

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik mit Friedrich-Baur-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktorin: Univ. Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Differentielle Genexpressionsanalysen aus Muskeleinzelfasern bei mitochondrialen Myopathien

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Konrad Olszewski

aus Berlin

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Matthias Elstner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Müller-Felber
	Prof. Dr. Marcus Deschauer
	PD Dr. Christoph Küper
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	06.12.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretischer Hintergrund.....	1
1.1. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	9
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Material.....	12
2.2. Patienten	12
2.3. Methoden	14
2.3.1. Aufbereitung des Materials.....	15
2.3.1.1. Erstellung der Dünnschnitte	15
2.3.1.2. COX-SDH-Färbung	15
2.3.1.3. Laser Cell Mikrodisektion.....	17
2.3.1.4. RNA- und DNA-Extraktion und -Isolation.....	18
2.3.1.5. RNA-Quantitäts- und Qualitätsbestimmung mit Agilent Bioanalyzer	18
2.3.2. DNA-Analyse.....	20
2.3.2.1. Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number der mitochondrialen DNA mittels quantitativer real time-PCR	20
2.3.2.2. Bestimmung der Deletionsart mittels Long-Range nested PCR	23
2.3.3. RNA-Analyse.....	27
2.3.3.1. In-vitro-Transkription.....	27
2.3.3.2. Microarray: Hybridisierung, Scan/Datenerhebung und Auswertung	27
2.3.3.3. Signalweg-Analyse mittels Ingenuity Pathway Analysis	28
2.3.4. Validierung der Ergebnisse der RNA-Analysen.....	29
2.3.4.1. Bestimmung von Muskelfasertyp und Expression von <i>p53</i> , <i>p21</i> und <i>mdm2</i> mittels Immunhistochemie und -fluoreszenz.....	29

3. Ergebnisse	33
3.1. Etablierung einer RNA-schonenden Färbung zur Identifikation COX-negativer und COX-positiver Muskelzellen	33
3.1.1. Unterscheidbarkeit COX-negativer und COX-positiver Zellen in der modifizierten SDH-Färbung	33
3.1.2. RNA-Qualität in der modifizierten SDH-Färbung	33
3.1.3. RNA-Qualität nach Laser-Zell-Mikrodissektion	34
3.2. Genetische Charakterisierung der CPEO-Patienten	35
3.2.1. Bestimmung von Copy Number und Deletionsgrad	35
3.2.2. Bestimmung der Deletionsart (sd/md)	37
3.3. Genexpressionsanalyse	38
3.3.1. Bestimmung differenziell exprimierter Gene	38
3.3.2. Zuordnung von Genen zu Signalwegen	39
3.4. Validierung der Ergebnisse der RNA-Analyse anhand der immun-histochemischen Bestimmung der Expression von p53, p21 und mdm2	42
3.4.1. Immunfluoreszenzsignal für p53	42
3.4.2. Immunfluoreszenzsignal für p21	42
3.4.3. Immunfluoreszenzsignal für mdm2	42
4. Diskussion	44
4.1. Etablierung einer RNA-schonenden Methode zur Identifikation und Isolation COX-negativer und COX-positiver Muskelzellen	44
4.2. Genetische Charakterisierung der CPEO-Patienten	46
4.3. Genexpressionsanalyse in Atmungsketten-defizienten Muskelzellen	47
4.4. Validierung der Ergebnisse der RNA-Analyse anhand der immun-histochemischen Bestimmung der Expression von p53, p21 und mdm2	56

5. Zusammenfassung und Ausblick.....	57
6. Anhang.....	58
7. Literaturverzeichnis	60
8. Abkürzungsverzeichnis	70
9. Danksagung	73
10. Eidesstattliche Versicherung	74

1. Theoretischer Hintergrund

Mitochondrien sind Zellorganellen, die in der Atmungskette durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) Adenosintriphosphat (ATP) erzeugen. Darüber hinaus sind Mitochondrien an zahlreichen Stoffwechselwegen (Synthese von Aminosäuren und Harnstoff, Fettsäure-Oxidation etc.), an der Bereitstellung prosthetischer Gruppen wie Häm und Eisen-Schwefel-Clustern, und an einer Vielzahl von zellulären Funktionen (u.a. Ionenhomöostase und Apoptose) beteiligt. Störungen der Mitochondrien können dementsprechend zu Zellschäden und spezifischen klinischen Phänotypen führen. [1]

Mitochondriale Genetik

Die Komplexität mitochondrialer Krankheitsbilder erklärt sich aus den besonderen genetischen Eigenschaften der Mitochondrien. Daher ist zum Verständnis der Pathophysiologie mitochondrialer Erkrankungen die Kenntnis einiger grundlegender Aspekte der mitochondrialen Genetik notwendig.

Grundlagen: Etwa 900-1500 Gene sind an der Funktion der Mitochondrien beteiligt, wobei der Großteil dieser Gene nukleär kodiert wird [2, 3]. Lediglich 37, für die mitochondriale Funktion jedoch wesentliche Gene werden in der doppelsträngigen, zirkulären und ca. 16,6 kbp langen mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert [3, 4]. Die mtDNA wird unabhängig von der nukleären DNA (nDNA) repliziert und transkribiert [5, 6] und ausschließlich von der Mutter vererbt (sog. maternale Vererbung), nur vereinzelt sind Fälle paternaler Vererbung bekannt [5, 7]. Zu den mitochondrial kodierten Proteinen gehören 13 der 90 an der Atmungskette beteiligten Strukturproteine sowie 22 mitochondriale tRNAs und 2 rRNAs [8, 9]. Die restlichen für die Atmungskette benötigten Proteine werden von der nukleären DNA kodiert und über die mitochondrialen Membrankanäle translocase of the inner membrane (TIM) und translocase of the outer membrane (TOM) in die Mitochondrien eingeschleust [10]. Zu den nukleär kodierten Proteinen gehören neben den übrigen Strukturproteinen der Atmungskette auch direkt an der mtDNA-Replikation beteiligte Proteine wie die Polymerase γ (POLG), die Helikase twinkle, mitochondrial single strand DNA-binding protein (mtSSB) oder die ADP/ATP-Translokase ANT1 [6, 11-13].

In allen, auch postmitotischen Geweben, werden Mitochondrien ständig abgebaut, erneuert und ihre Anzahl den Bedürfnissen der Zelle angepasst. Die Replikation der

Mitochondrien und ihrer DNA (sog. mitochondriale Biogenese) ist dementsprechend ein komplexes, in vielen Aspekten noch unverstandenes Netzwerk mitochondrialer und nukleärer Signale eingebettet. [9, 14]

Heteroplasmie: In einer einzigen Zelle können mehrere Tausend Mitochondrien und ein Vielfaches mehr an mtDNA-Kopien vorliegen [5, 6, 15]. Die Anzahl vorhandener mtDNA-Moleküle pro Zelle wird als Copy Number (CN) bezeichnet. Sind ausnahmslos alle mtDNA-Moleküle einer Zelle vom Wildtyp oder mutiert, bezeichnet man eine Zelle als homoplasmisch. Als Heteroplasmie wird das gleichzeitige Vorliegen mutierter und Wildtyp-mtDNA in einer Zelle bezeichnet. Da sich die Mitochondrien bei jeder Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilen, ergibt sich in den betroffenen Geweben ein Mosaik von Zellen mit unterschiedlichen Anteilen mutierter mtDNA an der Gesamt-mtDNA (sog. Heteroplasmiegrad) [6]. Für die Atmungskettenfunktion wird der Anteil defekter mtDNA allerdings erst relevant, wenn ein individueller zell- und gewebespezifischer Schwellenwert überschritten wird (z.B. mehr als 60% Deletionen der mtDNA in humanen Muskelfasern oder HeLa-Zellkultur) [5, 16-19].

Histochemische Darstellung: Das Mosaik aus respiratorisch intakten und defizienten Zellen kann histochemisch mittels COX-SDH-Färbung dargestellt werden. Da drei der 13 Untereinheiten des vierten Atmungskettenkomplexes (Cytochrom-C-Oxidase, COX) mitochondrial kodiert werden, stellen sich Zellen mit einem hohen Anteil defekter mtDNA als COX-negativ/ungefärbt dar, während alle anderen Zellen als sog. COX-Positive braun angefärbt werden. Die Untereinheiten des Komplex II (Succinatdehydrogenase, SDH) werden dagegen ausschließlich nukleär transkribiert, so dass sich die COX-Negativen gemäß ihrer vorhandenen SDH-Aktivität blau anfärben und auf diese Weise als respiratorisch defiziente Zellen identifiziert werden können. [6, 20, 21]

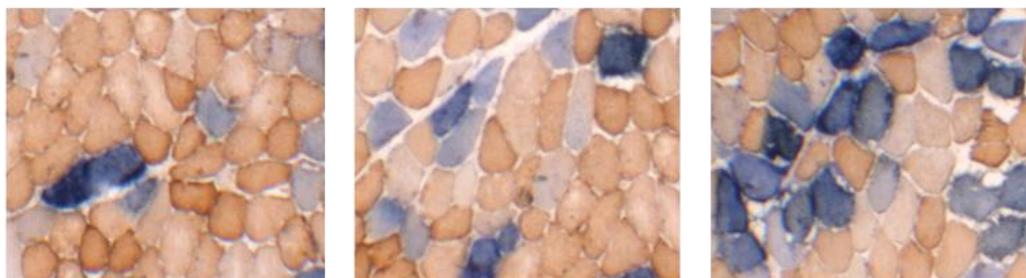


Abbildung 1: COX-SDH-Färbung (von links nach rechts niedriger, mittlerer und hoher Heteroplasmiegrad)

Mutationen und Deletionen der mtDNA: Mutationen in allen an der mitochondrialen Biogenese beteiligten nukleären oder mitochondrialen Genen können zu Störungen der Mitochondrienfunktion führen [22]. Zu den häufigsten Mutationen der mitochondrialen DNA gehören Punktmutationen (v.a. in den für Struktureinheiten des Komplex I und die mitochondrialen tRNAs kodierenden Genen) und Deletionen [23, 24]. Letztere können für mitochondriale Erkrankungen im engeren Sinn (z.B. Chronische Progressive Externe Ophthalmoplegie, CPEO, s.u.) verantwortlich sein, kommen aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen und in alternden postmitotischen Geweben vor [23, 24] (s.u.).

Der genaue Mechanismus der Entstehung von Deletionen ist unbekannt. Als mögliche Ursachen werden Replikationsfehler und fehlerhafte Reparaturmechanismen diskutiert [25]. Deletionen der mitochondrialen DNA kommen in Abhängigkeit vom zugrunde liegenden molekularbiologischen Defekt in zwei Formen vor [12], als singuläre und multiple Deletionen:

- Bei singulären Deletionen (sog. single deletions, sd) fehlt in allen betroffenen mtDNA-Molekülen ein einzelner, definierter Abschnitt. Die gleiche Deletion findet sich in verschiedenen Zellen, da alle mutierten Moleküle ursprünglich auf ein einzelnes defektes mtDNA-Molekül zurückgehen, das klonal vervielfältigt wurde (sog. klonale Expansion) [26, 27]. Eine besonders häufige Deletion ist die 4977bp-lange, sog. common deletion, die den Teil der mitochondrialen DNA zwischen den ATPase-8- und ND5-Genen deletiert [28]. Singuläre Deletionen können sporadisch vorkommen oder maternal vererbt werden [29].
- Bei multiplen Deletionen (multiple deletions, md) fehlen mehrere Abschnitte der mitochondrialen DNA. Ursächlich sind Mutationen nukleärer Gene, die an der mitochondrialen Replikation beteiligt sind (z.B. der einzigen an der mitochondrialen Biogenese beteiligten Polymerase γ oder der Helikase twinkle). Infolge dieser Mutationen verläuft die Replikation fehlerhaft und es entstehen immer neue Deletionen in der replizierten mtDNA. Es ergibt sich ein Mosaik aus Zellen mit unterschiedlichen Deletionen; häufig bestehen mehrere verschiedene Deletionen in einer einzelnen Zelle. Nukleäre Mutationen werden entweder spontan erworben oder autosomal vererbt. [11, 12, 30]

Punktmutationen und Deletionen der mtDNA häufen sich außerdem altersabhängig in postmitotischen Geweben [23, 24, 31-33]. Der Anteil mutierter mtDNA an der Gesamt-mtDNA erreicht im Alter beispielsweise bis zu 50% in Neuronen der Substantia Nigra, in anderen Geweben wie Skelettmuskel und restlichem Nervensystem hingegen insgesamt nur selten Werte über 1% [23, 32]. Dennoch können mtDNA-Mutationen auch hier funktionell relevant werden, da sie lokal akkumulieren und ihr Anteil an der Gesamt-mtDNA in einzelnen Zellen die spezifischen Schwellenwerte übersteigen kann [34, 35]. In alterndem Muskelgewebe finden sich daher als histochemisches Korrelat der eingeschränkten Atmungskettenfunktion einzelner Zellen vermehrt COX-Negative [34, 36, 37]. Als Ursache dieser fokalen Häufung wird die klonale Expansion defekter mtDNA diskutiert, d.h. die Vervielfältigung eines ursprünglich einzelnen defekten mtDNA-Moleküls (s.o.) [26, 27].

Mitochondriale Erkrankungen und CPEO

Störungen der Mitochondrien können einerseits zu klassischen mitochondrialen Syndromen führen („mitochondriale Erkrankungen“ im engeren Sinn, s.u.) und andererseits an einer Vielzahl von Krankheiten und altersbedingten degenerativen Prozessen beteiligt sein. Zu letzteren zählen u.a. neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson [38, 39], verschiedene Neoplasien [33, 40, 41], Bluthochdruck und Atherosklerose [42, 43], Störungen des Metabolismus wie Diabetes mellitus [44], psychiatrische Erkrankungen [45-47] sowie altersabhängige Muskelveränderungen (Sarkopenie) [31, 32, 48, 49]. Es wird angenommen, dass Mutationen der mtDNA zudem eine ursächliche Rolle bei Alterungsprozessen spielen [50, 51].

Mitochondriale Erkrankungen: Mitochondriale Erkrankungen im engeren Sinn stellen eine klinisch äußerst heterogene Gruppe genetisch bedingter Erkrankungen dar, die primär durch ein Funktionsdefizit der Atmungskette mit verminderter ATP-Synthese und erhöhter Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) charakterisiert sind [50, 52-54]. Die pathogenetischen Mechanismen sind nicht vollständig bekannt (s.u.). Für mitochondriale Erkrankungen wird eine Prävalenz von ungefähr 1:5000 angenommen [55-60].

Mitochondriale Erkrankungen können sich prinzipiell in jedem Organsystem manifestieren [52]. In erster Linie sind jedoch Gewebe betroffen, die einen besonders

hohen Bedarf an Energie haben, wie Muskel- und Nervengewebe [6]. Erstmanifestationsalter und Schweregrad sind hochvariabel [52]. Eine wichtige Ursache für diese klinische Heterogenität ist der unterschiedlich hohe Anteil defekter mtDNA an der Gesamt-mtDNA in den einzelnen Zellen und Geweben (Heteroplasmie, s.o.). Hinzu kommen zell- und gewebespezifische Schwellenwerte, bei deren Überschreitung der Heteroplasmiegrad erst klinisch relevant wird. Diese bereits von sich aus unterschiedlichen Schwellenwerte werden zusätzlich von genetischen und Umwelt-Faktoren beeinflusst [5, 6]. Zudem spielt die unterschiedliche Penetranz und Pathogenität der jeweiligen Mutation eine Rolle [5, 61]. Bei Deletionen der mtDNA ist weder deren Größe, noch Lokalisation, sondern einzig der Heteroplasmiegrad für die Schwere der Erkrankung verantwortlich [62-64]. Ein Heteroplasmiegrad von 60% wird hierbei häufig als Schwelle zur funktionellen Relevanz genannt (s.o.) [65]. [1, 6, 9].

Je nach zugrunde liegender Mutation und klinischem Phänotyp unterscheidet man u.a. folgende mitochondrialen Syndrome: CPEO (Chronisch Progressive Externe Ophthalmoplegie, s.u.), KSS (Kearns-Sayre-Syndrom), Pearson's Syndrom, MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes), MERRF (myoclonic epilepsy and ragged red fibers), NARP (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) und maternal vererbtes Leigh-Syndrom [22, 66-69]. Bei CPEO, KSS und Pearson's Syndrom handelt es sich um klinisch und ätiologisch verwandte Syndrome, die durch Deletionen der mitochondrialen DNA verursacht werden [5, 52]. Eine detaillierte Auflistung der klinischen Befunde des jeweiligen Syndroms findet sich in folgender Tabelle:

Tabelle 1: klinische Befunde bei Mutationen der mitochondrialen DNA, modifiziert nach Di Mauro, 2003. In der Tabelle ist das Vorhandensein von Symptomen oder Befunden mit +, die Abwesenheit mit -, das mögliche Vorhandensein mit +/- gekennzeichnet. Typische Befunde sind eingerahmt. CPEO = Chronische Progressive Externe Ophthalmoplegie; KSS = Kearns-Sayre Syndrom; PS= Pearsons Syndrom; MERRF = myoklone Epilepsie mit ragged red fibers; MELAS = Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-artige Episoden; AID = aminoglykoside-induced deafness (Aminoglykosid-induzierte Taubheit); NARP = Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa; MILS = maternal vererbtes Leigh-Syndrom (maternally inherited Leigh's Syndrome); LHON = Leber hereditäre Optikusatrophie

Symptome und Befunde:	Deletionssyndrome			tRNA-Mutationen		rRNA-Mutationen	mRNA-Mutationen		
	CPEO	KSS	PS	MERRF	MELAS	AID	NARP	MILS	LHON
ZNS:									
Krampfanfälle	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Ataxie	-	+	-	+	+	-	+	+/-	-
Myoklonien	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
Psychomotorische Retardierung	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Psychomotorische Regression	-	+	-	+/-	+	-	-	-	-
Hemiparese und Hemianopsie	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Koritkale Blindheit	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Migräne-artige Kopfschmerzen	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dystonie	-	-	-	-	+	-	-	+	+/-
PNS:									
Periphere Neuropathie	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	-	-
Muskel:									
Schwäche und Belastungsintoleranz	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Ophthalmoplegie	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-
Ptose	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Augen:									
Retinitis pigmentosa	-	+	-	-	-	-	+	+/-	-
Optikusatrophie	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+
Blut:									
Sideroblastische Anämie	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-
Endokrines System:									
Diabetes mellitus	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-
Kleinwuchs	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Hypoparathyreoidismus	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Herz:									
Reizleitungsstörung	-	+	-	-	+/-	-	-	-	+/-
Kardiomyopathie	-	+/-	-	-	+/-	+	-	+/-	-
Gastrointestinalum:									
Dysfunktion des exokrinen Pankreas	-	+/-	+	-	-	-	-	-	-
Intestinale Pseudoobstruktion	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HNO:									
Sensorineuraler Hörverlust	-	+/-	-	+	+	+	+/-	-	-
Niere:									
Fanconi-Syndrom	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
Zusätzliche Befunde:									
Laktatazidose	+/-	+	+	+	+	-	-	+/-	-
Ragged red fibers in der Muskelbiopsie	+	+	+/-	+	+	-	-	-	-

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit CPEO als Modellpatienten für mitochondriale Deletionssyndrome untersucht (s.u.). CPEO äußert sich klinisch durch eine progrediente, meist symmetrische Parese der äußeren Augenmuskeln und/oder eine frühe, häufig bilaterale Ptose. Als fakultative Symptome können eine generalisierte proximal betonte Muskelschwäche mit vorzeitiger Ermüdbarkeit und Belastungsintoleranz, Dysarthrie oder Dysphagie vorkommen [30].

Für die Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen spielen neben der typischen Histologie (COX-Negative und Mitochondrien-reiche sog. ragged red fibers in der Muskelbiopsie) vor allem Funktionstests der Atmungskettenkomplexe und molekularbiologische Untersuchungen des mitochondrialen und nukleären Genoms eine zentrale Rolle [52, 67]. Adäquate Therapieoptionen für mitochondriale Erkrankungen stehen bisher nicht zur Verfügung [70]. Für umfassende Angaben zu Ätiologie, Klinik und Management der mitochondrialen Syndrome wird auf die Übersichtsarbeiten von DiMauro et al (2003 und 2011) und Chinnery et al. (2010) verwiesen [6, 52, 71].

Pathogenese: Mechanismen

Seit der Erstbeschreibung mitochondrialer Deletionen im Jahre 1988 [62, 69, 72] wurden umfassende Kenntnisse über die pathogenetischen Auswirkungen von Mutationen der mtDNA gewonnen. Die wesentlichen Aspekte aktueller Erklärungsansätze sollen im Folgenden skizziert werden.

ROS-Hypothese: Die ROS-Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass bei Störungen der Atmungskette (z.B. infolge von Mutationen der mtDNA-kodierten Atmungskettenproteine) vermehrt reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden [50, 73-75]. Wenn die antioxidativen Kapazitäten der Zelle überstiegen werden, können DNA, Proteine oder Lipide infolge unkontrollierter Oxidation beschädigt werden [16, 76-78]. Besonders die mtDNA ist anfällig für oxidative Schäden, da ROS in unmittelbarer räumlicher Nähe zur mtDNA entstehen; Zudem ist die mtDNA nicht durch Histone geschützt und besitzt weniger effiziente DNA-Reparaturmechanismen als die nukleäre DNA [79]. Schäden an den mitochondrialen Genen führen wiederum zu Störungen der Atmungskette, die ihrerseits im Sinne eines Circulus vitiosus zu einer vermehrten Freisetzung von ROS führen [50].

Neuere Studien betonen die Funktion der ROS als Signalmoleküle, die u.a. Autophagie/Mitophagie [80-83], metabolische Anpassungsreaktionen [84],

Hypoxieantwort und Zelldifferenzierung vermitteln [85-87]. Innerhalb dieses Signalnetzwerks spielen p53 und p21 als mögliche Induktoren von Apoptose und Autophagie eine entscheidende Rolle [88-91]. Im Zusammenhang mit ROS werden außerdem Störungen der Kalzium-Homöostase, Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials und die Induktion der proapoptotischen unfolded-protein-response im Endoplasmatischen Retikulum [92, 93] beobachtet, die zusätzlich als Erklärung für die Zelltod-vermittelnde Wirkung von ROS herangezogen werden können [9, 38, 94].

Reaktion auf Energiemangelzustände: Störungen der Atmungskette führen neben erhöhten ROS-Spiegeln zu ATP-Mangel. Zellen reagieren auf einen Abfall der ATP/AMP-Ratio mit einer Gewebe-, Mutations- und Heteroplasmiegrad-abhängigen Expression von Genen des Energiestoffwechsels und verstärkter mitochondrialer Biogenese [9, 88, 95]. Dieser Anpassungsmechanismus ist in ein Netzwerk nukleärer und mitochondrialer Signale eingebettet, das u.a. über die AMP-Kinase und den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg die Energieproduktion und Mitogenese steuert [96-98]. Nach Alemi et al. kann diese Anpassungsreaktion zu einer Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und Induktion von Autophagie führen [16].

Zellzyklusregulation und Apoptose: Störungen der mitochondrialen Funktion können zu Zellzyklusarrest, Inhibition der Replikation und Transkription, und zur Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege führen. Neben den bereits genannten Mechanismen wirken vor allem mitochondrial beeinflusste Veränderungen der p53-abhängigen Expression von p21/CDKN1A und c-myc regulatorisch auf den Zellzyklus [85, 86, 96, 97]. [98, 99].

In der Literatur zeichnet sich also ein komplexes, bisher jedoch nicht vollständig verstandenes Netzwerk ab, das über zentrale Moleküle wie p53 die zellulären Reaktionen auf mitochondriale Defekte steuert. Apoptose und Autophagie scheinen innerhalb dieses Netzwerks eine wichtige Rolle zu spielen. Da wesentliche Erkenntnisse bezüglich molekularer Kompensationsmechanismen jedoch in Modellsystemen (Zellkulturen etc.) gewonnen wurden, ist unklar, welche dieser Mechanismen in vivo und in humanem Gewebe tatsächlich relevant sind und wie diese zusammenhängen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese Frage zu klären und das Funktionieren des zugrunde liegenden Netzwerks besser zu verstehen.

1.1. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Mechanismen aufzuzeigen, wie menschliche Zellen unter in-vivo-Bedingungen auf Störungen der Mitochondrien (hier: Deletionen der mtDNA) reagieren. Dazu soll das Genexpressionsprofil respiratorisch defizienter Zellen differenziell untersucht werden, um pathogenetisch relevante Kandidatengene und Signalwege zu identifizieren. Aus den Ergebnissen für die mitochondriale Erkrankung CPEO können dabei Rückschlüsse auf andere Krankheitsbilder und pathologische Prozesse gezogen werden, an denen Deletionen der mtDNA ursächlich beteiligt sind (neben den mitochondrialen Deletionssyndromen auch neurodegenerative Erkrankungen, Neoplasien, sowie Alterungsprozesse etc., s.o.).

Genexpressionstudien - Möglichkeiten und Grenzen: Genom-weite Genexpressionsstudien (z.B. mittels Microarray) liefern eine umfassende und hypothesenfreie (d.h. nicht von a-priori-Annahmen geleitete) Übersicht zellulärer Prozesse auf Transkriptionsebene. Sie eignen sich daher hervorragend zur Untersuchung der Reaktionen einer Zelle auf beliebige Veränderung (in diesem Fall Deletionen der mitochondrialen DNA) [99]. Bisher lieferten derartige Untersuchungen bei mitochondrialen Erkrankungen allerdings widersprüchliche Ergebnisse [9].

In vielen der bisherigen Studien könnte das verwendete Material für die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse verantwortlich gewesen sein. Folgende Aspekte müssen daher bei der Auswahl und Untersuchung der verwendeten Gewebe und Zellkulturen besonders beachtet werden:

- Jede Abweichung von den in-vivo-Bedingungen eines Gewebes kann große Veränderungen auf Expressionsebene hervorrufen, so etwa bei der Verwendung von Zellkulturen oder post-mortem-Analysen [100].
- Die Untersuchung von Gewebehomogenaten oder ganzer Zellkulturen führt unweigerlich zur Nivellierung der Expressions-Unterschiede, wenn unterschiedliche Zellen (z.B. solche mit oder ohne respiratorisches Defizit) gleichzeitig analysiert werden.
- Werden Gewebe verschiedener Patienten/Probanden oder sogar verschiedene Gewebe miteinander verglichen, so besteht die Gefahr, dass die Expressionsunterschiede durch Unterschiede zwischen den Patienten oder

Gewebe bedingt sind, und nicht z.B. durch Unterschiede in der mitochondrialen Funktion.

- Genexpressionsstudien verlangen schließlich eine sehr hohe Qualität des untersuchten Materials. Diese ist nicht gegeben, wenn das Gewebe z.B. bei der Bearbeitung und Lagerung nicht ausreichend vor RNasen geschützt wird [101] (eine ausführliche Diskussion dieses Aspekts erfolgt in den entsprechenden Unterkapiteln dieser Arbeit).

Ansatz der vorliegenden Arbeit: Im Unterschied zu bisherigen Microarray-Untersuchungen, die Zellkulturmaterial oder Gewebehomogenat verwendeten, werden in dieser Arbeit einzelne humane Muskelfasern aus Muskelbiopsien von CPEO-Patienten untersucht. Dazu werden anhand der COX-SDH-Färbung Zellen mit und ohne mitochondriale Dysfunktion identifiziert, gezielt mittels Laser-Mikrodissektion (LMD) aus dem gleichen Gewebeverband isoliert und mittels Microarray differenziell analysiert. Auf diese Weise werden respiratorisch defiziente und gesunde Zellen „in Reinform“ miteinander verglichen. Zudem können durch die Entnahme von Zellen aus demselben Gewebe desselben Patienten mögliche konfundierende Variablen (Alter, Geschlecht, unterschiedliche Gewebebedingungen etc.) ausgeschlossen werden. Um den in-vivo-Bedingungen im Muskel möglichst nahe zu kommen und gleichzeitig eine hohe Gewebequalität sicherzustellen, werden Muskelbiopsien verwendet, die unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort nach Entnahme schockgefroren wurden.

Eine Herausforderung dieser Arbeit bestand darin, die COX-SDH-Färbung so zu modifizieren, dass eine RNA-schonende Darstellung und Identifikation respiratorisch defizienter Fasern möglich würde. Eigenen Überlegungen zufolge würde die COX-SDH-Färbung in ihrer ursprünglichen Form aufgrund der langen Färbedauer (ca. 2 Stunden) und hohen Färbetemperaturen (37°C) in hohem Maße die RNA des untersuchten Gewebes beeinträchtigen: Ribonukleinsäuren sind zwar thermodynamisch relativ stabile Moleküle, würden aber unter diesen Bedingungen von ubiquitären RNasen zerstört werden [101, 102]. Eine ausreichende Integrität der RNA ist aber Voraussetzung für die Durchführung von Genexpressionanalysen [101-103]. Daher wurde zu Beginn der Arbeit ein histochemisches Verfahren etabliert, das die oben genannten Anforderungen erfüllt.

Aufbau der Arbeit/Methodik: Zunächst wurden anhand geeigneter Färbungen respiratorisch defiziente und „gesunde“ Zellen identifiziert und mittels Laser-Mikrodissektion (LMD) isoliert. Die aus diesen Zellen gewonnene RNA wurde zur Erstellung eines differentiellen Genexpressionsprofils verwendet, während die DNA zur molekularbiologischen Charakterisierung der untersuchten Zellen (Bestimmung von Copy Number, Deletionsgrad und Deletionsart) eingesetzt wurde. Die ermittelten differentiell exprimierten Gene wurden anschließend Signalwegen zugeordnet. Zuletzt wurden einzelne Gene immunhistochemisch dargestellt, um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf Einzelzell- und Proteinebene zu verifizieren. Eine schematische Darstellung der Arbeitsschritte findet sich in folgender Abbildung. Zur Methodik verweisen wir auf die nachfolgenden Abschnitte.

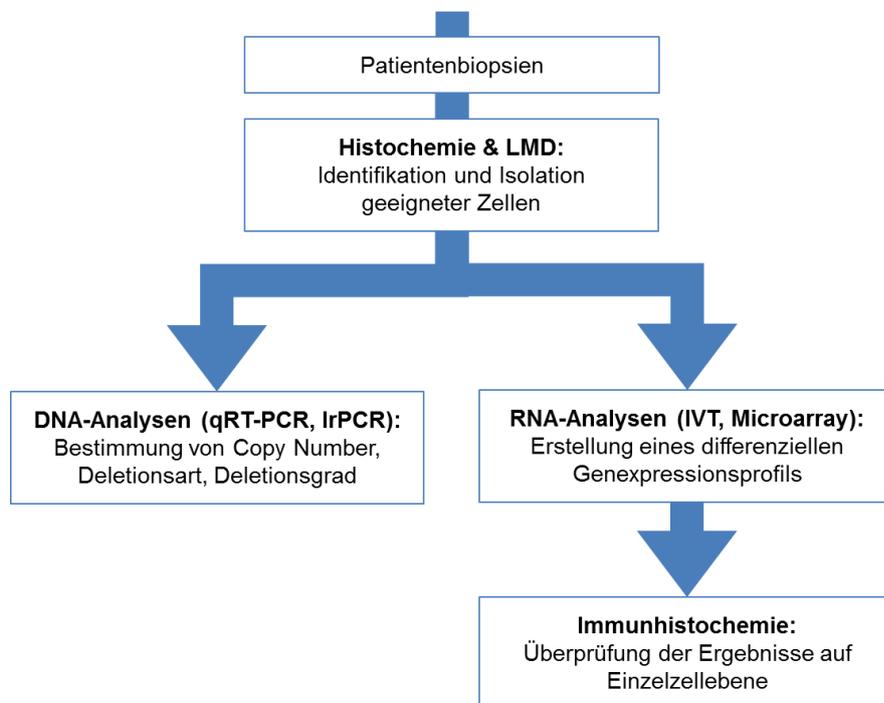


Abbildung 2: Schematischer Überblick über Methodik und Aufbau der Arbeit

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die verwendeten Muskelbiopsien stammen aus der Biobank des Friedrich-Baur-Instituts für Muskelerkrankungen an der Neurologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Entnahme erfolgte zur klinischen Diagnostik der Erkrankten. Eine Einverständniserklärung zur Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken liegt vor.

2.2. Patienten

Die untersuchten Muskelbiopsien stammen von $n = 9$ Patienten (Frauen = 5, Männer = 4) mit mitochondrialen Deletionssyndromen, davon $n = 8$ Patienten mit CPEO. Einschlusskriterien waren eine typische Histologie (COX-negative Zellen) und der biochemische Nachweis von Deletionen der mitochondrialen DNA (sd/md) aus Muskelhomogenat. Detaillierte Angaben zu den Patienten sind in Tabelle 2 angegeben.

2.3. Methoden

Der Arbeitsablauf gliederte sich in folgende Abschnitte:

1. Aufbereitung des Materials:
 1. Erstellung der Dünnschnitte
 2. Färbung
 3. Lasermikrodissektion
 4. Extraktion der RNA und DNA
 5. RNA-Qualitätskontrolle
2. DNA-Analyse:
 1. Bestimmung von Copy Number und Deletionsgrad mittels qRT-PCR
 2. Bestimmung der Deletionsart (sd/md) mittels long range-PCR
3. RNA-Analyse:
 1. In-vitro-Transkription (IVT)
 2. Microarray: Hybridisierung, Scan/Datenerhebung und Auswertung
 3. Signalweg-Analyse mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA)
4. Überprüfung der Ergebnisse der RNA-Analyse auf Einzelzell- und Proteinebene:
 1. Bestimmung von Muskelfasertyp und Expression von p53, p21 und mdm2 mittels Immunhistochemie und –fluoreszenz

Während des gesamten Arbeitsablaufs wurde unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet. Um eine Kontamination des Materials durch RNasen zu verhindern, wurden Arbeitsgegenstände und –flächen vor der Benutzung mit einem RNase-Inhibitor gereinigt und folgende RNase-freie Chemikalien und Materialien verwendet:

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete RNase-freie Chemikalien und Materialien

Verbrauchsmaterial	Produkt-Nr.	Hersteller
RNaseZap	9780	Ambion
Rnase-freies Wasser	W4502	Sigma Aldrich
RNase-freie Tubes	0030123328	Eppendorf
RNase-freie Pipettenspitzen	verschiedene	StarLab
RNase-freies Wasser	W4502	Sigma Aldrich
Rotipuran PA RNase-freies Ethanol	9065	Roth
PBS-Puffer	9625	Ambion/AB

2.3.1. Aufbereitung des Materials

2.3.1.1. Erstellung der Dünnschnitte

Material und Durchführung: Die Muskelbiopsien wurden unter kontinuierlicher Kühlung (-25°C) in einem vorher RNase-gereinigten Kryotom (Kryostat HM 500 OM, Microm International) aufgespannt und in 10µm-Schnitten jeweils abwechselnd auf einen Glasobjektträger (Superfrost, Menzel-Gläser, 7201277) und auf Membranbeschichtete Objektträger (2,0 µm PEN-Membrane Slides, Leica/Microdissect, 11505189) aufgetragen. Während die Schnitte auf Glasobjektträger als Referenzschnitte verwendet wurden, dienten die Schnitte auf Membranbeschichtetem Objektträger zur Laser-Mikrodissektion. Die Muskelbiopsien wurden so aufgespannt, dass die angeschnittenen Muskelfasern im Dünnschnitt eine transversale Orientierung zeigten. Pro Objektträger wurden drei bis fünf Schnitte aufgenommen. Die Membranbeschichteten Objektträger wurden sofort nach Auftragen der Schnitte bis zur Weiterverarbeitung in einer luftdichten Box verschlossen und bei -80°C gekühlt.

2.3.1.2. COX-SDH-Färbung

Hintergrund: In der COX/SDH-Färbung wird die Aktivität der Atmungsketten-Enzyme Cytochrom-C-Oxidase (COX, Komplex IV, mitochondrial kodiert) und Succinat-Dehydrogenase (SDH, Komplex II, nukleär kodiert) histochemisch dargestellt. Jede Zelle wird entsprechend ihrer COX-Aktivität braun gefärbt. Die anschließende, blaue SDH-Färbung färbt ausschließlich diejenigen Zellen an, die aufgrund eines Defizits an COX-Aktivität nicht braun gefärbt wurden, sog. COX-negative Zellen. Da diese Zellen häufig gleichzeitig die nukleär kodierte SDH überexprimieren, um die Atmungskettenfunktion aufrechtzuerhalten, färben sie sich tief-blau an. Durch die COX-SDH-Färbung lassen sich also respiratorisch defiziente COX-negative Zellen blau anfärben, während sich Zellen mit ungestörter Atmungskettenfunktion braun darstellen (s. Abbildungen 1 und 3). Nähere Angaben zur Methode finden sich bei Ross et al. [104].

Da im Rahmen der COX-SDH-Färbung aufgrund der langen Färbedauer und fehlenden Kühlung von einer relevanten RNA-Degradation ausgegangen werden kann, wurde für die Membranbeschichteten Objektträger ein alternatives Färbeverfahren etabliert, das auf einer verkürzten SDH-Färbung beruht. Durch den Abgleich mit den COX-SDH-gefärbter Referenzschnitte konnten auf den SDH-

gefärbten Schnitten die gesuchten Zellen für die anschließende Isolation identifiziert werden (s. Abbildung 3).

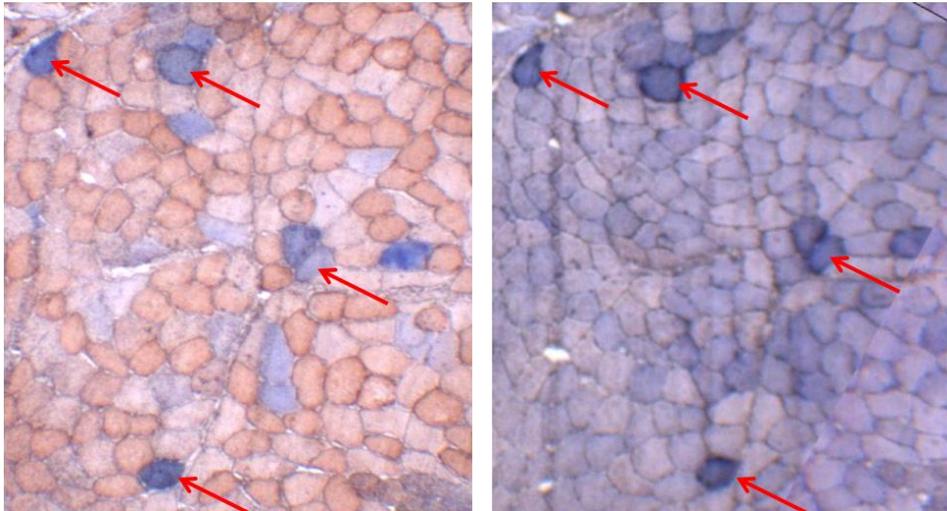


Abbildung 3: Sukzessive Schnitte, inkubiert mit COX-SDH-Färbung (links) und SDH-Färbung (rechts). Markiert sind jeweils übereinstimmende COX-negative Zellen

Material: Die verwendeten Materialien sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 4: Materialien für COX-SDH-Färbung

Reagenz	Volumen	End-Konzentration
3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma D-5637)	0,8 ml	5mM
Cytochrom C (Sigma C-2037)	0,42 ml	500 μ M
Natrium-Succinat (Sigma S-2378)	0,25ml	1,3 M
Nitro Blau Tetrazolium (NBT, Sigma N-6876)	0,8 ml	1,875 mM
Phenazin Methosulfat (PMS, Sigma P-9625)	0,25 ml	2 mM
Natrium-Azid (BDH 30111)	0,1 ml	100mM

Alle Verbrauchsmaterialien wurden in PBS-Puffer (Ambion/AB 9625, 0,1 M) gelöst, auf pH = 7,0 eingestellt und bis zu ihrer Verwendung in einer lichtgeschützten Box bei -25°C aufbewahrt.

COX/SDH-Färbung (auf einfachem Objektträger): Zu 0,8ml DAB 0,2ml Cytochrom C hinzufügen und auf Objektträger aufbringen, anschließend mit Lichtschutz für 60 Minuten bei 7°C inkubieren, mit PBS-Puffer abwaschen. Für die SDH-Färbung 0,1ml Natrium-Succinat, 0,1ml PMS und 0,01ml Natrium-Azid in 0,8 ml NBT auflösen und auf Objektträger aufbringen. Mit Lichtschutz für 45 Minuten bei 37°C inkubieren, mit

PBS-Puffer abwaschen und in aufsteigender Ethanol-Verdünnungsreihe (75%-, 95%, 100%-, 100%-Konzentration) dehydrieren. Trocknung in Silikagel-Kammer für 10 Minuten.

Modifizierte SDH-Färbung: Die Muskelschnitte auf den Membran-beschichteten Objektträgern wurden zur besseren RNA-Präservation nicht mit dem COX-Medium inkubiert, sondern ausschließlich für 15 Minuten mit Lichtschutz bei 37°C im SDH-Färbemedium inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden gemäß obigem Protokoll durchgeführt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Membran-Objektträger mit den SDH-gefärbten Muskelschnitten sofort weiterverarbeitet, um eine weitere zeitlich bedingte Degradation der RNA zu vermeiden.

2.3.1.3. Laser Cell Mikrodisektion (LMD)

Hintergrund: Das LMD-Verfahren ermöglicht die selektive Entnahme einzelner Zellen oder Zellgruppen innerhalb eines Gewebeschnitts mittels Laserstrahl. Das hier verwendete LMD-System von Leica besteht aus einem Mikroskop (Leica DM 6000B) mit integriertem Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 355nm und einem Probenstisch für Objektträger und Auffang-Tubes. Mit dem Lasergerät wird ein gepulster Laserstrahl auf vorher unter dem Mikroskop gekennzeichnete Gewebebereiche gerichtet, wodurch diese aus dem Gewebeschnitt herausgelöst und in einem Tube oder anderen Reaktionsgefäßen zur weiteren Analyse aufgefangen werden können. Voraussetzung dafür ist die Verwendung der bereits genannten Membran-beschichteten Objektträger.

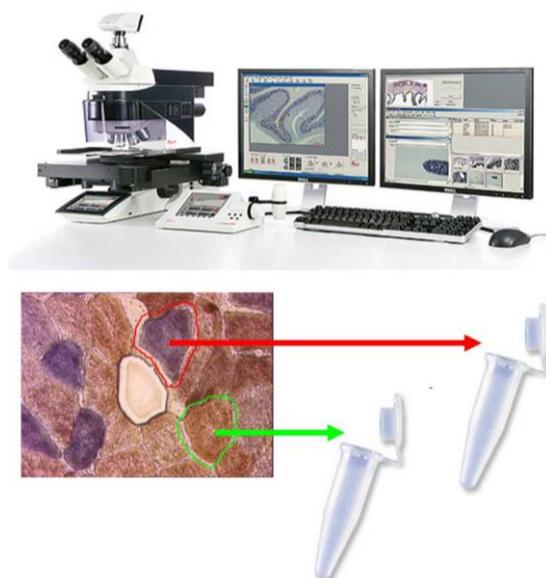


Abbildung 4: LMD-System und Schema der Lasermikrodisektion

Material: Zur Lasermikrodissektion (LMD) wurde ein Leica LMD 6000 Laser Microdissection System mit AVC Software Modul verwendet.

Durchführung: Die SDH-gefärbten Muskelschnitte auf Membran-beschichteten Objektträgern wurden gemäß Herstellerangaben im Gerät platziert. Zur Dissektion wurde eine 20- oder 40-fache Objektiv-Vergrößerung gewählt und die Laser-Einstellungen an die jeweilige Vergrößerung und Gewebebeschaffenheit angepasst. Anhand der COX-SDH-gefärbten Referenzschnitte wurden die gesuchten COX-positiven oder COX-negativen Zellen auf den eingesetzten Objektträgern identifiziert und mittels Steuerungssoftware markiert und isoliert. Die isolierten Zellen wurden während der etwa 45-minütigen Prozedur unter Raumtemperatur in einem Probengefäß mit RNA-protektivem RLT Plus-Puffer (40µl, aus RNA-Extraktionskit RNeasy Micro Plus, Qiagen, mit 0,4 µl β-Mercaptoethanol) aufgefangen und anschließend homogenisiert.

2.3.1.4. RNA- und DNA-Extraktion und -Isolation

Hintergrund: AllPrep DNA/RNA Micro Kit und RNeasy Micro Plus Kit sind Säulen-basierte Verfahren zur Extraktion und Isolation von kleinsten Mengen (ng bis µg) RNA und DNA. Die isolierte RNA und DNA kann für weitere molekularbiologische Verfahren, z.B. qRT-PCR, verwendet werden.

Material: Zur RNA/DNA-Extraktion und -Isolation wurden das RNeasy Micro Plus-Kit (Qiagen, Produkt-Nr.: 74034) und das AllPrep DNA/RNA Micro-Kit (Qiagen, Produkt-Nr.: 80284) verwendet.

Durchführung: Die RNA-/DNA-Extraktion und Isolation wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde bis zur weiteren Analyse unter +4°C, die RNA unter -80°C aufbewahrt.

2.3.1.5. RNA-Quantitäts- und Qualitätsbestimmung mit Agilent Bioanalyzer

Hintergrund: Quantität und Qualität gewonnener RNA können mittels Agilent Bioanalyzer in einem automatisierten Elektrophoreseverfahren bestimmt werden. Der Degradationsgrad der RNA als Maß für die Qualität der Probe wird aus dem elektrophoretischen Profil des verwendeten Materials berechnet: In der Elektrophorese intakter RNA findet sich ein Fluoreszenz-Profil mit zwei charakteristischen ribosomalen RNA-Gipfeln (18S- und 28S-rRNA). Diese werden im

Rahmen der allgemeinen Degradation der RNA als erste durch RNasen zerstört, so dass sich das zweigipflige RNA-Profil abflacht. Die auf Grundlage des RNA-Profiles berechnete RNA Integrity Number (RIN) eignet sich als Maßzahl für die Integrität der gesamten RNA [102].

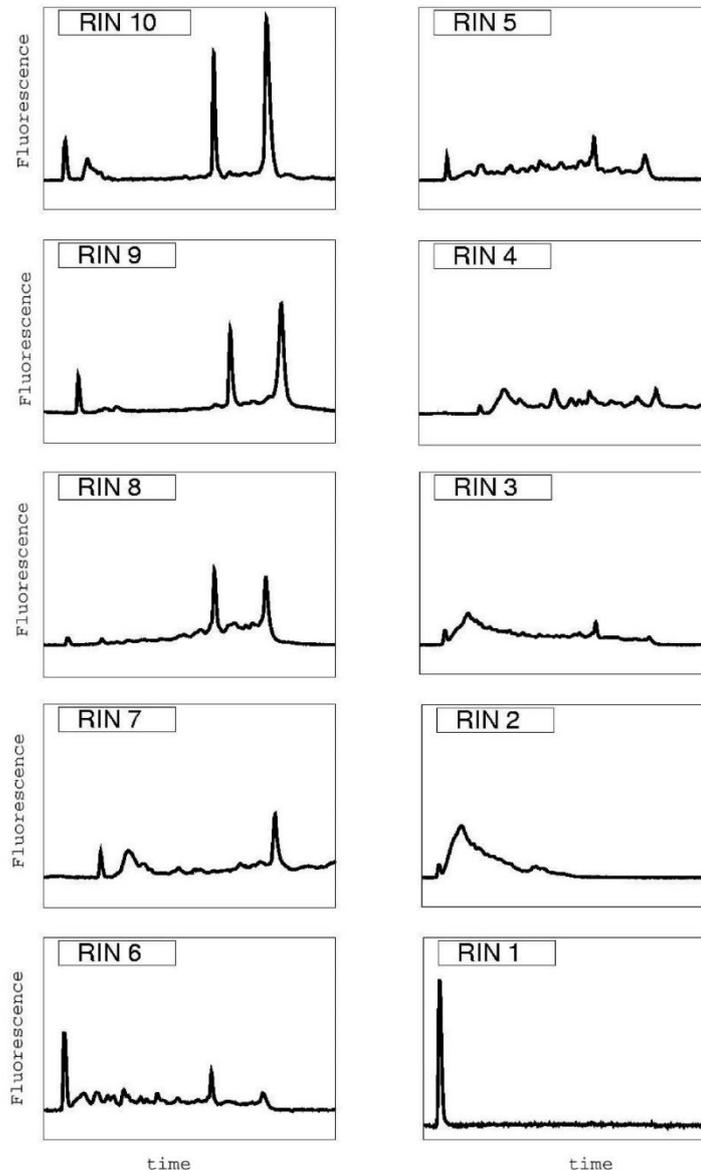


Abbildung 5: verschiedene RNA-Profile je nach Degradationsgrad, nach Schröder et al., 2006

Material: Zur Bestimmung von RNA-Menge und -Integrität wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer (Produkt-Nr.: G2938C) gemäß RNA 6000 Pico Assay-Protokoll (Agilent 6000 RNA Pico Assay-Kit, Produkt-Nr.: 5067-1513) verwendet.

Durchführung: Vorbereitung des Probematerials nach Herstellerprotokoll. Die Gelelektrophorese wurde anschließend automatisch mit 1 µg Probematerial durchgeführt.

2.3.2. DNA-Analyse

2.3.2.1. Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number der mitochondrialen DNA mittels quantitativer real time-PCR

Hintergrund der qRT-PCR: Die quantitative real time-PCR (qRT-PCR) ist ein PCR-Verfahren, das die Quantifizierung von DNA ermöglicht. Nach jedem PCR-Zyklus wird die aktuelle Menge an PCR-Produkten anhand eines Fluoreszenzsignals in Echtzeit detektiert. Die Anzahl an Vervielfältigungszyklen bis zum erstmaligen exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals (der sog. Ct-Wert, cycle threshold) kann mit den Ct-Werten anderer Proben oder mit einem Standard bekannter DNA-Konzentration verglichen werden. Auf diese Weise können mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge oder das Verhältnis der DNA-Mengen zwischen verschiedenen Proben bestimmt werden.

Hintergrund der Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number: Deletionen der mitochondrialen DNA finden sich fast ausschließlich im sogenannten major arc des mitochondrialen Genoms. Dort befindet sich das ND4-Gen, das somit häufig von Deletionen betroffen ist (in 82% d.F. bei single deletions, in 96% d.F. bei multiple deletions). Im fast deletionsfreien minor arc ist wiederum das Gen ND1 lokalisiert (Deletionen in 6% d.F. bei single deletion, 0% d.F. bei multiple deletion). [105]

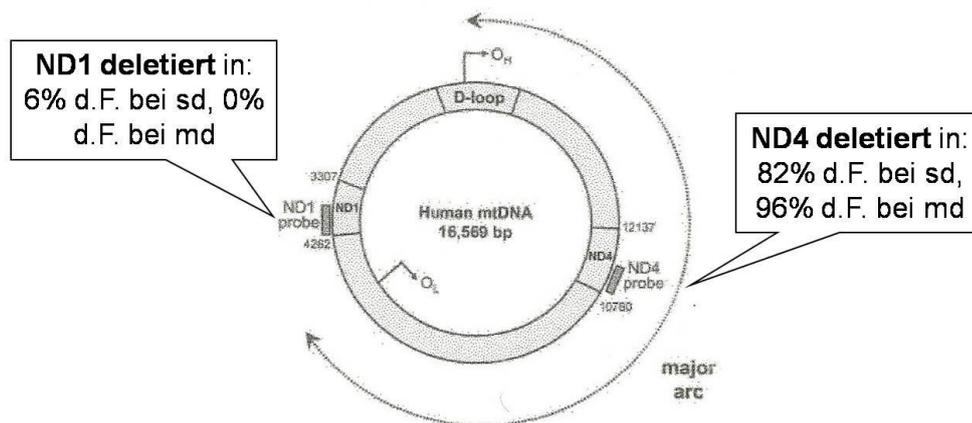


Abbildung 6: Mitochondriale DNA mit ND1 und ND4, modifiziert nach He et al., 2002

In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR dazu verwendet, den Deletionsgrad und die Copy Number der mtDNA anhand der Ct-Werte der mitochondrialen Gene ND1 und ND4 zu bestimmen. Nähere Angaben finden sich bei He et al. [105].

Methode zur Berechnung des Deletionsgrads: Der Deletionsgrad einer Zelle wird mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode aus den Ct-Werten der mitochondrialen Gene ND1 und ND4 bestimmt. Der ND1-Wert entspricht der intakten mtDNA, der ND4-Wert der mtDNA mit Deletionen. Aus der Differenz von ND1 und ND4 kann, nach Verrechnung mit einem Standard aus deletionsfreiem Humanblut, der Deletionsgrad gemäß folgender Formel berechnet werden:

$$\% \text{Deletionen} = (1 - 2^{-(\text{Ct ND4 Probe} - \text{Ct ND1 Probe} - \Delta\text{Ct Kontrolle})}) * 100$$

Zu Details siehe Krishnan et al (2007) [106].

Methode zur Berechnung der Copy Number: Um die Anzahl an Kopien mitochondrialer DNA in einer Probe (Copy Number) mittels quantitativer real time-PCR zu ermitteln, wird die Probe mit einem klonierten Standard (Plasmide mit bekannter ND1-Menge) verglichen. Zu diesem Zweck wird eine Standardkurve erstellt, die bekannten Mengen mitochondrialer DNA den dazugehörigen ND1-Ct-Wert zuordnet. So kann aus dem Ct-Wert einer Probe für das ND1-Gen unmittelbar die Copy Number dieser Probe berechnet werden. [107]

Material: Die verwendeten Materialien sind in folgenden Tabellen aufgelistet:

Tabelle 5: Materialien für die Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number

Gerät/Verbrauchsmaterial	Produkt-Nr.	Hersteller
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	4376598	Applied Biosystems
TaqMan ©Gene Expression Master Mix	4369510	Applied Biosystems
Tris Puffer 1M pH8 100 ml	9855G	Ambion
DEPC-treated Water	AM9922	Ambion
MicroAmp© Fast Optical 96-Well Reaction Plate	4346906	Applied Biosystems
MicroAmp© Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems

Tabelle 6: Primer für die Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number

Primer	Sequenz
HumND4_L (Fwd)	5'-CCA TTC TCC TCC TAT CCC TCA AC-3'
HumND4_H (Rev)	5'-CAC AAT CTG ATG TTT TGG TTA AAC TAT ATT T-3'
HumND1_L (Fwd)	5'-CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT-5'
HumND1_H (Rev)	5'-GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T-3'

Tabelle 7: Probes für die Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number

Probe	Sequenz
Lum-ND4-Probe (6-FAM-gelabelt)	5'-CCG ACA TCA TTA CCG GGT T-3'
Lum-ND1-Probe (VIC-gelabelt)	5'-CCA TCA CCC TCT ACA TCA-3'

Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number: Die Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number erfolgte gemäß folgendem Protokoll:

Tabelle 8: PCR-Reaktionsansatz für die Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number

Reagenz	Volumen	End-Konzentration
TaqMan Gene Expression Master Mix	10 µl	1x
Primer ND1_L	0,36 µl	900 nM
Primer ND1_H	0,36 µl	900 nM
Primer ND4_L	0,36 µl	900 nM
Primer ND4_H	0,36 µl	900 nM
Probe ND1 (VIC)	0,2 µl	100 nM
Probe ND4 (6-FAM)	0,2 µl	100 nM
ddH2O	6,16 µl	
Sample	2 µl	
Gesamt	20 µl	

Tabelle 9: PCR-Protokoll für die Bestimmung von Deletionsgrad und Copy Number

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
1. Enzym-Aktivierung	50°C	120 Sekunden
2. Denaturierung	95°C	10 Minuten
3. Denaturierung	95°C	15 Sekunden
4. Annealing und Elongation	60°C	60 Sekunden
5. Schritte 3 und 4 40mal wiederholen		

2.3.2.2. Bestimmung der Deletionsart mittels Long-Range nested PCR

Hintergrund: Die Long-Range nested PCR (lrPCR) ist eine PCR-Reaktion, die für die Amplifikation von >5 kbp langer Nukleinsäuren optimiert wurde. Als sog. nested PCR wird diese Reaktion bezeichnet, wenn nacheinander mehrere Paare von Primern verwendet werden, die die gesuchte Sequenz (hier: den Großteil der 16,6 kbp langen mitochondrialen DNA) einrahmen. Hierdurch wird die Anzahl zufälliger PCR-Produkte reduziert und damit die Spezifität der PCR-Reaktion erhöht.

Bei der anschließenden Gelelektrophorese der amplifizierten mtDNA entstehen Bandenmuster, die sich einem Deletionstyp zuordnen lassen (s. Abbildung 7):

- bei single deletions (sd) liegt die mtDNA in jedem betroffenen Molekül in derselben verkürzten Form vor, da jeweils das gleiche DNA-Fragment deletiert ist. Sd zeigen also bei hohem Deletionsgrad eine einzelne hochmolekulare Bande, die nicht dem Wildtyp entspricht, oder bei niedrigem Anteil an Deletionen der mtDNA eine zweite, neben der Wildtyp-Bande auftretende Bande;
- bei multiple deletions (md) liegen die betroffenen mtDNA-Moleküle in jeweils unterschiedlicher Länge vor, da in jedem Molekül unterschiedlich lange Fragmente der mtDNA fehlen. Md zeigen dementsprechend in der Elektrophorese viele unterschiedliche Banden von niedrigerem Molekulargewicht, die (je nach Deletionsgrad) zusätzlich oder anstelle der ursprünglichen Wildtyp-Bande auftreten können.

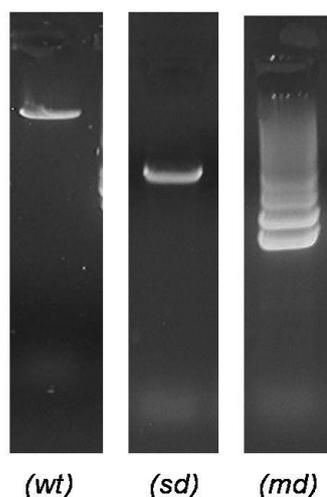


Abbildung 7: Beispiele von Bandenmustern für Zellen mit mitochondrialer DNA vom Wildtyp (wt), mit single deletion (sd) und multiple deletions (md)

Ergänzende Angaben finden sich bei Krishnan et al. und Bender et al. [23, 25]

Material: Die verwendeten Materialien sind in folgenden Tabellen aufgelistet:

Tabelle 10: Materialien für die Bestimmung der Deletionsart mittels IrPCR

Verbrauchsmaterial/Geräte	Produkt-Nr.	Hersteller
Thermo Cycler	PTC-200	MJ Research
Expand Long Range dNT Pack	04829042N2W	Roche
Ultrapure BSA, Non-Acetylated	AM2616	Ambion
Tube Strips 0,2 ml	82-0266-A	Peqlab Biotechnologie GmbH
Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH
Ethidiumbromid	E1510-10ml	Sigma-Aldrich
Gel Pilot 1kb Ladder	239085	Qiagen
DEPC-treated Water	AM9922	Ambion
GelPilot Loading Dye	124106862	Qiagen
Gelanalyse	Agagel	Biometra
Ultraviolet Transluminator	46514	Peqlab Biotechnologie GmbH

Tabelle 11: Primer für die Bestimmung der Deletionsart mittels IrPCR

Primer	Sequenz
Hum_Lx_1 (Fwd)	5'-TGTA AACGACGGCCAGTCAGTGACACATGTTT AACGGC-3'
Hum_Lx_1 (Rev)	5'-CAGGAAACAGCTATGACCTACAAGGACAGGCCCATTTG-3'
Hum_Lx_2 (Fwd)	5'-TGTA AACGACGGCCAGTTCCATCATAGCAGGCAGTTG-3'
Hum_Lx_2 (Rev)	5'-CAGGAAACAGCTATGACCAAGGAGTGAGCCGAAGTTTC-3'

Durchführung: Es wurden zwei PCR-Runden mit den oben aufgeführten Primern durchgeführt, wobei zuerst das externale und anschließend das internale Primerpaar verwendet wurde.

Tabelle 12: Ansatz 1. PCR-Runde (externale Primer):

Reagenz	Volumen	End-Konzentration
Buffer	10 µl	1x
dNTP	2,5 µl	0,5 mM
Primer F (external)	1,5 µl	600 nM
Primer R (external)	1,5 µl	600 nM
Taq-Polymerase	0,75 µl	3,75 U
BSA	10 µl	0,2x
ddH ₂ O	21,75 µl	
Template DNA	2 µl	
Gesamt	50 µl	

Tabelle 13: Programm 1. PCR-Runde (externale Primer):

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung und Enzym-Aktivierung	92°C	120 Sekunden
2. Denaturierung	92°C	10 Sekunden
3. Annealing	59°C	15 Sekunden
4. Elongation	68°C	13 Minuten
5. Schritte 2-4 9mal wiederholen (insgesamt 10 Zyklen)		
6. Denaturierung	92°C	10 Sekunden
7. Annealing	59°C	15 Sekunden
8. Elongation	68°C	13 Minuten +20 Sek./Zyklus
9. Schritte 6-8 9mal wiederholen (insgesamt 10 Zyklen)		
10. Elongation	68°C	7 Minuten
11. Kühlung	4°C	unendlich

Tabelle 14: Ansatz 2. PCR-Runde (internale Primer):

Reagenz	Volumen	End-Konzentration
Buffer	10 µl	1x
dNTP	2,5 µl	0,5 mM
Primer F (internal)	1,5 µl	600 nM
Primer R (internal)	1,5 µl	600 nM
Taq-Polymerase	0,75 µl	3,75 U
BSA	10 µl	0,2x
ddH ₂ O	21,75 µl	
Produkt aus der ersten PCR-Runde (1:10 verdünnt)	2 µl	
Gesamt	50 µl	

Tabelle 15: Programm 2. PCR-Runde (internale Primer):

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung und Enzym-Aktivierung	92°C	120 Sekunden
2. Denaturierung	92°C	10 Sekunden
3. Annealing	59°C	15 Sekunden
4. Elongation	68°C	12 Minuten
5. Schritte 2-4 9mal wiederholen (insgesamt 10 Zyklen)		
6. Denaturierung	92°C	10 Sekunden
7. Annealing	59°C	15 Sekunden
8. Elongation	68°C	12 Minuten +20 Sek./Zyklus
9. Schritte 6-8 19mal wiederholen (insgesamt 20 Zyklen)		
10. Elongation	68°C	7 Minuten
11. Kühlung	4°C	unendlich

10µl des PCR-Produkts aus der zweiten PCR-Runde wurden anschließend auf ein 0,9%-iges Agarosegel in TBE-Puffer aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

2.3.3. RNA-Analyse

2.3.3.1. In-vitro-Transkription

Hintergrund: In-vitro-Transkription (IVT) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von kleinsten Menge RNA. In einem ersten Schritt werden mit einer Reversen Transkriptase cDNA-Kopien der RNA erstellt, die anschließend in der eigentlichen IVT-Reaktion transkribiert werden. Das Endprodukt, die aRNA oder cRNA (antisense-RNA oder coding-RNA, synonym verwendet) kann im Anschluss z.B. für Hybridisierungsassays verwendet werden. Die Amplifizierung der RNA führt zu einer verbesserten Sensitivität und Reliabilität derartiger Assays [108, 109].

Material: Für die In-vitro-Transkription wurden das Ambion MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Applied Biosystems, AMB17515) und das Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, AMIL1791) mit T7 Oligo(dT) Primer (Ambion, 5710) und SUPERaseIn (Ambion, AM2694) verwendet.

Durchführung: Die In-Vitro-Transkription wurde zunächst mit Ambion MessageAmp II aRNA Amplification Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Nach der ersten Transkriptionsreaktion wurde die aRNA in 100µl RNase-freiem Wasser aufgelöst und das Volumen anschließend in einer Vakuumzentrifuge auf 10µl reduziert. Für die zweite Transkriptionsreaktion wurde das Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die amplifizierte aRNA wurde unmittelbar im Anschluss für die Hybridisierung verwendet.

2.3.3.2. Microarray: Hybridisierung, Scan/Datenerhebung und Auswertung

Hintergrund: Als Microarray werden Verfahren bezeichnet, die die gleichzeitige Analyse großer Datenmengen auf einem miniaturisierten Chip ermöglichen. Microarrays werden beispielsweise im Rahmen von Genexpressionsanalysen verwendet, wenn, so wie in der vorliegenden Arbeit, Genom-weite Genexpressionsprofile erstellt werden sollen. Die im Vorfeld amplifizierte und mit einem Fluoreszenzsignal markierte RNA wird zu diesem Zweck auf einen Chip aufgebracht, wo sie an komplementäre Gen-Sonden (Oligonukleotide oder DNA-Fragmente) bindet (sog. Hybridisierung). Das an diese Sonden gekoppelte Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge der jeweiligen RNA-Kopien. Da stets zwei verschiedene Proben verglichen werden, ergibt sich aus dem Abgleich der

Fluoreszenzsignale der beiden Proben für die untersuchten Gene ein differenzielles Expressionsprofil.

Material und Durchführung: Die Hybridisierung wurde gemäß Herstellerangaben auf Illumina WG-6v1 Bead Chips (Illumina) durchgeführt. Für Scan und Datenerhebung wurde der Illumina BeadArray Reader (Illumina) verwendet. Die Daten wurden anschließend mit dem Programm BeadStudio (Illumina, SW-20) ausgewertet und statistisch auf Zusammenhänge geprüft.

2.3.3.3. Signalweg-Analyse mittels Ingenuity Pathway Analysis

Hintergrund: Die Signalweg-Analyse ist eine Methode der Bioinformatik, die die Zuordnung von Genen oder Proteinen zu Signalwegen erlaubt. Da Gene in komplexe Signalnetzwerke integriert sind, erschließen sich durch die Zuordnung von Genen zu Signalwegen einerseits mögliche Funktionen von Proteinen, andererseits werden Zusammenhänge zwischen Genen sichtbar. Häufig werden Signalweg-Analysen im Rahmen von Genexpressionsstudien durchgeführt, um die Relevanz und Funktion von Genexpressionsunterschieden innerhalb zellulärer Netzwerke beurteilen zu können. Das hier verwendete Software-Programm Ingenuity Pathway Analysis (IPA) beruht auf der von Experten zusammengestellten IPA library of canonical pathways.

Material und Durchführung: Der Datensatz wurde mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>, Qiagen, Redwood City) ausgewertet und statistisch auf Zusammenhänge geprüft.

2.3.4. Validierung der Ergebnisse der RNA-Analysen

2.3.4.1. Bestimmung von Muskelfasertyp und Expression von *p53*, *p21* und *mdm2* mittels Immunhistochemie und -fluoreszenz

Hintergrund: Die Immunfluoreszenz ist ein immunhistochemisches Verfahren, mit dem Proteine oder andere Strukturen innerhalb von Geweben und Zellen durch spezifische, fluoreszierende Antikörper dargestellt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der zuvor durchgeführten RNA-Analysen exemplarisch anhand des Immunfluoreszenzsignals der proapoptotischen Proteine *p53*, *p21* und *mdm2* auf Protein- und Einzelzellebene validiert. Dazu wurden entsprechend gefärbte Gewebeschnitte von drei der untersuchten Muskelbiopsien erstellt und das Immunfluoreszenzsignal von *p53*, *p21* und *mdm2* in einzelnen Zellen in Abhängigkeit von Atmungskettenfunktion und Muskelfasertyp bestimmt. Der Fasertyp wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Doppelfärbung bestimmt. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein immunhistochemisches Verfahren, bei dem sich der jeweilige Primärantikörper gegen unterschiedliche Muskelfasertyp-spezifische Myosin-Schwere-Ketten-Isoformen (MYH2 bei Fasertyp 2a, MYH7 bei Fasertyp1) richtet und somit die Zuordnung von Zelle zu Fasertyp ermöglicht. Nähere Angaben zur Doppelfärbung finden sich bei Raheem et al. [110]. Zur Identifizierung der Zellkerne wurde das Färbemittel TO-PRO verwendet.

Material: Die verwendeten Materialien sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tabelle 16: Materialien für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Verbrauchsmaterial	Produkt-Nr.	Hersteller
Ethanol absolut	A3678, 1000	AppliChem
Ethanol 96%	L0447	Apotheke Innenstadt Uni Muenchen
Ethanol 70%		CLN GmbH
Aceton	1.00013.1000	Merck
Albumin (aus bovinem Serum)	A7906-50G	Sigma-Aldrich
PBS-Puffer 1M (10X) pH 7,4	P32799	Apotheke Innenstadt Uni Muenchen

Tabelle 17: Materialien für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz: Antikörper und Färbekits

Verbrauchsmaterial	Produkt-Nr.	Hersteller
p53-Antikörper (DO-1)	sc-126	Santa Cruz Biotechnology
p21-Antikörper (C-19)	sc-397	Santa Cruz Biotechnology
MDM2-Antikörper (SMP14)	sc-965	Santa Cruz Biotechnology
myosin slow	M8421	Sigma-Aldrich
myosin (human fast fibers)	A4.74	Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)
ZytoChem Plus AP Polymer Kit	POLAP-006	Zytomed Systems
Anti-Mouse/Rabbit poly hrp IHC detection kit	2774	Millipore
Permanent AP Red Kit	ZUC001-125	Zytomed Systems
Levamisole Solution	SP-5000	Vector Laboratories
TO-PRO®-3 iodide (642/661) - 1 mM solution in DMSO	T3605	Invitrogen

Färbungen: Neben der oben bereits beschriebenen COX-SDH-Färbung wurden folgende Protokolle zur immunhistochemischen Darstellung des Fasertyps („Doppelfärbung“) und von p53, p21 und mdm2 verwendet:

Tabelle 18: Protokoll für die Doppelfärbung zur Darstellung des Fasertyps

Arbeitsschritt	Dauer
Fixierung der Gewebeschnitte in Aceton	10 min
Blocken mit Reagent 1 (ZytoChem Plus AP Polymer Kit)	5 min
Waschen in 0,1M PBS	1x 2 min
Primären Antikörper Myosin (human fast fibers) in 1:1000-Verdünnung in 2%BSA/0,1M PBS auftragen und bei 37°C inkubieren	30 min
Waschen in 0,1M PBS	3x 5 min
Post Block mit Reagent 2 (ZytoChem Plus AP Polymer Kit)	20 min
Waschen in 0,1M PBS	3x 5 min
Sekundären Antikörper Reagent 3 (ZytoChem Plus AP Polymer Kit) auftragen	30 min

Tabelle 18: Protokoll für die Doppelfärbung zur Darstellung des Fasertyps (Fortsetzung)

Waschen in 0,1M PBS	3 x 2 min
Chromogen Permanent AP Red (8µl Chromogen +0,7µl Levamisol +0,5ml Puffer) aufbringen	20 min
Waschen in ddH2O	
Blocken mit 2% BSA/0,1 M PBS	30 min
Primären Antikörper myosin slow in 1:8000-Verdünnung in 2%BSA/0,1 M PBS auftragen und bei 37°C inkubieren	45 min
Waschen in 0,1 M PBS	2x 3 min
Sekundären Antikörper anti-mouse poly HRP auftragen	30 min
Waschen mit 0,1 M PBS	2x 3 min
Chromogen DAB (12,5 µl Chromogen pro 0,5 ml Chromogen-Puffer) auftragen	30 min
Waschen in ddH2O	5 Min
Dehydrieren in Ethanolreihe (70%, 95%, 100%, 100%)	je 1 min

Tabelle 19: Protokoll für die immunhistochemische Darstellung von p53, p21 und mdm2

Arbeitsschritt	Dauer
Fixierung in RNase-freiem 100% Methanol	40 sec
Waschen in 0,1M PBS	5 min
Blocken mit 5% FCS, 0,1% Triton X-100 in 0,1M PBS	60 min
Primärer Antikörper in Super Block T20 Blocking Buffer (1:10 verdünnt in PBS)	Über Nacht bei 4°C
Waschen in 0,1M PBS	3x 5 min
Sekundärer Antikörper in Blocking Buffer aufbringen (abgedunkelt)	60 min
Für p53: anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200)	
Für p21: anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:200)	
Für mdm2: anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200)	
Waschen in 0,1 M PBS (zunächst mehrmals waschen, dann abgedunkelt)	10 min
TO-PRO-Färbung in 1:1000-Verdünnung (1µM) (abgedunkelt)	15 min
Waschen in PBS 0,1M (zunächst mehrmals waschen, dann abgedunkelt)	3x 10 min

Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung: Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop wurden die gesuchten Zellen zunächst im Vergleich mit COX/SDH- und Doppelfärbung identifiziert.

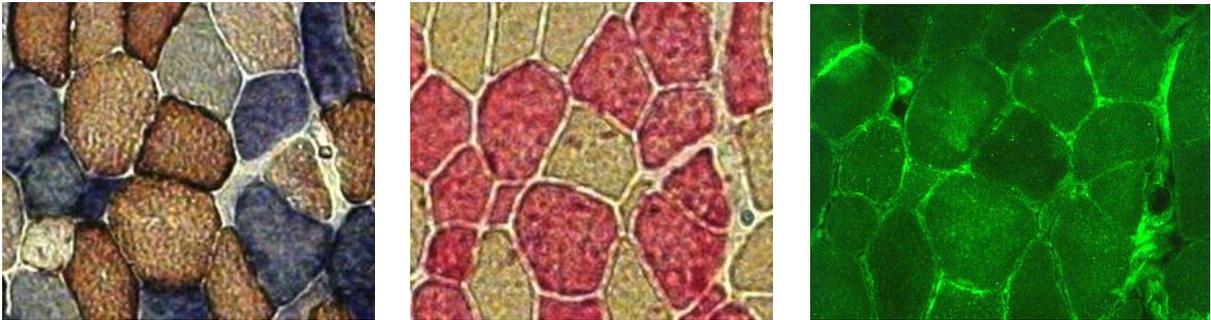


Abbildung 8: Sukzessive Muskelschnitte mit COX/SDH-Färbung (links), Doppelfärbung (Mitte) und Immunfluoreszenzfärbung für p21 (rechts) inkubiert

Anschließend wurde das Immunfluoreszenzsignal der ausgewählten Zellen mit dem Bildauswertungsprogramm ImageJ (Wayne Rasband, NIH) ausgewertet. Dazu wurde das Immunfluoreszenzbild in ein Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt, Helligkeit und Kontrast normalisiert und das Fluoreszenzsignal schließlich anhand der Helligkeit der markierten Zelle quantifiziert.

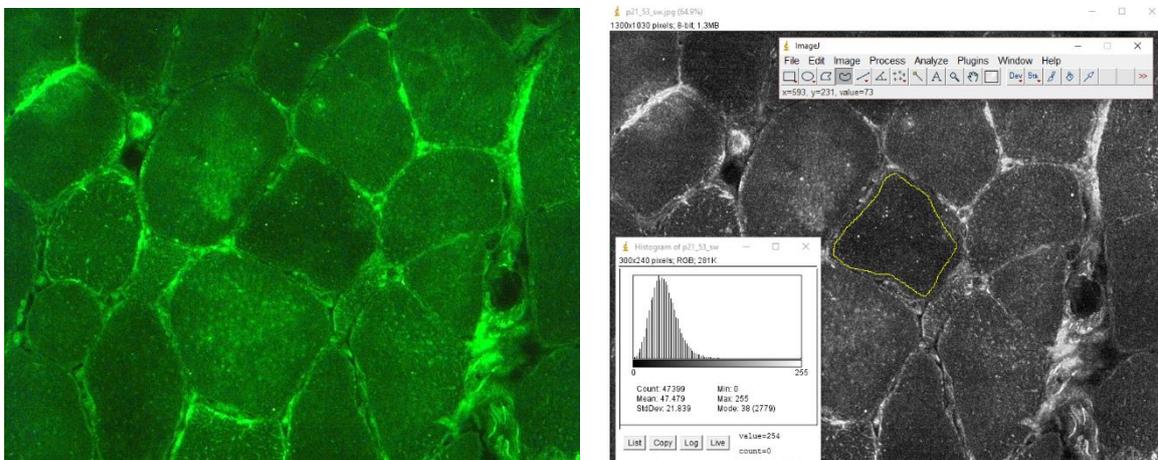


Abbildung 9: Immunfluoreszenzbild von p21 (links) und entsprechende Darstellung nach Umwandlung mit ImageJ in ein Schwarz-Weiß-Bild und Normalisierung (rechts). Exemplarisch ist auf dem rechten Bild eine Zelle markiert und die Analyse des Fluoreszenzsignals abgebildet (Histogramm)

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung einer RNA-schonenden Färbung zur Identifikation COX-negativer und COX-positiver Muskelzellen

Die hier verwendete Färbung zur Darstellung von Zellen mit Atmungskettendefekt sollte zwei Bedingungen erfüllen: einerseits sollten COX-negative und –positive Zellen deutlich unterscheidbar dargestellt werden, andererseits eine ausreichend hohe RNA-Qualität des Materials für weitere Analysen gewährleistet sein. Durch alleinige SDH-Färbung der Membran-beschichteten Objektträger und Reduktion der SDH-Färbedauer von 45 Minuten auf 15 Minuten wurden die genannten Bedingungen erfüllt.

3.1.1. Unterscheidbarkeit COX-negativer und COX-positiver Zellen in der modifizierten SDH-Färbung

Die in der COX/SDH-Färbung blau gefärbten Zellen (COX-negative Zellen) ließen sich in der alleinigen SDH-Färbung als Zellen mit besonders intensiver Blaufärbung (SDH-Überpositive) identifizieren. Im Vergleich mit den COX/SDH-gefärbten Referenzschnitten konnten auf diese Weise auch auf den ausschließlich SDH-gefärbten Membran-beschichteten Objektträgern eindeutig COX-positive von COX-negativen Zellen unterschieden werden (s. Abbildung 3). Dabei genügte eine 15-minütige Inkubation mit der SDH-Färbelösung, um bei alleiniger SDH-Färbung eine ausreichend intensive Färbung der Zellen zu gewährleisten.

3.1.2. RNA-Qualität in der modifizierten SDH-Färbung

Um zunächst isoliert den Effekt der Färbung auf die RNA-Qualität zu untersuchen, wurden n=6 und n=5 Membranen mit dem SDH-Medium für 15 oder 45 Minuten inkubiert und anschließend mit dem Skalpell vom Objektträger gelöst. Die n=5 Kontrollen wurden ohne Färbung mit dem Skalpell vom Objektträger gelöst.

Die RNA-Qualität nach 15-minütiger SDH-Färbung (RIN= 8,55 +/- 0,37) war im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle (RIN= 8,6 +/- 0,81) nicht signifikant schlechter (Δ RIN= -0,05; p= 0,89). Die 45-minütige SDH-Färbung (RIN= 7,16 +/- 0,42) verschlechtert die RNA-Qualität im Vergleich zur Kontrolle hingegen signifikant (Δ RIN= -1,39, p = 0,008) (s. Abbildung 10).

3.1.3. RNA-Qualität nach Laser-Zell-Mikrodissektion

Um die Auswirkungen der Laser-Zell-Mikrodissektion auf die RNA-Qualität zu untersuchen, wurden Membran-beschichtete Objektträger zunächst für 15 Minuten mit SDH-Medium inkubiert, und anschließend je 500 Zellen in einer 45-minütigen oder dreistündigen Laser-Mikrodissektionssitzung (n=4 und n=8) isoliert. 45 Minuten entsprechen der durchschnittlichen Arbeitszeit für die Isolation von 500 Zellen von einer Membran.

Nach Färbung und 45-minütiger LMD wurden RIN-Werte von 5,95 +/- 0,25 gemessen, nach Färbung und dreistündiger LMD wurden RIN-Werte von 5,25 +/- 1,04 gemessen. Die RNA-Integrität verschlechterte sich durch das 45-minütige LMD-Verfahren im Vergleich zur 15-minütigen SDH-Färbung ohne LMD um RIN = 2,6 ($p = 0,00000$).

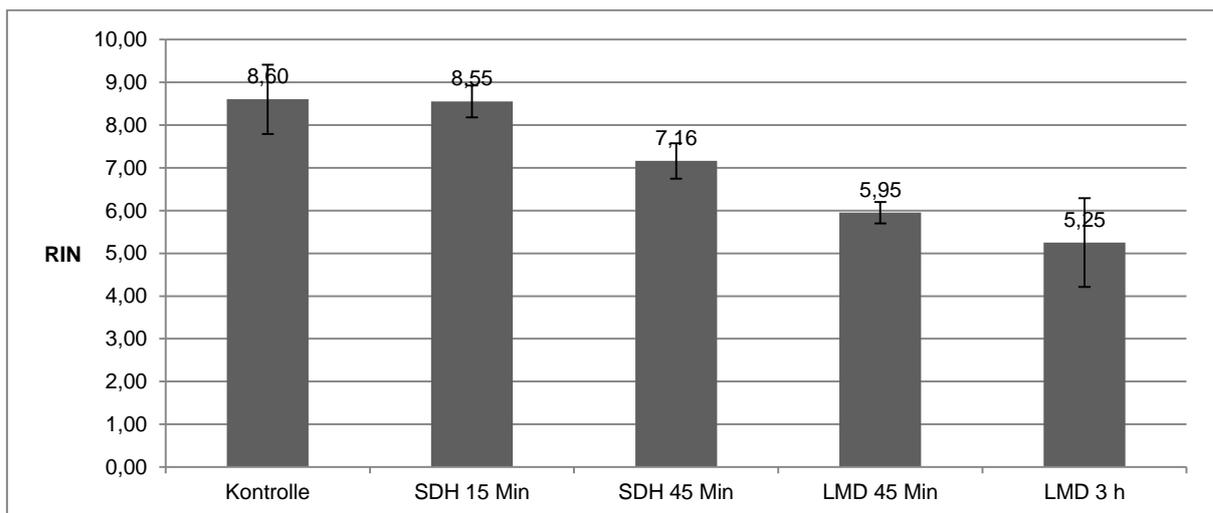


Abbildung 10: Darstellung der RIN-Werte der im Text genannten Gewebeschnitte. Kontrolle = keine Färbung, Entnahme mit Skalpell; SDH15 Min = 15-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Entnahme mit Skalpell; SDH 45 Min = 45-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Entnahme mit Skalpell; LMD 45 Min = 15-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Isolation während 45-minütiger Lasermikrodissektion; LMD 3h = 15-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Isolation während dreistündiger Lasermikrodissektion

3.2. Genetische Charakterisierung der CPEO-Patienten

Bei n=10 Patienten wurden jeweils 500 COX-positive Zelldissekate und 500 COX-negative Zelldissekate hinsichtlich Copy Number, Deletionsgrad und Art der vorliegenden Deletion untersucht.

3.2.1. Bestimmung von Copy Number und Deletionsgrad

Die CN betrug in den COX-positiven Samples 990,47 +/- 826,65 mtDNA-Moleküle pro 500 Zelldissekate, in den COX-negativen Proben CN= 3345,24 +/- 1968,27 mtDNA-Moleküle pro 500 Zelldissekate (s. Abbildung 11). In den COX-negativen Samples war die CN signifikant höher als in den COX-positiven Samples ($p = 0,003$). Die CN der COX-negativen Proben war bei allen Patienten höher als die CN des komplementären COX-positiven Samples.

Der Deletionsgrad betrug in den COX-positiven Dissekaten 30,89 +/- 13,56 %, in den COX-negativen Dissekaten 61,03 +/- 27,03 %. Der Deletionsgrad unterschied sich damit signifikant zwischen COX-negativen und COX-positiven Muskelfasern der jeweiligen Patienten ($p = 0,006$): In n=9 Patienten waren die COX-negativen Proben stärker von Deletionen betroffen als die COX-positiven Zellen.

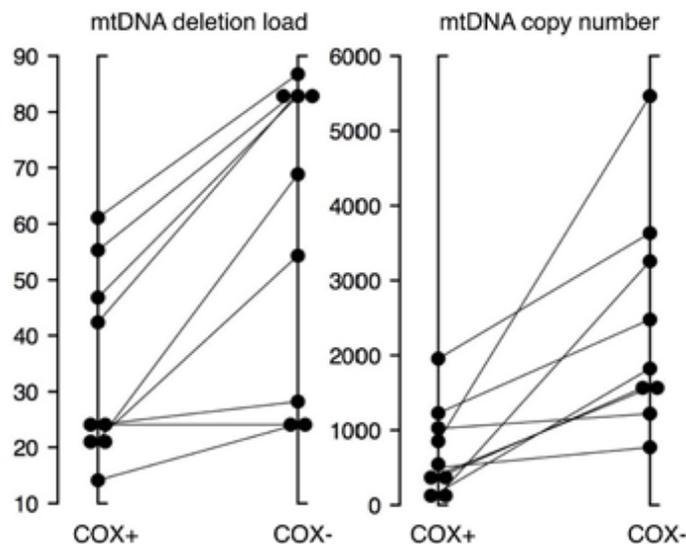


Abbildung 11: Deletionsgrad in % (links) und Copy Number in mtDNA-Moleküle/500 Zelldissekate (rechts) der COX-positiven (COX+) und COX-negativen (COX-) Muskelfasern.

Zur Prüfung des Zusammenhangs zwischen Deletionsgrad und Copy Number wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (s. Abbildung 12). Dabei wurde nicht zwischen COX-positiven und COX-negativen Proben unterschieden. Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang mit Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,3063$.

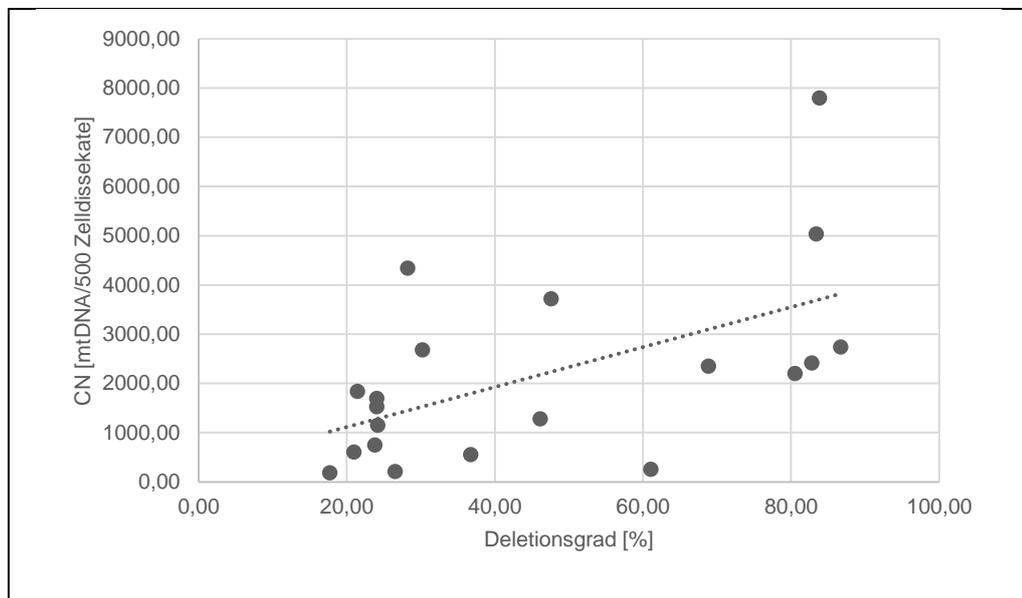


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Deletionsgrad und Copy Number. Die Punkte entsprechen jeweils CN und Deletionsgrad eines Samples gepoolter Muskeldissekate.

3.2.2. Bestimmung der Deletionsart (sd/md)

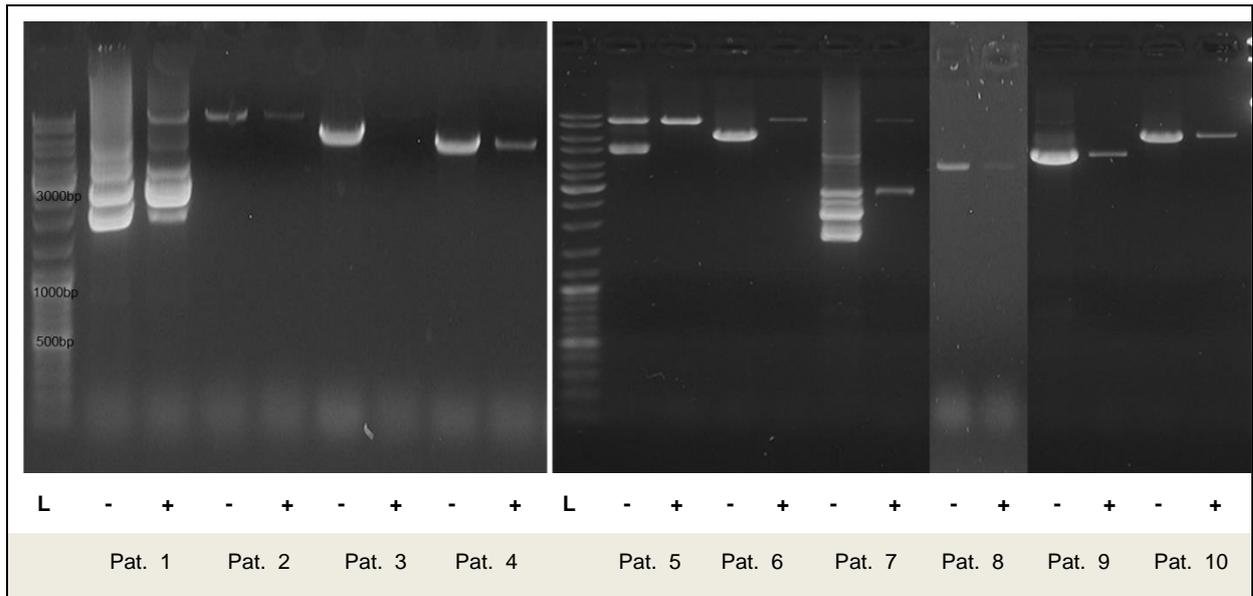


Abbildung 13: Gelelektrophoresen der Muskeldissekate. Für jeden Patienten ist jeweils links die Gelelektrophorese der 500 COX-negativen Zelldissekate (-) und rechts die Gelelektrophorese der 500 COX-positiven Zelldissekate (+) dargestellt. Die Gelelektrophoresen von Patient 8 sind heller dargestellt, um die Banden besser sichtbar zu machen. L = Ladder (3000bp, 1000bp, 500bp)

Patient 1 zeigte die für multiple deletions (md) charakteristischen vielen niedermolekularen Banden. Patient 2 zeigte zwei Wildtyp (wt)-Banden bei 16,6 kbp - der Deletionsstatus konnte somit nicht abschließend bestimmt werden. Patient 7 zeigte in der COX-negativen Probe ein typisches md-Muster und in der COX-positiven Probe ein sd-Muster, so dass auch hier der Deletionsstatus nicht eindeutig geklärt werden konnte. Alle weiteren Patienten zeigten ein sd-typisches Muster: Die Patienten 3, 5 und 6 zeigten im COX-negativen Sample eine nicht-wt-Bande (Patient 5 zusätzlich zur wt-Bande), im COX-positiven Sample war nur die wt-Bande sichtbar. Die Patienten 4, 8, 9 und 10 zeigten in der Elektrophorese der COX-negativen und COX-positiven Samples eine charakteristische singuläre nicht-wt-Bande. Die Nicht-Wildtyp-Banden bei den Patienten 4, 6 und 10 zeigten die für common deletion (cd) zu erwartende Bande bei 5 kbp.

3.3. Genexpressionsanalyse

Es wurden jeweils 500 COX-positive und 500 COX-negative Zelldissekate von n=9 Patienten (Patienten 1-8 und Patient 10) untersucht.

3.3.1. Bestimmung differenziell exprimierter Gene

Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ wurden 5992 Sonden detektiert. Mittels Varianzanalyse wurden nach Benjamini-Hochberg-Korrektur ($FDR < 0,05$) 160 Gene identifiziert, nach Bonferroni-Korrektur wurden neun Gene identifiziert (s. Tabelle 20). Die Untersuchungen wurden mit dem Programm BeadStudio (Illumina) durchgeführt.

Tabelle 20: Übersicht differenziell exprimierter Gene nach Bonferroni-Korrektur. x^* = x-fache Veränderung der Expression

Gen	p-Wert	x^*	Definition	Funktion des Gens
SLC7A1	$4,5 \times 10^{-8}$	3.7	Solute carrier family 7 member 1	L-Arginin-Transmembrantransporter, NO-Signaling
SHMT2	$1,1 \times 10^{-6}$	1.7	Serinydroxymethyltransferase 2	Mitochondriale Glycinhydroxymethyltransferase, Regulierung der Zellproliferation
SMTNL1	$2,1 \times 10^{-6}$	- 1.8	Smoothelin-like 1	Kontraktion und Relaxation des Muskels und belastungsabhängige vaskuläre Anpassungsreaktion
FHL2	$3,1 \times 10^{-6}$	- 1.5	Four and a half LIM domains 2	Koaktivator der Transkription, negative Regulierung apoptotischer Prozesse
DHCR24	$3,3 \times 10^{-6}$	- 1.5	24-dehydrocholesterol reductase	Cholesterin-Biosynthese, Antiapoptose, oxidative Stressantwort, negative Regulierung der Zellproliferation
COX7A2	$4,4 \times 10^{-6}$	1.5	Cytochrome C oxidase subunit VIIa	Mitochondrialer Elektronenüberträger
ADHFE1	$4,9 \times 10^{-6}$	- 1.2	Alcohol dehydrogenase, iron containing 1	Mitochondriale Hydroxyazid-Oxoazid Transhydrogenase, zelluläre Stoffwechselprozesse
FEZ2	$5,4 \times 10^{-6}$	- 1.6	Fasciculation and elongation protein zeta 2	Negative Regulierung der Bildung von Autophagosomen
TRIB3	$7,8 \times 10^{-6}$	4.0	Tribbles homolog 3	TNF- und TRAIL-induzierte Apoptose, negative Regulierung des Zellüberlebens, Serin-Threonin-Kinase AKT1

3.3.2. Zuordnung von Genen zu Signalwegen

Die Signalweganalyse wurde mit dem Programm Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems) durchgeführt. Die nach Benjamini-Hochberg-Korrektur (FDR<0,05) signifikant differenziell exprimierten Gene wurden den zugehörigen Signalwegen zugeordnet. Signifikante Aktivierung/Inhibition der Signalwege wurde mit dem exakten Fischer-Test geprüft. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Tabelle 21: Signifikante Signalwege nach Benjamini-Hochberg-Korrektur (FDR<0,05.) Signalwege mit redundanten Genen sind gemeinsam aufgeführt. x* = x-fache Änderung

Signalweg	p-Wert Signalweg	Gen		p-Wert Gen	x*
Hippo signaling	6.9 x 10 ⁻⁶	CUL1	cullin 1	2.27 x 10 ⁻⁴	-1.19
		PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	1.32 x 10 ⁻³	-1.30
		PPP1R3A	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	1.17 x 10 ⁻³	-1.35
		PPP2R2B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	5.51 x 10 ⁻⁴	1.24
		PPP2R3A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	5.18 x 10 ⁻⁴	-1.33
		SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	1.14 x 10 ⁻³	-1.37
		SMAD4	SMAD family member 4	8.18 x 10 ⁻⁴	-1.32
EIF2 signaling und mTOR signaling	1.2 x 10 ⁻⁵ 7.9 x 10 ⁻⁴	FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus ubiquitously expressed	1.23 x 10 ⁻³	1.19
		PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	1.32 x 10 ⁻³	-1.29
		RPL8	ribosomal protein L8	1.79 x 10 ⁻⁴	1.22
		RPL13	ribosomal protein L13	8.75 x 10 ⁻⁴	1.27
		RPL37A	ribosomal protein L37a	1.04 x 10 ⁻³	1.33
		RPS6	ribosomal protein S6	6.53 x 10 ⁻⁴	1.43
		RPS19	ribosomal protein S19	2.89 x 10 ⁻⁴	1.24
		RPS23	ribosomal protein S23	3.37 x 10 ⁻⁴	1.12
		RPS28	ribosomal protein S28	1.07 x 10 ⁻³	1.43

eiF4/p70S6K signaling	1.7 x 10 ⁻⁴	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	1.32 x 10 ⁻³	-1.30
		PPP1R3A	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	1.17 x 10 ⁻³	-1.35
Zykline und Zellzyklus-Regulierung	4.6 x 10 ⁻⁴	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	5.18-5	1.85
		CUL1	cullin 1	2.27 x 10 ⁻⁴	-1.18
		PPP2R2B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	5.51 x 10 ⁻⁴	1.23
		PPP2R3A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B", alpha	5.18 x 10 ⁻⁴	-1.33
		SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	1.14 x 10 ⁻³	-1.37
G2/M DNA damage Checkpoint-Regulierung	6.8 x 10 ⁻⁴	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	5.18 x 10 ⁻⁵	1.85
		CUL1	cullin 1	2.27 x 10 ⁻⁴	-1.19
		GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	8.09 x 10 ⁻⁴	1.39
		SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	1.14 x 10 ⁻³	-1.37
G1/S-Checkpoint		SMAD4	SMAD family member 4	8.18 x 10 ⁻⁴	-1.32
TOB T cell signaling	1.3 x 10 ⁻³	CUL1	cullin 1	2.27 x 10 ⁻⁴	-1.19
		SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	1.14 x 10 ⁻³	-1.37
		SMAD4	SMAD family member 4	8.18 x 10 ⁻⁴	-1.32
Folat-Stoffwechsel	2.4 x 10 ⁻³	MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2	2.46 x 10 ⁻⁴	1.83
		SHMT2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	1.15 x 10 ⁻⁶	1.69

Mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA) wurden folgende relevante vorgeschaltete Regulatorgene und microRNAs (miRNA) identifiziert:

Tabelle 22: Regulatorgene und microRNAs (miRNA) und deren Zielmoleküle im Datensatz

upstream Regulatorgen / miRNA (inhibiert)	z-score	Zielmoleküle im Datensatz
ESR1	-2.545	ARHGEF2,CDKN1A,CEBPG,DYRK2,FBXW7,FIBP,GPAM,HYAL1,NEDD4,PDLIM5,PFN2,RERE,RNF38,SCARB2,SLC7A1,SLC7A2,TRIB3,WNK1
RICTOR	-2.449	COX7A2,FAU,RPL8,RPS19,RPS23,RPS6
WNT3A	-2.236	FHL2,FHOD3,SLC7A1,SLC7A2,TRIB3

Tabelle 22: Regulatorgene und microRNAs (miRNA) und deren Zielmoleküle im Datensatz (Fortsetzung)

upstream Regulatoren / miRNA (aktiviert)	z-score	Zielmoleküle im Datensatz
MYCN	3.162	CDKN1A,EEF1A1,FAU,MSRB3,RPL13,RPL37A,RPL8,RPS19,RPS23,RPS28,RPS6
ATF4	2.219	ATF5,CDKN1A,CEBPG,MTHFD2,SHMT2,SLC7A1,TRIB3
NGF	2.158	CDKN1A,EEF1A1,EHD4,GADD45A,PPP2R2B
TGFB1	2.002	ABLIM3,AIF1L,BIN1,CARS,CDKN1A,DAPK1,DYRK2,EEF1A1,FAM107A,GADD45A,IL17D,MTHFD2,PDLIM5,PFN2,RERE,SLC7A1,SMAD4,WNK1
miRNA		
miR-340-5p (UAUAAAG)	2.519	ANKRD28,ANO6,C12orf75,C2orf88,CHD7,CYP4V2,DAPK1,DDN,EFNA4,ELP5,FHL2,JPH1,LMO7,MSRB3,PARM1,RERE,RPRD1A,SCARB2,SKP1,SMAD4,SMTNL2,SVIL,UBE2E3,XPO4
miR-200b-3p (AAUACUG)	2.086	ANKRD28,ANO6,C16orf72,CALU,ETF1,FARP1,FBXW7,FEZ2,LMO7,NCOA7,PFN2,PKIA,PPP1CB,RERE,RNF38,RPRD1A,SSH2
miR-377-3p (UCACACA)	3.245	ANKRD28,C16orf72,CUL1,DHCR24,FOXJ3,MCU,MSRB3,NEDD4,PKIA,RNF38,XPO4
miR-17-5p (AAAGUGC)	2.559	AEN,ANO6,C16orf72,CDKN1A,FBXL5,FOXJ3,PDLIM5,PFN2,PKIA,PPP2R3A,RNF38,SLC7A2,SMAD4,SSH2,UBQLN4,VPS13C,WNK1
miR-381-3p (AUACAAG)	2.638	CUL1,ETF1,FOXJ3,JPH1,MSRB3,PKIA,PPP1CB,RPRD1A,SCARB2,SLC7A1,SMAD4,SSH2,WNK1
miR-137-3p (UAUUGCU)	2.818	ACTN2,ANKRD28,ANXA7,CHD7,DUSP10,FBXW7,GPAM,LAPTM4B,MSRB3,PDLIM3,PPP1CB,SLC25A5,UGP2,USP38,XPO4
miR-219a-5p (GAUUGUC)	2.007	ANXA7,CHD7,FBXW7,FOXJ3,PARM1,SCARB2,SMAD4
miR-23a-3p (UCACAUU)	2.937	ACTN2,CHD7,DAPK1,DYRK2,FOPNL,NEDD4,PKIA,PPP1CB,PPP2R3A,SLC36A2,SLC7A1,SMAD4,SSH2,WBP4,WNK1
miR-186-5p (AAAGAAU)	2.258	ANKRD28,ANO6,EIF2D,FBXL5,MSRB3,NEDD4,PARM1,PPP1CB,RERE,TSPYL1,VPS13C
miR-224-5p (AAGUCAC)	2.405	FAM217B,FBXL5,RERE,RNF38,RPRD1A,SMAD4
miR-27a-3p (UCACAGU)	2.345	CALU,CHD7,FAM217B,FBXW7,GPAM,JPH1,LAPTM4B,NCOA7,NEDD4,PKIA,RNF38,SLC16A10,SMAD4,WNK1
miR-539-5p (GAGAAAU)	2.204	CLIC5,NEDD4,PPP1CB,RPRD1A,SLC7A1,SMAD4,WBP4,WNK1
miR-338-3p (CCAGCAU)	2.195	FBXW7,FOPNL,PPP1CB,TSPYL1,WNK1
miR-144-3p (ACAGUAU)	2.282	ANKRD28,ARPP21,DYRK2,FBXW7,JPH1,NCOA7,PKIA,RNF38,SMAD4,USP38
miR-145-5p (UCCAGUU)	2.402	ANKRD28,ANO6,C16orf72,JPH1,PPP2R3A,SKP1,SLC7A1,SMAD4,SSH2
miR-101-3p (ACAGUAC)	2.428	ABLIM3,ANKRD28,C16orf72,C8orf76,DYRK2,FAM217B,FBXW7,RNF38,USP38
miR-590-3p (AAUUUUA)	2.243	ARHGEF2,DYRK2,FOPNL,LAPTM4B,MSRB3,NEDD4,PRUNE2,RPRD1A,SCARB2,SMAD4,WNK1,XPO4
miR-128-3p (CACAGUG)	2.324	ARPP21,FBXW7,GPAM,LAPTM4B,NCOA7,NEDD4,PKIA,RERE,RNF38,WNK1

3.4. Validierung der Ergebnisse der RNA-Analyse anhand der immun-histochemischen Bestimmung der Expression von p53, p21 und mdm2

Die Ergebnisse der RNA-Analysen wurden in den Muskelbiopsien der Patienten 4, 9 und 10 auf Einzelzell- und Proteinebene überprüft. Dazu wurden exemplarisch die Fluoreszenzsignale von p53, p21 und mdm2 in Abhängigkeit von Atmungskettendefekt und Fasertyp untersucht. Von jedem Zelltyp wurden jeweils 10 Zellen untersucht. Die Immunfluoreszenzwerte wurden jeweils in Relation gesetzt zu den Werten für COX-positive Zellen vom Fasertyp 1 (=100%) und statistisch ausgewertet (Mittelwert, Standardabweichung, T-Test). Angaben zu den p-Werten finden sich im Anhang.

3.4.1. Immunfluoreszenzsignal für p53

Bei beiden Fasertypen zeigte sich ein Anstieg der p53-Immunfluoreszenz von COX-positiv (Typ 1: 100 +/-17,9%; Typ 2: 120,3 +/-19,0%) über COX-negativ (Typ 1: 119,3 +/-23,9%; Typ 2: 124,1 +/-22,6%) bis COX-negativ/SDH-überpositiv (Typ 1: 129,0 +/-24,2%; Typ 2: 140,3 +/-24,3%). Der Anstieg des p53-Signals war bei Fasertyp 1 zwischen COX-positiv und COX-negativ am steilsten, bei den Fasern vom Typ 2 zwischen COX-negativ und COX-negativ/SDH-überpositiv. Insgesamt stieg das p53-Fluoreszenzsignal beim Fasertyp 1 stärker an als beim Typ 2. Die p53-Werte waren bei den Typ-2-Fasern für alle Zelltypen höher als die Messwerte von Fasertyp 1.

3.4.2. Immunfluoreszenzsignal für p21

Bei beiden Fasertypen stieg das p21-Fluoreszenzsignal von COX-positiven (Typ 1: 100,0 +/-23,0%; Typ 2: 133,6 +/-31,3 %) über die COX-negativen (Typ 1: 126,0 +/-29,0%; Typ 2: 152,8 +/-36,5%) bis zu den COX-negativen/SDH-überpositiven Zellen (Typ 1: 157,3 +/-40,3%; Typ 2: 176,1 +/-46,4%) kontinuierlich und signifikant an. Die p21-Immunfluoreszenz war unabhängig vom Atmungskettendefekt für Fasertyp 2 stärker als für Muskelfasern vom Typ 1.

3.4.3. Immunfluoreszenzsignal für mdm2

Das mdm2-Immunfluoreszenzsignal stieg bei den Zellen vom Fasertyp 1 kontinuierlich von COX-positiv (100 +/-22,3%) über COX-negativ (107,8 +/-23,3%) bis COX-negativ/SDH-überpositiv (116,4 +/-23,7%) an, der Anstieg war jedoch

schwächer ausgeprägt als bei p53 und p21. Bei den Typ-2-Muskelfasern stieg das mdm2-Signal von COX-positiv (119,1 +/-26,0%) zu COX-negativ (122,0 +/-26,8%) an und sank dann für die COX-Negativen/SDH-Überpositiven (115,3 +/-31,4%) unter den Ursprungswert der COX-Positiven. Die Typ-2-Fasern zeigten bei den COX-Positiven und COX-Negativen ein stärkeres mdm2-Signal als die Typ-1-Fasern.

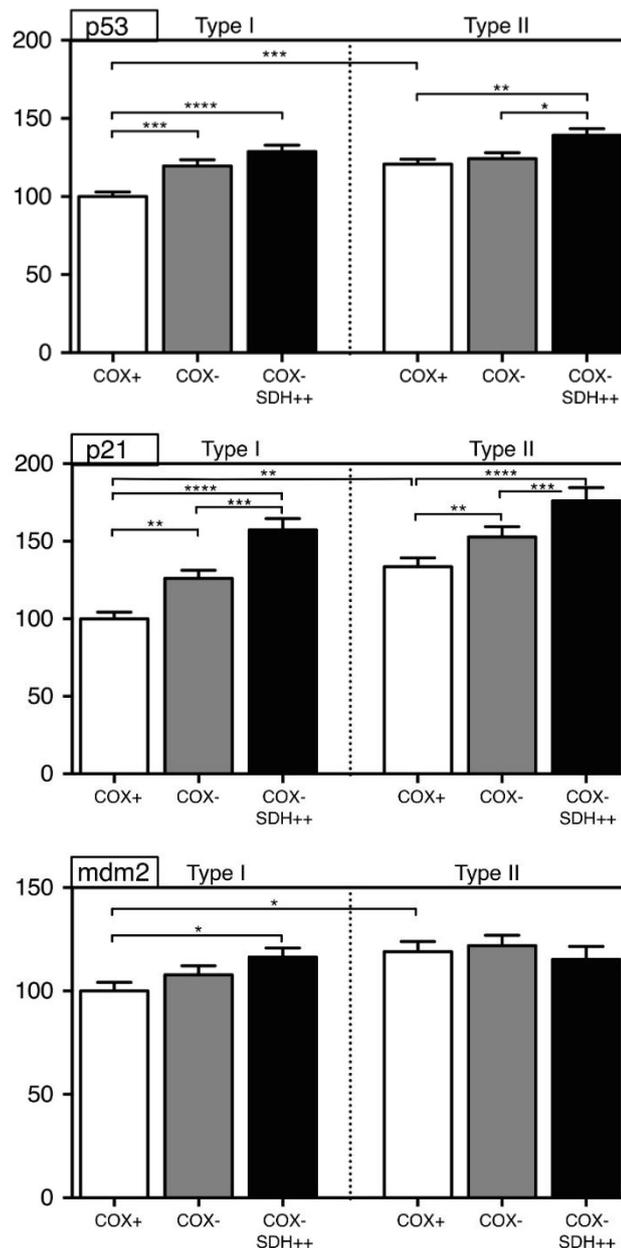


Abbildung 14: Immunfluoreszenzsignal für p53 (oben), p21 (Mitte), mdm2 (unten); von links nach rechts Werte für COX-positive (COX+), COX-negative (COX-) und COX-negative/SDH-überpositive Fasern (COX-/SDH++) für Fasertyp 1 (Type I) und Fasertyp 2 (Type II); Werte in Prozent, bezogen auf COX+/FT1

4. Diskussion

Deletionen der mtDNA verursachen kongenitale mitochondriale Erkrankungen, werden jedoch auch mit neurodegenerativen Erkrankungen, der Entstehung von Tumoren, sowie allgemeinen Alterungsmechanismen in Verbindung gebracht. Die Korrelation von Genotyp, d.h. Lokalisation und Umfang der Mutationen, und Phänotyp, d.h. Art und Ausmaß der zellulären Dysfunktion, ist dabei ausgesprochen variabel. Wichtige Ursachen dieser Variabilität sind einerseits der unterschiedlich hohe Anteil mutierter mtDNA in verschiedenen Zelltypen, Geweben und Organen, und andererseits das Vorhandensein zell- und organspezifischer Schwellenwerte. Erst bei Überschreiten dieser Schwellenwerte (als grober Richtwert wird häufig ein Heteroplasmiegrad von 60% angeführt) kommt es zu relevanten Störungen der Zellfunktion, wobei eine Vielzahl von Anpassungsmechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene den Energiehaushalt und die Zellfunktion zunächst aufrechterhält. Versagen diese Mechanismen, geht die Zelle zugrunde.

Die vorliegende Arbeit soll derartige Anpassungsmechanismen auf Genexpressionsebene darstellen und aufzeigen, wie menschliche Zellen unter in-vivo-Bedingungen auf Deletionen der mtDNA reagieren. Das typische genetische und histologische Mosaik von Muskelbiopsien kann hierbei genutzt werden, um Genexpressionsmuster unmittelbar benachbarter Muskelfasern mit und ohne metabolischer Störung differentiell zu analysieren. Die gleichzeitige Isolation von DNA und RNA aus zuvor histologisch charakterisierten Muskelfasern ermöglicht es, den zellulären Phänotyp mit dem Genotyp (d.h. Heteroplasmiegrad und Copy Number) und dem Genexpressionsmuster zu korrelieren.

4.1. Etablierung einer RNA-schonenden Methode zur Identifikation und Isolation COX-negativer und COX-positiver Muskelzellen

In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, das die Identifizierung und Isolation humaner Skelettmuskelfasern für Genexpressionsanalysen anhand histologischer und histochemischer Charakteristika ermöglicht. Die dargestellte Methode erlaubt die Isolation kleinster Mengen DNA und RNA aus einzelnen Muskelfasern, ohne dass die DNA und insbesondere RNA in relevantem Ausmaß durch Nukleinasen degradiert wird.

Im Mittelpunkt der hier dargestellten Überlegungen stand die Frage, ob die vorliegende Methodik eine unverfälschte Untersuchung der Genexpression

ermöglicht. Grundsätzlich können zwei Arten unerwünschter Veränderungen der RNA unterschieden werden:

1. Eine unspezifische Degradation der RNA durch endo- und exogene RNasen (darstellbar durch die RNA-Qualität)

Traditionell wird die RNA-Qualität mittels Gelelektrophorese über die semiquantitative Auswertung der 28s/18s-rRNA-Ratio ermittelt. Als genauere Methode steht unterdessen die Bestimmung der RNA Integrity Number (RIN) mit einem Agilent 2100 Bioanalyser zur Verfügung, die auch bei den hier vorliegenden niedrigen RNA-Konzentrationen die RNA-Qualität valide und reliabel abbildet [102, 111, 112]. Diverse Studien belegen den Einfluss der RNA-Qualität auf Expressionsanalysen, so dass grundsätzlich die bestmögliche Qualität angestrebt werden sollte. Mit zunehmender RNA-Degradierung sinkt nämlich zum einen die Sensitivität, d.h. die ‚Ausbeute‘ detektierter Gentranskripte, zum anderen steigt die Varianz der Expressionsergebnisse und damit der Anteil falsch-positiver und falsch-negativer Befunde [112, 113].

Um den zeit- und temperaturabhängigen Abbau der RNA durch endogene RNasen zu minimieren, wurden die histologischen Schnitte in dieser Arbeit schnellstmöglich und unter kontinuierlicher Kühlung entnommen sowie unter Verwendung ausschließlich RNase-freier Materialien in einem verkürzten Verfahren gefärbt und fixiert. Zur Vermeidung der Kontamination durch exogene RNasen erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte unter gekühlten und möglichst RNase-freien Bedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA-Qualität der verwendeten Gewebe nicht durch die Färbung, sondern erst durch die Laser-Mikrodissektion und die damit verbundene Wärmeexposition kompromittiert wurde. Bei den in dieser Arbeit erzielten RIN-Werten von ca. 5-6 nach LMD kann gemäß Schröder et al. [102] von einer guten Verwertbarkeit für anschließende Expressionsanalysen ausgegangen werden.

2. Spezifische, systematische Veränderungen der Genexpression

Strand et al. beobachteten, dass die Degradierung der RNA bei RIN-Werten unter 6 nicht zufällig über das Genom verteilt ist, sondern systematisch bestimmte Gene betreffen kann (u.a. Desoxyribonukleasen und NADH-Dehydrogenasen, Kollagen, an der Zelladhäsion-beteiligte und ribosomale Proteine) [113]. Derartige RIN-abhängige

Verzerrungen können jedoch erheblich reduziert werden, indem, wie in der vorliegenden Arbeit, Proben mit ähnlichen RIN-Werten verglichen werden [103, 111].

Bei post mortem entnommenen Geweben besteht zudem die Gefahr systematischer Verzerrungen der Genexpression durch agonale Prozesse vor der Gewebeentnahme. Derartige spezifische Veränderungen der Genexpression konnten in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von Biopsien, die ursprünglich zur klinischen Diagnostik entnommen wurden, vermieden werden.

Auf systematische Veränderungen der Genexpression durch die Zeit zwischen Proben-Entnahme und biologischer Inaktivierung (u.a. Induktion von AMPK-, Akt- und MAPK-Signalwegen) weisen auch Sköld et al. hin, auch wenn diese nicht unmittelbar in Zusammenhang mit dem RIN-Wert stehen und eher Ausdruck fortgesetzter agonaler Prozesse zu sein scheinen [114]. Da die hier verwendeten Muskelbiopsien jedoch unmittelbar nach Entnahme gemäß empfohlenem Standard [101] tiefgefroren wurden, ist von keiner relevanten Beeinträchtigung der Genexpression durch diesen Mechanismus auszugehen.

In Anbetracht der hohen internen und externen Konsistenz der Ergebnisse erscheint eine systematische Verzerrung im vorliegenden Datensatz unwahrscheinlich und die Methode damit geeignet, valide Aussagen zur Genexpression zu generieren.

4.2. Genetische Charakterisierung der CPEO-Patienten

Deletionsart (singuläre vs. multiple Deletionen), Deletionsgrad und Copy Number wurden für jeweils 500 COX-positive und 500 COX-negative Muskelfaserdissekte der zehn untersuchten Patientenproben bestimmt. COX-negative Zellen zeigten einen deutlich höheren Deletionsgrad (61 +/-27%) und eine höhere Copy Number pro 500 Dissekte (3345,24 +/-1968,27 mtDNA-Moleküle) als COX-positive Muskelfasern (31 +/-14%; 990,47 +/-826,65 mtDNA-Moleküle).

Die Steigerung der Copy Number in COX-negativen Fasern wird in der Literatur als bioenergetischer Kompensationsmechanismus diskutiert [115, 116]. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diesen Zusammenhang zwischen hohem Deletionsgrad, histochemisch darstellbarer konsekutiver Störung der Atmungskettenfunktion und kompensatorischer Steigerung der Copy Number.

4.3. Genexpressionsanalyse in Atmungsketten-defizienten Muskelzellen

Wir bestimmten das differentielle Genexpressionsprofil in COX-negativen und COX-positiven Muskelzellen von neun Patienten mit mitochondrialen Myopathien. Die einzelnen Gene, Pathways und dazugehörigen Regulatorgene und microRNAs sollen hier bezüglich ihrer möglichen Funktion bei Atmungskettendefekten diskutiert werden.

Folgende neun Gene zeigten nach Bonferroni-Korrektur ein signifikant abweichendes Expressionsmuster:

- *Solution carrier family 7 member 1 (Slc7A1)*: Slc7A1 ist ein Aminosäure-Transporter, der durch Aminosäuremangel induziert wird, die Aufnahme von Lysin und Arginin in die Zelle steuert und über Arginin das NO-Signaling beeinflusst [117, 118]. Daneben wird Slc7A1 als Teil einer umfassenden zellulären Stressreaktion durch die unfolded protein response (UPR) induziert [119, 120]. Slc7A1 vermittelt mit Tribbles homolog 3 (Trib3) die metabolischen Anpassungsreaktionen bei Mäusen nach kurzem Fasten [121, 122]. Andere Mitglieder der Slc7-Gengruppe beeinflussen Fasten-induzierte Veränderungen im Fettstoffwechsel und den AMPK-PPAR- α -Signalweg [123]. Wir interpretierten die gesteigerte Expression von Slc7A1 in der vorliegenden Arbeit als möglicherweise UPR-vermittelte Reaktion auf oxidativen Stress und Energiemangel und/oder als transkriptionelles Korrelat der Umstellung auf alternative Stoffwechselwege bzw. Bereitstellung alternativer Substrate (Aminosäuren) zur Energiegewinnung.
- *Serinhydroxymethyl-Transferase 2 (SHMT2)*: SHMT2 ist ein mitochondriales Protein, das an der zellulären Hypoxie-Antwort beteiligt ist. Eine Ausschaltung des Gens führt in Zellkultur unter Hypoxie zu ROS-Anstieg und Zelltod [124], in Glioblastomzellen reduziert es den O₂-Bedarf [125]. In Fibroblastenkultur ist die epigenetische Herunterregulierung von SHMT2 für Alters-abhängige Defekte der Atmungskette verantwortlich [126]. SHMT2 induziert die Proliferation von Zellen im HCC-Modell [127] und spielt für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (NADPH) [124] und dTTP als Substrat für die mtDNA-Replikation [128] eine Rolle. Die Hochregulierung von SHMT2 in dieser Arbeit werteten wir im Rahmen der Hypoxie-Antwort als Versuch, die

- gestörte Atmungskettenfunktion durch verstärkte Mitogenese und Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten zu kompensieren.
- *Smoothelin-like protein 1 (SMTNL1)*: SMTNL1 fördert in humanem und murinem Skelettmuskel die Umstellung von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse [129]. Bei physischer Belastung vermittelt die Herunterregulierung von SMTNL1 die PKA/PKG-abhängigen Anpassungsreaktionen (u.a. Erhöhung der Kontraktilität) [130]. SMTNL1-Knockout Mäuse zeigen etwa bessere physische Leistung und bessere Muskelkontraktilität als Wildtyp-Mäuse [130]. Die reduzierte Expression von SMTNL1 in den für die vorliegende Arbeit erhobenen Daten kann dementsprechend als Versuch interpretiert werden, trotz Energiemangel eine ausreichende muskuläre Kontraktilität aufrechtzuerhalten.
 - *Four and a half LIM domains 2 (FHL2)*: FHL2 ist einer der wesentlichen regulierenden Faktoren von Transkription, Signaltransduktion und zellulärem Überleben [131]. Wichtige Effektormoleküle sind u.a. p21 und Zyklin D1 [132-137]. Die Wirkung von FHL2 ist antiapoptotisch: Herunterregulierung von FHL2 ist in Pankreastumorzellkultur mit Apoptose assoziiert [134], in hepatozellulären Karzinomzellen und murinem Muskel hat die gesteigerte Expression von FHL2 antiapoptorische bzw. pro-proliferative Wirkung [132, 133]. Die verringerte Expression von FHL2 in der vorliegenden Arbeit werteten wir daher als pro-apoptotisches Signal, möglicherweise bei Dekompensation der Atmungsketten- und Zellfunktion. FHL2 wird u.a. von HIF1 induziert und inhibiert HIF1 [138], was die Bedeutung von FHL2 bei der Anpassung an bioenergetische Mangelzustände zusätzlich unterstreicht.
 - *24-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR24)*: DHCR24 ist ein Schlüsselgen für die zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress [139]. Es wird bei akutem oxidativem Stress hochreguliert und in chronischem oxidativem Stress herunterreguliert [140]. DHCR24 wirkt anti-apoptotisch, indem es p53 über unterschiedliche Mechanismen (u.a. Interaktion mit dem p53-Repressor mdm2) inaktiviert [140-143]. Die hier vorliegende reduzierte Expression interpretierten wir dementsprechend als pro-apoptotisches Signal infolge von chronischem oxidativem Stress bei gestörter Atmungskettenfunktion.

- *Cytochrome C Oxidase Untereinheit VIIa (COX7A2)*: COX7A2 wird in dieser Arbeit als Teil der Atmungskette kompensatorisch überexprimiert. An anderer Stelle wurde die kompensatorische Überexpression unterschiedlicher COX-Untereinheiten bei mitochondrialen Erkrankungen [144], unter hypoxischen Bedingungen [145] und altersabhängig in Skelettmuskel [146] gezeigt.

- *Iron-containing alcohol dehydrogenase (ADHFE1)*: ADHFE1 ist ein mitochondriales Protein, das 4-Hydroxybutyrat zu Semialdehydsuccinat konvertiert. Wenn die Zelle ‚fastet‘, erleichtert dieses Enzym die Einführung kataboler Substrate (Fettsäuren, Ketonkörper, Aminosäuren) in den Zitratzyklus und bietet somit eine alternative Quelle von Reduktionsäquivalenten für die ATP-Synthese [147]. Erhöhte ROS-Spiegel können die Expression von ADHFE1 durch die Zerstörung von Fe-S-Clustern beeinträchtigen [148], was eine mögliche Erklärung für die Herunterregulierung von ADHFE1 in unserem Datensatz darstellt.

- *Fasciculation and elongation protein zeta 2 (FEZ2)*: FEZ2 ist ein regulatorisches Gen, das in Skelettmuskel altersabhängig exprimiert wird und Autophagie supprimiert [146, 149]. Die hier vorliegende Herunterregulierung von FEZ2 weist folglich auf eine Aktivierung des Autophagie-Programms hin.

- *Tribbles-3 Pseudokinase (TRIB3)*: TRIB3 wird durch unterschiedliche Stressoren hochreguliert (u.a. Hypoxie, oxidativer Stress, Störungen der Atmungskette, chronischer Glucosemangel, ER-Stress, Hyperglykämie) [145, 150-153] und induziert, u.a. über eine Hemmung des MAPK-Signalwegs, Apoptose [154-156]. In unterschiedlichen Kontexten kann TRIB3 Autophagie induzieren [157] oder inhibieren [150]. Infolge der gestörten Atmungskettenfunktion in den untersuchten COX-negativen Zellen ist die Expression von TRIB3 im vorliegenden Datensatz hochreguliert. Neben FHL2, DHCR24 und FEZ2 weist auch TRIB3 auf Apoptose bzw. Autophagie als wesentlichen zellulären Reaktionsmechanismus bei Störungen der Atmungskette in den untersuchten Zellen hin.

Die nach Benjamini-Hochberg-Korrektur signifikant differentiell exprimierten Gene wurden in der anschließenden Pathway-Analyse zellulären Signalwegen zugeordnet und wesentliche übergeordnete Faktoren der Transkriptionsregulation identifiziert. Folgende signifikant regulierte Signalwege konnten identifiziert werden:

- Der *HIPPO*- oder *Salvador/Warts/Hippo*-Signalweg steuert bei Säugetieren Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose [158, 159]. Er integriert dabei verschiedene Faktoren wie mechanische Reize, DNA-Schäden, den zellulären Energiestatus, oxidativen Stress und mitochondriale Signale [160-162]. Letztere könnten die Herunterregulierung von HIPPO in unserem Datensatz als Folge mitochondrialer Störungen erklären. Wichtige Bestandteile dieses Signalwegs wie Yes-Associated Protein (YAP) und TAZ fördern außerdem das Muskelwachstum [163-166], so dass die verminderte Expression der Hippo-Gene möglicherweise die Atrophie und/oder Apoptose der hier untersuchten Atmungsketten-defizienten Fasern auf Transkriptionsebene widerspiegelt.
- Die *mTOR*-Achse steuert u.a. Zellwachstum und Proliferation und ist ein wichtiger Inhibitor von Autophagie. Die Aktivität von mTOR wird u.a. von Wachstumsfaktoren, Substratangebot und Energiestatus beeinflusst [167, 168] und hat selbst Auswirkungen auf zahlreiche altersbedingte Veränderungen [169, 170]. In Muskelgewebe ist mTOR der wichtigste Induktor von Muskelwachstum [171], die gesteigerte Expression von mTORC1 kann in Skelettmuskelgewebe jedoch auch zu ER-Stress und Induktion der UPR via eIF2 α /ATF4 führen [172]. In Mitochondrien führt mTOR via HIF-1 zu einer Umstellung des Stoffwechsels von oxidativer Phosphorylierung zu Glykolyse [173, 174]. Daneben reguliert mTOR die mitochondriale Aktivität und Biogenese über PGC1 α und eine 4E-BP-abhängige Steuerung der Translation [167, 175]. Die in unserer Untersuchung überwiegend gesteigerte Transkription der Gene dieses Pathways in COX-negativen Muskelfasern kann als Versuch gewertet werden, die defizitäre Funktion der Atmungskette durch Förderung der Mitogenese und Umstellung auf alternative Stoffwechselwege zu kompensieren. Histologisches Korrelat für die Proliferation der Mitochondrien sind ragged red fibers.
- *Eukaryotic initiation factor 2 (EIF2)* bildet zusammen mit PERK einen Signalweg, der bei Aminosäuremangel, DNA-Schäden, oxidativem Stress und

ER-Stress im Rahmen der UPR aktiviert wird und die Proteintranslation inhibiert und Apoptose induziert [176-178]. Die Induktion von EIF2 in dieser Arbeit könnte sowohl durch oxidativen oder ER-Stress verursacht sein und unterstützt die Beobachtung, dass in COX-negativen Zellen auf mtDNA-Deletionen unter gewissen Bedingungen mit einem pro-apoptotischen Programm reagiert wird.

- *eIF4/p70S6K* sind Effektoren des mTOR-Signalwegs, die u.a. die Steigerung der Proteintranslation vermitteln [179]. In den meisten Studien werden mTOR, eIF2 und eIF4/p70S6K aufgrund der funktionellen Verwandtschaft und gegenseitigen Beeinflussung parallel reguliert [180-183]. Die isolierte Herunterregulierung von eIF4/p70S6K in unseren Daten könnte auf Regulationsmechanismen hinweisen, die selektiv einzelne Effektormoleküle der mTOR-Achse inhibieren oder aktivieren; Glucokortikoide oder die Phosphatase PP2a inhibieren beispielsweise selektiv eIF4E und p70S6K, ohne die Expression von mTOR zu beeinflussen [184, 185].
- *Zellzyklus-Regulierung:* Der CDK-Inhibitor p21/CDKN1A nimmt eine Schlüsselrolle für die Regulation des Zellzyklus ein: Bei DNA-Schäden induziert p21 Zellzyklusarrest, inhibiert direkt die DNA-Replikation und reguliert Transkription und Apoptose [89]. In Muskelgewebe ist die gesteigerte Expression von p21 und dem p21-Aktivator p53 mit Atrophie assoziiert [186], gleichzeitig spielt p21 eine wichtige Rolle für die Muskelregeneration nach Trauma [187]. Übereinstimmend mit der Expressionsstudie von Crimi et al. [144] stellten wir in unserer Untersuchung eine Hochregulierung von p21 im Rahmen der zellulären Reaktion auf Atmungskettendefekte fest. p21 wird von p53 aktiviert [89] und u.a. von c-Myc inhibiert, das ebenfalls in verschiedenen Atmungsketten-defizienten Zellen differenziell exprimiert wird [92, 188]. Cullin 1 (CUL1), das in unserer Untersuchung herunterreguliert ist, wirkt ebenfalls als Inhibitor von p21 [189, 190]. CUL1 bildet zusammen mit dem gleichermaßen herunterregulierten S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1) einen Ubiquitin-Ligase-Komplex [191], der wiederum für die Inaktivierung zahlreicher mTOR-Inhibitoren verantwortlich ist [192]. Der sog. SCF-Komplex (Skp1-Cul1-F-box) ist außerdem an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt, indem gezielt Zellzyklus-spezifische Proteine ubiquitiniert bzw. degradiert werden [193, 194]. Das ebenfalls in dieser Arbeit

überexprimierte GADD45A ist ein zellulärer Stresssensor, der u.a. durch DNA-Schäden und p53 induziert wird, den Zellzyklus stoppt und verschiedene DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose initiiert [195]. Daneben spielt GADD45A eine wesentliche Rolle für altersbedingte Erkrankungen [196]. In Muskelgewebe führt eine stressinduzierte Überexpression von GADD45A zu Muskelatrophie [197], aber auch Atrophie durch Fasten wird von GADD45A via ATF4 vermittelt [198]. SMAD4 schließlich ist ein antimitogenes und proapoptotisches Effektorprotein von TGF- β [199], das Muskelwachstum inhibiert [200]. Die reduzierte Expression in unserem Datensatz wertet man dementsprechend als promotogenes oder myogenes Signal.

- Die Hochregulierung von Genen des *Folat-Stoffwechsels* ist einerseits als mTOR- oder ATF4-induzierte Anpassungsreaktion an den erhöhten Substratbedarf bei der DNA-Synthese im Rahmen der verstärkten Mitogenese erklärbar [201, 202]. Möglicherweise reagiert die Zelle andererseits auf erhöhte ROS-Spiegel mit der vermehrten Bereitstellung von antioxidativem Glutathion im Folsäure-Stoffwechsel [203].

Neben den genannten Signalwegen wurden außer einer Vielzahl von microRNAs u.a. folgende differenziell regulierten Regulatorgene identifiziert:

- *Östrogen-Rezeptor 1 (ESR1/ER α)* ist ein Regulatorgen, dessen Verlust zu einer Induktion von p53-Zielgenen führt [204]. Dies könnte die gesteigerte Expression von GADD45a, CDKN1a und proapoptotischer Gene in unserem Datensatz erklären, zumal Östrogen auch antiapoptotisch wirkt [205]. Die selektive Herunterregulierung des α -Rezeptorsubtyps weist außerdem auf die gezielte Steuerung unterschiedlicher Östrogen-vermittelter Prozesse hin: Der β -Östrogenrezeptor (ER β) vermittelt erstens die antiapoptotische Wirkung von Östrogen stärker als der α -Subtyp [205] und steigert zweitens stärker die bioenergetische Aktivität und Effizienz von Mitochondrien [206]. Dies erlaubt apoptotische Prozesse graduell zu regulieren, ohne den positiven bioenergetischen Effekt von Östrogen zu stark einzuschränken.
- *Rapamycin-insensitive companion of m-TOR (RICTOR)* ist eines der Proteine, die den mTOR complex 2 (mTORC2) definieren und ist ebenfalls in dieser Arbeit herunterreguliert. Die Herunterregulierung von RICTOR ermöglicht dementsprechend Zielgene/-signalwege von mTORC2 (AKT, SGK1, PGC1 α)

- selektiv zu inhibieren und dagegen Zielgene/-signalwege von mTORC1 (p70S6K, 4EBP1, IRS1) zu aktivieren [207]. In murinem Skelettmuskelgewebe hat die Inhibition von RICTOR hingegen weder Einfluss auf die mitochondriale Funktion und Leistung, noch auf die Muskelmorphologie und –funktion [208, 209].
- *Wnt3a* ist ein Signalmolekül innerhalb des Wingless-related integration site (Wnt)-Signalwegs, der in unserem Datensatz nicht differentiell exprimiert ist. *Wnt3a* reguliert in Adipozyten die mitochondriale Biogenese [210] und wirkt bei Alzheimer-Demenz in Neuronen anti-apoptotisch [211]. In Skelettmuskelgewebe ist *Wnt3a* hingegen mit Seneszenz und Atrophie assoziiert [212]. Ein möglicher Mechanismus ist die *Wnt3a*-induzierte Konversion von gealterten Satellitenzellen zu fibrogenen Stammzellen [212, 213]. Die hier vorliegende Inhibition der Expression von *Wnt3a* kann daher als kompensatorisches myogenes und anti-atrophes Signal gewertet werden.
 - *Neuroblastoma MYC Oncogene (MYCN)* ist ein charakteristisches Onkogen von Neuroblastomen, wo es gleichzeitig proliferativ (via Inhibition von p21) und pro-apoptotisch (via Induktion von p53 und Störung zahlreicher DNA-Reparaturmechanismen) wirkt und die Glykolyse fördert [214, 215]. In unserem Datensatz vermittelt möglicherweise die Aktivierung des mTOR-Signalwegs über die durch *MYCN* induzierten ribosomalen Proteine den proliferativen Effekt. Die Hochregulierung von *MYCN* deuteten wir in diesem Sinne als Versuch, die defizitäre Muskelleistung über ein proliferatives Signal zu steigern, mehr Substrat zur Verfügung zu stellen und gleichzeitig bei möglicherweise stärker vom Atmungskettendefizit betroffenen Zellen Apoptose zu induzieren.
 - *Activating transcription factor 4 (ATF4)* ist ein zellulärer Stresssensor, der zusammen mit eIF2 α u.a. bei mitochondrialer Dysfunktion und ER-Stress als Teil der unfolded-protein-response (UPR) bzw. integrated stress response (ISR) induziert wird [216, 217]. Bei fortgesetztem mitochondrialem Stress werden die zunächst überlebensfördernden Effekte von *ATF4* durch die gesteigerte Aktivität von p53 aufgehoben und die Zelle begeht Apoptose [218]. *ATF4* ist zudem selbst ein wichtiger Induktor von Autophagie [219]. In Muskelgewebe vermittelt die Überexpression von *ATF4* etwa fasten-, immobilisations- und altersabhängige Muskelatrophie, möglicherweise über

die Induktion von p21 und GADD45A [186, 220, 221]. Gleichzeitig reguliert ATF4 wahrscheinlich mit mTORC1 den Einbau von Aminosäure-Transportern bei entsprechender Aminosäure-Verfügbarkeit [222, 223] und fördert die Bereitstellung von Substraten für die DNA-Synthese via MTHFD2 und SHMT2 [202]. ATF4 ist also ein zentrales Regulationsgen, dessen Überexpression in unserem Datensatz unterschiedliche zelluläre Anpassungsreaktionen auf Energiemangel und mitochondriale Dysfunktion vermittelt: Induktion von ISR und zentralen proapoptotischen Genen wie GADD45a, p21 und TRIB3, gleichzeitig Bereitstellung von Aminosäuren und Substraten für die DNA-Synthese.

- *Nerve Growth Factor (NGF)* stimuliert die Proliferation, Differenzierung und Fusion von Muskelzellen [224, 225] und wird nach Muskelverletzungen und in dystrophem Muskelgewebe überexprimiert [226, 227]. Chae et al. zeigten, dass Training in murinem Muskelgewebe mit einer gesteigerten Expression von NGF und der Induktion antiapoptotischer Signalmoleküle korreliert [228]. In neuronalem Gewebe von Patienten mit Chorea Huntington stimuliert NGF die mitochondriale Biogenese und kann die gestörte mitochondriale Funktion wiederherstellen [229]. Eine reduzierte Expression von NGF führt zudem in verschiedenen neuronalen Geweben zu Störungen der mitochondrialen Funktion, einer erhöhten Produktion von ROS und einer Zellzyklusinduktion [230]. Die gesteigerte Expression von NGF in der vorliegenden Arbeit ist im Kontext der beschriebenen mitoprotektiven Effekte erklärbar.
- *Transforming Growth Factor β 1 (TGFB1)* ist ein Gen, das eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Skelettmuskelerkrankungen spielt [231]. Die gesteigerte Expression von TGFB1 induziert im Muskel Atrophie und Autophagie [232, 233], wobei die gesteigerte Produktion von ROS einen möglichen vermittelnden Mechanismus darstellt [234]. In anderen Geweben steigert TGFB1 die oxidative Kapazität, die Bereitstellung von ATP und die Produktion von ROS [235]. Die gesteigerte Expression von TGFB1 kann dementsprechend im vorliegenden Datensatz als Massnahme zur bioenergetischen Optimierung oder Korrelat der Atrophie interpretiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Genexpressionsanalyse wurden verschiedene, teils gegenläufige transkriptionelle Mechanismen identifiziert, wie Zellen auf Störungen der Atmungskette reagieren. Vereinfachend lassen sich diese Mechanismen zwei

übergeordneten Gruppen zuordnen: Maßnahmen zur Wiederherstellung oder Steigerung defizitärer Zellfunktionen einerseits und pro-apoptotische Signale andererseits. Zu ersteren zählen insbesondere:

- Steigerung der Atmungskettenfunktion,
- Reduktion von ROS,
- verstärkte Mitogenese,
- Aktivierung alternativer Stoffwechselwege,
- vermehrte Bereitstellung von Stoffwechselprodukten und
- Steigerung von Muskelwachstum und -kontraktilität.

Während die erstgenannten Mechanismen auf eine Kompensation der energetischen Defizite abzielen, handelt es sich bei den pro-apoptotischen Signalen um den eigentlich pathogenetisch relevanten Mechanismus, der für eine Vielzahl der klinisch relevanten Defizite in mitochondrialen Myopathien verantwortlich zu sein scheint.

Da sowohl pro-apoptotische, als auch anti-apoptotische und mitogene Signale gleichzeitig vorliegen, ist von einem fein koordinierten Signalnetzwerk auszugehen, das unterschiedliche Signale integriert und bei akuten Belastungen zunächst kompensatorische Mechanismen aktiviert, während bei chronischen oder schwerwiegenden Belastungen der Zelltod eingeleitet wird. Ein morphologisches Korrelat dieser Gleichzeitigkeit gegenläufiger Prozesse sind die atrophen und zugleich mitochondrienreichen ragged red fibers. Auf Genebene sind exemplarisch ATF4, TGF β oder MYCN zu nennen, die sowohl proliferative/mitogene, als auch proapoptotische Prozesse induzieren können.

Welche zelluläre Reaktion letztlich überwiegt, ergibt sich aus der Integration multipler Signale auf unterschiedlichen Ebenen. Dabei spielen Art und Dauer der Stressoren eine Rolle (TRIB3 wird z.B. durch ER-Stress induziert und durch genotoxischen Stress inhibiert [151], ATF4 und DHCR24 zeigen in Abhängigkeit von der Dauer der Belastung unterschiedliche Expressionsmuster). Zudem kann die Aktivität eines Gens oder Proteins u.a. durch wechselseitige Beeinflussung oder selektive Inhibition oder Induktion von Effektormolekülen (s. mTORC2 oder ESR1) beeinflusst werden. Ob es einen oder mehrere entscheidende Mechanismen oder eine wie auch immer geartete Schwelle gibt, bei deren Überschreiten die Zelle in Apoptose geht, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Weitere Forschung wird benötigt, um diese Frage zu beantworten und die zugrundeliegenden pro- und anti-

apoptotischen Prozesse besser zu verstehen. Auf Grundlage dieser Kenntnisse könnten dann ggf. in Zukunft gezielte molekulare Interventionen für Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen entwickelt werden, für die bisher keine überzeugenden Therapien zur Verfügung stehen.

Die folgende Grafik soll die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse schematisch zusammenfassen:



Abbildung 15: Übersicht über Veränderungen der Genexpression bei zellulärem Stress und daraus resultierende Anpassungsreaktionen der Zelle. Zellulärer Stress bedeutet hier Hypoxie, Energiemangel, Oxidativer Stress, DNA-Schäden, ER-Stress, Aminosäuremangel oder physische Belastung. Blaue Pfeile = Induktion; rote Pfeile = Hemmung

4.4. Validierung der Ergebnisse der RNA-Analyse anhand der immun-histochemischen Bestimmung der Expression von p53, p21 und mdm2

Die immunhistochemische Untersuchung der Apoptose-assoziierten Proteine p53 und p21 lieferte eine zusätzliche Bestätigung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse auf Einzelzell- und Proteinebene. Unabhängig vom Muskelfasertyp wurde eine Zunahme des p53- und p21-Immunfluoreszenzsignals bei zunehmender Atmungsketteninsuffizienz (entspricht: COX-Negativität) gezeigt. Die Zunahme insbesondere des p53- und p21-Signals bei COX-Negativen entspricht auf histologischer Ebene den zuvor in den Genexpressionsanalysen nachgewiesenen pro-apoptotischen Anpassungsreaktionen von Zellen mit gestörter Atmungskettenfunktion.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) verursachen zum einen kongenitale mitochondriale Erkrankungen, und treten zum anderen im Rahmen neurodegenerativer, neoplastischer und metabolischer Erkrankungen sowie bei allgemeinen Alterungsprozessen auf. Das phänotypische Spektrum von mtDNA-Deletionssyndromen ist dabei hochgradig variabel und reicht von isolierten Myopathien bis hin zur tödlich verlaufenden Multisystemerkrankung KSS. Eine wichtige Ursache dieser Variabilität ist der inter- und intraindividuell unterschiedlich hohe Anteil deletierter mtDNA in den Zellen (sog. Deletionsgrad). Ein hoher Deletionsgrad führt jedoch nicht unmittelbar zu Störungen der Atmungskette, sondern es besteht eine Vielzahl von Anpassungsmechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene, die Energiehaushalt und Zellfunktion modulieren. Um diese Mechanismen unter in-vivo-Bedingungen zu beschreiben, wurden in der vorliegenden Arbeit respiratorisch suffiziente und insuffiziente Muskelfasern von neun CPEO-Patienten anhand eines neu etablierten RNA-schonenden Färbeverfahrens identifiziert und mittels Laser-Mikrodissektion isoliert. Das typische histologische Mosaik von Zellen mit und ohne metabolischer Störung konnte hierbei ausgenutzt werden, um unmittelbar benachbarte Muskelfasern differentiell zu analysieren. Die Fasern wurden anschließend hinsichtlich Deletionsgrad, Copy Number und Deletionsart charakterisiert und das Genexpressionsprofil in Abhängigkeit vom respiratorischen Status untersucht. Die respiratorisch defizienten Zellen zeigten einen signifikant höheren Deletionsgrad (61,03 +/- 27,03 % vs. 30,89 +/- 13,56 %; $p=0,006$) und eine kompensatorisch signifikant gesteigerte Mitochondrien-Zahl (sog. Copy Number; 3345,24 +/- 1968,27 vs. 990,47 +/- 826,65; $p=0,003$; jeweils pro 500 Zellen). Auf Genexpressionsebene konnten zwei distinkte Anpassungsmechanismen identifiziert werden: ein mitogenes Programm zur Steigerung der oxidativen Kapazitäten, das u.a. über den mTOR-Signalweg vermittelt wird, und ein proapoptisches Programm, das u.a. via p21/p53 den Zelltod induziert. Entsprechend unserer initialen Annahme wurde Apoptose als wesentlicher pathogenetischer Mechanismus in mitochondrialen Erkrankungen in vivo bestätigt. Weitere Forschung könnte dazu beitragen, die Koordination dieser gegenläufigen Mechanismen besser zu verstehen. Die hier angewandten Methoden zur Genexpressionsanalyse aus Einzelzellen erscheinen in jedem Fall geeignet, derartige Fragestellungen zu untersuchen.

6. Anhang

Daten zu Abbildung 10 (Abschnitt 3.1.):

Tabelle 23: RIN-Werte für unterschiedliche Untersuchungsbedingungen. Kontrolle = keine Färbung, Entnahme mit Skalpell; SDH15 Min = 15-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Entnahme mit Skalpell; SDH 45 Min = 45-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Entnahme mit Skalpell; LMD 45 Min = 15-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Isolation während 45-minütiger Lasermikrodissektion; LMD 3h = 15-mütige Inkubation mit SDH-Medium, Isolation während dreistündiger Lasermikrodissektion; StaAbw= Standardabweichung; Die p-Werte beziehen sich jeweils auf die ungefärbten Kontrollen (*) oder auf die 15 Minuten mit SDH-Medium inkubierten Proben (**)

	Kontrolle	SDH 15 Min	SDH 45 Min	LMD 45 Min	LMD 3 h
	8,4	8,7	7,2	5,9	5,8
	9,5	7,9	6,7	5,9	5,8
	9,4	9	7,2	5,7	5,7
	7,8	8,7	7,8	6,3	5,8
	7,9	8,4	6,9		5,3
		8,6			6,3
					4
					3,3
Mittelwert	8,60	8,55	7,16	5,95	5,25
StaAbw	0,81	0,37	0,42	0,25	1,04
p-Wert		0,89477*	0,00764*	0,00000**	0,00001**

Daten zu Abbildung 11 (Abschnitt 3.2.1.):

Tabelle 24: Copy Number [mtDNA-Moleküle/500 Zellschnitte] und Deletionsgrad [%]. Die angegebenen Werte stellen jeweils Mittelwerte aus dreifachen Messungen dar. StaAbw= Standardabweichung

Patient	CN COX+	CN COX-	Deletionsgrad COX+	Deletionsgrad COX-
1	1841,38	3722,03	21,48	47,62
2	1282,34	7797,16	46,15	83,84
3	1527,64	1694,99	24,08	24,06
4	552,17	2414,19	36,75	82,80
5	750,76	1154,91	23,81	24,19
6	187,86	4345,51	17,73	28,23
7	608,74	2348,85	20,99	68,87
8	2684,43	5033,79	30,24	83,42
9	211,75	2203,39	26,54	80,53
10	257,63	2737,57	61,09	86,71
Mittelwert	990,47	3345,24	30,89	61,03
StaAbw	826,65	1968,27	13,56	27,03
p-Wert	0,002625		0,005514	

Daten zu Abbildung 14 (Abschnitt 3.4.):

Tabelle 25: p-Werte der Immunfluoreszenzmessungen

	p-Wert p53	p-Wert p21	p-Werte mdm2
FT1, COX+ gegen FT2, COX+	0,0000126	0,0000142	0,0040957
FT1, COX+ gegen FT1, COX-	0,0002131	0,0002920	0,2042398
FT1, COX- gegen FT1, COX-/SDH++	0,0926994	0,0010395	0,1689441
FT1, COX+ gegen FT1, COX-/SDH++	0,0000002	0,0000000	0,0087323
FT2, COX+ gegen FT2, COX-	0,4337845	0,0329338	0,6836975
FT2, COX- gegen FT2, COX-/SDH++	0,0046115	0,0347617	0,4082327
FT2, COX+ gegen FT2, COX-/SDH++	0,0001936	0,0001074	0,6289257

7. Literaturverzeichnis

1. Chinnery, P.F. and E.A. Schon, *Mitochondria*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. **74**(9): p. 1188-99.
2. Elstner, M., et al., *MitoP2: an integrative tool for the analysis of the mitochondrial proteome*. Mol Biotechnol, 2008. **40**(3): p. 306-15.
3. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
4. Wallace, D.C., *Mitochondrial DNA mutations in disease and aging*. Environ Mol Mutagen, 2010. **51**(5): p. 440-50.
5. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 389-402.
6. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial respiratory-chain diseases*. N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2656-68.
7. Schwartz, M. and J. Vissing, *New patterns of inheritance in mitochondrial disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(2): p. 247-51.
8. Tuppen, H.A., et al., *Mitochondrial DNA mutations and human disease*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(2): p. 113-28.
9. Elstner, M. and D.M. Turnbull, *Transcriptome analysis in mitochondrial disorders*. Brain Res Bull, 2012. **88**(44): p. 285-93.
10. Neupert, W. and J.M. Herrmann, *Translocation of proteins into mitochondria*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 723-49.
11. Chan, S.S. and W.C. Copeland, *DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 312-9.
12. Copeland, W.C., *Inherited mitochondrial diseases of DNA replication*. Annu Rev Med, 2008. **59**: p. 131-46.
13. Sharer, J.D., *The adenine nucleotide translocase type 1 (ANT1): a new factor in mitochondrial disease*. IUBMB Life, 2005. **57**(9): p. 607-14.
14. Ryan, M.T. and N.J. Hoogenraad, *Mitochondrial-nuclear communications*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 701-22.
15. Wallace, D.C., *A mitochondrial bioenergetic etiology of disease*. J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1405-12.
16. Alemi, M., et al., *Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(1): p. 32-43.
17. Hayashi, J., et al., *Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10614-8.
18. Porteous, W.K., et al., *Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion*. Eur J Biochem, 1998. **257**(1): p. 192-201.
19. Sciacco, M., et al., *Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(1): p. 13-9.
20. Tanji, K. and E. Bonilla, *Neuropathologic aspects of cytochrome C oxidase deficiency*. Brain Pathol, 2000. **10**(3): p. 422-30.
21. Taylor, R.W., et al., *The diagnosis of mitochondrial muscle disease*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(4): p. 237-45.
22. DiMauro, S., *Mitochondrial diseases*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1658**(1-2): p. 80-8.
23. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 515-7.
24. Kravtsov, Y., et al., *Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 518-20.

25. Krishnan, K.J., et al., *What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?* Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 275-9.
26. Nicholas, A., et al., *On the timing and the extent of clonal expansion of mtDNA deletions: evidence from single-molecule PCR.* Exp Neurol, 2009. **218**(2): p. 316-9.
27. Coller, H.A., N.D. Bodyak, and K. Khrapko, *Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations: significance and mechanisms.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 434-47.
28. Ikebe, S., et al., *Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence.* Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(3): p. 1044-8.
29. Chinnery, P.F., *Mitochondrial Disorders Overview*, in *GeneReviews(R)*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993, University of Washington, Seattle, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
30. Van Goethem, G., J.J. Martin, and C. Van Broeckhoven, *Progressive external ophthalmoplegia characterized by multiple deletions of mitochondrial DNA: unraveling the pathogenesis of human mitochondrial DNA instability and the initiation of a genetic classification.* Neuromolecular Med, 2003. **3**(3): p. 129-46.
31. Krishnan, K.J., et al., *Mitochondrial DNA mutations and aging.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 227-40.
32. Krishnan, K.J., et al., *The ageing mitochondrial genome.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7399-405.
33. Wallace, D.C., *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine.* Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 359-407.
34. Muller-Hocker, J., et al., *Progressive loss of cytochrome c oxidase in the human extraocular muscles in ageing--a cytochemical-immunohistochemical study.* Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 115-24.
35. Brierley, E.J., et al., *Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle.* Ann Neurol, 1998. **43**(2): p. 217-23.
36. Bua, E., et al., *Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers.* Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 469-80.
37. Arnheim, N. and G. Cortopassi, *Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues.* Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 157-67.
38. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.* Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
39. Morais, V.A. and B. De Strooper, *Mitochondria dysfunction and neurodegenerative disorders: cause or consequence.* J Alzheimers Dis, 2010. **20 Suppl 2**: p. S255-63.
40. Ralph, S.J., et al., *The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy.* Mol Aspects Med, 2010. **31**(2): p. 145-70.
41. Czarnecka, A.M. and E. Bartnik, *The role of the mitochondrial genome in ageing and carcinogenesis.* J Aging Res, 2011. **2011**: p. 136435.
42. Puddu, P., et al., *The emerging role of cardiovascular risk factor-induced mitochondrial dysfunction in atherogenesis.* J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 112.
43. Wilson, F.H., et al., *A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA.* Science, 2004. **306**(5699): p. 1190-4.
44. Garcia-Roves, P.M., *Mitochondrial pathophysiology and type 2 diabetes mellitus.* Arch Physiol Biochem, 2011. **117**(3): p. 177-87.
45. Fattal, O., et al., *Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases.* Psychosomatics, 2006. **47**(1): p. 1-7.
46. Shao, L., et al., *Mitochondrial involvement in psychiatric disorders.* Ann Med, 2008. **40**(4): p. 281-95.
47. Gibson, G.E., et al., *Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(1): p. 122-34.

48. Parise, G. and M. De Lisio, *Mitochondrial theory of aging in human age-related sarcopenia*. Interdiscip Top Gerontol, 2010. **37**: p. 142-56.
49. Hiona, A., et al., *Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11468.
50. Lagouge, M. and N.G. Larsson, *The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing*. J Intern Med, 2013. **273**(6): p. 529-43.
51. Larsson, N.G., *Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 683-706.
52. Chinnery, P.F., *Mitochondrial Disorders Overview*. 2010.
53. Greaves, L.C., et al., *Mitochondrial DNA and disease*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 274-86.
54. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell Signal, 2012. **24**(5): p. 981-90.
55. Skladal, D., J. Halliday, and D.R. Thorburn, *Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children*. Brain, 2003. **126**(Pt 8): p. 1905-12.
56. Majamaa, K., et al., *Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(2): p. 447-54.
57. Chinnery, P.F., et al., *The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations*. Ann Neurol, 2000. **48**(2): p. 188-93.
58. Darin, N., et al., *The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities*. Ann Neurol, 2001. **49**(3): p. 377-83.
59. Uusimaa, J., et al., *Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children*. Ann Neurol, 2007. **62**(3): p. 278-87.
60. Schaefer, A.M., et al., *Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults*. Ann Neurol, 2008. **63**(1): p. 35-9.
61. Kirkman, M.A., et al., *Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy*. Brain, 2009. **132**(Pt 9): p. 2317-26.
62. Zeviani, M., et al., *Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome*. Neurology, 1988. **38**(9): p. 1339-46.
63. Moraes, C.T., et al., *Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions*. Muscle Nerve, 1995. **3**: p. S150-3.
64. Vielhaber, S., et al., *Muscle fibres: applications for the study of the metabolic consequences of enzyme deficiencies in skeletal muscle*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(2): p. 159-64.
65. Rossignol, R., et al., *Mitochondrial threshold effects*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 751-62.
66. Moraes, C.T., et al., *Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome*. N Engl J Med, 1989. **320**(20): p. 1293-9.
67. McFarland, R., R.W. Taylor, and D.M. Turnbull, *A neurological perspective on mitochondrial disease*. Lancet Neurol, 2010. **9**(8): p. 829-40.
68. Cormier, V., et al., *Widespread multi-tissue deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome*. J Pediatr, 1990. **117**(4): p. 599-602.
69. Holt, I.J., A.E. Harding, and J.A. Morgan-Hughes, *Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies*. Nature, 1988. **331**(6158): p. 717-9.
70. Pfeffer, G., et al., *Treatment for mitochondrial disorders*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **4**: p. Cd004426.
71. DiMauro, S. and M. Hirano, *Mitochondrial DNA Deletion Syndromes*, in *GeneReviews*, R.A. Pagon, et al., Editors. 2011, University of Washington, Seattle, University of Washington, Seattle. All rights reserved.: Seattle (WA).
72. Wallace, D.C., et al., *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. Science, 1988. **242**(4884): p. 1427-30.
73. Harman, D., *Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
74. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.

75. Miquel, J., et al., *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(6): p. 575-91.
76. Abramov, A.Y., et al., *Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations*. Brain, 2010. **133**(Pt 3): p. 797-807.
77. Lim, P.S., et al., *Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in skeletal muscle of patients with chronic uremia*. J Biomed Sci, 2002. **9**(6 Pt 1): p. 549-60.
78. Lu, C.Y., et al., *Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin*. Mutat Res, 1999. **423**(1-2): p. 11-21.
79. Boesch, P., et al., *DNA repair in organelles: Pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(1): p. 186-200.
80. Schon, E.A. and S. Przedborski, *Mitochondria: the next (neurode)generation*. Neuron, 2011. **70**(6): p. 1033-53.
81. Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar, *Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(1): p. 30-8.
82. Frank, M., et al., *Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(12): p. 2297-310.
83. Wang, Y., et al., *ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(10): p. 1462-76.
84. Tyynismaa, H., et al., *Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 3948-58.
85. Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen, *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 569-76.
86. Ristow, M. and S. Schmeisser, *Extending life span by increasing oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(2): p. 327-36.
87. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
88. Sahin, E. and R.A. DePinho, *Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(6): p. 397-404.
89. Cazzalini, O., et al., *Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response*. Mutat Res, 2010. **704**(1-3): p. 12-20.
90. Achanta, G., et al., *Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma*. Embo j, 2005. **24**(19): p. 3482-92.
91. Passos, J.F., et al., *Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 347.
92. Cortopassi, G., et al., *Mitochondrial disease activates transcripts of the unfolded protein response and cell cycle and inhibits vesicular secretion and oligodendrocyte-specific transcripts*. Mitochondrion, 2006. **6**(4): p. 161-75.
93. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
94. McKenzie, M., D. Liolitsa, and M.G. Hanna, *Mitochondrial disease: mutations and mechanisms*. Neurochem Res, 2004. **29**(3): p. 589-600.
95. Guarente, L., *Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?* Cell, 2008. **132**(2): p. 171-6.
96. Zhang, Z., et al., *Primary respiratory chain disease causes tissue-specific dysregulation of the global transcriptome and nutrient-sensing signaling network*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69282.
97. Wallace, D.C. and W. Fan, *Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics*. Mitochondrion, 2010. **10**(1): p. 12-31.
98. Benard, G., et al., *Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 698-709.
99. Crimi, M., et al., *Molecular research technologies in mitochondrial diseases: the microarray approach*. IUBMB Life, 2005. **57**(12): p. 811-8.
100. Koppelkamm, A., et al., *RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays*. Int J Legal Med, 2011. **125**(4): p. 573-80.

101. Medeiros, F., et al., *Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(12): p. 1805-16.
102. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
103. Auer, H., et al., *Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis*. Nat Genet, 2003. **35**(4): p. 292-3.
104. Ross, J.M., *Visualization of mitochondrial respiratory function using cytochrome c oxidase/succinate dehydrogenase (COX/SDH) double-labeling histochemistry*. J Vis Exp, 2011(57): p. e3266.
105. He, L., et al., *Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. e68.
106. Krishnan, K.J., et al., *A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells*. Anal Biochem, 2007. **370**(1): p. 127-9.
107. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
108. Polacek, D.C., et al., *Fidelity and enhanced sensitivity of differential transcription profiles following linear amplification of nanogram amounts of endothelial mRNA*. Physiol Genomics, 2003. **13**(2): p. 147-56.
109. Feldman, A.L., et al., *Advantages of mRNA amplification for microarray analysis*. Biotechniques, 2002. **33**(4): p. 906-12, 914.
110. Raheem, O., et al., *Novel myosin heavy chain immunohistochemical double staining developed for the routine diagnostic separation of I, IIA and IIX fibers*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(4): p. 495-500.
111. Imbeaud, S., et al., *Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(6): p. e56.
112. Wilkes, T.M., et al., *Evaluation of a novel approach for the measurement of RNA quality*. BMC Res Notes, 2010. **3**: p. 89.
113. Strand, C., et al., *RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis--a comparison of three evaluation methods using microcapillary electrophoresis traces*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 38.
114. Skold, K., H. Alm, and B. Scholz, *The impact of biosampling procedures on molecular data interpretation*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(6): p. 1489-501.
115. Clay Montier, L.L., J.J. Deng, and Y. Bai, *Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number*. J Genet Genomics, 2009. **36**(3): p. 125-31.
116. Herbst, A., et al., *Mitochondrial biogenesis drives a vicious cycle of metabolic insufficiency and mitochondrial DNA deletion mutation accumulation in aged rat skeletal muscle fibers*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59006.
117. Hatzoglou, M., et al., *Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 377-99.
118. Ramachandran, J., et al., *Nitric oxide signalling pathway in Duchenne muscular dystrophy mice: up-regulation of L-arginine transporters*. Biochem J, 2013. **449**(1): p. 133-42.
119. Lopez, A.B., et al., *A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation*. Biochem J, 2007. **402**(1): p. 163-73.
120. Fernandez, J., et al., *Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50000-9.
121. Yamamoto, J., et al., *Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis*. FEBS Open Bio, 2015. **5**: p. 357-68.
122. Liu, J., et al., *Role of TRIB3 in regulation of insulin sensitivity and nutrient metabolism during short-term fasting and nutrient excess*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(7): p. E908-16.
123. Gu, Q., et al., *Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting*. Hepatology, 2014. **60**(6): p. 1929-41.

124. Ye, J., et al., *Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(12): p. 1406-17.
125. Kim, D., et al., *SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance*. *Nature*, 2015. **520**(7547): p. 363-7.
126. Hashizume, O., et al., *Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10434.
127. Wu, X., et al., *miR-615-5p prevents proliferation and migration through negatively regulating serine hydromethyltransferase 2 (SHMT2) in hepatocellular carcinoma*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(5): p. 6813-21.
128. Anderson, D.D., C.M. Quintero, and P.J. Stover, *Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(37): p. 15163-8.
129. Lontay, B., et al., *Pregnancy and Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human and Mice*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(29): p. 17985-98.
130. Wooldridge, A.A., et al., *Deletion of the protein kinase A/protein kinase G target SMTNL1 promotes an exercise-adapted phenotype in vascular smooth muscle*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(17): p. 11850-9.
131. Johannessen, M., et al., *The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(3): p. 268-84.
132. Kurakula, K., et al., *The LIM-only protein FHL2 reduces vascular lesion formation involving inhibition of proliferation and migration of smooth muscle cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94931.
133. Ng, C.F., et al., *FHL2 exhibits anti-proliferative and anti-apoptotic activities in liver cancer cells*. *Cancer Lett*, 2011. **304**(2): p. 97-106.
134. Zienert, E., et al., *LIM-only protein FHL2 critically determines survival and radioresistance of pancreatic cancer cells*. *Cancer Lett*, 2015. **364**(1): p. 17-24.
135. Labalette, C., et al., *The LIM-only protein FHL2 regulates cyclin D1 expression and cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(22): p. 15201-8.
136. Labalette, C., et al., *The LIM-only protein FHL2 mediates ras-induced transformation through cyclin D1 and p53 pathways*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3761.
137. Hou, Y., et al., *FHL2 regulates hematopoietic stem cell functions under stress conditions*. *Leukemia*, 2015. **29**(3): p. 615-24.
138. Hubbi, M.E., et al., *Four-and-a-half LIM domain proteins inhibit transactivation by hypoxia-inducible factor 1*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(9): p. 6139-49.
139. Wu, C., et al., *Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1*. *Nature*, 2004. **432**(7017): p. 640-5.
140. Kuehnle, K., et al., *Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(2): p. 539-50.
141. Rebbani, K. and K. Tsukiyama-Kohara, *HCV-Induced Oxidative Stress: Battlefield-Winning Strategy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 7425628.
142. Lu, X., et al., *3 beta-hydroxysteroid-Delta 24 reductase (DHCR24) protects neuronal cells from apoptotic cell death induced by endoplasmic reticulum (ER) stress*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86753.
143. Nishimura, T., et al., *Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3beta-hydroxysteroid Delta24-reductase*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(52): p. 36442-52.
144. Crimi, M., et al., *Skeletal muscle gene expression profiling in mitochondrial disorders*. *Faseb j*, 2005. **19**(7): p. 866-8.
145. Igwe, E.I., et al., *Hypoxic transcription gene profiles under the modulation of nitric oxide in nuclear run on-microarray and proteomics*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 408.
146. Su, J., et al., *A novel atlas of gene expression in human skeletal muscle reveals molecular changes associated with aging*. *Skelet Muscle*, 2015. **5**: p. 35.
147. Kardon, T., et al., *Identification of the gene encoding hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, an enzyme that metabolizes 4-hydroxybutyrate*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(9): p. 2347-50.

148. Tang, H., et al., *Downregulation of HSP60 disrupts mitochondrial proteostasis to promote tumorigenesis and progression in clear cell renal cell carcinoma*. *Oncotarget*, 2016.
149. Spang, N., et al., *RAB3GAP1 and RAB3GAP2 modulate basal and rapamycin-induced autophagy*. *Autophagy*, 2014. **10**(12): p. 2297-309.
150. Hua, F. and Z.W. Hu, *TRIB3-P62 interaction, diabetes and autophagy*. *Oncotarget*, 2015. **6**(33): p. 34061-2.
151. Corcoran, C.A., et al., *Genotoxic and endoplasmic reticulum stresses differentially regulate TRB3 expression*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(10): p. 1063-7.
152. Liu, J., et al., *Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(3): p. E565-76.
153. Ishikawa, F., et al., *Gene expression profiling identifies a role for CHOP during inhibition of the mitochondrial respiratory chain*. *J Biochem*, 2009. **146**(1): p. 123-32.
154. Guo, L., et al., *Tribbles homolog 3 is induced by high glucose and associated with apoptosis in human endothelial cells*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(2): p. 1963-70.
155. Qian, B., et al., *TRIB3 [corrected] is implicated in glucotoxicity- and endoplasmic reticulum-stress-induced [corrected] beta-cell apoptosis*. *J Endocrinol*, 2008. **199**(3): p. 407-16.
156. Bromati, C.R., et al., *UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **300**(1): p. R92-100.
157. Erazo, T., et al., *The New Antitumor Drug ABTL0812 Inhibits the Akt/mTORC1 Axis by Upregulating Tribbles-3 Pseudokinase*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(10): p. 2508-19.
158. Yu, F.X. and K.L. Guan, *The Hippo pathway: regulators and regulations*. *Genes Dev*, 2013. **27**(4): p. 355-71.
159. Fallahi, E., N.A. O'Driscoll, and D. Matallanas, *The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair*. *Genes (Basel)*, 2016. **7**(6).
160. Pefani, D.E. and E. O'Neill, *Hippo pathway and protection of genome stability in response to DNA damage*. *Febs j*, 2016. **283**(8): p. 1392-403.
161. Meng, Z., T. Moroishi, and K.L. Guan, *Mechanisms of Hippo pathway regulation*. *Genes Dev*, 2016. **30**(1): p. 1-17.
162. Deng, Q., et al., *Crosstalk Between Mitochondrial Fusion and the Hippo Pathway in Controlling Cell Proliferation During Drosophila Development*. *Genetics*, 2016.
163. Goodman, C.A., et al., *Yes-Associated Protein is up-regulated by mechanical overload and is sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy*. *FEBS Lett*, 2015. **589**(13): p. 1491-7.
164. Gabriel, B.M., et al., *The Hippo signal transduction network for exercise physiologists*. *J Appl Physiol (1985)*, 2016. **120**(10): p. 1105-17.
165. Fischer, M., et al., *YAP-Mediated Mechanotransduction in Skeletal Muscle*. *Front Physiol*, 2016. **7**: p. 41.
166. Wackerhage, H., et al., *The Hippo signal transduction network in skeletal and cardiac muscle*. *Sci Signal*, 2014. **7**(337): p. re4.
167. Johnson, S.C., P.S. Rabinovitch, and M. Kaeberlein, *mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease*. *Nature*, 2013. **493**(7432): p. 338-45.
168. Kim, Y.C. and K.L. Guan, *mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(1): p. 25-32.
169. Ehninger, D., F. Neff, and K. Xie, *Longevity, aging and rapamycin*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(22): p. 4325-46.
170. Xu, S., Y. Cai, and Y. Wei, *mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging*. *Aging Dis*, 2014. **5**(4): p. 263-73.
171. Schiaffino, S., et al., *Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy*. *Febs j*, 2013. **280**(17): p. 4294-314.
172. Guridi, M., et al., *Activation of mTORC1 in skeletal muscle regulates whole-body metabolism through FGF21*. *Sci Signal*, 2015. **8**(402): p. ra113.
173. Hudson, C.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(20): p. 7004-14.

174. Leontieva, O.V. and M.V. Blagosklonny, *M(o)TOR of pseudo-hypoxic state in aging: rapamycin to the rescue*. Cell Cycle, 2014. **13**(4): p. 509-15.
175. Morita, M., et al., *mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation*. Cell Metab, 2013. **18**(5): p. 698-711.
176. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3460-70.
177. Pavitt, G.D. and D. Ron, *New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
178. Liu, B. and S.B. Qian, *Translational reprogramming in cellular stress response*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014. **5**(3): p. 301-15.
179. Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar, *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. Biochem J, 2012. **441**(1): p. 1-21.
180. Elstner, M., et al., *Expression analysis of dopaminergic neurons in Parkinson's disease and aging links transcriptional dysregulation of energy metabolism to cell death*. Acta Neuropathol, 2011. **122**(1): p. 75-86.
181. Bengsch, F., et al., *Comprehensive analysis of the ubiquitinome during oncogene-induced senescence in human fibroblasts*. Cell Cycle, 2015. **14**(10): p. 1540-7.
182. Dukes, A., et al., *The aromatic amino acid tryptophan stimulates skeletal muscle IGF1/p70s6k/mTor signaling in vivo and the expression of myogenic genes in vitro*. Nutrition, 2015. **31**(7-8): p. 1018-24.
183. Wang, J., et al., *In situ Proteomic Profiling of Curcumin Targets in HCT116 Colon Cancer Cell Line*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22146.
184. Shah, O.J., S.R. Kimball, and L.S. Jefferson, *Glucocorticoids abate p70(S6k) and eIF4E function in L6 skeletal myoblasts*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(1): p. E74-82.
185. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
186. Fox, D.K., et al., *p53 and ATF4 mediate distinct and additive pathways to skeletal muscle atrophy during limb immobilization*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **307**(3): p. E245-61.
187. Chinzei, N., et al., *P21 deficiency delays regeneration of skeletal muscular tissue*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125765.
188. Subramaniam, V., et al., *MITOCHIP assessment of differential gene expression in the skeletal muscle of Ant1 knockout mice: coordinate regulation of OXPHOS, antioxidant, and apoptotic genes*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 666-75.
189. Fan, Y.C., et al., *Cullin1 regulates proliferation, migration and invasion of glioma cells*. Med Oncol, 2014. **31**(10): p. 227.
190. Jiang, H., et al., *Cullin-1 promotes cell proliferation via cell cycle regulation and is a novel in prostate cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(2): p. 1575-83.
191. Zheng, N., et al., *Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 703-9.
192. Zhao, Y. and Y. Sun, *Targeting the mTOR-DEPTOR pathway by CRL E3 ubiquitin ligases: therapeutic application*. Neoplasia, 2012. **14**(5): p. 360-7.
193. Burrows, A.C., J. Prokop, and M.K. Summers, *Skp1-Cul1-F-box ubiquitin ligase (SCF(betaTrCP))-mediated destruction of the ubiquitin-specific protease USP37 during G2-phase promotes mitotic entry*. J Biol Chem, 2012. **287**(46): p. 39021-9.
194. Bassermann, F., R. Eichner, and M. Pagano, *The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(1): p. 150-62.
195. Salvador, J.M., J.D. Brown-Clay, and A.J. Fornace, Jr., *Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2013. **793**: p. 1-19.
196. Moskalev, A.A., et al., *Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies*. Ageing Res Rev, 2012. **11**(1): p. 51-66.
197. Ebert, S.M., et al., *Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy*. J Biol Chem, 2012. **287**(33): p. 27290-301.

198. Bongers, K.S., et al., *Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. **305**(7): p. E907-15.
199. Pang, L., et al., *Apoptotic role of TGF-beta mediated by Smad4 mitochondria translocation and cytochrome c oxidase subunit II interaction*. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(11): p. 1608-20.
200. Lee, K.P., Y.J. Shin, and K.S. Kwon, *microRNA for determining the age-related myogenic capabilities of skeletal muscle*. *BMB Rep*, 2015. **48**(11): p. 595-6.
201. Ben-Sahra, I., et al., *mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle*. *Science*, 2016. **351**(6274): p. 728-33.
202. Celardo, I., et al., *dATF4 regulation of mitochondrial folate-mediated one-carbon metabolism is neuroprotective*. *Cell Death Differ*, 2017. **24**(4): p. 638-648.
203. Morris, G., et al., *The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders*. *Mol Neurobiol*, 2014. **50**(3): p. 1059-84.
204. Swetzig, W.M., J. Wang, and G.M. Das, *Estrogen receptor alpha (ERalpha/ESR1) mediates the p53-independent overexpression of MDM4/MDMX and MDM2 in human breast cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(13): p. 16049-69.
205. Boland, R., et al., *17beta-estradiol signaling in skeletal muscle cells and its relationship to apoptosis*. *Steroids*, 2008. **73**(9-10): p. 859-63.
206. Rettberg, J.R., J. Yao, and R.D. Brinton, *Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body*. *Front Neuroendocrinol*, 2014. **35**(1): p. 8-30.
207. Weber, J.D. and D.H. Gutmann, *Deconvoluting mTOR biology*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(2): p. 236-48.
208. Risson, V., et al., *Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy*. *J Cell Biol*, 2009. **187**(6): p. 859-74.
209. Bentzinger, C.F., et al., *Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy*. *Cell Metab*, 2008. **8**(5): p. 411-24.
210. Ning, X., et al., *Wnt3a regulates mitochondrial biogenesis through p38/CREB pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016.
211. Arrazola, M.S., C. Silva-Alvarez, and N.C. Inestrosa, *How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario*. *Front Cell Neurosci*, 2015. **9**: p. 166.
212. Hu, Z., et al., *MicroRNA-29 induces cellular senescence in aging muscle through multiple signaling pathways*. *Aging (Albany NY)*, 2014. **6**(3): p. 160-75.
213. Brack, A.S., et al., *Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis*. *Science*, 2007. **317**(5839): p. 807-10.
214. Chen, L., et al., *p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2010. **70**(4): p. 1377-88.
215. Shen, L.-J., et al., *Functional Enrichment Analysis by David in Transgenic MYCN Zebrafish Model*. *Blood*, 2012. **120**(21): p. 5114-5114.
216. Dey, S., et al., *Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(43): p. 33165-74.
217. Michel, S., et al., *Inhibition of mitochondrial genome expression triggers the activation of CHOP-10 by a cell signaling dependent on the integrated stress response but not the mitochondrial unfolded protein response*. *Mitochondrion*, 2015. **21**: p. 58-68.
218. Evstafieva, A.G., et al., *A sustained deficiency of mitochondrial respiratory complex III induces an apoptotic cell death through the p53-mediated inhibition of pro-survival activities of the activating transcription factor 4*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1511.
219. B'Chir, W., et al., *The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(16): p. 7683-99.
220. Ebert, S.M., et al., *The transcription factor ATF4 promotes skeletal myofiber atrophy during fasting*. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(4): p. 790-9.
221. Ebert, S.M., et al., *Identification and Small Molecule Inhibition of an Activating Transcription Factor 4 (ATF4)-dependent Pathway to Age-related Skeletal Muscle Weakness and Atrophy*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(42): p. 25497-511.

222. Drummond, M.J., et al., *Skeletal muscle amino acid transporter expression is increased in young and older adults following resistance exercise*. J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(1): p. 135-42.
223. Drummond, M.J., et al., *An increase in essential amino acid availability upregulates amino acid transporter expression in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(5): p. E1011-8.
224. Rende, M., et al., *Nerve growth factor (NGF) influences differentiation and proliferation of myogenic cells in vitro via TrKA*. Int J Dev Neurosci, 2000. **18**(8): p. 869-85.
225. Menetrey, J., et al., *Growth factors improve muscle healing in vivo*. J Bone Joint Surg Br, 2000. **82**(1): p. 131-7.
226. Deponti, D., et al., *The low-affinity receptor for neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via RhoA*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(16): p. 3620-7.
227. Toti, P., et al., *Nerve growth factor expression in human dystrophic muscles*. Muscle Nerve, 2003. **27**(3): p. 370-3.
228. Chae, C.H., et al., *Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats*. J Physiol Biochem, 2011. **67**(2): p. 235-41.
229. Chen, L.W., et al., *Activating mitochondrial regulator PGC-1alpha expression by astrocytic NGF is a therapeutic strategy for Huntington's disease*. Neuropharmacology, 2012. **63**(4): p. 719-32.
230. Bianco, M.R., et al., *Cross-talk between cell cycle induction and mitochondrial dysfunction during oxidative stress and nerve growth factor withdrawal in differentiated PC12 cells*. J Neurosci Res, 2011. **89**(8): p. 1302-15.
231. Burks, T.N. and R.D. Cohn, *Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies*. Skelet Muscle, 2011. **1**(1): p. 19.
232. Narola, J., et al., *Conditional expression of TGF-beta1 in skeletal muscles causes endomysial fibrosis and myofibers atrophy*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79356.
233. Iovino, S., et al., *PED/PEA-15 induces autophagy and mediates TGF-beta1 effect on muscle cell differentiation*. Cell Death Differ, 2012. **19**(7): p. 1127-38.
234. Abrigo, J., et al., *Transforming growth factor type beta (TGF-beta) requires reactive oxygen species to induce skeletal muscle atrophy*. Cell Signal, 2016. **28**(5): p. 366-76.
235. Abe, Y., et al., *TGF-beta1 stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and generation of reactive oxygen species in cultured mouse podocytes, mediated in part by the mTOR pathway*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(10): p. F1477-90.

8. Abkürzungsverzeichnis

ADFE1	Alcohol dehydrogenase, iron containing 1
aRNA	antisense-RNA
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cd	common deletion
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CN	Copy Number
COX	Cytochrom-C-Oxidase
COX7A2	Cytochrome C oxidase subunit VIIa
CPEO	Chronische Progressive Externe Ophthalmoplegie
cRNA	coding-RNA
Ct	cycle threshold
CUL1	cullin 1
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER β	β -Östrogenrezeptor
FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus ubiquitously expressed
FDR	False Discovery Rate
FEZ2	Fasciculation and elongation protein zeta 2
FHL2	Four and a half LIM domains 2
FT	Fasertyp
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ISR	integrated stress response
IVT	In-vitro-Transkription
kbp	Kilobasenpaare
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	Leber hereditäre Optikusatrophie
LM	Lichtmikroskopie
LMD	Laser (Cell) Mikrodissektion
IrPCR	Long-Range (nested) PCR

md	multiple deletion(s)
MELAS	mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes
MERRF	myoclonic epilepsy and ragged red fibers
MILS	maternally inherited Leigh's Syndrome
miRNA	microRNA
MM	Mitochondriale Myopathie
mtDNA	mitochondriale DNA
MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2
mTOR(Cx)	mammalian target of Rapamycin (Complex x)
mtSSB	mitochondrial single strand DNA-binding protein
MYCN	Neuroblastoma MYC Oncogene
NARP	neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa
nDNA	nukleäre DNA
NGF	Nerve Growth Factor
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
POLG	Polymerase γ
PPPxR/Cx	protein phosphatase x, catalytic/regulatory subunit x
PS	Pearson's Syndrom
qRT-PCR	quantitative Real Time-PCR
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIN	RNA Integrity Number
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPSxx	ribosomal protein Sxx
sd	single deletion(s)
SDH	Succinatdehydrogenase
SHMT2	Serinhydroxymethyl-transferase 2
SKP1	S-phase kinase-associated protein 1
SLC7A1	Solute carrier family 7 member 1
SMAD4	SMAD family member 4
SMTNL1	Smoothelin-like 1
StaAbw	Standardabweichung
TGFB1	Transforming Growth Factor β 1
TIM	translocase of the inner membrane
TOM	translocase of the outer membrane
TRIB3	Tribbles homolog 3

UPR	unfolded protein response
wnt	Wingless-related integration site
wt	Wildtyp
YAP	Yes-Associated Protein

9. Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Marianne Dieterich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Danach möchte ich Herrn Prof. Dr. Klopstock als Leiter des Friedrich-Baur-Instituts für die Überlassung des Themas danken und für die inhaltliche, organisatorische und menschliche Unterstützung insbesondere zu Beginn der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt anschließend Herrn PD Dr. Elstner für die kontinuierliche Supervision und seine Fähigkeit, mich auch über Durststrecken hinweg zu motivieren. Seine Begeisterungsfähigkeit und sein hoher wissenschaftlicher Anspruch haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Möglichkeit der Erstellung von Teilen dieser Arbeit am Helmholtz Zentrum München und die wertvolle Beratung vor Ort danke ich dem Direktor des Instituts für Humangenetik Herrn Prof. Dr. Meitinger und dem Leiter der Forschungsgruppe zur Genetik von Mitochondriopathien Herrn Dr. Prokisch.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Elstner, insbesondere Frau Dipl.-Ing. Krieg, Herrn Dr. Laub und Herrn Mehaffey, danke ich für die praktischen Hinweise und die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich den Mitarbeitern des Friedrich-Baur-Instituts, hier besonders Frau Becker, Frau Brandstetter, Frau Grimm und Frau Schmuck für die Bereitstellung von Raum und Materialien und die freundliche Einweisung in die Arbeitsabläufe und Bedienung der Geräte.

Meinen Eltern, meiner Frau Nicole und meiner Tochter Malina danke ich für ihr Verständnis, ihre Geduld und die große Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Dziękuję!

Danken möchte ich außerdem Prof. Kinya Ishikawa, der mich mit seinem wissenschaftlichen Eifer begeistert hat, und meinen Freunden, die mir in kritischen Situationen mit Rat und Verständnis zur Seite standen.

Abschließend gilt mein Dank den Patienten, ohne deren Einverständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und die mit ihrer Zustimmung einen unentbehrlichen Beitrag zu unserer Forschung leisten.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Konrad Stanisław Olszewski, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Differentielle Genexpressionsanalysen aus Muskeleinzelfasern bei mitochondrialen Myopathien“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Konrad Olszewski

München 08.12.2018