

---

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik Großhadern

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Brandt, FRCP

**Molekulargenetische Charakterisierung von  
Mutationen der mitochondrialen 12S rRNA bei  
Patienten mit bilateraler Vestibulopathie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Caroline Schmidt

aus

Trier

2007

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. T. Klopstock

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. Grafe  
Prof. Dr. J. Müller-Höcker

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Elstner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2007

Meinen Eltern  
für ihre  
Liebe und Unterstützung

---

# INHALTSVERZEICHNIS

## A. Einleitung

A.I	Mitochondriale Genetik und Biochemie.....	5
A.II	Mitochondriale Erkrankungen.....	8
A.III	Bilaterale Vestibulopathie.....	11
A.IV	Ziele der Arbeit.....	14

## B. Material und Methoden

B.I	Materialien	
B.I.1	Zellkulturbedarf.....	15
B.I.2	PCR- und Sequenzierbedarf, Gelelektrophorese.....	16
B.I.3	Analysegeräte.....	17
B.II.	Methoden	
B.II.1	Zelllinie und Zellkultur.....	18
B.II.1.1	Eigenschaften der Zelllinie.....	18
B.II.1.2	Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	20
B.II.1.2.1	Kulturmedien und Inkubatorbedingungen.....	20
B.II.1.2.2	Kultivierung und Lagerung der Zellen.....	20
B.II.2	Evaluierung des Rho <sup>0</sup> -Status.....	21
B.II.3	Thrombozytenisolation aus EDTA-Blut.....	23
B.II.4	Herstellung transmitochondrialer Cybride.....	24
B.II.5	Identifizierung von Cybridklonen mittels Enzymrestriktion...	25
B.II.5.1	Enzymrestriktion für die LHON-Mutation an Position 11778.....	25
B.II.5.2	Enzymrestriktion für die MELAS-Mutation an Position 3243.....	26
B.II.6	DNA-Isolierung.....	26
B.II.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
B.II.7.1	Primerdesign.....	29
B.II.7.2	PCR-Bedingungen.....	30
B.II.7.3	PCR-Programme.....	33
B.II.7.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	35
B.II.8	Thermozyklische DNA-Sequenzierung.....	35
B.II.8.1	Sequenzieransatz.....	35
B.II.8.2	Sequenzierprogramm.....	36
B.II.8.3	Ethanol-fällung der Sequenzierprodukte.....	36
B.II.9	Elektrophoresetechniken.....	37
B.II.9.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
B.II.9.2	Kapillar-Gelelektrophorese.....	37
B.II.10	Analyse mitochondrialer Translationsprodukte.....	38
B.II.11	Vergleichsdatenbanken.....	39

---

## **C. Ergebnisse**

C.I	Sequenzanalyse der mitochondrialen 12S rRNA	
C.I.1	Auswahl der analysierten Patienten-DNAs.....	40
C.I.2	Mutationsanalyse im Patientenkollektiv.....	41
C.I.3	Sequenzanalyse der Kontrollgruppen.....	44
C.I.3.1	Piloten.....	44
C.I.3.1.1	Mutationsanalyse in der Pilotengruppe.....	44
C.I.3.2	Kontrollkollektiv II.....	47
C.I.3.2.1	Auswahl der Kontrollen .....	48
C.I.3.2.2	Analyse von 12S rRNA-Mutationen bei Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Beeinträchtigung des Vestibularorgans.....	51
C.II	Vergleich der analysierten Gruppen.....	52
C.III	Analyse mitochondrialer Translationsprodukte in Cybriden mit dem Basenaustausch T961G.....	53
C.IV.	Etablierung des Verfahrens zur Herstellung transmito- chondrialer Cybride	
C.IV.1	Herstellung transmitochondrialer Cybride mit der 3243-Punkt- mutation.....	54
C.IV.2	Herstellung transmitochondrialer Cybride mit der homo- plasmischen 11778-LHON-Mutation.....	55

## **D. Diskussion**

D.I	Genetische Grundlagen der bilateralen Vestibulopathie.....	57
D.II	Diskussion der Ergebnisse der 12S rRNA-Sequenz- analyse	
D.II.1	Sequenzveränderungen an Position 960 und 961.....	59
D.II.2	Bekannte Polymorphismen der mitochondrialen 12S rRNA.....	64
D.III	Stärken und Schwächen des mitochondrialen Cybrid- modells.....	67

<b>E. Zusammenfassung</b>	71
---------------------------	----

<b>F. Danksagung</b>	73
----------------------	----

<b>G. Abbildungsverzeichnis</b>	74
---------------------------------	----

<b>H. Abkürzungen</b>	76
-----------------------	----

<b>I. Literaturverzeichnis</b>	77
--------------------------------	----

<b>J. Lebenslauf</b>	87
----------------------	----

## A. Einleitung

### AI. Mitochondriale Genetik und Biochemie

Nach der Endosymbiontenhypothese (Altmann 1890) entstanden Mitochondrien aus der Fusion aerober Bakterien mit anaeroben Eukaryonten, welche dadurch die Fähigkeit der Energiegewinnung aus Sauerstoff erwarben (Grivell 1983). Im Laufe der Jahre wurde ein Großteil der bakteriellen DNA in das Genom der Eukaryonten integriert. Ein kleinerer Teil blieb jedoch als mitochondriale DNA (mtDNA) erhalten. Diese wurde erstmals 1963 von Nass und Nass identifiziert und schließlich 1981 vollständig sequenziert (Anderson *et al*, 1981). Die humane mtDNA (Abb. A1), ein doppelsträngiges, zirkuläres, aus insgesamt 16569 Basenpaaren bestehendes DNA-Molekül, codiert für 13 Polypeptideneinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I-V (Anderson *et al*, 1981; Chomyn *et al*, 1985), zwei ribosomale RNAs (rRNA) und 22 Transfer-RNAs (tRNA). Diese ermöglichen zum einen die in den Mitochondrien stattfindende Replikation der mtDNA, zum anderen die Translation der 13 Atmungsketten-Gene.

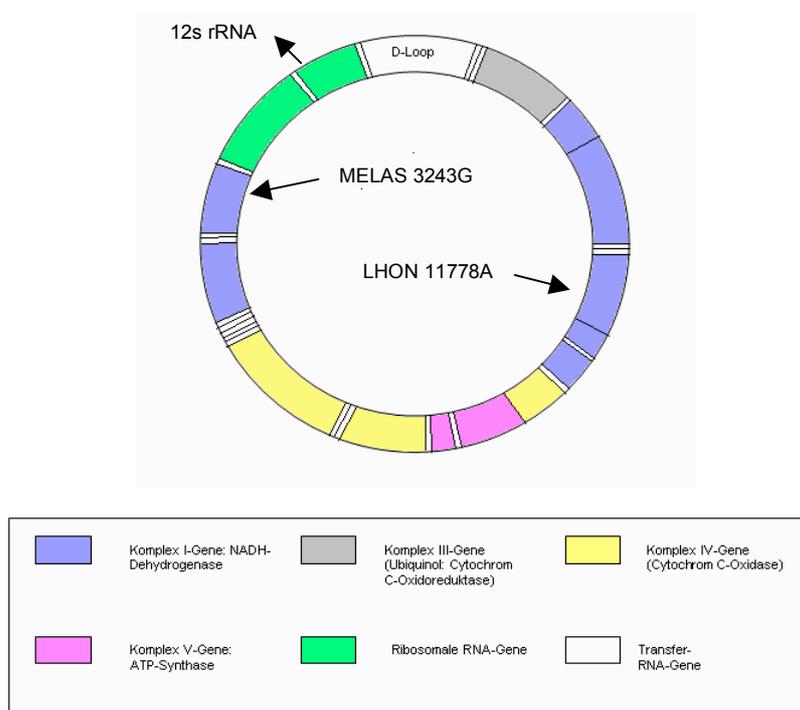


Abb. A1 Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA

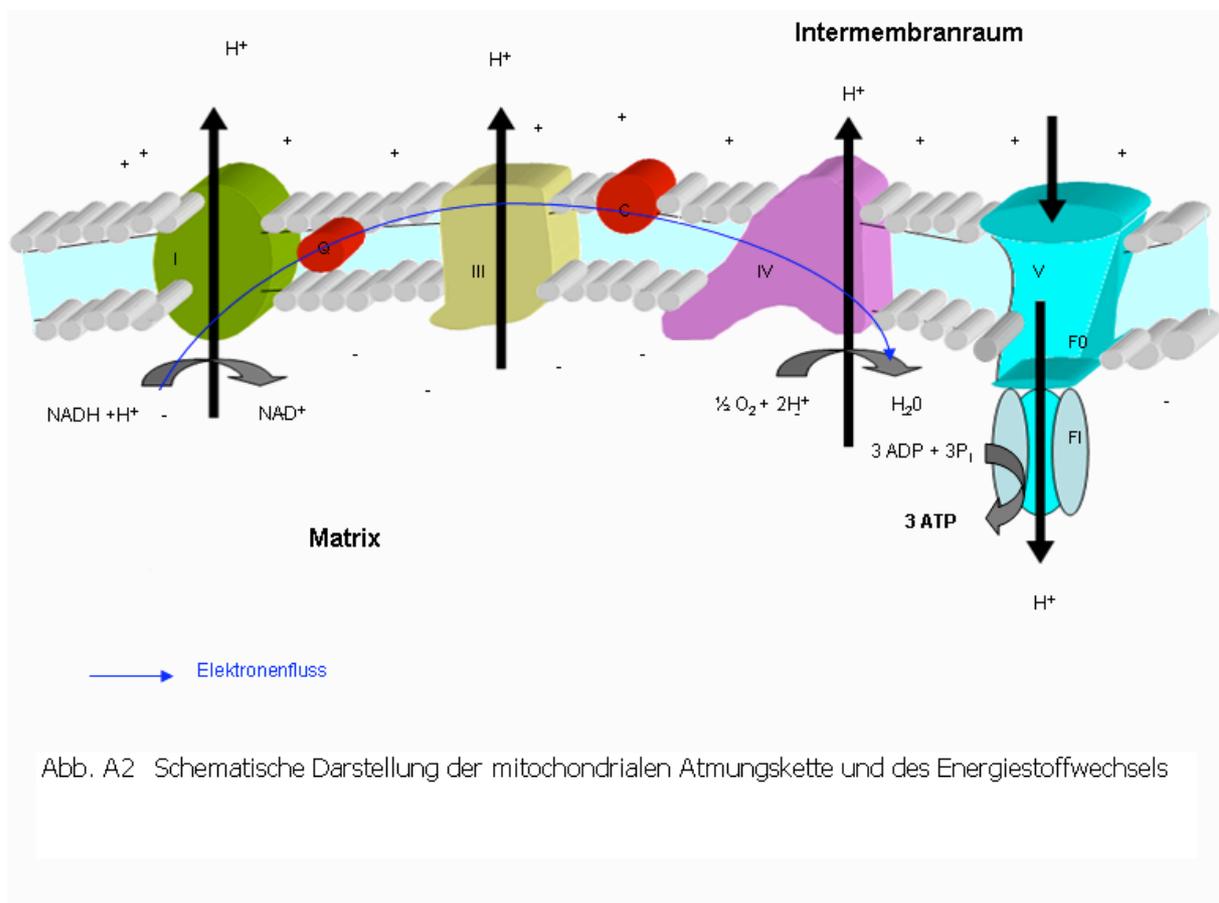
Die mitochondriale Vererbung folgt in einigen wesentlichen Punkten nicht der Mendelschen Genetik der Chromosomen im Zellkern (Schon, 1993). So wird neben einem kleinen paternal vererbten Anteil (Awadalla *et al*, 1999) der Großteil der mitochondrialen DNA maternal vererbt. In Ermangelung effektiver DNA-Reparatursysteme und mtDNA-schützender Histone sowie durch die im mitochondrialen Energiestoffwechsel anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies finden sich in der mtDNA wesentlich häufiger Spontanmutationen als in der Zellkern-DNA. Desweiteren erfolgen die Verteilung der Mitochondrien auf Tochterzellen und die Replikation der mtDNA rein zufällig und unabhängig vom Zellzyklus. Hieraus resultiert ein als *mitotische Segregation* bezeichnetes Phänomen. Verschiedene Mitochondrien-Populationen (z.B. Mitochondrien mit Wildtyp-mtDNA und mutanter mtDNA) verteilen sich sehr unterschiedlich auf ihre Tochterzellen, d.h. bereits in einer Zelle eines Organismus können unterschiedliche mtDNA-Populationen zu finden sein (*Heteroplasmie der mtDNA*). Wird durch den Anteil an mutanter mtDNA ein kritischer Schwellenwert überschritten, führt dies zu einer Funktionseinschränkung der mitochondrialen Atmungskette der betroffenen Zelle bzw. des betroffenen Gewebes. Der hieraus resultierende Defekt der oxidativen ATP-Gewinnung beeinträchtigt vor allem die Funktions- und Leistungsfähigkeit von Organen und Geweben mit einem hohen aeroben Energiebedarf, so z. B. das Gehirn, die Muskulatur oder auch die Retina.

Ein reibungsloser Ablauf der oxidativen Energiegewinnung der Zelle ist also eng gekoppelt an ein funktionsfähiges Mitochondrium bzw. die ausreichende Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) durch die sauerstoffabhängige Reoxidation wasserstoffabhängiger Coenzyme (NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub>) (Löffler, 1999) in der mitochondrialen Atmungskette (lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran).

Die Atmungskette besteht aus insgesamt fünf Atmungskettenkomplexen:

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

Die diese fünf Atmungskettenkomplexe bildenden Untereinheiten sind überwiegend nukleär codiert und werden über verschiedene transmembranöse Transporter in die Mitochondrien transferiert. Eine Ausnahme bilden hier die 13 von der mitochondrialen DNA codierten Untereinheiten, die am Aufbau von Komplex I (sieben mtDNA-codierte Untereinheiten), III (eine mtDNA-codierte Untereinheit), IV (drei mtDNA-codierte Untereinheiten) und V (zwei mtDNA-codierte Untereinheiten) beteiligt sind.



Die bei dem Elektronentransport (aus  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$ ) über Komplex I-IV freiwerdende Energie wird von Komplex I, III und IV dazu genutzt, aktiv Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum zu transportieren. Beim Rückfluss der Protonen über Komplex V (ATP-Synthase) entsteht unter Ausnutzung der freiwerdenden Energie aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (Pi) Adenosintriphosphat (ATP). Als terminaler Elektronenakzeptor fungiert Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ). Dieser reduzierte Sauerstoff reagiert schließlich unter Freisetzung von Energie mit den gewonnenen Wasserstoffprotonen zu Wasser (Knallgasreaktion).

Diese Kombination eines oxidativen Prozesses mit einer Phosphorylierung bezeichnet man auch als oxidative Phosphorylierung (Abb. A2).

### A.II. Mitochondriale Erkrankungen

Mitochondriale Erkrankungen stellen sowohl klinisch als auch bezüglich ihrer Genetik eine ausgesprochen heterogene Gruppe dar. Viele Krankheitsbilder, wie z.B. das *MELAS-Syndrom* (Mitochondriale Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose und „stroke like episodes“) (Pavlakakis *et al.*, 1984), das *MERRF-Syndrom* (Myoklonus-epilepsie mit „ragged red fibers“) (Fukuhara *et al.*, 1980) oder die Lebersche hereditäre Optikus-Neuropathie (*LHOM*) (Wallace D.C. *et al.* 1988) sind mit Mutationen der mtDNA assoziiert und werden daher maternal vererbt. Andere Erkrankungen, wie z.B. die autosomal dominanten Formen der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (*CPEO*) (van Goethem *et al.*, 2002, Suomalainen *et al.*, 2001) oder die *Friedreich-Ataxie* (cerebelläre Ataxie, periphere Neuropathie, hypertrophe Kardiomyopathie und Diabetes) sind durch Mutationen nukleärer Gene bedingt, die für mitochondrial lokalisierte Proteine codieren. Entsprechend folgen diese letztgenannten Erkrankungen einer autosomal dominanten oder rezessiven Vererbung.

Klinischer Phänotyp und Erkrankungsbeginn mitochondrialer Erkrankungen sind selbst bei nachgewiesener Mutation häufig schwierig vorhersagbar, da sowohl der Heteroplasmiegrad (= Anteil mutanter mtDNA an der gesamten mtDNA einer

Zelle/eines Gewebes) als auch der nukleäre Hintergrund (Bu X. *et al.*, 1992, Guan *et al.*, 1996) die mitochondriale Funktionsfähigkeit beeinflussen können. Kann die Beeinträchtigung der Energiegewinnung, der vermehrte Anfall von oxidativem Stress (durch vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)) und die gestörte Regulation des zellulären Apoptoseverhaltens in den betroffenen Geweben nicht länger ausreichend kompensiert werden (Wallace 1999 und 2001), kommt es zunächst vor allem in Geweben und Organen zur Symptomanifestation, die gegenüber mitochondrialen Fehlfunktionen sehr empfindlich sind. Häufig betroffen sind daher Gehirn, Retina, Herz- und Skelettmuskulatur, das endokrine System und die Nieren (Wallace, 1999). Die Symptome sind vielfältig und reichen von endokrinologischen Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus), Blind- und Taubheit, Kardiomyopathien, Myopathien, Augenmuskelparesen und Bewegungsstörungen wie z.B. ataktischen Gangstörungen und Parkinson-ähnlichen Krankheitsbildern hin zu epileptischen Anfällen und dementiellen Syndromen (Wallace 2001).

Sensorineuronaler Hörverlust ist ein typisches, sowohl isoliert als auch syndromal auftretendes Symptom mitochondrialer Erkrankungen. Reardon *et al.* beschrieben erstmals 1992 mehrere Familien, die an einer Kombination aus Diabetes mellitus und zunehmendem Hörverlust erkrankt waren. Bei den Erkrankten gelang der Nachweis der mit dem MELAS-Syndrom assoziierten heteroplasmischen A3243G-Mutation (Reardon *et al.*, 1992, van den Ouweland *et al.*, 1992). Die Assoziation dieser mitochondrialen Mutation mit Diabetes mellitus und Hörverlust konnte dann in weiteren größeren Studien belegt werden (Oka *et al.*, 1993, Kadowaki *et al.*, 1994). In einer Familie arabisch-israelischer Abstammung mit mehreren Fällen maternal vererbter Taubheit konnte die Assoziation einer homoplasmischen mtDNA-Mutation mit der Erkrankung gezeigt werden (Jaber *et al.*, 1992; Prezant *et al.*, 1993). Als pathogene Mutation wurde die homoplasmische A1555G-Mutation im Gen für die mitochondriale 12S rRNA identifiziert. Ferner kennzeichnet die Träger der A1555G-Mutation eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ototoxischen Substanzen, insbesondere gegenüber Aminoglykosiden wie Gentamicin und Streptomycin.

Patienten mit diesem prädisponierenden genetischen Faktor entwickeln bereits unter niedriger Aminoglykosiddosis schwere irreversible Hörschäden (Prezant *et al.*, 1993; Fischel-Ghodsian *et al.*, 1993, 1997b; Hutchin *et al.*, 1993; Pandya *et al.*, 1997). Durch den Basenaustausch an Position 1555 nähert sich die Sekundärstruktur der mitochondrialen 12S rRNA der korrespondierenden Region der bakteriellen 16S rRNA an. Diese hoch konservierte Region bildet einen wichtigen Teil der kleinen (30S) ribosomalen Untereinheit des Bakteriums (Wimberly *et al.*, 2000) und ist einer der wichtigsten Bindungsorte der Aminoglykoside (Moazed *et al.*, 1987; De Stasio *et al.*, 1989; Purohit *et al.*, 1994; Recht *et al.*, 1996; Fourmy *et al.*, 1998), die dort ihre bakterizide Wirkung entfalten können (Davies. *et al.*, 1965). Die erhöhte Suszeptibilität von der A1555G-Mutation betroffener Individuen gegenüber Aminoglykosiden erklärt sich folglich durch die Annäherung der Sekundärstrukturen der rRNAs, die die Bindung von Aminoglykosiden an die mitochondriale 12S rRNA (Hamasaki *et al.*, 1997, Guan *et al.*, 2000) erleichtert, was eine exakte Proteintranslation in der Zelle beeinträchtigt (Chernoff *et al.*, 1994). Ferner konnten Mutationen an den Positionen 961, 1095, 1243 und 1494 der mitochondrialen 12S rRNA als Suszeptibilitätsfaktoren für eine durch Aminoglykoside induzierte Taubheit (AIHL) identifiziert werden (Yoshida *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005, Tessa *et al.*, 2001).

Obwohl Aminoglykoside wie Gentamicin und Streptomycin weit mehr für ihre Vestibulotoxizität (Nedzelski *et al.*, 1993) als ihre Ototoxizität bekannt sind, ein Umstand, der zur Behandlung von Patienten mit einseitigem Morbus Menière therapeutisch zur Ausschaltung des betroffenen Vestibularorgans genutzt wird (Odkvist *et al.*, 1988; Nedzelski *et al.*, 1993), wiesen Patienten mit der 1555-Mutation fast ausschließlich Hörschäden und allenfalls milde Symptome einer Vestibulopathie auf.

Allerdings gilt die Applikation von Aminoglykosiden als einer der häufigsten Auslöser einer bilateralen Vestibulopathie (siehe A.III. Bilaterale Vestibulopathie) (Brandt 1999, Zingler 2007). So stellte sich die Frage, ob nicht für die durch Aminoglykoside verursachten Fälle bilateraler Vestibulopathie ähnliche prädisponierende genetische Faktoren identifiziert werden könnten wie für die

durch Aminoglykoside induzierte Taubheit. Das Gen für die mitochondriale 12S rRNA schien aus den genannten Gründen ein idealer Kandidat für die Mutationssuche zu sein.

### A.III. Bilaterale Vestibulopathie

Nach Brandt (1999) ist die bilaterale Vestibulopathie eine Erkrankung, die auf eine gleichzeitige oder sequentielle Schädigung der Labyrinth und/oder der Vestibularisnerven zurückzuführen ist. Die Ursachen dieser Erkrankung sind vielfältig (Rinne *et al.*, 1995, Vibert D. *et al.* 1995, Brandt, 1996 und 1999, Zingler 2007) (zur Ätiologie, siehe Tabelle 1). Die Erkrankung betrifft Männer und Frauen gleichermaßen und kann sich in jedem Lebensalter manifestieren. Beschrieben wurden u.a. akute und langsam progrediente Verläufe mit kompletter und inkompletter, teilweise auch seitendifferenzierter Schädigung der Vestibularorgane. In einigen Fällen wurden zusätzlich begleitend auftretende Hörstörungen beschrieben. Im Langzeitverlauf konnte bei etwa 50% der Patienten mit bilateraler Vestibulopathie zumindest eine partielle Remission der Ausfälle beobachtet werden (Vibert *et al.*, 1995).

Klinische Leitsymptome der bilateralen Vestibulopathie sind v.a. bei raschen Kopfbewegungen oder beim Gehen auftretende Oszillopsien und eine Gangunsicherheit, die sich bei Dunkelheit oder auf unebenem Grund verstärkt. Vor allem bei sequentiellen Ausfall der Vestibularorgane berichten Patienten in der Anfangsphase der Erkrankung über episodisch auftretenden, für Minuten bis Tage anhaltenden Dreh- oder Schwankschwindel. Diese Leitsymptome erklären sich durch den Ausfall vestibulo-okulärer und vestibulo-spinaler Funktionen. Eine Einschränkung des vestibulo-okulären Reflexes (VOR) (v.a. bei raschen horizontalen Kopfbewegungen) verursacht eine unwillkürliche Bildwanderung über die Retina, die von den Patienten als Scheinbewegung wahrgenommen wird. Die Sehschärfe ist reduziert. Die sich bei Dunkelheit und Unebenheit verstärkende Gang- und Standunsicherheit ist auf eine gestörte vestibulo-spinale Haltungs-

regulation zurückzuführen, die v.a. bei Dunkelheit nicht durch das visuelle System kompensiert werden kann.

Die klinische Diagnosestellung wird durch Überprüfung des VOR gesichert. Hier hat sich der rasche passive Kopfdrehtest nach Halmagy (1988) bewährt. Bei Beeinträchtigung des VOR lassen sich bei raschen horizontalen Kopfbewegungen Refixationssakkaden beobachten. Die Gleichgewichtsstörung zeigt sich v.a. bei geschlossenen Augen durch vermehrtes Schwanken im Romberg-Stehversuch und Unsicherheit beim Seiltänzerengang. Bei asymmetrischer Vestibularisfunktion findet sich darüber hinaus eine ipsiversive Gangabweichung. Zur weiteren Sicherung der Diagnose dient die Elektronystagmografie mit kalorischer Prüfung der Bogengänge, audiologische Untersuchungen und akustisch evozierte Potentiale (AEPs). Die ätiologische Einordnung (siehe Tabelle 1) erleichtert die Klärung therapeutischer Optionen. Bei Patienten mit positiver Familienanamnese für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ototoxischen Substanzen sollte der Einsatz von ototoxischen Substanzen wie Aminoglykosiden und Schleifendiuretika sorgfältig geprüft und wenn möglich vermieden werden.

Tabelle 1 Ursachen einer bilateralen Vestibulopathie (nach Brandt 1999, Zingler 2007)	
- idiopathisch (20- 30%)	
- ototoxische Substanzen	z. B. Gentamycin und andere Antibiotika, Schleifendiuretika
- Cerebelläre Degeneration	z. B. Multisystematrophien
- Meningitis/Labyrinthitis	
- Tumoren	z. B. NHL, bilaterale Vestibularis-Schwannome
- Autoimmunerkrankungen	z. B. Cogan- Syndrom, Rheumatoide Arthritis, SLE, Wegener Granulomatose, Neurosarkoidose, Riesenzellarteriitis, Polyarteriitis nodosa, Morbus Behcet, cerebrale Vaskulitiden
- Neuropathien	z. B. Vitamin B12- und B6- Mangel
- bilaterale Neuritis vestibularis	
- bilateraler Morbus Menière	
- kongenitale Fehlbildungen	

Tabelle A1. Ätiologie der bilateralen Vestibulopathie

### A.IV. Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit wurde die mitochondriale 12S rRNA von insgesamt 53 Patienten mittels PCR und Sequenzanalyse untersucht. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus: A) Patienten mit gesicherter bilateraler Vestibulopathie sowie B) der Tochter einer Patientin, die über eine zunehmende Hörstörung berichtete. Die molekulargenetische Analyse der 12S rRNA zielte auf die Identifizierung von verschiedenen, potentiell für eine Aminoglykosid-induzierte bilaterale Vestibulopathie prädisponierenden Mutationen. Diese sollten dann in einem weiteren Schritt mit Hilfe eines mitochondrialen Cybridmodells funktionell charakterisiert werden. So sollten schließlich analog zur A1555G-Mutation Mutationen identifiziert werden, welche die Suszeptibilität des Vestibularorgans gegenüber Aminoglykosiden erhöhen können.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines erstmals von Chomyn 1996 durchgeführten Verfahrens zur Herstellung transmitochondrialer Zellcybride aus Thrombozyten und einer mitochondrienfreien Zelllinie. Dieses erlaubt die funktionelle Charakterisierung mitochondrialer Mutationen vor einem jeweils identischen, intakten und vom ursprünglichen nukleären Genom der Thrombozytendonoren unabhängigen Zellkernhintergrund. So können anhand des Modells u.a. gezielt die Auswirkung einzelner mitochondrialer Mutationen auf die Aktivität der verschiedenen Atmungskettenkomplexe und damit verbunden die Auswirkungen auf den zellulären Energiestoffwechsel im Allgemeinen untersucht werden. Auch die therapeutische Erprobung verschiedener potentiell neuroprotektiver Substanzen wie beispielsweise Kreatin oder Coenzym Q am Zellmodell stellt eine langfristige Option dar.

## B. Material und Methoden

### B.I. Materialien

#### B.I.1. Zellkulturbedarf

Produktname	Artikelnummer	Firma
5` Bromo-Desoxyuridin (C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	B5002	Sigma
Cryotubes		
Nährmedium DMEM (+Glucose +Na/Pyruvat)	41966- 029	Gibco
Nährmedium DMEM (Ca <sup>++</sup> -frei)	21068- 028	Gibco
Dimethylsulfoxid ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)	D5879	Sigma
Ethidiumbromid (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )	E1510	Sigma
Falcon Tubes (50ml)	352070	Falcon
Fetal Calf Serum (heat inactivated)		
Ficoll- Lösung (Ficoll Plus)	171440- 02	Amersham
Phosphate buffered saline (PBS)		
Penicillin/Streptomycin	15140- 122	Gibco
Platten (10cm) (Nunclon for cell culture)	150350	Nunclon
Platten (24well), Platten (6well)	3526 3527	Corning
Polyethylenglykol (H(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OH )	P5402	Sigma
Trypan Blau	T8154	Sigma
Trypsin	25300- 054	Gibco
Uridin (C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> )	U3003	Sigma

## Material und Methoden

### B.I.2. PCR- und Sequenzierbedarf, Gelelektrophorese

Produktname	Artikelnummer	Firma
<i>DNA- Isolierung:</i>		
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	A9434	Sigma
EDTA ((HO <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H) <sub>2</sub> ), 250mM -Lösung	E6758	Sigma
Ethanol 100% (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)		
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	P9144	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	S7653	Sigma
Proteinase K	P2308	Sigma
DNA- Midi Kit	51185	Qiagen
<i>Gelelektrophorese:</i>		
Agarose	50000	Seakem
Ethidiumbromid (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )	E1510	Sigma
PBR 322 Marker	N3031S	NEB
<i>PCR:</i>		
10X Puffer	201223	Qiagen
Q- Solution	201223	Qiagen
Magnesiumchlorid (Mg <sub>2</sub> Cl)	201223	Qiagen
dNTP	201223	Qiagen
Tag- Polymerase	201223	Qiagen
HOTstar Tag- Polymerase	203605	Qiagen
Primer (5` Sequenz) (mt 12S rRNA)	Afor: ttagcttacctcctcaagca Arev: tcagtgagtttagctttattgg Bfor: tcacacgattaaccaagtcaa Brev: acgtgggtacttgcgcttac Cfor: accaccttgctcagccta Crev: ggttagctcagagcggta Dfor: ccgagtgtagtggggtattt Drev: gcagaaatgcacccatgaac	Invitrogen
Primer (5` Sequenz) (mt tRNA Leucin)	ND1for: cacaagctcccgatggtgcagccgc 16S rev: ggctactgctcgagtg	Invitrogen
Primer (5` Sequenz) (mt 11778- LHON)	PCRlink: cccctgaagcttcaccgg Revlink: caagctccatgggggtaaggcgaggttagcg	Invitrogen
Primer (5` Sequenz) (mt D-Loop)	534 for: ggggatggggcttggtgg 725 rev: ccactgagtgacctgccc	Invitrogen
<i>Restriktionsenzyme:</i>		
SfaN1	R0172S	NEB
Bsp 120 I	FD0134	Fermentas
<i>Sequenzierung:</i>		
PCR Purification Kit	28104	Qiagen
Big Dye Terminator Kit 3.1	4337455	Applied Biosystems

## Material und Methoden

<i>Translationsanalyse:</i>		
RPMI Met <sup>-</sup> Medium	R7513	Sigma
RPMI Met <sup>+</sup> Medium	R8758	Sigma
Emetine (C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 2HClxH <sub>2</sub> O)	E2375	Sigma
Bradford reagent	B6916	Sigma
Natronlauge (NaOH)	S8045	Sigma
Polyacrylamid	92560	Fluka

### B.I.3 Analysegeräte

Brutschrank (37°C, 5% CO <sub>2</sub> )	Hera Cell/ Heraeus
Lichtmikroskop	Zeiss (10x- 32x)
Neubauer- Zählkammer	
Gelelektrophoresekammer	Biometra
Sterilbank – Zellkultur	Heraeus
Zentrifuge	Multifuge 20R/ Heraeus
Wasserbad (37°C)	Memmert
Zentrifuge	Multifuge 3/ Heraeus
Tischzentrifuge	S415 R Eppendorf
PCR- Cycler (Gradient Cycler)	PTC 200 MJ research
pH- Meter Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Photometer	PhDigi 520/WTW
Sequenzier	ABI Prism 310 genetic analyser

- B.II. Methoden
- B.II.1. Zelllinie und Zellkultur
- B.II.1.1 Eigenschaften der Zelllinie

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellversuche wurde eine mtDNA-freie Zelllinie (Rho<sup>0</sup>) verwendet, die erstmals 1986 (Desjardin *et al.*) beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich um Osteosarkomzellen, deren mitochondriale DNA durch eine Langzeitbehandlung mit Ethidiumbromid, einer mit der DNA interkalierenden Substanz, vollständig aus den Zellen entfernt wurde. Ethidiumbromid akkumuliert in niedrigen Dosierungen v.a. in den Mitochondrien und beeinträchtigt dort, u.a. durch Inhibition der mitochondrialen DNA-Polymerase, die Replikation der mtDNA. So führt bereits eine Ethidiumbromidkonzentration von 50ng/μl (King und Attardi, 1986) zur gewünschten Elimination der mtDNA aus der Zelle ohne Schäden an der nukleären DNA zu verursachen (Nass, 1972). Entscheidend für die vollständige Entfernung der mtDNA ist die Fortführung der Ethidiumbromidbehandlung über einen Zeitraum von mindestens 25-30 Tagen, um die Repopulation auch kleinerer mtDNA-Fragmente zu verhindern (King und Attardi 1996; Moraes *et al.*, 2002).

Der Verlust der zelleigenen mtDNA, die u.a. für 13 wichtige Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette codiert, und das daraus resultierende Fehlen einer voll funktionsfähigen Atmungskette bedingen einige besondere Eigenschaften der Rho<sup>0</sup>-Zelllinie:

- A) Die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (Pi) ist unmittelbar abhängig von einem über der inneren Mitochondrienmembran bestehenden Protonengradienten, der von den mitochondrialen Atmungskettenkomplexen, wie z. B. der Cytochrom c-Oxidase (COX) unterhalten wird. Die Aktivität dieser Komplexe ist, wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, abhängig von einer intakten mtDNA und deren korrekter Translation. Der Zusammenbruch des Ladungsgradienten über der inneren Mitochondrienmembran der Rho<sup>0</sup>-Zellen erklärt deren Defizit in der oxidativen Phosphorylierung.

- B) Die mitochondriale Dihydroorotatdehydrogenase, ein in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiertes Enzym des Pyrimidinstoffwechsels, katalysiert die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat unter Bildung von NADH/H<sup>+</sup>. Die Aktivität der Dihydroorotatdehydrogenase ist eng gekoppelt an einen funktionierenden Elektronentransport über die Atmungskettenkomplexe (Gregorie *et al.*, 1984). Folglich verfügen Rho<sup>0</sup>-Zellen nicht über eine ausreichende Enzymaktivität, um ihren Pyrimidinbedarf zu decken und sind auf eine zusätzliche Pyrimidinquelle, z.B. Uridin im Kulturmedium angewiesen (Moraes *et al.*, 2001).
- C) 1989 zeigten King und Attardi, dass die Kultivierung der Zellen durch Zugabe von Pyruvat zum Nährmedium erleichtert werden kann. Diese Pyruvatabhängigkeit beruht wohl auf einer gesteigerten Verstoffwechslung von Pyruvat zu Laktat in der anaeroben Glykolyse. Dieser von der Laktatdehydrogenase katalysierte Schritt dient u.a. der Regeneration von NAD<sup>+</sup> aus NADH/H<sup>+</sup>. Diese stehen somit wieder als Reduktionsäquivalente zur Aufrechterhaltung der Glykolyse (Energiebilanz: + 2ATP) zur Verfügung. Die gesteigerte Umsetzung von Pyruvat in diesem Stoffwechselschritt bedingt zugleich einen Pyruvatmangel im Citratzyklus (Krebszyklus). Dies führt zur Funktionseinschränkung des Citratzyklus und zahlreicher mit ihm in Verbindung stehender Stoffwechselschritte wie z. B. der Fettsäurebiosynthese, der Bildung verschiedener Aminosäuren (z.B. Glutamat) und der Porphyrinsynthese. Eine Pyruvatsubstitution trägt folglich wesentlich zur Aufrechterhaltung zahlreicher Stoffwechselschritte der Zelle bei.

Zusätzlich verfügen Rho<sup>0</sup>-Zellen über einen nukleären Selektionsmarker. Sie besitzen keine Thymidinkinase. Die Thymidinkinase, ein Enzym des Pyrimidinstoffwechsels katalysiert die Phosphorylierung von Deoxythymidin zu Thymidinmonophosphat. 5`Bromodeoxyuridin wird ebenfalls von Thymidinkinase-positiven Zellen (z.B. Leukozyten) umgesetzt. Die daraus resultierende Unterbrechung des „DNA salvage pathway“ hemmt die Zellproliferation. Bei der Herstellung transmittochondrialer Cybride aus Patiententhrombozyten und Rho<sup>0</sup>-Zellen (genauere Darstellung des

Verfahrens weiter unten, B.II.2, B.II.3) ermöglicht dieser Selektionsmarker die Elimination unerwünschter kernhaltiger Blutzellen (v.a. Leukozyten) aus der Kultur (Chomyn A. *et al.*, 1996) .

### B.II.1.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

#### B.II.1.2.1 Kulturmedien und Inkubatorbedingungen

Kultiviert wurden die 143B.TK<sup>-</sup> Rho<sup>0</sup>-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Zeviani aus Mailand) in 10ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% Fetal Calf Serum (FCS), 2% Penicillin, Streptomycin, 1% Natriumpyruvat und 50µg/ml Uridin. Die Cybridlinien wurden in 10ml DMEM unter Zusatz von 10% FCS, 2% Penicillin-Streptomycin und 100µg/ml 5'Bromodeoxyuridin (BrdU) kultiviert (King und Attardi 1989, 1996; Mariotti *et al.* 1994). Ein Mediumwechsel erfolgte abhängig von der Zelldichte alle zwei bis drei Tage. Sowohl Mutterzelllinie als auch Cybridlinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### B.II.1.2.2 Kultivierung und Lagerung der Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 100.000-150.000 Zellen/ml auf 10cm Zellkulturplatten gegeben. Bei einer Konfluenz von 75-85% erfolgte die Ernte der Zellen.

Durchführung der Zellernte:

1. Nach Entfernung des Nährmediums erfolgt ein Waschschriff mit 10 ml einer 1x PBS-Lösung.
2. Nach Zugabe von jeweils 1ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung zur Platte folgt die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur vollständigen Ablösung der Zellen (jedoch nicht länger als 5 Minuten)
3. Die abgelösten Zellen werden in 10 ml DMEM (+ 10% FCS) aufgenommen und bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert (bei RT). Zur Bestimmung der Zellzahl können vor der Zentrifugation 12µl der Zellsuspension entnommen werden. Diese werden nach Färbung der Zellen mit 12µl Trypan blau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

4. Das Pellet wird nach Entfernung des Überstandes erneut in 10 ml Nährmedium aufgenommen und je nach gewünschter Zelldichte auf neuen Zellkulturplatten verteilt und erneut inkubiert. Alternativ erfolgt die Lösung des Pellets in einem Gefriermedium (DMEM, 10% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)) und unverzügliche Lagerung der Probe auf Eis. Langfristig erfolgt die Lagerung des Pellets bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder in flüssigem Stickstoff.
5. In Gefriermedium bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Proben können in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut werden und anschließend wie beschrieben kultiviert werden. Zur vollständigen Elimination des DMSO aus dem Kulturmedium empfiehlt sich ein Mediumwechsel etwa 2-3 h nach dem Auftauen.

### B.II.2 Evaluierung des Rho<sup>0</sup>- Status

Ziel der Langzeitbehandlung mit Ethidiumbromid ist, wie weiter oben beschrieben, die vollständige Elimination der zelleigenen mtDNA. Die 143B-Osteosarkomzellen verfügen durchschnittlich über 9100 mtDNA-Kopien/Zelle (King and Attardi, 1996). Nach King und Attardi sollten die Zellen mindestens für 14 Generationen, idealerweise aber für 3-4 Wochen in Gegenwart von Ethidiumbromid kultiviert werden, um mtDNA-freie Zellen zu erhalten.

Unvollständig entfernte mtDNA-Kopien repopulieren abhängig von der Fragmentgröße innerhalb weniger Wochen. Insbesondere repopulieren kleine mtDNA-Fragmente wesentlich schneller als die vollständige mtDNA (Moraes *et al.*, 2001). Eine sichere Identifikation mtDNA-freier Klone ist daher von entscheidender Wichtigkeit (Moraes *et al.*, 2001).

Die Abhängigkeit mtDNA-freier Klone von einer Pyrimidin- und Pyruvatquelle erlaubt bereits eine sehr zuverlässige Selektion der gewünschten Klone (King und Attardi, 1996). Neben diesem Verfahren stehen verschiedene PCR-Verfahren zur Detektion residueller mtDNA-Fragmente zur Verfügung.

Eine Möglichkeit stellt der PCR-Nachweis der mitochondrialen D-Loop (Displacement-Loop, np 16024-16576) in der Kontrollregion der mtDNA dar. Die dreisträngige Displacement-Loop (siehe Abbildung B1) wird aus der 7S DNA, einem Teil des H

(heavy)-Strang der mtDNA, synthetisiert und stellt die Startregion für die Replikation des restlichen H- Stranges dar (Wallace *et al.*, 1999).

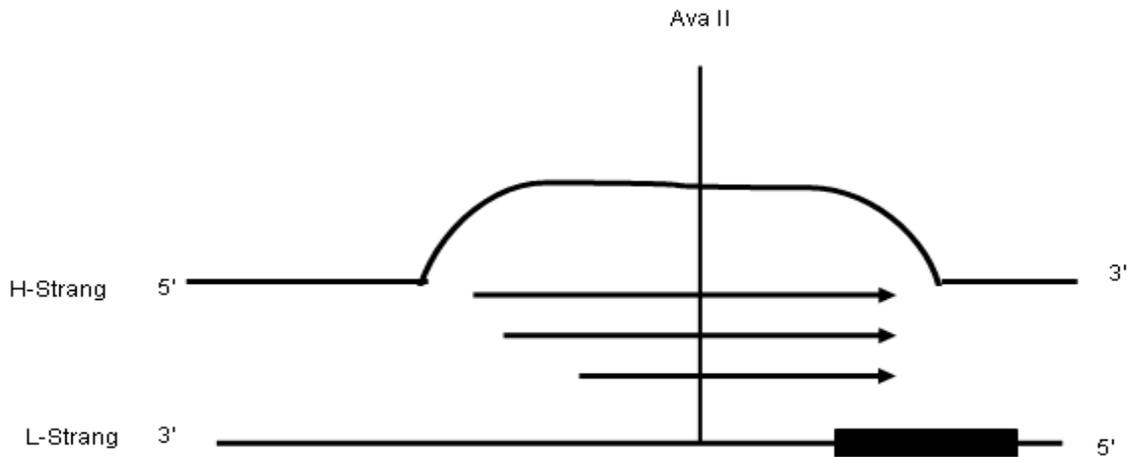


Abb. B1 Schematische Darstellung der humanen D-Loop Region (nach Doda *et al.*, 1981)

Nach erfolgreicher Behandlung mit Ethidiumbromid fällt der PCR-Nachweis negativ aus (Primer und PCR- Protokoll siehe Abschnitt B.II.7.1, B.II.7.2, B.II.7.3) .

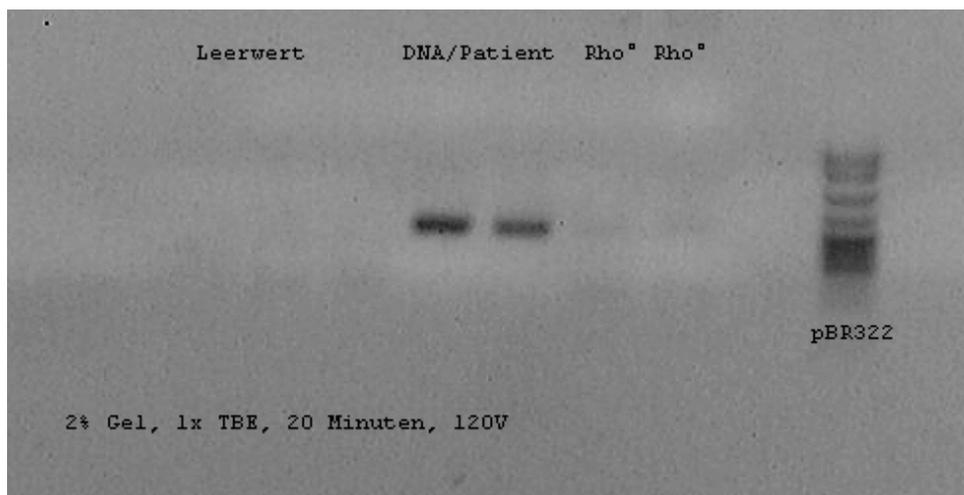


Abb. B2 D-Loop PCR nach dreiwöchiger Ethidiumbromidbehandlung (final concentration 50ng/ $\mu$ l Ethidiumbromid). Ethidiumbromidbehandlung wurde bis zur vierten Woche fortgesetzt.

Die Kombination dieser beiden Verfahren zur Evaluierung des Rho<sup>0</sup>-Status der Osteosarkomzellen erlaubt somit eine sichere Identifikation der gewünschten mtDNA-freien Klone.

### B.II.3 Thrombozytenisolation aus EDTA- Blut

1996 etablierte Chomyn ein neues Verfahren zur Herstellung transmitochondrialer Cybride. Reife Thrombozyten verfügen im Gegensatz zu ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, nicht mehr über einen eigenen Zellkern. Durchschnittlich enthalten sie vier bis fünf Mitochondrien und ein mtDNA-Molekül pro Organell (Shuster *et al.*, 1988). Sie eignen sich daher sehr gut als Mitochondriendonoren für die Herstellung transmitochondrialer Cybride (Chomyn *et al.*, 1994, 1996). Grundlegend für Chomyns Verfahren ist die erfolgreiche Isolation von Thrombozyten aus frischem EDTA-Blut (Lagerung bei Raumtemperatur(RT) bis zur Verarbeitung), welches innerhalb von drei bis vier Stunden, spätestens aber 24 Stunden nach Abnahme, verarbeitet werden sollte.

#### Durchführung:

Das EDTA-Blut wird 1:1 mit 1x PBS-Lösung gemischt. 15 ml einer zimmerwarmen Ficoll-Lösung (in 50 ml Falcon-Tubes) werden vorsichtig mit 20 ml des verdünnten EDTA-Blutes überschichtet und bei 400g (RT, keine Bremse) für 30 Minuten abzentrifugiert.

Der Plasmaüberstand wird abgenommen und in ein neues 50 ml Tube transferiert. Nach Zugabe von 50 ml 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl) erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1900g (RT) für 30 Minuten. Nach Abnahme des Überstandes und erneuter Zugabe von 50 ml physiologischer Kochsalzlösung zum Pellet folgt eine weitere Zentrifugation bei 1900g (RT) für 12 Minuten. Dieser Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt. Abschließend wird das Thrombozytenpellet bis zur weiteren Verarbeitung in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert oder wahlweise in DMSO-haltigem Medium (siehe Zellkulturbedingungen) eingefroren.

### B.II.4 Herstellung transmitochondrialer Cybride

Die mtDNA-freien Rho<sup>0</sup>-Zellen fungieren nach entsprechender Präparation der Thrombozyten als Mitochondrienakzeptoren. Ziel des weiteren Verfahrens ist die Integration der Patientenmitochondrien in die Empfängerzelllinie. Die endgültige Selektion der Cybridlinien erfolgt schließlich mit Hilfe eines uridinfreien und BrdU-haltigen Mediums, in dem letztlich nur erfolgreich transformierte Cybride überleben können, da nicht vollständig transformierte Rho<sup>0</sup>-Zellen uridinabhängig und somit im Selektivmedium nicht überlebensfähig sind (King und Attardi, 1989). Die Elimination von unerwünschten kernhaltigen Blutzellen (v.a. Leukozyten) erfolgt über die Umsetzung von BrdU durch deren Thymidinkinase.

Durchführung:

1,4-4 x 10<sup>7</sup> Zellen umfassende Proben der gewaschenen Thrombozytensuspension werden bei 2300g (15°C) für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes werden die Pellets mit jeweils 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Rho<sup>0</sup>-Zellen in 2ml Ca<sup>++</sup>-freiem DMEM überschichtet und bei 160g (RT) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Aspiration des Überstandes wird das Zellpellet in 100µl einer Polyethylenglykollösung (5g PEG 1500, 1ml 10%DMSO, 4ml Ca<sup>++</sup>-freies DMEM) resuspendiert. Nach 1 Minute bei Raumtemperatur wird die Zellsuspension durch Zugabe von 10ml DMEM (+10%FCS, 50µg/ml Uridin, und 100µg/ml BrdU) verdünnt. Diese verdünnte Zellsuspension wird je nach gewünschter Zelldichte auf 5-6 10 cm Petrischalen verteilt und für drei bis sechs Tage in uridin- und BrdU-haltigem Medium kultiviert. Nach drei bis sechs Tagen wird das Kulturmedium durch ein Selektivmedium, bestehend aus DMEM (+10%FCS und 100µg/ml BrdU), ersetzt, in dem erwartungsgemäß nur erfolgreich transformierte Zellen überleben. Nach etwa zwei bis vier Wochen können dann erste Cybridklone aus der Kultur isoliert werden.

### B.II.5 Identifizierung von Cybridklonen mittels Enzymrestriktion

Zur Etablierung des Cybridzellmodells wurden Patiententhrombozyten von Patienten mit molekulargenetisch gesichertem MELAS-Syndrom und Leberscher hereditäre Optikusneuropathie (LHON) verwendet.

Die **Lebersche hereditäre Optikusneuropathie**, eine Erkrankung, die nach zunächst asymmetrisch beginnender Schädigung der Sehnerven zu einem irreversiblen bilateralen Visusverlust führt, ist u.a. mit einer homoplasmischen Punktmutation an Position 11778 der mitochondrialen DNA assoziiert.

Das MELAS-Syndrom (mitochondriale **M**yoopathie, **E**ncephalopathie, **L**aktatazidose and „**S**troke like episodes“) wird unter anderem durch eine heteroplasmische Punktmutation an Position 3243 (auf dem Gen für die tRNA für Leucin) auf der mitochondrialen DNA verursacht.

Der Nachweis der homoplasmischen Mutation an Position 11778 sowie der Nachweis der heteroplasmischen Mutation an Position 3243 in den einzelnen Cybridklonen erlaubte die Identifizierung erfolgreich transformierter Klone. Der Nachweis dieser Mutationen erfolgt mittels PCR und Enzymrestriktion. Die für die PCR verwendeten Primer, der entsprechende PCR-Ansatz sowie das zur Amplifikation verwendete PCR-Programm werden weiter unten beschrieben (siehe B.II.7 Polymerasekettenreaktion).

#### B.II.5.1 Enzymrestriktion für die LHON- Mutation an Position 11778

Die DNA-Restriktion wurde mit dem Restriktionsenzym **SfaN1** der Firma New England Biolabs durchgeführt.

Durchführung:

20µl des PCR-Produkts werden nach Zugabe von 5µl *aqua bidest.*, 3µl des Puffer NE3 und 2µl des Enzyms SfaN1 für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der

Inkubation und kurzer Abzentrifugation erfolgt die Auftrennung der Banden auf einem 1,5% Gel bei 110 V für 20- 25 Minuten.

Bei erfolgreichem Mutationsnachweis findet sich ausschließlich eine 200 Basenpaare lange Bande. Beim Wildtyp hingegen erfolgt eine Restriktion in zwei 105 und 95 Basenpaare umfassende Banden.

### B.II.5.2 Enzymrestriktion für die MELAS-Mutation an Position 3243

Für die DNA-Restriktion wurde das Restriktionsenzym **Bsp 120 I** der Firma Fermentas verwendet.

Durchführung:

20µl des PCR-Produkts werden sorgfältig mit 3µl B<sup>+</sup>-Puffer (BSA-haltig, 1:10 verdünnt), 2µl Bsp 120 I und 5 µl *aqua bidest.* vermischt und für drei-vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird der Ansatz kurz abzentrifugiert und anschließend auf einem 1,5% Agarose-Gel bei 110 V für 20-25 Minuten aufgetrennt. Bei positivem Mutationsnachweis finden sich neben der Wildtypbande mit 710 Basenpaaren zwei weitere Banden mit 474 und 236 Basenpaaren.

### B.II.6 DNA-Isolierung

Zur Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzanalyse (siehe unten) wurde DNA aus EDTA-Blut und Zellen isoliert.

Die Isolierung der DNA aus EDTA-Blut erfolgte nach einem in unserem Labor etablierten Protokoll.

Durchführung:

- 1) Je 10ml EDTA-Blut werden mit 40ml Erythrozyten-Lysepuffer (1 Liter- Ansatz: 8,29g Ammoniumchlorid, 1g Kaliumhydrogencarbonat, 400 µl einer 250mM EDTA- Lösung in 1l H<sub>2</sub>O) aufgefüllt und 10 Minuten im Gefrierfach gelagert. Die gekühlten Proben werden anschließend bei 1700 rpm (4°C) für 10 Minuten zentrifugiert.

- 2) Nach Abnahme des Überstandes und Zugabe von 30ml Erythrozyten-Lysepuffer werden die Proben bis zur vollständigen Lösung des Bodensatzes mit Hilfe eines Vortexers gemischt und für 10 Minuten im Gefrierfach gekühlt. Danach folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 1700 rpm (4°) für 10 Minuten.
- 3) Der Überstand wird verworfen, der Bodensatz mit 5ml 20% SDS-Puffer gemischt. Nach Zugabe von 500µl SDS-Puffer und von 10µl Proteinase K (20mg/ml) wird die Suspension gemischt bis eine Schaumkrone sichtbar wird. Die Proben werden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.
- 4) Am nächsten Tag werden die Proben nach Zugabe von 2,5ml einer 5M NaCl-Lösung erneut gut gemischt und bei 2300 rpm (4°C) für 10 Minuten abzentrifugiert.
- 5) Der Überstand der zentrifugierten Proben wird nun in neue Falkons transferiert, in welchen 15ml 100% Ethanol vorgelegt wurden (Überstand und Ethanol gründlich mischen). Das sichtbare DNA-Pellet wird aus dem Tube entnommen und mit 70% Ethanol aufgegossen.
- 6) Nach diesem Waschschrift wird die DNA vorsichtig aus dem Tube entnommen und bei Raumtemperatur abgedeckt getrocknet.
- 7) Das getrocknete DNA-Pellet wird in 250-1000µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C gelagert.
- 8) Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt in einem Photometer bei 260 nm. Hierzu werden 5µl DNA in 495µl H<sub>2</sub>O transferiert und in einer entsprechenden Küvette gemessen.

Die DNA-Gewinnung aus Zellen erfolgte unter Verwendung des DNA-Midi Kits von Qiagen.

Durchführung:

- 1) Das Zellpellet wird zunächst in 50-100µl des Resuspension-Puffer (P1) gelöst. Unter Zugabe von 200-400µl Lysis-Puffer (P2) werden die Zellen lysiert. Die Lysereaktion wird durch 150-300µl Neutralization-Puffer (P3) unterbrochen.

- 2) Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 Minuten wird der Überstand abgenommen und in 1ml 100% Ethanol für weitere 30 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert.
- 3) Nach Entfernung des Alkoholüberstandes und einem Waschschrift mit 1ml 70% Ethanol (bei 14.000rpm, 25 Minuten) wird das DNA-Pellet sorgfältig bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 40µl-100µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt wie oben beschrieben.

### B.II.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren, das der gezielten Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte dient, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden (Mullis und Faloona, 1987). Die Amplifikation der DNA erfolgt mit Hilfe sogenannter Oligonukleotidprimer. Diese kurzen, zu definierten DNA-Abschnitten komplementären DNA-Fragmente dienen als Start- und Stoppsignal für die DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase verlängert in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den Komplementärstrang einer durch Hitzedenaturierung einsträngigen DNA-Sequenz, so dass am Ende eines jeden PCR-Zyklus alle DNA-Moleküle wieder doppelsträngig vorliegen. Dieser PCR-Zyklus, bestehend aus der Hitzedenaturierung der DNA, der Anlagerung der Primer und entsprechender Verlängerung der Primersequenz durch die DNA-Polymerase, wird im Thermocycler bis zu 35x wiederholt. Die einzelnen Schritte der PCR sind temperaturabhängig. So erfolgt die Denaturierung der DNA bei Temperaturen zwischen 93-100° C, die Anlagerung (Annealing) der Primer bei 40-60°C und die Verlängerung der Primersequenz bei 72°C (Aktivitätsoptimum der DNA-Polymerase).

### B.II.7.1 Primerdesign:

#### Primer für die PCR zum Nachweis der D-Loop-Region auf der mtDNA

Die verwendeten Primer sind jeweils 20 Basenpaare lang und umfassen einen 191 Basenpaare langen Abschnitt der mitochondrialen DNA:

5' Sequenz der Primer 534 forward und 725 reverse (Invitrogen):

Primer 534 forward:	CCCCATACCCCGAACCAACC
Primer 725 reverse:	CCACTTGAGTGACCTTGCCC

#### Mutationsanalyse für die MELAS-Mutation

Im Rahmen der Mutationsanalyse für die MELAS 3243-Punktmutation wurden jeweils 16 Basenpaare lange Oligonukleotidprimer verwendet. Der amplifizierte DNA-Abschnitt auf dem Gen für die tRNA für Leucin umfasst 678 Basenpaare:

5' Sequenz der Primer ND1- forward und 16S-reverse (Invitrogen):

Primer ND1- forward:	CACAAGCTTCCCGATGGTGCAGCCGC
Primer 16s- reverse:	GGCTACTGCTCGTCGCAGTG

#### Mutationsanalyse für die LHON-Mutation

Die verwendeten Oligonukleotidprimer waren 18 und 22 Basenpaare lang. Der amplifizierte DNA-Abschnitt umfasst 178 Basenpaare.

5' Sequenz der Primer PCR-Link forward und PCR-Link reverse (Invitrogen):

Primer PCR- Link forward:	CCCCCTGAAGCTTCACCGG
Primer PCR- Link reverse:	CCAAGCTTCCATGGGGGGTAAGGCGAGGTTAGCG

#### Amplifikation der mitochondrialen 12S rRNA:

Für die Amplifikation und Sequenzierung der *mitochondrialen 12S rRNA* wurden drei Primerpaare ausgewählt.

Primerpaar 12S rRNA A umfasst einen 406 Basenpaare langen DNA-Abschnitt der 12s rRNA. Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind 22 und 24 Basenpaare lang.

5' Sequenz Primerpaar A (Invitrogen) (np: 581-603 und np: 987-964):

Primer 12S rRNA A forward:	TGTAGCTTACCTCCTCAAAGCA
Primer 12S rRNA A reverse:	TCAGGTGAGTTTTAGCTTTATTGG

Primerpaar B umfasst 414 Basenpaare. Die verwendeten Oligonukleotide sind 22 und 20 Basenpaare lang.

5' Sequenz Primerpaar B (Invitrogen) (np: 903-924 und np:1316-1297):

Primer 12S rRNA B forward:	TCACACGATTAACCCAAGTCAA
Primer 12S rRNA B reverse:	ACGTGGGTA CTTGCGCTTAC

Primerpaar C umfasst 442 Basenpaare. Die verwendeten Primer sind beide 20 Basenpaare lang.

5' Sequenz Primerpaar C (Invitrogen) (np: 1237-1256 und np: 1677-1659):

Primer 12S rRNA C for:	ACCACCTCTTGCTCAGCCTA
Primer 12S rRNA C rev:	GGTTTAGCTCAGAGCGGTCA

Zusätzlich wurde für 91 weitere Patienten ein weiteres Primerpaar verwendet, das der Amplifikation eines kleineren 697 Basenpaare umfassenden Teil der 12S rRNA diene. Die verwendeten Oligonukleotide waren jeweils 20 Basenpaare lang.

5' Sequenz Primerpaar D (Invitrogen):

12s rRNA D forward:	GGCTCACATCACCCCATAAA
12s rRNA D reverse:	GCAGAAATGCACCCATGAAC

### B.II.7.2 PCR-Bedingungen

Für sämtliche PCRs wurden 10x Puffer, Q-Solution, Magnesiumchlorid und Taq-Polymerase von Qiagen verwendet (siehe Material B.I.2). Die Primer wurden, wie bereits im Labor etabliert, in einer Konzentration von 100 pM eingesetzt.

#### PCR-Ansatz (50µl) für die D-Loop- PCR (Evaluation des Rho<sup>0</sup>-Status)

<i>Reagenz</i>	<i>Eingesetzte Menge</i>
10x Puffer	5µl
dNTPs 10mM	1µl
MgCl <sub>2</sub>	1µl
Primer (100pM) je	1,25µl
Taq-Polymerase	0,3µl
dH <sub>2</sub> O	40,2µl

#### PCR-Ansatz (50µl) für die LHON-Mutationsanalyse an Position 11778

<i>Reagenz</i>	<i>Eingesetzte Menge</i>
10x Puffer	10µl
dNTPs 10mM	1µl
MgCl <sub>2</sub>	1µl
Primer (100pM) je	1,25µl
Taq-Polymerase	0,3µl
DNA (50ng/µl)	1µl
dH <sub>2</sub> O	35,5µl

#### PCR-Ansatz (50µl) für die MELAS-Mutationsanalyse an Position 3243 (tRNA für Leucin):

<i>Reagenz</i>	<i>Eingesetzte Menge</i>
10x Puffer	5µl
dNTPs (10mM)	1µl
MgCl <sub>2</sub>	1µl
Primer (100pM) je	1,25µl
Taq-Polymerase	0,3µl
DNA (50ng/µl)	1µl
dH <sub>2</sub> O	40,2µl

### PCR-Ansatz (50µl) für die Amplifikation der 12S rRNA:

<i>Reagenz</i>	<i>Eingesetzte Menge</i>
10x Puffer	5µl
dNTPs (10mM)	1µl
Q- Solution	10µl
Primer (je)	1,25µl
Taq-Polymerase	0,3µl
DNA (50µM)	1µl
dH <sub>2</sub> O	30,2µl

Festlegung der Annealing-Temperatur:

Entscheidend für die Spezifität der PCR ist die Festlegung der optimalen Annealing-Temperatur für die verwendeten Primer. Diese liegt idealerweise 3-5°C unter der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers. Die Schmelztemperatur eines Primers kann mit Hilfe folgender Formel abgeschätzt werden:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$$

Für die hier verwendeten Primer wurde die Amplifikation für einen Temperaturgradienten von 50°C–60°C getestet. Das beste Amplifikationsergebnis fand sich für die Primer 534for und 725rev bei 55°C, für PCR-Link for und rev bei 59°C, für die Primer ND1for und 16srev bei 50°C, für die Primerpaare A-C bei einer Annealing-Temperatur von 51°C. Für das Primerpaar D lag die optimale Annealing-Temperatur bei 55 °C.

### B.II.7.3 PCR-Programme

Für sämtliche PCR-Reaktionen wurde ein 96 well-Thermocycler der Firma MJ Research verwendet.

Die Amplifikation des mitochondrialen D-Loop-Abschnitts erfolgte mit folgendem PCR-Programm:

- I) 94°C 5 Minuten
  - II) 94°C 1 Minute
  - III) 55°C 1 Minute
  - IV) 72°C 1 Minute
- (Schritt II bis IV insgesamt 35 Zyklen)
- V) 72°C 10 Minuten

Das PCR-Programm zur Amplifikation des mtDNA-Abschnitts mit der LHON-Mutation 11778 war:

- I) 93°C 5 Minuten
  - II) 93°C 1 Minute
  - III) 59°C 1 Minute
  - IV) 72°C 1 Minute
- (Schritt II bis IV insgesamt 35 Zyklen)
- V) 72°C 5 Minuten

PCR-Programm: tRNA für Leucin:

I) 93°C 5 Minuten

II) 93°C 1 Minute

III) 50°C 1 Minute

IV) 72°C 1 Minute

(Schritt II-IV insgesamt 35 Zyklen)

V) 72°C 5 Minuten

VI) 4°C forever

Die DNA-Amplifikation mit den Primerpaaren 12s rRNA A-C erfolgte nach folgendem PCR-Protokoll:

I) 94°C 5 Minuten

II) 94°C 30 Sekunden

III) 51°C 30 Sekunden

IV) 72°C 30 Sekunden

(Schritt II-IV insgesamt 35 Zyklen)

V) 72°C 10 Minuten

VI) 4°C forever

(Bei Verwendung der HotStar-Tag-Polymerase von Qiagen verlängerte sich der (Denaturierungsschritt I) von 5 Minuten auf 10 Minuten.)

Für die Primerpaar D wurde folgendes PCR-Programm gewählt:

I) 94°C 5 Minuten

II) 94°C 30 Sekunden

III) 55°C 30 Sekunden

IV) 72°C 30 Sekunden

(Schritt II-IV insgesamt 35 Zyklen)

V) 72°C 10 Minuten

VI) 4°C forever

### B.II.7.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente dient der Entfernung von überschüssigen Nukleotiden, Salzen, Primern und Polymerasen. Hierzu wurde der „Qiaquick PCR Purifikation KIT“ von Qiagen verwendet (siehe Material), der für die Aufreinigung die selektiven Bindungseigenschaften von Silikamembranen nutzt. In

Gegenwart hoher Salzkonzentrationen erfolgt die Bindung der DNA an die Membran, während andere unerwünschte Bestandteile die Membran passieren können.

Die aufgereinigten PCR-Produkte werden abschließend in *aqua bidest.* (ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert und zum Schutz vor einer möglichen Degradierung der DNA bei – 20°C gelagert.

### B.II.8 Thermozyklische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der aufgereinigten Amplifikate erfolgte nach der 1977 von Sanger *et al.* erstmals beschriebenen Methode. Eine Polymerase verlängert mit Hilfe der vier bekannten dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) die entsprechenden Primer. Zusätzlich enthält der Sequenzieransatz sogenannte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs), die unterschiedlich farblich markiert sind und bei Einbau zum Abbruch der Sequenzierreaktion führen. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die jeweils mit dem zuletzt eingebauten ddNTP enden. Die im Thermocycler während der Sequenzierung ablaufenden Reaktionen ähneln im Prinzip den drei Reaktionsschritten der PCR. Zunächst folgt ein Denaturierungsschritt, dem die Anlagerung des Primers folgt (der Sequenzieransatz enthält jeweils nur einen Primer, entweder den Primer der for- Sequenz oder den Primer der rev-Sequenz). Die Elongation der Sequenz durch die Polymerase erfolgt dann jeweils bis zum Einbau des Stopp-ddNTP.

#### B.II.8.1. Sequenzieransatz

Für die Sequenzierung wurde das „ Big dye Terminator Kit 3.1“ von Applied Biosystems (siehe Material) verwendet. Der Big Dye Mix enthält bereits die für die

Sequenzierreaktion benötigten farblich markierten dNTPs, ddNTPs und eine Polymerase. Die Primer wurden jeweils einzeln in die Reaktion eingesetzt.

### Sequenzieransatz I (10µl):

Amplifikat (aufgereinigt)	5µl
Big Dye Mix	2µl
dH <sub>2</sub> O	2µl
Primer 100pM	1µl

### Sequenzieransatz II (5µl):

Amplifikat (aufgereinigt)	3µl
Big Dye Mix	1µl
Primer 100pM	1µl

### B.II.8.2 Sequenzierprogramm

Die Sequenzierreaktion wurde wieder mit Hilfe eines Thermocyclers (PTC 200/MJ research) mit folgendem Programm durchgeführt:

SEQ-E:

- I) 96°C 1 Minute
- II) 96°C 5 Sekunden
- III) 60°C 1, 30 Minuten
- IV) 50°C 1,30 Minuten

( Schritt II bis IV insgesamt 25 Zyklen)

- V) 4°C forever

### B.II.8.3 Ethanol-Fällung der Sequenzierprodukte

Die Sequenzierprodukte wurden mit einer Ethanol-fällung aufgereinigt. Die Fällung erfolgte in 96well- PCR- Platten in einer Heraeus-Zentrifuge (siehe Material) nach folgendem Protokoll.

Durchführung:

10 (5) $\mu$ l Sequenzierprodukt werden mit 50 (25) $\mu$ l einer 80% Ethanollösung bei 3000g für 25 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen, die Sequenzierprodukte erneut mit 50 $\mu$ l einer 70% Ethanollösung bei 2000g für 20

Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen. Abschließend folgt zur vollständigen Entfernung der Alkoholreste ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die Platte wird auf dem Kopf stehend für 30 Sekunden bei 600g abzentrifugiert und dann bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Sequenzen werden dann in 30 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O resuspendiert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert.

### B.II.9 Elektrophoresetechniken

#### B.II.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in einem 1,5% Agarosegel (1,5g Agarose in 100ml 1x TBE-Puffer) unter Zugabe von 0,5% Ethidiumbromid. Das Gel wurde mit jeweils 9 $\mu$ l Produkt pro Tasche geladen (7 $\mu$ l DNA + 2 $\mu$ l Ladepuffer (Blaumarker)). Die Auftrennung der Banden erfolgte dann bei einer Spannung von 110mV für circa 20-25 Minuten. Die resultierenden Banden wurden unter UV-Licht identifiziert. Als Standardmarker wurde pBR322 DNA-Msp I Digest von Fermentas verwendet (67-622 Basenpaare).

#### B.II.9.2 Kapillar-Gelelektrophorese

Zur Sequenzanalyse wurden ein Einkapillarsequenzier und ein 96-Kapillarsequenzier der Firma ABI-Prism verwendet. Zugrunde liegendes Prinzip der Sequenzanalyse ist die Kombination eines Elektrophoreseverfahrens mit einem Fluoreszenz-Detektionssystem. Die unterschiedlich langen, verschieden farblich markierten Amplifikate werden nach Anlage einer Spannung entlang einer Gel gefüllten Kapillare der Länge nach aufgetrennt vorbei an einem Argonlaser, der den jeweils das

Amplifikat beendenden Fluoreszenzfarbstoff identifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Sequenzanalyse-Programms Staden Package.

### B.II.10. Analyse mitochondrialer Translationsprodukte

Die Untersuchungen zur mitochondrialen Proteintranslation wurden in Zusammenarbeit mit der GSF in Neuherberg nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Markierung der Zellen:

- 1) Zellkulturen 2x mit 1x PBS spülen
- 2) Zellkulturen einmal mit Met-freiem RPMI-Medium spülen
- 3) Zellen für insgesamt sieben Minuten in 500µl Met-freiem Medium (+ Emetine 100µg/ml fc.) inkubieren
- 4) [<sup>35</sup>S]Met in einer Konzentration von 200µCi/ml hinzufügen
- 5) Zellkulturen 30 Minuten bei 37°C inkubieren
- 6) 500µl Met-haltiges RPMI- Medium hinzufügen und für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubieren
- 7) Zellkulturen 2x mit 1x PBS spülen
- 8) Zellen mit 1x PBS und 1mM EDTA bei 37°C für 5 Minuten ablösen lassen
- 9) Zellen bei 600g für 10 Minuten abzentrifugieren.
- 10) Zellen in 100µl 1x PBS resuspendieren

Bestimmung der Proteinkonzentration:

- 1) 10µl der einzelnen Zellsuspensionen abpipettieren
- 2) 50µl einer 6% NaOH-Lösungen hinzufügen und gründlich mischen
- 3) 740µl Wasser zu den einzelnen Lösungen hinzufügen
- 4) 200µl der Bradford Reagenz hinzufügen
- 5) Für 10 Minuten auf der Arbeitsbank ruhen lassen
- 6) Proteinkonzentrationen bei 595 nm messen

Durchbrechen der Zellmembranen:

- 1) 5µl RQ1 Dnase hinzufügen
- 2) Auf Eis für eine Minute mit Ultraschall behandeln (31%)

Proteinanalyse:

- 1) 20µl einer 6x Blue Dye Lösung zu den Proben hinzupipettieren

- 2) Beladung eines 10-20% Polyacrylamidgels mit etwa 80µg Gesamtprotein
- 3) Elektrophoretische Auftrennung bei 100-200 V
- 4) Trocknung des Polyacrylamidgels auf „Whatman“ Papier
- 5) Markierung der MW- Marker mit [<sup>35</sup>S]Marker
- 6) Gel auf mit Hilfe einer Bioimager Platte auswerten

### **B.II.11 Mitochondriale Vergleichsdatenbanken**

#### **B.II.11.1 MITOKOR**

Die Mitokor Datenbank setzt sich aus einem Kollektiv von 1349 ethnisch verschiedener Kontrollpersonen zusammen, deren mitochondriales Genom vollständig sequenziert wurde. Insgesamt 560 Genome sind öffentlich zugänglich (Herrnstadt *et al.*, 2002). Die Häufigkeit der in unseren Patienten gefundenen Veränderungen der 12S rRNA wurden in 1349 Mitokor-Proben untersucht.

#### **B.II.11.2 Human Mitochondrial Genome Database**

Diese Datenbank stellt eine umfassende Sammlung menschlicher mitochondrialer Genome zur Verfügung. Insgesamt sind 2487 Sequenzen öffentlich zugänglich und beinhaltet die 560 Genome, die von Herrnstadt *et al.*, 2002 veröffentlicht wurden. Die Datenbank ist unter <http://www.genpat.uu.se/mtDB/index.html> im Internet zugänglich.

**C. Ergebnisse**

**C.I. Sequenzanalyse der 12S rRNA**

**C.I.1. Auswahl der analysierten Patienten– DNAs**

In Zusammenarbeit mit der Schwindelambulanz der Neurologischen Klinik wurden insgesamt 53 Patienten mit der gesicherten Diagnose einer bilateralen Vestibulopathie und bei entsprechender Anamnese deren Angehörige für die molekulargenetische Untersuchung der mitochondrialen 12S rRNA rekrutiert. Insgesamt 14 Patienten der 53 Patienten hatten eine mit einer Aminoglykosidexposition assoziierte bilaterale Vestibulopathie, die übrigen 39 Patienten waren ohne eine frühere Aminoglykosidbehandlung erkrankt. Tabelle C1 bietet eine Übersicht über die eingeschlossenen Patienten.

Patient	Sex	Alter	Gangunsicherheit	Oszillopsien	Hörminderung	Tinnitus	Halmagy	Aminoglykosidexposition	FA
1	m	55	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
2	m	57	ja	ja	ja	ja	bds. pathologisch	nein	negativ
3	m	39	ja	ja	nein	ja	bds. pathologisch	nein	negativ
4	f	65	ja	nein	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
5	m	45	ja	ja	nein	ja	bds. pathologisch	nein	negativ
6	f	79	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
7	m	63	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
8	m	87	ja	nein	ja	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
9	m	82	ja	nein	ja	ja	bds. pathologisch	nein	negativ
10	f	60	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	nein	positiv
11	m	57	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
12	m	56	ja	nein	ja	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
13	m	58	ja	nein	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
14	m	71	ja	ja	nein	ja	bds. pathologisch	nein	negativ
15	m	51	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
16	m	59	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
17	m	69	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
18	f	85	ja	nein	ja	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
19	m	54	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
20	m	76	ja	ja	ja	ja	bds. pathologisch	ja	negativ
21	m	79	ja	nein	ja	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
22	f	53	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
23	m	43	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	nein	positiv
24	f	88	ja	nein	nein	ja	bds. pathologisch	nein	negativ
25	m	55	nein	nein	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
26	m	66	ja	nein	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
27	m	53	ja	nein	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
28	m	67	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	nein	negativ
29	f	67	ja	ja	nein	nein	bds. pathologisch	ja	negativ
30	m	58	ja	ja	ja	ja	bds. pathologisch	nein	positiv
31	m	63	ja	nein	nein	nein	bds.intakt	nein	negativ

## Ergebnisse

32	m	70	ja	nein	ja	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
33	m	54	ja	ja	ja	ja	bds.pathologisch	nein	negativ
34	f	83	ja	nein	nein	nein	bds.intakt	ja	negativ
35	m	33	ja	ja	nein	nein	bds.intakt	nein	negativ
36	m	79	ja	nein	nein	ja	bds.pathologisch	nein	negativ
37	m	53	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
38	m	65	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
39	m	58	ja	ja	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
40	f	68	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	ja	negativ
41	f	84	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
42	m	68	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
43	m	85	ja	nein	ja	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
44	m	53	ja	ja	ja	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
45	m	50	ja	ja	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
46	m	83	ja	nein	nein	ja	bds.pathologisch	ja	negativ
47	m	76	ja	ja	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
48	f	57	ja	ja	ja	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
49	f	86	ja	ja	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
50	f	88	ja	nein	ja	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
51	f	73	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
52	m	65	ja	nein	nein	nein	bds.pathologisch	nein	negativ
53	f	23	ja	nein	ja	nein	bds.pathologisch	nein	positiv

Tabelle C1. Liste der analysierten Patienten

### C.I.2. Mutationsanalyse im Patientenkollektiv

Die mitochondriale 12S rRNA (np: 648- 1601) wurde mit Hilfe von drei Primerpaaren analysiert. Insgesamt hatten 14 Patienten (26,4%) Aminoglykoside erhalten. Nur zwei dieser Patienten hatten im Verlauf zusätzlich eine Hörstörung entwickelt; bei einem dieser Patienten konnte eine C960del-Sequenzänderung auf der mitochondrialen 12S rRNA identifiziert werden. Alle untersuchten Patienten zeigten im Vergleich zur Cambridgesequenz einen Basenaustausch an Position 750 (A->G) und 1438 (A->G). Hierbei handelt es sich jeweils um seltene Polymorphismen in der Cambridgesequenz. In der Sequenzanalyse der 53 Patientenproben fanden sich drei bereits bekannte Polymorphismen (G709A, G930A und T1189C) und sieben seltene homoplasmische nicht codierende Sequenzänderungen (Tabelle C2); drei dieser Sequenzänderungen (T669C, C960ins und C960del) wurden bislang noch nicht in Mitomap beschrieben.

## Ergebnisse

Basenaustausch	Patient	bekannt	Pilotenkollektiv	Parkinsonpatienten	Mitokor	mtDB
T669C	49	-	0/155	0/91	1/1349	1/2478
T961G	10,53	+	0/155	2/91	8/1349	5/2478
C960del	20	-	0/155	0/91	3/1349	n.a.
G951A	20	+	0/155	1/91	9/1349	8/2478
C960ins	36	-	1/155	0/91	10/1349	n.a.
G1007A	12	+	0/155	0/91	5/1349	3/2478
T1243C	30	+	5/155	0/91	16/1349	56/2478

Tabelle C2. Patienten mit nicht codierenden 12S rRNA Nukleotidänderungen und deren Häufigkeit in Mitokor und mtDB.

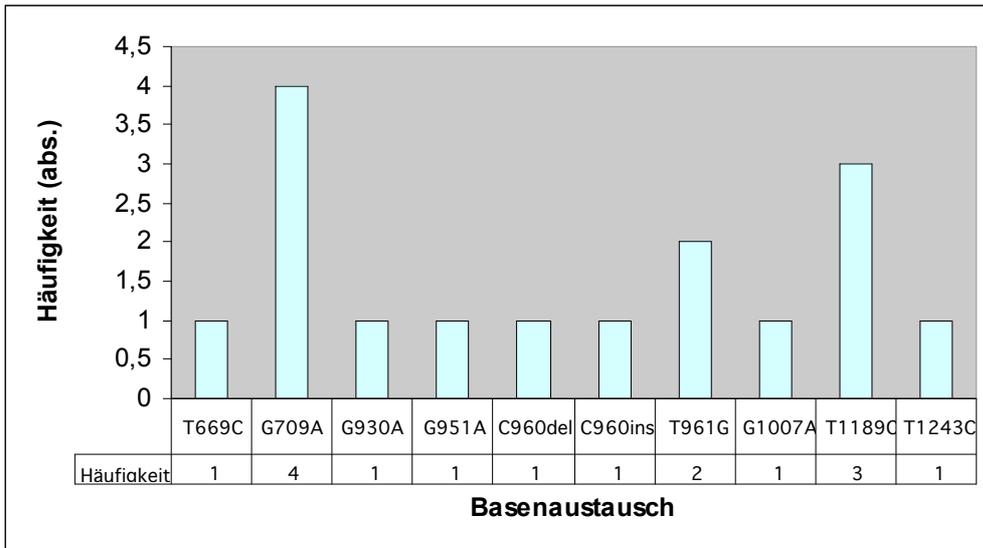
Tabelle C3 bietet einen Überblick die Verteilung sämtlicher im Patientenkollektiv gefundener Sequenzänderungen der 12S rRNA. Die Mutationen T1095C, C1494T und A1555G, die in der Literatur (Wang *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2004 und Casano *et al.*, 1998) als prädisponierende Mutationen für eine Aminoglykosid-assoziierte Taubheit beschrieben wurden, wurden weder bei den untersuchten Patienten noch bei den Kontrollen gefunden.

BASENAUSTAUSCH	PATIENTENNUMMER	REFERENZEN
<b>669C</b>	49	nicht beschrieben
<b>G709A</b>	4, 6, 30, 33	Häufiger Polymorphismus (Bacino <i>et al.</i> , 1995, Chagnon <i>et al.</i> , 1999, Finnila <i>et al.</i> , 2001)
<b>G930A</b>	33	Polymorphismus (Prezant <i>et al.</i> , 1993)
<b>G951A</b>	20	seltener Polymorphismus (Rieder <i>et al.</i> , 1998)
<b>C960del</b>	20	nicht beschrieben
<b>C960ins</b>	36	nicht beschrieben
<b>T961G</b>	10, 53 (Verwandte I. Grades)	Polymorphismus (Shoffner <i>et al.</i> , 1993, Ozawa <i>et al.</i> , 1995, Bacino <i>et al.</i> , 1995, Casano <i>et al.</i> , 1999, Fischel-Ghodsian 1999, Yoshida <i>et al.</i> , 2002, Li <i>et al.</i> , 2004, Zhao <i>et al.</i> , 2004)
<b>G1007A</b>	12	Polymorphismus (Semino <i>et al.</i> , 2000)
<b>T1189C</b>	1, 13, 37	bekannter Polymorphismus (Rieder <i>et al.</i> , 1998, Finnila <i>et al.</i> , 2001)
<b>T1243C</b>	30	Mutation assoziiert mit Pankreaskarzinom (Bacino <i>et al.</i> , 1995, Schwartz 1999)

Tabelle C3. Mutationen im Patientenkollektiv

## Ergebnisse

Insgesamt konnten im untersuchten Kollektiv zehn verschiedene Sequenzänderungen gefunden werden: a) *T669C*, b) *G709A*, c) *G930A*, d) *G951A*, e) *C960del*, f) *C961ins*, g) *T961G*, h) *G1007A*, i) *T1189C* und j) *T1243C*. Die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Sequenzänderungen können Grafik CI entnommen werden.



Grafik C1: Absolute Häufigkeiten der einzelnen 12S rRNA- Mutationen im Patientenkollektiv

### **C.I.3 Sequenzanalyse der Kontrollgruppen**

#### **C.I.3.1 Kontrollgruppe–Sportpiloten**

In diesem Kollektiv wurde die 12S rRNA von insgesamt 155 Sportpiloten untersucht, deren vestibuläre Funktion in jährlichen und verpflichtenden Flugtauglichkeitsprüfungen überprüft wurde. Die eingeschlossenen Probanden hatten alle ihr schriftliches Einverständnis zu anonymisiert durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen gegeben, weswegen sämtliche Informationen, die eine retrospektive Identifizierung einzelner Proben ermöglichen, nicht gespeichert wurden. Alle Probanden (143 männliche Probanden, sechs weibliche Probandinnen und sechs weitere Probanden mit unbekanntem Geschlecht) durchliefen eine sorgfältige vestibuläre Testung mittels kalorischer Spülung und rotatorischer Testung und hatten nachweislich kein vestibuläres Defizit. Diese Kontrollen wurden uns freundlicherweise vom Institut für Humangenetik der GSF in Neuherberg zur Verfügung gestellt. Die PCR- und Sequenzanalyse wurde wiederum mit den Primerpaaren A, B und C (vgl. B.II.7.1) unter Verwendung der Hotstar-Taq-Polymerase für die PCR-Reaktion durchgeführt .

##### **C.I.3.1.1. Mutationsanalyse in der Gruppe der Sportpiloten**

In der Gruppe der 155 Sportpiloten konnten insgesamt 24 verschiedene Sequenzänderungen in 55 Proben gefunden werden.

- 1) T634C, 2) A663G, 3) T669C, 4) G709A, 5) G709hetero 6) T721C,
- 7) A723C, 8) A745G, 9) G750A, 10) G769A, 11) T789C, 12) G930A,
- 13) C960ins, 14) delT961Cn, 15) G1018A, 16) T1189C, 17) T1243C,
- 18) C1290T, 19) T1406C, 20) T1438A, 21) G1462A, 22) T1520C,
- 23) C1619T, 24) T1646C.

Die Mutationen T634C, C1619T und T1646C befinden sich außerhalb der 12S rRNA (np 648- 1601) und wurden deshalb in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

## Ergebnisse

Bei sechs Patienten fand sich eine delT961Cn. Dies führte zu einer Sequenzänderung von – CACCCCCTCCCC - zu - CACCCCCCCCCCCC -. Nach diesen zwölf „C“ kam es in allen betroffenen Proben zum Sequenzabbruch. Im Bereich der Region um das Basenpaar 961 fanden sich sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe verschiedene interessante Veränderungen der 12S rRNA-Sequenz im Vergleich zur Cambridge-Sequenz. Diese sind zusammenfassend in Abbildung C2 dargestellt.

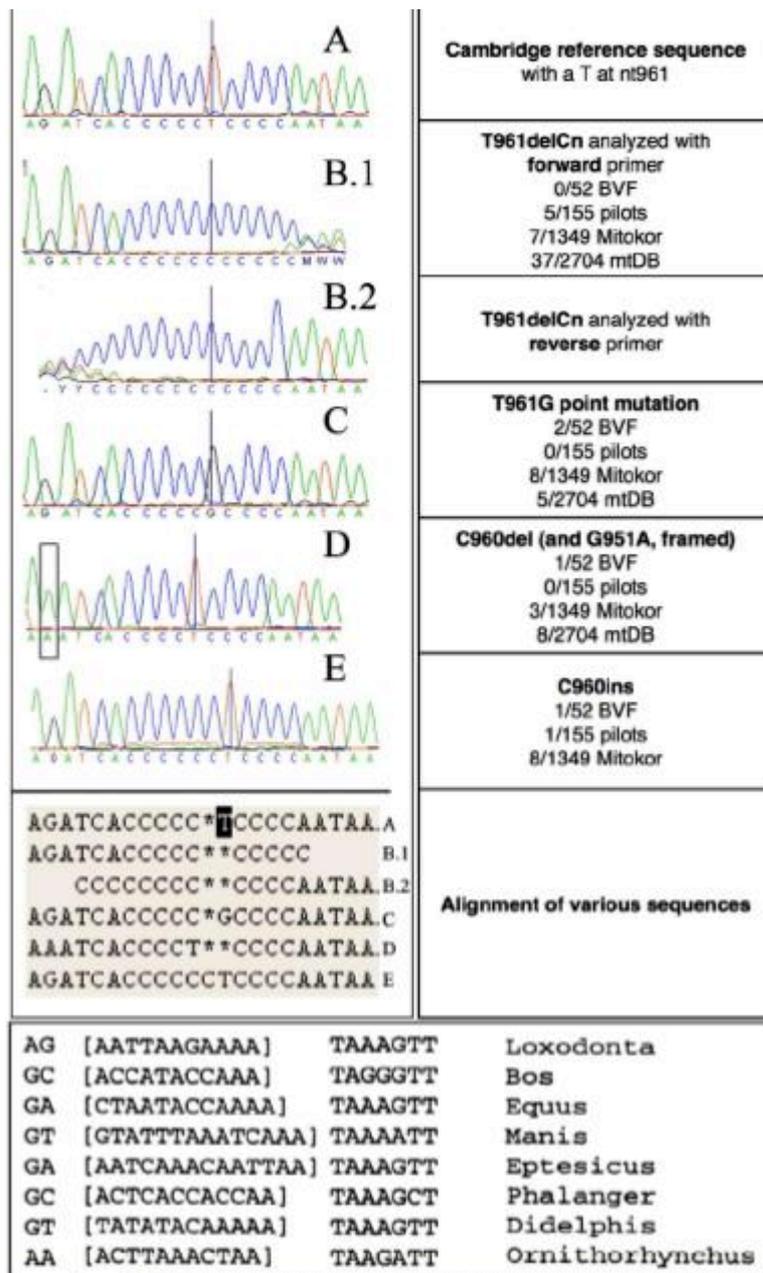


Abbildung C2 (A) Originalsequenz laut Cambridgesequenz. (B1) und (B2): Tdel961Cn sequenziert mit dem Forward- und Reverseprimer. (C) T961G. (D) C960del und G951A (eingerahmt). (E) C961ins.

## Ergebnisse

Häufigkeit und Verteilung der einzelnen Sequenzänderungen im Kontrollkollektiv können Tabelle C4 und C5 entnommen werden.

BASENAUSTAUSCH	PATIENTENNUMMER	REFERENZEN
A663G	19736	Polymorphismus (Hutchin <i>et al.</i> , 1993, Ikebe <i>et al.</i> , 1995, Kim <i>et al.</i> , 2002)
G709A	19729, 19731, 19735, 19737, 19738, 19743, 19744, 19750, 19758, 19765, 19789, 19796, 19872, 19892, 19893, 19894, 19924, 19928, 19932, 19938, 19943, 19976, 19978, 19979, 19981, 19987, 19990, 19999, 20029, 20033, 20036, 20038, 20046, 20047	Häufiger Polymorphismus (Bacino <i>et al.</i> , 1995, Chagnon <i>et al.</i> , 1999, Finnila <i>et al.</i> , 2001)
T721C	19764, 19767	Brown <i>et al.</i> , 1996
A723C	19788, 19888,	Polymorphismus (Pogozelski <i>et al.</i> , 2003)
A745G	20002	Limongelli <i>et al.</i> , 2004
G750A	19876, 19945	seltener Polymorphismus der Cambridge-Sequenz
G769A	19742, 20022	Polymorphismus (Greenberg <i>et al.</i> , 1985, Moraes <i>et al.</i> , 1993, Prezant <i>et al.</i> , 1993)
T789C	19787	Finnila <i>et al.</i> , 2001
G930A	19737, 19738, 19743, 19758, 19765, 19872, 19894, 19924, 19928, 19979, 19987, 20033, 20046, 20047	Polymorphismus (Prezant <i>et al.</i> , 1993)
delT961Cins (Sequenz abgebrochen)	19772, 19739, 19808, 19934, 19984	assoziiert mit mitochondrial vererbter Taubheit (Bacino <i>et Prezant</i> 1995, Casano <i>et al.</i> , 1999)
C961ins	19994	
G1018A	20022	Polymorphismus (Moraes <i>et al.</i> , 1993, Prezant <i>et al.</i> , 1993)
T1189C	19884	Polymorphismus (Rieder <i>et al.</i> , 1998, Finnila <i>et al.</i> , 2001)
T1243C	19731, 19893, 19976, 19990, 20038	Mutation assoziiert mit Pankreaskarzinom (Bacino <i>et al.</i> , 1995, Schwartz 1999)
C1290T	20049	nicht beschrieben
T1406C	20038	Basenaustausch in Patienten mit Pankreaskarzinomen beschrieben (Jones <i>et al.</i> , 2001)
T1438A	19876, 19945	seltener Polymorphismus der Cambridgesequenz
G1462A	19942, 20042	Polymorphismus lt. Mitomap
T1520C	19935	nicht beschrieben

Tabelle C4. Übersicht über Sequenzänderungen bei den gesunden Kontrollen

## Ergebnisse

Basenaustausch	Häufigkeit	Patienten
A663G	1x	19736
G709A	15x	19729, 19735, 19744, 19750, 19789, 19796, 19892, 19932, 19938, 19943, 19978, 19981, 19999, 20029, 20036
G709A+ G930A	14x	19737, 19738, 19743, 19758, 19765, 19872, 19894, 19924, 19928, 19979, 19987, 20033, 20046, 20047
G709A+ T1243C	4x	19731, 19893, 19976, 19990
G709A+ T1243C+ T1406C	1x	20038
T721C	2x	19764, 19767
A723C	2x	19788, 19888
G750A + T1438A	2x	19876, 19945
G769A	1x	19742
G769A + G1018A	1x	20022
T789C	1x	19787
DelT961Cins	5x	19772, 19739, 19808, 19934, 19984
C961ins	1x	19994
T1189C	1x	19884
C1290T	1x	20049
G1462A	2x	19942, 20042
T1520C	1x	19935

Tabelle C5. Übersicht über die absolute Häufigkeit der Sequenzänderungen und Haplotypen

### C.I.3.2 Sequenzierung der 12S rRNA bei Kontrollprobanden mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Beeinträchtigung des Vestibularorgans

Angesichts der hohen Variabilität um Basenpaar 960 und 961 der mitochondrialen 12S rRNA in den untersuchten Kollektiven, wurde eine weitere Gruppe von 91 Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Beeinträchtigung des Vestibularorgans, die ihr schriftliches Einverständnis für molekulargenetische Untersuchungen gegeben hatten, in einem kleineren, diese Region umfassenden Bereich der 12S rRNA (np 626-1323) nachuntersucht. Hierzu wurde ein viertes Primerpaar D (siehe Material und Methoden, B.II.7.1) verwendet.

### C.I.3.2.1. Auswahl der Kontrollprobanden mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Beeinträchtigung des Vestibularorgans

In diesem Kollektiv wurde die DNA von 91 Patienten untersucht, die sich in der neurogenetischen Ambulanz oder der Ambulanz für Bewegungsstörungen vorgestellt und deren Grunderkrankung nicht mit einer Erkrankung des Vestibularorgans vergesellschaftet war. Anamnestisch fanden sich bei keinem der eingeschlossenen Patienten der Hinweis auf eine Affektion des Vestibularorgans.

Patientennummer	Alter	Geschlecht	Diagnose/Klinik
1	60	m	Parkinsonsyndrom
2	37	m	Parkinsonsyndrom
3	32	m	Parkinsonsyndrom
4	40	m	Parkinsonsyndrom
5	40	f	Parkinsonsyndrom
6	67	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
7	80	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
8	77	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
9	65	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
10	94	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
11	85	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
12	67	m	Amytrophe Lateralsklerose
13	41	f	Parkinsonsyndrom
14	84	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
15	83	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
16	83	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
17	73	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
18	83	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
19	63	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
20	65	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
21	86	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
22	86	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
23	63	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
24	28	f	Parkinsonsyndrom
25	68	m	Parkinsonsyndrom
26	38	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
27	84	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
28	48	f	Multiple Sklerose
29	55	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
30	54	f	Parkinsonsyndrom
31	84	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
32	47	f	Myotone Dystrophie
33	22	f	Myotone Dystrophie
34	58	m	Multisystematrophie
35	56	m	noch nicht diagnostiziert
36	66	m	FTD
37	49	m	HNPP
38	77	m	Essentieller Tremor
39	37	m	Myotonia congenita Thomsen
40	53	m	Chorea Huntington
41	56	f	HNPP

## Ergebnisse

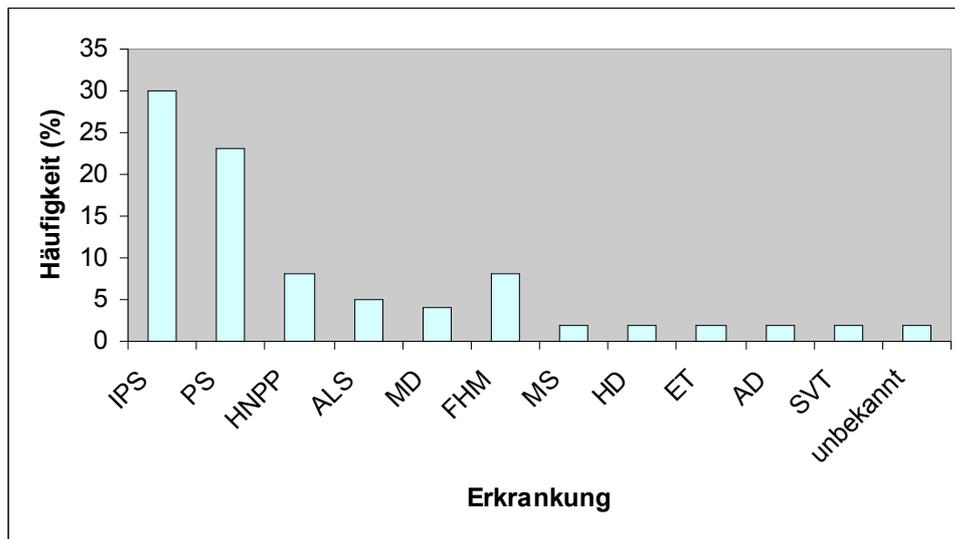
42	27	m	HNPP
43	76	m	Amyotrophe Lateralsklerose
44	44	f	HNPP
45	24	m	Spastische Spinalparalyse
46	102	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
47	60	f	Parkinsonsyndrom
48	67	m	Parkinsonsyndrom
49	69	f	Amyotrophe Lateralsklerose
50	67	f	Parkinsonsyndrom
51	77	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
52	45	f	Parkinsonsyndrom
53	55	f	Parkinsonsyndrom
54	50	m	Parkinsonsyndrom
55	66	m	Parkinsonsyndrom
56	61	m	HNPP
57	81	m	CMT
58	69	m	Parkinsonsyndrom
59	63	f	Myotone Dystrophie
60	39	m	HNPP
61	71	m	AD
62	71	m	Amyotrophe Lateralsklerose
63	70	m	Amyotrophe Lateralsklerose
64		m	Sinusvenenthrombose
65	77	m	AD
66	77	f	Sinusvenenthrombose
67	11	m	Myotone Dystrophie
68	50	f	Multiple Sklerose
69	71	m	Essentieller Tremor
70	70	f	Familiäre hemiplegische Migräne
71	47	f	Familiäre hemiplegische Migräne
72	34	f	noch nicht diagnostiziert
73	65	m	Familiäre hemiplegische Migräne
74	66	f	Familiäre hemiplegische Migräne
75		f	Familiäre hemiplegische Migräne
76	43	m	Familiäre hemiplegische Migräne
77	56	f	Familiäre hemiplegische Migräne
78	64	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
79	52	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
80	54	m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
81		m	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
82	43	m	Parkinsonsyndrom
83	28	m	HNPP
84	64	f	Parkinsonsyndrom
85	66	m	Parkinsonsyndrom
86	49	m	Parkinsonsyndrom
87	68	f	Chorea Huntington
88	27	m	Carpaltunnelsyndrom
89	62	m	CADASIL
90	51	f	Multiple Cavernome
91	82	f	Idiopathisches Parkinsonsyndrom

Tabelle C6. Liste der analysierten Patienten

27 Patienten waren an einem idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS), weitere 21 Patienten an einem noch nicht weiter eingeordneten Parkinsonsyndrom (PS) erkrankt. Sieben Patienten litten an einer hereditären Neuropathie mit Neigung zu

Druckpareesen (HNPP), fünf Patienten an einer Amytrophen Lateralsklerose (ALS), vier Patienten an einer myotonen Dystrophie (MD), sieben Patienten an einer familiären hemiplegischen Migräne (FHM), zwei Patienten an einer Multiplen Sklerose (MS), zwei Patienten an einer Chorea Huntington (HD), zwei an einem essentiellen Tremor (ET), zwei Patienten an einer Alzheimer-Demenz (AD). Je ein weiterer Patient war an einer Myotonia congenita Thomsen, an einer frontotemporalen Demenz (FTD), einer Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie, an einem CADASIL-Syndrom und einem Carpaltunnelsyndrom (CTS), einer Multisystematrophie (MSA) und einer spastischen Spinalparalyse (SSP) erkrankt. Bei einem weiteren Patienten fanden sich multiple Cavernome (MC), zwei Patienten waren an einer Sinusvenenthrombose erkrankt. Bei zwei Patienten war zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine endgültige Diagnose gestellt.

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Erkrankungen kann Grafik C2 entnommen werden. Berücksichtigt wurden ausschließlich Krankheitsbilder, die häufiger als einmal in der Kontrollgruppe vertreten waren.



Grafik C2 . Prozentuale Verteilung der Krankheitsbilder bei Kontrollprobanden

C.I.3.2.2. Analyse der 12S rRNA-Sequenzänderungen bei Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Beeinträchtigung des Vestibularorgans

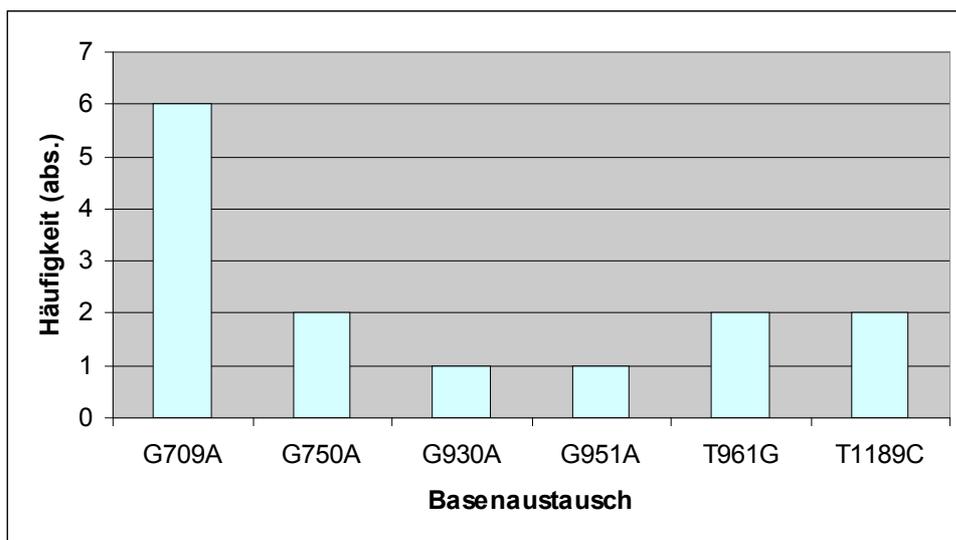
In dieser Gruppe fanden sich folgende Veränderungen im untersuchten Bereich:

a) **G709A**, b) **G750A**, c) **G930A**, d) **G951A**, e) **T961G** und f) **T1189C** (Tabelle C7, Sequenzänderungen bei Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen).

BASENAUSTAUSCH	PATIENTENNUMMER	REFERENZEN
<b>G709A</b>	2, 10, 12, 44, 47, 67	häufiger Polymorphismus (Bacino <i>et al.</i> , 1995, Chagnon <i>et al.</i> , 1999, Finnila <i>et al.</i> , 2001)
<b>G750A</b>	9, 50	seltener Polymorphismus der Cambridgesequenz
<b>G930A</b>	17	Polymorphismus (Prezant <i>et al.</i> , 1993)
<b>G951A</b>	38	Polymorphismus (Rieder <i>et al.</i> , 1998)
<b>T961G</b>	36, 37 (Kontrollen nicht verwandt)	Polymorphismus (Shoffner <i>et al.</i> , 1993, Ozawa <i>et al.</i> , 1995, Bacino <i>et al.</i> , 1995, Casano <i>et al.</i> , 1999, Fischel-Ghodsian 1999, Yoshida <i>et al.</i> , 2002, Li <i>et al.</i> , 2004, Zhao <i>et al.</i> , 2004)
<b>T1189C</b>	25, 30	bekannter Polymorphismus (Rieder <i>et al.</i> , 1998, Finnila <i>et al.</i> , 2001)

Tabelle C7. Sequenzänderungen bei Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen

Grafik C3 zeigt die Häufigkeit der einzelnen Mutationen.



Grafik C3. Verteilung der 12S rRNA- Sequenzänderungen bei Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen

## **C.II Vergleich der analysierten Gruppen**

Bei den Patienten mit bilateraler Vestibulopathie konnten bei insgesamt 13 (24,5%) von 53 untersuchten Patienten Mutationen der mitochondrialen 12S rRNA nachgewiesen werden. In der Gruppe der Sportpiloten fanden sich bei 55 (35,5%) der untersuchten 155 Piloten Veränderungen der 12S rRNA. In der Patientengruppe fanden sich neben drei bekannten Polymorphismen (G709A, G930A und T1189C) insgesamt sieben seltene homoplasmische nicht kodierende Sequenzänderungen der mitochondrialen 12S rRNA (siehe Tabelle C2). Zwei dieser Nukleotidveränderungen (T669C und C960del) wurden bislang noch nicht in Mitomap beschrieben. Der Basenaustausch T961G, die von Li *et al.*, 2004 in einem Kollektiv von 164 hörbehinderten Kindern beschrieben wurde, konnte im Patientenkollektiv bei einer Mutter und deren Tochter gefunden werden, beide waren an einer bilateralen Vestibulopathie ohne vorangegangene Aminoglykosidexposition erkrankt. Die Tochter berichtete zusätzlich von einem wiederholt aufgetretenen Tinnitus. Diese Sequenzänderung fand sich zusätzlich zweimal bei nicht verwandten Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Affektion des Vestibularorgans. Die Sequenzänderungen T1095C, C1494T und A1555G, prädisponierende Faktoren für die Entstehung eines NSHL („non syndromic hearing loss“) und einer Aminoglykosid induzierten Taubheit, wurden weder im Patienten- noch im Kontrollkollektiv gefunden. In der Gruppe der Piloten wurden weitere bekannte Polymorphismen (A663G, G709A, G769A, G930A, G1018A, T1189C, T1406C und G1462A) identifiziert. Zusätzlich konnten sieben seltene Polymorphismen gefunden werden (T721C, A723C, A745G, G769A, T789C, C1290T, T1520C). Der Basenaustausch T961G und die C960del fanden sich bei keinem der untersuchten Piloten, allerdings war einer der Piloten Träger der C960 ins und fünf weitere Piloten Träger der delT961Cn. In der sequenzierten 12S rRNA fünf weiterer Piloten fand sich der Basenaustausch T1243C. Die folgenden Tabellen bieten einen Überblick über die Verteilung der wichtigsten Sequenzveränderungen in den einzelnen Gruppen.

	Patienten mit Sequenz- änderungen	Patienten ohne Sequenz- änderung
Patientengruppe	24,5%	75,5%
Normale Kontrollen (Piloten)	35,5%	64,5%

Tabelle C8. Prozentualer Anteil von Patienten mit Nachweis einer beliebigen Mutation

	Patienten mit bilateraler Vestibulopathie	Gesunde Kontrollen (Piloten)	Kontrollprobanden mit anderen neurologischen Erkrankungen
C960Del	1,9%	0%	0%
C961Ins	1,9%	0,7%	0%
T961G	3,8%	0%	2,2%
T1243C	1,9%	3,5%	0%

Tabelle C9. Prozentuale Häufigkeit der wichtigsten Sequenzänderungen in Patienten und Normal- und Krankheitskontrollen

Insgesamt drei Sequenzänderungen fanden sich ausschließlich in der Patientengruppe. Hierzu zählen der Basenaustausch T669C, die C-Deletion an Position 960 sowie der Basenaustausch G1007A.

### **C.III Analyse mitochondrialer Translationsprodukte in Cybriden mit der T961G-Sequenzänderung**

Der Basenaustausch T961G wurde bereits 2004 von Li *et al.* in fünf von 164 kaukasischen Kindern mit einer Hörbehinderung ohne vorangegangene Aminoglykosidexposition beschrieben, nicht aber in insgesamt 226 kaukasischen Kontrollen und 324 chinesischen Kontrollen. In unserem Patientenkollektiv fand sich diese Sequenzänderung bei Mutter und Tochter mit bilateraler Vestibulopathie. Um zu überprüfen, ob und in wieweit eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Proteintranslation durch diese Sequenzänderung auf der 12S rRNA resultieren könnte, wurden mitochondriale Cybride hergestellt, die mittels Sequenzanalyse auf

eine erfolgreiche Übertragung der mitochondrialen Sequenzänderung T961G überprüft worden waren, und auf ihre Proteintranslation in Kooperation mit Herrn Prokisch an der GSF in Neuherberg untersucht. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigte sich kein Unterschied in der Translationsrate und in den Translationsprodukten. Eine funktionelle Bedeutung des Basenaustausches T961G für die Translationsaktivität der Zelle konnte somit nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### **C.IV. Etablierung des Verfahrens zur Herstellung trans-mitochondrialer Cybride**

#### **C.IV.1. Herstellung von mitochondrialen Cybriden mit der 3243-Punktmutation**

Vor Durchführung der Fusionsexperimente wurden die verwendeten Rho<sup>0</sup>-Zellen nach dem oben beschriebenen Verfahren mittels PCR und in Kultur auf ihren mtDNA-Gehalt überprüft, um eine mögliche Verunreinigung durch repopulierende mtDNA-Fragmente auszuschließen. Die Thrombozyten stammten von einem Patienten mit einem klinisch und muskelbiologisch gesicherten MELAS-Syndrom. Nach einem Selektionszeitraum von vier Wochen in uridinfreiem Medium wurden insgesamt 25 Klone aus der Kultur isoliert und für weitere vier Wochen in uridinfreiem Medium kultiviert. Aus jeweils einer Platte/Klon wurde die DNA extrahiert und mittels PCR und Enzymrestriktion untersucht. In allen untersuchten Klonen konnte ein Transfer mitochondrialer DNA nachgewiesen werden. Der Nachweis der 3243-Punktmutation gelang jedoch in nur drei (12 %) der untersuchten Klone. Der Heteroplasmiegrad der Klone wurde am Agarosegel mit Hilfe der Analysesoftware TINA abgeschätzt. Ein Klon höheren Heteroplasmiegrades (70 % oder höher) konnte nicht isoliert werden.

In mehreren Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der Phänotyp verschiedener heteroplasmischer mtDNA-Mutationen entscheidend vom Heteroplasmiegrad der jeweiligen Zelle beeinflusst wird (Chomyn *et al.*, 1996, Boulet *et al.*, 1992). Bis zu einem Wildtyp-DNA-Anteil von > 10 % scheint die Wildtyp mtDNA der

Zelle einen protektiven Effekt auf die Funktion der einzelnen Atmungskettenkomplexe auszuüben (Yoneda *et al.*, 1994, Chomyn *et al.*, 1992, Boulet *et al.*, 1992). So wurden mit dem Ziel, Klone höheren Heteroplasmiegrades zu generieren, Subklone von Klon K isoliert, welcher den höchsten Heteroplasmiegrad unter den drei 3243-positiven Klonen aufwies. Insgesamt wurden zwölf Subklone mittels PCR und Restriktionsenzymverdau untersucht. Eine entscheidende Steigerung des Heteroplasmiegrades gegenüber dem Ursprungsklon K konnte jedoch nicht erreicht werden (siehe Abbildung C1).

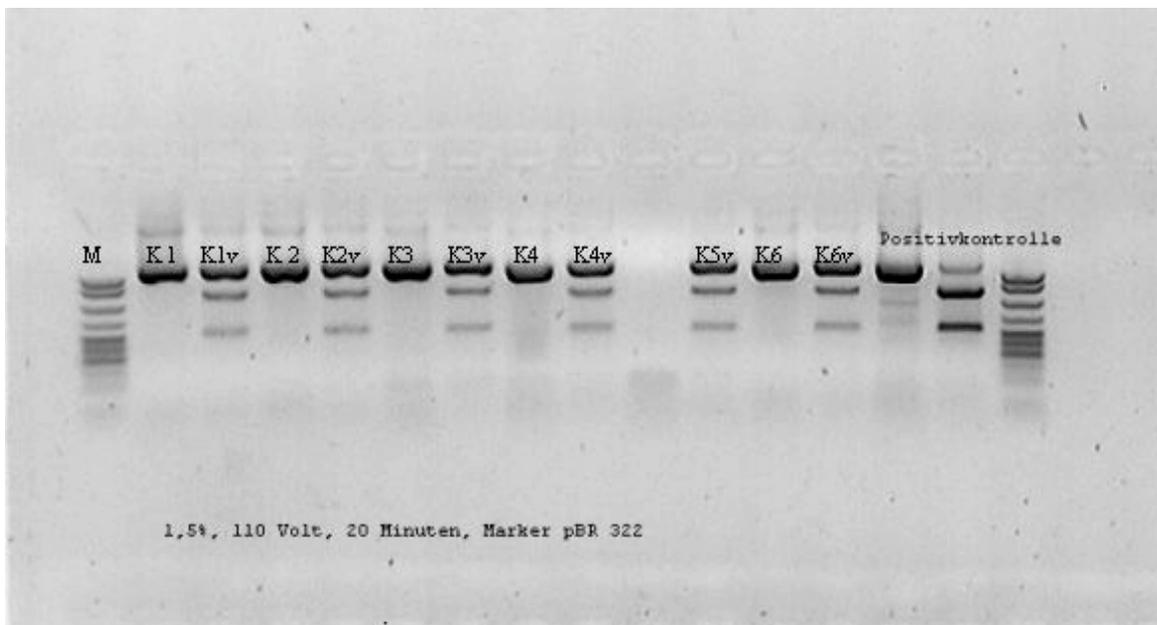


Abbildung C1. Subklone von Klon K. Klone wurden jeweils unverdaut und nach Zugabe des Restriktionsenzym aufgetragen.

(M=Marker; Kn= Klon ohne Enzymrestriktion; Knv= Klon nach Enzymrestriktion)

### C.IV.2. Herstellung transmitochondrialer Cybride mit der homoplasmischen 11778-LHON-Mutation

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit des Verfahrens wurden in einem weiteren Versuch Thrombozyten mit der homoplasmischen 11778-Mutation mit der Rho<sup>0</sup>-

Zelllinie fusioniert. Bei erfolgreichem Transfer sollte der Nachweis der 11778-Mutation in sämtlichen isolierten Klone gelingen.

Die Klone wurden wiederum nach einem Selektionszeitraum von vier Wochen in uridinfreiem Medium isoliert und in uridinfreiem Selektionsmedium kultiviert. Insgesamt wurden acht Klone auf die 11778-Mutation untersucht. Diese konnte in allen acht Klonen (100%) nachgewiesen werden, so dass von einem zuverlässigen Transfer von Spender-mtDNA auf die Empfängerzelllinie ausgegangen werden kann.

## **D. Diskussion**

### D.I. Genetische Grundlagen der bilateralen Vestibulopathie

Einer bilateralen Vestibulopathie können nach Brandt (1999, Zingler 2007) verschiedene Ursachen zugrunde liegen (A.III, Tabelle I). In etwa 30-40% der Fälle bleibt die Ätiologie der Erkrankung jedoch unklar. Für einen Teil dieser Fälle spielen mit großer Wahrscheinlichkeit prädisponierende genetische Faktoren eine Rolle, die bislang jedoch noch nicht identifiziert werden konnten. Untersuchungen an Individuen betroffener Familien legen, zumindest für einen Teil der Fälle, einen dominanten Erbgang nahe (Baloh *et al.*, 1994, Jen *et al.*, 2004). Jen *et al.* konnten 2004 in einer genomweiten Linkage-Analyse, die sie für vier Familien mit dominant vererbter bilateraler Vestibulopathie durchgeführt hatten, eine Region auf Chromosom sechs identifizieren, die mit der Entstehung einer bilateralen Vestibulopathie assoziiert sein könnte. Innerhalb dieser Region identifizierte die Arbeitsgruppe um Jen drei Kandidatengene: a) OPRM1, welches für den mu-Opiodrezeptor kodiert, b) SYNJ2, ein Gen für ein Synapsenprotein und c) SOD2, das für die mitochondriale Superoxidiondismutase kodiert. Erste Sequenzanalysen im OPRM1-Gen erbrachten keinen Hinweis auf eine potentiell pathogene Mutation in diesem Gen (Jen *et al.*, 2004), so dass die Mutationssuche in weiteren Genen fortgeführt werden muss. Auch die Möglichkeit einer autosomal rezessiven Vererbung wurde bereits diskutiert (Verhagen *et al.*, 1987). Verhagen *et al.* berichteten von einer Familie mit drei von einer bilateralen Vestibulopathie betroffenen Individuen, deren Stammbaum auf eine autosomal rezessive Vererbung der Erkrankung hindeutete.

Einige Erkrankungsfälle wurden nach einer Therapie mit Aminoglykosidantibiotika beobachtet. Aminoglykoside, wie Gentamicin, entfalten ihre primär bakterizide Wirkung über eine Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit der Bakterien. Über eine Störung der Elongation und die Einführung von Ablesefehlern kommt es zur Bildung von „Nonsense“-Proteinen. Der Einbau dieser abnormen Proteine in die bakterielle Zellmembran verursacht eine Permeabilitätsstörung (Prescott *et al.*, 2000), die zum Zelluntergang führt. Auch die bakterielle DNA-Replikation und

verschiedene zelluläre Elektronentransporter, wie beispielsweise die Atmungskettenkomplexe, werden durch die Gabe von Aminoglykosiden beeinträchtigt (Brown *et al.*, 1988, Prescott *et al.*, 2000). Die Oto-, Vestibulo- und Nephrotoxizität dieser Substanzgruppe sind allgemein bekannt und müssen bei einer Aminoglykosidtherapie immer berücksichtigt werden (Selimoglu 2007, Black *et al.*, 2004, Rougier *et al.*, 2004). Bestimmte Personengruppen weisen allerdings aufgrund ihrer genetischen Disposition eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Aminoglykosiden auf. Sie entwickeln bereits unter niedrigen Dosierungen von Aminoglykosiden irreversible Nebenwirkungen. So konnte inzwischen die mit der maternal vererbten Aminoglykosid induzierten und sporadischen Taubheit (AIHL) assoziierte mitochondriale 12SrRNA-Mutation A1555G identifiziert werden (Prezant *et al.*, 1993, Abe *et al.*, 1998, Fischel- Ghodsian 1998). Die Pathogenität dieser Mutation konnte inzwischen in einer Vielzahl von Familien unterschiedlicher Abstammung, ebenso in sporadischen Fällen nachgewiesen werden (Malik *et al.*, 2003, Casano *et al.*, 1998, Estivill *et al.*, 1998, Torroni *et al.*, 1999). Mehrere klinische Studien mit betroffenen Familien und verschiedene experimentelle Studien mit mitochondrialen Cybriden zeigten jedoch, dass die Mutation A1555G nicht allein für die Entstehung eines klinischen oder molekularen Phänotyps verantwortlich ist (Giordano *et al.*, 2002, Young *et al.*, 2005, Inoue *et al.*, 1996). Vielmehr scheint der nukleäre genetische Hintergrund mitverantwortlich für die Entstehung der einzelnen Phänotypen zu sein (Matsunaga *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2005). In den vergangenen Jahren wurden weitere Mutationen der mitochondrialen 12S rRNA als prädisponierende Faktoren eines NSHL („ Non Syndromic Hearing Loss“) oder einer Aminoglykosid assoziierten Taubheit identifiziert. In einer großen chinesischen Familie wurde ein Basenaustausch an Position 1494 (C->T) beschrieben (Zhao *et al.*, 2005). Ähnlich der A1555G- Mutation verursacht der Basenaustausch C1494T Veränderungen in der Sekundärstruktur der 12S rRNA, die die Bindung von Aminoglykosiden erleichtern. Tessa *et al.* berichteten 2001 von einer weiteren pathogenen Mutation (T1095C). Eine Affektion des Vestibularorgans durch diese Mutationen scheint eher unwahrscheinlich. Die Mehrzahl der beschriebenen Familien mit einer dieser Mutationen zeigten keine oder allenfalls geringe Beeinträchtigungen des Vestibularorgans. In dem von uns untersuchten Kollektiv von Patienten mit bilateraler

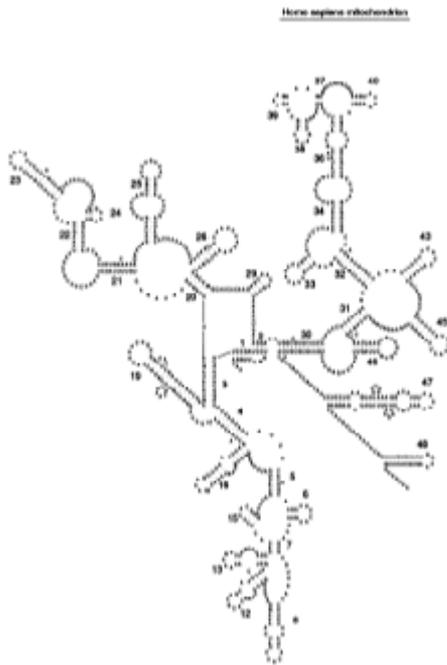
Vestibulopathie mit und ohne vorangegangene Aminoglykosidexposition konnte keine der oben beschriebenen Mutationen nachgewiesen werden. Könnten jedoch nicht analog zu diesen Mutationen weitere Mutationen der 12S rRNA existieren, die selektiv die Suszeptibilität des Vestibularorgans gegenüber Aminoglykosiden erhöhen?

### D.II. Diskussion der Ergebnisse der 12S rRNA-Sequenzanalyse

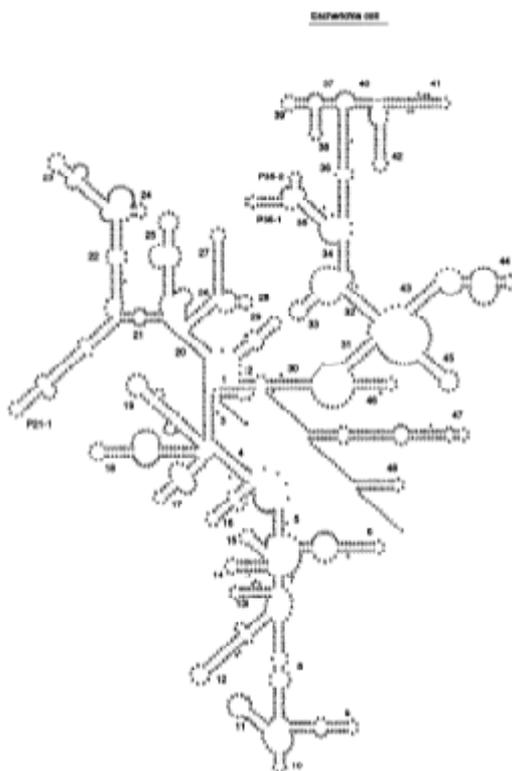
Die Pathogenität mitochondrialer Mutationen ist häufig schwierig zu beweisen, da eine Vielzahl von Faktoren wie der nukleäre genetische Hintergrund, die Häufung und Kombination verschiedener Polymorphismen, mitochondrialer Haplotypen, welche die mitochondriale Funktion wie beispielsweise die Aktivität der Atmungskettenenzyme oder auch die Proteintranslation beeinflussen und beeinträchtigen können. Wenn auch bekannte mit sporadischen und vererbten Fällen mitochondrialer Taubheit assoziierte Mutationen wie A1555G, C1494T und C1095T im untersuchten Kollektiv aus Patienten mit bilateraler Vestibulopathie nicht gefunden werden konnten, konnten doch einige interessante Veränderungen der mitochondrialen 12S rRNA in unseren Patienten beschrieben werden. So konnten unter anderem die T961G-Sequenzveränderung in einer Patientin und deren ebenfalls betroffenen Tochter identifiziert werden. Zwei weitere Patienten hatten die C961ins und die bislang noch nicht beschriebene C960del.

#### D.II.1. Sequenzveränderungen an Position 960 und 961 der 12S rRNA

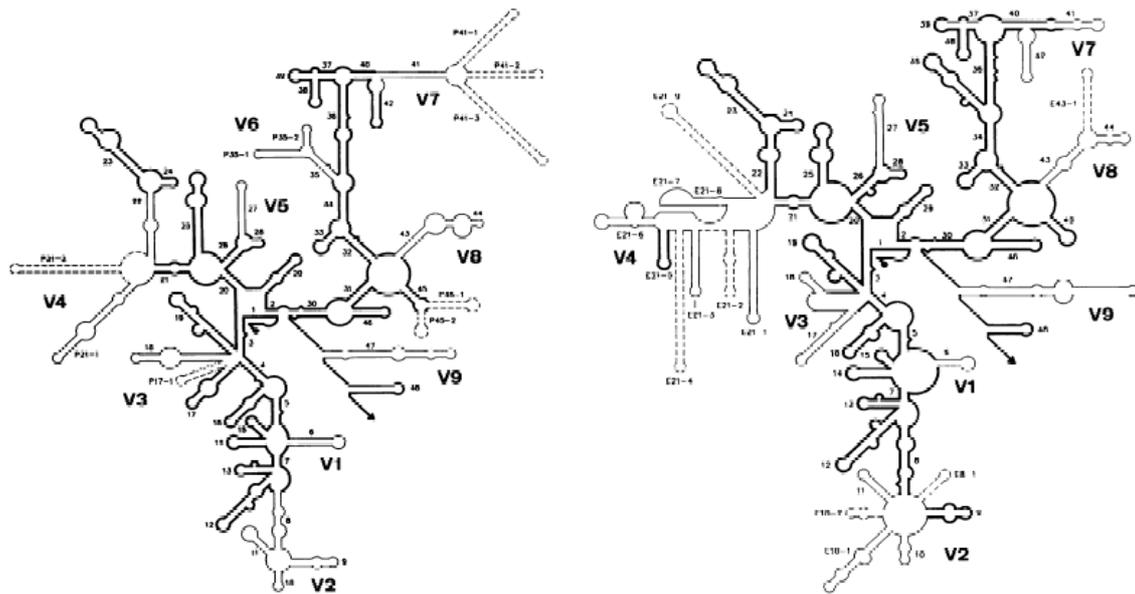
Eine hochvariable Region der mitochondrialen 12S rRNA findet sich im Bereich der Basenpaare 960 und 961. Die Basenpaare 960 und 961 liegen in einer cytosinreichen Region zwischen Helix 21 und 22 der mitochondrialen 12S rRNA, einer funktionell schlecht charakterisierten und evolutionsbiologisch kaum konservierten Region (Neefs *et al.*, 1993, Li *et al.*, 2004). Die Bedeutung der Region für die Bindung von Aminoglykosiden an der mitochondrialen 12S rRNA ist weitgehend unklar.



Sekundärstruktur der humanen 12S rRNA (Neefs *et al.*, 1993)



Sekundärstruktur der bakteriellen rRNA (Neefs *et al.*, 1993)



Gegenüberstellung der Sekundärstrukturen von rRNAs in Prokaryonten (links) und Eukaryonten (rechts). Schwarz durchgezogene Linien: Region konserviert. (Neefs *et al.*, 1993)

Möglicherweise beeinflussen Veränderungen der 12S rRNA in dieser Region aber indirekt die Interaktion zwischen Aminoglykosiden und 12S rRNA. Durch die Mutationen bedingte Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur könnten die Bindung der Aminoglykoside an der humanen 12S rRNA erleichtern und so deren schädigende Wirkung begünstigen (Casano *et al.*, 1999). Ein ähnlicher Pathomechanismus konnte für die mit der durch Aminoglykoside induzierten Taubheit assoziierte A1555G-Mutation bereits belegt werden (Hamasaki *et al.* 1997, Guan *et al.*, 2000). Diese führt zur einer stärkeren Ähnlichkeit der humanen 12S rRNA mit der bakteriellen 16S rRNA, die den eigentlichen Angriffspunkt der Aminoglykoside darstellt. Diese verstärkte strukturelle Ähnlichkeit erleichtert die unerwünschte Bindung von Aminoglykosiden an die mitochondriale 12S rRNA, was die Entstehung von aminoglykosidbedingten Nebenwirkungen begünstigt. Für verschiedene Antibiotika, wie z.B. Tetracycline oder Makrolidantibiotika, konnte gezeigt werden, dass neben dem beabsichtigten inhibitorischen Effekt auf die

bakterielle Proteinbiosynthese, auch eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Translation resultiert (Zhang *et al.*, 2005). Diese Schädigung der mitochondrialen Proteinbiosynthese beeinträchtigt die Aktivität der Atmungskettenkomplexe und führt zu einer verminderten ATP-Produktion der Zellen.

Die bei einer Patientin und deren Tochter nachgewiesene Sequenzänderung T961G wurde bereits 2004 von Li *et al.* beschrieben. Dieser hatte insgesamt 164 Kinder kaukasischer Abstammung mit Hörbehinderung (ohne vorangegangene Aminoglykosidexposition) untersucht und diesen Basenaustausch bei fünf der 164 Kinder beschrieben. 226 kaukasische Kontrolle und 324 chinesische Kontrollen waren nicht Träger dieses Basenaustausches. Unter den Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Affektion des Vestibularorgans, die gezielt in dieser Region der 12S rRNA untersucht worden waren, fanden sich zwei nicht verwandte Träger dieser Sequenzänderung, zusätzlich zeigte sich diese bei 0,59% der Mitokor Sequenzen. Untersuchungen an einer Cybridlinie mit dieser mitochondrialen 12S rRNA-Sequenz zeigten keine Änderungen in der mitochondrialen Proteintranslation. Eine Bedeutung dieses Basenaustauschs sowohl für die Entstehung sporadischer als auch familiärer Fälle eines NSHL oder einer durch Aminoglykoside verursachten Taubheit oder Vestibulopathie muss daher sicher kritisch betrachtet werden. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Nachweis einer unbeeinträchtigten Proteintranslation mögen eine Bedeutung dieses Basenaustausches für unsere Fragestellung eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Sicherlich müssen jedoch weitere funktionelle Untersuchungen folgen, um die funktionelle Bedeutung dieser Sequenzveränderung abschließend zu beurteilen.

Die C961Insertion konnte bei einem Patienten mit bilateraler Vestibulopathie und Hörminderung nachgewiesen werden. Eine Cosgregation dieser Cytosinininsertion mit der A1555G-Mutation wurde 2004 in einem großen chinesischen Stammbaum mit insgesamt 136 betroffenen Familienmitgliedern berichtet (Li *et al.*, 2004). Ferner berichteten Zhao *et al.*, 2004 in einer Familie mit 20 betroffenen Patienten eine Cosegregation dieser Mutation mit C1494T. Ein direkter Einfluss dieser Cytosinininsertion an Position 961 auf die Penetranz der beiden vorbeschriebenen Mutationen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Außerdem fand sich die entsprechende

Sequenzänderung zusätzlich in 1/60 chinesischen AIHL- Patienten und 1/86 Patienten mit NSHL, ferner in 5/144 Kontrollen (Yao *et al.*, 2005). Desweiteren diskutierten Pulkes *et al.*, 2003 die Bedeutung der C961ins für die Entstehung einer chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO) bei einem Patienten ohne Nachweis der typischen CPEO assoziierten Mutationen. Auch unter unseren Piloten konnte ein Träger der C961ins identifiziert werden; in Mitokor fand sich der Basenaustausch bei 0,74% der untersuchten Sequenzen.

Patient 20 hatte sich wegen eines Hüftabszesses einer Gentamicintherapie unterzogen und im Verlauf eine bilaterale Vestibulopathie, Hörminderung und einen Tinnitus entwickelt. Die Sequenzanalyse der 12S rRNA zeigte neben einem seltenen Polymorphismus G951A (Rieder *et al.*, 1998), der in den untersuchten Mitokorsequenzen in 0,67% der Sequenzen gefunden werden konnte, eine Cytosindeletion an Position 960. Diese fand sich weder in der Gruppe der Piloten noch in der Gruppe der Patienten aus der neurogenetischen Ambulanz. In Mitokor fand sich die Deletion in 0,22% der untersuchten Sequenzen. Fehlende Daten in der verfügbaren Literatur und die positive Aminoglykosidanamnese des Patienten machten diese C960-Deletion zu einem interessanten Kandidaten für eine weitere funktionelle Charakterisierung mit Hilfe mitochondrialer Cybride. Weitere Blut- und DNA-Proben zur Herstellung mitochondrialer Cybride konnten jedoch aufgrund einer schweren internistischen Erkrankung des betroffenen Patienten nicht gewonnen werden. Eine funktionelle Charakterisierung konnte daher nicht begonnen werden.

Bei insgesamt fünf Probanden aus der Pilotengruppe fand sich eine delT961Cins. Diese Mutation führte in sämtlichen betroffenen Fällen zu einer Poly-C-Sequenz, die jeweils einen Sequenzabbruch verursachte. Dieses Phänomen konnten auch andere Gruppen beobachten, die sich mit der Analyse dieser Region beschäftigt hatten (Bacino *et al.*, 1995, Yoneda *et al.*, 2002). Bacino *et al.* identifizierten diese Sequenzänderung bei insgesamt 1/35 Patienten mit Aminoglykosid assoziierter Taubheit und nicht in 100 gesunden Kontrollen. Casano *et al.* präsentierten 1999 eine kleine Familie mit maternal vererbter durch Aminoglykoside verursachte Taubheit, die Träger dieser Sequenzänderung waren. Li *et al.* fanden diese Änderung der Basenabfolge bei zwei von 68 Patienten mit NSHL und nicht bei 144 Kontrollen. Darüberhinaus konnten in einigen Familien, die Träger der A1555G-

Mutation waren, zusätzlich die delT961Cins und T961C nachgewiesen werden (Yoshida *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2003). Die Häufigkeit der Veränderungen um das Basenpaar 961 sowohl in den von uns untersuchten Gruppen und den bereits publizierten Familien macht eine Bedeutung für die Entstehung einer bilateralen Vestibulopathie, ebenso wie für die Entwicklung einer Aminoglykosid assoziierten Taubheit eher unwahrscheinlich, insbesondere da neuere phylogenetische Studien eben diese Region um das Basenpaar 961 als typische Marker verschiedener mitochondrialer Haplogruppen identifizierten (Tanaka *et al.*, 2004, Kong *et al.*, 2003).

Zusammenfassend scheint es sicherlich sinnvoll, neben der T961G-Mutation zusätzlich im Verlauf die C960-Deletion mit Hilfe mitochondrialer Cybride zu charakterisieren, bleibt sie letztlich doch die einzige Sequenzänderung der mitochondrialen 12S rRNA bei Patienten bilateraler Vestibulopathie, der möglicherweise eine Bedeutung in der Entstehung einer bilateralen Vestibulopathie nach Aminoglykosidexposition zukommen mag.

### D.III.2 Polymorphismen der mitochondrialen 12S rRNA

#### T669C

Bei einer Patientin mit bilateraler Vestibulopathie fand sich ein bisher in der Literatur nicht beschriebener Basenaustausch T669C in der 12S rRNA, welcher in einer gut konservierten Region (Helix 3) lokalisiert ist. In Mitokor fand sich diese Basenaustausch bei einem Patienten mit Alzheimer-Demenz, nicht aber in unseren Kontrollgruppen. Angesichts der dürftigen Datenlage, bleibt die Bedeutung dieser Sequenzänderung unklar.

#### T721C

Der Polymorphismus T721C wurde bei einem Patienten mit Alzheimer-Demenz gefunden, 905 Kontrollen zeigten diesen Basenaustausch nicht (Brown *et al.*, 1996).

In den von uns untersuchten Gruppen fanden sich diese Sequenzveränderungen bei einem unserer Piloten, allerdings nicht in der Patientengruppe.

### G951A

Der Polymorphismus G951A, erstmals beschrieben von Rieder *et al.*, 1998, fand sich bei einem unserer Vestibulopathiepatienten (Patient Nr. 20). Dieser war gleichzeitig Träger der C960-Deletion. Der Polymorphismus fand sich ebenfalls in 1/164 Patienten mit AIHL und 1/226 Kontrollen (Li *et al.*, 2004). Ferner findet sich dieser Basenaustausch in neun Mitokor-Sequenzen und acht Kontrollen der mtDatabase.

### G1007A

Dieser seltene Polymorphismus fand sich bei einem unserer Patienten mit bilateraler Vestibulopathie sowie fünf der Mitokor Kontrollen. Der Polymorphismus liegt in einer eukaryotisch gut konservierten Region zwischen Helix 23 und 24 (Neefs *et al.*, 1991) und wird in der Literatur einmal von Tokura *et al.*, 2001 erwähnt.

### T1243C

Der Polymorphismus T1243C fand sich einmal in unserer Patientengruppe und insgesamt bei fünf der untersuchten Piloten. Auch in den öffentlichen Datenbanken Mitokor (16/1349) und mtDB (56/2487) war er häufig zu finden. Dieser Basenaustausch wurde bereits in verschiedenen Familien und Patientengruppen untersucht und beschrieben. In einer Gruppe A1555G-negativer chinesischer Patienten mit sporadischer aminoglykosidinduzierter Taubheit konnte diese Sequenzänderung in einem von 35 untersuchten Patienten und nicht in 100 Kontrollen gefunden werden (Bacino *et al.*, 1995). Eine mögliche Bedeutung dieses Basenaustausches für die Entstehung einer sporadischen AID wurde angesichts dieser Befunde lange diskutiert. Schwartz *et al.* berichteten 1999 in einem anderen

Kontext von dieser Sequenzveränderung. Sie konnten die T1243C bei einem Patienten aus einer Familie mit maternal vererbter Hypotension nachweisen. Im Jahr 2001 gelang dann der Nachweis dieser Sequenzänderung in mehreren Gewebeproben, die aus Pankreaskarzinomen gewonnen worden waren (Jones *et al.*, 2001). Obwohl sich das Nukleotid 1243 in einer sehr alten und hoch konservierten Region befindet und verschiedene mathematische Modelle Veränderungen der Sekundärstruktur durch diesen Basenaustausch vorhersagen, spricht das heterogene Verteilungsmuster dieser Sequenzänderung in Patienten- und Kontrollgruppen gegen eine pathogene Rolle dieses Polymorphismus.

### T1520C

T1520C konnte bei einem von insgesamt 35 Patienten mit Aminoglykosid-assoziiertem Hörverlust gefunden werden (Bacino *et al.*, 1995). Darüberhinaus wurde eine mögliche Rolle als modifizierende Mutation in einer MELAS-Familie diskutiert (Morovvati *et al.*, 2002). Der Polymorphismus fand sich in den analysierten Gruppen ausschließlich in der Pilotengruppe. Eine Affektion des Vestibularorgans in dieser Kontrollgruppe ist durch die strengen Auflagen und jährlichen Testungen des Vestibularorgans nahezu ausgeschlossen, eine Bedeutung dieses Polymorphismus für unsere Fragestellung erscheint daher eher unwahrscheinlich.

### D.III. Stärken und Schwächen des mitochondrialen Cybridmodells

Die Auswirkungen mitochondrialer Mutationen auf den Zellmetabolismus sind sehr vielfältig und schwer charakterisierbar. Eine gestörte Proteinbiosynthese, eine Einschränkung der mitochondrialen Atmungskettenaktivität oder die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der damit verbundene erhöhte oxidative Stress und Schaden in den betroffenen Zellen sind pathophysiologische Mechanismen, die für die unterschiedlichen Phänotypen mitochondrialer Erkrankungen verantwortlich sein können. Insbesondere Interaktionen zwischen nukleärer DNA und mtDNA bei der Entstehung mitochondrialer Erkrankungen sind *in vivo* schwer nachvollziehbar und überprüfbar. Gerade in diesem Zusammenhang bietet das Cybridmodell die einzigartige Möglichkeit, die Pathogenität mitochondrialer Mutationen vor dem unabhängigen und gering variierenden Zellkernhintergrund der Rho<sup>0</sup>-Zelllinie zu untersuchen (Moraes *et al.*, 1991, Maziotta *et al.*, 1992, Bodnar *et al.*, 1993 and Guan *et al.*, 2001).

So legen insbesondere nicht maternal, sondern nach den Mendelschen Regeln vererbte mtDNA-Defekte, die Existenz verschiedener nukleärer Mutationen nahe, welche die Intaktheit der mtDNA und damit verbunden die mitochondriale Funktion beeinträchtigen. Für die autosomal dominant oder rezessiv vererbte externe Ophthalmoplegie (adPEO und arPEO) konnten zum Beispiel Defekte in den nukleären Genen ANT1, POLG1, Twinkle, für die mitochondriale neurogastrointestinale Encephalomyopathie (MNGIE) Defekte im Thymidinphosphorylase-Gen nachgewiesen werden, welche verschiedene mit diesen Erkrankungen assoziierte mtDNA-Deletionen und Depletionen verursachen (Limongelli *et al.*, 2002). Aber auch bei auf primären mtDNA-Mutationen beruhenden Syndromen, wie beispielsweise dem MELAS-Syndrom, wird die Ausprägung des Phänotyps durch nukleär-mitochondriale Interaktionen beeinflusst (Kenyon *et al.*, 1997, Zeviani *et al.*, 1997).

Das Cybridmodell erlaubt hier die gezielte biochemische Analyse einzelner heteroplasmischer Punktmutationen vor einem neutralen Zellkernhintergrund. Die

Atmungskettenaktivität, damit verbunden die ATP-Synthese, die Proteinbiosynthese und Laktatproduktion sowie zahlreiche weitere Parameter können an patientenspezifischen Cybriden unterschiedlichen Heteroplasmiegrades untersucht werden. Dies erlaubt zum einen Rückschlüsse auf die Pathogenität der Mutation an sich, zum anderen kann eine Aussage über die Abhängigkeit des klinischen Phänotyps vom Heteroplasmiegrad getroffen werden (Boulet *et al.*, 1992, Yoneda *et al.* 1994).

Die besonderen Eigenschaften der als Mitochondriendonoren fungierenden Thrombozyten bringen unbestreitbare Vorteile für die Cybridherstellung mit sich, allein der Wegfall des Eukleationsschritts bedeutet eine entscheidende Vereinfachung und Zeitersparnis gegenüber anderen Verfahren (Chomyn *et al.*, 1992).

Die Verteilung mitochondrialer Mutationen ist allerdings gewebespezifisch. Selbst bei Patienten mit einem hohen Anteil mutanter DNA in ihrem Muskelgewebe kann die entsprechende mtDNA-Mutation in ihren Blutzellen in deutlich geringerem Heteroplasmiegrad nachzuweisen sein. Bei unserem Thrombozytenspender war die Verteilung der 3243-Mutation in den Thrombozyten nicht bekannt. Eine Erklärung für die geringe Ausbeute an 3243-positiven Klonen könnte somit auch ein entsprechend hoher Wildtyp- DNA- Anteil in den Spenderthrombozyten sein. Häufig fusionieren auch mehrere Thrombozyten mit nur einer Empfängerzelle (Chomyn *et al.*, 1992), so dass bei hohen Wildtyp-mtDNA-Anteilen mit großer Wahrscheinlichkeit, selbst bei erfolgreichem Mutationstransfer, Klone mit niedrigen Heteroplasmiegraden entstehen. So ist der Heteroplasmiegrad der Spenderthrombozyten, vor allem da Thrombozyten über nur wenige Mitochondrien pro Zelle und durchschnittlich eine mtDNA-Kopie pro Organell verfügen (Shuster *et al.*, 1988), entscheidend für einen erfolgreichen Transfer der jeweiligen Mutation in die Empfängerzelllinie.

Zusätzlich werden Klone durch ihren Heteroplasmiegrad in ihrem Wachstum während der Selektionsphase in uridinfreiem Medium beeinflusst. Schwer betroffene Klone zeigen wiederum deutliche Atmungskettendefizite, so dass ein Überleben in Kultur

ohne Zusatz einer Pyrimidinquelle erschwert ist (Bodnar *et al.*, 1993). Dieser Umstand mag erklären, warum tendenziell Klone mit einem niedrigeren Anteil mutanter DNA (<90%) bessere Wachstums- und Überlebenschancen in uridinfreiem Selektionsmedium haben als Klone, welche deutliche Atmungskettendefizite aufweisen. Dass jedoch insgesamt nur 12% der untersuchten 25 Klone positiv für die 3243-MELAS-Mutation waren, kann durch diesen Sachverhalt nicht hinreichend erklärt werden.

Um auszuschließen, dass technische oder methodische Fehler für die geringe Ausbeute an MELAS-positiven Klonen verantwortlich sein könnten, wurde der Versuch mit einer weiteren, diesmal jedoch homoplasmischen mtDNA-Mutation wiederholt.

Die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON), eine mitochondriale Erkrankung, welche mit einem bilateralen Visusverlust einhergeht, ist mit etwa 13 hetero- und homoplasmischen Mutationen der mtDNA assoziiert. Die Mehrzahl der Fälle, etwa 90%, wird durch eine der drei mtDNA-Mutationen an Position 3460 (G-A), 11778 (G-A) und 14484 (T-C) verursacht (Mayorov *et al.*, 2005), welche meist als homoplasmische Mutationen vorkommen.

Die Cybride wurden nun mit Thrombozyten hergestellt, die die homoplasmische 11778-LHON-Mutation enthielten. Eine homoplasmische Mutation findet sich in sämtlichen mtDNA-Kopien betroffener Zellen, bei erfolgreichem mtDNA-Transfer sollte diese Mutation folglich auch in sämtlichen isolierten Klonen nachweisbar sein. In unserem Fall wurden acht Klone untersucht. In allen Klonen (100%) konnte die homoplasmische 11778-LHON-Mutation nachgewiesen werden. Ein Verfahrensfehler als Ursache für die geringe Anzahl an heteroplasmischen 3243-Klonen scheint somit ebenfalls unwahrscheinlich.

Die Behandlung von Zellen mit Ethidiumbromid in niedriger Konzentration stellt eine sehr effektive und verhältnismäßig schonende Methode zur Entfernung zelleigener mtDNA dar (King und Attardi, 1996, Moraes *et al.*, 1999). Entscheidend für die erfolgreiche und vor allem vollständige Entfernung der mtDNA aus der Zelle ist, wie weiter oben beschrieben, die strenge Einhaltung eines Zeitintervalls von mindestens

25 bis 30 Tagen für die Behandlung mit Ethidiumbromid. Moraes *et al.* zeigten 1999, dass kleine, in den Zellen verbleibende mtDNA-Fragmente sogar fünf bis achtmal schneller als das vollständige mtDNA- Genom repopulieren. Dieser Aspekt darf, da er die erfolgreiche Herstellung mitochondrialer Cybride entscheidend beeinflusst, nicht vernachlässigt werden. Repopulierende mtDNA-Fragmente gefährden zum einen eine zuverlässige Identifizierung erfolgreicher transformierter Klone, zum anderen muss in einem solchen Fall von mitochondrialen Mischpopulationen in den Zellen ausgegangen werden. Eine zuverlässige Zuordnung der Mitochondrien zur Spenderpopulation ist somit nicht mehr möglich.

Um derartige Einflussgrößen in unserem Experiment auszuschließen, wurden sämtliche Rho<sup>0</sup>-Klone, die für einen Versuch verwendet wurden, mittels PCR und in Kultur, unter Einhaltung der in der Literatur empfohlenen Zeitintervalle, auf ihren mtDNA - Gehalt überprüft.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das von King und Attardi im Jahr 1989 etablierte und später von Chomyn *et al.* modifizierte Verfahren zur Herstellung transmitochondrialer Cybride unter Verwendung einer mtDNA-freien Zelllinie (Rho<sup>0</sup>) eine hervorragende Möglichkeit darstellt, potentiell pathogene mitochondriale Mutationen zu charakterisieren. So wurden mit diesem Verfahren schon verschiedenste mitochondriale Punktmutationen, Deletionen und Depletionen auf ihre funktionellen Auswirkungen untersucht und auf diesem Wege mit unterschiedlichen mitochondrialen Erkrankungen assoziiert. Auch die Untersuchung der mitochondrialen Translationsrate in Cybriden mit der T961G-Mutation lieferte erste Hinweise, die eine funktionelle Bedeutung dieser Sequenzveränderung eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Unter Berücksichtigung der oben genannten Aspekte, insbesondere die Sicherstellung des mtDNA-freien Rho<sup>0</sup>-Status, können Patientenmitochondrien zuverlässig und erfolgreich in eine entsprechend präparierte Empfängerzelllinie transferiert werden. Gerade da auf dem Gebiet mitochondrialer Erkrankungen heute noch verhältnismäßig wenige therapeutische Mittel zur Verfügung stehen, stellt auch die Austestung verschiedener Substanzen, wie Coenzym Q und Kreatin, am Cybridmodell eine langfristige Option dar.

### **E. Zusammenfassung**

Die Untersuchung der mitochondrialen 12S rRNA auf Mutationen, die potentiell die Entstehung einer aminoglykosidinduzierten bilateralen Vestibulopathie begünstigen könnten, erbrachte im wesentlichen folgendes Ergebnis: In dem untersuchten Kollektiv von Patienten mit sporadischer bilateraler Vestibulopathie konnte keine eindeutig pathogene Mutation der mitochondrialen 12S rRNA nachgewiesen werden. Bei den nachgewiesenen Änderungen der 12S rRNA Sequenz handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um seltene Polymorphismen mit fraglicher Pathogenität. Wenn auch bestimmte Mutationen der 12S rRNA (A1555G, C1494T, C1095T) die Suszeptibilität der Cochlea gegenüber Aminoglykosiden erhöhen können, scheint doch die Bedeutung von 12S rRNA-Mutationen für die Entstehung einer bilateralen Vestibulopathie, insbesondere nach Aminoglykosidexposition, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Wir konnten mit der C960-Deletion letztlich nur eine Mutation auf der 12S rRNA identifizieren, die möglicherweise für unsere Fragestellung von Bedeutung sein könnte. Eine abschließende Beurteilung dieser Sequenzänderung kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erfolgen, da aktuell die Gewinnung weiterer Blut- und DNA-Proben aufgrund einer Erkrankung des betroffenen Patienten nicht möglich ist. Funktionelle Analysen dieser Mutationen im Verlauf werden zeigen, ob und inwieweit die mitochondriale Funktion durch die beschriebene Deletion beeinflusst und beeinträchtigt wird. Eine Schädigung des Vestibularorgans mit und ohne Aminoglykosidexposition scheint aber insgesamt mehr durch andere Faktoren vermittelt als durch Mutationen auf der mitochondrialen 12S rRNA. Der durch Aminoglykoside bedingten Schädigung von Vestibularorgan und Cochlea scheinen verschiedene pathophysiologische Mechanismen zugrunde zu liegen.

Mit der Etablierung des mitochondrialen Cybridmodells steht uns nun in unserem Labor eine zuverlässige, allgemein anerkannte und vielfältige Methode zur funktionellen Charakterisierung mitochondrialer Mutationen zur Verfügung.

Mitochondriale Mutationen können mit Hilfe dieses Modells vor einem einheitlichen und neutralen Zellkernhintergrund untersucht werden. Defekte der mitochondrialen Atmungskette, damit assoziierte Einschränkungen der zellulären ATP- und

Proteinbiosynthese können detektiert und charakterisiert werden. Darüber hinaus können am Zellkulturmodell erste Therapieversuche unternommen werden.

### **F. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn PD. Dr.med. Thomas Klopstock für die Bereitstellung des Themas, die freundliche Aufnahme in die Gruppe, das freundschaftliche Arbeitsklima und die gute Betreuung.

Auch meinem Betreuer, Dr.med. Matthias Elstner, möchte ich für die vielen investierten Stunden, die gründliche Einarbeitung und weitere Betreuung und Unterstützung danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei unseren medizinisch- technischen Assistentinnen Franziska Anneser, Petra Gempel und Johanna Sailer für die motivierte und geduldige Unterstützung und bei der gesamten Arbeitsgruppe für molekulare Neurogenetik, unter Leitung von Herrn PD. Dr. M. Dichgans für die freundliche Aufnahme.

**G. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung	A1	Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA
Abbildung	A2	Atmungskettenkomplexe und Energiestoffwechsel
Tabelle	A1	Ätiologie der bilateralen Vestibulopathie
Abbildung	B1	Schematische Darstellung der humanen Diloop
Abbildung	B2	D-Loop-PCR nach Ethidiumbromidbehandlung
Tabelle	C1	Patienten mit bilateraler Vestibulopathie
Tabelle	C2	Patienten mit nicht codierenden 12S rRNA Nukleotid- änderungen und deren Häufigkeit in Mitokor und mtDB
Tabelle	C3	Sequenzänderungen im Patientenkollektiv
Grafik	C1	Absolute Häufigkeit der 12S rRNA-Mutationen im Patientenkollektiv
Abbildung	C1	(A) Originalsequenz laut Cambridgesequenz. (B1) und (B2): Tdel961Cn sequenziert mit dem Forward- und Reverseprimer. (C) T961G. (D) C960del und G951A (eingerahmt). (E) C961ins
Tabelle	C4	Übersicht über Sequenzänderungen in der Pilotengruppe
Tabelle	C5	Übersicht über die absolute Häufigkeit der Sequenzände- rungen und Haplotypen
Tabelle	C6	Liste der analysierten Patienten
Grafik	C2	Prozentuale Verteilung der Krankheitsbilder bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen
Tabelle	C7	Mutationen der 12S rRNA bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen ohne Beeinträchtigung des Vestibularorgans
Grafik	C3	Verteilung der 12S rRNA-Sequenzänderungen bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen
Tabelle	C8	Prozentualer Anteil von Patienten mit Nachweis einer beliebigen Sequenzänderung
Tabelle	C9	Prozentuale Häufigkeit der wichtigsten Sequenzänderungen

Abbildung	C2	in Patientengruppe, Normal- und Krankheitskontrollen Enzymrestriktion zum Nachweis der 3243-Mutation bei Subklonen K
Abbildung	D1	Humane 12S rRNA–Sekundärstruktur
Abbildung	D2	Bakterielle rRNA–Sekundärstruktur
Abbildung	D3	Vergleich der pro- und eukaryontischen Sekundär- strukturen–Darstellung der konservierten Regionen

## H. Wichtige Abkürzungen

(nach Erscheinen im Text)

DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
RNA	Ribonukleinsäure (acid)
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transporter-RNA
ATP	Adenosintriphosphat
NADH <sub>2</sub>	Nikotinamidadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
MELAS	mitochondriale Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose, „stroke like episodes“
MERRF	Myoklonus-Epilepsie mit “ragged red fibers”
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
CPEO	chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
VOR	vestibulo-okulärer Reflex
BrdU	5` Bromodesoxyuridin
COX	Cytochrom C-Oxidase
PEG	Polyethylenglykol
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetal Calf Serum
PCR	Polymerase chain reaction
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	<i>Aqua bidest</i>
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
AID	Aminoglykoside induced deafness

## I. Literaturverzeichnis

Abe S, Usami S, Shinkawa H, et al. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in Japanese pedigrees of sensorineural hearing loss associated with the A1555G mutation. *Eur J Hum Genet* 1998 Nov;6(6):563-569.

Acierno MD, Trobe JD, Shepard NT, Cornblath WT, Disher MJ. Two types of oscillopsia in a patient with idiopathic vestibulopathy. *J Neuroophthalmol* 1997 Jun;17(2):92-94.

Altmann R. Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig: Veit 1890.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981 Apr 9;290(5806):457-465.

Arbusow V, Strupp M, Dieterich M, et al. Serum antibodies against membranous labyrinth in patients with "idiopathic" bilateral vestibulopathy. *J Neurol* 1998 Mar;245(3):132-136.

Attardi G, Chomyn A, Montoya J, Ojala D. Identification and mapping of human mitochondrial genes. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1982;18(2):85-98.

Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith JM. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 1999 Dec 24;286(5449):2524-2525.

Bacino C, Prezant TR, Bu X, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics* 1995 Jun;5(3):165-172.

Bakker A, Barthelemy C, Frachon P, et al. Functional mitochondrial heterogeneity in heteroplasmic cells carrying the mitochondrial DNA mutation associated with the MELAS syndrome (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes). *Pediatr Res* 2000 Aug;48(2):143-150.

Baloh RW, Jacobson K, Honrubia V. Idiopathic bilateral vestibulopathy. *Neurology* 1989 Feb;39(2 Pt 1):272-275.

Baloh RW, Jacobson K, Fife T. Familial vestibulopathy: a new dominantly inherited syndrome. *Neurology* 1994 Jan;44(1):20-25.

Baloh RW, Enrietto J, Jacobson KM, Lin A. Age-related changes in vestibular function: a longitudinal study. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Oct;942:210-219.

Black FO, Pesnecker S, Stallings V. Permanent gentamicin vestibulotoxicity. *Otol Neurotol*. 2004 Jul;25(4):559-69.

Bodnar AG, Cooper JM, Holt IJ, Leonard JV, Schapira AH. Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion. *Am J Hum Genet* 1993 Sep;53(3):663-669.

Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992 Dec;51(6):1187-1200.

Brandt T, Dieterich M. Vestibular falls. *J Vestib Res* 1993;3(1):3-14.

Brandt T. Bilateral vestibulopathy revisited. *Eur J Med Res* 1996 May 24;1(8):361-368.

- Brandt T, Strupp M, Benson J. You are better off running than walking with acute vestibulopathy. *Lancet* 1999 Aug 28;354(9180):746.
- Brown MD, Shoffner JM, Kim YL, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Am J Med Genet* 1996 Jan 22;61(3):283-289.
- Bu X, Yang HY, Shohat M, Rotter JI. Two-locus mitochondrial and nuclear gene models for mitochondrial disorders. *Genet Epidemiol* 1992;9(1):27-44.
- Casano RA, Johnson DF, Bykhovskaya Y, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999 May;20(3):151-156.
- Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet* 1999 Jul 2;85(1):20-30.
- Chandel NS, Schumacker PT. Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Lett* 1999 Jul 9;454(3):173-176.
- Chen JM, Williamson PA, Hutchin T, Nedzelski JM, Cortopassi GA. Topical gentamicin-induced hearing loss: a mitochondrial ribosomal RNA study of genetic susceptibility. *Am J Otol* 1996 Nov;17(6):850-852.
- Chernoff YO, Vincent A, Liebman SW. Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 1994 Feb 15;13(4):906-913.
- Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000 Aug;48(2):188-193.
- Chinnery PF, Elliott C, Green GR, et al. The spectrum of hearing loss due to mitochondrial DNA defects. *Brain* 2000 Jan;123 ( Pt 1):82-92.
- Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MW, et al. Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* 1985 Apr 18;314(6012):592-597.
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, et al. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15;89(10):4221-4225.
- Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA<sup>Lys</sup> mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* 1994 Jun;54(6):966-974.
- Chomyn A. Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol* 1996;264:334-339.
- Chomyn A. The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet* 1998 Apr;62(4):745-751.
- Chomyn A, Enriquez JA, Micol V, Fernandez-Silva P, Attardi G. The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J Biol Chem* 2000 Jun 23;275(25):19198-19209.

- Chomyn A. Mitochondrial genetic control of assembly and function of complex I in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* 2001 Jun;33(3):251-257.
- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, et al. MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol* 1992 Apr;31(4):391-398.
- COGAN DG, KUWABARA T, RICHARDSON EP, Jr. Pathology of abiotrophic ophthalmoplegia externa. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1962 Aug;111:42-56.
- Crane BT, Demer JL. Effects of vestibular and cerebellar deficits on gaze and torso stability during ambulation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000 Jul;123(1 Pt 1):22-29.
- Dai P, Yuan Y, Huang D, et al. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation in three Chinese families. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Sep 15;348(1):200-205.
- Davies J, Gorini L, Davis BD. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol Pharmacol* 1965 Jul;1(1):93-106.
- De Stasio EA, Moazed D, Noller HF, Dahlberg AE. Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic--RNA interactions. *EMBO J* 1989 Apr;8(4):1213-1216.
- del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Martin Y, et al. Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2003 Aug;40(8):632-636.
- Demer JL, Crane BT, Tian JR, Wiest G. New tests of vestibular function. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Oct;942:428-445.
- Doda JN, Wright CT, Clayton DA. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Oct;78(10):6116-6120.
- Estivill X, Govea N, Barcelo E, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998 Jan;62(1):27-35.
- Finnila S, Hassinen IE, Majamaa K. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region. *Mutat Res* 2001 Jun;458(1-2):31-39.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X, Oztas S. Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1993 Nov;14(6):399-403.
- Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Chaltraw WE, et al. Mitochondrial gene mutation is a significant predisposing factor in aminoglycoside ototoxicity. *Am J Otolaryngol* 1997 May;18(3):173-178.
- Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 1998 Jan;62(1):15-19.
- Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial deafness. *Ear Hear* 2003 Aug;24(4):303-313.
- Fischel-Ghodsian N. Genetic factors in aminoglycoside toxicity. *Pharmacogenomics* 2005 Jan;6(1):27-36.
- Frohman EM, Tusa R, Mark AS, Cornblath DR. Vestibular dysfunction in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996 Apr;39(4):529-535.

Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities ): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 1980 Jul;47(1):117-133.

Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem* 2003 Feb 7;278(6):4145-4150.

Giordano C, Pallotti F, Walker WF, et al. Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Apr 26;293(1):521-529.

Grivell LA. Mitochondrial DNA. *Sci Am* 1983 Mar;248(3):78-89.

Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 1996 Jul;5(7):963-971.

Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. A biochemical basis for the inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity. *Hum Mol Genet* 2000 Jul 22;9(12):1787-1793.

Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 2001 Mar 15;10(6):573-580.

Guan MX. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. *Ann N Y Acad Sci* 2004 Apr;1011:259-271.

Gurtler N, Schmuziger N, Kim Y, Mhatre AN, Jungi M, Lalwani AK. Audiologic testing and molecular analysis of 12S rRNA in patients receiving aminoglycosides. *Laryngoscope* 2005 Apr;115(4):640-644.

Halmagyi GM, Fattore CM, Curthoys IS, Wade S. Gentamicin vestibulotoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994 Nov;111(5):571-574.

Hamasaki K, Rando RR. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 1997 Oct 7;36(40):12323-12328.

Hutchin T, Haworth I, Higashi K, et al. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 1993 Sep 11;21(18):4174-4179.

Hutchin T, Cortopassi G. Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 Nov;38(11):2517-2520.

Hutchin TP, Cortopassi GA. Mitochondrial defects and hearing loss. *Cell Mol Life Sci* 2000 Dec;57(13-14):1927-1937.

Inoue K, Takai D, Soejima A, et al. Mutant mtDNA at 1555 A to G in 12S rRNA gene and hypersusceptibility of mitochondrial translation to streptomycin can be co-transferred to rho 0 HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Jun 25;223(3):496-501.

Ishiyama G, Ishiyama A, Baloh RW. Drop attacks and vertigo secondary to a non-meniére otologic cause. *Arch Neurol* 2003 Jan;60(1):71-75.

Jaber L, Shohat M, Bu X, et al. Sensorineural deafness inherited as a tissue specific mitochondrial disorder. *J Med Genet* 1992 Feb;29(2):86-90.

- Jacobs HT, Turnbull DM. Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet* 2005 Jun;21(6):312-314.
- Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006 Mar;70(2):140-150.
- Jen JC, Wang H, Lee H, et al. Suggestive linkage to chromosome 6q in families with bilateral vestibulopathy. *Neurology* 2004 Dec 28;63(12):2376-2379.
- Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1994 Apr 7;330(14):962-968.
- Kenyon L, Moraes CT. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Aug 19;94(17):9131-9135.
- King MP, Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell* 1988 Mar 25;52(6):811-819.
- King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989 Oct 27;246(4929):500-503.
- King MP, Attardi G. Mitochondria-mediated transformation of human rho(0) cells. *Methods Enzymol* 1996;264:313-334.
- King MP, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 1996;264:304-313.
- Klopstock T. Klinik, Genetik und Therapie mitochondrialer Erkrankungen: Mitochondriale Myopathie, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie und Kearns-Sayre-Syndrom. 2000
- Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP. Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *Am J Hum Genet* 2003 Sep;73(3):671-676.
- Kupka S, Toth T, Wrobel M, et al. Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients. *Hum Mutat* 2002 Mar;19(3):308-309.
- Li R, Greinwald JH, Jr., Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNASer(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 2004 Aug;41(8):615-620.
- Li R, Xing G, Yan M, et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. *Am J Med Genet A* 2004 Jan 15;124(2):113-117.
- Li Z, Li R, Chen J, et al. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet* 2005 Jun;117(1):9-15.
- Limongelli A, Tiranti V. Inherited Mendelian defects of nuclear-mitochondrial communication affecting the stability of mitochondrial DNA. *Mitochondrion* 2002 Nov;2(1-2):39-46.
- Löffler G, Petrides P. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer* 1999.
- Lynch SR, Puglisi JD. Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol* 2001 Mar 9;306(5):1037-1058.

- Malik S, Sudoyo H, Sasmono T, et al. Nonsyndromic sensorineural deafness associated with the A1555G mutation in the mitochondrial small subunit ribosomal RNA in a Balinese family. *J Hum Genet* 2003;48(3):119-124.
- Mariotti C, Tiranti V, Carrara F, Dallapiccola B, DiDonato S, Zeviani M. Defective respiratory capacity and mitochondrial protein synthesis in transformant cybrids harboring the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with maternally inherited myopathy and cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1994 Mar;93(3):1102-1107.
- Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S. Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005 Feb;114(2):153-160.
- Matsuzaki M, Murofushi T. Vestibular evoked myogenic potentials in patients with idiopathic bilateral vestibulopathy. Report of three cases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001 Nov;63(6):349-352.
- Maynard BT, Kerr LJ, McKiernan JM, Jansen ES, Hanna PJ. Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backup abalone *haliotis rubra* (leach). *Mar Biotechnol (NY)* 2005 Nov;7(6):645-658.
- Mayorov V, Biousse V, Newman NJ, Brown MD. The role of the ND5 gene in LHON: characterization of a new, heteroplasmic LHON mutation. *Ann Neurol* 2005 Nov;58(5):807-811.
- Migliaccio AA, Halmagyi GM, McGarvie LA, Cremer PD. Cerebellar ataxia with bilateral vestibulopathy: description of a syndrome and its characteristic clinical sign. *Brain* 2004 Feb;127(Pt 2):280-293.
- Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987 Jun 4;327(6121):389-394.
- Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA. The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1992 May;50(5):934-949.
- Moraes CT. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 1996 Oct;9(5):369-374.
- Moraes CT, Kenyon L, Hao H. Mechanisms of human mitochondrial DNA maintenance: the determining role of primary sequence and length over function. *Mol Biol Cell* 1999 Oct;10(10):3345-3356.
- Moraes CT. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet* 2001 Apr;17(4):199-205.
- Moraes CT, Srivastava S, Kirkinezos I, et al. Mitochondrial DNA structure and function. *Int Rev Neurobiol* 2002;53:3-23.
- Moraes CT. Studying mitochondria of animal cells. *Methods* 2002 Apr;26(4):291.
- Moraes CT, Atencio DP, Oca-Cossio J, Diaz F. Techniques and pitfalls in the detection of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *J Mol Diagn* 2003 Nov;5(4):197-208.
- Morovvati S, Nakagawa M, Sato Y, Hamada K, Higuchi I, Osame M. Phenotypes and mitochondrial DNA substitutions in families with A3243G mutation. *Acta Neurol Scand* 2002 Aug;106(2):104-108.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.

- Nass MM. The circularity of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966 Oct;56(4):1215-1222.
- Nass MM. Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *J Mol Biol* 1969 Jun 28;42(3):521-528.
- Nass MM. Mitochondrial DNA. II. Structure and physicochemical properties of isolated DNA. *J Mol Biol* 1969 Jun 28;42(3):529-545.
- Nass MM. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res* 1972 May;72(1):211-222.
- Nedzelski JM, Chiong CM, Fradet G, Schessel DA, Bryce GE, Pfeleiderer AG. Intratympanic gentamicin instillation as treatment of unilateral Meniere's disease: update of an ongoing study. *Am J Otol* 1993 May;14(3):278-282.
- Neefs JM, Van de PY, De RP, Chapelle S, De WR. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res* 1993 Jul 1;21(13):3025-3049.
- Odkvist LM, Bergenius J. Drop attacks in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl* 1988;455:82-85.
- Oka Y, Katagiri H, Yazaki Y, Murase T, Kobayashi T. Mitochondrial gene mutation in islet-cell-antibody-positive patients who were initially non-insulin-dependent diabetics. *Lancet* 1993 Aug 28;342(8870):527-528.
- Ozawa T. Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exp Gerontol* 1995 May;30(3-4):269-290.
- Pandya A, Xia X, Radnaabazar J, et al. Mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in two families from Mongolia with matrilineal aminoglycoside ototoxicity. *J Med Genet* 1997 Feb;34(2):169-172.
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De V, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984 Oct;16(4):481-488.
- Povalko N, Zakharova E, Rudenskaia G, et al. A new sequence variant in mitochondrial DNA associated with high penetrance of Russian Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion* 2005 Jun;5(3):194-199.
- Prescott JF, Dowling PM. Agriculture's role in managing antimicrobial resistance: conference report. *Can Vet J* 2000 Mar;41(3):191-197.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993 Jul;4(3):289-294.
- Pulkes T, Liolitsa D, Nelson IP, Hanna MG. Classical mitochondrial phenotypes without mtDNA mutations: the possible role of nuclear genes. *Neurology* 2003 Oct 28;61(8):1144-1147.
- Purohit P, Stern S. Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit. *Nature* 1994 Aug 25;370(6491):659-662.
- Reardon W, Ross RJ, Sweeney MG, et al. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* 1992 Dec 5;340(8832):1376-1379.
- Reardon W. Genetic deafness. *J Med Genet* 1992 Aug;29(8):521-526.
- Recht MI, Fourmy D, Blanchard SC, Dahlquist KD, Puglisi JD. RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol* 1996 Oct 4;262(4):421-436.

- Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998 Feb 15;26(4):967-973.
- Rinne T, Bronstein AM, Rudge P, Gresty MA, Luxon LM. Bilateral loss of vestibular function. *Acta Otolaryngol Suppl* 1995;520 Pt 2:247-250.
- Rougier F, Claude D, Maurin M, Maire P. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2004 Jun;4(2):153-62.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Dec;74(12):5463-5467.
- Sawano T, Tanaka M, Ohno K, et al. Mitochondrial DNA mutations associated with the 11778 mutation in Leber's disease. *Biochem Mol Biol Int* 1996 Apr;38(4):693-700.
- Schon EA. Mitochondrial disorders in muscle. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993 Feb;6(1):19-26.
- Schuler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T. A case of possible autoimmune bilateral vestibulopathy treated with steroids. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 Jun;74(6):825.
- Schulz P, Arbusow V, Strupp M, Dieterich M, Sautier W, Brandt T. Sympathetic contralateral vestibulopathy after unilateral zoster oticus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999 May;66(5):672-676.
- Selimoglu E. Aminoglycoside induces ototoxicity. *Curr Pharm Des.* 2007;13(1):119-26.
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, et al. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 1993 Jul;17(1):171-184.
- Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC. Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Sep 30;155(3):1360-1365.
- Smith PF. Are vestibular hair cells excited to death by aminoglycoside antibiotics? *J Vestib Res* 2000;10(1):1-5.
- Strupp M, Jahn K, Brandt T. Another adverse effect of aspirin: bilateral vestibulopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 May;74(5):691.
- Suomalainen A, Kaukonen J. Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability. *Am J Med Genet* 2001;106(1):53-61.
- Tanaka M, Takeyasu T, Fuku N, Li-Jun G, Kurata M. Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 2004 Apr;1011:7-20.
- Tang HY, Hutcheson E, Neill S, Drummond-Borg M, Speer M, Alford RL. Genetic susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: how many are at risk? *Genet Med* 2002 Sep;4(5):336-345.
- Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarinho L, Marotta G, Santorelli FM. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA. *Eur J Hum Genet* 2001 Feb;9(2):147-149.
- Tono T, Kiyomizu K, Matsuda K, et al. Different clinical characteristics of aminoglycoside-induced profound deafness with and without the 1555 A-->G mitochondrial mutation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001 Jan;63(1):25-30.
- Torroni A, Cruciani F, Rengo C, et al. The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am J Hum Genet* 1999 Nov;65(5):1349-1358.

- Usami S, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord* 1998 Sep;31(5):423-434.
- Usami S, Abe S, Tono T, Komune S, Kimberling WJ, Shinkawa H. Isepamicin sulfate-induced sensorineural hearing loss in patients with the 1555 A-->G mitochondrial mutation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1998 May;60(3):164-169.
- Van CG, Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 2000 Jun;57(6):409-414.
- Van GG, Martin JJ, Van BC. Progressive external ophthalmoplegia and multiple mitochondrial DNA deletions. *Acta Neurol Belg* 2002 Mar;102(1):39-42.
- Verhagen WI, Huygen PL, Horstink MW. Familial congenital vestibular areflexia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987 Jul;50(7):933-935.
- Vibert D, Liard P, Hausler R. Bilateral idiopathic loss of peripheral vestibular function with normal hearing. *Acta Otolaryngol* 1995 Sep;115(5):611-615.
- Wallace DC. Mitochondrial genes and disease. *Hosp Pract (Off Ed)* 1986 Oct 15;21(10):77-2.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988 Dec 9;242(4884):1427-1430.
- Wallace DC. Mitochondrial genes and neuromuscular disease. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1991;69:101-120.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992;61:1175-1212.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends Genet* 1993 Apr;9(4):128-133.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999 Mar 5;283(5407):1482-1488.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999 Sep 30;238(1):211-230.
- Wallace DC. Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7(3):158-166.
- Wallace DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp* 2001;235:247-263.
- Wallace DC. Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* 2001;106(1):71-93.
- Wang Q, Li R, Zhao H, et al. Clinical and molecular characterization of a Chinese patient with auditory neuropathy associated with mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation. *Am J Med Genet A* 2005 Feb 15;133(1):27-30.
- Wang Y, Liu VW, Ngan HY, Nagley P. Frequent occurrence of mitochondrial microsatellite instability in the d-loop region of human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 2005 May;1042:123-129.
- Waterston JA, Halmagyi GM. Unilateral vestibulotoxicity due to systemic gentamicin therapy. *Acta Otolaryngol* 1998 Jul;118(4):474-478.
- Weintraub MI. High-impact aerobic exercises and vertigo--a possible cause of bilateral vestibulopathy. *N Engl J Med* 1990 Dec 6;323(23):1633.

- Wiest G, Demer JL, Tian J, Crane BT, Baloh RW. Vestibular function in severe bilateral vestibulopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001 Jul;71(1):53-57.
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM jr, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonrhein C, Hartsch T., Ramakrishnan V. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 2000 Sep 21;407(6802):327-39.
- Yao YG, Salas A, Bravi CM, Bandelt HJ. A reappraisal of complete mtDNA variation in East Asian families with hearing impairment. *Hum Genet* 2006 Jun;119(5):505-515.
- Yoneda M, Miyatake T, Attardi G. Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol* 1994 Apr;14(4):2699-2712.
- Yoshida M, Shintani T, Hirao M, Himi T, Yamaguchi A, Kikuchi K. Aminoglycoside-induced hearing loss in a patient with the 961 mutation in mitochondrial DNA. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002 May;64(3):219-222.
- Young WY, Zhao L, Qian Y, et al. Extremely low penetrance of hearing loss in four Chinese families with the mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Mar 25;328(4):1244-1251.
- Yuan H, Qian Y, Xu Y, et al. Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/trRNA(Ser(UCN)) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet A* 2005 Oct 1;138(2):133-140.
- Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 1989 May 25;339(6222):309-311.
- Zeviani M, Petruzzella V, Carrozzo R. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signalling. *J Bioenerg Biomembr* 1997 Apr;29(2):121-130.
- Zhang HJ, Xu CH, Zhan YJ, et al. Sequence analysis of the mitochondrial genome from a large family with maternally inherited nonsyndromic deafness. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2005 Aug;22(4):368-371.
- Zhao H, Li R, Wang Q, et al. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 2004 Jan;74(1):139-152.
- Zhao H, Young WY, Yan Q, et al. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Nucleic Acids Res* 2005;33(3):1132-1139.
- Zingler VC, Cynrim C, Jahn K, Weintz E, Fernbacher J, Frenzel C, Brandt T, Strupp M. Causative factors and epidemiology of bilateral vestibulopathy in 255 patients. *Ann Neurol*. 2007 Jun;61(6):524-32.

## **J. Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Vorname: Caroline  
Name: Schmidt  
Geburtsort: Trier  
Geburtstag: 11.02.1980  
Eltern: Dr. Dr. Willy Schmidt und Annelore Schmidt

### Schulische Laufbahn:

1986- 1990 Grundschule Ursberg  
1990- 1999 Dominikus-Ringeisen Gymnasium in Ursberg

### Internship:

06-09/1999 Internship bei Chiron Behring in Emeryville/CA  
(Cancer genomics Programm)

### Hochschulausbildung:

10/1999- 10/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-  
Universität in München  
08/09/2001 Physikum  
04/2002 Famulatur in der Unfall- und Allgemein Chirurgie im Kreis-  
krankenhaus Krumbach  
08/2002 I. Staatsexamen  
09/10/2002 Praxisfamulatur  
08/2003 Famulatur in der Neurologie des Städtischen Krankenhaus  
München- Harlaching  
09/10/2003 Famulatur in der Neurochirurgie des Klinikum Großhadern  
08/09/2004 II. Staatsexamen  
10/2004- 02/2005 I. PJ-Tertial in der Neurologie des Klinikum Großhadern  
02/2005- 05/2005 II. PJ-Tertial in der Medizinischen Klinik II und III des  
Klinikum Großhadern

## Lebenslauf

---

06/2005- 09/2005 III. PJ-Tertial in der Chirurgie des Kantonsspital in Chur/  
Schweiz (Urologie/Visceral- und Gefässchirurgie)

10/2005 III. Staatsexamen

11/2005 Approbation

seit 12/2005 Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik des Klinikums  
Großhadern (Arbeitsgruppe für Neuroinfektiologie, Prof.  
Dr. Walter Pfister)

### Promotion:

10/2002- 04/2005 Molekulargenetische Analyse von Mutationen der mito-  
chondrialen 12S rRNA bei Patienten mit bilateraler  
Vestibulopathie (Arbeitsgruppe für Molekulare Neuro-  
Genetik des Klinikum Großhaderns)

München, den 25.11.2007

Caroline Schmidt