

Charakterisierung der Atmungsketten-Enzyme NADH-CoQ-Reduktase
und Cytochrom-C-Oxidase in verschiedenen humanen Geweben und
Darstellung ihrer Bedeutung bei Defekten

Jana Susann Elle
2005

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Charakterisierung der Atmungsketten-Enzyme NADH-CoQ-
Reduktase und Cytochrom-C-Oxidase in verschiedenen humanen
Geweben und Darstellung ihrer Bedeutung bei Defekten**

Dissertation

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

Vorgelegt von
Jana Susann Elle
aus Hoyerswerda

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Y. S. Shin
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. S. Werner
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	03.03.2005

Mein besonderer und herzlicher Dank im Rahmen der Entstehung dieser Arbeit gilt:

Frau Prof. Dr. Y. S. Shin, die durch ihre fortwährende Unterstützung und ihre fördernde und freundliche Betreuung und Hilfe diese Experimente erst ermöglichte.

Herrn Franz Jansen und **Herrn Jan Tausendfreund**, für die Einführung in die biochemische Laborarbeit und für das zur Seite Stehen mit viel Geduld und ausgesprochener Hilfsbereitschaft.

Herrn Zaheer Abbas, für die stetigen Aufmunterungen und der moralischen Unterstützung, sowie das mühevoll Korrekturlesen und den vielen hilfreichen Tipps im Umgang mit der Datenverarbeitung und den verschiedenen Anwendungen.

Gewidmet in großer Dankbarkeit und Liebe

meinen Eltern Werner Elle und Elke Elle
meiner wunderbaren Großmutter Elfriede Richter
und meinem Partner Zaheer Abbas

Einleitung	1
1.1 Biochemischer Hintergrund – Die Atmungskette	1
1.1.1 Komplex I: NADH-Coenzym-Q-Reduktase	3
1.1.2 Komplex II: Succinat-Coenzym-Q-Reduktase	3
1.1.3 Komplex III: Coenzym-QH ₂ -Cytochrom-C-Reduktase	4
1.1.4 Komplex IV: Cytochrom-C-Oxidase	5
1.1.5 Trägermoleküle: Coenzym Q (Ubichinon) und Cytochrom C	8
1.2 Die humane mitochondriale DNA und deren Bedeutung für die Atmungskette	10
1.2.1 Die mitochondriale Replikation, Transkription und Translation	12
1.2.2 Import von kernkodierten Proteinen in das Mitochondrium	13
1.2.3 Die mitochondriale Vererbung	14
1.2.4 Somatische und germinale mtDNA-Mutationen	16
1.3 Pathomechanismus und Klinik defekter Atmungskettenenzymfunktion	18
1.3.1 Neurodegenerative Erkrankungen	22
1.3.2 Myopathien	23
1.3.3 Alterungsprozess und oxidativer Stress	25
1.4 Diagnostik und differentialdiagnostische Überlegungen	26
1.4.1 Pränatale Diagnostik	27
1.5 Therapeutische Möglichkeiten	28
2. Ziel der Arbeit	29

3. Materialien	30
3.1 Gewebeproben	30
3.1.1 Präparation der Proben	30
3.2 Chemikalien	31
3.3 Geräte und Hilfsmittel	32
4. Methoden	33
4.1 Zellkultur	33
4.1.1 Anlegen einer Zellkultur aus Biopsien	33
4.1.2 Splitten der Zellkultur	34
4.2 Proteinbestimmung	35
4.3 Bestimmung der Aktivität von NADH-CoQ-Reduktase (Komplex I)	36
4.3.1 Reagenzien	36
4.3.2 Hilfslösung	37
4.3.3 Durchführung der Aktivitätsmessung	37
4.3.4 Berechnung der Aktivität	37
4.4 Bestimmung der Aktivität von Cytochrom-C- Oxidase (Komplex IV)	38
4.4.1 Reagenzien und Herstellung von reduzierten Cytochrom C	38
4.4.2 Testansatz und Messung der Aktivität	38
4.4.3 Berechnung der Aktivität	38

5. Ergebnisse	39
5.1 Enzymanalyse der NADH-CoQ-Reduktase	39
5.1.1 Aktivität	39
5.1.2 Proteinkonzentrationsabhängigkeit	39
5.1.3 Stabilität	40
5.1.4 Inkubationszeitabhängigkeit	42
5.1.5 Enzymkinetik	43
5.1.5.1 Affinität zum CoSubstrat Ubichinon	43
5.1.5.2 Affinität zum Substrat NADH	45
5.1.6 Patienten	47
5.1.6.1 Patient I.C	47
5.1.6.2 Patient A.K	48
5.2 Enzymanalyse der Cytochrom-C-Oxidase	48
5.2.1 Normwerte	48
5.2.2 Proteinkonzentrationsabhängigkeit	49
5.2.3 Stabilität	49
5.2.4 Enzymkinetik	51
5.2.5 Patientin J.M.	55
6. Diskussion	56
6.1 Methode	56
6.2 Beurteilung der Ergebnisse	58
6.2.1 Normwerte	58
6.2.2 Enzymkinetik	59
6.3 Patienten	60
7. Zusammenfassung	62
Bibliographie	63
Lebenslauf	74

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CoQ	Ubichinon = Coenzym Q
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CPEO	Chronic Progressive External Ophthalmoplegia
CSF	Colony Stimulating Factor
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
FeS	Eisenschwefel-Cluster
KSS	Kearns-Sayre-Syndrome
Leigh Syndrom	Subacute necrotizing encephalomyelopathy
LHON	Leber´s Hereditary Optic Neuropathy
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Seizures
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
MNGIE	Myo-Neuro-Gastrointestinal Encephalopathy
mtDNA	mitochondrialen DNA
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NARP	Neurogenic weakness Ataxis Retinitis Pigmentosa
nDNA	cytosolische DNA
RRF	Ragged Red Fibres
SDH	Succinatdehydrogenase

Abbildungen

Nr.	Titel	Seite
1	Die mitochondriale Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung	2
2	Der Q-Zyklus	4
3	Aufbau des Cytochrom-C-Oxidase-Komplex und Elektronen- und Protonenfluss	6
4	Das Cytochrom-C- Molekül	8
5	Formen des Ubichinons	9
6	Die menschliche mtDNA-Mappe	11
7	Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Lowry et al.	35
8	Proteinkonzentrationsabhängigkeit im Muskelgewebe, in kultivierten Fibroblasten & Chorionzotten	40
9	Inkubationszeitabhängigkeit der NADH-CoQ-Reduktase im Muskelgewebe	42
10	Inkubationszeitabhängigkeit der NADH-CoQ-Reduktase in Fibroblasten	43
11	Lineweaver-Burk-Diagramm für die Komplex-I-Kinetik bei variabler Ubichinonkonzentration im Muskelgewebe, Fibroblasten und Chorionzotten	44
12	Lineweaver-Burk-Diagramm für die NADH-CoQ-Reduktase-Kinetik bei variabler NADH-Konzentration im Muskelgewebe, Fibroblasten und Chorionzotten	46
13	Proteinkonzentrationsabhängigkeit im Muskelgewebe, kultivierten Fibroblasten & Chorionzotten	49
14	Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik von COX im Muskelgewebe	52
15	Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik von COX in kultivierten Chorionzotten & Fibroblasten	53

Tabellen

Nr.	Titel	Seite
1	Masse und Prothetische Gruppen der mitochondrialen Elektronentransportkette	1
2	Nomenklatur der 13 COX-Untereinheiten nach Kadenbach et al.	6
3	Anzahl und Kodierung der Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung	10
4	Mögliche Symptome verschiedener Organsysteme bei defekter Atmungskette	19
5	Klinische Symptome & Syndrome assoziiert mit spezifischem Komplex-Defekten	21
6	Veröffentlichungen mit photometrischen Enzym-Assays für die einzelnen Atmungskettenkomplexe	26
7	Aktivität der NADH-CoQ-Reduktase gemessen im Muskelgewebe, in kultivierten Fibroblasten und kultivierten Chorionzotten	39
8a	Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Muskelgewebshomogenisat A (Poteinkonzentration: 2,04 mg/ml) mit 250 μ M NADH	41
8b	Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Muskelgewebshomogenisat B (Poteinkonzentration: 2,05 mg/ml) 200 μ M NADH mit 200 μ M NADH	41
9a	Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Fibroblastenhomogenisat A (Poteinkonzentration: 5,27 mg/ml) mit 200 μ M NADH	41
9b	Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Fibroblastenhomogenisat B (Poteinkonzentration: 4,02 mg/ml) mit 200 μ M NADH	41
10	Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Chorionzottenhomogenisat (Poteinkonzentration: 2,19 mg/ml) mit 250 μ M NADH	41
11a	NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung im Muskelgewebe in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ubichinon-Konzentrationen	43
11b	NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Fibroblasten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ubichinon-Konzentrationen	44
11c	NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Chorionzotten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ubichinon-Konzentrationen	44
12a	NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung im Muskelgewebe in Abhängigkeit von unterschiedlichen NADH-Konzentrationen	45

Tabellen

12b	NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Fibroblasten in Abhängigkeit von unterschiedlichen NADH-Konzentrationen	45
12c	NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Chorionzotten in Abhängigkeit von unterschiedlichen NADH-Konzentrationen	46
13	Normalwerte von COX mit Mittelwert und Standardabweichung im Muskelgewebe, in kultivierten Fibroblasten und Chorionzotten	48
14a	Stabilität von COX im Muskelgewebssonifikats (Poteinkonzentration: 0,62 mg/ml)	50
14b	Stabilität von COX im Fibroblastensonifikat (Poteinkonzentration: 1,40 mg/ml)	50
14c	Stabilität von COX im Chorionzottensonifikat (Poteinkonzentration: 2,1 mg/ml)	50
15	Stabilität von COX in der Muskelbiopsie nach längerer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	51
16a	COX-Aktivitätsveränderung im Muskel I in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytochrom-C-Konzentrationen	51
16b	COX-Aktivitätsveränderung im Muskel II in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytochrom-C-Konzentrationen	51
17	COX-Aktivitätsveränderung in kultivierten Fibroblasten und Chorionzotten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytochrom c Konzentrationen	52

1.1 Biochemischer Hintergrund – Die Atmungskette

Die Energiebereitstellung einer Zelle vollzieht sich innerhalb der Mitochondrien durch den Elektronentransfer entlang der Atmungskette mit dem Ziel der oxidativen Phosphorylierung. Das Mitochondrium wird deshalb auch als das Kraftwerk der Zelle bezeichnet. An diesem Prozess sind fünf Protein-Lipid-Enzym-Komplexe beteiligt, die sich in der inneren Mitochondrienmembran befinden:

- NADH-CoQ-Reduktase (Komplex I),
- Succinat-CoQ-Reduktase (Komplex II),
- CoQH₂-Cytochrom C-Reduktase (Komplex III),
- Cytochrom C-Oxidase (Komplex IV),
- ATP-Synthase (Komplex V).

Die Atmungskette setzt sich definitionsgemäß aus den ersten vier ortsgebundenen Komplexen und den Transportmolekülen Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom C zusammen (32). Die Komplexe kommen in einem bestimmten Verhältnis zueinander vor. Auf einen NADH-CoQ-Reduktase-Komplex folgen etwa drei CoQH₂-Cytochrom-C-Reduktase- und sieben Cytochrom-C-Oxidase-Komplexe (32 S.1017). Innerhalb der Enzymkomplexe fließen die Elektronen über prosthetische Gruppen. Dabei handelt es sich um quinoide Verbindungen (FMN, FAD) oder Metallkomplexe (Eisensulfurcluster, Hämmoleküle, proteingebundenes Kupfer), die fest in den Enzymkomplexen gebunden sind. Tabelle 1 zeigt ihre Zugehörigkeit zu den jeweiligen Atmungskettenenzymkomplexen.

Tabelle 1: Masse und Prosthetische Gruppen der mitochondrialen Elektronentransportkette

Enzymkomplex	Masse (dalton)	Prosthetische Gruppen
NADH-CoQ-Reduktase	85.000	FMN, FeS
Succinat-CoQ-Reduktase	97.000	FAD, FeS, Häm b ₅₆₀
CoQH ₂ -Cytochrom C-Reduktase	280.000	FeS, Häm b ₅₆₂ , Häm b ₅₆₆ , Häm c ₁ ,
Cytochrom C-Oxidase	200.000	Häm a, Häm a ₃ , Cu _A ⁺ , Cu _B ⁺

Quellen: J. W. De Pierre and L. Ernster, Ann. Rev. Biochem. 46 : 201 1977.; (22)
Hafeti Y, Ann. Rev. Biochem. 54: 1017, 1985. (37)

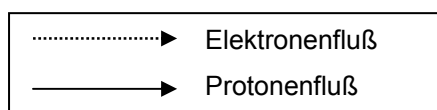
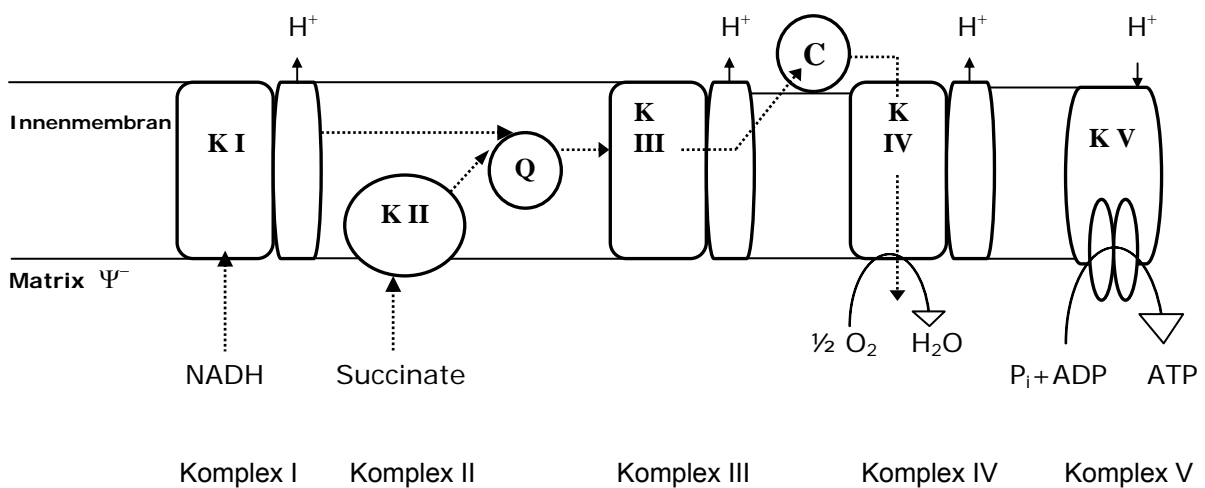
An drei Stellen der Atmungskette (Komplexe I, III, IV) ist der mitochondriale Intermembranraum mit der Mitochondrienmatrix verbunden - wie in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt. Hier wird die oxidative Energie konserviert, indem Protonen in Richtung Intermembranraum gepumpt werden. Ein elektrochemisches Protonen-Membranpotential entsteht. Dieses gibt dann den Antrieb für den Protonenrückfluss durch den Komplex V in die negativ geladene mitochondriale Matrix. Die dabei freigesetzte Energie wird für die Synthese von ATP genutzt. Pro oxidiertem Molekül NADH entstehen drei Moleküle ATP. Beim Eintritt von Succinat in die Atmungskette werden nur zwei ATP-Moleküle erzeugt.

Abbildung 1: Die mitochondriale Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung

Cytosol

Außenmembran

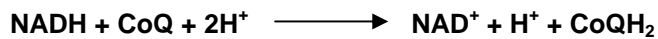
Intermembranraum Ψ^+



- NADH** reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
- K I** Komplex I (NADH-Coenzym-Q-Reduktase)
- K II** Komplex II (Succinat-Coenzym-Q-Reduktase)
- K III** Komplex III (Coenzym-QH₂-Cytochrom-C-Reduktase)
- K IV** Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase)
- K V** Komplex V (ATP-Synthase)

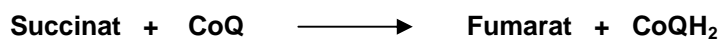
- ADP** Adenosindiphosphat
- ATP** Adenosintriphosphat
- Pi** anorganisches Phosphat
- Q** Ubichinon = Coenzym Q
- Ψ** Membranpotential
- C** Cytochrom C

1.1.1 Komplex I: NADH-Coenzym-Q-Reduktase



Der Enzymkomplex wurde erstmalig 1961 aus bovinen Herzmuskelmitochondrien isoliert (34, 35). Er setzt sich aus 42 verschiedenen Polypeptiduntereinheiten zusammen, wovon sieben mitochondrial kodiert werden. Der Multiproteinkomplex NADH-Coenzym-Q-Reduktase überträgt Elektronen von NADH auf Ubichinon. Gleichzeitig wird NADH zu NAD^+ oxidiert. Dabei fließen die Elektronen zunächst von NADH zu den prosthetischen Gruppen FMN und anschließend zum Eisenschwefel-Cluster. Beim Transport eines Elektronenpaares von einem NADH-Molekül auf ein Molekül CoQ werden durch den Komplex I vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Diese Protonentranslokation wird gehemmt durch Annytal, Rotenon, Piericidin A, Barbiturate, Demerol und Quecksilber.

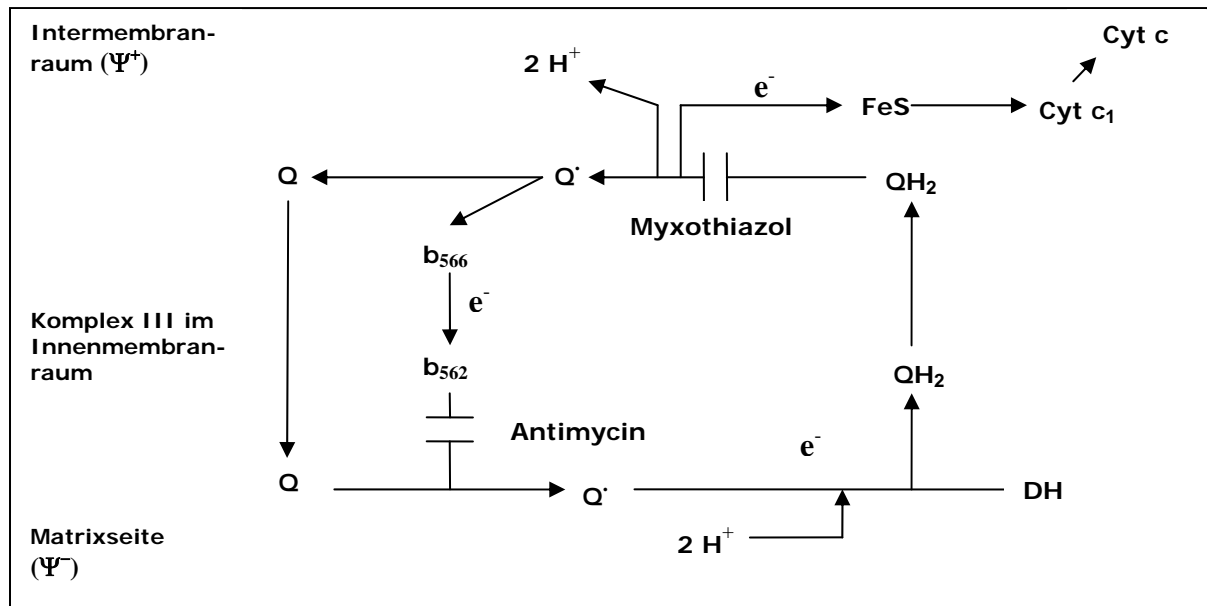
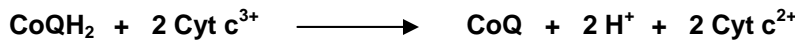
1.1.2 Komplex II: Succinat-Coenzym-Q-Reduktase



Komplex II lässt sich in vier Polypeptiduntereinheiten zerlegen, die allesamt cytoribosomale Produkte sind. Hauptkomponente dieses Komplexes ist die Succinatdehydrogenase, welche in allen aeroben Organismen als ein membrangebundenes Enzym im Citrats-Zyklus vorkommt. Sie wurde bereits 1909 entdeckt und erstmals 1950 aus Mitochondrien eines Pferde-Herzmuskels extrahiert (64). Weitere Komponenten des Komplexes II sind die prosthetischen Gruppen FAD, FeS und Cytochrom b_{560} . Von ihnen werden die bei der Oxidierung von Succinat zu Fumarat freiwerdenden Elektronen übernommen und schließlich auf CoQ unter Bildung von CoQH_2 übertragen.

Für laborchemische Untersuchungen ist von Bedeutung, dass isolierte SDH nicht mit CoQ reagiert, jedoch mit Ferricyanid oder Phenazinmethosulfat (PMS). Unter aeroben Bedingungen verschlechtert sich außerdem die Aktivität isolierter SDH sehr schnell. Nur die membrangebundene SDH zeigt eine stabile Aktivität (32, S. 1024). Der Elektronentransport durch die Succinat-Coenzym-Q-Reduktase ist nicht mit einem Protonentransport gekoppelt. Dadurch entsteht ein ATP weniger als bei Komplex I. Die Q-Reduktase-Aktivität des Komplexes II wird durch 2-Thenoyltrifluoroaceton gehemmt. Die SDH-Komponente wird durch Ethoxyformylanhydrid und Dansylchlorid inhibiert und kann durch Substrate und kompetitive Hemmer aufgehoben werden.

1.1.3 Komplex III: Coenzym-QH₂-Cytochrom-C-Reduktase



- | | | | |
|-----------|-----------------------|---|--|
| Q | Ubichinon = Coenzym Q | DH | Dehydrogenase |
| Q• | Ubisemichinon | b₅₆₆,
b₅₆₂ | Cytochrome b ₅₆₆ , b ₅₆₂ |

Abbildung 2: Der Q-Zyklus

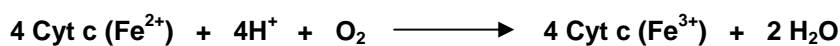
Die durch Komplex I und II entstandene reduzierte Form des Ubichinons, Dihydroubichinon (CoQH₂), gibt nun unter Katalysierung durch Komplex III seine Elektronen auf das Cytochrom C ab. Die Coenzym-QH₂-Cytochrom-C-Reduktase setzt sich aus 11 Untereinheiten zusammen, wovon das Peptid für die Cytochrom-b-Untereinheit mtDNA-kodiert ist. Als prosthetische Gruppen lassen sich Häm b₅₆₂, Häm b₅₆₆, Häm c₁ und FeS nachweisen.

Die zwei Cytochrome mit den Hämen b₅₆₆ und b₅₆₂ sind senkrecht zur Membran gelegen: mit b₅₆₆ nah zur zytosolischen Seite und b₅₆₂ nah der Matrix-Seite. Durch Komplex III werden pro Elektron zwei Protonen transportiert, also vier pro Elektronenpaar. Da CoQ eine Schlüsselrolle bei diesem Prozess spielt, bezeichnet man ihn auch als Q-Zyklus. Dieser wurde erstmals 1976 von Mitchell (61) beschrieben und zeigt einen möglichen Mechanismus der gekoppelten Elektronenübertragung mit dem Protonentransport auf.

Dabei wird der Komplex III als ein System mit einem Redoxzentrum hoher Spannung (entspricht dem FeS-Protein und dem Cytochrom C₁) und einem Redoxzentrum niedriger Spannung (Cytochrom b₅₆₆ und b₅₆₂) verstanden. Wie in Abbildung 2 dargestellt, pendelt CoQ während dieses Vorgangs zwischen dem reduzierten und dem oxidierten Zustand. Ubichinon gibt dabei ein Elektron ab an das hoch-potentielle Zentrum (e⁻ → FeS-Protein → c₁) und ein weiteres an das niedrig-potentielle Redoxzentrum (e⁻ → b₅₆₆ → b₅₆₂).

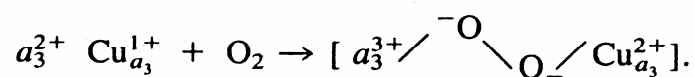
Die Reduktion am Redoxzentrum hoher Spannung wird gehemmt durch Myxothialzol und 2,3-Dimercaptopropanol, indem sie das FeS-Zentrum zerstören. Die Abgabe von einem Elektron aus CoQH_2 wird begleitet von vektorieller Protonenfreisetzung an der zytosolischen Seite. Dadurch entsteht ein Ubisemichinon, das ein sehr starkes Reduktionsmittel für das niedrigpotentielle Zentrum ist. Das nun über die Cytochrome auf den zur Matrix zugewandten Teil des Komplexes übertragene Elektron wird dann zurückgegeben an Ubichinon. Diese Reaktion wird gehemmt durch Antimycin A.

1.1.4 Komplex IV: Cytochrom-C-Oxidase (COX)



Die Cytochrom-C-Oxidase katalysiert den terminalen Schritt der Atmungskette, d.h. die Vier-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff durch den Einzelelektronendonator Cytochrom C. Das Enzym ist aus zwei verschiedenen Redoxzentren mit einem Spannungsunterschied von 100mV aufgebaut (32). Diese Redoxzentren setzen sich aus zwei identischen Häm-Molekülen a zusammen, wobei jedes mit einem Kupferatom assoziiert ist. Die zwei Häm-Moleküle werden als a und a₃ bezeichnet und die dazugehörigen Kupferatome als Cu_a (CuA) und Cu_{a3} (CuB). COX übernimmt die Elektronen einzeln von vier Molekülen reduziertem Cytochrom C.

Dabei ist die Reihenfolge des Elektronenflusses innerhalb des COX-Moleküls genau festgelegt (wie in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt). Das reduzierte Cytochrom C bindet an der CuA-Stelle und überträgt zwei Elektronen zuerst zur Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ und anschließend zur Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} im Häm-a-Molekül. Danach wandern die Elektronen auf das Häm-a₃-Cu_{a3}-Paar, das Redoxzentrum mit der O₂-Bindungsstelle. Hier erfolgt die Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff. Es entsteht als flüchtiges Zwischenprodukt ein Peroxid-Komplex:



Verließe diese Verbindung das Reduktionszentrum, würde sie in der Zelle toxisch wirken – tatsächlich löst es sich nur selten aus dem Komplex. Die Reaktion wird beendet mit dem Transfer von zwei weiteren Elektronen und vier Protonen auf das Sauerstoff-Molekül. Es entstehen zwei H₂O-Moleküle.

Der Elektronentransfer vom Cytochrom C zum Häm a oder Cu_A vollzieht sich sehr schnell. Der geschwindigkeitslimitierende Schritt innerhalb des COX-Enzym ist der Elektronentransport zwischen dem Häm a-Cu_A-Paar und dem Häm a₃-Cu_B-Zentrum (15).

Der Elektronentransport des Komplexes IV wird gehemmt durch HCN, H₂S und durch Kohlenmonoxid. Beim Transport eines Elektronenpaares durch den Oxidase-Komplex werden nur jeweils zwei Protonen über die mitochondriale Innenmembran transportiert.

Der stabile und membrangebundene Zustand der Oxidase ist die Dimer-Form (89, 76). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der monomere Komplex genauso aktiv ist bezüglich des Elektronentransfers wie die Dimerform (30, 77). Im Gegensatz dazu scheint die Protonenpumpaktivität des Enzyms eine Funktion des Dimers zu sein, sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten (3, 28). Die Bindung von Cytochrom C verändert die Konformation des gesamten COX-Komplexes. Die größten Strukturveränderungen erscheinen während der Reduktion von Häm a und Cu_A⁺, indem die Sauerstoffbindungsseite von einer geschlossenen zu einer offenen Konformation konvertiert.

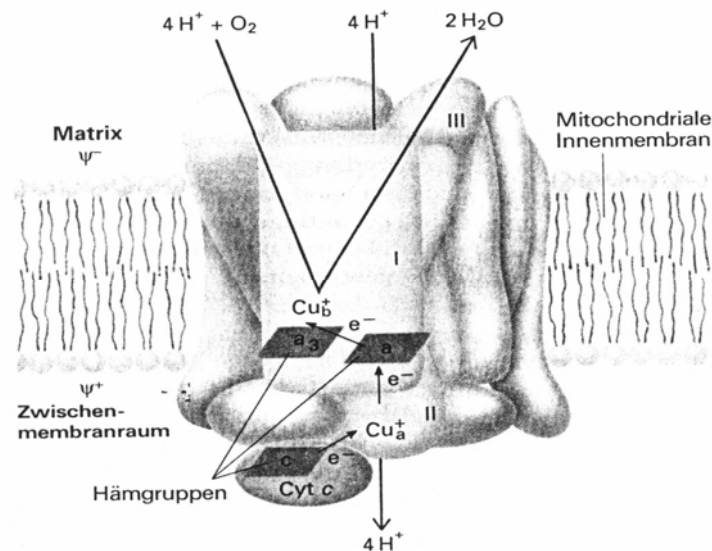


Abbildung 3: Aufbau des Cytochrom-C-Oxidase-Komplex und Elektronen- und Protonenfluss

<p>COX-Untereinheiten</p> <p>I, II, III, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII</p>
--

Tabelle 2: Nomenklatur der 13 COX-Untereinheiten nach Kadenbach et al.

COX setzt sich aus 13 Untereinheiten zusammen. Die am häufigsten benutzte Nomenklatur der COX-Untereinheiten ist die von Kadenbach et al. (44) (Tabelle 2). Die drei größten Untereinheiten (I, II, III) werden mitochondrial kodiert. Diese sind homolog zu den drei einzigen Untereinheiten des bakteriellen aa₃-Typ-COX-Komplexes. Sie bilden den katalytisch aktiven Teil des Enzyms.

Der metallische Co-Faktor Cu_A^+ ist in der Untereinheit II gelegen, der Bindungsstelle für das reduzierte Cytochrom C. Dies entspricht der hochaffinen Bindungsstelle des COX-Komplexes, während das Enzym auch noch ein zweites Molekül Cytochrom C an einer niedrigaffinen Seite binden kann. Den Rest der prosthetischen Gruppen (Häm a, Häm a_3 , Cu_B^+) trägt die Untereinheit I (59) (Abb. 3). Die COX-Untereinheit-III enthält keine prosthetischen Gruppen (32). Ihre Funktion ist nicht klar. Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) reagiert mit der COX-Untereinheit III und hemmt die Protonenpumpaktivität bis zu 80% (17, 72). Es wird daher vermutet, dass die Untereinheit III am Protonenkanal beteiligt ist. In Anlehnung an Studien von COX des *Paracoccus denitrificans* vermutet man die Funktion dieser Untereinheit auch beim Zusammenbau des Holoenzym (36, 101).

Die zytosolisch kodierten COX-Untereinheiten werden im Cytoplasma synthetisiert und über NH_2 -Endgruppen (mit Ausnahme von Untereinheit VIII) in die Mitochondrien transportiert. Viele der nukleär kodierten Untereinheiten haben zwei oder mehr Isoformen. So sind für die Untereinheiten VIa, VIIa und VIII gewebespezifische Isoformen bekannt (22, 46, 21, 97). Die Sequenzhomologie zwischen den gleichen Isoformen in verschiedenen Säugetieren ist größer als die zwischen verschiedenen Isoformen gleicher Spezies (15, S. 381). Daher wird angenommen, dass evolutionärer Druck zur Erhaltung von Eigenschaften der verschiedenen Isoformen führte, was auf eine wichtige funktionelle Rolle dieser Polypeptide hindeutet. Ihre Funktion ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Der Gesamtprozess der oxidativen Phosphorylierung muss eng kontrolliert werden. COX ist die wahrscheinlichste Stelle dieser Kontrolle, da das Enzym den einzigen irreversiblen Schritt der Atmungskette katalysiert. Um die COX-Aktivität den unterschiedlichen Energiebedürfnissen der verschiedenen Gewebe anzupassen wird vermutet, dass die zytosolisch kodierten COX-Untereinheiten hier regulierende Wirkung besitzen. Diese Hypothese wurde von der Gruppe um Kadenbach im Detail diskutiert (45). Dieser Einfluss kann sich einerseits sehr schnell vollziehen oder andererseits längerfristig aktivitäts-modulierend sein. Zu einer schnell wirkenden Regulierung zählt beispielsweise eine Affinitätsänderung für das Substrat Cytochrom C.

So ließ sich nachweisen, dass bei geringen Cytochrom-C-Konzentrationen ATP, ADP und auch Phosphat die COX-Aktivität hemmen, indem sie die Affinität des Enzyms für das Substrat ändern (27, 88). ATP bindet dabei an dieselben zytosolisch kodierten Untereinheiten, wie das Substrat Cytochrom C. Eine eher längerfristige Modellierung der nukleären Untereinheiten könnte sich auf der Ebene der Enzymsynthese z.B. bei der mitochondrialen Proteinsynthese auf der Stufe der Transkription oder der Translation vollziehen.

Ein Indiz, dass die zytosolischen Untereinheiten die Menge des synthetisierten COX kontrollieren, zeigt die genetische Studie der Gruppe um Trueblood et al. (94). Sie konnten belegen, dass die zwei Gene, die für die Untereinheit IV kodieren, einer unterschiedlichen Expressionskontrolle unterliegen. IVa wird hauptsächlich in aeroben Zellen und IVb überwiegend in anaeroben Zellen synthetisiert. Eine weitere Funktion der zytosolisch kodierten COX-Untereinheiten liegt möglicherweise im Zusammenbau vom COX-Komplex. Demgemäß könnten sie als Baugerüst dem Enzym-Zusammenbau dienen, indem sie zum Beispiel an der Faltung der mitochondrialen Untereinheiten mitwirken.

1.1.5 Trägermoleküle: Cytochrom C und Coenzym Q (Ubichinon)

Zu den nichtproteingebundenen prosthetischen Gruppen zählen das Coenzym Q (Ubichinon) und das Cytochrom C. Sie sind frei im Mitochondrium beweglich und dienen damit der Elektronenübertragung zwischen den ortsgebundenen Komplexen.

Die Gruppe der Cytochrome sind Proteine, die als prosthetische Gruppe ein Häm enthalten, das dem Häm im Hämoglobin und Myoglobin ähnelt. Im Zentrum des Häm-Moleküls übernimmt das Fe-Atom die Funktion der Elektronenübertragung und liegt entweder im reduzierten (Fe^{2+}) oder im oxidierten Zustand (Fe^{3+}) vor. In der Atmungskette kommen sieben verschiedene Cytochrome vor (b_{560} , b_{562} , b_{566} , c_1 , c , a und a_3 entsprechend der Reihenfolge des Elektronenflusses), wovon nur das Cytochrom C im Intermembranraum des Mitochondriums frei beweglich ist. Diese Eigenschaft ergibt sich aus seiner Wasserlöslichkeit.

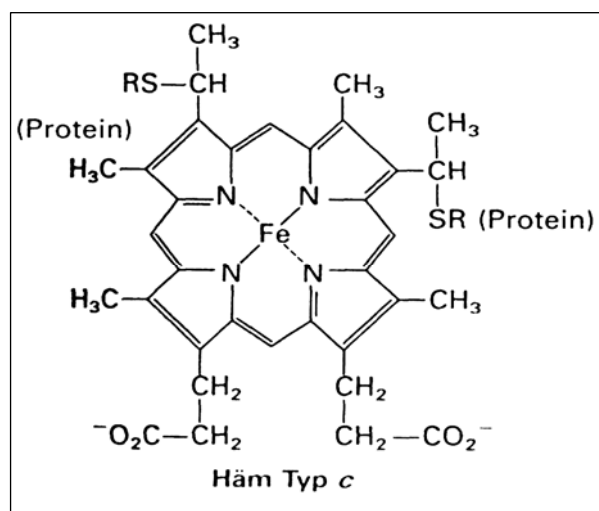


Abbildung 4: Das Cytochrom-C- Molekül

Die Hämoleküle der Cytochrome unterscheiden sich geringfügig in der Struktur und besitzen am Fe-Atom verschiedene axiale Liganden. Damit befindet sich das Eisen jeweils in einer unterschiedlichen Umgebung und es entsteht für jedes Cytochrom ein anderes Reduktionspotential. Diese wichtige Eigenschaft der Cytochrome bestimmt den nur in einer Richtung verlaufenden Elektronenfluß in der Kette.

Coenzym Q (Ubichinon) transportiert Wasserstoffatome, also Protonen plus Elektronen. Nach der Aufnahme eines Elektrons geht die oxidierte Form in eine halbreduzierte Form über (Semichinon), die wiederum ein weiteres Elektron und zwei Protonen akzeptiert und dabei in das vollständig reduzierte Dihydrubichinon CoQH_2 übergeht. Wegen des langen Kohlenwasserstoff-„Schwanzes“ aus Isopreneinheiten ist CoQ im hydrophoben Innenbereich der Phospholipiddoppelschicht der Innenmembran des Mitochondriums löslich und sehr beweglich. Es ist das einzige Trägermolekül des Elektronentransportsystems, das keine feste Bindung mit einem Protein eingeht. Coenzym Q übernimmt die Elektronen von der NADH-CoQ-Reduktase und Succinat-CoQ-Reduktase (Komplex I, II) und überträgt sie schließlich auf die CoQH_2 -Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III).

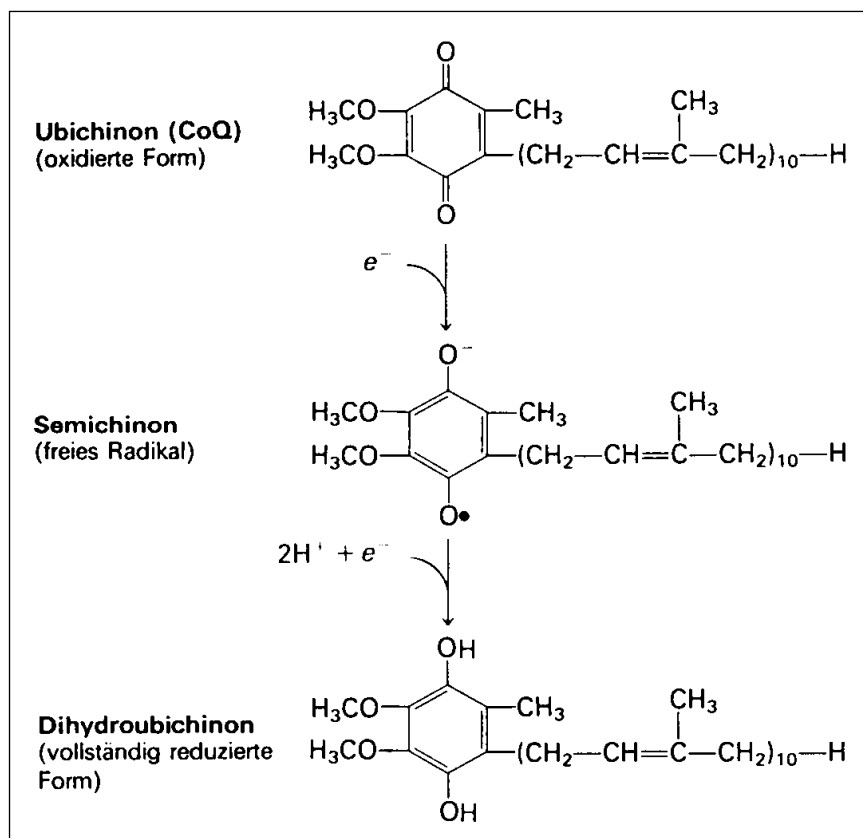


Abbildung 5: Formen des Ubichinons

1.2 Die humane mitochondriale DNA und deren Bedeutung für die Atmungskette

Mitochondrien wurden erstmals 1857 von Kölliker mikroskopisch beschrieben. Sie unterliegen der Kontrolle zweier Genome: dem mitochondrialen und dem kernkodierten Genom.

Die erste chemische Demonstration der mitochondrialen DNA gelang 1963 experimentell in einem Hühnerembryo (65). Der Anteil der gesamten DNA einer Tierzelle wird mit nur 1% von der mtDNA gestellt. Kein multizellulärer Organismus wurde ohne mtDNA beschrieben. Sie ist entscheidend für die Differenzierung der Zellfunktion. Jede kernhaltige Tierzelle enthält über 1000 Mitochondrien und jedes Mitochondrium enthält 2-10 mtDNAs. Das sind pro differenzierte Zelle über 3000 mtDNA-Kopien.

Kernlose Zellen wie Thrombozyten oder Erythrozyten haben 1-3 mtDNA-Kopien und keine Mitochondrien (66). Obwohl das menschliche mt-Genom seit 1963 (65) bekannt ist und 1981 komplett sequenziert wurde (1), trat es erst mit der Entdeckung der ersten pathogenetischen Mutation 1988 ins klinische Rampenlicht (41, 99). Die mtDNA befindet sich in der mitochondrialen Matrix und ist an die innere Mitochondrienmembran angeheftet. Sie wird in der mitochondrialen Matrix repliziert und transkribiert. Die nordeuropäische Referenzsequenz der humanen mtDNA besteht aus 16569 Basenpaaren, wobei sich nichtverwandte Individuen in über 60 Positionen unterscheiden können. Diese polymorphen Varianten der mtDNA korrelieren mit dem ethnischen Ursprung.

Die mtDNA ist doppelsträngig ringförmig konfiguriert (1). Die zwei mtDNA-Stränge unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Basenkombination, welche meist Guanin-Reste im H-Strang (heavy) und überwiegend Cytosin-Resten im L-Strang (light) aufweisen. Der H-Strang dient als Vorlage für die kleinen (12S) und die großen (16S) rRNAs, 12 Polypeptide und 14 tRNAs. Der L-Strang kodiert für ein Polypeptid (ND6) und 8 tRNAs. Insgesamt werden 37 mtDNA-Gene kodiert: 24 für die mtDNA-Translation (2 ribosomale RNAs, 22 Transfer-RNAs) und 13 Proteine für die Komplexe I, III, IV und V (Tabelle 3). Damit werden ca. 15% der Proteine für die oxidative Phosphorylierung über die mtDNA kodiert.

Tabelle 3: Anzahl und Kodierung der Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung

		Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V
Ort der Kodierung	nDNA	35	4	10	10	12
	mtDNA	7	0	1	3	2

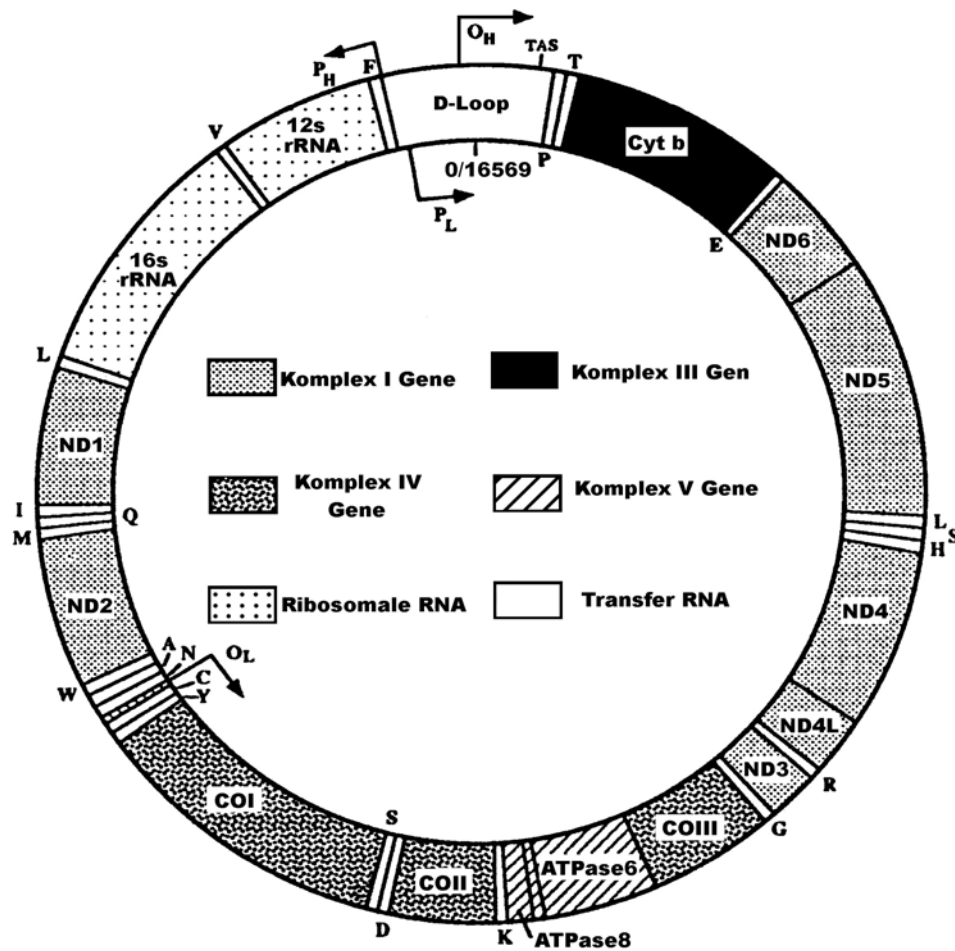


Abbildung 6: Die menschliche mtDNA-Mappe

Die Funktion jedes Gens ist durch unterschiedliche Schattierung dargestellt entsprechend der Bezeichnung innerhalb des Kreises. Die tRNA Gene werden durch einen Buchstaben ihrer verwandten Aminosäure angezeigt. Die Namen der Gene sind:

O_H = MTOH, CSBI-III = MTCSB-3, P_L = MTLSP, P_H = MTHSP1, F = tRNA^{Phe} = MTF, 12S rRNA = MTRNR1, V = tRNA^{Val} = MTTV, 16S rRNA = MTRNR2, L = tRNA^{Leu(UUR)} = MTTL1, ND1 = MTND1, I = tRNA^{Ile} = MTTI, Q = tRNA^{Gly} = MTTQ, M = tRNA^{Met} = MTTM, ND2 = MTND2, N = tRNA^{Trp} = MTTW, A = tRNA^{Ala} = MTTA, N = tRNA^{Asp} = MTTN, O_L = MTOLR, C = tRNA^{Cys} = MTTT, Y = tRNA^{Tyr} = MTTY, COI = MTCO1, S = tRNA^{Ser(UCN)} = MTTT1, D = tRNA^{Asp} = MTTD, COII = MTCO2, K = tRNA^{Lys} = MTTK, ATPase8 = MTATP8, ATPase6 = MTATP6, COIII = MTCO3, G = tRNA^{Gly} = MTTG, ND3 = MTND3, R = tRNA^{Arg} = MTRR, ND4 = MTND4L, ND4 = MTND4, H = tRNA^{His} = MTHH, S = tRNA^{Ser(AGY)} = MTTT2, L = tRNA^{Leu(CUN)} = MTTL2, ND5 = MTNDS, ND6 = MTND6, E = tRNA^{Glu} = MTE, Cytb = MTCYB, T = tRNA^{Thr} = MTTT, P = tRNA^{Pro} = MTP, TAS = termination-associated sequence = MTTAS.

1.2.1 Die mitochondriale Replikation, Transkription und Translation

Das Mitochondrium besitzt ein vom Zellkern unabhängiges Replikations-, Transkriptions- und Translationssystem.

Mehr als 20 Genprodukte sind bekannt, die für das Replisom, ein Multienzymkomplex für die mtDNA-Replikation, benötigt werden. Das Verhältnis mitochondrialer DNA zu nukleärer DNA ist während aller Zellzyklusphasen in etwa gleich, was darauf hindeutet, dass die mtDNA-Replikation mit der nukleären verbunden ist. Die mitochondriale DNA-Replikation beginnt an zwei Stellen. Der Ausgangspunkt der H-Strang-Replikation liegt in der D-Loop-Region, gekennzeichnet mit O_H , der für den L-Strang (O_L) außerhalb der D-Loop-Region. Die Replikation verläuft bidirektional. Im Gegensatz zur Replikation der Kern-DNA, erfolgt sie beim mitochondrialen Genom asynchron zur Zellteilung und es kommt zur ungleichen Verteilung der mtDNA-Moleküle auf die Tochterzellen (49).

Die mitochondriale DNA-Transkription erfolgt symmetrisch ausgehend von den zwei Promotoren, die sich im D-Loop zum einen für den H-Strang (P_H) und zum anderen für den L-Strang (P_L) befinden (Abbildung 6). Die Transkription des äußeren H-Stranges erfolgt im Uhrzeigersinn, während RNA am inneren L-Strang entgegen dem Uhrzeigersinn synthetisiert wird. Die gebildete RNA unterliegt im Mitochondrium einem umfassenden Reifungsprozess. Das heißt, dass mitochondriale rRNA- und mRNA-Moleküle durch enzymatische Spaltung aus höhermolekularen Vorläufern entstehen. Eine sehr genaue Einhaltung der Schnittstellen zwischen mRNA- und tRNA-Molekülen ist nötig, weil die 5'-Enden der einzelnen mRNA-Moleküle dem 3'-Ende einer tRNA unmittelbar benachbart sind. Damit führt das Herausschneiden der tRNAs gleichzeitig zur Freisetzung der rRNAs und der mRNAs.

Die H-Strang-Transkription generiert einen Überschuss an rRNA-Transkripten gegenüber den mRNAs. Die Poly-A-Schwänze werden posttranskriptional an die mRNA hinzugefügt. Die gebildete RNA verbleibt im Mitochondrium für die sich anschließende Translation.

Bei der Cytochrom-C-Oxidase wurde festgestellt, dass Im Vergleich zur Kern-DNA-Transkription, die Tage dauert, die mitochondriale Transkription nur etwa 3 Stunden benötigt. So liegt die Anzahl der mtDNA-COX-Transkripte ca. 20 bis 25-mal höher als die der Kern-DNA-COX-Transkripte (12). Warum es zu einem solchen mengenmäßigen Unterschied kommt, wenn doch ein equimolarer Zusammenbau der Komplex-Untereinheiten stattfindet, ist nicht bekannt.

Wie bei der bakteriellen Translation wird die mitochondriale Proteinsynthese initiiert durch Formylmethionin, benutzt bakterienartige Elongationsfaktoren und ist sensitiv gegenüber dem bakteriellem Ribosom-Hemmer Chloramphenicol. Mitochondrien benutzen einen veränderten genetischen Kode. In der Kern-DNA stehen UGA oder UGG für Stopp, im Mitochondrium kodieren diese für Tryptophan. Dafür entsprechen die nukleären Arginin-Kodons AGA und AGG im Mitochondrium dem Stoppsignal. Alle auf der mtDNA kodierten Proteine werden an mitochondrialen Ribosomen gebildet und verbleiben in der Organelle. Mit Ausnahme von zwei werden die ribosomalen Nucleinsäuren für die mitochondrialen Ribosomen aus dem Cytosol aufgenommen. Die mitochondrialen Ribosomen unterscheiden sich von cytoplasmatischen Ribosomen in ihrer Zusammensetzung aus RNA und Proteinen. Alle für die Proteinsynthese notwendigen tRNA-Moleküle werden von der mtDNA selbst kodiert.

1.2.2 Import von kernkodierten Proteinen in das Mitochondrium

Die Mehrheit (etwa 85%) der mitochondrialen Proteine wird von der Kern-DNA kodiert, im Cytoplasma translatiert und in die Mitochondrien importiert. Hierzu zählen neben den Untereinheiten für die Atmungskettenkomplexe auch die mitochondrialen DNA- und RNA-Polymerasen. Für die Mehrzahl der in die Mitochondrien übertragenen Proteine existiert kein zytosolisches Gegenstück mit der gleichen Funktion. Der Import der kernkodierten Proteine in die entsprechenden submitochondrialen Kompartimente (Außenmembran-, Intermembran-, Innenmembran-, Matrix-Raum) ist ein komplexer Prozess, der überwiegend in der letzten Dekade erforscht und verstanden wurde (21). Für die Aufnahme in die Mitochondrien binden Chaperone an die Vorläufer-mt-Proteine und entfalten diese. Die Steuerung der zu importierenden Proteine in die mitochondriale Matrix erfolgt durch N-terminale Eintritts- und Zielsteuerungssequenzen. Rezeptoren auf der Außenmembran der Mitochondrien binden diese. Die Einschleusung der Vorstufenproteine vollzieht sich an seltenen Kontaktstellen zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran. Bei mikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Vorstufenproteine an solchen Stellen der Organelle akkumulieren. Man nimmt an, dass sich in der Nähe dieser Kontaktstellen die Außenmembran-Rezeptoren befinden. Der Transport über die Außen- und Innenmembran ist ein energieabhängiger Prozess. Nach Durchwandern der Membranen werden die Vorläufer-mt-Proteine mit ihren Matrix-Zielsteuerungssequenzen, die aus vielen positiv geladenen Aminosäuren bestehen, bei einem negativen Membranpotential auf die Innenseite der Mitochondrien-Matrix gezogen.

Die N-terminalen Eintritts- und Zielsteuerungssequenzen werden nun durch mitochondriale Peptidasen abgespalten. Es kommt zu einer Konformationsänderung. Das wiederum führt zu einer Bindung am hydrophoben Innenbereich der mitochondrialen Membran. Wenn jetzt eine Mutation oder Deletion in einer Zielsteuerungssequenz auftritt, dann verbleibt das Protein im Cytosol.

Vorläufer-mt-Proteine mit dem gleichen Bestimmungsort innerhalb des Mitochondriums haben Zielsteuerungssignale mit ähnlichen Strukturmerkmalen. Jedoch unterscheiden sie sich in den Signalsequenzen. Proteine für den Intermembranraum (wie Cytochrom C₁) verwenden zwei Präsequenzen. Mit der Signalsequenz gelangt es zunächst in die Matrix, danach wird diese Sequenz abgespalten und die Zielsequenz für den Intermembranraum wird freigesetzt.

1.2.3 Die mitochondriale Vererbung

Die Genetik der mitochondrialen DNA unterscheidet sich deutlich von den Prinzipien der Kern-DNA-Vererbung. Der Hauptunterschied liegt darin, dass die mitochondrialen Gene nicht wie die nukleären Gene nach Mendel (quantitatives Prinzip: alle oder keine) vererbt werden, sondern eine Übertragung von 0 bis 100% möglich ist. Bei der Befruchtung stammt die gesamte mtDNA von der Oocyte (maternale Vererbung), da der Teil des Spermiums, der die Mitochondrien enthält, die weibliche Eizelle während der Befruchtung nicht durchdringt.

Somatische Zellgenetikstudien zeigten, dass mtDNA-Moleküle innerhalb der Zelle interagieren, indem sich Mitochondrien teilen oder fusionieren (97, S.1181). Dies führt zu einer mtDNA-Vermischung oder Komplementation. Eine Rekombination der mtDNA, wie sie während der Meiose zwischen der Kern-DNA stattfindet, gibt es nicht.

Im Gegensatz zu den kernkodierten DNA-Genen, die ein maternales und ein paternales Allel besitzen, enthalten Zellen multiple Mitochondrien, welche wiederum multiple Genome aufweisen. Ein Individuum kann unterschiedliche Allelformen der mtDNA tragen, die in verschiedenen Verhältnissen vorkommen. Die Koexistenz von mehr als einem mtDNA-Typ kann innerhalb einer Zelle, eines Gewebes oder eines Individuums vorkommen und wird als Heteroplasmie bezeichnet. Fehlen alternative Sequenzen spricht man von einer Homoplasmie.

Die meisten pathogenetischen Mutationen spiegeln sich in einer heteroplasmischen mt-DNA-Population wieder. Ab einem bestimmten Verhältnis von gesunder Wildtyp- zu mutierter mtDNA kommt es zur Dysfunktion im Gewebe. Das heißt, nicht jede Mutation ist pathogen, sondern erst das Überschreiten eines bestimmten Anteils von mutierter zu gesunder mtDNA führt zu einem biochemischen Defekt und damit zur Erkrankung.

Diese Manifestationsschwelle einer Mutation ist einerseits vom Gewebetyp und andererseits vom Mutationsort abhängig und infolgedessen unterschiedlich hoch. Ersteres erklärt sich aus den sich unterscheidenden oxidativ-metabolischen Bedürfnissen verschiedener Gewebe und ihrer daraus resultierenden Reaktion auf oxidativen Stress. So ist die Manifestationsschwelle im sehr sensibel auf oxidativen Stress reagierenden Gehirn eher niedrig. Die Lokalisation der Mutation hat funktionelle Bedeutung. Bei Punktmutationen in mitochondrialen Strukturgenen liegt die Schwelle bis zum Auftreten einer Fehlfunktion etwa zwischen 55% - 65% (47, 37). So wurde beispielsweise von der Gruppe um Hanna (37) bei der von ihnen erstmalig entdeckten Punktmutation im COX-Stopp-Codon an Position 9952 eine niedrige Manifestationsgrenze von 56% beschrieben. Während im Gewebe mit Punktmutation, die das tRNA-Genom betreffen, die Schwelle erst bei 85% (7) liegt. Diese hohe Grenze begründet sich aus der noch vorhandenen Teilaktivität mutierter tRNA (6).

Während der Teilung somatischer Zellen und Keimzellen werden die mtDNA-Moleküle zufällig (also nicht gleichmäßig) auf die Tochterzellen übertragen. Der Genotyp aller Mitochondrien wie auch der Grad einer Heteroplasmie ändert sich deshalb von einer Zellteilung sowie von einer Generation zur nächsten. Der Genotyp kann dann mehr dem Wildtyp oder bei Mutationen mehr der Mutante entsprechen. Damit erklärt sich das Phänomen mtDNA-verursachter Krankheiten, bei dem sich sowohl Genotyp als auch klinischer Phänotyp über einen bestimmten Zeitraum verändern können.

Dies zeigt sich zum Beispiel bei einigen Kindern mit Pearsonschen Syndrom (PS), die im Säuglingsalter an einer sidero-blastischen Anämie leiden. Kinder, die PS überleben, entwickeln später ein Kearns-Sayre Syndrom (KSS), eine Enzephalomyopathie. Als mögliche molekulare Ursache wird bei PS und KSS eine einfache mtDNA-Deletion diskutiert. Dabei ändert sich bei den sich schnell replizierenden Blutzellen das Verhältnis von Wildtyp zu mutierter mtDNA zu Gunsten der Wildtyp-DNA, während die Deletion in postmitotischen Zellen (Gehirn, Muskel) ansteigt.

1.2.4 Somatische und germinale mtDNA-Mutationen

Die mtDNA besitzt keine Introns, keine protektiven Histone, kein Reparatursystem und hat ständigen Kontakt mit aggressiven Sauerstoffradikalen. Daraus resultiert die circa 10-mal höhere Mutationsrate gegenüber der Kern-DNA. (97 S.1183, 13)

MtDNA-Mutationen führen sehr häufig zu multisystemischen Erkrankungen. Somatische Mutationen können in einem beliebigen Gewebe im Körper entstehen. Dabei ist der Anteil an mutierter zu gesunder mtDNA entscheidend für die Pathogenität (Schwelleneffekt). Diese Mutationen sterben mit dem Körper. Die höchsten Mutationsraten findet man in absteigender Reihenfolge in den Basalganglien des Gehirns, im Cortexbereich (nicht im Kleinhirn), im Skelettmuskel und im Herzmuskel. Diese Gewebe sind stark vom oxidativen Metabolismus abhängig und darum besonders anfällig gegenüber mitochondrialen Defekten. Desweiteren besteht bei pathologisch veränderten Gewebsbestandteilen in postmitotischen Organen nicht die Möglichkeit der Regeneration durch Mitosen. Je besser die geerbte mtDNA ist (80), desto mehr somatische Mutationen kann der Körper demzufolge verkraften. Somatische Mutationen bestimmen den Zeitpunkt des Ausbruchs und den Verlauf der Krankheit. Falls schon vererbte mtDNA-Schäden vorliegen, können wenige spontane somatische Mutationen die Schwelle überschreiten.

Germinale Mutationen können spontan in der Keimbahn auftreten und sind demzufolge auf die Nachkommen übertragbar. Die Mutter gibt diese an alle ihre Kinder unabhängig vom Geschlecht weiter, während aber nur ihre Töchter die Mutation an ihre Nachkommen übertragen. Aufgrund der Heteroplasmie und des Schwelleneffekts ist die maternale Vererbung jedoch nicht immer sofort ersichtlich. Verschiedene Individuen in der maternalen Linie einer Familie können somit ernsthaft, oligosymptomatisch oder überhaupt nicht betroffen sein.

Bis heute sind mehr als 100 Punktmutationen und 200 verschiedene mtDNA-Rearrangements und Deletionen bekannt, die eine mitochondriale Dysfunktion verursachen (66, 96).

Entwicklungen im Bereich der mitochondrialen Erkrankungen können durch die Datenbank-Webseite <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html> verfolgt werden. Punktmutationen, Rearrangements, Deletionen wie auch Duplikationen zählen zu den qualitativen Abnormalitäten der mtDNA. Eine quantitative Mutation der mtDNA ist die Depletion, die pathologisch wird bei einer mtDNA-Reduzierung unter 30-35% des normalen Wertes (90).

Wahrscheinlich ist die mitochondriale Depletion das Ergebnis von nukleären Gendefekten, da die überwiegende Anzahl der Gen-Produkte, die für die mtDNA-Replikation benötigt werden, vom Nukleus kodiert werden. Es sollte also neben dem mitochondrialen Genom die nukleäre DNA nicht außer Acht gelassen werden. Schließlich werden 80% der Gene für die oxidative Phosphorylierung und alle Proteingene für die mitochondriale Biogenese (wie Replikations-Proteine, Transkriptionsproteine, Translationsfaktoren) vom Kern-Genom kodiert. Als Indiz für die Ursache von Mutationen im Kern-Genom, kann der autosomal rezessive Erbgang gewertet werden.

1.3 Pathomechanismus und Klinik defekter Atmungskettenenzymfunktion

Mitochondriale Erkrankungen beim Menschen wurden erstmals 1959 entdeckt und 1962 von Rolf Luft (53) beschrieben. Die bisher publizierte Literatur von genetisch bestätigten mitochondrialen Erkrankungen besteht fast ausschließlich aus einzelnen Fallberichten oder abnormalen Stammbaumberichten. Diese Erkrankungen sind nicht so selten, wie bisher angenommen: ihre geschätzte Prävalenz liegt bei 10-15 Fällen pro 100 000 Personen (24 S.2656).

Der Verdacht auf einen Defekt in der mitochondrialen Atmungskette stellt sich immer dann, wenn es zu einer unerklärbaren Zusammensetzung von Symptomen bei scheinbar nicht verwandten Organen kommt. Mitochondriale Zytopathien betreffen hauptsächlich das stark von der Atmungskette abhängige Muskel- und Nervengewebe und sind meistens rasch progredient. Es können jedoch alle Mitochondrienenthaltene Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Folglich führen Defekte der Atmungskette zu jeglichen Symptomen in den verschiedensten Organsystemen, wie in Abbildung 7 zusammenfassend aufgelistet ist. Diese Symptom-Vielfalt erlaubt klinisch keinen Rückschluss auf den funktionellen Mangel eines speziellen Atmungsketten-Komplexes. So kann etwa ein isolierter COX-Mangel assoziiert sein mit einer Myopathie (10, 22, 43, 37, 83, 85), dem Leigh-Syndrom (22, 99), der Alzheimer-Erkrankung (19, 101), der Retinopathia pigmentosa mit kombinierter bilateraler Optikusatrophy (47) oder mit der dilativen Kardiomyopathie (14, 55, 56, 70).

Ebenfalls ist anhand der Symptome kein Rückschluss auf die ursächliche Mutation möglich. Die beispielsweise mit MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Seizures) am häufigsten in Zusammenhang gebrachte A3243G-Mutation einer Transfer-RNA, äußert sich auch in einer reinen Kardiomyopathie, einem Diabetes mellitus oder führt zu einer externen Ophthalmoplegie (24 S.2660; 66 S. 224).

Tabelle 4: Mögliche Symptome verschiedener Organsysteme bei defekter Atmungskette

ZNS	Neuromuskulär	Renal
Ataxie	Dystonie	Glomerulopathie
Demenz	Infantile Hypotonie	Bartter Syndrom
Depression	Spät beginnende Myopathie	Fanconi Syndrom
Psychosen	Myalgie	
Leukodystrophie	Neuropathie	Dermal
Migräne	Spastische Paraparese	Akrozyanose
Myoklonus	Schwäche	Hypertrichose
Parkinsonismus	Ptosis	Pigmentierungsstörungen
Ermüdbarkeit		Alopezie
Psychomot. Retardierung	Ophthalmologisch	Pruritus
Epileptische Anfälle	Katarakt	
Sensoneurale Taubheit	Externale Ophthalmoplegie	Endokrinologisch
Schlaganfall	Optikus-Neuropathie	Struma
Schwindel	Retinopathie	Nebenniereninsuffizienz
	Makuladegeneration	Hypoparathyroidismus
	Nystagmus	Diabetes mellitus
Hepatisch		Hypothyroidismus
Aplastische Anämie		Ovarielle Dysfunktion
Sideroblastische Anämie	Gastrointestinal	
Aszites	Zyklisches Erbrechen	
	Hepathopathie	Neoplastisch
	Intestinale Dysmotilität	Hereditäres Paragangliom
Kardiologisch	Exokrine Pankreas-	Symmetrische Lipomatosis
Kardiomyopathie	Dysfunktion	
Leitungsstörungen		

In der Tabelle 4 nicht aufgeführt ist noch zu ergänzen, dass als laborchemischer Parameter sehr häufig ein erhöhter Laktatspiegel nachweisbar ist. Dieser kommt dadurch zustande, dass der beeinträchtigte Elektronentransport zu einer Verringerung des mitochondrialen NAD^+/NADH -Verhältnisses führt und so die Pyruvat-Oxidation hemmt. Das führt zur anaeroben Oxidation von Pyruvat unter Bildung von Laktat. Mit der NADH-Ansammlung verschlechtert sich ebenfalls die Funktion des Citratzyklus, da dieser auf NAD^+ angewiesen ist. Das kann wiederum sekundär einen Anstieg der Ketonkörper bewirken.

Die Art, die Schwere und der Verlauf der Symptome, die durch bestimmte mtDNA-Mutationen hervorgerufen werden, variieren in Abhängigkeit von der mitotischen und meiotischen Verteilung der Mutation (Replikationsverteilung, Heteroplasmie und Schwelleneffekt) und der gewebespezifischen Unterschiede in der Energieabhängigkeit (49). Während eine gestörte Atmungskettenenzymfunktion in jeder Altersstufe in den verschiedensten Schweregraden in klinische Erscheinung treten kann, führt sie im frühen Säuglingsalter fast immer zu schwersten klinischen Ausprägungen (75).

Die Anhäufung mutierter pathogener mtDNA über einen Zeitraum hinweg beeinflusst den Beginn der Erkrankung. Beispielsweise kann ein Individuum, dessen Muskulatur zu 15 Prozent normale und zu 85 Prozent mutierte mtDNA besitzt, im Alter von 20 Jahren ausreichend mit mitochondrial kodierten Proteinen versorgt und daher klinisch gesund sein, jedoch im Alter von 60 Jahren bei einem Anstieg der mutierten mtDNA einen schweren Krankheitsphänotyp ausprägen (97 S.1196).

Die Schwelle einer mutierten pathologischen mt-DNA-Population kann auch durch eine hinzutretende Erkrankung (wie Infektion oder Schock) herabgesetzt werden (87) – die Symptome treten also zeitlich früher oder überhaupt klinisch in Erscheinung, als wenn kein Stress hinzugekommen wäre. Genetisch prädisponierte Individuen mit evtl. zusätzlichen Erkrankungen haben folglich ein größeres Risiko, eine Verringerung der mitochondrialen Atmungskapazität zu bekommen.

Die oxidative Kapazität ist am schwersten herabgesetzt beim COX-Mangel (95). Alleiniger COX-Mangel wird selten nach dem ersten Lebensjahrzehnt beobachtet und ist im Erwachsenenalter meist mit anderen Komplexmängeln gekoppelt (37). Untersuchungen von 606 Patienten (überwiegend Säuglinge und Kleinkinder) zeigten folgende Verteilung der defekten Atmungskettenkomplexe im klinisch befallenen Gewebe: mit 31% war Komplex I am häufigsten betroffen, gefolgt von Komplex IV mit 27% und Komplex III mit 15%, am seltensten mit 2% konnte ein Komplex-II-Mangel detektiert werden. Zu 17% fand man einen kombinierten Mangel aus den Komplexen I & IV und zu 8% generalisierte Defekte (78 S. 50).

Eine Möglichkeit, die heterogene Klinik zu ordnen, ist in Tabelle 5 mithilfe der Zuweisung der Symptomatik zu den defekten Enzymkomplexen aufgezeigt. Eine solche ist aber nur grob orientierend als Übersicht angedacht, da sich die Symptome überlappen und verschiedene Komplex-Defizite teilweise zu ähnlichen bis gleichen Krankheitssyndromen führen können.

Tabelle 5: Klinische Symptome & Syndrome assoziiert mit spezifischem Komplex-Defekten

Komplex I	Komplex II	Komplex III
Kardiomyopathie Katarakt Demenz Hepatopathie KSS Leigh Syndrom Fatal infantile Enzephalomyopathie Leukodystrophie LHON MELAS Myoklonische Epilepsie Neonatale Laktatazidose Pearson Syndrom Renale Tubulopathie	Ataxie Sportintoleranz Hereditäres Paragangliom Leigh Syndrom Myalgie Rhabdomyolyse KSS Optikusatrophie Hypertrophische Kardiomyopathie	Enzephalopathie Histozytoide Kardiomyopathie KSS MELAS CPEO Renale Tubulopathie Sportintoleranz Laktatazidose Fatal infantile Enzephalomyopathie
Komplex IV	Komplex V	Komplex I-III, II-III oder Coenzym Q₁₀
Alpers Syndrom Infantile Enzephalomyopathie Fatale Form Benigne Form KSS Leigh Syndrom MELAS MERRF MNGIE Multiple symmetrische Lipomatosis CPEO Renaler tubulärer Defekt	Leigh Syndrom NARP Komplex I + IV Ataxie Taubheit Demenz KSS Fatale infantile Enzephalomyopathie MERRF MELAS Myoklonus Retinopathie	Ataxie Zerebellare Hypoplasie Enzephalopathie Sportintoleranz Laktatazidose Myoglobinurie CPEO Ptosis Epileptischer Anfall Schwäche

1.3.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Wird die Manifestationsschwelle der mutierten mitochondrialen DNA im Gehirn im Säuglings- bzw. Kindesalter erreicht, so führt dies zu Erkrankungen wie dem Leigh-Syndrom oder dem Kearns-Sayre-Syndrom. Im mittleren Alter kann sich ein Defekt in der Atmungskettenenzymfunktion als Chorea Huntington präsentieren und im fortgeschrittenem Alter z.B. in Form von Alzheimer oder Parkinson (87 S. 314).

Das Leigh-Syndrom

Das Leigh Syndrom, welches auch als subakute nekrotisierende Enzephalomyopathie bezeichnet wird, zählt zu den am häufigsten diagnostizierten mitochondrialen neurodegenerativen Erkrankungen im Säuglings- und im frühen Kindesalter (20). Zentralnervöse Symptome stehen im Vordergrund. Im ersten Lebensjahr manifestiert sich die Erkrankung mit neurologischen Symptomen wie psychomotorischer Regression, Ataxie, Optikusatrophie, Ptosis, Ophthalmoplegie, Nystagmus, Tremor, Dystonie, Pyramidenzeichen und respiratorischer Anomalie. Einzig im Labor kann eine Laktatazidose hinweisend sein. Diese schwere Symptomatik ist nur für einen kurzen Zeitraum mit dem Leben vereinbar.

Bei histopathologischen Untersuchungen von Patienten beschreibt die Gruppe um DiMauro (22) symmetrische Nekrosen, Demyelinisierungen, Nervenzellverlust im Mittelhirn, Pons, in den Basalganglien, im Thalamus und im Nervus Opticus. Elektronenmikroskopisch lässt sich eine Aggregation von vergrößerten Mitochondrien mit bizarrem Bau und großer Variation in Größe und Form nachweisen (99). Außerdem wurde eine Vermehrung der Mitochondrien in der Muskulatur nachweisen. Pathophysiologisch erklärt man sich diese schwere Neurodegeneration durch den veränderten Energie-Metabolismus, der hervorgerufen werden kann durch ein uneinheitliches Bild von möglichen Defekten in jeweils einem Komplex der Atmungskette, im Komplex V oder differentialdiagnostisch in einem Pyruvat-Dehydrogenase-Mangel (80).

Für eine mögliche autosomal rezessive Vererbung sprechen Patienten mit konsanguinen Eltern. DiMauro et al. (21) konnten nach acht Jahren molekulargenetischer Studien keine Mutationen in den zehn kernkodierten COX-Untereinheiten-Genen auffinden. Sie vermuten daher, dass bei der nach Mendel vererbten Leigh-Krankheit das betroffene (mutierte) Gen für den COX-Zusammenbau verantwortlich ist. Neben dem nach Mendel vererbten Leigh-Syndrom existiert auch die maternal vererbte Form, bei der die Ursache in einer Punktmutationen der mtDNA zu finden ist. Eine relativ milde Ausprägung dessen beschreiben Santorelli et al. (80).

1.3.2 Myopathien

Bei einem hohen Energiebedarf und der möglichen Akkumulation mutierter mtDNA im postmitotischen Skelettmuskelgewebe äußern sich Defekte der Atmungskette sehr häufig in Form von Myopathien. Ursächlich für isolierte Myopathien können Mutationen in Proteinkodierenden Genen in myogenen Stammzellen sein, die wahrscheinlich nach der Keimblattdifferenzierung auftreten (2). Ein isolierter COX-Mangel kann assoziiert sein mit infantiler (10, 22, 83) wie auch mit erst im Erwachsenenalter beginnender Myopathie (37, 43, 85). Es kommt zu variablen klinischen Manifestationsformen wie Muskelschwäche, Sportinduzierten Krämpfen, Myalgien, Ptosis, Progressive Externe Ophthalmoplegie (PEO) und eher selten in Erscheinung tretend ist die episodische Schwäche assoziiert mit Rhabdomyolyse und Myoglobinurie (49). In morphologischen Muskelanalysen lassen sich als typische Veränderungen mit der modifizierten Gomori-Trichrom-Technik rote „zerrissene“ Muskelfaserbereiche anfärben, die in der Literatur als Ragged Red Fibres (RRF) bezeichnet werden. Diese sind nicht entlang der gesamten Länge einer Muskelfaser detektierbar, haben demgemäß ein segmentales Vorkommen. Elektronenmikroskopisch befinden sich in den RRF akkumulierte Mitochondrien mit parakristallinen Einschlüssen.

Die nachgewiesene Korrelation zwischen gestörter oxidativer Phosphorylierung und abnormalen segmentalen Veränderungen der Muskelfaser deutet darauf hin, dass die abnormale Proliferation der Mitochondrien in den RRF sekundär als Folge des defekten Energie-Metabolismus auftritt (49). AIDS-Patienten können unter Zidovudinbehandlung eine mitochondriale Myopathie entwickeln. Es wird angenommen, dass das Nukleosidanalogen Zidovudin die mtDNA-Polymerase hemmt und so mtDNA-Depletionen hervorruft (4). Generell haben Myopathien einen sehr hohen Schwellenwert, der oft 90% der mutierten mtDNA überschreitet. Folglich sind schon geringe Mengen an Wildtyp-mtDNA ausreichend, um einen normal funktionierenden Elektronentransport zu gewährleisten. Meist beobachtet man einen großen Unterschied im Anteil der mutierten mtDNA zwischen benachbarten Zellen, was die Diagnostik mittels Muskelbiopsie erschwert.

Infantile Myopathie

Erstmals wurden 1977 drei Säuglinge mit mitochondrialer Myopathie untersucht, bei denen eine verringerte COX-Aktivität im Skelettmuskel nachgewiesen wurde (10). Myopathie-erkrankte Neugeborene zeigen nach der Geburt eine gravierende generalisierte Schwäche mit Atemnotsyndrom und laborchemisch eine Laktatazidose.

Als Hauptursache wurde neben anderen Komplexmängeln der COX-Defekt detektiert (21). Aufgrund des unterschiedlichen Verlaufs und der Prognose lassen sich zwei Formen abgrenzen, die fatale und die benigne infantile Form. Bei der fatalen Form versterben die Kinder noch vor dem ersten Lebensjahr an respiratorischem Versagen. Obwohl Herz, Leber und Gehirn nicht betroffen sind, weisen viele Patienten eine Nierenbeteiligung auf. Das kann dann zu einer Glycos-, Phosphat- und generalisierten Aminosäururie führen. Stammbaumanalysen zeigen eine autosomal rezessive erbliche Weitergabe, was darauf hindeutet, dass kernkodierte COX-Untereinheiten geschädigt sein könnten.

Kinder mit benigner infantiler Myopathie müssen in den ersten Lebensmonaten beatmet und teilweise zwangsernährt werden. Bei ihnen kommt es dagegen zu einer spontanen Besserung der Klinik. Die Laktatazidose ist mitunter schwerer ausgeprägt als bei der fatalen Form und ist von selbst rückläufig. Im Alter von zwei bis drei Jahren sind die Kinder gewöhnlich gesund. DiMauro et al. (21) haben festgestellt, dass die klinische Genesung mit einer allmählichen Rückkehr der COX-Aktivität im Muskel korreliert ist. Biochemisch haben sie nachweisen können, dass die Enzymaktivität in Muskelbiopsien (entnommen im Alter von 2, 7 und 36 Monaten) von anfänglich 6%, auf 33% und schließlich auf 174% der normalen Aktivität anstieg. Auch histochemisch ließen sich in Abhängigkeit der vergangenen Zeit vermehrt COX-aktive Fasern anfärben.

Myopathie im Erwachsenenalter

Bevor man die eher seltene Myopathie mitochondrialer Genese beim Erwachsenen in Erwägung zieht, sollte differentialdiagnostisch eine Polymyositis, eine Einschlusskörpermyositis, eine Myasthenia gravis, die chronische spinale Muskelatrophie und eine ischämie-bedingte Erkrankung der Extremitäten ausgeschlossen werden. Johnston et al. (43) untersuchten 9 ältere Patienten (über 69 Jahre) mit nicht erklärbarer proximaler Extremitätenschwäche, einer signifikanten Erhöhung der RRFs, mit einem veränderten Energiestatus des ruhenden Muskels sowie mit mtDNA-Abnormalitäten. Es war nicht möglich, zwischen den Patienten einer Late-onset Myopathie und den altersentsprechenden Kontrollpersonen anhand des PCR-Testes zu differenzieren. Der Unterschied war quantitativer Natur, indem die Muskulatur der Patienten eine größere Anzahl von mtDNA-Deletionen als die der altersentsprechenden Kontrollpersonen aufwies. Eine klonale Erhöhung von multiplen mtDNA-Deletionen kann beim Überschreiten einer bestimmten Schwelle zu klinischen Symptomen einer Myopathie führen (49).

1.3.3 Alterungsprozess und oxidativer Stress

Altern ist assoziiert mit einer progressiven Akkumulation von mtDNA-Schaden mit der Folge einer Verschlechterung der Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (13, 97). Die höchsten Mengen an mutierter mtDNA zeigen postmitotische Zellen (Gehirn, Muskel) (49). Drei verschiedene mtDNA-Mutationen wurden bis jetzt im menschlichen Alterungsprozess beschrieben: Deletionen, kurze Duplikationen und Basensubstitutionen (51).

Außerdem ließ sich ein progressiver Aktivitätsverlust der Atmungskettenkomplexe I und IV (87 S.310), sowie eine Zunahme der COX-negativen Skelettmuskel- und Herzmuskelfasern im Alter nachweisen (13).

Ein Indiz, dass oxidativer Schaden Einfluss auf den Alterungsprozess hat, ist das längerlebende Tiere eine Vielzahl von Sauerstoffradikalschutzsystemen haben. Außerdem ist die mtDNA 16-mal häufiger oxidativem Stress ausgesetzt als die Kern-DNA.

Die Verschlechterung der oxidativen Phosphorylierung im Alter reflektiert also den Sauerstoffradikalschaden gegenüber der mtDNA. Sauerstoffradikale (Superoxidanionen und H_2O_2) entstehen natürlicherweise als Nebenprodukte bei der oxidativen Phosphorylierung.

So wird reaktiver Sauerstoff an zwei Stellen in der Atmungskette generiert: an der Verbindungsstelle von Flavindehydrogenase und Coenzym Q und im Komplex III (97 S. 1199). Wenn der Prozess der reduzierten Atmungskettenkapazität einmal begonnen hat, dann kommt es weiterhin zu einer Abnahme des Elektronenflusses mit der Folge eines Substratüberschusses. Das führt zu einer Erhöhung der Elektronegativität der Flavine, Coenzym Q, Cytochrom b mit der Folge einer Stimulation der Sauerstoffradikalbildung. Durch die Interaktion der Radikale mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommt es zu einer Hemmung der mt-DNA-Replikation und -Transkription. Eine mögliche Erklärung für die Entstehung von mtDNA-Deletionen ließe sich aus der Hemmung der mitochondrialen Replikation ableiten. Individuen, die lange genug leben, können genügend oxidativen Schaden akkumulieren, der die Atmungskettenaktivität bis unter die organspezifische Energieschwelle verringert (97).

1.4 Diagnostik und differentialdiagnostische Überlegungen

Die Diagnostik der Atmungsketten-Defekte setzt sich zusammen aus sorgfältiger klinischer Beurteilung, aus biochemischen, morphologischen und molekulargenetischen Techniken. Laborchemisch können eine Laktatazidose (Screening-Test), erhöhte Konzentrationen an Ketonkörpern und eher selten ein erhöhtes CSF-Protein, eine erhöhte Serum-Kreatinkinase sowie eine Myoglobinurie hinweisend sein (96). Differentialdiagnostisch sollten andere Ursachen einer Laktatämie ausgeschlossen werden, wie z.B. zirkulatorische, renale oder hepatische Störungen oder andere metabolische Enzymstörungen wie Defekte in der Pyruvat-DH, der Pyruvat-Carboxylase, der Biotinidase, der Holocarboxylase-Synthetase, der Fruktose-1,6-Bisphosphatase und der Glucose-6-Phosphatase (11, 95).

In biochemischen Untersuchungen kann photometrisch oder polarographisch die Aktivität der einzelnen Atmungskettenenzyme gemessen werden. Die Analyse kann entweder am unbehandelten Gewebehomogenisat (70) oder an isolierten Mitochondrien (75, 82, 83, 99) durchgeführt werden. Für die Mitochondrienisolierung gibt es verschiedene Methoden, hier seien die nach Rustin (78 S. 41) und nach Buchwald (22 S. 510) genannt. Getestet wird das Gewebe, welches symptomatisch ist. Bewährt haben sich Gewebeprobe vom Skelettmuskel, der Leber und dem Herzmuskel. Während man bei Erkrankungen von Geweben, die für eine Biopsie nicht zugänglich sind (Gehirn, Retina), auf periphere Gewebe zurückgreifen muss, wie Skelettmuskel, Lymphozyten, kultivierte Fibroblasten oder Myoblasten. Erstmals etabliert wurde die Myoblastenkultur von Yasin et al. (103). Ein weiterentwickeltes Assay zur Myoblasten- und Fibroblastenkultur beschreibt die Gruppe um Shamina (83). Erythrozyten haben keine diagnostische Bedeutung, da sie keine Mitochondrien enthalten. Zur photometrischen Aktivitätsbestimmung der einzelnen Komplexe gibt es unterschiedlich entwickelte Enzym-Assays. Tabelle 6 gibt einen kleinen Überblick.

Tabelle 6: Veröffentlichungen mit photometrischen Enzym-Assays für die einzelnen Atmungskettenkomplexe

Enzymkomplex	Veröffentlichungen mit Enzym-Assay
I	Moreadith et al.; Fischer J.C
II	Matlib et al.; Birch-Machin et al.
III	Rieske J.S.; Nelson et al.
IV	Cooperstein et al.; DiMauro S. et al.1983; Rafael J.; Smith L.

Polarographisch können über die Bestimmung des O_2 -Verbrauchs in Abhängigkeit des zu oxidierenden Substrates Rückschlüsse auf den defekten Komplex gemacht werden - eine Methode wird von Rustin (78) beschrieben. Diese Methode lässt sich allerdings nur mit frischem Gewebe durchführen.

Molekulargenetische Untersuchungen nutzen den Southern oder Northern Blot und die PCR. Speziell für die Bestimmung der mutierten mtDNA in einer einzelnen Muskelfaser kann eine Einzel-Faser-PCR nach Moreas & Schon durchgeführt werden (63). Diese Methode macht Sinn, wenn zuvor die Muskelfaser auf das COX-Vorhandensein immunochemisch markiert wurde und man daraufhin einen Zusammenhang mit der mtDNA-Situation herstellen möchte.

Lichtmikroskopisch lassen sich nach der modifizierten Gomori Trichrom Färbetechnik RRFs darstellen. Sekundäre RRF-Bildung kann aber auch als Folge auftreten bei: Antikonvulsivagabe, neurogenetischer Atrophie, Kortikosteroid- und thyreotoxischen Myopathien (96). Elektronenmikroskopisch beobachtet man im betroffenen Gewebe strukturell veränderte Mitochondrien.

Weitere etablierte Methoden sind die Enzymhistochemie; die Immunhistochemie; fluoreszierende Untersuchungen von Mitochondrien, Membranphospholipiden oder Lipidtröpfchen. Bei der Immunhistochemie können beispielsweise mittels Antikörper nukleäre und mitochondriale COX-Untereinheiten markiert werden. Für neurodegenerative Ausprägungen trägt die Neuradiologie zur Diagnosesicherung bei. Mit dem Phosphor-MRT kann in vivo der Energie-Metabolismus im Gehirn und Muskel untersucht werden (58, 92). Die Fahrradergometrie weist bei Myopathien eine verminderte anaerobe Schwelle nach (43).

1.4.1 Pränatale Diagnostik

Erstmalig wurden Chorionzotten zur pränatalen DNA-Analyse 1982 von Williamson et al. (99) benutzt. Kazy et al. haben daraufhin auf die Möglichkeit von Enzymuntersuchungen zur Diagnostik genetisch-metabolischer Stoffwechselerkrankungen hingewiesen. Biochemische Untersuchungen verschiedener Enzyme folgten, so auch für die Atmungskettenenzyme (9, 79).

Die Chorionzottenbiopsie wird zwischen der 8. und 12. Schwangerschaftswoche mittels ultraschallkontrollierter transzervikaler Aspiration oder durch Anwendung des Forceps durchgeführt. Die Gefahr eines Aborts nach Chorionzottenbiopsie beträgt etwa 3 %. Eine weitere Möglichkeit der pränatalen Diagnostik bietet die Untersuchung der Amnionzentese. Hierbei werden transabdominell in der 16. Schwangerschaftswoche fetale Zellen gewonnen.

Die pränatale biochemische Diagnostik in Amnionzellen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht empfohlen werden (9, 26). Die Verwendung von Chorionzotten wird in der Literatur verschieden bewertet. So haben die Gruppe um Niers für den Komplex I verlässliche Untersuchungsergebnisse in Chorionzotten erzielt und empfehlen ihren Einsatz in der pränatalen Diagnostik (68). Indessen spricht sich die Gruppe von Faivre et al. gegen eine Verwendung von sowohl Chorionzotten als auch Amnionzellen speziell zur Detektierung eines Komplex-I-Defektes aus (26).

1.5 Therapeutische Möglichkeiten

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine befriedigende Therapie. Die Behandlung ist überwiegend symptomatisch dominiert und ändert nicht signifikant den Verlauf der Erkrankung. Co-Faktoren haben eine positive Wirkung, so z.B. Coenzym Q bei Komplex-III-Mangel oder Riboflavin bei Komplex-I-Mangel. Weiterhin kann durch die Gabe von Antioxidantien und Radikalfängern (wie Pyruvat; Vitamin C, E, A-Derivate; Beta-Karotine; Dichloroacetat und Omega-3-Fettsäuren) die mitochondriale Membran geschützt werden (87, 97). Ebenso therapeutisch sinnvoll ist eine Stimulierung der Glucose-Oxidation über eine Carnitin-, Pyruvat- oder Dichloroacetat-Gabe (48). Damit wird vor allem der Laktatazidose entgegengewirkt. Zu den Ernährungsempfehlungen zählen eine lipidreiche und eine kohlenhydratarme Ernährung, da eine glucosereiche Diät eine Belastung für Patienten mit eingeschränkter oxidativer Phosphorylierung darstellt. Bei bestimmten Medikamenten ist ein negativer Einfluss auf die Atmungskettenfunktion bekannt. So sollten gemieden werden: Barbiturate sowie Valproinsäure (welche die Atmungskette hemmen) und Tetrazykline, sowie Chloramphenicol (welche die mitochondriale Proteinsynthese hemmen).

Die folgenden therapeutischen Maßnahmen befinden sich noch im experimentellen Stadium und kamen bei Patienten bisher nicht zum Einsatz. So wurde beispielsweise eine lokalisierte Muskelnekrose in einer Muskelregion mit mitochondrialer Myopathie induziert (84). Satellitenzellen mit niedrigen Mengen an mutierter mtDNA regenerierten dieses Segment vollständig mit einer daraus resultierenden normalen Atmungskettenfunktion. Ein zweiter therapeutischer Ansatz besteht in der Hemmung der Replikation. Bei In-Vitro-Versuchen wurden dafür synthetische Polyamidnukleinsäuren mit komplementärem Charakter zu bestimmten mtDNA-Abschnitten, welche eine Mutation oder Deletion enthalten, als Antisense-Probe benutzt (91). Die somatische Gentherapie wäre die Therapieform mit einem permanenten Potential. So könnten defekte Gene ersetzt oder repariert werden. Das größte Hindernis besteht allerdings darin, dass es gegenwärtig noch nicht möglich ist, Gene in Mitochondrien einzuführen.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die beiden Enzyme Komplex I (NADH-CoQ-Reduktase) und Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) der Atmungskette in verschiedenen menschlichen Geweben (Skelettmuskulatur, Fibroblasten und Chorionzotten) in Hinblick auf die nachstehend beschriebenen Variablen zu erforschen. Die zu untersuchenden Variablen waren dabei die Nachweisbarkeit, die Proteinkonzentrationsabhängigkeit, die Aktivität, die Haltbarkeit und die Kinetik der Enzymkomplexe. Mit Bezug auf die pränatale Diagnostik sollte die Verwendbarkeit von Chorionzotten geprüft werden.

Die Testansätze wie auch ihre Durchführung wurden anhand von Vorversuchen und der Enzymcharakterisierung optimiert. Weiterhin sollten aus den Aktivitätsbestimmungen gesunder Personen Normbereiche der Aktivitäten für Muskelgewebe, Fibroblasten und Chorionzotten erstellt werden.

Komplex- I - und IV -Mangel stellen die zwei häufigsten Ursachen für Atmungsketten-Defekte dar. Aktivitätsmessungen von Patienten sollten dargestellt und diskutiert werden.

3. Materialien

3.1 Gewebeproben

Biopsien von Fibroblasten und Chorionzotten wurden kultiviert. Bei Zusendung bereits kultivierter Gewebeproben, wurden diese durch Splitting weitergezüchtet.

Neben den Chorionzotten und Fibroblasten erfolgte die Mehrheit der Messungen an Muskelbiopsien. Sofort nach Erhalt der Muskelbiopsien wurden diese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ konserviert.

3.1.1 Präparation der Proben

Wenn in den Kulturflaschen ein mikroskopisch nachweisbarer, dichter Rasen aus Fibroblasten oder Chorionzotten gewachsen ist, können diese Zellen geerntet werden. Die Nährlösung wird vorsichtig abgeschüttet und anschließend zwei bis dreimal mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Dies dient der Reinigung von nekrotischen Zellen und zur Entfernung des Nährmediums, welches als zusätzliches Protein bei der Proteinbestimmung den Wert verfälschen würde. Als nächstes gibt man ein weiteres mal circa fünf bis zehn Milliliter isotone Kochsalzlösung in das Kulturgefäß, so dass der Boden benetzt ist. Mit einem Kratzer, auch als Scraper bezeichnet, löst man die Zellen vom Boden der Flasche ab. Es bilden sich sichtbare Zellschlieren in der Lösung.

Dieses Gemisch überführt man in ein Reagenzglas. Um einen Gewebeverlust zu vermeiden, kann dieser Vorgang wiederholt werden. Das Reagenzglas wird bei 2000 Umdrehungen pro Minute etwa 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch setzt sich am Boden ein Zellhaufen aus Fibroblasten bzw. Chorionzotten ab, der in der Literatur auch als Pellet bezeichnet wird. Der Überstand wird durch sanftes Abschütten vom Pellet getrennt. Auf das Pellet gibt man nun ungefähr 1,3 ml isotone Kochsalzlösung und schüttelt das Gemisch anschließend. Die so in der Lösung verteilten Zellen lassen sich damit sehr gut in das 1,5ml-Eppendorfhütchen überführen. Dieses Hütchen wird nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand abgegossen. Um ihn vollständig entfernen zu können, saugt man übrig gebliebene Flüssigkeitsreste mit Hilfe einer Pipette oder eines Zellstoffstreifens ab. Die Zellpellets können jetzt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Um die Zellpellets wie auch die Muskelbiopsien für die folgenden Enzymmessungen nutzbar zu machen, werden sie als Homogenisat aufgeschlossen. Dies erfolgt durch Sonifizierung. Je nach Größe der Muskelbiopsie und des Pellets gibt man eine entsprechende Menge (zwischen 200 und 400 µl) destilliertes Wasser hinzu. Da destilliertes Wasser im Vergleich zur Zellflüssigkeit hypoton ist, wird ein Teil der Zellen bereits dadurch aufgeschlossen. Die hochkonzentrierten Substanzen innerhalb der Zelle erzeugen eine osmotische Wirkung, d.h. Wasser dringt ein, die Zelle dehnt sich und platzt schließlich.

Die Zellsuspension wird im Eisbad lagernd in circa fünf Intervallen, die maximal 10s lang sein sollten, sonifiziert. Die verwendeten Ultraschwingungen liegen dabei im Frequenzbereich von 10-40 kHz und verursachen starke Druckveränderungen in der Suspension des Zellmaterials. Die Zellen und die Organellen werden damit gut aufgebrochen.

Der Nachteil dieser Methode ist die starke Wärmefreisetzung – deshalb sind die Sonifizierung im Eisbad mit einer kurzen Beschallzeit und dem Einsatz kleiner Volumina einzuhalten. Das Sonifikat wird jetzt für circa fünf Minuten zentrifugiert, um die festen Bestandteile vom Homogenisat zu trennen. Der Überstand wird abgehoben und der sich absetzende feste Bodensatz verworfen.

3.2 Chemikalien

- Antimycin aus *Streptomyces kitazawaensis* (Sigma, Deisenhofen)
- β-NADH (Sigma, Steinheim)
- Cytochrom c (Sigma Chemie, Steinheim)
- Coenzym Q₁₀ (Fluka, Steinheim)
- Coenzym Q₂ (Sigma, Steinheim)
- Cyklohexan (Merck, Darmstadt)
- EDTA (Sigma, St. Louis)
- Ethanol absolut (Merck, Darmstadt)
- Kaliumcyanid (Merck, Darmstadt)
- K₂HPO₄ · 3 H₂O (Merck, Darmstadt)
- KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)
- L-Ascorbinsäure (Sigma Chemie, St. Louis)
- Saccharose (Sigma Chemie, St. Louis)
- Salzsäure 1M (Apotheke Klinik Innenstadt, Pettenkoferstr. 8a)
- Natriumdithionit (Fluka, Steinheim)
- Triton X-100 (Sigma, St. Louis)

3.3 Geräte und Hilfsmittel

- Abzug
- Automatische Kultivierungspipette (Pipetboy acu integra Biosciences)
- Brutkästen für 25, 75 cm² (Costar®)
- Dialysierschlauch (Visking Typ 8/32 Firma Roth)
- Feinwaage (Sartorius Basic)
- Gefrierschrank –20 °C
- Inkubatoren 37 °C (Liebisch)
- Kühlschrank +8 °C
- Lichtmikroskop (Nikon Phase Contrast ELWD 0,3)
- Multipipette (Eppendorf)
- Petrischale (Nunclon TM Surface)
- pH-Meter PHM 82 Standard pH Meter Radiometer Copenhagen
- Photometer Response TM (Gilford) mit Drucker OKI Mikroline 102
- Pipettenspitzen für 2, 5, 10 ml (Costar®)
- Pipetten für 10, 100, 1000µl (Eppendorf)
- Pipettenspitzen 10, 100, 1000µl (Sarstedt)
- Präzisionsküvetten (Hellma)
- Reaktionshütchen (Sarstedt)
- Rührspatel
- Rührgeräte IKAMG RCT und RET (IKA-Labortechnik, Janke & Kunke)
- Scraper
- Sonifikator B-10 (Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut)
- Spektrophotometer Ultraspec Plus 4054 (LKB Biochrom)
- Stoppuhr (Junghans)
- Vortexer (IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel)
- Wasserstrahlpumpe
- Zentrifuge Mikro Rapid/K (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifuge 1300 (Hettich, Tuttlingen)

4. Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Anlegen einer Zellkultur aus Biopsien

Steriles Arbeiten ist die Voraussetzung für die Zellkultivierung, um eine Kontamination mit Bakterien oder Viren zu vermeiden. Die Arbeitsfläche wird dafür mit 70% Alkohol gesäubert und ein Luft-Abzug läuft während des Arbeitsprozesses. Weiterhin einzuhalten ist das sterile Öffnen und Verschließen aller Gefäße, d. h. Gefäßdeckel und Gefäßöffnung werden abgeflammt. Die Pipetten werden vor ihrem Einsatz ebenfalls abgeflammt und sollten nur einmalig verwendet werden.

Mediumherstellung für Fibroblasten:

500 ml Dulbeccos Medium
50 ml Fetal Calf Serum
2 Rörchen L-Glutamin
5 ml Anitbiotikum

Mediumherstellung für Chorionzotten:

100 ml Chang Medium mit L-Glutamin
1,5 ml Penicillin/Streptomycin

Das Medium wird auf Zimmertemperatur angewärmt. Nicht aufgebrauchtes Medium kann im Kühlraum gelagert werden. Brutkästen (Größe: 25 cm²) werden vorbereitet, indem sie beschriftet, ihre Öffnung abgeflammt und sie mit 5 ml Antibiotikummedium gespült werden.

In eine Petrischale gibt man 10 ml vorbereitetes Medium. Nach Abflammen der Biopsienröhrchen entnimmt man 2 ml Probe und gibt diese in die Petrischale. Die Biopsie wird jetzt mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. Dabei ist zu beachten, dass man schneidet und nicht reißt. Die Probe sollte neben dem Zerkleinern auch von Fett und Blut getrennt werden.

Anschließend überführt man 3-4 Probestückchen in den Brutkasten. In dem Brutgefäß sollten die Biopsie-Stückchen nur mit Medium benetzt sein, da zuviel Medium das Absenken und damit das Anwachsen der Biopsien erschwert. Nach 4 Tagen kann ein Anwachsen beobachtet werden. Jetzt kann 1 ml Medium dazugegeben werden. Nach weiteren vier bis fünf Tagen wird das Medium auf 5 ml aufgefüllt. Einmal pro Woche sollte das Medium steril gewechselt werden. Bei der Chorionzottenkultur muss der Mediumwechsel häufiger erfolgen: etwa alle 2-3 Tage. Dabei ist zu beachten, dass das alte Medium mit einer sterilen Pipette abgezogen wird und mit einer neuen sterilen Pipette das frische Medium hinzugefügt wird.

4.1.2 Splitten der Zellkultur

Materialien:

- Trypsin
- PBS
- Medium (Herstellung siehe 4.1.1)

Trypsin wird immer frisch benutzt, d.h. übrig gebliebene Reste dürfen nicht wieder eingefroren werden. Während angebrochene Flaschen PBS und Medium bis zum nächsten Einsatz im Kühlraum gelagert werden können.

Aus der Kulturflasche wird mithilfe einer Pipette das alte Medium abgezogen. Je nach Größe des Kulturgefäßes wird das kleine (25 cm²) mit 2,5 ml PBS und das große (75 cm²) mit 5 ml PBS gespült, um das Medium möglichst vollständig zu entfernen. In die Brutflasche gibt man nun je 2,5 oder 5 ml Trypsin, welches dafür sorgt, dass die Zellen sich ablösen. Die Kulturflasche mit dem Trypsin wird für den Ablösevorgang für drei Minuten in den Brutschrank gestellt.

Dieser Prozess lässt sich mikroskopisch überprüfen. Sollten noch vereinzelt Zellen am Boden des Kulturgefäßes haften, können diese durch Schwenken der Kulturflasche gelöst werden. Anschließend gibt man 2,5 ml (5 ml) Medium hinzu, um den Ablösevorgang zu stoppen. Diese Zellen-Medium-Trypsin-Mischung wird mit einer Pipette in ein Röhrchen überführt und für 5 min bei 500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Das Pellet wird mit 5 ml (10 ml) Medium suspendiert. Jetzt erfolgt das eigentliche Splitten, indem jeweils 2,5 ml (5 ml) Zellen-Suspension auf zwei neue Brutkästen überführt wird. Danach werden die Kulturflaschen mit 2,5 ml (5 ml) Medium aufgefüllt. Die Brutgefäße können nun in den Brutschrank gestellt werden, in dem man sie 30 min lang im geöffneten Zustand zur Begasung belässt und sie danach für den Kultivierungsprozess permanent verschließt.

4.2 Proteinbestimmung

Zur Berechnung der Enzymaktivität benötigt man den Proteingehalt der untersuchten Probe. Dieser wurde nach der Methode von Lowry (52) bestimmt. Dabei reagiert Kupfer mit dem Protein im alkalischen Milieu. Der sich bildende Komplex reduziert das Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz und führt zu einer Farbreaktion, die photometrisch erfasst wird.

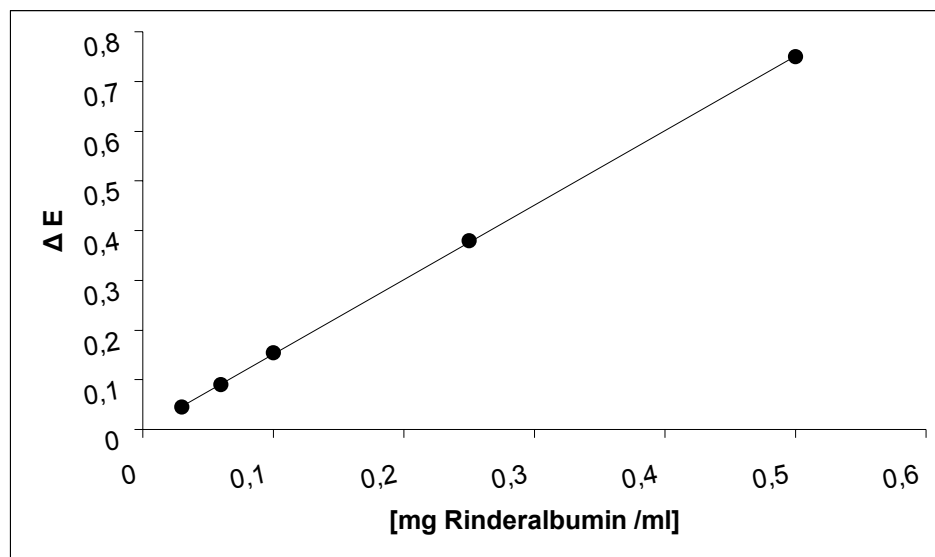
Es werden folgende Lösungen verwendet:

- Reagenz A: 2% Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH
- Reagenz B_a: 5,5 g CuSO_4 in 100 ml H_2O
- Reagenz B_b: 1,35 g Seignettesalz in 100 ml Na-K-Tartrat
- Reagenz C: vor jeder Messung frisch gemischt aus 10 μl B_a + 100 μl B_b + 5 ml A, wobei stets die angegebene Reihenfolge eingehalten werden soll
- Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
- 2% Na_2CO_3

Als Standards dienen:

Die Proteinkonzentration wird aus einer Eichkurve abgelesen. Als Referenzwerte für diese Eichkurve stellt man aus einer Rinderalbuminlösung fünf verschiedene Konzentrationen (0,03 / 0,06 / 0,1 / 0,25 / 0,5 mg Protein/ ml) her.

Abbildung 7: Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Lowry et al.



Zum Ablauf:

Die zu messenden Proben werden so verdünnt, dass die zu erwartende Konzentration zwischen 0,1 – 0,25 mg Protein/ml verdünnt liegt. In diesem Konzentrationsbereich erhält man die genauesten Ergebnisse, weil hier die Eichgerade nahezu linear verläuft.

Sowohl für die Standard- als auch für die Proteinlösungen werden Duplikate verwendet. Man mischt jeweils 20 µl Probenlösung (Rinderalbuminlösung respektive das zu bestimmende Proteingemisch) mit 250 µl Reagenz C und belässt das Gemisch 10 min bei Zimmer-Temperatur.

Anschließend werden 25 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz hinzu gegeben, welches zuvor 1:2 mit 2%igem Na₂CO₃ verdünnt wurde. Dieser Ansatz wird für nochmals 30 bis 35 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

Die Extinktion der Standards und der Proben kann jetzt bei einer Wellenlänge von 734 nm gemessen werden. Als Leerwert dient ein gleich behandelter Ansatz, der statt Protein Wasser enthält.

4.3 Aktivitätsbestimmung der NADH-CoQ-Reduktase (Komplex I)**4.3.1 Reagenzien**

1 Teil	KP _i -Puffer	125 mM,	im Reaktionsgemisch	20,8 mM	mit pH 7,4
1 Teil	Coenzym Q ₁₀	500 µM,	im Reaktionsgemisch	83,3 µM	(Co-Substrat)
1 Teil	Kaliumcyanid	10 mM,	im Reaktionsgemisch	1,7 mM	(Komplex IV – Hemmer)
1 Teil	Antimycin	10 µg/ml,	im Reaktionsgemisch	1,7 µg/ml	(Komplex III – Hemmer)
1 Teil	NADH	0,25 mM,	im Reaktionsgemisch	0,04 mM	(Substrat, Startreagenz)

Die Verdünnungen von NADH und Kaliumcyanid werden frisch hergestellt. Die anderen Substanzen können bei –20°C gelagert werden. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit wird die NADH – Lösung in ein lichtundurchlässiges Eppendorfhütchen gegeben. Sowohl Antimycin als auch Coenzym Q₁₀ sind aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften nicht vollständig in Wasser löslich und müssen daher mit Alkohol verdünnt werden. Bei Coenzym Q₁₀ erfolgt die Verdünnung in einem Alkohol – Wasser – Verhältnis von 1:10 und bei Antimycin von 1:100.

4.3.2 Hilfslösung

Zum Abstoppen der Reaktion nach erfolgter Inkubation wird folgende Stopplösung hergestellt:

- 33 % Ethanol
- 1,2 % Triton X-100
- 0,13 M Tris HCl mit pH 8,0

4.3.3 Durchführung der Aktivitätsmessung

Unter Eiskühlung pipettiert man je 50µl vom KP_i -Puffer, Kaliumcyanid, Antimycin und Coenzym Q_{10} in ein Eppendorfhütchen. Dazu wird nun 50µl Probe und für den Leerwert 50µl H_2O gegeben. Nach Durchmischen mit dem Vortexer folgt eine einminütige Inkubation bei 37°C. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl NADH-Reagenz gestartet. Die Reaktion verläuft sehr schnell und wird nach 30 Sekunden Inkubation abestoppt. Zum Abstoppen überführt man 100µl Reaktionsgemisch in 200µl Stopplösung. Anschließend nach erneutem kurzen Vortexen erfolgt die photometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm. In fast allen Fällen wurden Duplikate von Proben und Leerwerten hergestellt.

4.3.4 Berechnung der Aktivität

Vom Extinktionswert der Probe subtrahiert man den Leerwert, um den Wert ΔE zu erhalten. Mit folgender Formel wird die Enzymaktivität des Komplex I berechnet:

$$E_{NADH} = 6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{nmol/min/mg Protein} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times 1000 \times \text{Gesamtvolumen Reaktionsgemisch [ml]} \times 6}{E_{NADH} \times V_{\text{Probe [ml]}} \times \text{Protein [mg/ml]}}$$

4.4 Aktivitätsbestimmung der Cytochrom-C- Oxidase (Komplex IV)

4.4.1 Reagenzien und Herstellung von reduzierten Cytochrom C

Cytochrom C	3 mM	im Reaktionsgemisch	157 μ M
Vitamin C	2 mg		
K _p -Puffer	10 mM	mit pH 7,0	

Für die Herstellung 3 mM reduzierter Cytochrom-C-Lösung gibt man auf 10 mg angewärmtes Cytochrom C (wenn Purity = 95%, Solvent = 2,8%) 250 μ l 10 mM K_p-Puffer und vortex anschließend das Gemisch. Dieses Gemisch wird nun zum Vitamin C hinzugegeben, das die Reduzierung des Cytochrom C bewirkt. Für diese Reduzierungsreaktion benötigt man 2,5 l 10 mM K_p-Puffer, der als Dialysepuffer dient. Das Cytochrom-Vitamin-C-Gemisch wird in einen Dialyseschlauch gefüllt und ins Dialysebad für 2-mal je 45 min gegeben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Cytochrom C sollte die Dialyse in einem dunklen Raum stattfinden und das entstandene reduzierte Cytochrom in ein lichtgeschütztes Eppendorfhütchen überführt werden. Dieses ist bei -20° C mehrere Monate haltbar.

4.4.2 Testansatz und Messung der Aktivität

Zu 220 ml K_p-Puffer werden 50 μ l Probe gegeben. Die Reaktion wird mit 15 μ l reduziertem Cytochrom C gestartet. Für den Leerwert gibt man statt Protein 50 μ l Aqua bidest. hinzu. Bei einer Wellenlänge von 550 nm wird circa für 120 min der Extinktionsabfall photometrisch gemessen.

4.4.3 Berechnung der Aktivität

Der höchste Betrag des Extinktionsabfalls geht in die Aktivitätsberechnung ein. Von diesem zieht man den zugehörigen Leerwert ab und erhält den Wert für ΔE . Mit der folgenden Formel wird die Enzymaktivität des Komplex IV berechnet: μ

$$E_{\text{Cytochrom}} = 21,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{mol/min/mg Protein} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times 1000 \times \text{Gesamtvolumen Reaktionsgemisch [ml]}}{E_{\text{Cytochrom}} \times V_{\text{Probe [ml]}} \times \text{Protein [mg/ml]}}$$

5. Ergebnisse

5.1 Enzymanalyse der NADH-CoQ-Reduktase

5.1.1 Aktivität

Gewebe	Bereich [nmol/min/mg Protein]	Mittelwert	Anzahl	Standardabweichung
Skelettmuskel	185,3 - 484	302,9	12	80,4
kult. Fibroblasten	101 – 205,7	141,3	14	28,4
kult. Chorionzotten	102,6 – 115,4	109,3	4	4,5

Tabelle 7: Aktivität der NADH-CoQ-Reduktase gemessen im Muskelgewebe, in kultivierten Fibroblasten und kultivierten Chorionzotten

Tabelle 7 gibt Auskunft über den für jedes Gewebe ermittelten Aktivitätsbereich, über die Anzahl der gemessenen Proben, den Mittelwert und über die Standardabweichung. Duplikate von ein und demselben Gewebe gehen in die Berechnung gemittelt als eine Messung ein. Die höchsten Aktivitäten ließen sich im energiebedürftigsten Gewebe, dem Skelettmuskel nachweisen.

5.1.2 Proteinkonzentrationsabhängigkeit

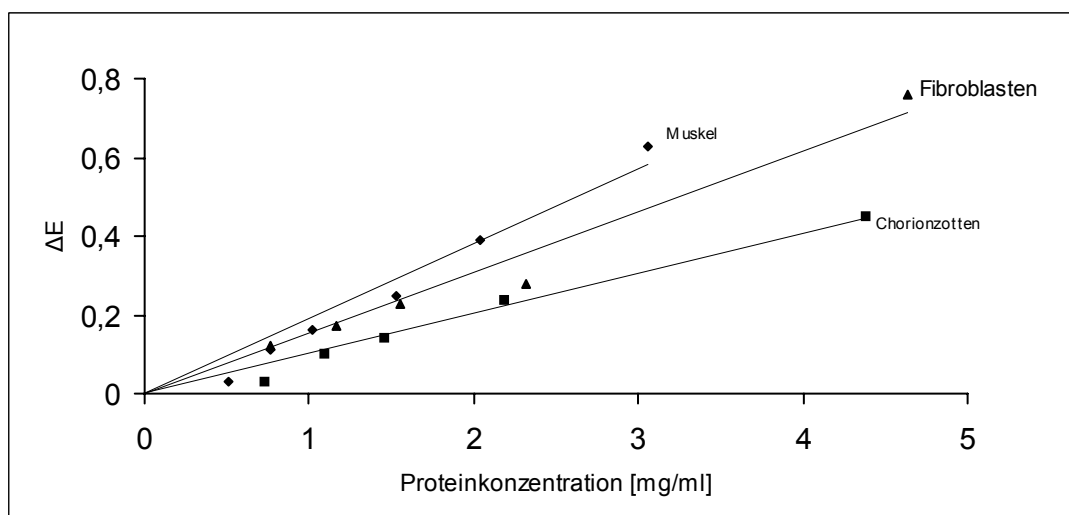


Abbildung 8: Proteinkonzentrationsabhängigkeit im Muskelgewebe, in kultivierten Fibroblasten & Chorionzotten

In allen Geweben ist ein linearer Anstieg der Extinktion mit zunehmender Proteinkonzentration zu beobachten (Abbildung 8). Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde die Proteinkonzentration im linearen Bereich verwendet.

5.1.3 Stabilität

Nach Bestimmung eines Ausgangswertes wurde die Aktivität der Reduktase im Muskel-, Fibroblasten- und Chorionzotengewebe in unterschiedlich langen Zeitintervallen erneut gemessen. Dabei wurde dasselbe Gewebehomogenisat zwischenzeitlich bei -20°C eingefroren und für die Untersuchung bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut. Die Aktivität aller drei Gewebe sank mit der Häufigkeit des Einfrier- und Auftauprozesses sowie mit der Dauer des Einfrorenseins. Demzufolge ist dieser Enzymkomplex als sehr instabil einzuschätzen.

Am instabilsten zeigte sich die muskuläre NADH-CoQ-Reduktase (Tabelle 8a-b). Nach 38 bzw. 39 Tagen tiefgefrorener Lagerung war nur noch 19,7 % bzw. 20,5 % der anfänglichen Aktivität nachweisbar. Stabiler zeigte sich der Komplex in den Fibroblasten (Tabelle 9a-b). Hier betrug die Aktivität nach einer Lagerung von 118 Tagen und 2-maligem Auftauen noch über 50 % der Anfangsaktivität, während sie beim Muskel gerade noch 3,9% bzw. 3,2% der anfänglich gemessenen Aktivität betrug. Vergleicht man den Aktivitätsabfall von kultivierten Chorionzotten nach 38 Tagen (Tabelle 10) mit dem im Muskelgewebe und in kultivierten Fibroblasten, so verlieren sie 60% ihrer ursprünglichen Aktivität und nehmen damit eine Mittelstellung ein.

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [nmol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	224	100
37 Tage später (38. Tag)	1x	44,2	19,7
80 Tage später (118. Tag)	2x	8,8	3,9

Tabelle 8a: Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Muskelgewebshomogenisat A (Poteinkonzentration: 2,04 mg/ml) mit 250 μ M NADH

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [nmol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	270	100
38 Tage später (39. Tag)	1x	55,6	20,5
80 Tage später (119. Tag)	2x	8,8	3,2

Tabelle 8b: Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Muskelgewebshomogenisat B (Poteinkonzentration: 2,05 mg/ml) 200 μ M NADH mit 200 μ M NADH

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [nmol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	85,4	100
38 Tage später (39. Tag)	1x	58,1	68,0
80 Tage später (119. Tag)	2x	49,0	57,4

Tabelle 9a: Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Fibroblastenhomogenisat A (Poteinkonzentration: 5,27 mg/ml) mit 200 μ M NADH

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [nmol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	70,9	100
38 Tage später (39. Tag)	1x	55,2	77,8
80 Tage später (119. Tag)	2x	41,8	58,9

Tabelle 9b: Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Fibroblastenhomogenisat B (Poteinkonzentration: 4,02 mg/ml) mit 200 μ M NADH

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [nmol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	109,6	100
38 Tage später (39. Tag)	1x	43,8	40,0

Tabelle 10: Stabilität der NADH-CoQ-Reduktase im Chorionzottenhomogenisat (Poteinkonzentration: 2,19 mg/ml) mit 250 μ M NADH

5.1.4 Inkubationszeitabhängigkeit

Zur Bestimmung der Inkubationsdauer wurden Muskel- und Fibroblastenproben jeweils 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 Sekunden lang inkubiert, bevor die Reaktion mit der Stopplösung beendet wurde. Dabei wurde geprüft, wie sich die Dauer der Kontaktzeit des Enzyms mit dem Substrat NADH und dem Co-Substrat Coenzym Q₁₀ auf die Aktivität der NADH-CoQ-Reduktase im jeweiligen Gewebe auswirkt. Es zeigte sich, dass die Aktivität mit der Länge der Inkubationszeit sowohl im Muskel- wie auch im Fibroblastengewebe abnahm.

Die Reaktion verläuft demzufolge sehr schnell (im Sekundenbereich).

Entsprechend der Grafen in den Abbildungen 9 und 10, ist also eine möglichst kurze Inkubationszeit wünschenswert. So wurde für alle Versuche die kürzest mögliche Inkubationszeit von jeweils 30 Sekunden gewählt. Aus Gründen des optimalen Handlings und der Durchführbarkeit (Zeit für die Vorbereitung des Stoppvorgangs) war eine kürzere Inkubationszeit nicht umsetzbar.

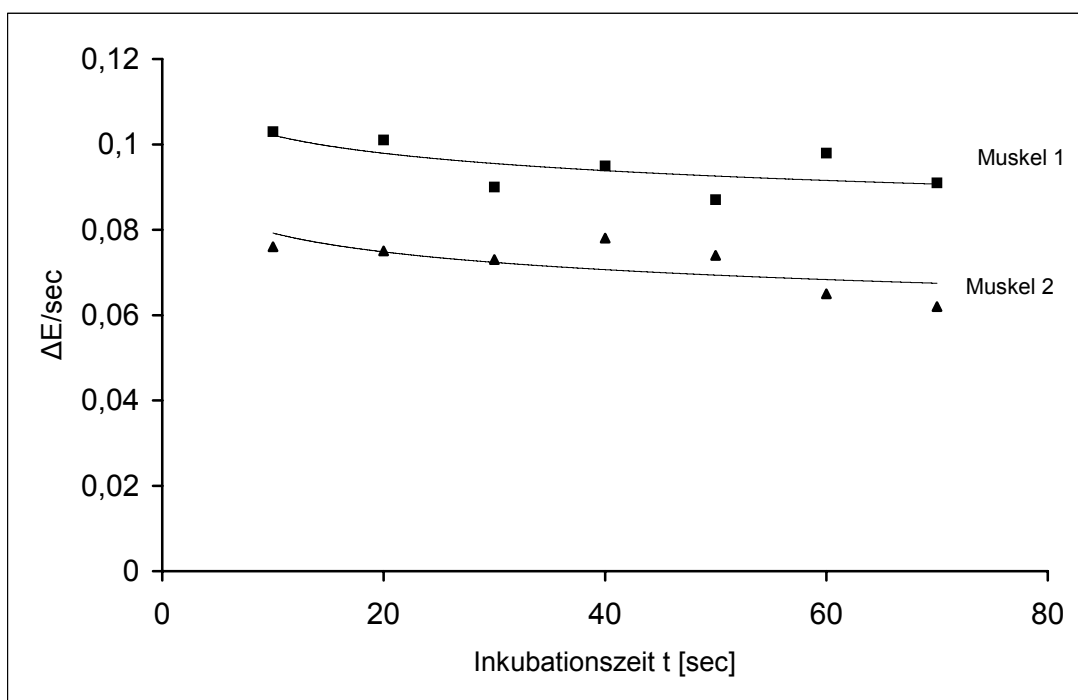


Abbildung 9: Inkubationszeitabhängigkeit der NADH-CoQ-Reduktase im Muskelgewebe

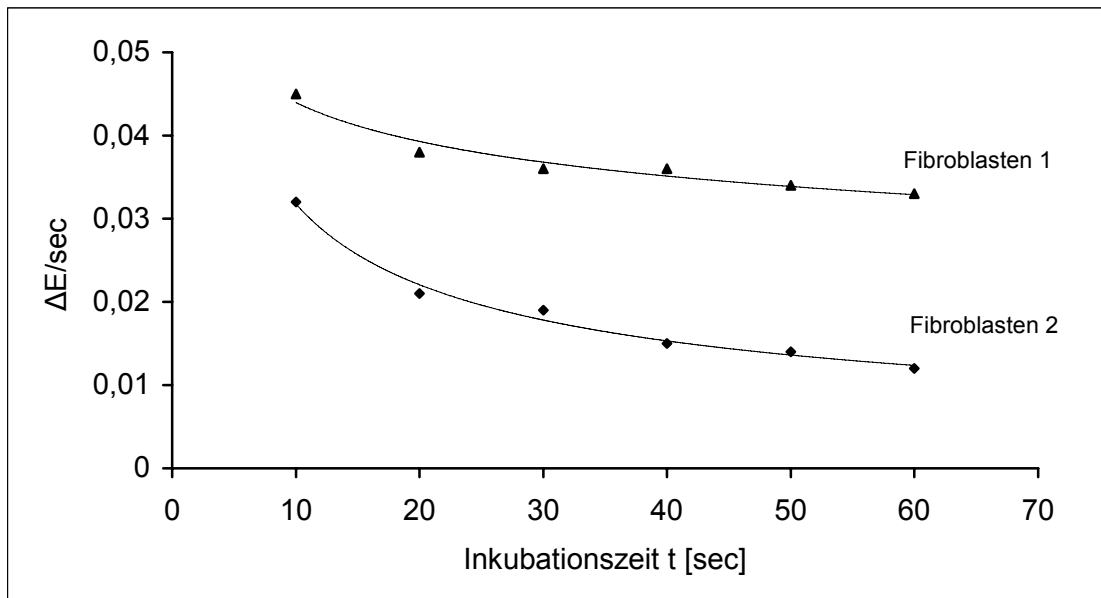


Abbildung 10: Inkubationszeitabhängigkeit der NADH-CoQ-Reduktase in Fibroblasten

5.1.5 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der Enzymkinetik wurde zum einen, bei sich ändernder Konzentration des Co-Substrats Ubichinon, und zum anderen bei sich ändernder Konzentration des Substrates NADH, während die anderen Parameter konstant blieben, die Aktivität gemessen.

5.1.5.1 Affinität zum Co-Substrat Ubichinon

Zugegebenes Ubichinon [μM]	Endkonzentration Ubichinon [μM]	Aktivität [$\text{nmol}/\text{min}/\text{mg Protein}$]
100	16,7	404,7
75	12,5	367,4
50	8,3	306
25	4,2	227,9

Tabelle 11 a: NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung im Muskelgewebe in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ubichinon-Konzentrationen

Zugegebenes Ubichinon [μM]	Endkonzentration Ubichinon [μM]	Aktivität [nmol/min/mg Protein]
100	16,7	169,7
75	12,5	177,9
50	8,3	159,3
25	4,2	148,9

Tabelle 11 b: NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Fibroblasten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ubichinon-Konzentrationen

Zugegebenes Ubichinon [μM]	Endkonzentration Ubichinon [μM]	Aktivität [nmol/min/mg Protein]
75	12,5	147,9
50	8,3	131,5
25	4,2	115,1

Tabelle 11 c: NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Chorionzotten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ubichinon-Konzentrationen

Die verschiedenen Ubichinon-Konzentrationen mit den jeweils gemessenen Aktivitäten werden doppeltreziprok, gemäß der Methode nach Lineweaver und Burk, in ein Diagramm aufgetragen. Abbildung 11 zeigt diese Darstellung aus den Kehrwerten der Tabellen 11a-b.

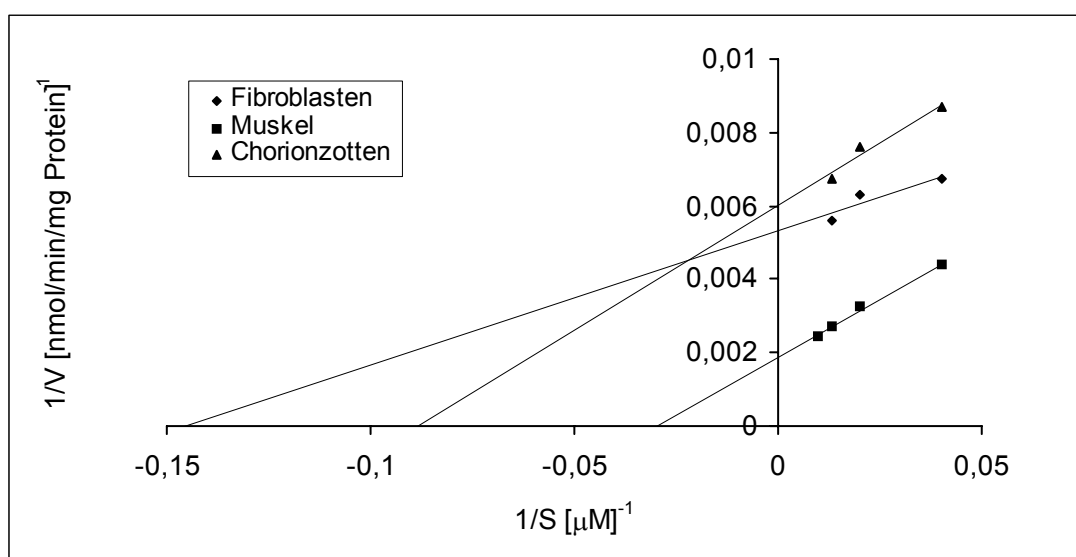


Abbildung 11: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Komplex-I-Kinetik bei variabler Ubichinonkonzentration im Muskelgewebe, Fibroblasten und Chorionzotten

Mittels linearer Regression lassen sich dann folgende theoretischen Maximalaktivitäten und K_m -Werte für das Co-Substrat Ubichinon berechnen:

NADH-CoQ-Reduktase im Muskel:

$$1/V = 0,0631 \times 1/S + 0,0019$$

$$\Rightarrow K_m = 33 \mu\text{M}$$

$$\Rightarrow V_{\text{max}} = 526 \text{ nmol/min/mg Protein}$$

NADH-CoQ-Reduktase in Fibroblasten:

$$1/V = 0,0366 \times 1/S + 0,0053$$

$$\Rightarrow K_m = 6,9 \mu\text{M}$$

$$\Rightarrow V_{\text{max}} = 188,7 \text{ nmol/min/mg Protein}$$

NADH-CoQ-Reduktase in Chorionzotten:

$$1/V = 0,0681 \times 1/S + 0,006$$

$$\Rightarrow K_m = 11,35 \mu\text{M}$$

$$\Rightarrow V_{\text{max}} = 166,7 \text{ nmol/min/mg Protein}$$

5.1.5.2 Affinität zum Substrat NADH

Zugegebenes NADH [mM]	Endkonzentration NADH [mM]	Aktivität [nmol/min/mg Protein]
1,0	0,16	701,6
0,5	0,08	421
0,25	0,04	411,3

Tabelle 12 a: NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung im Muskelgewebe in Abhängigkeit von unterschiedlichen NADH-Konzentrationen

Zugegebenes NADH [mM]	Endkonzentration NADH [mM]	Aktivität [nmol/min/mg Protein]
0,75	0,125	145,7
0,375	0,063	114,5
0,189	0,0315	65,9
0,09	0,015	55,5

Tabelle 12 b: NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Fibroblasten in Abhängigkeit von unterschiedlichen NADH-Konzentrationen

Zugegebenes Ubichinon [mM]	Endkonzentration Ubichinon [mM]	Aktivität [nmol/min/mg Protein]
0,375	0,063	122,7
0,189	0,0315	87,8

Tabelle 12 c: NADH-CoQ-Reduktase-Aktivitätsveränderung in Chorionzotten in Abhängigkeit von unterschiedlichen NADH-Konzentrationen

In Abbildung 12 sind gemäß der Methode nach Lineweaver und Burk die NADH-Konzentrationen mit den jeweils gemessenen Aktivitäten doppeltreziprok aufgetragen.

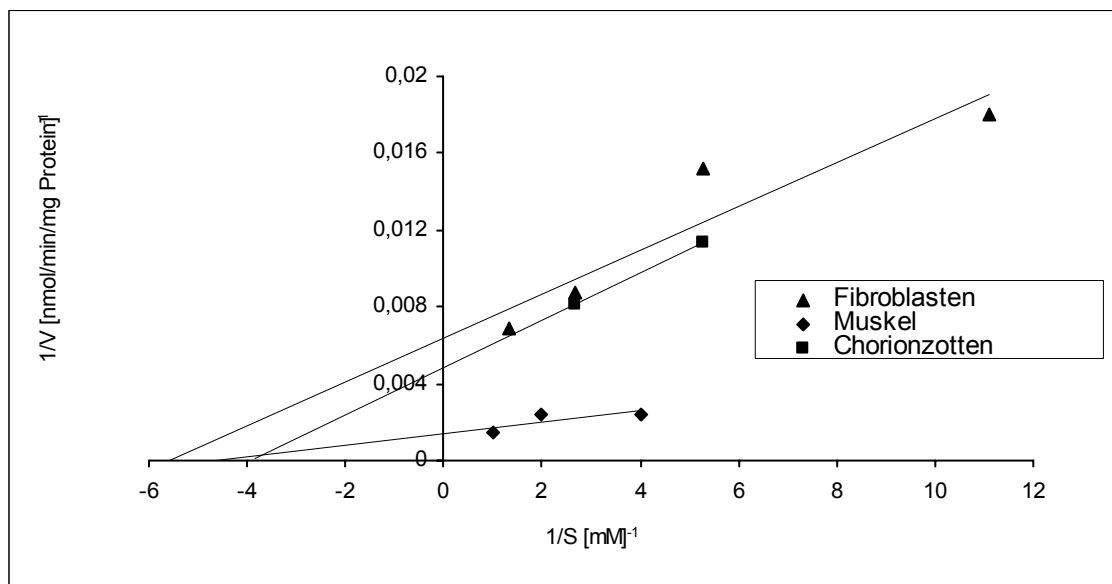


Abbildung 12: Lineweaver-Burk-Diagramm für die NADH-CoQ-Reduktase-Kinetik bei variabler NADH-Konzentration im Muskelgewebe, Fibroblasten und Chorionzotten

Für das Substrat NADH der NADH-CoQ-Reduktase ergeben sich aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm folgende K_m - und V_{max} -Werte:

NADH-CoQ-Reduktase im Muskel:

$$1/V = 0,00031/S + 0,0014$$

$$\Rightarrow K_m = 0,22 \text{ mM}$$

$$\Rightarrow V_{max} = 714 \text{ nmol/min/mg Protein}$$

NADH-CoQ-Reduktase in Fibroblasten:

$$1/V = 0,0011/S + 0,0064$$

$$\Rightarrow K_m = 0,17 \text{ mM}$$

$$\Rightarrow V_{max} = 156,25 \text{ nmol/min/mg Protein}$$

NADH-CoQ-Reduktase in Chorionzotten :

$$1/V = 0,0012x + 0,0049$$

$$\Rightarrow K_m = 0,24 \text{ mM}$$

$$\Rightarrow V_{max} = 204,1 \text{ nmol/min/mg Protein}$$

Das Muskel- wie auch das Chorionzottengewebe haben eine niedrigere Affinität zu NADH als die Fibroblasten. Im normalen Ansatz wurden 0,25 mM Substrat verwendet.

5.1.6 Patienten

5.1.6.1 Patient I.C.

Bei diesem 4,5 jährigen Jungen türkischer Abstammung beobachtete man eine schnelle körperliche Erschöpfung nach Belastung. Die grob-motorische Entwicklung war verzögert. Erst im Alter von 22 Monaten begann er mit dem Laufen. Laborchemisch waren folgende Werte erhöht: Kreatinkinase, ASAT, ALAT und Triglyceride. Das EMG war ohne pathologischen Befund. Molekulargenetisch konnte die Duchenne-Muskeldystrophie als mögliche Ursache ausgeschlossen werden. Familienanamnestisch litt die Mutter des Jungen an einer einseitigen Ptosis. Die Eltern des Kindes waren Cousine und Cousin ersten Grades. Biochemisch fand sich in der Muskelbiopsie eine deutliche Herabsetzung der Komplex-I-Aktivität auf 45,2/49,3 nmol/min/mg Protein. Die Aktivität von COX lag mit 15,6 nmol/min/mg Protein im mittleren Normbereich.

5.1.6.2 Patient A.K.

Bei diesem 22jährigen Mann (ebenfalls türkischer Herkunft) begann die Symptomatik vor 6 Jahren mit Schwierigkeiten beim Gehen. Seit einem Jahr war eine zentrale halbseitige Fazialisparese hinzugetreten. Der Patient hatte außerdem beidseits ptotische Augenlider. Die Plasmalaktatwerte waren immer um das zwei bis dreifache erhöht. Geringfügig erhöht zeigten sich das Plasmapyruvat sowie die Kreatinkinase. Familienanamnestisch fanden sich bei der Mutter und dem Bruder des Patienten ähnliche Beschwerden allerdings mit milderer Ausprägung. Die biochemische Untersuchung der Muskelbiopsie ergab eine Herabsetzung der Aktivität der NADH-CoQ-Reduktase auf 57,0/60,8 nmol/min/mg Protein. Die Aktivität von COX lag mit 12,0 nmol/min/mg Protein im mittleren Normbereich.

5.2 Enzymanalyse der Cytochrom C- Oxidase

5.2.1 Normwerte

Tabelle 13 zeigt den für jedes Gewebe ermittelten Aktivitätsbereich, den dazugehörigen Mittelwert, die Anzahl der gemessenen Proben und die Standardabweichung vom jeweils berechneten Mittelwert. Bei mehreren Sonifikaten von ein und demselben Gewebe gehen diese gemittelt als eine Messung in die Wertung ein. Die höchsten gemessenen Aktivitäten der Cytochrom C- Oxidase wurden im stark energieabhängigen Muskelgewebe bestimmt.

Gewebe	Bereich [mol/min/mg Protein]	Mittelwert	Anzahl	Standardabweichung
Muskel	1,5 - 34,8	11,3	70	12,8
kult. Fibroblasten	1,3 - 12,6	5,7	35	2,9
kult. Chorionzotten	3,6 - 17,1	10,7	7	5,1

Tabelle 13: Normalwerte von COX mit Mittelwert und Standardabweichung im Muskelgewebe, in kultivierten Fibroblasten und Chorionzotten

5.2.2 Proteinkonzentrationsabhängigkeit

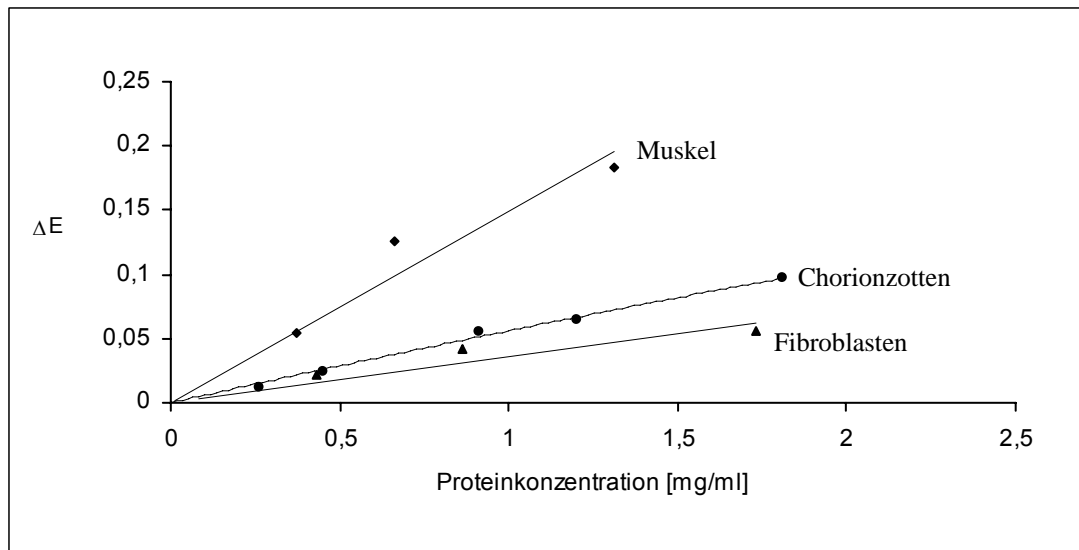


Abbildung 13: Proteinkonzentrationsabhängigkeit im Muskelgewebe, kultivierten Fibroblasten & Chorionzotten

Die Extinktionsänderung wurde in Abhängigkeit von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen im Muskel-, Fibroblasten- und Chorionzottenonifikat untersucht. Die Absorptionsänderung steigt bei allen Geweben mit der Proteinkonzentration linear an. Wobei der Skelettmuskel den stärksten Anstieg zu verzeichnen hat. Kultivierte Fibroblasten und Chorionzotten weisen annähernd die gleiche Steigung auf. Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde die Proteinkonzentration im linearen Bereich gewählt.

5.2.3 Stabilität

In diesem Versuch wurde überprüft, wie sich das Enzym auf Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und nach mehrmaligem Auftauen verhält. Nach Bestimmung des Ausgangswertes wurde das Sonifikat eingefroren und nach verschiedenen langen Zeitabschnitten erneut zur Aktivitätsmessung aufgetaut. Alle drei Gewebe verloren mit der Häufigkeit des Einfrierens und Wiederauftauens an Aktivität. (Tabelle 14a-c). Ein sehr hoher Aktivitätsverlust wurde dabei im Muskelsonifikat nachgewiesen, wobei die Aktivität nach 91 Tagen Lagerung und dreimaligen Einfrieren und Auftauen gerade noch 6,5 % der Aktivität des frischen Sonifikats betrug. In Tabelle 15 wurde zusammengefasst, wie sich die Enzymaktivität einer Muskelbiopsie nach längerer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ verhält. Trotz dieses Konservierungsversuches ohne zwischenzeitliches Auftauen nahm die Aktivität nach einem Jahr auf 16,7% respektive 22,4% der anfänglichen Aktivität ab. Allerdings war der Aktivitätsverlust geringer als bei dem Muskelsonifikat (Tabelle 14a), welches indessen kürzere Zeit (91 Tage) eingefroren war, aber dafür dreimalig eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Hier waren nur noch 6,5 % der Ausgangsaktivität messbar.

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [mol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	30,84	100,0
17 Tage später (18. Tag)	1x	11,02	35,7
18 Tage später (36. Tag)	2x	4,00	13,0
55 Tage später (91. Tag)	3x	2,00	6,5

Tabelle 14a: Stabilität von COX im Muskelgewebssonifikats (Poteinkonzentration: 0,62 mg/ml)

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [mol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	10,07	100
7 Tage später (8. Tag)	1x	5,8	57,6
22 Tage später (30. Tag)	2x	5,5	54,6

Tabelle 14b: Stabilität von COX im Fibroblastensonifikat (Poteinkonzentration: 1,40 mg/ml)

Zeitpunkt der Messung	Häufigkeit des Auftauens	Aktivität absolut [mol/min/mg Protein]	Aktivität prozentual (%)
Sonifikationstag (1.Tag)	0	3,6	100
44 Tage später (45. Tag)	1x	2,2	61,1

Tabelle 14c: Stabilität von COX im Chorionzottensonifikat (Poteinkonzentration: 2,1 mg/ml)

	Aktivität absolut [mol/min/mgProtein] nach Erhalt der Muskelbiopsie	Aktivität absolut [mol/min/mgProtein] nach 1y 19d - Lagerung	Aktivität prozentual (%) nach 1y 19d - Lagerung
Muskel 1	30,84	5,15	16,7

	Aktivität absolut [mol/min/mgProtein] nach Erhalt der Muskelbiopsie	Aktivität absolut [mol/min/mgProtein] nach 1y 84d Lagerung	Aktivität prozentual (%) nach 1y 84d Lagerung
Muskel 2	34,77	7,8	22,4

Tabelle 15: Stabilität von COX in der Muskelbiopsie nach längerer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.2.4 Enzymkinetik

Bei allen Geweben (Tabelle 16a, 17) hatte Komplex IV seine höchste gemessene Aktivität bei einer Substratkonzentration von 1,5 mM Cytochrom C.

Zugegebenes Cytochrom C [mM]	Endkonzentration Cytochrom C [μM]	Aktivität [mol/min/mg Protein]
1,5	79	16
0,3	15,8	11
0,15	7,9	5,3
0,01	5,2	2,1

Tabelle 16 a: COX-Aktivitätsveränderung im Muskel I in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytochrom-C-Konzentrationen

Zugegebenes Cytochrom C [mM]	Endkonzentration Cytochrom C [μM]	Aktivität [mol/min/mg Protein]
3,0	158	4
0,75	39,5	17,5
0,15	7,9	8

Tabelle 16 b: COX-Aktivitätsveränderung im Muskel II in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytochrom-C-Konzentrationen

Zugegebenes Cytochrom C [mM]	Endkonzentration Cytochrom C [μ M]	Aktivität [mol/min/mg Protein]	
		Fibroblasten	Chorionzotten
3,0	158	3,3	6,4
1,5	79,0	11,6	14,5
0,75	39,5	10,7	13,2
0,375	19,7	10,0	9,4
0,15	7,9	8,2	7,3

Tabelle 17: COX-Aktivitätsveränderung in kultivierten Fibroblasten und Chorionzotten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Cytochrom C Konzentrationen

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante K_m und der maximalen Substratumsatz-Geschwindigkeit V_{max} wurden die Kehrwerte der Reaktionsgeschwindigkeit und der Substratkonzentration aus den Tabellen 16a-b und 17 entsprechend der Methode nach Lineweaver und Burk in ein Diagramm (Abbildung 14, 15) aufgetragen. COX der Muskelgewebs-Proben hat verglichen zum Chorionzotten- und Fibroblasten-COX die höhere theoretische Maximalaktivität V_{max} und den höheren K_m -Wert.

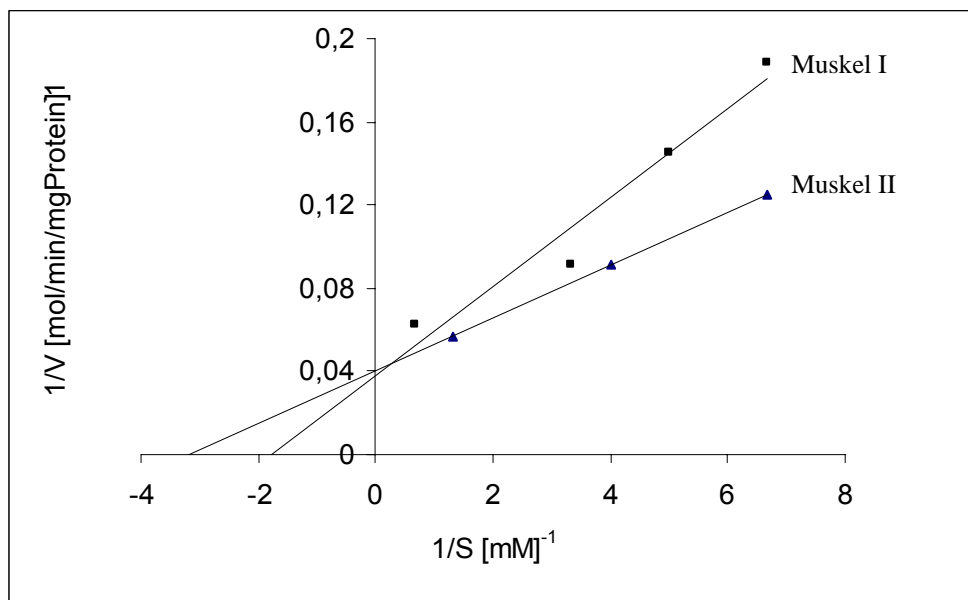


Abbildung 14: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik von COX im Muskelgewebe

Die Michaelis-Konstante K_m und die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit V_{max} für das Substrat Cytochrom C der Cytochrom-C-Oxidase bei den untersuchten Muskel-Proben lauten:

$$\begin{aligned} \text{Muskel I:} \quad 1/V &= 0,0214 \times 1/S + 0,038 \\ \Rightarrow K_m &= 0,5 \text{ mM} \\ \Rightarrow V_{max} &= 26,3 \text{ mol/min/mg Protein} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Muskel II:} \quad 1/V &= 0,0127 \times 1/S + 0,042 \\ \Rightarrow K_m &= 0,3 \text{ mM} \\ \Rightarrow V_{max} &= 23,8 \text{ mol/min/mg Protein} \end{aligned}$$

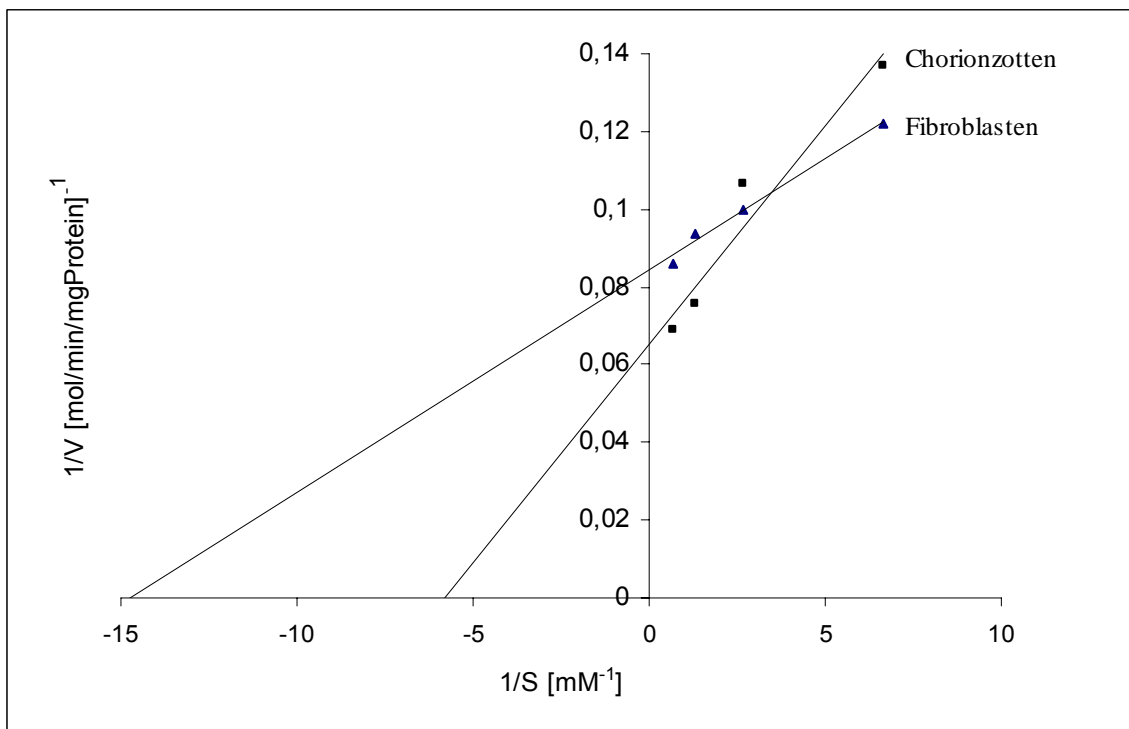


Abbildung 15: Lineweaver-Burk-Diagramm für die Kinetik von COX in kultivierten Chorionzotten & Fibroblasten

Es lassen sich folgende Werte für die Michaelis-Konstante K_m und die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit V_{\max} in den kultivierten Zellen berechnen:

$$\begin{aligned} \text{Fibroblasten: } 1/V &= 0,0057 \times 1/S + 0,0842 \\ &\Rightarrow K_m = 0,07 \text{ mM} \\ &\Rightarrow V_{\max} = 11,9 \text{ mol/min/mg Protein} \\ \text{Chorionzotten: } 1/V &= 0,0113 \times 1/S + 0,0651 \\ &\Rightarrow K_m = 0,17 \text{ mM} \\ &\Rightarrow V_{\max} = 15,4 \text{ mol/min/mg Protein} \end{aligned}$$

Das Muskelgewebe hat eine niedrigere Affinität zum Substrat Cytochrom C als die Fibroblasten und Chorionzotten. Im normalen Ansatz wurden 3,0 mM Substrat verwendet.

5.2.5 Patientin J.M.

In der Vorsorgeuntersuchung U2 des Säuglings fiel eine muskuläre Hypotonie auf. Nach einem stattgehabten Krampfanfall wurde das Kind für einen Tag intensivmedizinisch in einem Klinikum in Trier behandelt, wo es im Alter von 10 Lebenstagen verstarb. Laborchemisch stellte sich eine rasch progrediente Azidose dar. Trotz Pufferung dieser Azidose mit Natrium- Bicarbonat und später dreimolaren Thrometamol kam es nur vorübergehend und nur zu einer geringfügigen Besserung dieser Stoffwechsellage. Zur günstigen Beeinflussung der Acidoseentwicklung wurde außerdem die Glucosezufuhr reduziert, worauf sich aber keine eindeutige Besserung zeigte. Der pH-Wert lag zeitweise bei 7,03 mit einem Basenüberschuß von -24mmol/l. Das Kind fiel in einen komatösen Zustand mit Muskeltonuserhöhung, Ateminsuffizienz, verschlechterter Mikrozirkulation und Akrozyanose. Es musste daraufhin intubiert und beatmet werden. Im weiteren Verlauf des stationären Aufenthaltes bis zum Exitus des Kindes hatte es einen hohen Sauerstoffbedarf (60-100%). Ferner fand sich ein blass-gelbliches Hautcolorid, eine träge Spontanmotorik und verzögernd reagierende mittelweite Pupillen. In der Schädelsonographie stellten sich ein vergrößerter rechter Ventrikel und eine große Zyste unklarer Genese dar. Der durchgeführte Rachenabstrich- und Hautabstrich ergab Streptokokken der Gruppe B in hoher Keimzahl. Daraufhin leitete man eine antibiotische Therapie ein. Am Abend vor dem Exitus präsentierte sich das klinische Bild eines akuten Nierenversagens mit Anurie und Anstieg des Serumkreatinins. Es ist nicht klar, ob dieses primär aufgetreten ist oder sekundär als Folge der antibiotischen Therapie.

Aus dem uns zugesandten biopsierten Muskel- und Lebergewebe (Autopsie) konnte biochemisch eine Glykogenose ausgeschlossen werden. Pathologisch war die nicht messbare Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität. Folglich kann bei der geschilderten Klinik am ehesten von einem defekten COX-Komplex ausgegangen werden, der zur Stoffwechsellage führte. Differentialdiagnostisch käme auch eine Sepsis in Betracht.

6. Diskussion

6.1 Methode

Neben den in der Einleitung bereits erläuterten morphologischen Untersuchungen (lichtmikroskopische RRF-Darstellung im Skelettmuskel, elektronenmikroskopisch veränderte Mitochondrienmorphologie) stellt die Enzymanalyse im großem Feld der diagnostischen Möglichkeiten zur Untersuchung der Atmungskettendefekte eine weitere sensitive Methode dar. Sie weist allerdings eine geringere Spezifität als die genetische Diagnostik auf und sollte wenn möglich durch diese ergänzt werden. Allerdings kompliziert der hohe Grad an Polymorphismus der mtDNA die Deutung einer Mutation, die bei Patienten mit einer Erkrankung gefunden wird (66).

Eine Schwachstelle, sowohl für die molekulargenetische wie auch die biochemische Untersuchung, begründet sich aus der zufälligen Verteilung der Mitochondrien auf die Zellen und der damit verbundenen unterschiedlichen Mitochondrienpopulationen im gleichen Gewebe. Infolgedessen kann nicht immer davon ausgegangen werden, dass das zu untersuchende biospierte Gewebe einen ausreichenden Anteil an geschädigter DNA für die Molekulargenetik, sowie eine ausreichende Fraktion an abnormalen Mitochondrien für die Enzymanalyse enthält. So können die isolierten Mitochondrien gelegentlich nicht repräsentativ für die gesamte Mitochondrien-Population sein. Es empfiehlt sich daher, möglichst kombinierte morphologische, biochemische und molekulargenetische Untersuchungen durchzuführen.

Die in dieser Arbeit verwendete biochemische Methode, sowohl zur Bestimmung der Komplex-I-Aktivität wie auch zur Komplex-IV-Aktivität, basiert auf dem Prinzip der photometrischen Konzentrationsbestimmung, der durch die Enzymreaktion umgewandelten Substrate NADH sowie Cytochrom C. Mittels Filter werden definierte enge Wellenbereiche des Lichtes eingestellt. Für die Oxidierung von NADH zu NAD ist die Wellenlänge bei 340nm und für die Oxidierung von Cytochrom C bei 550 nm festgelegt. Die Substrate werden als Startreagenz in das Reaktionsgemisch mit dem zu untersuchendem Gewebehomogenisat gegeben.

Um die äußere Mitochondrienmembran für extern zugeführtes Cytochrom C durchgängiger zu machen, schlagen Rustin et al. vor (78 S. 43), dem Reaktionsgemisch Lauryl-Maltosid zu zugeben. Bei zukünftigen Untersuchungen könnte somit ein Vergleich der Cytochrom-C-Oxidation mit und ohne Lauryl-Maltosid Auskunft über die Einheit der äußeren Mitochondrienmembran geben.

Das Gewebe wurde in unseren Untersuchungen mittels Sonifizierung aufgeschlossen. In der Literatur wird aber überwiegend eine Isolierung der Mitochondrien für die biochemische Analyse favorisiert (75, 82, 83, 99).

Für das unbehandelte Homogenisat spricht, dass keine pathologischen Mitochondrien verloren gehen. So konnten Servidei et al. (82 S. 59) bei der Aktivitätsbestimmung von COX im unbehandelten Muskel-Homogenisat eine Aktivitätsverminderung der normalen mittleren Aktivität auf 44% und bei isolierten Mitochondrien auf nur 30% aufzeigen.

Gegen das unbehandelte Gewebehomogenisat spricht der mögliche Überschuss an fibrösem Bindegewebe bzw. Fettgewebe. Die Messung wird dann durch die verminderte Anzahl der zu untersuchenden Mitochondrien und der falsch zu hohen Proteinwerte verfälscht. Deshalb sollte im Vorfeld des Homogenisierens (besonders bei Muskelbiopsien) das Gewebe so rein wie möglich sein.

Dieses Problem stellt sich bei kultivierten Zellen nicht. Hier wurde vielmehr festgestellt, dass einige Defekte der Atmungskette sich nicht regelmäßig in kultivierten Fibroblasten (83, 75, 31, 93) und Myoblasten (83) manifestieren. Ob dieser Umstand auch für kultivierte Chorionzotten zutrifft, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Es ist also davon auszugehen, dass die pränatale Diagnostik mittels kultivierter Chorionzotten zum jetzigen Zeitpunkt eher als unsicher zu bewerten ist. Empfehlenswert wäre folglich, die sofortige Aktivitätsbestimmung nach Entnahme der Chorionzotten. Es gibt hinweisende Ergebnisse, dass die Gabe von Uridin (200µM) zum Kulturmedium, die Expression der Atmungskettenenzym-Defekte in kultivierten Fibroblasten erhält, vorausgesetzt es wird frühzeitig hinzugegeben (31).

Studien der Gruppe um Hanna et al. dagegen widerlegten die Wirkung des Uridins bei einem COX-Defekt sowohl in kultivierten Fibroblasten als auch in kultivierten Chorionzotten (37 S. 32). Trotz Uridingabe fehlte die COX-Mutation in den kultivierten Zellen.

Da die Genauigkeit der Methoden von der Proteinkonzentration, der Lagerungsstabilität und bei Komplex I auch von der Inkubationszeit abhängig ist, wurden Vorversuche gemacht, um jeweils optimale Bereiche für jene Parameter zu erfassen. Es zeigte sich bei Komplex I wie auch bei Komplex IV, dass die Absorptionsänderung linear mit zunehmender Proteinkonzentration anstieg. Somit konnten die Angaben aus der Literatur bestätigt werden (56). Demgemäß war die Verwendung von sehr niedrigen Proteinkonzentrationen in den Versuchen möglich.

Außerdem bestätigte sich, wie schon in anderen Studien beschrieben wurde, dass die Enzyme auf den Wechsel von Einfrieren und Auftauen und auf längere Lagerung bei -20°C labil reagieren und es zu einem Aktivitätsverlust kommt. Zur Optimierung der enzymatischen

Reaktion sollte daher mit frischem Homogenisat gearbeitet werden. Sollte dennoch eine Lagerung des Gewebes notwendig werden, ist eine Konservierung bei -80°C empfehlenswert.

6.2 Beurteilung der Ergebnisse

6.2.1 Normwerte

Die in den jeweiligen Kapiteln angegebenen Aktivitätsbereiche sind nur unter Vorbehalt als Normwerte anzusehen. Insbesondere bei Komplex I ergaben sich die Werte aus kleinen Patientengruppen (zwischen 4 und 14). Weitere Messungen von größeren Patientengruppen sind notwendig.

Sowohl bei den Normwerten der NADH-CoQ-Reduktase (Tabelle 7, S. 39) als auch bei den Normwerten der Cytochrom-C-Oxidase (Tabelle 13, S. 48) fällt auf, dass die Werte für das Muskelgewebe im Vergleich zu den kultivierten Fibroblasten und Chorionzotten die größte Standardabweichung haben und somit am meisten streuen. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen hierfür. Enzymtests werden ungenau, wenn die Proben nicht rechtzeitig eingefroren werden. Es kann folglich der Transport bei den uns zugesandten Muskelbiopsien zur Autolyse der besonders instabilen Atmungskettenenzyme geführt haben. Zum anderen kann eine Verunreinigung des Sonifikats mit Bindegewebe zu niedrigeren Aktivitätsmessungen führen.

Weiterhin ist bekannt, dass Atmungskettenenzymaktivitäten mit dem Alter signifikant variieren. Sie nehmen mit zunehmendem Alter in den Skelettmuskel- und Lebermitochondrien ab. So zeigt die COX-Aktivität eine 50%-ige Abnahme zwischen dem 4. und 19 Lebensjahr (50). Aufgrund dessen und aufgrund verschiedener Methoden gibt es in der Literatur weitestgehend keine standardisierten Kontroll-Werte. Eine sich anschließende Studie könnte sich beispielsweise damit befassen, Normwerte für eine Altersgruppe zu erstellen.

Ebenso wird bei beiden Komplexen deutlich, dass das Muskelgewebe im Vergleich zu den Fibroblasten und Chorionzotten die höhere Aktivität aufweist. Dies spiegelt möglicherweise den größeren Energiebedarf des Skelettmuskels wieder.

Inwieweit Normwerte von Enzymmessungen aus frisch biopsierten Gewebe mit kultivierten Zellen des gleichen Gewebetyps vergleichbar sind, bleibt für weitere Untersuchungen offen.

Bekannt ist, dass sich nicht immer Enzymdefekte in kultivierten Fibroblasten und Myoblasten nachweisen lassen (31, 75, 83, 93).

In der Literatur wird für die Bewertung des Enzymmangels häufig eine Referenzenzymaktivität bestimmt und zu dieser ein Verhältnis gebildet. Gewöhnlich ist es die Citratsynthase (96). Es werden aber auch Verhältnisse innerhalb der Atmungsketten-Enzyme gebildet, unter der Annahme, dass ein ausgeglichenes Verhältnis unter den Komplexen für eine normale mitochondriale Funktion notwendig ist.

So wird von der Gruppe um Marin-Garcia in einer Studie der Nutzen der K IV/ K III – Ratio bestätigt (56). Damit hat man einen Indikator für die mitochondriale Proliferation. Außerdem spricht die Tatsache, dass einzelne mitochondriale Enzyme betroffen sind, gegen eine unspezifische Verletzung des Gewebes (durch falsche Behandlung oder Autolyse).

Der Nachteil einer solchen Ratio liegt darin, dass andere mitochondriale Enzymschäden nicht mit einbezogen werden.

6.2.2 Enzymkinetik

Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm lassen sich die Michaelis-Konstante K_m und die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit V_{max} bestimmen. Die Michaelis-Konstante ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat. Sie entspricht der Substratkonzentration, bei der das Enzym halbmaximal gesättigt ist und bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt. V_{max} stellt die theoretische Enzymaktivität bei unendlicher Substratkonzentration dar.

Bei der NADH-CoQ-Reduktase ergaben sich für das Co-Substrat Ubichinon im Muskel ein K_m von 33 μM , für kultivierte Fibroblasten ein K_m von 6,9 μM und für kultivierte Chorionzotten ein K_m von 11,35 μM . Der niedrigste K_m -Wert und folglich die höchste Affinität zum Ubichinon besitzt damit die NADH-CoQ-Reduktase der Fibroblasten.

Beim Vergleich der verwendeten Assaykonzentrationen von 500 μM CoQ mit den ermittelten K_m -Werten wird deutlich, dass auch eine geringere Konzentration von Ubichinon ausgereicht hätte, um die theoretische Maximalgeschwindigkeit zu erreichen.

Verglichen mit den verwendeten Assaykonzentrationen des Substrates NADH (0,25mM) lagen die errechneten K_m -Werte in etwa in diesem Bereich: der ermittelte K_m im Muskel lag bei 0,22 mM, in den kultivierten Fibroblasten bei 0,17 mM und in den kultivierten Chorionzotten bei 0,24 mM. Wie beim Co-Substrat Ubichinon besitzt die Fibroblasten-NADH-CoQ-Reduktase auch für das Substrat NADH den niedrigsten K_m -Wert und hat dementsprechend die höchste Affinität zum NADH.

Für die berechneten theoretischen Maximalgeschwindigkeiten bei unendlich hoher Substrat- bzw. Co-Substrat-Konzentration zeigt sich bei den im Komplex-I-Assay gemessenen Normalwerten (Tabelle 7, S. 39), im Skelettmuskel die höchste Aktivität (beim Co-Substrat: 526 nmol/min/mg/Protein; beim Substrat: 714 nmol/min/mg Protein).

Die Cytochrom-C-Oxidase der beiden Muskelgewebs-Proben (26,3 bzw. 23,8 mol/min/mg Protein) hat im Vergleich zum Chorionzotten- und Fibroblasten-COX (15,4 bzw. 11,9 mol/min/mg Protein) die höhere theoretische Maximalaktivität V_{max} , was den gemessenen COX-Normwerten entspricht (Tabelle 13, S. 48). Den niedrigsten K_m -Wert zeigt die Fibroblasten-Cytochrom-C-Oxidase mit 0,07 mM und weist damit die höchste Affinität zum Substrat Cytochrom C auf.

Die höchsten K_m -Werte und damit die niedrigste Affinität zum Cytochrom C finden sich beim Muskel (0,5 bzw. 0,3 mM). Eine Mittelstellung nehmen die Chorionzotten mit einem K_m von 0,17 mM ein. Bei allen untersuchten Geweben (Tabelle 16b, S. 51; Tabelle 17; S. 52) verringerte sich die COX-Aktivität nach Zugabe von 3 mM Cytochrom C im Vergleich zu geringer verwendeten Konzentrationen. Das könnte auf eine mögliche Substrathemmung hindeuten. Eine schnelle Inhibierung des Enzyms durch oxidiertes Cytochrom C wurde bereits von Rustin et al. beschrieben (78). Daher und in Anlehnung an die berechneten K_m -Werte ist es empfehlenswert, die bisher im COX-Assay verwendete Cytochrom-C-Konzentration von 3 mM für weitere Versuche auf die Hälfte zu reduzieren, um möglichst annähernd die theoretische Maximalgeschwindigkeit erreichen zu können.

Die verschiedenen K_m -Werte der sich unterscheidenden Gewebe bei Komplex I wie auch IV sind wahrscheinlich die Folge von gewebespezifischen Isoenzymen. So ist (wie bereits unter 1.1.4 erwähnt) bekannt, dass für die COX-Untereinheiten VIa, VIIa und VIII gewebespezifische Isoformen existieren (21, 22, 46, 97). Diese sind wahrscheinlich an der Bildung von Isoenzymen beteiligt. Möglicherweise dienen die Isoenzyme der gewebespezifischen Regulierung des Energie-Metabolismus.

6.3 Patienten

Trotz der angesprochenen Problematik der Normwerte in 6.2.1 für den Komplex I lassen sich die Ergebnisse von zwei Patienten als mögliche Ursache der beschriebenen Klinik deuten. Beide Patienten türkischer Abstammung I.C. und A.K. leiden unter einer milden Ausprägung einer Myopathie. Bei beiden Patienten leidet die Mutter an einer ähnlichen Symptomatik. Dies kann als Hinweis auf den für die mitochondrialen Erkrankungen typischen maternalen Erbgang gewertet werden. Laborchemisch fand sich bei dem Kind I.C. eine erhöhte

Kreatinkinase und bei dem 22jährigen Patienten A.K. ein erhöhter Plasmalaktat-Wert neben der ebenfalls gering erhöhten Kreatinkinase. Diese Laborparameter passen ebenfalls in das Bild einer mitochondrialen Myopathie. Untypisch ist die Erhöhung der Werte von ASAT, ALAT und der Triglyceride bei Patient I.C., die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Als Differentialdiagnose konnte die Duchenne-Muskeldystrophie molekulargenetisch bei dem Kind I.C. ausgeschlossen werden.

Unsere biochemische Untersuchung ergab eine herabgesetzte Aktivität der NADH-CoQ-Reduktase bei I.C. auf 45,2/49,3 nmol/min/mg Protein (das entspricht einer Reduzierung auf ca. 16 % der mittleren Aktivität der Normwerte) und bei A.K. auf 57,0/60,8 nmol/min/mg Protein (das entspricht einer Reduzierung auf 20 % der mittleren Aktivität der Normwerte). Gerade dieser Mangel und eben nicht der komplette Verlust an Aktivität des Komplexes I kann die milde Ausprägungsform der Symptomatik beider Patienten erklären. Gegen eine Autolyse des uns zugesandten Skelettmuskelgewebes spricht die über dem Mittelwert liegende COX-Aktivität, welche bei A.K. 12,0 und bei I.C. 15,6 mol/min/mg Protein betrug.

Wie bereits eingangs angesprochen, führt I) eine gestörte Atmungskettenenzymfunktion im frühen Säuglingsalter fast immer zu schwersten klinischen Ausprägungen (75) wird II) alleiniger COX-Mangel selten nach dem ersten Lebensjahrzehnt beobachtet (37) und ist III) die oxidative Kapazität am schwerwiegendsten beim COX-Mangel herabgesetzt (95).

In Zusammenschau der Klinik des mit 10 Lebenstagen verstorbenen Säuglings mit komplettem Aktivitätsverlust von COX kann folglich ein möglicher Zusammenhang vermutet werden. Trotz dieser Stimmigkeit von Klinik und Biochemie, sollte das Ergebnis des Enzym-Assays kritisch gesehen werden, weil die zugesandte Muskel-Probe Autopsie-Material war. Eher gegen eine mögliche Autolyse spricht jedoch der biochemische Ausschluss einer Glucogenose. Ein weiteres unspezifisches Indiz für eine Stoffwechselerkrankung lieferte die Schädelsonographie, bei der sich ein vergrößerter rechter Ventrikel und eine große Zyste darstellen ließen.

Es bleibt für weitere Diskussionen offen, ob man die Symptomatik des Säuglings aufgrund der Gehirnbeteiligung entweder dem Leigh-Syndrom zuordnet oder ob man die Klinik im Rahmen einer fatalen infantilen Myopathie versteht. Bei letzterem Syndrom wird neben dem respiratorischem Versagen auch häufig eine Nierenbeteiligung beschrieben, die sich bei dem Säugling als akutes Nierenversagen präsentierte.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Atmungskettenkomplexe I (NADH-CoQ-Reduktase) und IV (Cytochrom-C-Oxidase) anhand biochemischer Aktivitätsbestimmung charakterisiert. Da Erythrozyten keine Mitochondrien enthalten, haben sie für die Diagnostik der Atmungskettendefekte keine Bedeutung. Die untersuchten Gewebe stammten von humaner Skelettmuskulatur, humanen Fibroblasten und Chorionzotten. Die Biopsien der Chorionzotten und Fibroblasten wurden kultiviert. Die Lagerung des sonifizierten Gewebes erfolgte bei -20°C .

Es wurden die Eigenschaften der Enzyme bezüglich Proteinkonzentrations-, Substratkonzentrations- und Inkubationszeitabhängigkeit untersucht. Für den biochemischen Ansatz konnten geringe Gewebemengen verwendet werden (z.B. weniger als 20mg), wodurch bei begründetem Verdacht auf einen Defekt der Atmungskettenkomplexe relativ kleine Gewebebiopsien ausreichend sind.

Die enzymkinetischen Studien ergaben lineare Verläufe der Lineweaver-Burk-Diagramme für beide Enzyme in allen Geweben. Die sich aus dem Diagramm ableitende Maximalgeschwindigkeit war für den Skelettmuskel in beiden Komplexen am höchsten. Das Muskelgewebe wies jedoch gegenüber den Fibroblasten und Chorionzotten eine geringere Affinität zum Substrat auf.

Es wurden anhand von 12 Skelettmuskel-, 14 Fibroblasten- und 4 Chorionzottenproben Normbereiche für die Komplex-I-Aktivität erstellt. Die Normbereiche der Komplex-IV-Aktivität ergaben sich beim Skelettmuskel aus 70 verschiedenen Kontrollproben, bei den Fibroblasten aus 35 und bei den Chorionzotten aus 7 Biopsien. Die Skelettmuskulatur wies die höchsten messbaren Aktivitäten bei beiden Komplexen auf.

Im Stabilitätstest wurde deutlich, dass sowohl die NADH-CoQ-Reduktase wie auch die Cytochrom-C-Oxidase bei -20°C extrem lagerungsinstabil waren.

Es konnte bei drei Patienten, die eine typische Klinik für einen Defekt in der Atmungskette aufwiesen, eine biochemische Ursache gefunden werden. Bei zwei Patienten wurde eine reduzierte Aktivität im Komplex I gemessen. Ein Säugling präsentierte einen kompletten Verlust der Komplex-IV-Aktivität. Die Patienten mit dem Komplex-I-Defizit zeigten eine milde ausgeprägte myopathische Form. Wobei der Säugling an Krampfanfällen, muskulärer Hypotonie und schwerer Azidose litt. Er verstarb an respiratorischer Insuffizienz am 10. Lebenstag.

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G.: Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* Vol 290: 457 – 465, 1981.
2. Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H.: Exercise intolerance due to mutations in the cytochrom b gene in mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 341: 1037-44, 1999.
3. Antonini G., Brunori M., Malatesta F., Sarti P., Wilson M.T.: Reconstitution of monomeric cytochrome c oxidase into phospholipid vesicles yields functionally interacting cytochrome aa3 units. *J Biol Chem* 262: 10077-79, 1987.
4. Arnaudo E., Dalakas M., Shanske S., Moraes C.T., DiMauro S., Schon E.A.: Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet* 337: 508-510, 1991.
5. Bakker H.D., Scholte H.R., Dingemans K.P., Spelbrink J.N., Wijburg F.A., Bogert v d C.: Depletion of mitochondrial deoxyribonucleic acid in a family with neonatal liver disease. *The Journal of Pediatrics* Vol.128, No. 5: 683-687, 1996.
6. Bentlage HACM, Attardi G.: Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with MELAS encephalopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 5: 197-205, 1996.
7. Boulet L., Karpati G., Shoubridge E.A.: Distribution and threshold expression of the tRNA^{Lys} mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged red fibers (MERRF). *Am J Hum Gen* 51: 1187-1200, 1992.
8. Bourgeron T., Chretien D., Amati P., Rotig A., Munnich A., Rustin P.: Expression of respiratory chain deficiencies in humane cultured cells. *Neuromuscul Disord* 3: 5-6, 1993.
9. Bourgeron T., Chretien D., Rötig A., Munnich A., Rustin P.: Prenatal diagnosis of cytochrome c oxidase in cultered amniocytes is hazardous. *Prenatal Diagn* 12: 548-549, 1992.

10. Van Biervliet J.P.G.M., Bruinvis L., Ketting P.K., De Bree P.K., Van der Heiden C., Wadman S.K., Willems J.L., Bookelman H., Van Haelst U., Monnens L.A.H.: Hereditary Mitochondrial Myopathy with Lactic Acidemia, A DeToni-Fanconi-Debré Syndrome, and a Defective Respiratory Chain in Voluntary Striated Muscles. *Pediatric Research* 11: 1088-1093, 1977.
11. Birch-Machin M.A., Shepherd I.M., Watmough N.J., Sherratt H.S.A., Bartlett K., Darley-Usmar V.M., Milligan D.W.A., Welch R.J., Aynsley-Green A., Turnbull D.M.: Fatal lactic acidosis in infancy with a defect of complex III of the respiratory chain. *Pediatric Research* 25, No. 5: 553-559, 1989.
12. Van den Bogert C., De Vries H., Holtrop M., Muus P., Dekker H.L., Van Galen J.M.M., Bolhuis P.A., Taanman J.W.: Regulation of the expression of mitochondrial proteins: relationship between mtDNA copy number and cytochrom-c oxidase activity in human cells and tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1144: 177-183, 1993.
13. Brierley J. E., Johnson A.M., Lightowlers R.N., James O.F.W., Turnbull D.M.: Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: Implications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol* 43: 217-223, 1998.
14. Buchwald A., Till H., Unterberg C., Oberschmidt R., Figulla H.R., Wiegand V.: Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal* 11: 509-516, 1990.
15. Capaldi Roderick A.: Structure and Function of Cytochrom c Oxidase. *Ann Rev Biochem* 59: 569-96, 1990.
16. Casey R.P., Thelen M., Azzi A.: Dicyclohexylcarbodiimide inhibits proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 87: 1044-51, 1979.
17. Casey R.P., Thelen M., Azzi A.: Dicyclohexylcarbodiimide binds specifically and covalently to cytochrome c oxidase while inhibiting its H⁺-translocating activity. *J Biol Chem* 255: 3994-4000, 1980.
18. Cooperstein S.J, Lazarow A.: A microspectrophotometric method for the determination of Cytochrom oxidase. *J Biol Chem* 189: 665-70, 1951.

19. Davis E.R., Miller S., Herrstadt C., Ghoush S.S., Fahy E., Shinobu L.A., Galasko D., Thal J.L., Beal F.M., Howell N., Parker W.D.: Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 94: 4526-4531, 1997.
20. DiMauro S.: Mitochondrial encephalomyopathies: back to mendelian genetics. *Annals of Neurology* Vol. 45, No.6: 693 – 694, 1999.
21. DiMauro S., Bonilla E., Davidson M., Hirano M., Schon E.A.: Mitochondria in neuromuskular disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1366: 199-210, 1998.
22. DiMauro S., Lombes A., Nakase H., Mita S., Fabrizi G.M., Tritschler H.-J., Bonilla E., Miranda A.F., DeVivo D.C., Schon E.A.: Cytochrom c Oxidase Deficiency. *Pediatric Research* 28: 536–541, 1990.
23. DiMauro S., Nicholson J.F., Hays A.P., Eastwood A.B., Papadimitriou A., Königsberger R., De Vivo D.C.: Benign infantile mitochondrial myopathy due to reversible cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* 14: 89-94, 1983.
24. DiMauro S., Schon E.A.: Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal of Medicine* 348(26):2656-2668, 2003.
25. Engel W.K., Cunningham G.G.: Rapid examination of muscle tissue: An improved trichrome stain method for fresh frozen biopsy specimens. *Neurology* 13: 919-926, 1963.
26. Faivre L., Cormier-Daire V., Chretien D., Christoph von Kleist-Retzov Amiel J., Dommergues M., Saudubray J.M., Dumez Y., Rotig A., Rustin P., Munnich A.: Determination of enzyme activities for prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency. *Prenat Diagn* 20 (9): 732-7, 2000.
27. Ferguson-Miller S., Brautigan D.L., Margoliash E.: Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. III. Kinetics of reaction of carboxydinitrophenyl cytochromes c with cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 253: 149-159, 1978.
28. Finel M., Wikstrom M.: Studies on the role of the oligomeric state and subunit III of cytochrome oxidase in proton translocation. *Biochim Biophys Acta* 851: 99-108. 1986.

29. Fischer J.C.: Mitochondrial myopathies an respiratory chain defects. Doctoral Thesis, University of Nigmegen, The Netherlands, 1985.
30. Georgevich G., Darley-USmar V.M., Malatesta F., Capaldi R.A.: Electron transfer in monomeric forms of beef and shark heart cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 22: 1317-22, 1983.
31. Gérard B., Bourgeron T., Chretien D., Rötig A., Munnich A., Rustin P.: Uridine preserves the expression of respiratory enzyme deficiencys in cultered fibroblasts. *Eur J Pediatr* 152: 270, 1992.
32. Hafeti Y.: The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System. *Ann Rev Biochem* 54: 1015-69, 1985.
33. Hafeti Y., Haavik A., A.G., Griffiths D.E.: Reconstitution of the electron transport system. Preparation and properties of the interacting enzyme complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 4: 441-46, 1961.
34. Hafeti Y., Haavik A., A.G., Griffiths D.E.: Reconstitution of the electron transport system II. Reconstitution of DPNH-cvtochrome c reductase. succinic-cytochrome c reductase and DPNH, succinic-cytochrome c reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 4: 447-53, 1961.
35. Hafeti Y., Haavik A., A.G., Griffiths D.E.: Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem* 237: 1676-80, 1962.
36. Haltia T., Saraste M., Wikstrom M.T.: Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. *EMBO J* 10: 2015-2021, 1991.
37. Hanna M.G., Nelson P., Rahman S., Lane R.J.M., Land J., Heales S., Cooper M.J., Schapira A.H.V., Morgan-Hughes J.A., Wood N.W.: Cytochrome c Oxidase Deficiency Associated with the First Stop-Codon Point Mutation in Human mtDNA. *Am J Hum Genet* 63: 29 – 36, 1998.
38. Harding A.E., Holt I.J., Sweeney M.G., Brockington M., Davis M.B.: Prenatal Diagnosis of Mitochondrial DNA ⁸⁹⁹³T→G Disease. *Am J Hum Genet* 50: 629-633, 1992.

39. Harvey L., Baltimore D., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Darnell J.:
Molekulare Zellbiologie. De Gruyter Verlag, Berlin – New York, 1996.
40. Höhn H., Salk D.: Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. In: Latt S.A., Darlington G.J. (eds.), *Methods in Cell Biol* Vol. 26, Acad Press, New York, 1982.
41. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A.: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719, 1988.
42. Holt I.J., Harding A.E., Petty R.K.H., Morgan-Hughes J.A.: A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 46: 428-433, 1990.
43. Johnston W., Karpati G., Carpenter S., Arnold D., Shoubridge E.A.: Late-Onset Mitochondrial Myopathy. *Ann Neurol* 37: 16-23, 1995.
44. Kadenbach B., Merle P.: On the function of multiple subunits of cytochrome c oxidase from higher eukaryotes. *FEBS Lett* 135: 1-11, 1981.
45. Kadenbach B.: Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis. *J Bioenerg Biomembr* 18: 39-54, 1986.
46. Kennaway N.G., Carrero-Valenzuela R.D., Ewart G., Balan V.K., Lightowlers R., Zhang Y.-Z., Powell B.R., Capaldi R.A., Buist N.R.M.: Isoforms of Mammalian Cytochrom c Oxidase: Correlation with Human Cytochrom c Oxidase Deficiency. *Pediatric Research* Vol 28, No. 5: 529-535, 1990.
47. Kim M.C., Taylor R.W., Johnson M.A., Chinnery P.F., Chrzanowska-Lightowlers Z.M.A., Andrews R.M., Nelson P.I., Wood N.W., Lamont P. J., Hanna M.G., Lightowlers R., Turnbull D.M.: An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrom c oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 64: 1330-1339, 1999.
48. Kuroda Y., Ito M., Toshima K. et al.: Treatment of chronic congenital lactic acidosis by oral administration of dichloroacetate. *J Inherit Metab Dis* 9: 244-252, 1986.

49. Larsson N.G., Oldfors A.: Mitochondrial myopathies. *Acta Physiol Scand* 171: 385-393, 2001.
50. Lefai E., Terrier-Cayre A., Vincent A., Boespflug-Tanguy O., Tanguy A., Alziary S.: Enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes from children muscular biopsies. Age-related evolutions. *Biochim Biophys Acta* 1228: 43-50, 1995.
51. Liu S.W.V., Zhang C., Nagley P.: Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Research* Vol. 26, No. 5: 1268-1275, 1998.
52. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
53. Luft R., Ikkos D., Palmieri G.: A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory chain control: A correlated clinical, biochemical and morphological study. *J Clin Invest* 41: 1776-1804, 1962.
54. Maaswinkel-Mooij P.D., Bogert van de C., Scholte H.R., Onkenhout W., Brederoo P., Poorthuis B.J.H.M.: Depletion of mitochondrial DNA in the liver of a patient with lactic acidemia and hypoketotic hypoglycemia. *The Journal of Pediatrics* Vol.128, No. 5: 679-683, 1996.
55. Marin-Garcia J., Goldenthal M.J., Ananthakrishnan R., Pierpont M.E.M., Fricker F.J., Lipshultz S.E., Perez-Atayde A.: Mitochondrial function in children with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Inher Metab Dis.* 19: 309-312, 1996.
56. Marin-Garcia J., Goldenthal M.J., Pierpont M.E.M., Ananthakrishnan R.: Impaired Mitochondrial Function in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy: Biochemical and Molecular Analysis. *Journal of Cardiac Failure* Vol. 1, No. 4: 285-291, 1995.
57. Matlib M.A., Rouslin W., Vaghy P.L., Schwartz A.: Isolation of cardiac muscle mitochondria. An Update. *Methods Pharmacol* 5: 25-27, 1984.
58. Matthews P.M., Allaire C., Shoubridge E.A., et al.: In vivo muscle magnetic resonance spectroscopy in the clinical investigation of mitochondrial disease. *Neurology* 41: 114-120, 1991.

59. Mazourek M., Torello T.A., Cameron V.: Analysis of strains of *Saccharomyces cerevisiae* with amino acid substitutions in the Cu_A-binding region of subunit II of cytochrom c oxidase. *Curr Genet* 36: 249-255, 1999.
60. Michel H., Behr J., Harrenga A., Kannt A.: Cytochrome c Oxidase: structure and spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 27: 329-356, 1998.
61. Mitchell P.: Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 63: 327-67, 1976.
62. Moreadith R.W., Batshaw M.L., Ohnishi T., Kerr D., Knowx B., Jackson D., Hrubá R., Olson J., Reynafarse B., Lehninger A.L.: Deficiency of the iron-sulfur clusters of mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in an infant with congenital lactic acidosis. *J Clin Invest* 74: 685-697, 1984.
63. Moreas C.T., Schon E.A.: Detection and analysis of mitochondrial DNA and RNA in muscle by in situ hybridization and single-fiber PCR. *Meth Enzymol* 264: 522-540, 1996.
64. Morton R.K.: Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature* 166: 1092-95, 1950.
65. Nass M.M., Nass S.: Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 19: 593-611, 1963.
66. Naviaux R.K.: Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr* 159: 219-226, 2000.
67. Nelson B.D., Gellerfors P.: Characterisation and resolution of complex III from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* 53: 80-91, 1978.
68. Niers L.E., Smeitink J.A., Trijbels J.M., Sengers R.C., Janssen A.J., van de Heuvel L.P.: Prenatal diagnosis of NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Prenat Diagn* 21(10): 871-80, 2001.
69. Olimpia M., Antoni L.A., Shanske S., Bresolin N., Comi G.P., Rothstein R., Schon E.A., DiMauro S.: Intragenic inversion of mtDNA: A new type of pathogenic mutation in a patient with mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* 66: 1900 – 1904, 2000.

70. Papadopoulou C. L., Sue C. M., Davidson M.M., Tanji K., Nishino I., Sadlock J. E., Krishna S., Walker W., Selby J., Glerum D.M., Van Coster R., Lyon G., Scalais E., Lebel R., Kaplan P., Shanske S., De Vivo D.C., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S., Schon E.A.: Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature Genetics* 23: 333-337, 1999.

71. Pitkänen S., Merante F., McLeod D., Applegarth D., Tong T., Robinson B.H.: Familial Cardiomyopathy with Cataracts and Lactic Acidosis: A Defect in Complex I (NADH-Dehydrogenase) of the Mitochondria Respiratory Chain. *Pediatric Research* Vol. 39, No.3: 513-521, 1996.

72. Prochaska L.J., Bisson R., Capaldi R.A., Steffens G.C.M., Buse G.: Inhibition of cytochrome c oxidase function by dicyclohexylcarbodiimide. *Biochem Biophys Acta* 637: 360-73, 1981.

73. Rafael J.: Cytochrome C Oxidase. In Bergmeyer (ed). *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Edition, Vol. III, Verlag Chemie, FRG: 266-72, 1970.

74. Rieske J.S.: Preparation and properties of reduced coenzyme Q cytochrome c reductase (Complex III of the respiratory chain). *Methods Enzymol* X: 239-45, 1975.

75. Robinson H. B., Glerum M.D., Chow W., Petrova-Benedict R., Lightowlers R., Capaldi R.: The Use of Skin Fibroblast Cultures in the Detection of Respiratory Chain Defects in Patients with Lacticacidemia. *Pediatric Research* Vol. 28, No. 5: 549-555, 1990.

76. Robinson N.C., Capaldi R.A.: Interaction of detergents with cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 16: 375-81, 1977.

77. Robinson N.C., Talbert L.: Triton X-100 induced dissociation of beef heart cytochrome c oxidase into monomers. *Biochemistry* 25: 2328-35, 1986.

78. Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gérard B, Rötig A., Saudubray J.M., Munnich A. : Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta* 228: 35 – 51, 1994.

79. Ruitenbeek W., Sengers R., Albani M., Trijbels F., Janssen A., vanDiggelen O., Bakkeren J.: Prenatal diagnosis of cytochrome c oxidase deficiency by biopsy of chorionic villi. *New England Journal of Medicine* 319: 1095, 1988.
80. Santorelli M.F., Mak S., Vazquez-Memije M.E., Shanske S., Kranz-Eble P., Jain K.D., Bluestone D. L., De Vivo D.C., DiMauro S.: Clinical Heterogeneity Associated with the Mitochondrial DNA T8993C Point Mutation. *Pediatric Research* Vol. 39, No. 5: 914-917, 1996.
81. Stacpoole P.W.: Lactic Acidosis and other Mitochondrial Disorders. *Metabolism* Vol. 46, No. 3: 306 – 321, 1997.
82. Servedei S., Lazero R.P., Bonilla E., Barron K.D., Ziviani M., DiMauro S.: Mitochondrial encephalomyopathy and partial cytochrome c oxidase deficiency. *Neurology* 37: 58-63, 1987.
83. Shamima R., Taanman J.W., Cooper J.M., Nelson I., Hargreaves I., Meunier B., Hanna M.G., Garcia J.J. et al.: A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. *Am J Hum Genet* 65: 1030-1039, 1999.
84. Shoubridge E.A., Johns T., Karpati T.: Complete restoration of a wild-type mtDNA genotype in regenerating muscle fibres in a patient with a tRNA point mutation and mitochondrial Encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 6: 2239-2242, 1997.
85. Silvestri G., Rana M., DiMuzio A., Uncini A., Tonali P., Servedei S.: A late –onset mitochondrial myopathy is associated with a novel mitochondrial DNA (mtDNA) point mutation in the tRNA^{TRP} gene. *Neuromuscular Disorders* 8: 291-295, 1998.
86. Smith L.: Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. *Methods Biochem Anal* 2: 427-434, 1955.
87. Stacpoole P.W.: Lactic Acidosis and other Mitochondrial Disorders. *Metabolism* Vol. 46, No. 3: 306 – 321, 1997.
88. Stellwagen E., Shulman R.G.: Nuclear magnetic resonance study of exchangeable protons in ferrocytochrome c. *J Mol Biol* 75: 683-95, 1973.

89. Suarez M.D., Revzin A., Narlock R., Kempner E.S., Thompson D.A., Ferfuson-Miller S.: The functional and physical form of mammalian cytochrome c oxidase determined by gel filtration, radiation inactivation, and sedimentation equilibrium analysis. *J Biol Chem* 259: 13791-99, 1984.
90. Taanman J.W., Bodnar A.G., Cooper J.M. Morris A.A.M. Clayton P.T., Leonard J.V., Schapira A.H.V.: Molecular mechanisms in mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet* 6: 935-942, 1997.
91. Taylor D.J., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Lightowlers R.N.: Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat Genet* 15: 212-215, 1997.
92. Taylor D.J., Crowe M., Bore P.J., et al.: Examination of the energetics of aging skeletal muscle using nuclear magnetic resonance. *Gerontology* 30: 2-7, 1984.
93. Trijbels J.M., Scholte H.R., Ruitenbeek W., Sengers R.C., Janssen A.J., Busch H.F.: Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial (encephalo-) myopathies. *Eur J Pediatr* 152: 178-184, 1993.
94. Trueblood C.E., Wright R.M., Poyton R.O.: Differential regulation of the two genes encoding *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit V by heme and the HAP2 and REO1 genes. *Mol Cell Biol* 8: 4537-40, 1988.
95. Tulinius M.H., Holme E., Kristiansson B., Larsson N.G., Oldfors A.: Mitochondrial encephalomyopathies in childhood. I. biochemical and morphologic investigations. *J Pediatr* 119: 242-250, 1991.
96. Vogel H.: Mitochondrial Myopathies and the Role of the Pathologist in the Molecular Era. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* Vol. 60, No. 3: 217-227, 2001.
97. Wallace C. D.: Diseases of the mitochondrial DNA. *Ann Rev Biochem* 61: 1175-1212, 1992.
98. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., et al.: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber`s hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-1430, 1988.

99. Willems J.L., Monnens L.A.H., Trijbels J.M.F., Veerkamp J.H., Meyer A.E.F.H., van Dam K., van Haelst U.: Leigh's Encephalomyopathy in a Patient With Cytochrome c Oxidase Deficiency in Muscle Tissue. *Pediatrics* Vol. 60, No. 6: 850-857, 1977.
100. Williamson R., Eskdale J., Colmann D.V., Niazi M., Löffler F.E., Modell B.M.: Direct gene analysis of chorionic villi: a possible technique for first-trimester and antenatal diagnosis of haemoglobinopathie. *Lancet* 2: 1125, 1981.
101. Wong-Riley MTT: Cytochrome Oxidase: An endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12: 94-101, 1989.
102. Wu S., Moreno-Sanchez R., Rottenberg H: Involvement of Cytochrome c oxidase subunit III in energy coupling. *Biochemistry* 34: 16298-16305, 1995.
103. Yasin R., Van Beers G., Nurse K.C., Al-Ani S., Landon D.N., Thompson E.J.: A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells. *J Neurol Sci* 32: 347-360, 1977.

Persönliche Daten

Name: Jana Susann Elle
Geburtsort: Hoyerswerda
Geburtstag: 14. 03. 1976
Familienstand: ledig

Bildungsweg

1982-1991 POS-Hans-Coppi, Lauta
1991-1994 Lessing-Gymnasium, Hoyerswerda
1994 Abitur
1994-1995 Au pair in Summit, USA
1995-1996 Studium der Kommunikationswissenschaft, Politikwissenschaft, Amerikanistik TU Dresden

Medizinstudium

1996-1998 Vorklinischer Teil LMU München
1998 Physikum
1999 Klinischer Teil TU München
2000 1. Staatsexamen
2002 2. Staatsexamen
2003 3. Staatsexamen

Praktische Tätigkeit

1999-2001 Famulatur
Gefäßchirurgie, Klinikum rechts der Isar München
Orthopädie, Bryn Mawr Hospital, USA
Augenheilkunde, Universitätsaugenklinik Frankfurt a. M.
Gynäkologie, Privatpraxis, München
Kardiologie/Pneumologie, KH München Bogenhausen

2002-2003 Praktisches Jahr
Innere Medizin, Klinikum rechts der Isar München
Chirurgie, Spital Zofingen, Schweiz
Augenheilkunde, Klinikum rechts der Isar München und
Universitätsaugenklinik Basel, Schweiz

Berufliche Tätigkeit

Seit Juli 2003 Assistenzärztin in der
Augenheilkunde an der Universitätsklinik Dresden