderung in der Array-CGH-Analyse. Es waren keine quantitativen Abweichungen erkennbar. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz logarithmisch aufgetragen. Die X-Achse gibt die Position der auf dem Objekträger fixierten DNA-Fragmente im jeweiligen Chromosom in kb an.

4.5 Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenkomplexe

4.5.1 Biochemische Messung

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Verringerung des mtDNA-Gehalts und eines funktionellen Defekts zu untersuchen, wurden die Aktivitäten der NADH-Coenzym Q Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex II/III kombiniert) und der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) gemessen. Es konnten allerdings keine Unterschiede der biochemischen Aktivitäten der Atmungskettenenzyme in DGUOK-

und POLG-defizienten Myoblasten bzw. Myotuben im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden.

4.5.2 Cytochrom c Oxidase-Färbung

Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase wurde des Weiteren durch eine histochemische Färbung der Myotuben gemessen. Obwohl der mtDNA-Gehalt in DGUOK- und POLG-defizienten Myotuben hoch signifikant ($p < 0,01$) abnimmt, konnten auch in dieser Messung keine Unterschiede zwischen Patienten- (p1, p3) und Kontrollmyotuben detektiert werden.

COX-Färbung:

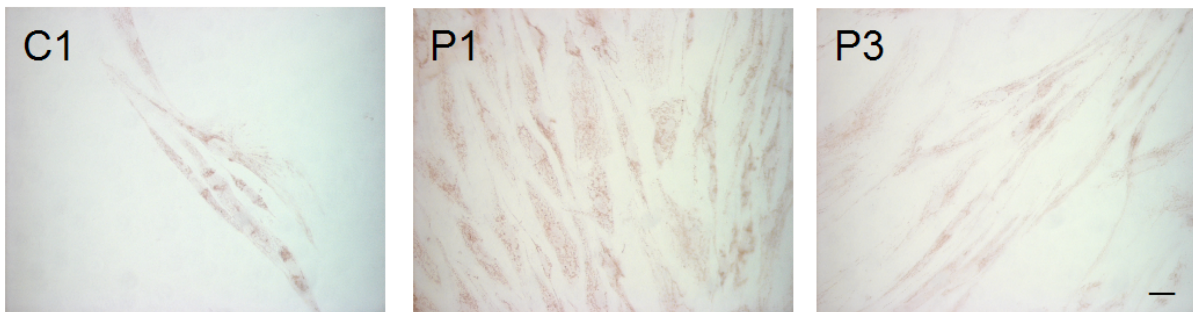


Abbildung 29: 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde durch die Cytochrom c Oxidase in Kontroll- und Patientenzellen oxidiert. Es waren keine Unterschiede der Intensität der Braunfärbung erkennbar. Die Färbung wurde mit einem Leica Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop und einer Zeiss AxioCam HR Kamera analysiert und fotografiert. (Maßstabsbalken 50µm)

4.5.3 WST-Test

Die metabolische Aktivität der fusionierten DGUOK- (p1) und POLG- (p3) defizienten Myotuben sowie zweier unabhängiger Kontrollzelllinien wurde mit und ohne Zugabe von 200 µM bzw. 400 µM dAMP/dGMP mittels WST-Test gemessen. Die Menge des dabei gebildeten Farbstoffs korreliert mit der Menge an mitochondrialen Dehydrogenasen und damit mit der mitochondrialen Aktivität. Dieser Test berücksichtigt auch mtDNA unabhängige Dehydrogenasen und wird aus diesem Grund gewöhnlich zur Bestimmung der Zellviabilität und Zellteilung verwendet. Es wird nicht spezifisch die Funktion der mitochondrialen Atmungskettenenzyme gemessen, sondern die generelle mitochondriale Aktivität. Es wurde allerdings gezeigt, dass die Aktivität der mitochondrialen

Dehydrogenasen in direktem Zusammenhang mit der mitochondrialen Energieproduktion steht. Eine Verringerung der mitochondrialen Dehydrogenase Aktivität geht also mit einer verminderten Energieproduktion einher (Lascaratos et al., 2007).

Die optische Dichte wurde mit einem Spektralphotometer während eines Zeitraums von 3 Stunden gemessen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der metabolischen Aktivität in Patientenzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert. Die Zugabe von 200 μM bzw. 400 μM dAMP/dGMP führte zu einem leichten, nicht signifikanten ($p > 0,05$) Anstieg der Messwerte. Diese Ergebnisse deuten auf ein normales Zellwachstum und eine normale mitochondriale Enzymfunktion hin.

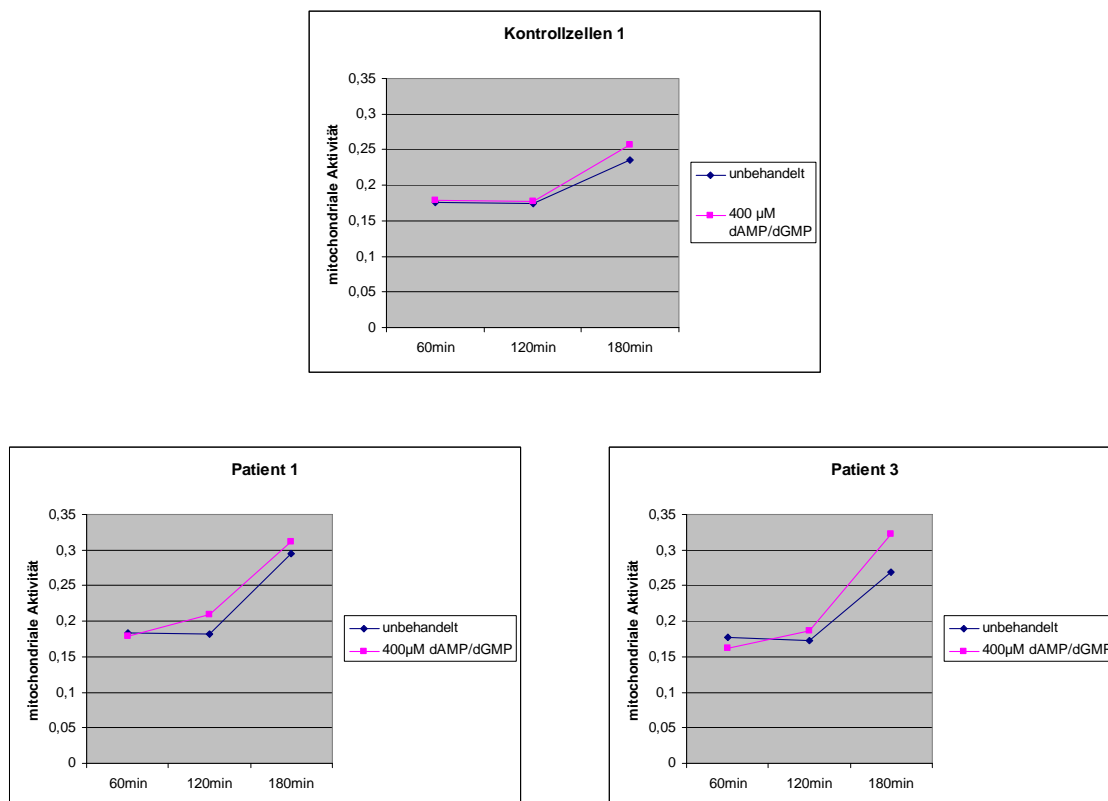


Abbildung 30: Die metabolische Aktivität in Patienten- und Kontrollmyotuben zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Substitution von 400 μM dAMP/dGMP führte zu einer leichten, nicht signifikanten ($p > 0,05$) Erhöhung der Werte.

4.6 Verstärkung der mtDNA-Depletion

Wie in der Literatur beschrieben (Duram et al., 2005), muss die Anzahl der mtDNA-Kopien einen bestimmten Schwellenwert unterschreiten, um einen Atmungsketten-Defekt zu verursachen. Da in den DGUOK-defizienten Myotuben (p1, p2) die mtDNA-Depletion bisher nur mittels real-time PCR nachgewiesen werden konnte, sich diese aber nicht in funktionellen Defekten äußerte, wurde in den folgenden Experimenten versucht, die mtDNA-Depletion durch Zugabe von Zellgiften und verschiedenen Medikamenten zu verstärken.

4.6.1 Ethidiumbromid (EtBr)

EtBr wurde bereits des Öfteren zur Reduktion der mtDNA in proliferierenden Zellen eingesetzt (Diaz et al., 2002).

DGUOK-defiziente Myoblasten (p1, p2) und eine Kontrollzelllinie wurden 10 Tage mit 50 ng/ml EtBr kultiviert. Während der anschließenden Fusion wurde EtBr zum Fusionsmedium gegeben und nach insgesamt 16 Tagen in Kultur die Zellen geerntet. Die Inkubation mit EtBr erzeugte eine sehr schwere mtDNA-Depletion sowohl in den Myoblasten, als auch in den Myotuben der Patienten- und Kontrollzellen, die auch durch die Zugabe von 200 μ M bzw. 400 μ M dAMP/dGMP nicht mehr aufgehoben werden konnte. Die Anzahl der mtDNA-Kopien war 1000 - 2000 mal geringer als in unbehandelten Zellen. Dies ist weit unter dem biochemischen Schwellenwert, der unterschritten werden muss, um einen Defekt der Atmungsketten zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass ein so geringer mtDNA-Gehalt in diesem *in vitro*-Modell nicht mehr durch die Substitution der Nukleosidmonophosphate aufgehoben werden kann.

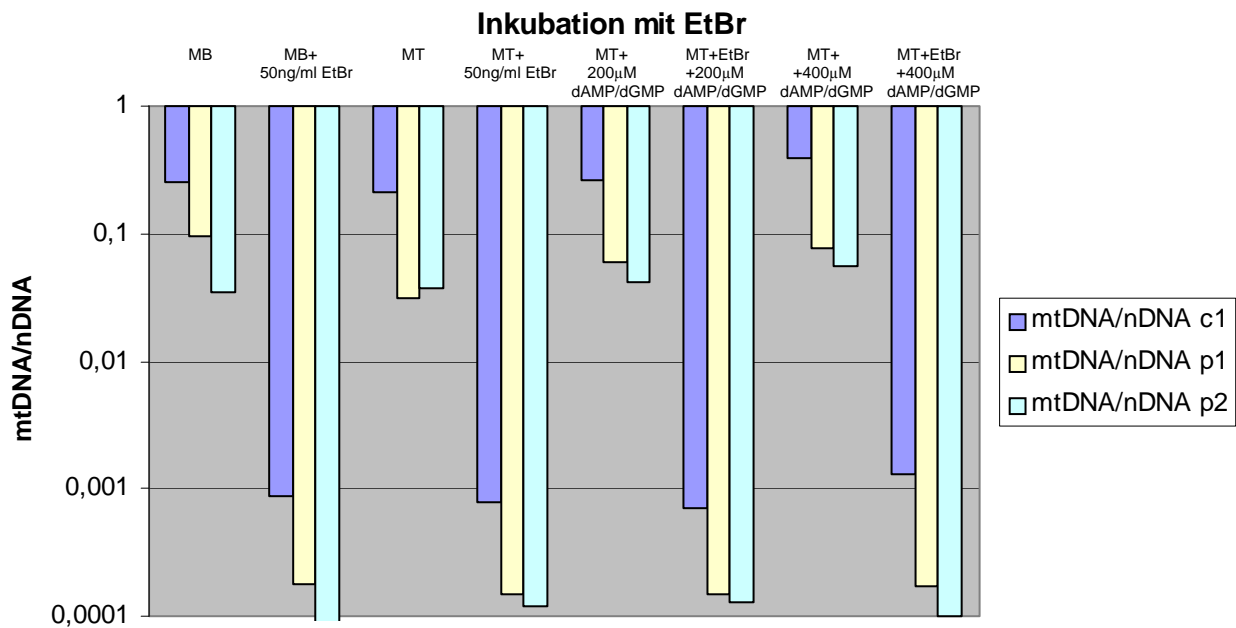


Abbildung 31: Logarithmische Darstellung des mtDNA/nDNA-Quotienten: Die Zugabe von 50 ng/ml EtBr zum Zellmedium verursachte eine sehr schwere, hoch signifikante ($p < 0,01$) mtDNA-Depletion in den Myoblasten und Myotuben der Kontroll- (c1) und Patientenzellen mit DGUOK-Defizienz (p1, p2). Die mtDNA-Depletion war durch die Zugabe von 200 μM bzw. 400 μM dAMP/dGMP nicht mehr reversibel.

4.6.2 Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

NRTIs in Kombination mit anderen antiretroviralen Arzneimitteln sind heute die Eckpfeiler der AIDS Therapie. Es handelt sich dabei um Nukleosid-Analoga, die als falsche DNA-Bausteine eine Unterbrechung der reversen Transkription in Retroviren verursachen. Neben den positiven therapeutischen Wirkungen haben sich im Laufe der Zeit auch einige unerwünschte Nebenwirkungen gezeigt, die vor allem die Mitochondrien betreffen. Die selektive Interaktion der NRTIs mit der Polymerase gamma (POLG) führt zu Störungen der mtDNA-Replikation, in deren Folge mtDNA-Depletionen entstehen (Kohler and Lewis, 2007).

Aus diesen Gründen wurde in weiteren Versuchen Didanosin (2'3'-Dideoxyinosin; ddi) und Stavudin (2'3'-Dideoxyhydro-3'-deoxythymidin; d4T) zur Reduktion der mtDNA eingesetzt (Lund et al., 2007).

Die Myoblasten von zwei Kontrollzelllinien (c1, c2) und von jeweils zwei Patienten mit einem genetischen Defekt im *DGUOK*-Gen (p1, p2) bzw. im *POLG*-Gen (p3, p4) wurden 3

Tage mit 300 μM Didanosin bzw. 300 μM Stavudin inkubiert. Anschließend erfolgte die Fusion zu Myotuben über 6 Tage in Gegenwart des jeweiligen Wirkstoffs. Die Inkubation mit den beiden NRTIs erzeugte eine hoch signifikante ($p < 0,01$) mtDNA-Depletion sowohl in den Myotuben der Patienten als auch in den Kontrollzellen. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Saitoh et al., 2008) war die Reduktion der mtDNA durch Stavudin deutlich milder im Vergleich zu Didanosin.

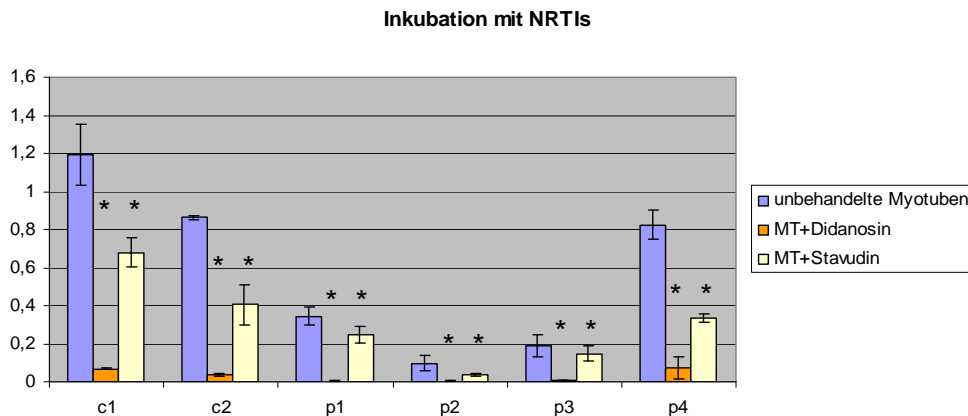


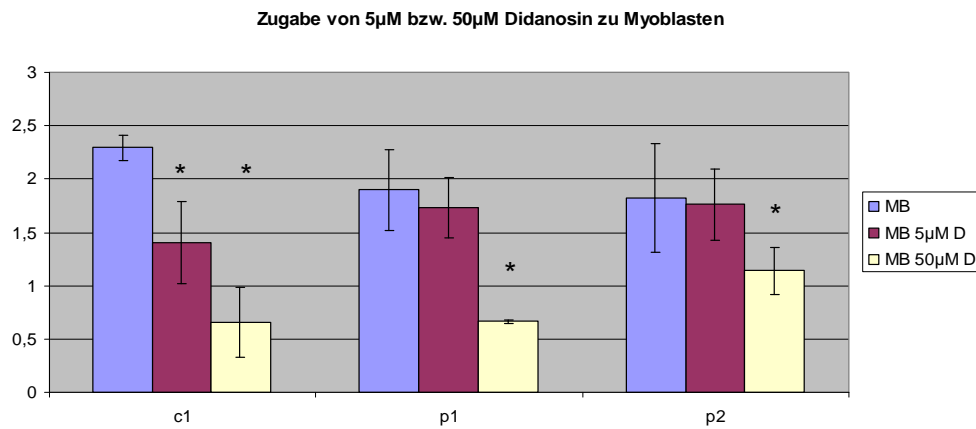
Abbildung 32: Inkubation zweier Kontrollzelllinien (c1, c2), zweier Patientenzellen mit DGUOK-Defizienz (p1, p2) und zweier Patientenzellen mit POLG-Defizienz (p3, p4) mit 300 μM Didanosin bzw. Stavudin führte zu einer hoch signifikanten Reduktion der mtDNA im Vergleich zu unbehandelten Myotuben. Dabei hatte Didanosin den stärkeren Effekt.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden. Der hoch signifikante Unterschied zwischen den nicht-supplementierten und supplementierten Myotuben des gleichen Genotyps ist mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,01$).

Um den Effekt von Didanosin zu optimieren, wurde der Wirkstoff in weiteren Versuchen mit den Konzentrationen 5 μM bzw. 50 μM eingesetzt. Eine Kontrollzelllinie (c1) und zwei DGUOK-defiziente Patientenzelllinien (p1, p2) wurden mit diesen Konzentrationen insgesamt 9 Tage (3 Tage als Myoblasten und 6 Tage während der Fusion zu Myotuben) inkubiert. Schon die 3-tägige Inkubation der Myoblasten sowohl mit 5 μM als auch mit 50 μM Didanosin verursachte eine signifikante Verstärkung der Depletion in den Kontrollzellen. Bei den Patientenzellen stellte sich erst bei der Gabe von 50 μM Didanosin ein signifikanter Unterschied ein. Die weitere Zugabe von 50 μM Didanosin während der 6-tägigen Fusion verursachte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in allen Zellen stets eine signifikante ($p < 0,05$) Verstärkung der mtDNA-Depletion. Die Zugabe von 400 μM dAMP/dGMP führte zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Zunahme der mtDNA in allen mit 50 μM Didanosin

behandelten und in allen unbehandelten Patientenmyotuben, sowie in den behandelten Kontrollzellen.

A



B

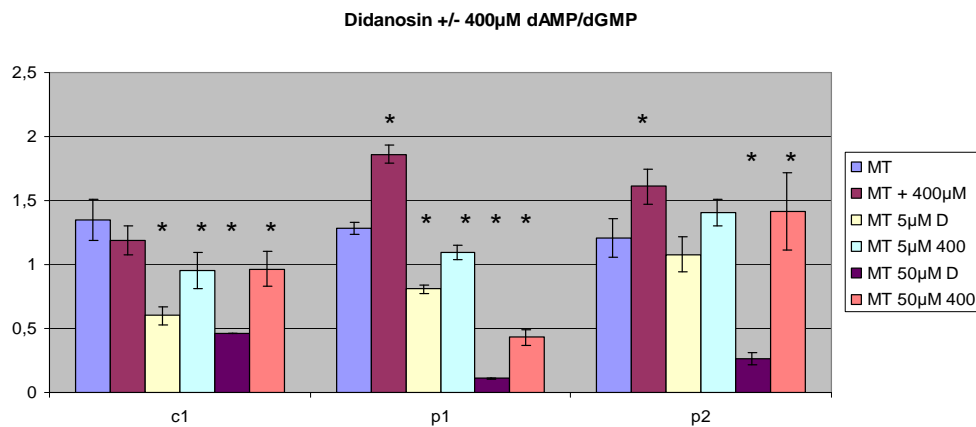


Abbildung 33: Eine Kontrollzelllinie und zwei Patientenzelllinien mit DGUOK-Defizienz wurden 3 Tage als Myoblasten und anschließend 6 Tage während der Fusion zu Myotuben in Gegenwart von 5 µM bzw. 50 µM Didanosin kultiviert. (A) zeigt die Inkubation der Myoblasten mit 5 µM bzw. 50 µM Didanosin. Die Zugabe beider Konzentrationen zu den Kontrollzellen und 50 µM Didanosin zu den Patientenzellen führte zu einer signifikanten Verstärkung der mtDNA-Depletion. (B) zeigt die Auswirkung der Inkubation mit Didanosin auf die mtDNA nach 6tägiger Fusion. In den Kontrollzellen und den Patientenzellen p1 verursachte Didanosin eine signifikante Verstärkung der mtDNA-Depletion, die durch die Zugabe von 400 µM dAMP/dGMP signifikant verbessert werden konnte. In den Patientenzellen p2 führte nur die Zugabe von 50 µM Didanosin zu einer signifikanten Verschlechterung der mtDNA-Depletion. Allerdings konnte durch die Zugabe von 400 µM dAMP/dGMP die mtDNA-Depletion sowohl in den unbehandelten als auch in den mit 50µM Didanosin depletierten Patientenzellen den mtDNA-Gehalt signifikant erhöhen.

Für jede Messung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt, die wiederum als Duplikate gemessen wurden. Der signifikante Unterschied zwischen den nicht-supplementierten und supplementierten Myoblasten bzw. Myotuben des gleichen Genotyps ist mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4.6.2.1 Biochemische Messung der Atmungskettenkomplexe

Da bei den bisherigen Aktivitätsbestimmungen der Atmungskettenkomplexe kein Unterschied zwischen Patientenmyoblasten bzw.-myotuben und zwischen Kontroll- und Patientenzellen detektiert werden konnte, wurde die mtDNA-Depletion durch die Zugabe von 50 μM Didanosin verstärkt, um den Schwellenwert zu unterschreiten und somit einen messbaren funktionellen Defekt zu erhalten. Dafür wurden die Myoblasten 3 Tage mit dem Wirkstoff kultiviert und anschließend fusioniert. Während der Fusion wurde wieder der Wirkstoff zugesetzt und ein Teil der Zellen zusätzlich mit 400 μM dAMP/dGMP inkubiert. Anschließend erfolgte die biochemische Messung der Cytochrom c Oxidase und der Citratsynthase.

Wie bereits in früheren Versuchen konnte durch die Fusion wieder kein funktioneller Defekt in den unbehandelten Myotuben ausgelöst werden. Allerdings führte die Zugabe von 50 μM Didanosin zu einer starken Reduktion der Cytochrom c Oxidase-Aktivität. Durch die gleichzeitige Substitution von dAMP/dGMP konnten sich die Werte wieder etwas erholen. Dieser Effekt war bei den Kontrollmyotuben stärker als bei den Patientenzellen. Da für diesen Versuch sehr viele Zellen benötigt werden, wurde die Messung nur einmal durchgeführt. Aus diesem Grund zeigen die hier aufgeführten Ergebnisse nur eine Tendenz auf. Um eine verlässliche Aussage treffen zu können sind weitere Messungen notwendig.

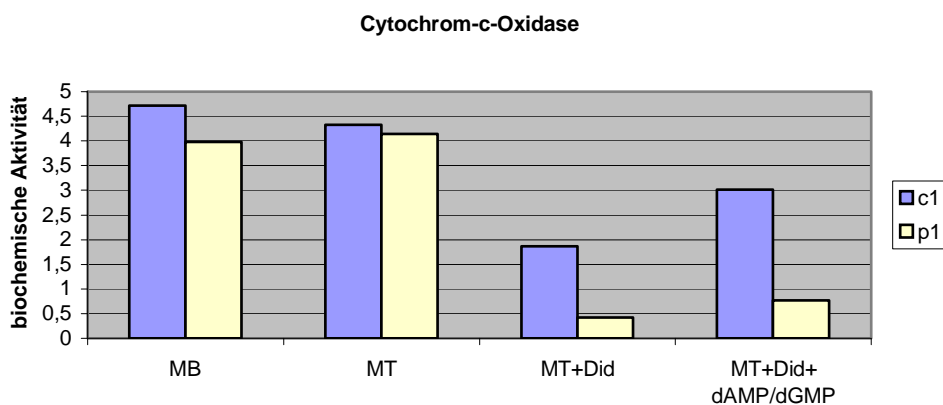


Abbildung 34: Biochemische Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität im Verhältnis zur Citratsynthase. Durch die Zugabe von 50 μM Didanosin über 9 Tage, wurde die Anzahl an mtDNA-Molekülen soweit vermindert, dass ein biochemischer Defekt detektierbar wurde. Die Substitution von dAMP/dGMP führte sowohl in den Kontroll- als auch in den Patientenzellen zu einem leichten Anstieg der COX-Aktivität. Es können weder Standardabweichung, noch Signifikanzniveau angegeben werden, da die Messung nur einmal durchgeführt wurde.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung eines Zellkulturmodells zur näheren Untersuchung von mtDNA-Depletion

Die Proliferation der mitochondrialen DNA geschieht in allen Körperzellen während des gesamten Lebens. Die dafür notwendigen Proteine werden größtenteils durch nukleäre Gene kodiert und in die Mitochondrien importiert. Bisher sind 200 nukleäre Genprodukte bekannt, die an diesem Prozess beteiligt sind. Einige dieser Proteine wurden während der letzten Jahre näher untersucht, um deren Beteiligung an verschiedenen Erkrankungen besser verstehen zu können (Eriksson; Wang 2009).

Das mitochondriale DNA-Depletionssyndrom wird definiert als eine Reduktion der mtDNA-Kopien (unter 30%). Durch Defekte der Atmungskette kommt es zu klinischen Symptomen, die vor allem die Muskulatur, die Leber und das Gehirn betreffen.

mtDNA-Depletion betrifft vor allem postmitotische Gewebe und kann dort wesentlich leichter detektiert werden als in sich teilenden Zellen. In früheren Untersuchungen wurden dafür Fibroblasten-Kulturen verwendet (Taanman et al., 2003). Fibroblasten sind mesenchymale Bindegewebszellen, mit einer glykolytischen Funktion, die nicht von der oxidativen Phosphorylierung abhängen. Da mtDNA-Depletion aber nur in bestimmten Geweben vorkommt, eignen sich Muskel- und Leberzellen wesentlich besser, um sie näher zu untersuchen. Aufgrund dessen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen an primären menschlichen Muskelzelllinien durchgeführt. Sie ähneln in ihren Eigenschaften denen der betroffenen Skelettmuskulatur mehr als Fibroblasten. Die Ausdifferenzierung der Myoblasten zu Myotuben wird routinemäßig in der Untersuchung von Muskelerkrankungen verwendet. Einige muskelspezifische Proteine werden nur in Myotuben, im Gegensatz zu kontinuierlich wachsenden Myoblasten, exprimiert.

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit, wurden Myotuben von Patienten mit verschiedenen mtDNA-Depletionssyndromen *in vivo* eingesetzt, um ein Zellkulturmodell für die bessere Analyse von mtDNA-Depletionen zu entwickeln.

In früheren Arbeiten wurde mtDNA-Depletion in DGUOK-defizienten Fibroblasten ausgelöst, indem der Zellzyklus durch Serumreduktion gehemmt wurde (Taanman et al., 2003; Saada, 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass auch die Anzahl der mtDNA-Kopien in Patientenmyotuben durch die Ausdifferenzierung der Myoblasten zu Myotuben abnimmt. Die Fusion der Myoblasten zu Myotuben wird standardgemäß durch

Serumreduktion ausgelöst. Dadurch kommt es zu einer Hemmung des Zellzyklus und die Myoblasten beginnen zu fusionieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach 5tägiger Fusion eine signifikante Abnahme der mtDNA in Patientenmyotuben detektiert werden. Diese Zellen stammten von Patienten mit gesicherter mtDNA-Depletion. Die Patienten waren alle Träger pathogener Mutationen im *DGUOK*- oder *POLG*-Gen. Da der mtDNA/nDNA-Quotient in Kontrollzellen konstant blieb, konnte die Abnahme der mtDNA-Kopien nicht durch einen erhöhten nDNA-Gehalt erklärt werden.

Myotuben stellen also ein exzellentes Modell für postmitotisches Gewebe dar und sollten für weitere Untersuchungen der mitochondrialen Erkrankungen verwendet werden.

5.2 Substitution der Nukleosidmonophosphate führt zu einer Verbesserung der mtDNA-Depletion *in vitro*

Die Messung von mtDNA-Depletion in Myotuben ist übereinstimmend mit früher veröffentlichten Ergebnissen. Es wurde gezeigt, dass in sich teilenden Zellen, freie Nukleotide in Form von Monophosphaten aus dem Zytosol in die Mitochondrien gelangen können. Im Gegensatz dazu sind ruhende Zellen von den Nukleotiden abhängig, die von den beiden Enzymen DGUOK und TK2 innerhalb der Mitochondrien synthetisiert werden (Leanza et al., 2008; Wang et al., 2003). Die signifikante Abnahme der mtDNA in Myotuben dient als *in vitro*-Modell für mtDNA-Depletion und ermöglicht es, den Pathomechanismus von mtDNA-Depletion näher zu untersuchen. Anhand der Supplementationsstudien können mögliche, zukünftige Therapiestrategien entwickelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die gezielte Substitution der Nukleotide die reduzierte Anzahl an mtDNA-Kopien in Patientenmyotuben wieder erhöht werden kann. In Myotuben mit einer genetischen Veränderung im *DGUOK*-Gen ist die für die mtDNA-Synthese verfügbare Menge an Purinnukleotiden reduziert. Durch die Zugabe von dAMP/dGMP zum Fusionsmedium konnte die mtDNA-Depletion aufgehoben werden. Man erhielt dadurch wieder einen normalen mtDNA-Gehalt. Diese Ergebnisse zeigen ein neues Zellkulturmodell zum besseren Verständnis des mtDNA-Depletionssyndroms auf und weisen einen möglichen Weg für neue Therapiestrategien.

Für weitere Versuche wäre es interessant, den dNTP-Gehalt in DGUOK-defizienten Myotuben mit und ohne Zugabe von dAMP/dGMP zu messen. Allerdings ist diese Messung technisch sehr schwierig, aufgrund der limitierten Menge an *in vitro* verfügbaren Myotuben.

Die Myoblasten, die von einem Kind mit Alpers-Huttenlocher Syndrom stammten, zeigten nach Ausdifferenzierung zu Myotuben eine signifikante Abnahme der mtDNA. Allerdings führte die Zugabe der beiden Purinnukleosidmonophosphate zum Fusionsmedium nur zu einer leichten, nicht signifikanten Zunahme der Anzahl an mtDNA-Kopien. Es ist anzunehmen, dass bei diesen Zellen, der mtDNA-Depletion ein anderer Pathomechanismus zugrunde liegt, als bei *DGUOK*-defizienten Myotuben. Im Gegensatz zu den Zellen mit *DGUOK*-Mutationen, bei denen die ausgewogene Bereitstellung der Nukleotide für die mtDNA-Synthese gestört ist, wird bei Defekten der Polymerase gamma die mtDNA-Synthese direkt beeinflusst.

Ermutigt durch den leichten, positiven Effekt und aufgrund der unterschiedlichen Pathomechanismen, wurde dieser Versuch in zwei Patientenzelllinien (p3, p4) mit *POLG*-Mutationen mit allen 4 Nukleotiden wiederholt. Es stellte sich heraus, dass durch die Zugabe von 200 μM bzw. 400 μM aller Nukleosidmonophosphate die mtDNA-Depletion in *POLG*-defizienten Myotuben, aufgehoben werden konnte. Die Substitution aller 4 Nukleotide führte in Patientenmyotuben (p3) mit jeweils einer Mutation in der Polymerase- und in der Linkerdomäne des *POLG*-Gens sowie in Patientenmyotuben (p4) mit jeweils einer Mutation in der Exonuklease- und in der Linkerdomäne des *POLG*-Gens zu einer signifikanten Zunahme der mtDNA auf Myoblasten-Niveau. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollzellen nur einen leichten, nicht signifikanten Anstieg.

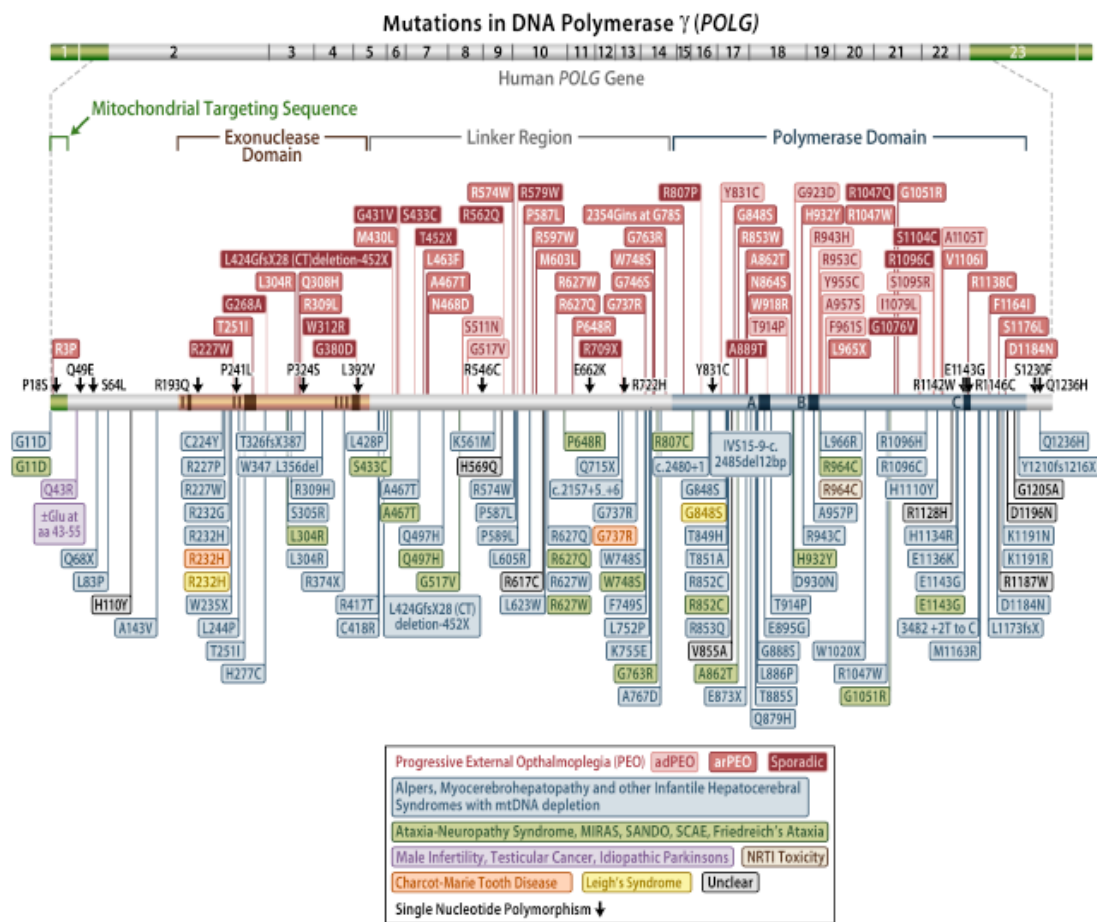


Abbildung 35: Bekannte Mutationen und Polymorphismen der katalytischen Untereinheit der Polymerase gamma. Das POLG-Gen setzt sich aus der Exonukleasedomäne im 1. Drittel, gefolgt von einer langen Linkerdomäne in der Mitte und einer Polymerasedomäne am C-Terminus zusammen. <http://tools.niehs.nih.gov/polg/>

Bei Defekten der Thymidinphosphorylase kommt es durch den gestörten Abbaumechanismus zu einem pathologischen Anstieg der Thymidin-Konzentration in den Mitochondrien, im Zytosol und im Blut. Es wird vermutet, dass es dadurch auch zu einer Erhöhung des dTTP-Pools kommt, der zu mtDNA-Depletionen und/oder mtDNA-Deletionen oder Mutationen der mtDNA führt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass Fibroblasten von Patienten mit MNGIE, überschüssiges Thymidin in das Zellkulturmedium abgeben, während normale Kontrollzellen Thymidin aktiv metabolisieren (Ashley et al., 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Zugabe von Thymidin zu einem Anstieg des dTTP-Pools in den Mitochondrien und im Zytosol führte (Ferraro et al., 2006), und dadurch mtDNA-Depletion (50%) verursachte. Allerdings konnten keine multiplen mtDNA-Deletionen oder Punktmutationen der mtDNA in ruhenden Zellen nach 2 Monaten detektiert werden (Pontarin et al., 2006).

Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte nach einer 6-tägigen Fusion der Patientenmyoblasten mit genetischen Veränderungen im *TYMP*-Gen keine mtDNA-Depletion detektiert werden. Die Zugabe der drei Nukleotide dAMP/dCMP/dGMP führte zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl an mtDNA-Kopien in diesen Zellen. Des Weiteren konnten keine multiplen mtDNA-Deletionen, eine weitere Konsequenz pathogener *TYMP*-Mutationen, mittels LongRange-PCR detektiert werden. Da multiple mtDNA-Deletionen normalerweise erst im späten Erwachsenenalter bei Patienten mit MNGIE auftreten, scheint dies ein langfristiger Vorgang im Krankheitsverlauf zu sein, der sich in diesem Zellkulturmodell nicht nachweisen lässt. Die hier durchgeführten Substitutionsstudien führten zu keinem weiterführenden Ergebnis. Dies kann mehrere Gründe haben. Erstens, wurde evtl. durch die Zugabe der drei anderen Nukleotide nicht die nötigen Konzentrationen in den Zellen erreicht, um das überschüssige dTTP für die mtDNA-Synthese auszugleichen. Es könnte durch die intakten Abbaumechanismen von dAMP/dCMP/dGMP wieder zu einer Elimination der zugeführten Nukleotide gekommen sein, während dTMP nicht abgebaut werden konnte und somit das Ungleichgewicht der verfügbaren Nukleotide weiter bestehen blieb. Alternativ dazu könnte es durch die hohen Nukleotidkonzentrationen zu einer kompensatorischen Hemmung der mtDNA-Synthese gekommen sein. Allerdings wurde dieses Phänomen nicht in anderen Zelllinien beobachtet, die mit 1200 μ M dAMP/dGMP substituiert worden waren. Dies spricht eher gegen einen toxischen Effekt. Es konnte kein Nachweis erbracht werden, dass die Zugabe von Desoxyadenosin-, Desoxycytosin- und Desoxyguanosinmonophosphat zu Patientenzellen mit MNGIE einen signifikanten positiven Effekt im Zellkulturmodell erzeugt. Somit ergibt sich kein Ausgangspunkt für weitere Therapieansätze.

5.3 Sind Nukleosidmonophosphate toxisch?

Es ist bekannt, dass Störungen des mitochondrialen dNTP-Pools mutagen sind und dass die dadurch entstehenden Funktionsstörungen der Mitochondrien zu Instabilitäten der Chromosomen führen. Dies könnte eine Erklärung für die Beteiligung des dNTP-Pools in der Entwicklung von Tumoren sein (Desler et al., 2007).

In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass Nukleotide in Form von Monophosphaten in die Mitochondrien hinein und bei einem Überschuss aus den Mitochondrien heraustransportiert werden (Pontarin et al., 2003). Solange dieser Mechanismus funktioniert scheinen

überflüssige Nukleotide keinen negativen Effekt zu haben, da stets ein ausgewogenes Verhältnis in den Mitochondrien aufrecht erhalten werden kann.

Um einen evtl. toxischen Effekt der Nukleotide auf die Zellen abschätzen zu können, wurden Supplementationsanalysen mit ansteigenden Konzentrationen dAMP/dGMP durchgeführt. Bei der Zugabe von 1200 μ M dAMP/dGMP konnte man bei gleichbleibendem mtDNA-Gehalt eine milde Wachstumsretardierung und eine verringerte Ausdifferenzierung der Myoblasten zu Myotuben beobachten. Um zu testen, ob die hohe Dosis dAMP/dGMP zu Veränderungen der mtDNA und/oder der nDNA führt (Desler et al., 2007; Sumption et al., 2006) wurde mit der aus diesen Zellen nach 6 Tagen extrahierten DNA eine Array-CGH-Analyse und eine LongRange-PCR durchgeführt. Dabei wurden keine Anzeichen einer chromosomalen oder mitochondrialen Veränderung detektiert. Man kann nicht ausschließen, dass die Nukleotid-Exposition nur zu kurz war, um solche Anomalien zu entwickeln. Allerdings zeigten frühere Studien, dass die Zugabe von dem Nukleosidanalogen Zidovudin (AZT) schon nach drei Tagen zu einer dosisabhängigen Mutagenität in den beschriebenen Genen führte (Torres et al., 2007).

Man kann also davon ausgehen, dass falls die Exkretionsmechanismen im Nukleotidmetabolismus intakt sind, überschüssige Mengen der vorhandenen Nukleotide ins Blut abgegeben werden und so für einen ungestörten Ablauf der mtDNA-Synthese sorgen. Folglich kommt es zu einer unregelmäßigen mtDNA-Synthese in Zellen, in denen diese Mechanismen nicht fehlerfrei funktionieren, wie es z.B. in MNGIE-Patientenzellen oder bei dem Einsatz von nicht-physiologischen Nukleosidanaloga der Fall ist. Sowohl die Aufnahme als auch die Ausscheidung der Nukleotide scheint in Form der jeweiligen Monophosphate zu geschehen (Pontarin et al., 2003). Anhand der gewonnenen Erkenntnisse kann man davon ausgehen, dass keine toxischen Effekte der Nukleotidsubstitution die mtDNA-Synthese signifikant beeinträchtigen und dass diese Methode bei zukünftigen Therapieansätzen des mitochondrialen DNA-Depletionssyndroms berücksichtigt werden sollte.

5.4 Kann der Effekt eines verminderten mtDNA-Gehalts durch die Aktivitätsbestimmung der Atmungskettenkomplexe gemessen werden?

Die mtDNA-Depletion muss einen bestimmten Schwellenwert unterschreiten, um Defekte der Atmungskettenkomplexe zu verursachen. Es wurde gezeigt, dass in Skelettmuskelfasern von einem Patienten mit Mutationen im *TK2*-Gen 0,01 Kopien der mtDNA/ μm^3 ausreichen, um die Aktivität der Cytochrom c Oxidase (COX) zu erhalten (Durham et al., 2005). Dies definiert die Mindestmenge an Wildtyp-mtDNA-Molekülen, die im ausgereiften Skelettmuskel benötigt werden, um die COX-Aktivität aufrecht zu erhalten und könnte gleichzeitig eine Erklärung für das mosaikartige histochemische Muster in Patienten mit MDS sein. Falls man die Anzahl der mtDNA-Kopien über diesen Schwellenwert anheben könnte, würde sich das auf die funktionellen Konsequenzen relativ stark auswirken. Eine relativ geringe Zunahme der mtDNA würde also eine signifikante Verbesserung der Atmungskettenfunktion bewirken und somit eine deutliche Verbesserung des klinischen Phänotyps herbeiführen. Aus diesem Grund ist der Eingriff in das gestörte mitochondriale Gleichgewicht der für die mtDNA-Synthese zur Verfügung stehenden Nukleotide ein möglicher Weg für zukünftige Therapien von MDS.

In dem für diese Arbeit entwickelten Zellkulturmodell war es nicht möglich, in unbehandelten Patientenmyotuben einen funktionellen Defekt der Atmungskette in Folge von mtDNA-Depletion zu detektieren. Die biochemische Messung von unbehandelten DGUOK-defizienten Myotuben zeigte keine Verminderung der COX-Aktivität, trotz signifikanter mtDNA-Depletion. Möglicherweise unterschritt die Anzahl der mtDNA-Kopien nicht den Schwellenwert und äußerte sich dementsprechend nicht in messbaren, funktionellen Defekten. Des Weiteren spielt in dem gemessenen Gesamtextrakt die mosaikartige Verteilung der Mitochondrien keine wesentliche Rolle, da nur die Messung des Durchschnittswerts der COX-Aktivität möglich war. Kritisch ist zu betrachten, dass das hier gewählte Zellkulturmodell nicht die Situation im Patientenmuskel widerspiegelt, wo sich ein signifikanter Atmungskettendefekt durch eine mögliche ungünstige Verteilung der Mitochondrien innerhalb des Synzytiums ermitteln lässt.

5.5 Durch Verstärkung der mtDNA-Depletion *in vitro* werden funktionelle Defekte detektierbar

In weiteren Experimenten wurde versucht, durch die Zugabe verschiedener Substanzen, die mtDNA-Depletion zu verstärken und so einen funktionellen Defekt detektieren zu können. Das Ziel dieser Versuche war, auch den funktionellen Defekt evtl. durch die Substitution der Nukleotide positiv beeinflussen zu können.

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) wurde schon öfter die Reduktion der mtDNA in proliferierenden Zellen erreicht (Diaz et al., 2002). Bei den hier beschriebenen Versuchen erzeugte die Inkubation der Zellen mit EtBr über 16 Tage eine sehr schwere mtDNA-Depletion. Die Anzahl der mtDNA-Kopien war 1000-2000 mal geringer als in unbehandelten Zellen und ließ sich auch durch die Zugabe von dAMP/dGMP nicht wieder erhöhen. Des Weiteren war die Cytochrom c Oxidase-Färbung in allen Zellen, sowohl in den Myoblasten und Myotuben der Patienten, als auch in den Kontrollen negativ. Anscheinend war die hier durch EtBr verursachte mtDNA-Depletion zu hoch und dadurch innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht mehr reversibel. Daraus lässt sich schließen, dass ein so geringer mtDNA-Gehalt in diesem *in vitro*-Modell nicht mehr durch die Substitution der Nukleosidmonophosphate aufgehoben werden kann.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die durch EtBr erzeugte mtDNA-Depletion nach Absetzen des Wirkstoffs nach einiger Zeit reversibel war (Diaz et al., 2002). Leider können Myotuben nicht solange in Kultur gehalten werden, um die Erholung der mtDNA zu untersuchen. Da allerdings auch schon die Myoblasten eine mtDNA-Depletion nach EtBr-Supplementation zeigten, eignen sich diese evtl. für ein Langzeit-Zellkultur-Experiment, um das Wiederanstiegen des mtDNA-Gehalts nach Absetzen von EtBr zu messen und somit ein Möglichkeit darstellen, mtDNA-Depletionen näher analysieren zu können.

Von einer Titration der EtBr-Konzentration im Rahmen dieser Arbeit wurde abgesehen, da in weiteren Versuchen Substanzen verwendet werden sollten, die die mtDNA-Synthese spezifisch beeinflussen. Um einen moderateren Effekt zu erzielen, wurden nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) eingesetzt, um die mtDNA-Depletion zu verstärken. Dabei handelt es sich um Nukleosid-Analoga, die im Rahmen einer HIV-Therapie nach Aktivierung in der Zelle als falsche DNA-Bausteine eine Unterbrechung der reversen Transkription in Retroviren erzeugen. Allerdings kommt es durch selektive Interaktionen mit der Polymerase gamma (POLG) auch zu Störungen der mtDNA-Replikation, in deren Folge mtDNA-Depletion entsteht. Dieser eigentlich unerwünschte Nebeneffekt wurde hier

ausgenutzt, um in den depletierten Patientenmyotuben die Anzahl der mtDNA-Kopien weiter zu vermindern. Dazu wurden Didanosin und Stavudin eingesetzt. Durch die Inkubation mit den beiden NRTIs konnte u.a. eine hoch signifikante Verstärkung der mtDNA Depletion in den Patientenmyotuben erzeugt werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Lund et al., 2007), war dieser Effekt durch Stavudin deutlich milder als durch Didanosin.

Durch eine Titration der Didanosin-Dosis konnte der Effekt soweit optimiert werden, dass die Zugabe von 400 μ M dAMP/dGMP wieder zu einer signifikanten Zunahme der mtDNA führte.

In den so behandelten Patientenmyotuben mit DGUOK-Defizienz wurde außerdem biochemisch die Aktivität der Cytochrom c Oxidase gemessen. In den unbehandelten Myotuben konnte, wie in den bisherigen Messungen weder bei den Patienten- noch bei den Kontrollzellen ein funktioneller Defekt detektiert werden. Allerdings kam es durch die Zugabe von Didanosin zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität sowohl in den Patienten- als auch in den Kontrollmyotuben. Dies lässt vermuten, dass durch die Zugabe des Wirkstoffs, der Schwellenwert unterschritten und somit ein funktioneller Defekt ausgelöst wurde. Die Abnahme der mtDNA war in den Patientenzellen stärker als in den Kontrollzellen, evtl. auf Grund des zusätzlichen Defekts durch die genetische Veränderung der Deoxyguanosinkinase. Durch Substitution von dAMP/dGMP konnte eine Verbesserung der Werte erzielt werden. Dabei erholten sich die Kontrollzellen schneller und erreichten annähernd das normale Niveau. Die Zugabe der beiden Nukleosidmonophosphate zu den Patientenzellen erzeugte eine Verdopplung der COX-Aktivität im Vergleich zu den Zellen, die nur mit Didanosin behandelt wurden. Es könnte sei, dass die Patientenzellen für einen weiteren Anstieg der COX-Aktivität eine längere Inkubation mit dAMP/dGMP benötigen, da sie nicht nur die durch Didanosin verursachte Depletion ausgleichen müssen, sondern auch den durch die Mutation im *DGUOK*-Gen verursachten genetischen Defekt neutralisieren müssen und sich aus diesem Grund nicht so schnell erholen können.

Obwohl die Messung der COX-Aktivität aus Mangel an primären Zellmaterial nur einmal durchgeführt werden konnte und die daraus gewonnenen Schlüsse nur eine mögliche Tendenz aufzeigen, lassen sich daraus evtl. neue, zukünftige Therapiestrategien des mtDNA-Depletionssyndroms ableiten, welche durch weiterführende Experimente überprüft werden sollten.

5.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, welches es ermöglicht, das mtDNA-Depletionssyndrom auf molekularer Ebene näher zu untersuchen. Es kann dazu benutzt werden, neue Therapieansätze zu entwickeln und deren Auswirkungen auf zellulärer sowie auf molekularer Ebene zu überprüfen. Dadurch könnte es in Zukunft möglich sein, die Lebensqualität der durch MDS betroffenen Kinder zu verbessern bzw. die Krankheitsprogression zu verzögern.

Ein erster Ansatz wurde durch die Substitution der Nukleosidmonophosphate gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass sie sich als Therapeutika anbieten, da sie durch physiologische Transportmechanismen problemlos in postmitotische Zellen gelangen und sie entweder einen positiven oder im schlimmsten Falle, keinen Effekt auf molekularer Ebene zeigten. Ihre – nur in sehr hohen Dosen vorhandenen - negativen Effekte auf die Zellen waren stets moderat. Natürlich muss ihr Einsatz in zukünftigen präklinischen Versuchen weiter überprüft und optimiert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Substitution der Nukleosidmonophosphate nicht nur zur Therapie von MDS eignet, sondern darüber hinaus auch möglicherweise zur Reduktion der Nebenwirkungen im Rahmen einer HIV-Therapie, die durch den Einsatz von nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) entstehen, anbietet.

Abschließend kann gesagt werden, dass das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Zellkulturmodell eine attraktive Möglichkeit darstellt, weitere Pathomechanismen des MDS aufzudecken und so gezielt zukünftige Therapiestrategien zu entwickeln.

D Literaturverzeichnis

Aguzzi, A., Heikenwalder, M. and Polymenidou, M. (2007) Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **8**, 552-561.

Alberio, S., Mineri, R., Tiranti, V. and Zeviani, M. (2007) Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion* **7**, 6-12.

Ashley, N., Adams, S., Slama, A., Zeviani, M., Suomalainen, A., Andreu, A. L., Naviaux, R. K. and Poulton, J. (2007) Defects in maintenance of mitochondrial DNA are associated with intramitochondrial nucleotide imbalances. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1400-1411.

Ashley, N., O'Rourke, A., Smith, C., Adams, S., Gowda, V., Zeviani, M., Brown, G. K., Fratter, C. and Poulton, J. (2008) Depletion of mitochondrial DNA in fibroblast cultures from patients with POLG1 mutations is a consequence of catalytic mutations. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2496-2506.

Bacia, K. and Schwille, P. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. (2003) *Methods* **29**, 74-85.

Bär, H., Strelkov, S. V., Sjoberg, G., Aebi, U., Herrmann, H. (2004) The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J. Struct. Biol.* **148**, 137-152.

Bär, H., Fischer, D., Goudeau, B., Kley, R. A., Clemen, C. S., Vicart, P., Herrmann, H., Vorgerd, M., Schröder, R. (2005) Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1251-1260.

Bär, H., Mucke, N., Kostareva, A., Sjoberg, G., Aebi, U., Herrmann, H. (2005) Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distinct stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15099-15104.

Bär, H., Mucke, N., Ringler, P., Muller, S. A., Kreplak, L., Katus, H. A., Aebi, U., Herrmann, H. (2006) Impact of disease mutations on the desmin filament assembly process. *J. Mol. Biol.* **360**, 1031-1042.

Bär, H., Goudeau, B., Walde, S., Casteras-Simon, M., Mucke, N., Shatunov, A., Goldberg, Y. P., Clarke, C., Holton, J. L., Eymard, B., Katus, H. A., Fardeau, M., Goldfarb, L., Vicart, P., Herrmann, H. (2007) Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. *Hum. Mutat.* **28**, 374-386.

Bentlage, H. A., Wendel, U., Schägger, H., ter Laak, H. J., Janssen, A. J., Trijbels, J. M. (1996) Lethal infantile mitochondrial disease with isolated complex I deficiency in fibroblasts but with combined complex I and IV deficiencies in muscle. *Neurology* **47**, 243-8.

Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 127-152.

Bertsch, U., Winklhofer, K. F., Hirschberger, T., Bieschke, J., Weber, P., Hartl, F. U., Tavan, P., Tatzelt, J., Kretzschmar, H. A., Giese, A. (2005) Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J. Virol.* **79**, 7785-7791.

Bieschke, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Poser, S., Eigen, M., Kretzschmar, H. (2000) Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5468-5473.

Blakely, E. L., He, L., Taylor, R. W., Chinnery, P. F., Lightowers, R. N., Schaefer, A. M. and Turnbull, D. M. (2004) Mitochondrial DNA deletion in "identical" twin brothers. *J. Med. Genet.* **41**, e19.

Bogenhausen, D. and Clayton, D. A. (1976) Thymidilate nucleotide supply for mitochondrial DNA synthesis in mouse L-cells. *J. Biol. Chem.* **251**, 2938-2944.

Bornstein, B., Area, E., Flanigan, K. M., Ganesh, J., Jayakar, P., Swoboda, K. J., Coku, J., Naini, A., Shanske, S., Tanji, K., Hirano, M. and DiMauro, S. (2008) Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 453-459.

Bourdon, A., Minai, L., Serre, V., Jais, J. P., Sarzi, E., Aubert, S., Chrétien, D., de Lonlay, P., Paquis-Flucklinger, V., Arakawa, H., Nakamura, Y., Munnich, A., Rötig, A. (2007) Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **39**, 776-780.

Bulst, S., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Müller-Ziermann, S., Koehler, U., Thirion, C., Walter, M. C., Stewart, J. D., Chinnery, P. F., Lochmüller, H., Horváth, R. (2009) *In vitro* supplementation with dAMP/dGMP leads to partial restoration of mtDNA levels in mitochondrial depletion syndroms. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1590-1599.

Capetanaki, Y. (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 339-348.

Carrozzo, R., Dionisi-Vici, C., Steuerwald, U., Luciola, S., Deodato, F., Di Giandomenico, S., Bertini, E., Franke, B., Kluijtmans, L. A., Meschini, M. C., Rizzo, C., Piemonte, F., Rodenburg, R., Santer, R., Santorelli, F. M., van Rooij, A., Vermunt-de Koning, D., Morava, E., Wevers, R. A. (2007) SUCLA2 mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness. *Brain* **130**, 862-874.

Dalakas, M. C., Park, K. Y., Semino-Mora, C., Lee, H. S., Sivakumar, K., Goldfarb, L. G. (2000) Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N. Engl. J. Med.* **342**, 770-80.

Desler, C., Munch-Petersen, B., Stevnsner, T., Matsui, S., Kulawiec, M., Singh, K. K. and Rasmussen, L. J. (2007) Mitochondria as determinant of nucleotide pools and chromosomal stability. *Mutat. Res.* **625**, 112-124.

Diaz, F., Bayona-Bafaluy, M. P., Rana, M., Mora, M., Hao, H. and Moraes, C. T. (2002) Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4626-4633.

Durham, S. E., Bonilla, E., Samuels, D. C., DiMauro, S. and Chinnery, P. F. (2005) Mitochondrial DNA copy number threshold in mtDNA depletion myopathy. *Neurology* **65**, 453-455.

Ehrenberg, M., Rigler, R. (1976) Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules. *Q Rev. Biophys.* **9**, 69-81.

Eigen, M., Rigler, R. (1994) Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5740-5747.

Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glinzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S. and Saada, A. (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 1081-1086.

Enríquez, J. A., Ramos, J., Pérez-Martos, A., López-Pérez, M. J. and Montoya, J. (1994) Highly efficient DNA synthesis in isolated mitochondria from rat liver. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1861-1865.

Evotec OAI. FCS + Plus Theory and Handling. (2001) 14-11-2001. Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Ferraro, P., Nicolosi, L., Bernardi, P., Reichard, P. and Bianchi, V. (2006) Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 18586-18591.

Ferrer, I., Olive, M. (2008) Molecular pathology of myofibrillar myopathies. *Expert. Rev. Mol. Med.* **10**:e25., e25.

Fischer, J. C., Ruitenbeek, W., Gabreels, F. J., Janssen, A. J., Renier, W. O., Sengers, R. C., Stadhouders, A. M., ter Laak, H. J., Trijbels, J. M. and Yeerkamp, J. H. (1986) A mitochondrial encephalomyopathy: the first case with an established defect at the level of coenzyme Q. *Eur. J. Pediatr.* **144**, 441-444.

Fischer, D., Clemen, C. S., Olivé, M., Ferrer, I., Goudeau, B., Roth, U., Badorf, P., Wattjes, M. B., Lutterbey, G., Kral, T., van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Vicart, P., Goldfarb, L. G., Moza, M., Carpen, O., Reichelt, J., Schröder, R. (2006) Different early pathogenesis in myotilinopathy compared to primary desminopathy. *Neuromuscul. Disord.* **16**, 361-367.

- Freisinger, P., Fütterer, N., Lankes, E., Gempel, K., Berger, T. M., Spalinger, J., Hoerbe, A., Schwantes, C., Lindner, M., Santer, R., Burdelski, M., Schaefer, H., Setzer, B., Walker, U. A., Horváth, R. (2006) Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome caused by deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations. *Arch. Neurol.* **63**, 1129-1134.
- Fuchs, E., Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 345-382.
- Gazziola, C., Ferraro, P., Moras, M., Reichard, P. and Bianchi, V. (2001) Cytosolic high K(m) 5'-nucleotidase and 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 6185-6190.
- Geisler, N., Kaufmann, E., Weber, K. (1982) Proteinchemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. *Cell.* **30**, 277-286.
- Giese, A., Bieschke, J., Eigen, M., Kretzschmar, H. A. (2000) Putting prions into focus: application of single molecule detection to diagnosis of prion diseases. *Arch. Virol. Suppl.* **16**, 161-171.
- Giese, A., Levin, J., Bertsch, J., Kretzschmar, H. (2004) Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1240-1246.
- Giese, A., Bader, B., Bieschke, J., Schaffar, G., Odoy, S., Kahle, P. J. Haass, C., Kretzschmar, H. (2005) Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 1202-1210.
- Goebel, H. H. (1995) Desmin-related neuromuscular disorders. *Muscle Nerve.* **18**, 1306-1320.
- Goldfarb, L. G., Vicart, P., Goebel, H. H., and Dalakas, M. C. (2004) Desmin myopathy. *Brain* **127**, 723-734.
- Haustein, E., Schwille, P. (2003) Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 153-166.
- Haustein, E., Schwille, P. (2007) Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 151-169.
- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N. O., Aebi, U. (1999) Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J. Mol. Biol.* **286**, 1403-1420.

- Herrmann, H., Strelkov, S. V., Feja, B., Rogers, K. R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D. A., Steinert, P. M., Burkhard, P., Aebi, U. (2000) The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *J. Mol. Biol.* **298**, 817-832.
- Herrmann, H., Aebi, U. (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 749-89.
- Hirano, M., Silvestri, G., Blake, D. M., Lombes, A., Minetti, C., Bonilla, E., Hays, A. P., Lovelace, R. E., Butler, T. E., et al. (1994) Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology.* **44**, 721-7
- Hirano, M. and Vu, T. H. (2000) Defects of intergenomic communication: where do we stand? *Brain Pathol.* **10**, 451-461.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* **77**, 51-59.
- Horvath, R., Hudson, G., Ferrari, G., Fütterer, N., Ahola, S., Lamantea, E., Prokisch, H., Lochmüller, H., McFarland, R., Ramesh, V., Klopstock, T., Freisinger, P., Salvi, F., Mayr, J. A., Santer, R., Tesarova, M., Zeman, J., Udd, B., Taylor, R. W., Turnbull, D., Hanna, M., Fialho, D., Suomalainen, A., Zeviani, M., Chinnery, P. F. (2006) Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* **129**, 1674-1684.
- Hübbers, C. U., Clemen, C. S., Kesper, K., Böddrich, A., Hofmann, A., Kämäräinen, O., Tolksdorf, K., Stumpf, M., Reichelt, J., Roth, U., Krause, S., Watts, G., Kimonis, V., Wattjes, M. P., Reimann, J., Thal, D. R., Biermann, K., Evert, B. O., Lochmüller, H., Wanker, E. E., Schoser, B. G., Noegel, A. A., Schröder, R. (2007) Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain* **130**, 381-93 .
- Janué, A., Odena, M. A., Oliveira, E., Olivé, M., Ferrer, I. (2007) Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 711-23.
- Karol, M. H. and Simpson, M. V. (1968) DNA biosynthesis by isolated mitochondria: A replicative rather than a repair process. *Science* **162**, 470-473.
- Kask, P., Palo, K., Ullmann, D., Gall, K. (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13756-13761.
- Kask, P., Palo, K., Brand, L., Mets, U., Ullmann, D., Jungmann, J., Pschorr, J., Gall, K. (2000) Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications. *Biophys. J.* **78**, 1703-1713.

Kley, R. A., Hellenbroich, Y., van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Huebner, A., Bruchertseifer, V., Peters, S. A., Heyer, C. M., Kirschner, J., Schröder, R., Fischer, D., Müller, K., Tolksdorf, K., Eger, K., Germing, A., Brodherr, T., Reum, C., Walter, M. C., Lochmüller, H., Ketelsen, U. P., Vorgerd, M. (2007) Clinical and morphological phenotype of filamen myopathy: a study of 31 German patients. *Brain* **130**,3250-3264.

Kohler, J. J. and Lewis, W. (2007) A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ. Mol. Mutagen* **48**, 166-72.

Koltermann, A., Kettling, U., Bieschke, J., Winkler, T., Eigen, M. (1998) Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: high throughput screening for enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1421-1426.

Konieczny, P., Wiche, G. (2008) Muscular integrity – a matter of interlinking distinct structures via plectin. In: The sarcomere and skeletal muscle disease, Laing, N., Editor. Landes Bioscience & Springer + Business

Kostka, M., Hogen, T., Danzer, K. M., Levin, J., Habeck, M., Wirth, A., Wagner, R., Glabe, C. G., Finger, S., Heinzlmann, U., Garidel, P., Duan, W., Ross, C. A., Kretzschmar, H., Giese, A. (2008) Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *J. Biol. Chem.* **283**, 10992-11003.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685.

Lascaratos, G, Ji, D, Wood, J. P. M., Osborne, N. N. (2007) Visible light affects mitochondrial function and induces neuronal death in retinal cell cultures. *Vision Research* **47**,1191-1201.

Leanza, L., Ferraro, P., Reichard, P. and Bianchi, V. (2008) Metabolic interrelations within guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance. *J. Biol. Chem.* **283**, 16437-16445.

Levin, J., Bertsch, U., Kretzschmar, H., Giese, A. (2005) Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 1200-1207.

Levin, J., Giese, A., Boetzel, K., Israel, L., Hogen, T., Nubling, G., Kretzschmar, H. and Lorenzl, S. (2009) Increased alpha-synuclein aggregation following limited cleavage by certain matrix metalloproteinases. *Exp.Neurol.* **215**, 201-208.

Li, Z. L., Lilienbaum, A., Butler-Browne, G. and Paulin, D. (1989) Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development. *Gene.* **78**, 243-254.

Löffler, G. and Petrides, P. E. (2003) Biochemie & Pathobiochemie. Springer-Verlag

Lund, K. C., Peterson, L. L., Wallace, K. B. (2007) Absence of a universal mechanism of mitochondrial toxicity by nucleoside analogs. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **51**, 2531-9.

Magde, D., Elson, E. L., Webb, W. W. (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* **13**, 29-61.

Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., Eriksson, S., Cohen, N. (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **29**, 337-341.

Mathews, C. K. and Song, S. (2007) Maintaining precursor pools for mitochondrial DNA replication. *FASEB J.* **21**, 2294-2303.

Meseth, U., Wohland, T., Rigler, R., Vogel, H. (1999) Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys. J.* **76**, 1619-1631.

Moraes, C. T., Shanske, S., Tritschler, H-J., Aprille, J. R., Andreetta, F., Bonilla, E., Schon, E. A. and DiMauro, S. (1991) MtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 492-501

Mucke, N., Wedig, T., Burer, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Langowski, J., Aebi, U., Herrmann, H. (2004) Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J. Mol. Biol.* **340**, 97-114.

Mullis, K. B. (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **48**, 579-82.

Naviaux, R. K. and Nguyen, K. V. (2004) POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mtDNA depletion. *Ann. Neurol.* **55**, 706-712.

Nishino, I., Spinazzola, A. and Hirano, M. (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* **283**, 689-692.

Opherk, C., During, M., Peters, N., Karpinska, A., Rosner, S., Schneider, E., Bader, B., Giese, A., Dichgans, M. (2009) CADASIL mutations enhance spontaneous multimerization of NOTCH3. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2761-7.

Oskoui, M., Davidzon, G., Pascual, J., Erazo, R., Gurgel-Giannetti, J., Krishna, S., Bonilla, E., De Vivo, D. C., Shanske, S., DiMauro, S. (2006) Clinical spectrum of mitochondrial depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch. Neurol.* **63**, 1122-6.

Ostergaard, E., Hansen, F. J., Sorensen, N., Duno, M., Vissing, J., Larsen, P. L., Faeroe, O., Thorgrimsson, S., Wibrand, F., Christensen, E. and Schwartz, M. (2007) Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain* **130**, 853-861.

Ostergaard, E., Christensen, E., Kristensen, E., Mogensen, B., Duno, M., Shoubridge, E. A, and Wibrand, F. (2007) Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 383-387.

Ostergaard, E., Schwartz, M., Batbayli, M., Christensen, E., Hjalmarson, O., Kollberg, G., Holme, E. (2009) A novel missense mutation in SUCLG1 associated with mitochondrial DNA Depletion, encephalomyopathie form, with methylmalonic aciduria. *Eur. J. Pediatr.*

Palo, K., Mets, U., Jager, S., Kask, P., Gall, K. (2000) Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophys. J.* **79**, 2858-2866.

Parry, D. A., Steinert, P. M. (1995) *Intermediate filament structure*. Springer, New York.

Paulin, D., Huet, A., Khanamirian, L., Xue, Z. (2004) Desminopathies in muscle disease. *J. Pathol.* **204**, 418-427.

Perng, M. D., Wen, S. F., van den Ijssel, P., Prescott, A. R., Quinlan, R. A. (2004) Desmin aggregate formation by R120G alphaB-crystallin is caused by altered filament interactions and is dependent upon network status in cells. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 2335-2346.

Pontarin, G., Gallinaro, L., Ferraro, P., Reichard, P. and Bianchi, V. (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 12159-12164.

Pontarin, G, Ferraro, P, Valentino, M. L., Hirano, M, Reichard, P, and Bianchi, V. (2006) Mitochondrial DNA Depletion and Thymidine Phosphate Pool Dynamics in a Cellular Model of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *J. Biol. Chem.* **281**, 22720 – 22728.

Pruszczyk, P., Kostera-Pruszczyk, A., Shatunov, A., Goudeau, B., Draminska, A., Takeda, K., Sambuughin, N., Vicart, P., Strelkov, S. V., Goldfarb, L. G., Kaminska, A. (2007) Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular conduction block resulting from a desmin mutation. *Int. J. Cardiol.* **117**, 244-253.

Rahman, S. and Poulton, J. (2009) Diagnosis of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Arch. Dis. Child.* **94**, 3-5.

Rampazzo, C., Ferraro, P., Pontarin, G., Fabris, S., Reichard, P. and Bianchi, V. (2004) Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation. *J. Biol. Chem.* **279**, 17019-17026.

- Rigler, R. (1995) Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. *J. Biotechnol.* **41**, 177-186.
- Rötig, A. and Poulton, J. (2009) Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S. and Elpeleg, O. (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat. Genet.* **29**, 342-344.
- Saada, A. (2008) Mitochondrial deoxyribonucleotide pools in deoxyguanosine kinase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **95**, 169-173.
- Saitoh, A., Haas, R. H., Naviaux, R. K., Salva, N. G., Wong, J. K., Spector, S. A. (2008) Impact of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on mitochondrial DNA and RNA in human skeletal muscle cells. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **52**, 2825-30.
- Sandrini, M. P. and Piskur, J. (2005) Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction. *Trends. Biochem. Sci.* **30**, 225-228.
- Sarzi, E., Bourdon, A., Chrétien, D., Zarhrate, M., Corcos, J., Slama, A., Cormier-Daire, V., de Lonlay, P., Munnich, A. and Rötig, A. (2007) Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J. Pediatr.* **150**, 531-534, 534.e1-6.
- Schessler, J., Zou, Y., McGrath, M. J., Cowling BS, Maiti B, Chin SS, Sewry C, Battini R, Hu Y, Cottle DL, Rosenblatt M, Spruce, L., Ganguly, A., Kirschner, J., Judkins, A. R., Golden, J.A., Goebel, H. H., Muntoni, F., Flanigan, K. M., Mitchell, C. A., Bönnemann, C. G. (2008) Proteomic identification of FHL 1 as the protein mutated in human reducing body myopathy. *J. Clin. Invest.* **118**, 904-912.
- Schröder, R., Kunz, W. S., Rouan, F., Pfendner, E., Tolksdorf, K., Kappes-Horn, K., Altenschmidt-Mehring, M., Knoblich, R., van der Ven, P. F., Reimann, J., Fürst, D. O., Blümcke, I., Vielhaber, S., Zillikens, D., Eming, S., Klockgether, T., Uitto, J., Wiche, G., Rolfs, A. (2002) Disorganization of the desmin cytoskeleton and mitochondrial dysfunction in plectin-related epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 520-530.
- Schröder, R., Goudeau, B., Simon, M. C., Fischer, D., Eggermann, T., Clemen, C. S., Li, Z., Reimann, J., Xue, Z., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., van der Ven, P. F., Fürst, D. O., Kunz, W. S., Vicart, P. (2003) On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 657-669.
- Schröder, R., Vrabie, A., Goebel, H. H. (2007) Primary desminopathies. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 416-426.

- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J., Rigler, R. (1997) Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* **72**, 1878-1886.
- Schwille, P., Bieschke, J., Oehlenschläger, F. (1997) Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys. Chem.* **66**, 211-228.
- Schwille, P. (1997) Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene. Technische Universität zu Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Selcen, D., Ohno, K., Engel, A. G. (2004) Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* **127**, 439-451.
- Seligman, A. M., Karnovsky, M. J., Wasserkrug, H. L. and Hanker, J. S. (1968) Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell. Biol.* **38**, 1-14.
- Shah, K. B., Inoue, Y. and Mehra, M. R. (2006) Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch. Intern. Med.*, **166**, 1805-1813.
- Small, J. V., Gimona, M. (1998) The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 341-348.
- Soto, C., Estrada, L. D. (2008) Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch. Neurol.*, **65**, 184-189.
- Spinazzola, A. and Zeviani, M. (2005) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signalling. *Gene* **354**, 162-168.
- Spinazzola, A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E., Carrara, F., D'Adamo, P., Calvo, S., Marsano, R. M., Donnini, C., Weiher, H., Strisciuglio, P., Parini, R., Sarzi, E., Chan, A., DiMauro, S., Rötig, A., Gasparini, P., Ferrero, I., Mootha, V. K., Tiranti, V., Zeviani, M. (2006) MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **38**, 570-575.
- Spinazzola, A., Marti, R., Nishino, I., Andreu, A. L., Naini, A., Tadesse, S., Pela, I., Zammarchi, E. A., Oliver, J. A. and Hirano, M. (2007) Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 4128-4133.
- Spinazzola, A., Invernizzi, F., Carrara, F., Lamantea, E., Donati, A., DiRocco, M., Giordano, I., Meznaric-Petrusa, M., Baruffini, E., Ferrero, I., Zeviani, M. (2009) Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 143-58.

Strach, K., Sommer, T., Grohe, C., Meyer, C., Fischer, D., Walter, M. C., Vorgerd, M., Reilich, P., Bär, H., Reimann, J., Reuner, U., Germing, A., Goebel, H. H., Lochmüller, H., Wintersperger, B. and Schröder, R. (2008) Clinical, genetic, and cardiac magnetic resonance imaging findings in primary desminopathies. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 475-482.

Sumption, N. D., Goodhead, D. T. and Anderson, R. M. (2006) No increase in radiation-induced chromosome aberration complexity detected by m-FISH after culture in the presence of 5'-bromodeoxyuridine. *Mutat. Res.* **594**, 30-38.

Taanman, J. W., Muddle, J. R. and Muntau, A. C. (2003) Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1839-1845.

Thomas, B., Beal, M. F. (2007) Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 16 Spec No. 2:R183-94., R183-R194.

Torres, S. M., Walker, D. M., Carter, M. M., Cook, D. L. Jr, McCash, C. L., Cordova, E. M., Olivero, O. A., Poirier, M. C. and Walker, V. E. (2007) Mutagenicity of zidovudine, lamivudine, and abacavir following in vitro exposure of human lymphoblastoid cells or in utero exposure of CD-1 mice to single agents or drug combinations. *Environ. Mol. Mutagen.* **48**, 224-238.

Walter, M. C., Reilich, P., Huebner, A., Fischer, D., Schröder, R., Vorgerd, M., Kress, W., Born, C., Schoser, B. G., Krause, K. H., Klutzny, U., Bulst, S., Frey, J. R., Lochmüller, H. (2007) Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. *Brain* **130**, 1485-1496.

Wang, J., Su, C., Neuhard, J. and Eriksson, S. (2000) Expression of human mitochondrial thymidine kinase in *Escherichia coli*: correlation between the enzymatic activity of pyrimidine nucleoside analogues and their inhibitory effect on bacterial growth. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 1583-1588.

Wang, L., Saada, A. and Eriksson, S. (2003) Kinetic properties of mutant human thymidine kinase 2 suggest a mechanism for mitochondrial DNA depletion myopathy. *J. Biol. Chem.* **278**, 6963-6968.

Weihl, C. C., Miller, S. E., Hanson, P. I., Pestronk, A. (2007) Transgenic expression of inclusion body myopathy associated mutant o97/VCP causes weakness and ubiquitinated protein inclusions in mice. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 919-928.

Winkler, T., Kettling, U., Koltermann, A., Eigen, M. (1999) Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1375-1378.

Wolschner, C., Giese, A., Kretzschmar, H. A., Huber, R., Moroder, L. and Budisa, N. (2009) Design of anti- and pro-aggregation variants to assess the effects of methionine oxidation in human prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **106**, 7756-7761.

Yankner, B. A., Lu, T. (2009) Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J.Biol.Chem.* **284**, 4755-4759.

E Anhang

1 Verzeichnis der verwendete Abkürzungen

APD	Avalanche-Photo-Dioden
AR	Axis Ratio
bp	Basenpaar/e
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CGH	comparative genomic hybridization
COX	Cytochrom c Oxidase
CPEO	chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie
CPP	(= counts per particle) mittlere Helligkeit der Partikel
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
DGUOK	Desoxyguanosinkinase
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid

FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FIDA	Fluorescence Intensity Distribution Analysis
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK	Human embryonic kidney
I_{tot}	Gesamtintensität der Probe (FCS)
IF	Intermediärfilamente
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOD	Logarithm of odds
MDS	Mitochondriales DNA Depletions Syndrom
MFM	Myofibrilläre Myopathien
min	Minuten
mM	Millimol
MNGIE	Mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie
mRNA	Boten (messenger)- Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
μM	Mikromol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
N	Partikelzahl
nDNA	nukleäre DNA
nm	Nanometer
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptions-Inhibitoren

PBS	Phosphate-buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
POLG	Polymerase gamma
OD	optische Dichte
q_x	spezifische Helligkeit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfar
SGM	Skeletal muscle growth Medium
SIFT	Scanning for Intensely Fluorescent Targets
SW 13	humane Nebennierenkarzinom-Zelllinie
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ttrip	Triplett-Zeit
TYMP	Thymidinphosphorylase
τ_{Diff}	Mittlere Diffusionszeit der Partikel in der FCS
ULF	unit-length-filaments
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

2 Danksagung

Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich möchte ich für die Möglichkeit zur Dissertation und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Friedrich-Baur-Institut herzlich danken.

Frau Priv.-Doz. Dr. Maggie Walter möchte ich sehr herzlich für die Möglichkeit bei ihr zu promovieren, die stets sehr gute und intensive Betreuung und für die ständige Bereitschaft sowohl über fachliche, als auch über so manche nicht-fachliche Themen zu reden und zu lachen danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Rita Horváth für die schöne Zusammenarbeit und ihr großes persönliches Engagement bei der Etablierung des Forschungsthemas „mitochondriales DNA-Depletionssyndrom“.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Hanns Lochmüller für seine fachliche Anleitung, sowie für seine Diskussionsbereitschaft in allen Fragen danken.

Besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Dr. Sabine Krause und Herrn Dr. Christian Thirion für ihre äußerst kompetente Hilfe und für ihre Ideen und Anregungen während meiner gesamten Doktorarbeit aussprechen.

Herrn Dr. Johannes Levin und Herrn Prof. Dr. Armin Giese möchte ich ganz herzlich für ihren Einsatz und ihre zahlreichen Ideen in Fragestellungen der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie bedanken, die zu einer sehr angenehmen und produktiven Zusammenarbeit führten.

Für die Hilfe und Mitarbeit bei Teilprojekten dieser Arbeit möchte ich mich bei Solvig Müller-Ziermann, Ira Kaus, Felix Schmidt und Maria Schmuck ganz herzlich bedanken.

Herrn Dr. Rolf Stucka danke ich für die Hilfe bei kniffligen molekularbiologische Fragestellungen.

Allen anderen, aktuellen und früheren Kollegen der AG Lochmüller, Cordula Pertl, Mandy Heiliger, Dr. Juliane Müller, Ursula Klutzny, Dr. Sarah Baumeister, Marina Dusl und Tina

Zils möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die schöne Zusammenarbeit danken.

Zum Schluss möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen, mich ganz herzlich bei denjenigen Menschen zu bedanken, die mich außerhalb des Instituts unterstützt haben – meinem Freund, meinen Freunden und ganz besonders meinen Eltern, die durch ihre stete Unterstützung meine Ausbildung ermöglicht haben.

3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Bulst
Geburtsdatum: 03.12.1979
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Adresse: Ohlmüllerstr. 8
81541 München

Ausbildung

1986 – 1990 Grundschule Perlach
1990 – 1999 Heinrich-Heine-Gymnasium
1999 Abitur
2000 – 2006 Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität,
München
2002 1. Pharmazeutisches Staatsexamen
2005 2. Pharmazeutisches Staatsexamen
2006 3. Pharmazeutisches Staatsexamen
2005 – 2006 Praktisches Jahr:
1. Hälfte: Mariahilf-Apotheke, München
2. Hälfte: Institut für Rechtsmedizin der LMU, München

Praktika

Aug. 2000 – Sept. 2000 Isabella-Apotheke, München
Juli 2002 Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften, LMU,
München

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit Okt. 2006 Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hanns
Lochmüller, Friedrich-Baur-Institut, Neurologische Klinik und
Poliklinik, LMU, München

Veröffentlichungen

Bulst, S.*, Levin, J.*, Thirion, C., Schmidt, F., Bötzel, K., Krause, S., Pertl, C., Kretzschmar, H., Walter, M. C., Giese, A., Lochmüller, H. Divergent molecular effects of desmin mutations on protein assembly in myofibrillar myopathy. *JNEN*, in press.

*equal contribution

Stewart, J. D., Horváth, R., Ferrara, I., **Bulst, S.**, Watkins, P. B., Fontana, R. J., Day, C. P., Chinnery, P. F. Brief Report: *POLG* genetic variants increased the risk of sodium valproate induced liver injury and failure. *NEJM*, submitted.

Walter, M.C., Czermin, B., Müller-Ziermann, S., **Bulst, S.**, Stewart, J., Hudson, G., Schneiderat, P., Abicht, A., Lochmüller, H., Chinnery, P. F., Klopstock, T., Horváth, R. Late-onset PEO and proximal myopathy in a patient with mutations in *POLG2*. *J Med Genet*, submitted.

Giacomotto, J., Pertl, C., Borrel, C., Walter, M. C., **Bulst, S.**, Johnsen, B., Baillie, D. L., Lochmüller, H., Thirion, C., Ségalat, L. (2009) Evaluation of the therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors in two animal models of dystrophin deficient muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4089-101.

Bulst, S., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Müller-Ziermann, S., Koehler, U., Thirion, C., Walter, M. C., Stewart, J. D., Chinnery, P. F., Lochmüller, H., Horváth, R. (2009) *In vitro* supplementation with dAMP/dGMP leads to partial restoration of mtDNA levels in mitochondrial depletion syndroms. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1590-1599.

Walter, M. C., Reilich, P., Huebner, A., Fischer, D., Schröder, R., Vorgerd, M., Kress, W., Born, C., Schoser, B. G., Krause, K. H., Klutzny, U., **Bulst, S.**, Frey, J. R., Lochmüller, H. (2007) Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. *Brain* **130**, 1485-1496.

Poster

Bulst, S., Abicht, A., Thirion, C., Lochmüller, H., Horváth, R.

Supplementation studies with dAMP/dGMP in primary human muscle cells of patients with mitochondrial DNA depletion caused by mutations in the *DGUOK* and *POLG1* genes.

53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung, 26.03. – 28.03.2009 München, Deutschland.

Bulst, S., Abicht, A., Thirion, C., Lochmüller, H., Horváth, R.

Supplementation studies with dAMP/dGMP in primary human muscle cells of patients with mitochondrial DNA depletion caused by mutations in the *DGUOK* and *POLG1* genes.

19. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e. V. (DGM), 04.03. – 07.03.2009 Darmstadt, Deutschland.

Bulst, S., Abicht, A., Thirion, C., Lochmüller, H., Horváth, R.

Supplementation studies with dAMP/dGMP in primary human muscle cells of patients with mitochondrial DNA depletion caused by mutations in the *DGUOK* and *POLG1* genes.

13th International Congress of the World Muscle Society (WMS), 29.09. – 02.10.2008 Newcastle-Gateshead, UK

4 Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....

(Stefanie Bulst)

Dissertation eingereicht am:.....