

Fremdgenexpression in humanen Mitochondrien

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ingo Schäfer

aus Heilbronn

Würzburg 2011

Eingereicht am: 29.07.2011

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Seibel

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 07.10.2011

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ursprung und Evolution der Mitochondrien	1
1.2. Die Morphologie der Mitochondrien	2
1.3. Die Funktionen der Mitochondrien	3
1.4. Das mitochondriale Genom	5
1.5. Die Transkription der mitochondrialen DNA	8
1.6. Die mitochondriale RNA-Prozessierung und Proteinbiosynthese	10
1.7. Die Replikation mitochondrialer DNA	12
1.8. Proteinimport in Mitochondrien	14
1.9. Fusion und Fission von Mitochondrien	16
1.10. Zellen ohne mitochondriales Genom	18
1.11. Mitochondriale Gendefekte und Erkrankungen	19
1.12. Ansätze zur Therapie mitochondrialer Gendefekte	22
1.13. Zielsetzung	24
2. Material	25
2.1. Zelllinien	25
2.2. Zellkulturmedien	26
2.3. Bakterien	27
2.4. Plasmidvektoren	27
2.4.1. pMAG2-1	27
2.4.2. pMAG2-2	28
2.4.3. pEGFP-Mito	29
2.4.4. pEGFP-N1	29
2.4.5. pEGFP-OMP	30
2.4.6. pAR1219	30
2.4.7. pCR [®] II-TOPO [®]	31
2.4.8. pCR [®] -XL-TOPO [®]	31
2.5. Oligodesoxynukleotide	32
2.6. Chemikalien	34
2.7. Enzyme	35
2.8. Kits	35

2.9. Antikörper	36
2.10. Längenstandards.....	36
2.11. Puffer und Lösungen	38
2.12. Verbrauchsmaterialien	43
2.13. Geräte	44
2.14. Software und Datenbanken	46
3. Methoden.....	47
3.1. Mikrobiologische Methoden	47
3.1.1. Übernachtflüssigkulturen von Bakterien	47
3.1.2. Bakterienkultur auf Agar-Platten.....	47
3.1.2.1. Herstellen von Agar-Selektionsplatten.....	47
3.1.2.2. Herstellen von Agar-Platten für „Blau-Weiß“-Selektionen	48
3.1.3. Herstellen einer Glycerinkultur	49
3.1.4. Herstellung von transformationskompetenten <i>E. coli</i> Zellen nach dem „one-step“-Verfahren von CHUNG, 1989	49
3.1.5. Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	50
3.2. Molekularbiologische Methoden	51
3.2.1. DNA-Extraktion	51
3.2.1.1. Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	51
3.2.1.1.1. GTE-System.....	51
3.2.1.1.2. peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I und II.....	52
3.2.1.1.3. Plasmid-Maxipräparation mit dem NucleoBond® PC-500 Kit	52
3.2.1.2. Gewinnung von Gesamt-DNA aus Kulturzellen.....	53
3.2.1.3. Gewinnung mitochondrialer DNA aus humaner Placenta	54
3.2.2. DNA-Reinigung.....	56
3.2.2.1. DNA-Reinigung durch Phenol-/Chloroform-Extraktion.....	56
3.2.2.2. Präzipitation von Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung	57
3.2.2.3. Gelextraktion von DNA.....	58
3.2.2.4. DNA-Reinigung durch Dialyse	58
3.2.2.5. DNA-Reinigung durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation	59
3.2.3. DNA-Quantifizierung.....	60
3.2.3.1. Photometrische Quantifizierung von DNA	60
3.2.3.2. DNA-Quantifizierung über ein Agarose-Gel	61
3.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	62

3.2.4.1.	Analytische Agarose- und Agar-Gelelektrophorese.....	62
3.2.4.2.	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	63
3.2.5.	DNA-Modifizierung durch Enzymbehandlung	64
3.2.5.1.	Restriktionsspaltung von DNA durch Endonukleasen	64
3.2.5.2.	Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende	66
3.2.5.3.	Phosphorylierung von DNA am 5'-Ende	66
3.2.5.4.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	67
3.2.5.5.	TOPO [®] -TA-Ligation von DNA-Fragmenten	68
3.2.5.6.	<i>Blunting</i> von DNA-Fragmenten	70
3.2.5.6.1.	Auffüllen von 5'-Überhängen und Entfernen von 3'-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase.....	70
3.2.5.6.2.	Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment	71
3.2.5.6.3.	Entfernen von 5'- und 3'-Überhängen mit der S1-Nuklease	72
3.2.6.	Enzymatische DNA-Amplifikation	72
3.2.6.1.	Polymerase-Kettenreaktion	72
3.2.6.2.	Kolonie-PCR	76
3.2.6.3.	Zielgerichtete Mutagenese.....	78
3.2.7.	Southern Blot.....	81
3.2.7.1.	Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde	81
3.2.7.2.	Gelelektrophorese	82
3.2.7.3.	Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran	82
3.2.7.4.	Hybridisierung der DNA mit einer DIG-markierten Sonde	84
3.2.7.5.	Immundetektion der gebundenen Sonde durch eine Farbreaktion	84
3.2.8.	DNA-Sequenzierung.....	86
3.2.9.	<i>In-vitro</i> -Transkription mitochondrialer Plasmide.....	87
3.2.9.1.	Herstellung eines mitochondrialen <i>in-vitro</i> -Transkriptionsextraktes (modifiziert nach Fernandez-Silva <i>et al.</i> , 1996).....	87
3.2.9.2.	<i>In-vitro</i> -Transkription.....	87
3.2.9.3.	Aufreinigung der RNA aus dem <i>in-vitro</i> -Transkriptionsextrakt	88
3.2.10.	Reverse Transkription von RNA	89
3.2.10.1.	Entfernung von DNA-Verunreinigungen der RNA.....	90
3.2.10.2.	Reverse Transkription.....	90
3.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	92
3.3.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	92

3.3.1.1.	Gießen eines SDS-Polyacrylamid-Gels.....	92
3.3.1.2.	Vorbereitung der Proben.....	93
3.3.1.3.	Gelelektrophorese.....	94
3.3.1.4.	Coomassie-Färbung.....	94
3.3.1.5.	Trocknen von Polyacrylamid-Gelen.....	95
3.3.2.	Western Blot.....	95
3.3.2.1.	Transfer auf eine PVDF-Membran.....	96
3.3.2.2.	Ponceau S-Färbung.....	97
3.3.2.3.	Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern.....	97
3.4.	Zellkultur.....	99
3.4.1.	Kultivierung von Zellen.....	99
3.4.2.	Ablösen und Ernten von Zellen.....	100
3.4.2.1.	Mechanische Ablösung von Zellen.....	100
3.4.2.2.	Enzymatische Ablösung von Zellen.....	100
3.4.3.	Bestimmung der Zellzahl.....	101
3.4.4.	Kryokonservierung von Zellen.....	101
3.4.5.	Auftauen von Zellen.....	102
3.4.6.	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	103
3.4.6.1.	Transfektion mit dem Transfektionsreagenz METAFECTENE [®] PRO ..	103
3.4.6.2.	Transfektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE [®] HD ..	104
3.4.6.3.	Transfektion mit dem Transfektionsreagenz MATra-A.....	104
3.4.7.	Selektion transfizierter Zellen durch Antibiotika.....	105
3.4.8.	Selektion von mit mtDNA transfizierten ρ^0 -Zellen.....	106
3.4.9.	Herstellung von dialysiertem FCS.....	106
3.4.10.	Färbung von Mitochondrien mit MitoTracker [®] -Farbstoffen.....	107
3.4.11.	Induktion von Megamitochondrien.....	107
3.4.11.1.	Induktion über Ansäuerung des Mediums mit Milchsäure.....	108
3.4.11.2.	Induktion über Zugabe von Valinomycin.....	108
3.4.11.3.	Induktion über Ansäuerung des Mediums mit Natriumacetat.....	109
3.4.11.4.	Induktion über Ansäuerung des Mediums mit Essigsäure.....	109
3.5.	Sonstige Methoden.....	110
3.5.1.	Partikelbeschuss mit der <i>Gene Gun</i>	110
3.5.1.1.	Vorbereitung des Geräts.....	111
3.5.1.2.	Präparation der Goldpartikel.....	111

3.5.1.3.	Beschichten der Goldpartikel mit DNA	112
3.5.1.4.	Partikelbeschuss humaner Zellen	113
3.5.2.	Mikroskopie.....	114
3.5.2.1.	Fluoreszenzmikroskopie.....	114
3.5.2.2.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	115
3.5.2.3.	Fixierung von Kulturzellen mit Formaldehyd.....	115
3.5.2.4.	Immunlokalisation an Kulturzellen	116
3.5.3.	Mikroinjektion	116
4.	Ergebnisse	118
4.1.	Mitochondriale Expressionsvektoren.....	118
4.1.1.	Konstruktion mitochondrialer Expressionsvektoren	118
4.1.1.1.	pMAG11-1.....	119
4.1.1.2.	pMAG11-2.....	120
4.1.1.3.	pMAG12-1.....	121
4.1.1.4.	pMAG13-1.....	122
4.1.1.5.	pMAG14-1.....	123
4.1.1.6.	pMAG14-2.....	125
4.1.1.7.	pMAG14-3.....	126
4.1.1.8.	pMAG15-1.....	127
4.1.1.9.	pMAG15-2.....	128
4.1.1.10.	pMAG16-1.....	129
4.1.1.11.	pMAG17-1.....	131
4.1.1.12.	Hilfsvektoren	132
4.1.1.12.1.	pCRII-TOPO-mtEGFP.....	132
4.1.1.12.2.	pCR-XL-TOPO-T7	132
4.1.2.	Überprüfung der Funktionsfähigkeit	133
4.1.2.1.	Transkription	133
4.1.2.2.	Prozessierung.....	136
4.2.	Zelllinien mit T7-RNA-Polymerase in den Mitochondrien.....	140
4.2.1.	Konstruktion des Expressionsvektors für die T7-RNA-Polymerase	140
4.2.2.	Herstellung einer Zelllinie mit T7-RNA-Polymerase in den Mitochondrien.....	141
4.2.3.	Nachweis der T7-RNA-Polymerase	141

4.3.	Induktion von Megamitochondrien.....	146
4.3.1.	Induktion mit Natriumacetat.....	146
4.3.2.	Induktion mit Essigsäure	149
4.3.3.	Morphologieänderung bei Megamitochondrien	150
4.4.	Methoden zur Transfektion von Mitochondrien mit Plasmid-DNA	152
4.4.1.	Partikelbeschuss mit der <i>Gene Gun</i>	152
4.4.1.1.	Bestimmung der Durchführungsbedingungen.....	152
4.4.1.2.	Induktion von Megamitochondrien	158
4.4.1.3.	Transfektion mit mtDNA.....	162
4.4.1.4.	Transfektion mit mitochondrialen Expressionsvektoren.....	163
4.4.2.	Transfektion mit magnetischen Partikeln	165
4.4.3.	Transfektion durch Mikroinjektion von DNA.....	167
5.	Diskussion.....	169
5.1.	Mitochondriale Expressionsvektoren.....	169
5.1.1.	Konstruktion mitochondrialer Expressionsvektoren	169
5.1.2.	<i>In-vitro</i> -Nachweis der Transkription	172
5.1.3.	<i>In-vitro</i> -Nachweis der Prozessierung	173
5.2.	Zelllinien mit mitochondrial lokalisierter T7-RNA-Polymerase	175
5.3.	Induktion von Megamitochondrien.....	177
5.3.1.	Induktion mit Natriumacetat.....	178
5.3.2.	Induktion mit Essigsäure	179
5.3.3.	Morphologieänderung bei Megamitochondrien	180
5.4.	Methoden zur Transfektion von Mitochondrien mit Plasmid-DNA	181
5.4.1.	Partikelbeschuss mit der Gene Gun.....	181
5.4.1.1.	Bestimmung der Durchführungsbedingungen.....	181
5.4.1.2.	Induktion von Megamitochondrien	183
5.4.1.3.	Transfektion mit mtDNA.....	184
5.4.1.4.	Transfektion mit mitochondrialen Expressionsvektoren.....	185
5.4.2.	Transfektion mit magnetischen Partikeln	187
5.4.3.	Transfektion durch Mikroinjektion von DNA.....	188
5.5.	Ausblick	190
6.	Zusammenfassung.....	191

7. Summary	193
8. Literaturverzeichnis	194
9. Abkürzungsverzeichnis.....	212
10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	217
10.1. Abbildungen.....	217
10.2. Tabellen.....	220
11. Ehrenwörtliche Erklärung	221
12. Danksagung.....	222

1. Einleitung

1.1. Ursprung und Evolution der Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen, die in allen eukaryontischen Zellen, mit Ausnahme von Erythrozyten und einigen ein- bis wenigzelligen Lebewesen (Protisten), vorkommen.

Die ersten Berichte über intrazelluläre Strukturen, bei denen es sich möglicherweise um Mitochondrien handelte, reichen bis in die 40er Jahre des 19. Jahrhunderts zurück (Henle, 1841), als gerade erst ein paar Jahre zuvor der Zellkern entdeckt wurde (Brown, 1833). Durch Altmann wurden sie dann später als „Bioblasten“ bezeichnet. Er kam zu dem Schluss, dass sie „elementare Organismen“ seien, die in den Zellen leben und dort wichtige Funktionen ausführen, da sie in allen Zellen zu finden waren (Altmann, 1890). Im Jahr 1898 führte Benda aufgrund ihres faden- und knotenförmigen Erscheinungsbildes dann die Bezeichnung „Mitochondrien“ ein (Benda, 1898).

Man geht davon aus, dass der Ursprung der Mitochondrien auf einen einmaligen Endosymbioseprozess zurückgeht (Margulis, 1975). Gensequenzvergleiche stützen die Annahme, dass möglicherweise anaerobe Archaeobakterien atmungsaktive α -Proteobakterien aufgenommen haben, die sich dann zu den ersten energieproduzierenden Organellen entwickelten (Gray *et al.*, 1999; Vellai und Vida, 1999). Die genetische Information der Mitochondrien wurde im Laufe der Evolution auf ein Minimum reduziert und zum Teil in das Kerngenom übertragen (Gray, 1993). Aus diesem Grund ist der Großteil der mitochondrialen Proteine durch die nukleäre DNA codiert (Scheffler, 2001).

Mitochondrien werden nicht *de novo* synthetisiert. Vielmehr vermehren sie sich in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen durch Abschnürungen aus bereits existierenden Organellen. Während der Mitose werden die Organellen dann gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellen verteilt.

Die Vererbung der Mitochondrien erfolgt, entgegen den Mendelschen Regeln, nahezu ausschließlich maternal (Hutchison III *et al.*, 1974; Giles *et al.*, 1980; Case und Wallace, 1981). In den Spermien sind die Mitochondrien an der Basis des Flagellums lokalisiert, welches bei der Befruchtung abgeworfen wird. Dadurch geht ein Großteil der männlichen Mitochondrien schon bei der Befruchtung der Eizelle verloren (Piko und Matsumoto, 1976). Sollten dennoch einzelne männliche Mitochondrien auf die Eizelle übertragen werden, erfolgt

Einleitung

ihr Abbau recht schnell innerhalb der ersten Zellteilungen (Hiraoka und Hirao, 1988; Kaneda *et al.*, 1995). Die paternalen Mitochondrien werden wahrscheinlich kurz nach der Befruchtung durch Ubiquitylierung inaktiviert - ein Prozess, der einen proteolytischen Abbau einleitet (Sutovsky *et al.*, 1996). In seltenen Einzelfällen konnte auch eine paternale Vererbung festgestellt werden (Schwartz und Vissing, 2002).

1.2. Die Morphologie der Mitochondrien

Vergleichbar mit der Größe von Bakterien haben Mitochondrien einen Durchmesser von 0,5-1 μm und eine Länge von mehreren Mikrometern (Logan, 2007).

Die Mitochondrien besitzen zwei Lipidmembranen, weshalb man vier Subkompartimente unterscheiden kann (Abb. 1-1): Die äußere Membran, die aus Phospholipiden und Cholesterin

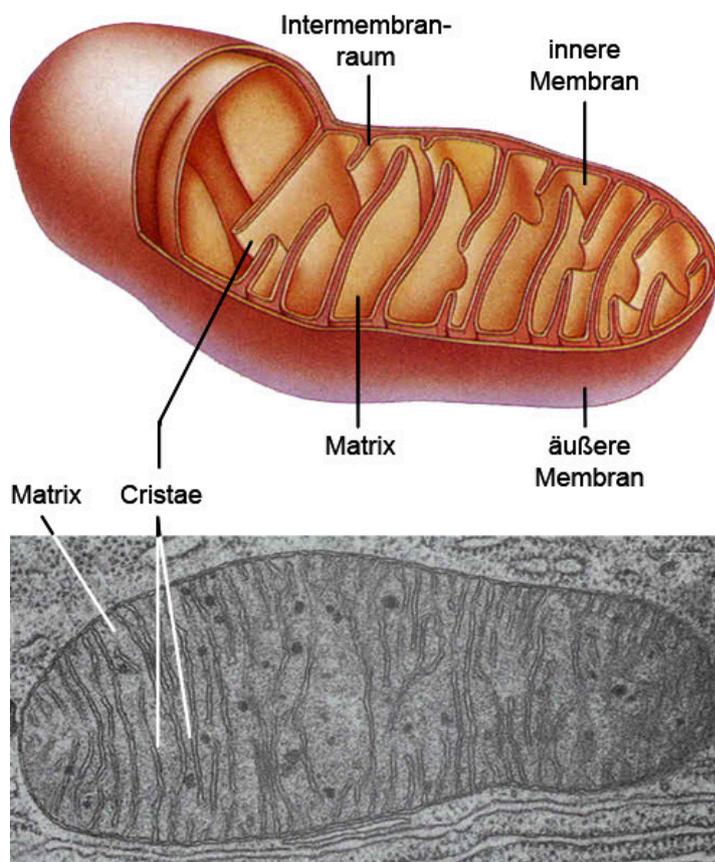


Abb. 1-1: Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums
(modifiziert nach <http://www.cropsci.illinois.edu/classes/cpsc112/Topicpages/form-function.cfm>)

aufgebaut ist, grenzt die Mitochondrien gegen das Zytoplasma ab und ist von der inneren Membran durch den Intermembranraum getrennt. Im Gegensatz zu der glatten äußeren Membran bildet die innere Membran Einstülpungen aus, die in das vierte Subkompartiment, die Matrix, hineinragen und als Cristae bezeichnet werden (Palade, 1952; Daems und Wisse, 1966). Anstelle des Lipids Cholesterin enthält die innere Mitochondrienmembran das Lipid Cardiolipin, welches in keinen anderen Membranen der Zelle vorkommt. In der inneren Membran sind zudem die Proteine der oxidativen Phosphorylierung integriert.

1.3. Die Funktionen der Mitochondrien

Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Bereitstellung der Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP), das als universeller Energieträger unverzichtbar bei der Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen ist.

Zunächst wird das in der Glykolyse gebildete Pyruvat in die Matrix der Mitochondrien transportiert, wo es durch das Enzym Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Zusammen mit dem bei der Fettsäureoxidation und dem Aminosäureabbau entstehenden Acetyl-CoA wird es nun im Citratzyklus unter Bildung von CO_2 und H_2O oxidiert. Die dabei freigesetzten Elektronen dienen der Bildung der Reduktionsäquivalente Nikotinamid-adeninindinukleotid (NADH) und Flavinadeninindinukleotid (FADH_2), die anschließend bei der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) benötigt werden.

Die Atmungskette ist aus fünf Multi-Enzymkomplexen (Komplex I-V) zusammengesetzt, die aus rund 90 Untereinheiten bestehen (Abb. 1-2). An den ersten vier Komplexen, die die Elektronentransportkette bilden, werden die Reduktionsäquivalente schrittweise oxidiert, wobei die hierdurch freigesetzte Energie für die Erzeugung eines Protonengradienten über der Innenmembran eingesetzt wird. Der fünfte Komplex, die ATP-Synthase, nutzt anschließend das elektrochemische Potential des Protonengradienten zur Synthese von ATP in der mitochondrialen Matrix.

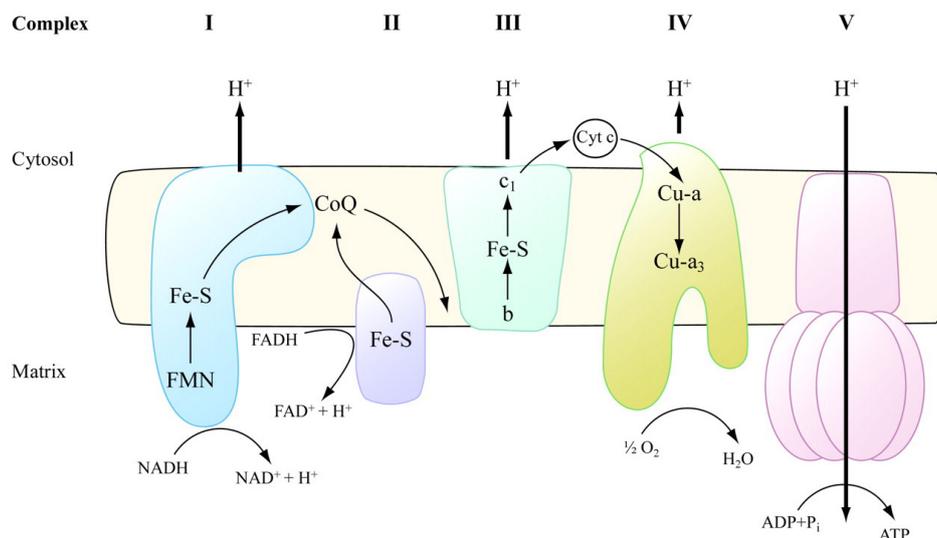


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette mit ihren fünf Proteinkomplexen (Shoubridge, 2001)

Einleitung

Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase, Komplex I), der größte der Enzymkomplexe der Atmungskette, besteht in Säugermitochondrien aus 45 Untereinheiten, von denen sieben durch die mtDNA codiert werden (Chomyn *et al.*, 1986; Carroll *et al.*, 2003). An diesem Komplex werden Elektronen, die durch die Oxidation von NADH zu NAD^+ gewonnen werden über eine Reihe von Eisen-Schwefel-Clustern transportiert und dann für die Reduzierung von Ubichinon (Coenzym Q) zu Ubichinol genutzt. Gleichzeitig werden vier Protonen über die Membran in den Intermembranraum gepumpt.

Der zweite Komplex der Atmungskette, die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Succinat-Dehydrogenase), ist das einzige membranständige Enzym des Citratzyklus und katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Bei diesem Vorgang erfolgt eine Übertragung von Elektronen des Succinats auf FAD, welches an die Succinat-Dehydrogenase gebunden ist und zu FADH_2 reduziert wird. Wie bei der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase wird Ubichinon durch die Übertragung von Elektronen zu Ubichinol reduziert (Lancaster und Kröger, 2000). Bei diesem Vorgang werden jedoch keine Protonen über die Membran gepumpt.

Die Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Cytochrom c-Reduktase, Komplex III) ist ein Dimer von zwei identischen Monomeren, die aus jeweils 11 Untereinheiten aufgebaut sind. Nur eine dieser Untereinheiten, das Cytochrom b, wird durch die mitochondriale DNA codiert.

Der Komplex III katalysiert den Transfer von Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c. Pro Ubichinol-Molekül werden dabei zwei Elektronen übertragen und vier Protonen in den Intermembranraum abgegeben (Darrouzet *et al.*, 2001).

Am Ende der Elektronentransportkette werden Elektronen vom Cytochrom c an die Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) übergeben. Dieser Komplex enthält 13 Untereinheiten, wovon drei durch die mitochondriale DNA codiert sind. Vier Elektronen werden daraufhin auf ein Sauerstoffmolekül übertragen, das anschließend mit vier Protonen zu zwei Wassermolekülen reduziert wird. Mit Hilfe der dabei freiwerdenden Energie können vier weitere Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden (Schultz und Chan, 2001).

Der fünfte Komplex, die ATP-Synthase, nutzt den durch die vorangehenden Komplexe gebildeten Protonengradienten, um die Synthese von ATP aus ADP und P_i zu katalysieren. Die menschliche ATPase besteht aus mindestens 16 Untereinheiten, von denen zwei durch mitochondriale Gene codiert sind (Kagawa, 1999; Schultz und Chan, 2001).

Das erzeugte ATP wird anschließend über den Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) im Austausch gegen ADP in das Zytosol der Zelle exportiert (Kholodenko *et al.*, 1988). Dabei wechselt der Komplex zwischen zwei verschiedenen Konformationen, die durch Substratbindung auf der zytosolischen und der Matrix-zugewandten Seite gekennzeichnet sind (Klingenberg *et al.*, 1984).

Neben dem Citratzyklus sind auch Teile der β -Oxidation der Fettsäuren und des Aminosäureabbaus in den Mitochondrien lokalisiert. Daneben werden in Mitochondrien zahlreiche Stoffwechselprodukte wie Lipide, Pyrimidine, Aminosäuren, Häm, Eisen-Schwefel-Cluster (Kispal *et al.*, 1999; Schilke *et al.*, 1999) und Steroide synthetisiert. Sie spielen darüber hinaus eine essentielle Rolle bei der Regulation des Ionenhaushalts (Brierley *et al.*, 1994; Garland, 1994; Gunter, 1994; Hansford, 1994), der Thermogenese (Nedergard und Cannon, 1992; Matthias *et al.*, 1999; Lowell und Spiegelman, 2000) der Aufrechterhaltung des zellulären Redoxpotentials sowie der Apoptose.

1.4. Das mitochondriale Genom

Als einziges Organell neben dem Zellkern (und den Chloroplasten in Pflanzenzellen) verfügen die Mitochondrien über ein eigenes Genom. Seine Entdeckung geht auf elektronenmikroskopische Aufnahmen zurück, bei denen in den Mitochondrien fadenähnliche Strukturen zu erkennen waren, die durch DNA-abbauende Enzyme entfernt werden konnten (Nass und Nass, 1963).

Das mitochondriale Genom des Menschen besteht aus einem zirkulären doppelsträngigen DNA-Molekül (Abb. 1-3), das 16569 bp umfasst und in einer *supercoiled*-Konformation vorliegt. Dabei enthält jedes Mitochondrium einer Zelle mehrere identische Kopien des DNA-Moleküls (Shuster *et al.*, 1988; Robin und Wong, 1988; Wiesner *et al.*, 1992). Die genaue Sequenz der humanen mitochondrialen DNA ist bereits seit 1981 bekannt (Anderson *et al.*, 1981) und beinhaltet die Sequenz für 37 Gene. 13 Gene davon codieren Polypeptide, die integrale Bestandteile von vier der fünf Atmungskettenkomplexe sind. Sieben dieser Gene (ND1 bis ND6 sowie ND4L) codieren für Untereinheiten der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) und eines (CYTB) für Cytochrom b, einen Bestandteil der Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III). Außerdem liegen drei Gene (COX1 bis COX3) für Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) sowie zwei Gene (ATP6/8) für

Einleitung

Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V) auf der mitochondrialen DNA vor. Daneben befinden sich auf dem Genom noch zwei ribosomale RNAs (rRNAs) und 22 Gene für transfer-RNAs (tRNAs), die für das mitochondriale Translations-System essentiell sind.

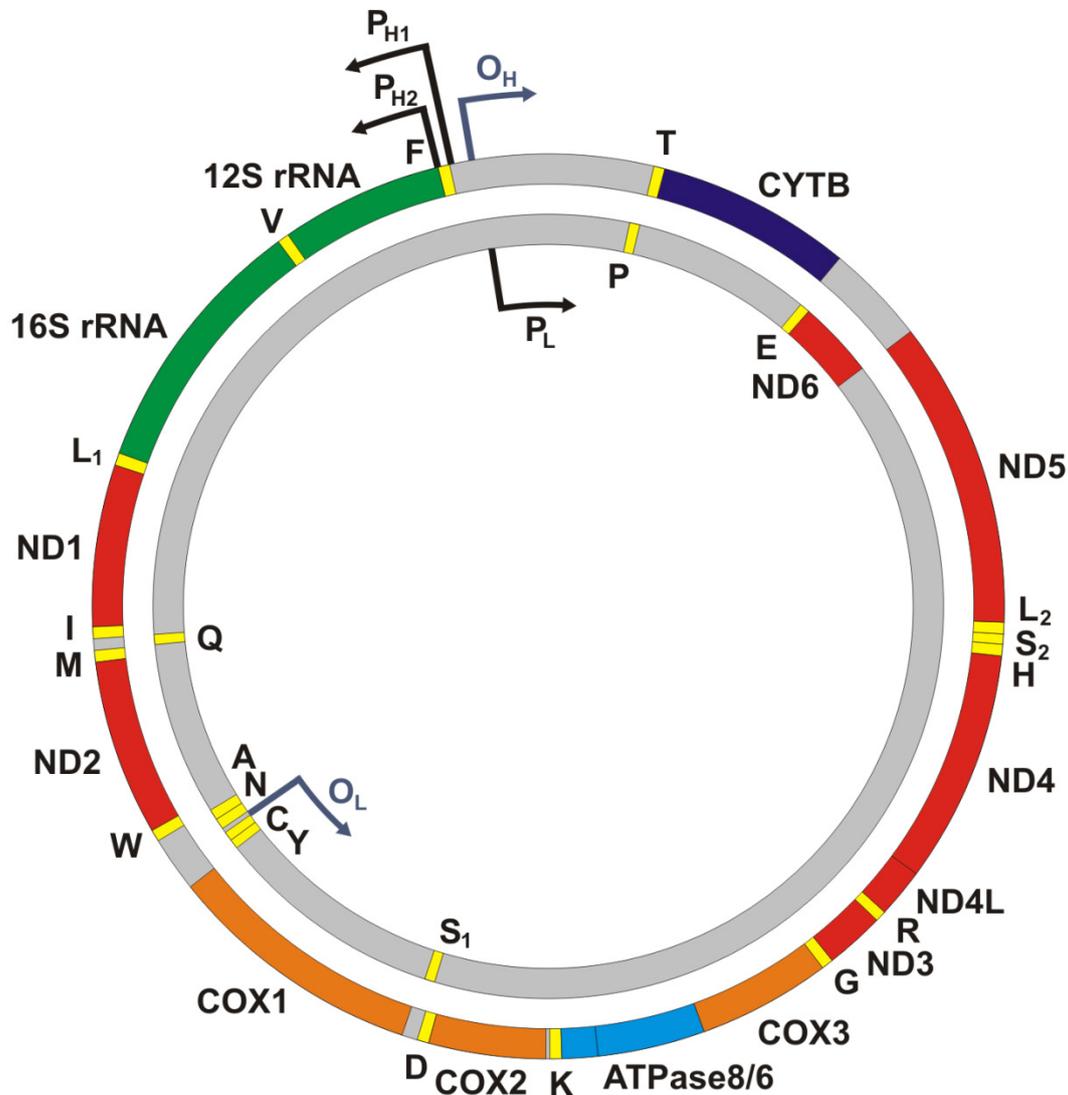


Abb. 1-3: Genkarte des humanen mitochondrialen Genoms

P_L : L-Strang Promotor, P_{H1} und P_{H2} : H-Strang-Promotor, O_L : Replikationsursprung des L-Stranges, O_H : Replikationsursprung des H-Stranges

Die beiden Stränge der mtDNA können aufgrund ihres unterschiedlichen Purin- und Pyrimidingehalts mittels eines Cäsiumchlorid-Gradienten in einen schweren Strang (H-Strang, *heavy*) und einen leichten Strang (L-Strang, *light*) unterschieden werden (Clayton *et al.*, 1970; Kasamatsu und Vinograd, 1974; Berk und Clayton, 1974). Der Großteil der Information ist mit den Genen für zwei rRNAs, 14 tRNAs und 12 Polypeptiden auf dem

H-Strang codiert, während hingegen der L-Strang nur ein Protein- und acht tRNA-Gene trägt. (Anderson *et al.*, 1981; Attardi *et al.*, 1982).

Im Gegensatz zum nukleären Genom ist das mitochondriale Genom extrem kompakt strukturiert. Neben dem Fehlen von Introns grenzen die Gene teilweise ohne jegliche nicht codierende Sequenz direkt aneinander oder überlappen sogar, so dass manche Terminations-Codons erst nach der Transkription durch Polyadenylierung der mRNAs vervollständigt werden. Dabei sind die Protein- und rRNA-codierenden Gene meistens von einem tRNA-Gen flankiert. Dieser Umstand führte zu der Hypothese, dass das Primärtranskript an den tRNA-Sekundärstrukturen durch einen RNase P-ähnlichen Mechanismus gespalten wird (Ojala *et al.*, 1980; Ojala *et al.*, 1981; Clayton, 1984). Insgesamt gibt es nur drei nichtcodierende Regionen, von denen der größte 1123 bp umfasst und als *Displacement-Loop (D-Loop)* bezeichnet wird (Anderson *et al.*, 1981).

Der *D-Loop* stellt einen Bereich dar, der für die Regulation der Replikation und Transkription des mitochondrialen Genoms verantwortlich ist. In ihm liegen die Promotoren für die Transkription sowie den Startpunkt der Replikation des H-Stranges. Die Bezeichnung *Displacement-Loop* beschreibt eine der Hauptkonformationen der mitochondrialen DNA, die an dieser Stelle eine Tripel-DNA-Struktur aufweist. Sie enthält ein kurzes, neu synthetisiertes H-Strang-Molekül (7S-DNA), welches mit dem L-Strang Basenpaarungen eingeht (Crews *et al.*, 1979; Doda *et al.*, 1981; Tapper und Clayton, 1981).

Die mitochondriale DNA kommt vermutlich in DNA-Protein-Komplexen vor, die als *Nucleoids* bezeichnet werden. Sie enthalten bis zu zehn DNA-Moleküle und sind als hunderte von einzelnen Punkten in der Matrix visualisierbar (Nass, 1969; Iborra *et al.*, 2004; Legros *et al.*, 2004). Es wurden bereits mehrere Proteine identifiziert, die in den *Nucleoids* vorkommen, wie zum Beispiel der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM, mtTFA), die mitochondriale DNA-Polymerase γ (POLG), das mitochondriale DNA-Einzelstrangbindeprotein (mtSSB) oder die mitochondriale DNA-Helikase Twinkle (Bogenhagen *et al.*, 2003; Garrido *et al.*, 2003; Wang und Bogenhagen, 2006; Spelbrink, 2009). Zudem wurden auch Proteine gefunden, die mit der inneren Membran assoziiert sind, weshalb man davon ausgeht, dass die *Nucleoids* an der inneren Membran verankert sind (Albring *et al.*, 1977; Barat *et al.*, 1985; Garrido *et al.*, 2003).

1.5. Die Transkription der mitochondrialen DNA

Die für die Transkription und Replikation der mtDNA notwendigen Elemente befinden sich innerhalb des 1123 bp großen *Displacement-Loops (D-Loop)*. Diese, von den Genen für die tRNA^{Phe} und tRNA^{Pro} umrahmte Region (Anderson *et al.*, 1981), beinhaltet neben den Promotoren für den H- bzw. L-Strang, den Replikationsursprung des H-Stranges (O_H), konservierte Sequenzblöcke (CSB I-III) und Terminations-assoziierte Sequenzen (TAS).

Die Steuerung der Transkription bei der humanen mtDNA erfolgt durch drei unabhängige Promotoren: einen H- und L-Strang-Promotor in der *D-Loop*-Region, mit der Bezeichnung HSP1 (*heavy strand promotor 1*) und LSP (*light strand promotor*), und einen zweiten H-Strang-Promotor namens HSP2 (*heavy strand promotor 2*) im tRNA^{Phe}-Gen (Montoya *et al.*, 1982; Bogenhagen *et al.*, 1984).

Die genauen Startpunkte der Transkription des H-Strangs liegen im HSP1 bei dem Nukleotid 561 (IT_{H1}, *initiation of transcription site on the heavy strand 1*) bzw. im HSP2 an Position 638 (IT_{H2}), während die Transkription des L-Stranges bei Position 407 (IT_L, *initiation of transcription site on the light strand*) im LSP startet. IT_{H1} und IT_L werden jeweils von einer 15 bp-Konsensus-Sequenz umrahmt, während der IT_{H2} nur wenig Ähnlichkeit zeigt (Chang und Clayton, 1984; Hixson und Clayton, 1985; Taanman, 1999). Die Transkripte von IT_{H1} beginnen 16 bp stromaufwärts der tRNA^{Phe} und enden am 3'-Ende der 16S rRNA. Die Transkripte des IT_{H2} kommen seltener vor und umfassen fast den gesamten H-Strang (Montoya *et al.*, 1982).

Die Transkription erfolgt durch eine mitochondriale RNA-Polymerase (POLRMT, mtRNAPol), die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu RNA-Polymerasen aus Bakteriophagen aufweist (Masters *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu letzteren besitzt die POLRMT jedoch nicht die Fähigkeit, selbstständig mit der Promotor-DNA zu interagieren und so die Transkription zu initiieren, sondern benötigt dafür zusätzliche trans-aktive Faktoren (Fisher und Clayton, 1985; Prieto-Martin *et al.*, 2001).

Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM, mtTFA) war der erste Transkriptionsfaktor, der in Mitochondrien identifiziert wurde. TFAM hat eine Größe von 25 kDa und ist ein Mitglied der HMG-Familie (*high mobility group*). Über zwei HMG-Box-Domänen stromaufwärts der Initiationsstellen des HSP1 und LSP (-12 bis -39 bp) kann TFAM an den D-Loop der mtDNA binden (Parisi und Clayton, 1991) und sorgt dadurch für ein Entwinden

des Promotor-Bereichs, so dass dieser Bereich für die POLRMT zugänglich wird (Shadel und Clayton, 1997). Der Transkriptionsfaktor bindet präferentiell stärker am LSP als am HSP und verstärkt damit deutlich die Transkription des L-Stranges (Fisher *et al.*, 1987).

Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, die mitochondrialen Transkriptionsfaktoren B1 (TFB1M) und B2 (TFB2M), können einzeln mit der POLRMT heterodimerisieren (Falkenberg *et al.*, 2002).

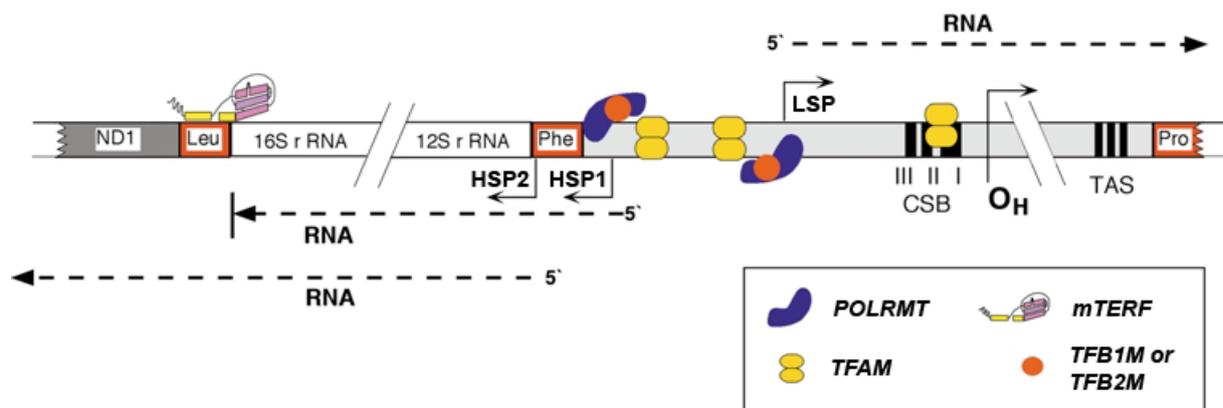


Abb. 1-4: Schematische Übersicht der *D-Loop*-Region in der humanen mtDNA sowie der daran ablaufenden Transkriptionsinitiation

Folgende Elemente mtDNA sind dargestellt: HSP1: H-Strang-Promotor 1, HSP2: H-Strang-Promotor 2, LSP: L-Strang-Promotor, O_H : Replikationsursprung des H-Stranges, CSB I-III: konservierte Sequenzblöcke, TAS: Terminations-assoziierte Sequenzen. Zudem sind folgende bei der Transkription beteiligten Proteine abgebildet: POLRMT: RNA-Polymerase, TFAM: mitochondrialer Transkriptionsfaktor A, TFB1M und TFB2M: mitochondriale Transkriptionsfaktoren B1 und B2, mTERF: Terminationsfaktor (modifiziert nach Fernandez-Silva *et al.*, 2003)

In-vitro-Experimente zeigten, dass die POLRMT nur in Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren in der Lage ist, an den mtDNA-Promotoren zu binden und mit der Transkription zu beginnen (Falkenberg *et al.*, 2002). Der basale Transkriptionsinitiationskomplex besteht demnach aus der POLRMT, TFAM und entweder TFB1M oder TFB2M.

Während die Primärtranskripte vom HSP2 bzw. LSP ausgehend fast über die gesamte Genomlänge reichen, werden vom HSP1 nur kurze Transkripte generiert, die bis zum Ende des 16S rRNA-Gens reichen. Der Terminationsfaktor mTERF unterbindet dabei die Elongation über das 3'-Ende des 16S rRNA-Gens hinaus. Er bindet an der Terminationsstelle im tRNA^{Leu}-Gen und kann die Transkription vermutlich durch eine Interaktion mit der POLRMT stoppen (Fernandez-Silva *et al.*, 1997; Fernandez-Silva *et al.*, 2003). Zudem kann

Einleitung

mTERF die Termination der Transkription auf dem L-Strang einleiten. Inwiefern die Termination der H-Strang-Transkription ausgehend vom HSP2 erfolgt, ist noch ungeklärt.

Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass mTERF zu einer großen Proteinfamilie gehört, die sich über Metazoa und Pflanzen erstreckt. Dabei wurden drei weitere Homologe zu mTERF (neu: mTERF1) entdeckt, die als mTERF2 bis mTERF4 bezeichnet werden (Linder *et al.*, 2005). Bisher wurde jedoch nur für mTERF3 eine Funktion als negativer Regulator der mitochondrialen Transkription gefunden, während den beiden anderen Proteinen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Park *et al.*, 2007).

Um sicherzustellen, dass genügend rRNAs für die Ribosomen des mitochondrialen Translationsapparates zur Verfügung stehen, erfolgt die Transkription ausgehend vom HSP1 10-60-mal häufiger als vom HSP2. Der Terminationsfaktor mTERF interagiert dabei nicht nur mit der Terminationsstelle, sondern zusätzlich auch mit dem Initiationspunkt im HSP1. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Schleife aus der dazwischen befindlichen Region, die eine Reinitiation der Transkription am HSP1 erleichtert (Martin *et al.*, 2005).

1.6. Die mitochondriale RNA-Prozessierung und Proteinbiosynthese

Da die Primärtranskripte der mitochondrialen DNA polycistronisch aufgebaut sind, müssen sie anschließend noch prozessiert werden.

Man geht davon aus, dass die die Protein-Gene flankierenden tRNA-Bereiche in den Primärtranskripten Kleeblatt-ähnliche Sekundärstrukturen ausbilden und dass diese Strukturen als Erkennungsstellen für die Prozessierungsenzyme dienen. Durch die Spaltung der tRNAs an den 5'- und 3'-Enden kommt es gleichzeitig zur Freisetzung der rRNAs und tRNAs. In den Fällen, in denen die Proteingene nicht von einer tRNA flankiert werden, nimmt möglicherweise die Protein-codierende RNA selbst eine Kleeblatt-ähnliche Sekundärstruktur an (Ojala *et al.*, 1980; Ojala *et al.*, 1981; Montoya *et al.*, 1983).

Bereits während oder kurz nach dem Herausschneiden erfolgt die Reifung der mRNAs und rRNAs durch Polyadenylierung am 3'-Ende (Amalric *et al.*, 1978). Dabei werden ohne Vorkommen eines Polyadenylierungssignals durch eine mitochondriale Poly(A)-Polymerase bei den mRNAs ungefähr 55 Adenylreste angehängt, wohingegen der Poly(A)-Schwanz bei den rRNAs nur 1-10 Nukleotide lang ist (Dubin *et al.*, 1982). Somit ist in den Mitochondrien

die Länge der Poly(A)-Schwänze deutlich kürzer als in den Kern-mRNAs, die 200 bis 250 hinzugefügte Adenylreste besitzen. Ein weiterer Unterschied zu zytosolischen mRNAs ist das Fehlen einer 5'Cap-Struktur bei mitochondrialen mRNAs (Grohmann *et al.*, 1978).

Die Polyadenylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der RNAs, und zudem werden unvollständige Stop-Codons (U oder UA) einiger mRNAs erst durch sie zu einem UAA komplettiert. (Ojala *et al.*, 1981). Die Reifung der tRNAs erfolgt durch Anhängen einer CCA-Sequenz durch eine ATP(CTP):tRNA-Nukleotidyltransferase (Doersen *et al.*, 1985; Rossmann *et al.*, 1995).

Die Translation der mitochondrialen mRNAs erfolgt in der Matrix an eigenen Ribosomen, den Mitoribosomen. Diese unterscheiden sich von den zytosolischen Ribosomen in ihrer Zusammensetzung (RNA, Proteinen), ihrer Größe und der Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol (Attardi und Ojala, 1971; Borst und Grivell, 1971). Sie ähneln in starkem Maß prokaryontischen Ribosomen, und auch die Translation verläuft ähnlich wie in Prokaryonten. Allerdings besitzen mitochondriale mRNAs keine 5'-Leader-Sequenz bzw. Shine-Dalgarno-Sequenz, die ein Binden und Erkennen der Ribosomen gestattet (Grohmann *et al.*, 1978), dennoch beginnen sie wie bei Prokaryonten mit dem Codon für N-Formylmethionin (Montoya *et al.*, 1981). Die kleine mitoribosomale Untereinheit bindet die mitochondrialen mRNAs jedoch in einer sequenzunabhängigen Weise (Christopher *et al.*, 1978; Liao und Spremulli, 1989).

Codon	Nukleärer Code	Mitochondrialer Code
AUA	Isoleucin	Methionin
AGA	Arginin	Stop
AGG	Arginin	Stop
UGA	Stop	Tryptophan

Tab. 1-1: Unterschiede zwischen nukleärem und mitochondrialem Code
(O'Brien *et al.*, 1990)

In den Mitochondrien wird im Unterschied zur zytosolischen Transkription ein leicht veränderter Code verwendet (Tab. 1-1). Durch eine Vereinfachung des Codon-Anticodon-Erkennungsmechanismus können alle 61 Codons durch die 22 mitochondrialen tRNAs abgelesen werden, während dafür im Zytoplasma 32 tRNAs notwendig sind (Avner *et al.*,

1989; Osawa *et al.*, 1992). Deshalb können viele mRNAs aus dem Zytoplasma nicht in Mitochondrien und umgekehrt translatiert werden. Mitochondrien stellen daher eine eigene genetische Einheit dar (Brown *et al.*, 1979; Wallace, 1982).

1.7. Die Replikation mitochondrialer DNA

Die Replikation des mitochondrialen Genoms ist nicht an die Synthese der nukleären DNA in der S-Phase gekoppelt (Bogenhagen und Clayton, 1977); sie erfolgt sowohl in sich teilenden als auch in postmitotischen Zellen (Magnusson *et al.*, 2003).

Die mitochondriale DNA wird mittels einer eigenen Replikationsmaschinerie dupliziert. Viele Bestandteile davon wurden bereits charakterisiert, doch bestimmte Enzymaktivitäten, wie zum Beispiel die Primaseaktivität für die Folgestrangsynthese, wurden bisher noch nicht eindeutig charakterisiert (Falkenberg *et al.*, 2007). Über den eigentlichen Mechanismus der mtDNA-Replikation werden kontroverse Debatten geführt. Das bisherige Modell beschreibt, wie die mitochondriale Replikation von zwei Replikationsursprüngen aus asymmetrisch verläuft (Clayton, 1982; Shadel und Clayton, 1997), während das zweite Modell eine symmetrische Replikation der mtDNA annimmt (Holt *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Bowmaker *et al.*, 2003)

Beim asymmetrischen Modell beginnt die Replikation des H-Stranges am O_H , der stromabwärts des LSP liegt. Der für die Initiation benötigte Primer wird durch die vom LSP ausgehende Transkription gebildet (Chang und Clayton, 1985). Das dabei entstehende RNA-Fragment bleibt über die konservierten Sequenzblöcke (CSB I-III) an die DNA gebunden. Zusammen mit dem verdrängten H-Strang bildet dieses RNA/DNA-Hybrid eine stabile dreisträngige Struktur, die als *R-Loop* bezeichnet wird (Xu und Clayton, 1996). Der RNA-Strang wird durch eine Endonukleaseaktivität an bestimmten Stellen in der O_H -Region gespalten und kann daraufhin als Primer für die DNA-Synthese des H-Stranges durch die mitochondriale DNA-Polymerase γ (POLG) dienen (Lee und Clayton, 1997; Graziewicz *et al.*, 2006).

Die Replikation des H-Stranges bricht in den meisten Fällen im Bereich der Terminations-assoziierten Sequenzen (TAS, 700 bp stromabwärts des O_H) ab (Abb. 1-4). Durch den Terminationsvorgang entsteht die sogenannte 7S DNA, die zusammen mit den beiden

Strängen der mtDNA die charakteristische dreisträngige Struktur des *D-Loop* ergibt (Clayton, 1982). Wird jedoch die H-Strang-Synthese weitergeführt, erreicht sie nach 2/3 der Elongation den O_L , wodurch die Replikation des L-Stranges in entgegengesetzter (asymmetrischer) Richtung beginnt. Die verdrängte einzelsträngige DNA am O_L bildet eine *stem-loop*-Struktur aus, die zur Rekrutierung einer möglichen mitochondrialen Primase führt (Wong und Clayton, 1985). Diese synthetisiert in der thymidinreichen Region des Loops den RNA-Primer für die Replikation des L-Stranges. Im Bereich einer Pentanukleotidsequenz an der Basis der Sekundärstruktur erfolgt der Übergang zwischen RNA- und DNA-Synthese (Hixson *et al.*, 1986). Sind beide Stränge repliziert, werden die RNA-Primer entfernt, Lücken aufgefüllt sowie ligiert und superhelikale Windungen in die geschlossenen zirkulären mtDNA-Moleküle eingeführt (Shadel und Clayton, 1997).

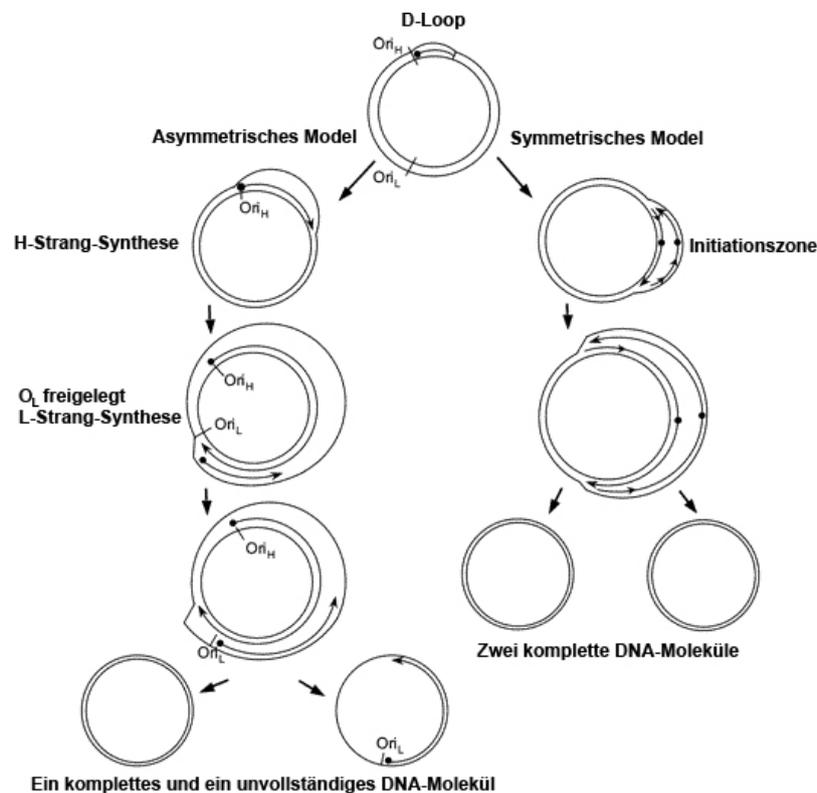


Abb. 1-5: Die zwei Modelle der mitochondrialen Replikation
(modifiziert nach Graziewicz *et al.*, 2006)

Die Initiation der Replikation beim symmetrischen Modell erfolgt an mehreren Startpunkten innerhalb eines 4 kb großen Bereichs, der sich über die Gene CYTB, ND6 und ND5 erstreckt (Bowmaker *et al.*, 2003). Dabei läuft die Synthese der beiden Stränge gleichzeitig in beide

Einleitung

Richtungen ab. Das Modell basiert auf der Untersuchung von Replikationsintermediaten mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese-Experimenten, in denen Strukturen auftraten, die nach dem asymmetrischen Modell nicht zu erklären sind (Holt *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Bowmaker *et al.*, 2003; Holt und Jacobs, 2003).

Neben der POLG sind bei beiden Replikations-Modellen noch eine Reihe weiterer Proteine beteiligt: Dazu zählen unter anderem Topoisomerasen des Typs I und II, die superhelikale Windungen in der mtDNA entfernen bzw. in diese einführen (Castora und Simpson, 1979; Castora *et al.*, 1985) sowie TWINKLE, eine ATP-abhängige Helikase, die doppelsträngige DNA-Regionen entwindet (Spelbrink *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Während der Replikation werden einzelsträngige DNA-Bereiche durch das Protein mtSSB (*single strand binding*) stabilisiert (Hoke *et al.*, 1990; Farr *et al.*, 1999). Am Ende der Replikation wird eine Ligase benötigt, die beide Enden der einzelnen Stränge miteinander verbindet (Berk und Clayton, 1974; Levin und Zimmerman, 1976).

1.8. Proteinimport in Mitochondrien

Mitochondrien enthalten zwischen 1000 (*S. cerevisiae*) und 1500 (*H. sapiens*) verschiedene Proteine (Sickmann *et al.*, 2003; Perocchi *et al.*, 2006; Pagliarini *et al.*, 2008). Von diesen werden allerdings nur rund 1% an den Mitoribosomen der mitochondrialen Matrix synthetisiert, die restlichen 99% an zytosolischen Ribosomen als Präproteine. Deshalb sind die Proteine der mitochondrialen Import- und Faltungsmaschinerie essentiell für das Überleben der Zelle (Neupert und Herrmann, 2007).

Damit die Präproteine zu den Mitochondrien transportiert werden können, enthalten sie Signalsequenzen, die sich bei den Matrixproteinen als Präsequenzen am Aminoterminus der Polypeptidkette befinden. Sie bestehen aus 10 bis 50, in seltenen Fällen auch bis zu 100 Aminosäuren und bilden eine positiv geladene amphipatische α -Helix (Gasser *et al.*, 1982; Suissa und Schatz, 1982; Saitoh *et al.*, 2007). Da nur ungefaltete Proteine durch die Membran transportiert werden können, ist es notwendig, dass das Präprotein durch zytosolische Faktoren, wie zum Beispiel den präsequenzbindenden Faktor (PBF), in einer importfähigen Struktur gehalten wird (Ostermann *et al.*, 1989). Um in die Mitochondrien importiert zu werden, muss die Signalsequenz von den Rezeptoren des Translokationskomplexes der äußeren Membran (TOM, *translocase of the outer membrane*) erkannt werden. Bei diesen

Rezeptoren handelt es sich um Tom20, das die hydrophobe Oberfläche der α -Helix erkennt und diese an Tom22 weiterleitet, das mit der positiv geladenen Oberfläche der Signalsequenz interagiert (Moberg *et al.*, 2004; Saitoh *et al.*, 2007; Yamano *et al.*, 2008). Anschließend wird das Präprotein mit Hilfe von Tom5 an das integrale Membranprotein Tom40 weitergereicht, das einen Kanal für den Transport durch die äußere Membran bildet (Ahting *et al.*, 2001; Model *et al.*, 2008). Nach dem Transport durch die äußere Membran wird das Präprotein über die Intermembranraumdomäne von Tom22 an den Translokationskomplexes der inneren Membran (TIM, *translocase of the inner membrane*), den TIM23-Komplex, weitergeleitet (Komiya *et al.*, 1998; Kanamori *et al.*, 1999; Esaki *et al.*, 2003; Esaki *et al.*, 2004; Chacinska *et al.*, 2005).

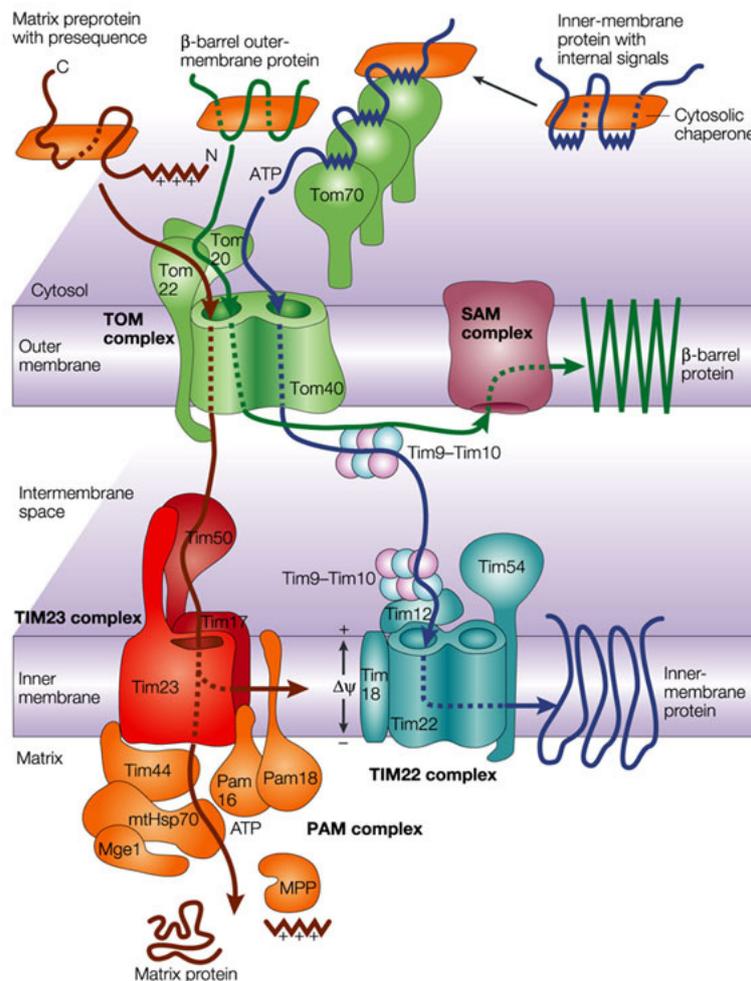


Abb. 1-6: Schema des Proteinimports in Mitochondrien
(Rehling *et al.*, 2004)

Einleitung

Der TIM23-Komplex wird aus drei essentiellen Proteinen gebildet: Tim50 mit einer Rezeptorfunktion im Intermembranraum (Mokranjac *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2009), dem kanalbildenden Protein Tim23 (Meinecke *et al.*, 2006) und Tim17, das an der Rekrutierung des Translokationsmotors und der Sortierung beteiligt ist (Chacinska *et al.*, 2005; Martinez-Caballero *et al.*, 2007). Das Membranpotential spielt eine wichtige Rolle beim Proteintransport, da es den Tim23-Kanal aktiviert. Tim44 ist auf der Matrixoberfläche der inneren Membran mit dem TIM23-Komplex sowie dem mitochondrialen Hitzeschockprotein mtHSP70 (*mitochondrial heat shock protein*) aus der Matrix assoziiert (Krayl *et al.*, 2007; Slutsky-Leiderman *et al.*, 2007), das ATP-abhängig mit dem hereinkommenden Präprotein interagiert und dadurch den aktiven Transport in die Matrix herbeiführt. Nach dem Import in die mitochondriale Matrix wird die Signalsequenz durch spezifische Peptidasen MIP (*mitochondrial intermediate peptidase*) und MPP (*mitochondrial processing peptidase*) abgespaltet (Böhni *et al.*, 1983), und es entsteht das maturierte Protein.

Membranständige Proteine und Proteine, die im Intermembranraum lokalisiert sind, besitzen andere Signalsequenzen, die nicht immer abgetrennt werden. Jedoch werden alle mitochondrial lokalisierten Proteine über den TOM-Komplex in die Mitochondrien eingeschleust (Chacinska *et al.*, 2009).

1.9. Fusion und Fission von Mitochondrien

Mitochondrien sind hochdynamische Organellen und können zum Beispiel in Säugerzellen durch Fusions- und Fissionsvorgänge unterschiedliche Formen annehmen: von langen, netzwerkartigen Strukturen bis hin zu einzelnen kugelförmigen Organellen (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994).

Ein wichtiger Grund für die Fusion und Fission von Mitochondrien ist der Austausch von Matrix- und Membranbestandteilen. So können zum Beispiel Auswirkungen von Mutationen der mtDNA reduziert werden, indem es zu einer funktionellen Komplementierung der Genprodukte kommt (Nakada *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2001).

Die Schlüsselproteine für die Mitochondrienfusion sind zwei große GTPasen; Mitofusin I (Mfn1) und Mitofusin II (Mfn2) (Santel und Fuller, 2001; Chen *et al.*, 2003) - sowie OPA1 (*Optic Atrophy protein 1*) (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Olichon *et al.*, 2006).

Diese Proteine können miteinander interagieren und sind gemeinsam an der mitochondrialen Fusion beteiligt (Guillery *et al.*, 2008).

Die beiden Mitofusine Mfn1 und Mfn2 besitzen eine sehr große Sequenzhomologie (Santel und Fuller, 2001) und werden in nahezu allen Geweben exprimiert. Sie sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, wobei die N-terminale GTPase-Domäne und die C-terminale *coiled-coil*-Domäne in das Zytoplasma ragen. Mfn1 und Mfn2 können sowohl Homodimer als auch Heterodimer ausbilden, wodurch zwei Mitochondrien aneinander gebunden werden. Dies geschieht durch die Interaktion zwischen Heptad repeats zweier *coiled-coil*-Domänen (Chen *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2004; Koshiba *et al.*, 2004). Obwohl die beiden Mitofusine essentiell für die Fusion sind, sind ihre Funktionen bei anderen Vorgängen noch weitgehend unbekannt. Es wird sogar vermutet, dass sie direkt an der Fusion der beiden äußeren Membranen beteiligt sind; dieser Vorgang ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Weitere an der Fusion der äußeren Membran beteiligte Proteine scheinen ein Mitofusin-Bindeprotein (MIB) sowie das Stomatin-ähnliche Protein 2 (Stoml2 bzw. SLP2) zu sein (Eura *et al.*, 2006; Hajek *et al.*, 2007). Ihre Funktion ist jedoch scheinbar, wie bei einigen Proteinen der Bcl-2-Familie, auf die Regulation der Fusion beschränkt. Einen weiteren Regulator stellt Mito-PLD, ein Mitglied der Phospholipase D-Superfamilie, dar (Choi *et al.*, 2006).

Das Protein OPA1 ist beim Menschen in mindestens acht verschiedenen Isoformen zu finden (Delettre *et al.*, 2000). Es ist mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert und besitzt am C-Terminus eine GTPase- sowie eine GTPase-Effektor-Domäne, die in den Intermembranraum ragen (Wong *et al.*, 2000; Griparic *et al.*, 2004).

Wie die Fusion der inneren Membran im Einzelnen abläuft, ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, OPA1 scheint dabei jedoch eine essentielle Rolle zu spielen (Griparic *et al.*, 2004; Ishihara *et al.*, 2006).

Bei der mitochondrialen Fission kommt dem Dynamin-verwandten Protein 1 (Drp1) eine grundlegende Rolle zu. Es besteht aus einer GTPase-, einer Zentral- sowie einer GTPase-Effektor-Domäne und befindet sich sowohl im Zytoplasma verteilt als auch punktförmig an den Mitochondrien lokalisiert (Karbowski *et al.*, 2007; Wasiake *et al.*, 2007). Einige dieser mitochondrialen Foci sind mit späteren Teilungsstellen identisch (Smirnova *et al.*, 2001).

Das zweite wichtige an der Fission beteiligte Protein ist das Fis1, das gleichmäßig über die äußere Membran der Mitochondrien verteilt vorliegt. Es sorgt dafür, dass Drp1 an die

Mitochondrienmembran rekrutiert wird. Anschließend kommt es zu einer Einschnürung der Mitochondrien durch Drp1 und letztendlich zur Teilung (Smirnova *et al.*, 2001).

1.10. Zellen ohne mitochondriales Genom

Zellen, die kein mitochondriales Genom mehr enthalten, werden als ρ^0 -Zellen bezeichnet. Die Standardmethode zur Herstellung solcher Zellen ist die Zugabe von Ethidiumbromid in das Kulturmedium. Da Ethidiumbromid stärker in die mitochondriale DNA als in die Kern-DNA interkaliert, wird die Replikation der mtDNA in Säugerzellen inhibiert, während das Kerngenom weiterhin dupliziert werden kann. Zudem gibt es Berichte über eine spezifische Hemmung der mitochondrialen DNA-Polymerase γ durch Ethidiumbromid (Tarrago-Litvak *et al.*, 1978). Nach einer Langzeitinkubation mit Ethidiumbromid erhält man durch den Verdünnungseffekt ρ^0 -Zellen. Bei den ersten so hergestellten ρ^0 -Zelllinien handelte es sich um Vogelzellen (Desjardins *et al.*, 1985; Morais *et al.*, 1988); später wurde auf diese Weise auch bei anderen Zelllinien die mtDNA entfernt (King und Attardi, 1989; Miller *et al.*, 1996).

Auch andere Substanzen eignen sich für die Entfernung der mtDNA: So wurden zum Beispiel Zellen mit einem interkalierenden Antitumormittel Ditercalinium (Inoue *et al.*, 1997) oder 2'-3'-Didesoxycytidin (Nelson *et al.*, 1997) in den ρ^0 -Zustand versetzt. Als weitere Methode ist der Einsatz von Restriktionsendonukleasen mit einem mitochondrialen Signalpeptid möglich, die in die Mitochondrien importiert werden und dort die mitochondriale DNA zerschneiden (Kukat *et al.*, 2008).

Damit die Zellen überleben, obwohl die Atmungskette in ihren Mitochondrien aufgrund der fehlenden Untereinheiten nicht mehr funktioniert, müssen bestimmte Zusätze dem Kulturmedium zugegeben werden. Bei diesen Zusätzen handelt es sich um Uridin und Pyruvat. Teilweise muss auch, aufgrund der schlechteren Energieausbeute durch die fehlende oxidative Phosphorylierung, die Glucosekonzentration im Medium erhöht werden (King und Attardi, 1996). Da durch die defekte Atmungskette vermutlich die Funktion der Dihydroorotat-Dehydrogenase gestört ist, kann die Zelle kein Cytidin und Thymin mehr synthetisieren. Das zugegebene Uridin kann diesen Mangel jedoch aufheben, weil es in Cytidin und Thymin umgewandelt werden kann. Durch die Supplementierung des Mediums mit Pyruvat kann das bei der Glykolyse gebildete Reduktionsäquivalent NADH wieder zu NAD⁺ oxidiert werden, um für neue Reaktionen zur Verfügung zu stehen.

1.11. Mitochondriale Gendefekte und Erkrankungen

Über die letzten 20 Jahre haben sich mitochondriale Fehlfunktionen als ein wichtiger Faktor bei einer Vielzahl neuromuskulärer und neurodegenerativer Erkrankungen herausgestellt. Da in den Enzymkomplexen der Atmungskette sowohl kern- als auch mitochondrial-codierte Untereinheiten enthalten sind, können sowohl Mutationen im Kerngenom als auch Veränderungen der mitochondrialen DNA zu Beeinträchtigungen der Atmungskette führen.

Die mitochondriale DNA weist im Vergleich zum Kerngenom eine 10-20fach höhere Mutationsrate auf (Brown *et al.*, 1979; Wallace, 1987). Obwohl DNA-Reparatursysteme in Mitochondrien existieren (Dianov *et al.*, 2001; de Souza-Pinto *et al.*, 2009), sind sie nicht ausreichend, um den oxidativen Schaden der mtDNA, der durch die Nähe zu den Atmungsketten-Komplexen und den dort gebildeten Sauerstoffradikalen (ROS, *reactive oxygen species*) entsteht, zu kompensieren (Raha und Robinson, 2000). Zudem fehlt der mitochondrialen DNA die schützende Wirkung von Histon-Proteinen. Dadurch akkumulieren die Mutationen im Laufe des Lebens (Cortopassi *et al.*, 1992).

Die meisten mtDNA-Veränderungen sind neutrale Polymorphismen, die sich bei der Verfolgung menschlicher Migrationsbewegungen als sehr nützlich erwiesen haben (Ingman *et al.*, 2000). Die ersten pathogenen mtDNA-Mutationen wurden im Jahre 1988 identifiziert (Holt *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1988). Seitdem wurden etwa 250 pathogene Mutationen, Punktmutationen und Längenveränderungen der mitochondrialen DNA charakterisiert, die verschiedene Krankheiten mit unterschiedlichen Phänotypen verursachen (McFarland *et al.*, 2007). Da alle im mitochondrialen Genom codierten Gene direkt oder indirekt am Aufbau des OXPHOS-Systems beteiligt sind, verwundert es nicht, dass oft Gewebe mit besonderer Abhängigkeit von der mitochondrialen ATP-Synthese und einem hohen Energieverbrauch betroffen sind, wie zum Beispiel die Herz- und Skelettmuskulatur sowie das visuelle System.

Die Veränderungen der mtDNA kann man in Deletionen und Punktmutationen einteilen. Die meisten Deletionen sind zwischen 1,3 und 8 kb groß und umfassen mehrere Gene (Schon *et al.*, 1989). Sie sind meist zwischen den beiden Replikationsursprüngen O_H und O_L zu finden und sind typischerweise von kurzen Repeatsequenzen flankiert (Samuels *et al.*, 2004; Bua *et al.*, 2006). Punktmutationen können überall auf der mtDNA auftreten, wobei jedoch mehr als die Hälfte der bekannten krankheitsassoziierten Punktmutationen in den tRNA-Genen lokalisiert sind (Wallace *et al.*, 1992). Man bezeichnet sie daher als Hotspots (Lauber *et al.*,

Einleitung

1991). Während Basensubstitutionen in Proteingenen nur einzelne Bestandteile der Atmungskette betreffen, wird durch Mutationen in den tRNA- und rRNA-Genen die gesamte mitochondriale Proteinbiosynthese und somit alle mitochondrial codierten Atmungskettenuntereinheiten beeinträchtigt. Eine Unterversorgung der Zelle mit ATP durch ein inhibiertes bzw. funktionsunfähiges OXPHOS-System ist die Folge (DiMauro *et al.*, 1985).

Sehr häufig treten folgende klinischen Symptome bei den Patienten auf:

- Muskelschwächen
- verschlechterte Sehkraft bis hin zur Erblindung
- epileptische Anfälle
- Gleichgewichtsstörungen

Das späte Auftreten einiger mitochondrialer Erkrankungen lässt sich durch die mitochondriale DNA-Segregation erklären. Hierbei können Tochterzellen entstehen, die entweder nur die mutierte bzw. nur die Wildtyp-mtDNA enthalten (Homoplasmie) oder eine Mischung beider mtDNA-Varianten (Heteroplasmie). Überschreitet der Anteil der mutierten mtDNA dabei einen gewissen Schwellenwert, so zeigen sich erste klinische Symptome (Wallace, 1986).

Im Folgenden sind die wichtigsten mitochondrial bedingten Erkrankungen aufgeführt:

MERFF (Myoclonic epilepsy and ragged red fibers)

Bei dieser Erkrankung ist neben den Muskeln auch das Zentralnervensystem betroffen. Meistens findet sich die Punktmutation 8344A>G im tRNA^{Lys}-Gen (Shoffner *et al.*, 1990; Yoneda *et al.*, 1990; Silvestri *et al.*, 1993).

MELAS (Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes)

Symptome sind häufig Schlaganfall-ähnliche Episoden, Migräne-artige Kopfschmerzen mit Erbrechen, Bewusstseinsstörungen und epileptische Anfälle. In über 80% der Fälle kann eine spezifische Punktmutation (3243A>G) im tRNA^{Leu}-Gen nachgewiesen werden (Goto *et al.*, 1990; Hess *et al.*, 1991). Weitere Mutationen befinden sich ebenfalls in diesem Gen, aber auch in Protein-codierenden Genen.

LHON (Leber's hereditary optic neuropathy)

LHON ist relativ organspezifisch und betrifft meist nur die retinalen Ganglien des Sehnervs. Deshalb äußert sich die Krankheit hauptsächlich durch einen Sehkraftverlust bis hin zur Blindheit. In 95% der Fälle bestehen folgende Punktmutationen: 11778G>A, 3469G>A und 14484T>C (Man *et al.*, 2002).

CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia)

Patienten mit CPEO zeigen eine Lähmung der Augenmuskulatur (Ophthalmoplegie), die überwiegend erst im Erwachsenenalter auftritt. Ursache sind typischerweise Deletionen in der mtDNA (Moraes *et al.*, 1989; van Goethem *et al.*, 2003)

NARP (Neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa)

NARP ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die durch Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa gekennzeichnet ist. Üblicherweise wird NARP durch die Punktmutation 8993T>G ausgelöst (Holt *et al.*, 1990; Rojo *et al.*, 2006).

Leigh Syndrom

Neben geistigem Zurückbleiben oder sogar dem Verlust erworbener Fähigkeiten fallen eine allgemeine Muskelschwäche, Augenbewegungs- und Schluckstörungen sowie Ataxie auf. Als Ursache sind unterschiedliche mtDNA-Mutationen oder auch Veränderungen der nukleären DNA bekannt (Finsterer, 2008).

KSS (Kearns-Sayre syndrome)

Das Kearns-Sayre Syndrom ist als eine spezielle Variante der CPEO anzusehen und betrifft mehrere Organe. Es wird durch verschiedene Deletionen in der mtDNA verursacht (Moraes *et al.*, 1989; Maceluch und Niedziela, 2006).

Daneben sind auch die Parkinson-, Alzheimer- und Huntington-Krankheit mit Mitochondriendefekten assoziiert, allerdings sind dabei Proteine die Auslöser, die im Kerngenom codiert sind und in mitochondriale Funktionen eingreifen (Zeviani und Carelli, 2007).

1.12. Ansätze zur Therapie mitochondrialer Gendefekte

Mitochondrialer Erkrankungen werden bisher unter anderem mit der Gabe stoffwechselaktiver Substanzen (zum Beispiel Cofaktoren von Atmungskettenenzymen) therapiert, die die Defekte im oxidativen Energiestoffwechsel kompensieren sollen. Allerdings konnte diese Therapieform nur in Ausnahmefällen eine deutliche Verbesserung des Gesundheitszustands der Patienten erzielen (Shoffner *et al.*, 1990; Chinnery und Turnbull, 2001; Finsterer, 2009). Eine Heilung ist ausgehend von derartigen Therapieansätzen allein durch die Tatsache, dass letztendlich nur die Symptome behandelt werden, nicht zu erwarten. Dahingegen wären Therapien, die auf den Krankheitsauslöser der Erkrankung abzielen, als chancenreicher anzusehen. Eine denkbare Therapieform wäre die somatische Gentherapie, bei der der Gendefekt der mitochondrialen DNA korrigiert wird. Dazu müsste der Anteil der mutierten mtDNA unter den für die Ausprägung klinischer Symptome notwendigen Schwellenwert gedrückt werden, um die Wiederherstellung des normalen Phänotyps zu ermöglichen. Ideal wäre jedoch eine vollständige Entfernung der mutierten DNA.

Eine Therapie könnte mittels unterschiedlicher Strategien erfolgen:

- Kompetitierung der mutierten Gene durch Einschleusen intakter replikativer und transkriptionsaktiver Gene
- Austausch der mutierten Gene gegen intakte Gene durch Rekombination
- Inhibierung der Replikation mutierter mtDNA durch Antisense-Oligonukleotide
- Degradation mutierter mtDNA

Die ersten drei Strategien sind auf den Transport von Nukleinsäuren in die Mitochondrien angewiesen. Bislang stellt dies allerdings eine große Hürde dar.

Der aktive Transport von kernkodierten RNAs und tRNAs in die Mitochondrien ist bei Hefen (Martin *et al.*, 1979), Protozoen (Simpson und Shaw, 1989) und Pflanzen (Gray und Boer, 1988) bekannt. An isolierten humanen Mitochondrien wurde ebenfalls der Import einer Hefe-tRNA dokumentiert (Entelis *et al.*, 2001). Allerdings ist es bisher nicht gelungen, den Import größerer Nukleinsäuren in Säuger-Mitochondrien *in-vivo* nachzuweisen.

Eine zweite Möglichkeit besteht in der Nutzung physikalischer Transformationsmethoden. So wurde bereits DNA durch Elektroporation in Mitochondrien eingeführt, jedoch waren diese

Mitochondrien vorher aus den Zellen isoliert worden (Collombet *et al.*, 1997). Als weitere physikalische Methode wurde die *Gene Gun* bzw. *Particle Gun* eingesetzt, bei der Mikroprojekteile aus Gold oder Wolfram genutzt werden, um DNA in Zellen zu bringen. Die DNA wird dabei an die Oberfläche der Partikel gebunden und kann am Zielort wieder freigesetzt werden. Bei der Transformation von Chloroplasten in Pflanzen wird diese Methode schon erfolgreich eingesetzt (Kanevski und Maliga, 1994; Barone *et al.*, 2009; De Marchis *et al.*, 2009). Auch in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gelang die Transformation von Chloroplasten und Mitochondrien (Boynton *et al.*, 1988; Yamasaki *et al.*, 2005; Remacle *et al.*, 2006). In Hefezellen konnten ebenfalls Mitochondrien mittels der *Gene Gun* mit exogener DNA beladen werden (Fox *et al.*, 1988; Johnston *et al.*, 1988; Sulo *et al.*, 1995; Meunier, 2001). Diese positiven Ergebnisse beruhen darauf, dass die Zielorganellen in den verwendeten Organismen im Vergleich zu den Mitochondrien in Säugerzellen sehr groß sind. Da die verwendeten Partikel einen Durchmesser von mindestens 0,3 µm haben, ist es zum Beispiel nahezu unmöglich die normalgroßen Mitochondrien menschlicher Zellen zu penetrieren ohne sie dabei zu zerstören. Aufgrund dieses Problems ist auch eine weitere physikalische Transformations-Methode, die Mikroinjektion, in Mitochondrien nicht realisierbar.

Der Protein-Importapparat kann ebenfalls für den Transport von Nukleinsäuren in die Mitochondrien genutzt werden. So wurde gezeigt, dass Konjugate aus einem mitochondrialen Signalpeptid und doppelsträngiger DNA mit einer Länge von 17 bis 322 bp in die Matrix isolierter Mitochondrien importiert werden können. Die Länge der DNA zeigte dabei keinen Einfluss auf das Importverhalten, so dass man davon ausgehen kann, dass auch längere DNA-Moleküle auf diese Weise eingeschleust werden können (Seibel *et al.*, 1995).

Des Weiteren wurde versucht, größere DNA-Moleküle mit Hilfe von kationischen Lipidvesikeln durch die Plasmamembran der Zelle bis in die Nähe der Mitochondrien zu bringen. Dazu wurde ein 5,3 kb großes Plasmid in sogenannte DQAsomen verpackt, die ihren Inhalt nach dem Kontakt mit Mitochondrienmembranen freisetzen sollen (D'Souza *et al.*, 2005). Zudem wurde das Plasmid zusätzlich noch mit einer mitochondrialen Signalsequenz versehen, um nach Freisetzung aus den Vesikeln einen Import in die Mitochondrien zu erlauben.

Die Nutzung von Signalpeptiden eröffnet die Möglichkeit der Antisense-Strategie. Antisense-Nukleotide binden spezifisch an die gewünschten DNA-Sequenzen und verhindern ihre

Einleitung

Replikation, wodurch eine Verschiebung des heteroplasmatischen Verhältnisses von mutierter zu Wildtyp-mtDNA zugunsten der Wildtyp-mtDNA die Folge ist. In diesem Zusammenhang wird der Einsatz von Peptidnukleinsäuren (PNAs, *peptide nucleic acids*) erforscht, welche synthetische DNA-Analoga sind, in denen das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat durch Peptide ersetzt ist. *In-vitro* konnten die PNAs die Synthese mutierter mtDNA blockieren, bei primären Zelllinien von Patienten konnte jedoch keinerlei Einfluss auf das heteroplasmatische Verhältnis von mutierter zu Wildtyp-mtDNA festgestellt werden (Taylor *et al.*, 1997; Chinnery *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Flierl *et al.*, 2003).

Für die letzte Strategie zur Behandlung mitochondrialer Gendefekte ist kein Transport von Nukleinsäuren in die Mitochondrien notwendig. Vielmehr werden die Zellen mit einem nukleären Expressionsvektor behandelt, der ein Gen für eine Restriktionsendonuklease mit einer mitochondrialen Signalsequenz trägt. Das Fusionsprotein wird im Zytosol synthetisiert und in die Mitochondrien transportiert, wo es anschließend mitochondriale DNA mit der passenden Erkennungssequenz spalten kann (Tanaka *et al.*, 2002). Allerdings ist diese Methode nur anwendbar, wenn durch die Mutationen der mtDNA spezifische Restriktionsschnittstellen entstehen, die in der Wildtyp-mtDNA nicht vorkommen, da sonst alle mtDNA-Moleküle durch die Restriktionsendonuklease zerstört werden.

1.13. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu finden, mit der es möglich ist, exogene DNA in die Mitochondrien menschlicher Zellen einzubringen. Dazu sollten mehrere physikalische Transfektionsmethoden auf ihre Eignung überprüft werden: der Beschuss von Zellen mit der *Gene Gun*, der Einsatz magnetischer Partikel sowie die Mikroinjektion, die durch die in der Arbeitsgruppe entwickelten Methoden zur Induktion von Megamitochondrien erst ermöglicht wird.

Zuvor sollten die dafür benötigten Plasmidvektoren konstruiert werden. Diese Vektoren sollten in Mitochondrien transkriptions- und replikationsaktiv sein und ein Reporter gen besitzen, das den Nachweis einer gelungenen Transfektion ermöglicht.

2. Material

2.1. Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften
143B.TK ⁻	Organismus: <i>Homo sapiens</i> , weiblich Ursprung: Osteosarkoma adhärent
143B.TK ⁻ +pEGFP-Mito	Organismus: <i>Homo sapiens</i> , weiblich Ursprung: Osteosarkoma adhärent stabil transfiziert mit pEGFP-Mito (2.4.3), dadurch grün-fluoreszierende Mitochondrien (Matrix)
143B.TK ⁻ +pEGFP-OMP	Organismus: <i>Homo sapiens</i> , weiblich Ursprung: Osteosarkoma adhärent stabil transfiziert mit pEGFP-OMP (2.4.5), dadurch grün-fluoreszierende Mitochondrienmembranen (äußere Membran)
143B.TK ⁻ K7	Organismus: <i>Homo sapiens</i> , weiblich Ursprung: Osteosarkoma adhärent Zelllinie ohne mitochondriale DNA, hergestellt durch Transfektion mit einer mitochondrial lokalisierten Restriktionsendonuklease
HeLa 296-1	Organismus: <i>Homo sapiens</i> , weiblich Ursprung: Cervixkarzinom adhärent Zelllinie mit einer Chloramphenicol-Resistenz durch eine Punktmutation (T2991C) in der mitochondrialen 16S rRNA

Tab. 2-1: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Material

2.2. Zellkulturmedien

Zelllinie	Zusammensetzung
143B.TK ⁻	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
143B.TK ⁻ +pEGFP-Mito	mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l Glucose, stabilem Glutamin und
143B.TK ⁻ +pEGFP-OMP	Natriumpyruvat 5% FCS 100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU)
143B.TK ⁻ K7	Kultivierungsmedium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l Glucose, stabilem Glutamin und Natriumpyruvat 5% FCS 100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU) 50 µg/ml Uridin Selektionsmedium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l Glucose und stabilem Glutamin, ohne Natriumpyruvat 5% dialysiertes FCS 100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrdU)
HeLa 296-1	Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, 2,2 g/l NaHCO ₃ und stabilem Glutamin 5% FCS 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) 100 µg/ml Chloramphenicol

Tab. 2-2: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien

2.3. Bakterien

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ mk ⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Plasmidvermehrung und Standard-Klonierungen
<i>E. coli</i> JM110	rpsL (Str ^R) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q Z Δ M15]	Plasmidvermehrung ohne dam/dcm-Methylierung
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Klonierungen mit TOPO [®] - Vektoren
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)]	Plasmidvermehrung, Standard- Klonierungen und Mutagenese- Ansätze

Tab. 2-3: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme

2.4. Plasmidvektoren

2.4.1. pMAG2-1

Der Vektor pMAG2-1 enthält die Basen 15904 bis 677 der humanen mitochondrialen DNA und somit den vollständigen *D-Loop*. Er wurde als Ausgangsvektor für die Herstellung der mitochondrialen Expressionsvektoren verwendet.

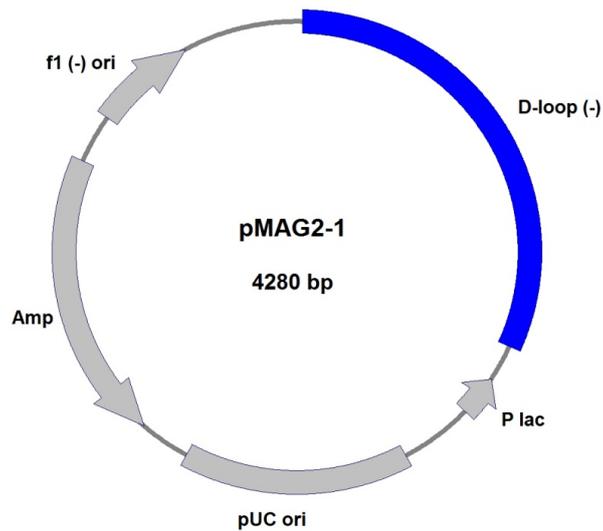


Abb. 2-1: Vektorkarte von pMAG2-1

2.4.2. pMAG2-2

Der Vektor pMAG2-2 enthält wie der Vektor pMAG2-1 den vollständigen *D-Loop* der humanen mitochondrialen DNA und trägt zusätzlich die Transkriptions-Terminations-Sequenz (TTS). Er diente ebenfalls als Ausgangsvektor für die Herstellung der mitochondrialen Expressionsvektoren.

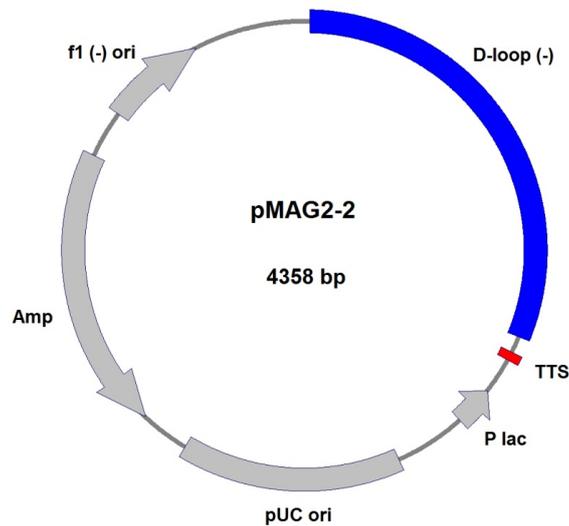


Abb. 2-2: Vektorkarte von pMAG2-2

2.4.3. pEGFP-Mito

Dieser Vektor trägt das Gen für EGFP, an dessen C-Terminus das Signalpeptid der menschlichen Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 8 fusioniert wurde. Dadurch wird das Protein in die Matrix der Mitochondrien transportiert.

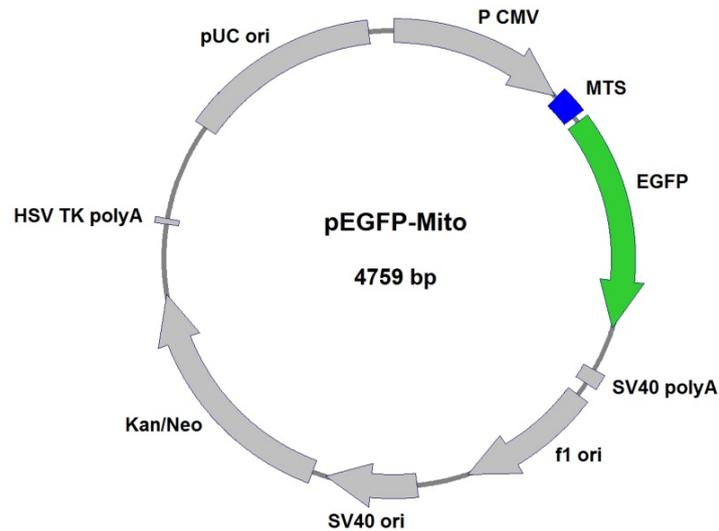


Abb. 2-3: Vektorkarte von pEGFP-Mito

2.4.4. pEGFP-N1

Der Vektor pEGFP-N1 der Firma Clontech ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins, an dessen N-Terminus EGFP lokalisiert ist. Wird der Vektor ohne inklonierte Sequenzen eingesetzt, ist das EGFP im gesamten Cytoplasma und dem Zellkern sichtbar.

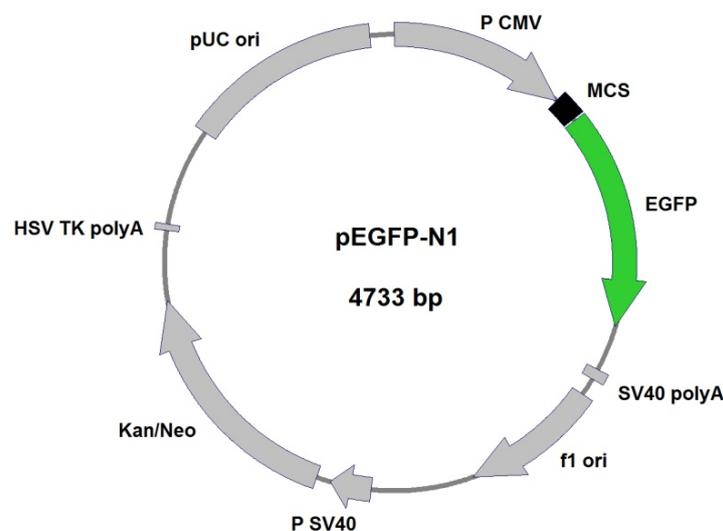


Abb. 2-4: Vektorkarte von pEGFP-N1

Material

2.4.5. pEGFP-OMP

Dieser Vektor trägt das Gen für EGFP, an dessen N-Terminus der membranständige Teil des menschlichen OMP25-Proteins fusioniert wurde. Dadurch ist das Fusionsprotein in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert.

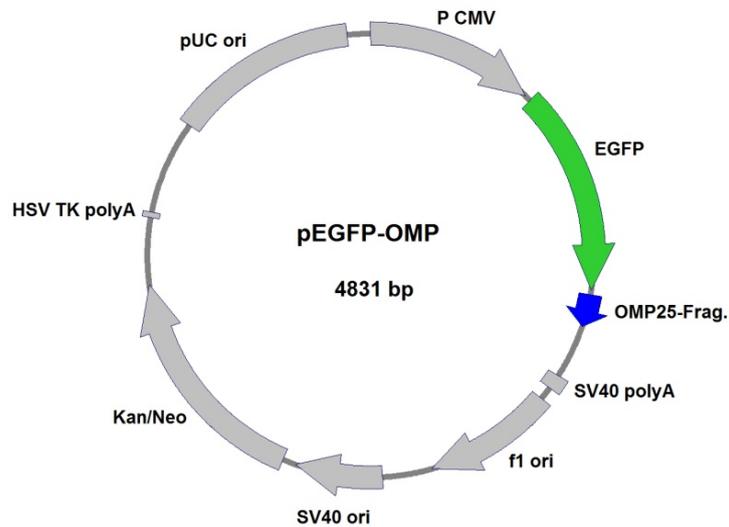


Abb. 2-5: Vektorkarte von pEGFP-OMP

2.4.6. pAR1219

Das Plasmid pAR1219 enthält das Gen für die T7-RNA-Polymerase hinter einem lacUV5-Promotor. Es diente als Template für PCR-Reaktionen bei den Klonierungen der T7-RNA-Polymerase.

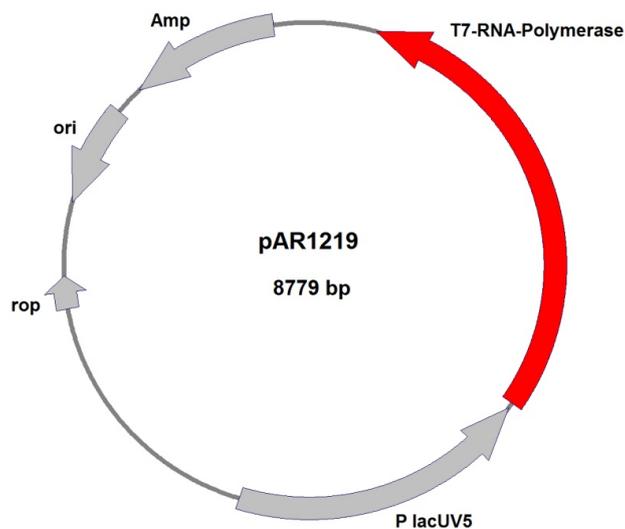


Abb. 2-6: Vektorkarte von pAR1219

2.4.7. pCR[®] II-TOPO[®]

Dieser Vektor ist Teil des TOPO[®] TA Cloning[®] Kit Dual Promoter der Firma Invitrogen. Er wurde zur Klonierung von PCR-Produkten mit einem Adenosin-Überhang am 3'-Ende verwendet. Das enthaltene lac-Operon ermöglicht eine Blau-Weiß-Selektion zur Identifizierung positiver Klone.

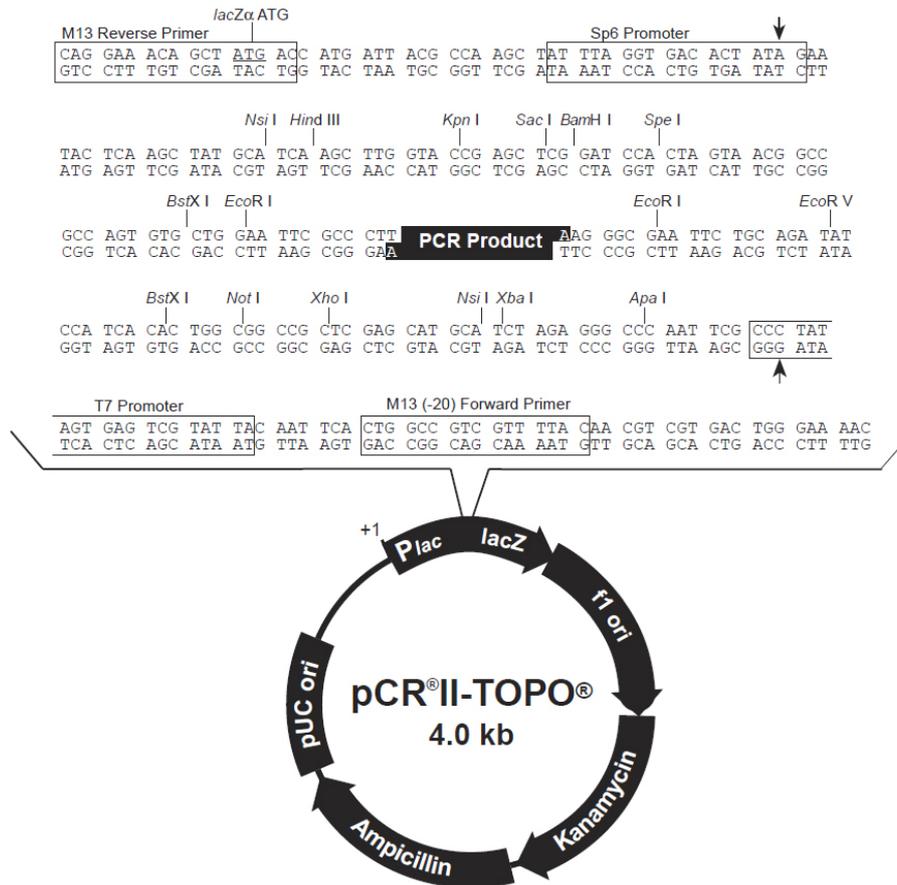


Abb. 2-7: Vektorkarte und MCS von pCR[®] II-TOPO[®]
(Quelle: TOPO[®] TA Cloning[®] Kit Dual Promoter, Invitrogen, 2006)

2.4.8. pCR[®] -XL-TOPO[®]

Dieser Vektor aus dem TOPO[®] XL PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen wird vor allem zur Klonierung großer PCR-Produkte (>3 kb) mit einem 3'-Adenosin-Überhang eingesetzt. Analog zur Verwendung von pCR[®] II-TOPO[®] ist eine Blau-Weiß-Selektion möglich.

Material

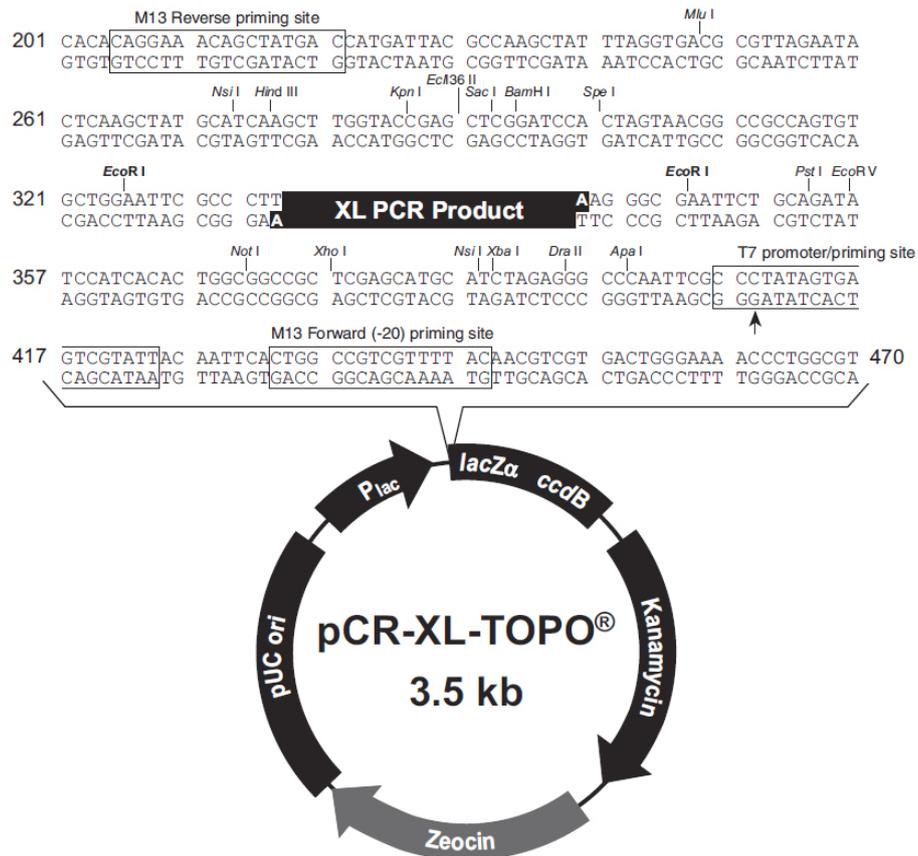


Abb. 2-8: Vektorkarte und MCS von pCR[®]-XL-TOPO[®]
(Quelle: TOPO[®] XL PCR Cloning Kit, Invitrogen, 2004)

2.5. Oligodesoxynukleotide

Name	Sequenz	
01562-FOR	GCGCTGCAGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCAC	O
03351-REV	AATCTCGAGATTAGAATGGGTACAATGAG	T
05465-FOR	ACCACGCTACTCCTACCTATC	X
06266-REV	TCCGGCCTCCACTATAGCAG	X
3'-ND4L-Psi	CGCTTATAATGAGGGGCATTTGG	O
3'-T7-trnK-HindIII	GCGCAAGCTTCACTGTAAAGAGGTGTTGGTTCTCTTAATCTTTAACTTAAAAG GTTAATGCTAAGTTAGCTTTACAGTGGGCTCTAGAGGGGGTAGAGGGGGTGC TACGCGAACGCG	B
5'-Bcl1-trnD-T7	CGTGATCACAAAAGGTATTAGAAAACCATTTTCATAACTTTGTCAAAGTT AAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGAACACGATTAAC	B

5'-Xho-T7p-Cox3	GCGCTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGATGAGGGTCTTAC	O
Anker2	CGGACGTCACGCGTCGACCTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	E
EGFP-001-FOR (4)	CTTTTGGTCTCAATGATGGTGAGCAAGGG	T
EGFP-068-FOR	TAAACGGCCACAAGTTCAGCG	T
EGFP-156-FOR	CAAGCTGCCCCGTGCCCTGACCCACCCTCGTGACCAC	T
EGFP-191-REV	GTGGTCACGAGGGTGGGTCAGGGCACGGGCAGCTTG	T
EGFP-283-FOR	CAGGAGCGCACCATCTTC	T
EGFP-424-REV	GCTTGTGCCCCAGGATGT	T
EGFP-655-REV	TGTGATCGCGCTTCTCGTT	T
EGFP-716-REV (4)	GTTAGTGGTCTCTATTTGTACAGCTCGTCC	T
GFP Link 1	AGCTTGAAGACGCTAAGATGAGGGTCTTACTCTTTTAGTATAAATAGT	X
GFP Link 2	CGGTACTATTTATACTAAAAGAGTAAGACCCTCATCTTAGCGTCTCA	X
GFP Link 3	ACCGTTAACTTCCAATTAAGTATTTGACAACATTCAAAAAAGAGTA	X
GFP Link 4	TCATTACTCTTTTTGAATGTTGTCAAACTAGTTAATTGGAAGTTAA	X
GFP Link 5	AAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTCGACTCATTAAA	X
GFP Link 6	ATAATTTAATGAGTCGAAATCATTCGTTTTGTTTAACTATATACCA	X
GFP Link 7	TTATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTTTTTCGTCCTCT	X
GFP Link 8	GATCAGAAGACGAAAAAATGAGGGGCATTTGGTAAATATGATTATC	X
pEGFP-Mito-0597-FOR	GGCCAAATGTCCGTCCTGACG	T
T7-0001-FOR	ATCCACCGGTCGCCACCATGAACACGATTAACATCG	T
T7-0912-FOR	CACTGATGCGCTACGAAGAC	M
T7-1506-REV	CCACCAAGTGTCTCCAG	M
T7-2018-REV	GCCTGATTCGGCTGAGTG	M
T7-2391-FOR	GGCACACGAGAAGTACGG	M
T7-2559-REV	CAACTGGTCAGCGAACTGG	M
T7-2651-REV	AGTCGCGGCCGCTCTACGCGAACGCGA	T
UAPkurz	GTCACGCGTCGACCTAC	E

Tab. 2-4: Auflistung der eingesetzten Oligodesoxynukleotide

Hersteller: B - biomers.net, E - Eurogentec, M - Microsynth, O - Operon, T - Thermo, X - eigene Herstellung

2.6. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien bis auf die unten aufgeführten wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) in Analysequalität bezogen. Für Wasch-, Färbe- und Entfärbe-Lösungen wurden Alkohole technischer Qualität eingesetzt.

Bovines Serum Albumin	Biochrom, Berlin
Blocking Reagent	Roche, Mannheim
DNA-Agar™	Serva, Heidelberg
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
FuGENE® HD	Roche, Mannheim
G-418 (Geneticin)	Invitrogen, Karlsruhe
MATra-A	IBA, Göttingen
METAFACTENE® PRO	Biotex, Martinsried
MitoTracker® Deep Red FM	Invitrogen, Karlsruhe
MitoTracker® Red CMXRos	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat-Lösung	Biochrom, Berlin
Nicht-essentielle-Aminosäuren-Konzentrat	Biochrom, Berlin
NuSieve® 3:1 Agarose	Cambrex, Rockland, USA
NuSieve® GTG Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Random Hexamer Primer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock™ RNase-Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
rNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SeaKem® GTGNuSieve® GTG Agarose	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
SeaKem® LE Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Zellkulturmedien	Biochrom, Berlin

2.7. Enzyme

DNase I (RNase-frei)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M. MBI Fermentas, St. Leon-Rot Roche, Mannheim Boehringer, Ingelheim am Rhein
RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A (DNase-frei)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
S1 Nuklease	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	eigene Herstellung

2.8. Kits

DIG DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
NucleoBond® PC 500 Kit	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I/II	Peqlab, Erlangen
TOPO® TA Cloning® Kit Dual Promoter	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
VenorGeM® Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

Material

2.9. Antikörper

Antigen/ Konjugat	Bezeichnung	Hersteller/ Bestellnummer	Herkunft	Konzentration	Verdünnung
Digoxigenin - Alkalische Phosphatase	Anti-Digoxigenin- AP, Fab fragments from sheep	Roche 11093274910	Schaf polyklonal	0,75 U/ μ l	1:10.000
T7-RNA- Polymerase	T7 RNA Polymerase Monoclonal Antibody	Novagen 70566	Maus monoklonal	1 mg/ml	WB: 1:10.000 IF: 1:150
Ziege anti-Maus - Alkalische Phosphatase	Ziege anti-Maus IgG, Fc -Alk. Phos., MinX Hu,Bo,Ho	Dianova 115-055-071	Ziege polyklonal		1:10.000
Ziege anti-Maus - AlexaFluor 488	Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG (H+L) *highly cross- adsorbed*	Invitrogen A-11029	Ziege	2 mg/ml	1:250

Tab. 2-5: Auflistung der verwendeten Antikörper

2.10. Längenstandards

Alle verwendeten DNA- und Protein-Längenstandards wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Als DNA-Längenstandard diente für kleinere Fragmente bis 1 kb der GeneRuler[™] 100 bp Ladder Plus, für größere der Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker und bei Gelelektrophoresen mit mitochondrialer DNA der Lambda Mix Marker.

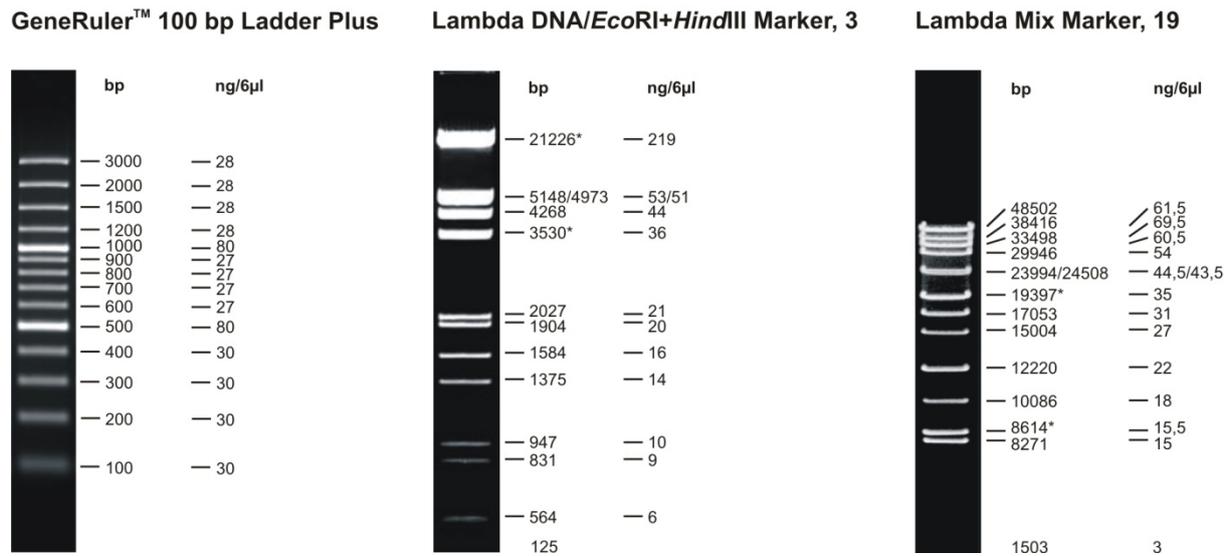


Abb. 2-9: Verwendete DNA-Längenstandards
(Quelle: www.fermentas.com)

Als Protein-Längenstandard diente der Unstained Protein Molecular Weight Marker.

Unstained Protein Molecular Weight

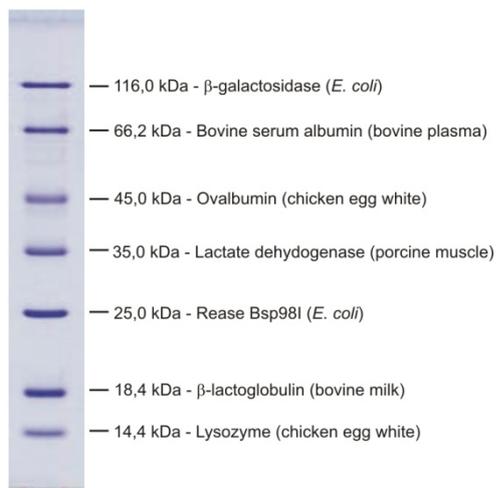


Abb. 2-10: Verwendeter Protein-Längenstandard
(Quelle: www.fermentas.com)

2.11. Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung	20% Methanol (v/v) (oder Ethanol) 10% Essigsäure (v/v) 0,1% Coomassie Brilliantblau R-250
Coomassie-Entfärbelösung	20% Methanol (v/v) (oder Ethanol) 10% Essigsäure (v/v)
6× DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 60 mM EDTA 60% Glycerin 0,2% Orange G
DIG-Detektionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl
25× FCS-Dialyse-Puffer	625 mM Tris-HCl (pH 7,5) 3,425 M NaCl 125 mM KCl
GTE-Lösung 1	25 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 50 mM Glucose + 1 Spatelspitze RNase A Lagerung bei 4°C
GTE-Lösung 2	0,2 M NaOH 1% SDS (w/v)
GTE-Lösung 3	3 M Kaliumacetat 11,5% Essigsäure
Homogenisierungspuffer I (pH 7,1)	20 mM HEPES 0,9 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM EDTA 5 mM KCl 137 mM NaCl 55 mM Glucose

Homogenisierungspuffer II (pH 7,4)	10 mM HEPES 10 mM EDTA 1% SDS (w/v)
10× Laemmli-Laufpuffer	3,03 g Tris (Endkonz. 250 mM) 144 g Glycin (Endkonz. 1,92 M) 10 g SDS (Endkonz. 1% (w/v) ad 1 l ddH ₂ O
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren
1× Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
ML-Puffer (<i>mitochondria lysis buffer</i>)	25 mM HEPES-KOH (pH7,6) 5 mM MgCl ₂ 0,5 mM EDTA 1 mM DTT 1 mM PMSF 10% Glycerin (v/v)
Mowiol Einbettmedium	6 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 1 h bei RT unter Rühren lösen + 6 ml ddH ₂ O 1 h bei RT rühren + 12,0 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) 2 h bei 50°C inkubieren und alle 20 min für 2 min rühren + 25 mg/ml DABCO lösen bis klar, 15 min bei 5.000× g zentrifugieren Überstand aliquotiert bei -20°C lagern

Material

MS-Puffer (<i>mitochondria suspension buffer</i>)	10 mM Tris-HCl (pH 6,7) 0,25 mM Sucrose (Analysequalität) 0,15 mM MgCl ₂
50× NBT/BCIP-Lösung	70% DMSO (v/v) 18,75 mg/ml NBT (Endkonz.: ~23 mM) 9,4 mg/ml BCIP (Endkonz.: ~22 mM) Lagerung bei 4°C
NZY ⁺ -Medium	10 g NZ-Amin (Casein-Hydrolysat) 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren + 12,5 ml 1 M MgCl ₂ + 12,5 ml 1 M MgSO ₄ + 20 ml 1 M Glucose (sterilfiltriert)
PAGE-Lösung A	Acrylamid 4K (30%) – Mix 37,5:1
PAGE-Lösung B	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
PAGE-Lösung C	10% SDS (w/v)
PAGE-Lösung D	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
10× PBS (pH 7,4)	80 g NaCl (Endkonz.: 1,37 M) 2 g KCl (Endkonz.: 27 mM) 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O (Endkonz.: 100 mM) 2,4 g KH ₂ PO ₄ (Endkonz.: 19,2 mM) ad 1 l ddH ₂ O
10× <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer (mit Mg ²⁺)	200 mM Tris-HCl (pH 8,8) 100 mM KCl 60 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgSO ₄ 1% Triton X-100 1 mg/ml BSA Lagerung bei -20°C

Ponceau S-Färbelösung	3% Trichloressigsäure (w/v) 0,2% Ponceau S (w/v)
4× Protein-Probenpuffer	200 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8% SDS (w/v) 40% Glycerin (v/v) 20% β-Mercaptoethanol 0,04% Bromphenolblau (w/v)
10× Southern-Blocking Solution	1× Maleinsäurepuffer 10% Blocking Reagent (w/v) Verdünnungen mit 1× Maleinsäurepuffer herstellen
Southern-Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Southern-Hybridisierungspuffer	5× SSC 0,1% N-Lauroylsarcosin (w/v) 25% Formamid (v/v) 0,02% SDS (w/v) 2× Southern-Blocking Solution
Southern-Waschpuffer	1× Maleinsäurepuffer 0,3% Tween 20 (v/v)
20× SSC	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat
5× Sucrose-TE-Puffer (STE)	100 mM Tris-HCl (pH 7,0) 10 mM EDTA 1250 mM Sucrose (Haushaltszucker)
5× Sucrose-TE-Puffer+ (STE+)	100 mM Tris-HCl (pH 7,0) 10 mM EDTA 1250 mM Sucrose (Analysequalität)
1× Sucrose-TE-Puffer mit MgCl ₂ (STEM)	20 mM Tris-HCl (pH 7,0) 2 mM EDTA 250 mM Sucrose (Analysequalität) 50 mM MgCl ₂

Material

50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l ddH ₂ O
10× <i>Taq</i> -Reaktionspuffer (mit Mg ²⁺)	100 mM Tris-HCl (pH 9,0) 500 mM KCl 1% Triton X-100 15 mM MgCl ₂ Lagerung bei -20°C
10× <i>Taq</i> -(NH ₄) ₂ SO ₄ -Reaktionspuffer (mit Mg ²⁺)	670 mM Tris-HCl (pH 8,8) 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Tween 20 25 mM MgCl ₂ Lagerung bei -20°C
10× TBS	100 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1,5 M NaCl
10× TBST	100 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1,5 M NaCl 1% Tween 20 (v/v)
10× TE-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,4) 10 mM EDTA
2× Transkriptionspuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 20 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 200 µg/ml BSA 20% Glycerin (v/v) sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
Transkriptions-Stop-Puffer	10 mM Tris 0,3 M Natriumacetat (pH 7,0) 15 mM EDTA 0,5% SDS (w/v) mit HCl auf pH 8,0 einstellen Lagerung bei -20°C

1× TSS	LB-Medium 10% PEG 4000 (w/v) 5% DMSO (v/v) 40 mM MgCl ₂ sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
Western-Blockierlösung	1× TBST 5% Magermilchpulver
Western-Transferpuffer	0,303 g Tris (Endkonz. 25 mM) 14,4 g Glycin (Endkonz. 192 mM) 1 g SDS (Endkonz. 0,1% (w/v)) 20% Methanol (v/v) ad 1 l ddH ₂ O

2.12. Verbrauchsmaterialien

Corex-Glas-Zentrifugenröhrchen	Corning, Lowell, USA
Dialyseschlauch Spectra/Por 3, 12-14 kDa	Spectrum, Breda, Niederlande
Dialyseschlauch Spectra/Por 4, 3,5 kDa	Spectrum, Breda, Niederlande
Filterspitzen	Greiner, Frickenhausen
Goldpartikel	Bio-Rad, München
Handschuhe	Paul Hartmann, Heidenheim
Injektionskapillare FemtoTip II	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen, 2 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Macrocarrier	Bio-Rad, München
Messküvette (Glas)	Hellma, Müllheim
Messküvette (Kunststoff)	Carl Roth, Karlsruhe
Miracloth	Merck Chemicals, Nottingham, UK
Nylon-Membran (Porablot NY ⁺)	Macherey-Nagel, Düren
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Gefäße	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg

Material

PVDF-Membran Immobilion-P	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen für Zellzähler	Beckman-Coulter, Krefeld
Rupture Disks	Bio-Rad, München
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellklingen	Bayha, Tuttlingen
Spritzenfilter Millex, 0,2 µm	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter Steritop, 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Sterilindikator-Klebeband	Hartenstein, Würzburg
Stopping Screens	Bio-Rad, München
UVette	Eppendorf, Hamburg
Verbandmull	Paul Hartmann, Heidenheim
Vernichtungsbeutel	Carl Roth, Karlsruhe
Verschlussklammern Toppits	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden
Whatman-Papier 3MM Chr	Whatman, Dassel
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen mit Glasboden	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.13. Geräte

Autoklav V-150 Systec	Laborsystemtechnik, Wetttenberg
Bakterienbrutschrank Heraeus FL B 12	Kendro, Langenselbold
Destille Water still A4000D	Aquatron, Kungsham, Schweden
Eismaschine AF 100 Scotsman	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer i-Mupid	Eurogentec, Köln
Elektrophoresekammer Mini PROTEAN 3	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer Owl B1A, B3 und A6	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Feinwaage Sartorius CP 64	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop DMI4000 B	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop DMI6000 B	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

Gefrierschrank -20°C Premium NoFrost	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank -80°C Forma -86C ULT	Thermo Electron, Karlsruhe
Gene Gun PDS-1000/He	Bio-Rad, München
Glas-Homogenisator POTTER S, 60 ml	Sartorius, Göttingen
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop SP5	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Laborschüttler Ika KS 260 Basic	IKA® Werke, Staufen
Magnetrührer MR 3001K	Heidolph, Schwabach
Mikroinjektor FemtoJet	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator InjectMan NI 2	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle MW 500 PROFI	AEG, Aachen
Mixer Waring Blender 8011EG	Waring, Torrington, USA
Netzteile E833 und E861	Consort, Turnhout, Belgien
PCR-System GeneAmp 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Phasenkontrastmikroskop DMIL	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
pH-Meter pH 740 WTW	Inolab, Weilheim
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Research (2,5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf, Hamburg
Plattentrockner SGD2000	Thermo Electron, Karlsruhe
Roto Shake Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Roller Mixer SRT1	Bibby Sterilin LTD., Staffordshire, UK
Schüttler Forma orbital shaker	Thermo Electron, Karlsruhe
Schwarzweiss-Kamera DFC-350FX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
SpeedVac SPD111V	Thermo Electron, Karlsruhe
Spülmaschine Professional G 7883 CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank HeraSafe HSP 12	Kendro, Langenselbold
Stickstofflagertank CryoPlus 2	Thermo Electron, Karlsruhe
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank FD 240	Binder, Tuttlingen
Ultra-Turrax T25 basic	IKA-Werke, Staufen
Ultrazentrifuge Optima L-100 XP	Beckman-Coulter, Krefeld
UV-Transluminator mit Videokamerasystem	Biozym, Hessisch Oldendorf
Alphaimager™ Biozym/Alpha Innotech	
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Material

Waage Sartorius CP 3202 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Memmert WB 22	Memmert GmbH, Schwabach
Zellzähler ViCell XR	Beckman-Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC28-S	Kendro, Langenselbold

2.14. Software und Datenbanken

Adobe Acrobat X Standard	Adobe Systems GmbH, München
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems GmbH, München
AlphaEase FC und AlphaVIEW	Biozym, Hessisch Oldendorf
BioEdit Sequence Alignment Editor	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
CorelDRAW X3	Corel, Unterschleißheim
GenBank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
Leica LAS 3.3.0	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Leica LAS AF 2.2.1	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Microsoft Office 2007	Microsoft, Unterschleißheim
MITOMAP	http://www.mitomap.org
NCBI BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Reference Manager 12	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
The Sequence Manipulation Suite	http://bioinformatics.org/sms
Visual Cloning 2000	Redasoft, Toronto, Kanada
Webcutter 2.0	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2 http://users.unimi.it/~camelot/tools/cut2.html

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Übernachtflüssigkulturen von Bakterien

Benötigtes Material:

LB-Medium

Antibiotikum-Stammlösung

Durchführung:

Für eine Übernachtflüssigkultur wurden je nach benötigter Menge 10 ml LB-Medium in einem 50-ml-Röhrchen oder 5 ml in einem 15-ml-Röhrchen vorgelegt. Bei Bedarf wurde zur Selektion des gewünschten Bakterienstammes das benötigte Antibiotikum (Tab. 3-1) hinzugefügt. Das Medium wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze mit einer gepickten Kolonie von einer Agar-Platte und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung	gelöst in	Stocklösung/ml Medium	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	50 mg/ml	ddH ₂ O	2-3 µl	100-150 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml	ddH ₂ O	5 µl	50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml	Ethanol	10 µl	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml	Ethanol	0,5-5 µl	17-170 µg/ml

Tab. 3-1: Eingesetzte Antibiotika-Konzentrationen

3.1.2. Bakterienkultur auf Agar-Platten

3.1.2.1. Herstellen von Agar-Selektionsplatten

Benötigtes Material:

LB-Medium

Agar-Agar

Antibiotikum-Stammlösung (vgl. 3.1.1)

Methoden

Durchführung:

Zur Herstellung von Agar-Platten wurden 15 g Agar in 1 l LB-Medium eingewogen und autoklaviert. Bei Bedarf erfolgte danach ab einer Temperatur von ca. 60°C eine Zugabe des entsprechenden Selektionsmediums. Der flüssige Agar konnte anschließend in Petrischalen gegossen werden. Nach dem Erstarren wurden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur auf den Deckel gedreht getrocknet und für bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert (begrenzte Haltbarkeit des Antibiotikums). Auf solchen bei 37°C vorgewärmten Platten können die entsprechenden Bakterienklone mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und kultiviert werden.

3.1.2.2. Herstellen von Agar-Platten für „Blau-Weiß“-Selektionen

In auf diesen Platten aufgebrachten, wachsenden Bakterienklonen wird durch das IPTG die Expression eines plasmidcodierten lacZ-Reportergens induziert, falls der Bakterienklon das lacZ-Plasmid enthält. Die dadurch hervorgerufene Expression des Enzyms β -Galactosidase hat nun die Spaltung des farblosen X-Gal in sein tiefblaues Spaltprodukt zur Folge. Die jeweiligen Klone können nun anhand ihrer Färbung identifiziert werden.

Benötigtes Material:

Agar-Selektionsplatten

X-Gal Stammlösung (20 mg/ml in Dimethylformamid)

IPTG-Stammlösung (200 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert)

Durchführung:

Für die Durchführung einer „Blau-Weiß“ Selektion von Bakterienklonen wurden die gewünschten LB-Selektionsplatten verwendet, auf denen der Farbstoff X-Gal und der Induktor IPTG aufgebracht wurden. Dazu wurden auf den trockenen Platten jeweils 4 μ l IPTG-Lösung und 40 μ l X-Gal-Stammlösung aufgetropft, vermischt und sofort mit einem Drygalskispatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden anschließend für mindestens 1 h bei 37°C getrocknet.

3.1.3. Herstellen einer Glycerinkultur

Benötigtes Material:

Glycerin, wasserfrei, autoklaviert

Durchführung:

Um Bakterienklone für praktisch unbegrenzte Zeit inert zu lagern und zu archivieren, werden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wird 700 µl der Flüssigmedium-Bakterienkultur mit 700 µl autoklaviertem Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.4. Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* Zellen nach dem „one-step“-Verfahren von CHUNG, 1989

Um Plasmid-DNA aus der ihrer Umgebung aufnehmen zu können, müssen Bakterien die dafür notwendige Kompetenz besitzen. Der Einsatz von Reagenzien wie Polyethylenglycol (PEG) und Dimethylsulfoxid (DMSO) während der Herstellung der kompetenten Bakterien ermöglicht bei der Transformation eine erleichterte Aufnahme der Plasmid-DNA und erhöht somit die Transformationsrate (Chung et al., 1989).

Benötigtes Material:

LB-Medium

1× TSS

Durchführung:

Die Zellen des gewünschten *E. coli*-Stammes wurden auf einer Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie gepickt und eine 10-ml-Übernachtskultur ohne Antibiotikum angelegt. 200 ml LB-Medium wurden mit 0,5-2 ml Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 (logarithmische Wachstumsphase) bei 37°C im Schüttler inkubiert. Bei Erreichen dieses Wertes wurden die Zellen sofort auf Eis 15 min abgekühlt und bei 4°C und 1.000× g für 10 min zentrifugiert. Das so erhaltene Bakterien-Pellet wurde in 1/100 Originalvolumen (2 ml) TSS-Lösung (eiskalt) aufgenommen, auf 100-µl-Aliquots in 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten *E. coli* wurden bei -80°C aufbewahrt.

Methoden

3.1.5. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Benötigtes Material:

NZY⁺-Medium

Agar-Selektionsplatten

Durchführung:

Die chemisch kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und durch Rühren mit der Pipettenspitze mit der zu transformierenden DNA (Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz) vermischt. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s im Wasserbad, an den sich eine zweiminütige Inkubation im Eis anschloss. Die transformierten Bakterien wurden in ein steriles 15-ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 900 µl NZY⁺-Medium versetzt und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden jeweils ein 1/10- und ein 9/10-Volumenteil auf Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Der 9/10-Volumenteil wurde dazu bei 600× g für 3 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Überstand resuspendiert und ausplattiert.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. DNA-Extraktion

3.2.1.1. Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.2.1.1.1. GTE-System

Grundlage dieser Methode der Plasmid-Präparation ist die alkalische Lyse von Bakterien (Li et al., 1997). Auf den Einsatz von Silika-Membranen wird jedoch verzichtet. Eingesetzt wird das GTE-System vor allem zum Testen, ob Bakterienklone nach einer Ligation und Transformation das gewünschte Plasmid enthalten oder wenn eine Kolonie-PCR keine schlüssigen Ergebnisse liefert.

Benötigtes Material:

GTE-Lösung 1

GTE-Lösung 2

GTE-Lösung 3

100% Ethanol p.a. (-20°C)

70% Ethanol p.a. (v/v)

Durchführung:

Zunächst wurde von dem betreffenden Bakterienklon eine Übernachtflüssigkultur in LB-Medium hergestellt (3.1.1). Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml dieser Übernachtskultur in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14.000× g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µl Lösung 1 (GTE-Puffer) resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung 2 (Lysispuffer) zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes gemischt. Zum Schluss wurde durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 (Kaliumacetatlösung) die Reaktion neutralisiert und der Ansatz kurz kräftig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14.000× g zum Pelletieren des Zelldebris wurden 400 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt. Beim Abnehmen des Überstandes war darauf zu achten, dass kein ausgefallenes SDS mit verschleppt wurde, weil dies nachfolgende Reaktionen hätte stören können. Für eine höhere Reinheit der Präparation wurde der Zentrifugationsschritt mit dem Überstand noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde mit

Methoden

400 µl eiskaltem Ethanol (100%) vermischt und dann für 10 min bei 14.000× g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 14.000× g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Pellet 10-15 min luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

3.2.1.1.2. peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I und II

Diese Methode ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Absorption der DNA an eine Silika-Matrix in einer Säule unter Hochsalz-Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt, sondern an die Matrix gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z.B. ddH₂O) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die so gewonnene Plasmid-DNA besitzt in der Regel einen sehr hohen Reinheitsgrad und ist somit auch für empfindlichere Reaktionen wie Sequenzierungen, Mutagenese-PCRs oder die Transfektion von Zellen geeignet.

Benötigtes Material:

peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I/II

Durchführung:

Die peqGOLD Plasmid Miniprep erfolgte nach Herstellerprotokoll, ausgehend von bis zu 5 ml (Kit I) bzw. 15 ml (Kit II) Übernachtflüssigkultur. Eluiert wurde mit 50 µl (Kit I) bzw. 100 µl (Kit II) ddH₂O. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C. Die Säulchen können ohne Verlust an Ausbeute und Reinheit mehrmals für dasselbe Plasmid verwendet werden.

3.2.1.1.3. Plasmid-Maxipräparation mit dem NucleoBond[®] PC-500 Kit

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad für Transfektionen und Klonierungen wurde das auf Säulenchromatographie basierende Aufreinigungssystem NucleoBond[®] PC 500 verwendet.

Benötigtes Material:

LB-Medium

Antibiotikum-Stammlösung

NucleoBond[®] PC 500 Kit

Durchführung:

Zunächst wurde eine 5-ml-Vorkultur angesetzt (3.1.1) und über 8 h bei 37°C geschüttelt. Zum Ansetzen einer Übernachtskultur wurde für low copy Plasmide 500 ml selektives LB-Medium mit 1 ml Vorkultur angeimpft, für high copy Plasmide 100 ml selektives LB-Medium mit 100 µl Vorkultur. Die Plasmid-Maxipräparation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll ohne Modifikationen. Die DNA wurde in 200 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.1.2. Gewinnung von Gesamt-DNA aus Kulturzellen

Benötigtes Material:

Homogenisierungspuffer I

Homogenisierungspuffer II

5 M NaCl

10% SDS-Lösung

RNase A (DNase-frei)

Proteinase K

Durchführung:

Die geernteten und bei -80°C gelagerten Zellen (3.4.2) wurden aufgetaut und in 400 µl Homogenisierungspuffer I resuspendiert. Die Suspensionen wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und mit einem Kunststoffstempel homogenisiert. Nach Zugabe von Homogenisationspuffer II folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Suspension auf eine Endkonzentration von 1 M NaCl eingestellt und 4 h im Eisbad inkubiert. Die erhöhte Salzkonzentration erleichtert die Präzipitation unerwünschter Proteine, indem deren Löslichkeit verringert wird (Aussalz-Effekt). Durch eine einstündige Zentrifugation bei 4°C und 14.000× g wurde das Proteinpräzipitat vom DNA-haltigen Überstand getrennt. Anschließend wurde der abgenommene Überstand mit SDS in einer Endkonzentration von 0,5% sowie mit RNase A in einer Endkonzentration von

Methoden

100 µg/ml versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h. Danach wurde Proteinase K in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzu pipettiert und der Ansatz bei 55°C über Nacht inkubiert. Die DNA-Lösung konnte nun zur weiteren Aufarbeitung einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) unterzogen werden.

3.2.1.3. Gewinnung mitochondrialer DNA aus humaner Placenta

Humane mitochondriale DNA kann in größeren Mengen aus Placenta präpariert werden. Dies ist der einfachste Weg, da andere humane Gewebe nur schwer zugänglich sind, während Placenten bei jeder Geburt anfallen. Die Präparation beruht hauptsächlich auf einer differenziellen Zentrifugation, bei der die Mitochondrien vom Kern und Zelltrümmern gereinigt werden und anschließend die DNA aus ihnen präpariert wird.

Benötigtes Material:

Sucrose-TE-Puffer (STE)

Sucrose-TE-Puffer+ (STE+)

Sucrose-TE-Puffer mit MgCl₂ (STEM)

0,5 M EDTA

5 M NaCl

0,5 M SDS

DNase I (RNase-frei)

RNase A (DNase-frei)

Verbandmull

Miracloth

Glas-Homogenisator

Corex-Glas-Zentrifugenröhrchen

Durchführung:

Nach der Abholung aus dem Kreißaal wurde die Placenta auf Eis herabgekühlt. Anschließend wurde die Placenta in kleine Stücke geschnitten, wobei das Bindegewebe und größere Gefäße abgetrennt wurden. Die Stücke wurden dann solange in STE gewaschen, bis nahezu kein Blut mehr austrat. Nach dem Wiegen (normalerweise 300-350 g) wurden die Stücke bis zur weiteren Verarbeitung in Form einer dünnen Platte bei -80°C eingefroren.

Nach dem Antauen für ca. 1 h bei RT folgte die Zerkleinerung (durch Brechen) der Platte in kleine Stücke, die dann für 1,5 h langsam in 1 l STE gerührt wurden, bis sie völlig aufgetaut waren. Nach dem Überführen der Stücke in 600 ml neuen STE erfolgte die Zerkleinerung im Mixer für 3×20 s bei niedriger Geschwindigkeit. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei $500 \times g$ und 4°C zur Entfernung der Zelltrümmer wurden die Überstände durch zwei Lagen Mull geschüttet und für die spätere Verwendung aufgehoben. Die Pellets wurden in 200 ml STE resuspendiert und nochmals für 3×20 s im Mixer zerkleinert. Nach der erneuten Zentrifugation für 15 min bei $500 \times g$ und 4°C wurden die Überstände durch die bereits benutzten Mulllagen geschüttet und die Pellets durch zwei neue Lagen Mull und eine Lage MiraCloth ausgedrückt, um die restliche Flüssigkeit zu erhalten. Die vereinigten Überstände (ca. 500 ml) wurden im Glas-Homogenisator durch 4-5 Hübe bei 100 rpm weiter zerkleinert und bei 4°C und $1500 \times g$ für 15 min zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde mit den Überständen mindestens zweimal wiederholt, bis nahezu kein Pellet mehr zu sehen war. Anschließend wurden die Mitochondrien aus dem Überstand bei $10.800 \times g$ und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde entweder für die Herstellung eines *in-vitro*-Transkriptionsextraktes (3.2.9.1) verwendet oder in 120 ml STEM resuspendiert und mit zwei Hüben bei 100 rpm im Glas-Homogenisator gepottert. Es wurde in STEM gelöste DNase I mit der Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben, die Proben auf vier 50-ml-Reaktionsgefäße verteilt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inaktivierung der DNase I durch Zugabe von 7 ml 0,5 M EDTA pro Reaktionsgefäß und einer anschließenden Inkubation bei RT für 10 min wurden die Mitochondrien für 20 min bei 4°C und $15.000 \times g$ abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 80 ml STE+ aufgenommen, auf zwei 50-ml-Reaktionsgefäße verteilt und jeweils 0,8 ml 5 M NaCl zugegeben. Anschließend wurde solange 0,5 M SDS zugegeben (ca. 0,5-1 ml), bis die Mitochondrien lysiert waren und die Lösung klar wurde. Die Lösung wurde danach mit 2,5 mg DNase-freier RNase A pro Reaktionsgefäß versetzt und im Wasserbad bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Proben wurden vereinigt, auf sechs 50-ml-Reaktionsgefäße verteilt, einer Phenol-/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) unterzogen, auf 16 Corex-Glas-Zentrifugenröhrchen verteilt und über Nacht bei -20°C ohne Zugabe von Natriumacetat gefällt (3.2.2.2). Nach dem Lufttrocknen wurden die Pellets jeweils in 500 μl ddH₂O aufgenommen, vereinigt, dialysiert (3.2.2.4) und wiederum gefällt (3.2.2.2). Das Pellet wurde in 500 μl ddH₂O aufgenommen, nach einer Restriktionspaltung mit *PvuII* (3.2.5.1) gelelektrophoretisch (3.2.4.1) analysiert und bei -20°C gelagert. Waren genügend Proben (5-8 Stück) aufgereinigt, wurden sie vereinigt, mit

Methoden

50 µg/ml DNase-freier RNase A versetzt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde eine Reinigung mittels CsCl-Gradienten-Zentrifugation (3.2.2.5) durchgeführt. Nach der Dialyse wurde die DNA gefällt (3.2.2.2), in 100 µl ddH₂O aufgenommen und nach einer Restriktionspaltung mit *Pvu*II (3.2.5.1) gelelektrophoretisch (3.2.4.1) sowie durch einen Southern Blot (3.2.7) analysiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2. DNA-Reinigung

3.2.2.1. DNA-Reinigung durch Phenol-/Chloroform-Extraktion

Um DNA aus einem Reaktionsansatz, der einen hohen Proteinanteil besitzt, isolieren zu können, wird der Ansatz einer Phenol-/Chloroform-Extraktion unterzogen. Dabei sammeln sich die Proteine in der Phenol-Phase, während die DNA in der wässrigen Phase zu finden ist. Das Lösungsmittel Phenol stört nachfolgende enzymatische Reaktionen und muss deshalb sorgfältig durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform entfernt werden.

Benötigtes Material:

Phenol, pH 7,5-8, mit 1% 8-Hydroxychinolin

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1 (v/v/v)

Chloroform/Isoamylalkohol, 24:1 (v/v)

Chloroform

Durchführung:

Die DNA-Lösung wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol, einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils bei RT bei 14.000× g zentrifugiert, bis die Phasen vollständig getrennt waren und anschließend wurde die obere wässrige Phase, die die DNA enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um sicherzustellen, dass kein Phenol mehr in der DNA-Lösung vorhanden ist, erfolgte die Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion bis zu fünf Mal (es durfte keine Interphase mehr zu sehen sein). Beim letzten Schritt wurde Chloroform statt Chloroform/Isoamylalkohol verwendet. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA mittels Ethanol (3.2.2.2).

3.2.2.2. Präzipitation von Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung

Die Präzipitation von Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung dient dazu, den verbliebenen Puffer, andere unerwünschte Lösungsmittel, Salze oder kleinere DNA-Fragmente wie Primer zu entfernen, um dann die Nukleinsäure in reinem Wasser aufnehmen zu können.

Benötigtes Material:

3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2)

100% Ethanol p.a. (-20°C)

70% Ethanol, p.a. (v/v)

Glykogen-Lösung

Durchführung:

Um die Nukleinsäure aus der wässrigen Lösung zu präzipitieren, wurde sie zunächst mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt und mit 2,5-fachem Volumen eiskaltem 100% Ethanol für 60 min bei -80°C inkubiert. Dann wurde der Reaktionsansatz bei 4°C zentrifugiert (20 min, 14.000× g), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, kurz kräftig gemischt und dann wieder zentrifugiert (15 min, 14.000× g). Danach wurde wiederholt der Überstand abgenommen und das gewaschene Pellet ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Bei Lösungen mit niedrigen Nukleinsäurekonzentrationen konnte durch die Zugabe von 5-10 µg Glykogen zur Ausgangslösung eine Verbesserung des Fällungsergebnisses erzielt werden. Als Nebeneffekt waren auch kleine Nukleinsäure-Pellets als weiße Punkte gut sichtbar.

Methoden

3.2.2.3. Gelextraktion von DNA

Die Gelextraktion ermöglicht es, einzelne DNA-Banden aus einem Agarose-Gel auszuschneiden und die enthaltene DNA so aus dem Gel herauszulösen, dass sie für weitere Experimente zur Verfügung steht. Dieses Verfahren wurde zur Aufreinigung von linearisierten Vektoren, DNA-Fragmenten und PCR-Produkten angewandt.

Benötigtes Material:

Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System

Durchführung:

Die Gelextraktion erfolgte mit dem Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System nach den Angaben des Herstellerprotokolls ohne Modifikationen. Die Elution der DNA erfolgte in einem Volumen von 50 µl ddH₂O. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3.2) bestimmt. Die Säulchen können ohne Verlust an Ausbeute und Reinheit mehrmals für dasselbe DNA-Fragment verwendet werden. Darüber hinaus wurde beim Ausschneiden der Banden darauf geachtet, dass die UV-Exposition der DNA so kurz wie möglich ausfiel, um die Entstehung von Thymidindimeren zu verhindern.

3.2.2.4. DNA-Reinigung durch Dialyse

Die Dialyse ist die schonendste Methode, um niedermolekulare Substanzen wie Salze, Phenolreste und Peptide aus einer DNA-Lösung zu entfernen. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass Substanzen, die kleiner sind als die Porengröße der Dialysemembran, bis zum Einstellen eines Gleichgewichtes frei zwischen der Probe und dem Dialysepuffer diffundieren können. Größere Moleküle wie Nukleinsäuren können die Membran nicht passieren und bleiben innerhalb des Schlauchs.

Benötigtes Material:

Dialyseschlauch, MWCO 12-14 kDa

Verschlussklammern

TE-Puffer

Durchführung:

Zunächst wurde das eine Ende des Dialyseschlauches doppelt umgefaltet und anschließend mit einer Verschlussklammer verschlossen. Danach wurde die DNA-Lösung in den Dialyseschlauch eingefüllt und genauso wie am anderen Ende sorgfältig verschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen im Inneren des Schlauches befanden. Der Schlauch wurde in einem 2-l-Becherglas mit $1\times$ TE-Puffer so befestigt, dass er nicht mit dem Rührfisch in Berührung kam. Die Dialyse erfolgte bei 4°C , wobei der TE-Puffer nach 1 h und weiteren 3 h gewechselt wurde. Anschließend wurde die Dialyse noch über Nacht weitergeführt. Am nächsten Morgen wurde die DNA-Lösung aus dem Schlauch entnommen und präzipitiert (3.2.2.2).

3.2.2.5. DNA-Reinigung durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation

Bei der Aufreinigung von DNA über die Dichtegradienten-Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Gradienten werden Nukleinsäuren nach ihrer Dichte getrennt. Während der Zentrifugation stellt sich ein Dichtegradient in der Salzlösung ein und die Nukleinsäuren sammeln sich in den Bereichen des Gradienten an, in denen die Dichte ihrer eigenen entspricht. Mit dieser Methode lässt sich mitochondriale DNA sehr gut aufreinigen.

Benötigtes Material:

TE-Puffer

CsCl

1% Ethidiumbromid-Stammlösung (w/v)

Paraffinöl

Isoamylalkohol, TE-gesättigt

Durchführung:

Die DNA-Lösung wurde mit 0,7 ml der Ethidiumbromid-Stammlösung versetzt und mit CsCl am Refraktometer auf einen Brechungsindex von $n_{25}=1,3892$ eingestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Endvolumen nicht das Volumen des Zentrifugenröhrchens von 13,5 ml überschritt. Nach dem Einfüllen der Lösung in ein Zentrifugenröhrchen wurde die Probe mit Paraffinöl überschichtet, so dass sich keine Luft mehr in dem Röhrchen befand. Es wurde zudem ein zweites Röhrchen mit CsCl-Lösung befüllt und gegen das erste Röhrchen

Methoden

austariert. Die Röhren wurden verschweißt und anschließend mit der Ultrazentrifuge in dem Rotor Type 70 Ti bei 36.000 rpm und 20°C über mindestens 48 h zentrifugiert. Der Lauf wurde manuell beendet, wobei die Bremse nicht aktiviert sein durfte, um den Gradienten nicht zu zerstören. Die Röhren wurden vorsichtig entnommen und unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) wurden die zwei entstandenen Banden separat mit einer Spritze (Kanüle durch die Wand gestochen) abgenommen. Anschließend wurde je 1 Volumen TE-gesättigter Isoamylalkohol zugegeben und die Probe ausgeschüttelt. Die obere Isoamylalkohol-Phase, in der sich das Ethidiumbromid anreicherte, wurde verworfen und der Reinigungsvorgang mit Isoamylalkohol so oft wiederholt, bis keine Rotfärbung des Isoamylalkohols mehr feststellbar war. Anschließend erfolgte eine Dialyse zur Entfernung des CsCl (3.2.2.4).

3.2.3. DNA-Quantifizierung

3.2.3.1. Photometrische Quantifizierung von DNA

Bei der photometrischen Messung wird die Tatsache genutzt, dass Nukleinsäuren UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren. Das Spektralphotometer misst den Grad des absorbierten Lichts und errechnet daraus die in der Lösung enthaltene Menge an DNA in ng/ μ l. Definitionsgemäß bedeutet eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm eine DNA-Konzentration von 50 μ g/ml (dsDNA) bzw. eine RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Über die Messung der OD₂₃₀ und OD₂₈₀ können eventuelle Verunreinigungen durch Lösungsmittel oder Proteine nachgewiesen werden.

Benötigtes Material:

Messküvette

Durchführung:

Die DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:10 bis 1:50 mit ddH₂O verdünnt, in eine Küvette gefüllt und photometrisch vermessen. Als Referenz diente das zur Verdünnung eingesetzte ddH₂O. Das Mischungsverhältnis war zusammen mit den einzelnen Messparametern am Photometer einzustellen. Nach dem Nullabgleich wurde die OD bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Aus dem OD₂₆₀-Wert errechnete das Gerät

selbstständig die DNA-Konzentration. Die gemessenen OD-Werte geben Aufschluss über einige in der Lösung enthaltenen Komponenten (Tab. 3-2) und damit über die Reinheit der DNA-Lösung. Die Verhältnisse OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} sollten bei reiner DNA (und RNA) zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

Wellenlänge	absorbierende Substanz
230 nm	aromatische Lösungsmittel (u.a. Phenol)
260 nm	Purin- und Pyrimidinbasen der DNA und RNA
280 nm	aromatische Aminosäurereste von Proteinen
320 nm	Trübung (Kontrolle)

Tab. 3-2: Auflistung der mit spezifischen Wellenlängen gemessenen Substanzen

3.2.3.2. DNA-Quantifizierung über ein Agarose-Gel

Diese Methode wurde zur Quantifizierung von DNA-Mengen im Nanogramm-Bereich verwendet. Sie beruht darauf, dass der Stoff Ethidiumbromid, der durch Bestrahlung mit UV-Licht (250-360 nm) zum Leuchten gebracht werden kann, in die Struktur der aufgetrennten DNA interkaliert. Durch UV-Bestrahlung kann man so den DNA-Gehalt im Gel im Vergleich zu einem DNA-Standard sichtbar machen.

Benötigtes Material:

DNA-Größenmarker

Agarose-Gel

Durchführung:

Hierzu wurde die zu bestimmende DNA zusammen mit einer Konzentrationsreihe einer quantifizierten Marker-DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Nach der beendeten Elektrophorese (3.2.4.1) wurde das durch Ethidiumbromid angefärbte Gel unter ultraviolettem Licht betrachtet. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu quantifizierenden DNA mit der der Markerfragmente konnte die DNA-Menge – bezogen auf das eingesetzte Volumen – hinreichend genau bestimmt werden.

3.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

3.2.4.1. Analytische Agarose- und Agar-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese können DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Da Nukleinsäuren bei neutralem pH negative Ladungen an ihren Phosphatgruppen aufweisen, wandern sie im elektrischen Feld auf die positiv geladene Elektrode zu. Als Matrix für die Wanderung dient ein Agarose- oder DNA-Agar-Gel, das die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe auftrennt. Die Trennschärfe eines Gels hängt davon ab, wie porös die Matrix ist: Agarose bzw. Agar fungieren als „Molekularsiebe“. Je weniger von diesen Kohlenhydraten für die Herstellung des Gels verwendet wird, umso größere Poren besitzt das Gel (Tab. 3-3). Große Fragmente werden stärker zurückgehalten als kleine.

Agarosekonzentration in % (w/v)	Trennbereich linearer DNA (bp)
0,6	1.000 - 20.000
0,8	500 - 10.000
1,0	400 - 5.000
1,5	200 - 3.000
2,0	100 - 2.000
3,0	50 - 1.000

Tab. 3-3: Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Trennbereiche für lineare DNA

Bei der Verwendung von DNA-Agar reicht bereits eine um Faktor zwei verringerte Konzentration für dieselben Trennbereiche linearer DNA aus wie in SeaKem-Agarose. NuSieve 3:1-Agarose ist nur für kleine Fragmente geeignet und nicht nach dieser Tabelle verwendbar.

Mittels Ethidiumbromid kann die aufgetrennte DNA nach der Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Dieser fluoreszierende Farbstoff lagert sich zwischen die gepaarten Basen der DNA ein (Interkalation). Die dabei ausgebildeten DNA-Ethidiumbromid-Komplexe können durch UV-Licht ($\lambda=320$ nm) zur Fluoreszenz angeregt und als orangefarbene ($\lambda=590$ nm) Banden sichtbar gemacht werden.

Benötigtes Material:

SeaKem[®] LE Agarose, NuSieve[®] 3:1 Agarose oder DNA-Agar[™]

1% Ethidiumbromid-Stammlösung (w/v)

TAE-Puffer

6× DNA-Probenpuffer

DNA-Größenmarker

Durchführung:

Es wurden 0,4-4%-ige Gele angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge SeaKem[®] LE Agarose, NuSieve[®] 3:1 Agarose (für sehr kleine Fragmente) oder DNA-Agar[™] in 1× TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, auf circa 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid-Lösung im Verhältnis 1:20.000 (v/v) versetzt. Die Gellösung wurde in die Gelschlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen und auspolymerisiert. Nach dem Erstarren wurden die Gele zur Aufbewahrung mit 1× TAE-Puffer überschichtet und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Gel in der Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die zu analysierende DNA wurde mit 6× DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde solange durchgeführt, bis die entsprechenden Banden eindeutig identifiziert werden konnten. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) analysiert und fotografisch festgehalten.

3.2.4.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Benötigtes Material:

SeaKem[®] GTG oder NuSieve[®] GTG Agarose

1% Ethidiumbromid-Stammlösung (w/v)

TAE-Puffer

6× DNA-Probenpuffer

DNA-Größenmarker

Durchführung:

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurde die SeaKem[®] GTG bzw. bei kleinen Fragmenten NuSieve[®] GTG Agarose und spezielle Probenkämme benutzt, die ein Auftragen der DNA über die gesamte Gelbreite erlaubten. Die Elektrophorese erfolgte wie unter 3.2.4.1

Methoden

beschrieben. Die gesuchte Bande wurde, um die DNA nicht zu beschädigen, unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=365$ nm) identifiziert und mithilfe eines Skalpell herausgetrennt. Die Aufarbeitung erfolgte dann mittels des Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System (3.2.2.4).

3.2.5. DNA-Modifizierung durch Enzymbehandlung

3.2.5.1. Restriktionsspaltung von DNA durch Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind aus verschiedenen Bakterienstämmen gewonnene Enzyme, die für die gezielte Fraktionierung von DNA eingesetzt werden. Sie erkennen und schneiden vorwiegend 4 bis 8 Nukleotide lange, meist palindromische DNA-Sequenzen. Die Spaltung der beiden DNA-Stränge erfolgt hydrolytisch innerhalb oder in der Nähe der Erkennungssequenz. An der Spaltstelle trägt das 3'-Ende meist eine Hydroxylgruppe, das 5'-Ende in der Regel eine Phosphatgruppe, wobei je nach Enzym glatte Enden (*blunt ends*) oder überstehende einzelsträngige Enden (*sticky ends*) entstehen können. Die Aktivität der Restriktionsenzyme wird in Units (U) angegeben. Ein U entspricht dabei der Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen 1 μ g Referenz-DNA (i.d.R. λ -Phagen-DNA) in 1 h spaltet. Die spezifische Spaltung von DNA wurde zur Klonierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Hierzu gehört sowohl die Präparation von DNA-Fragmenten mit bestimmten Enden als auch die Linearisierung von Vektoren für eine anschließende Ligationsreaktion.

Benötigtes Material:

Restriktionsendonuklease
10× Reaktionspuffer

Durchführung:

Die zu spaltende DNA-Menge wurde mit dem jeweiligen Enzym und 1/10 des Endvolumens an 10× Reaktionspuffer gemischt. Zur Berechnung der notwendigen Units Enzym pro μ g DNA wurde folgende Formel angewendet:

$$U_{1 \mu\text{g}} = \frac{X_{\text{Referenz}} \cdot n_{\text{DNA}}}{X_{\text{DNA}} \cdot n_{\text{Referenz}}}$$

X_{Referenz}	–	Anzahl der Basenpaare der Referenz-DNA (siehe Enzymbeiblatt, meist λ -Phagen-DNA [48.502 bp] oder Adenovirus-2-DNA [35.937 bp])
X_{DNA}	–	Anzahl der Basenpaare der zu spaltenden DNA
n_{Referenz}	–	Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in der Referenz-DNA
n_{DNA}	–	Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in der zu spaltenden DNA

Es wurde darauf geachtet, dass das Volumen der Enzymstammlösung nicht 1/10 des Gesamtansatzes überstieg, da sonst das enthaltene Glycerin die Reaktion hemmen könnte. Der analytische Restriktionsverdau wurde in einem Volumen von 20 μl durchgeführt (s. u.), präparative Ansätze in einem Volumen bis 150 μl mit bis zu 10 μg DNA.

Analytischer Restriktionsansatz für Plasmid-DNA (20 μl):

0,5-1 μg	Plasmid-DNA
2 μl	10 \times Reaktionspuffer
ad 19 μl	ddH ₂ O
1 μl	Restriktionsendonuklease (5-10 U/ μl)

Die Restriktionspaltung erfolgte für mindestens 1 h Stunde bei optimaler Temperatur für die jeweilige Restriktionsendonuklease. Die Qualität der Hydrolyse wurde durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (3.2.4.1).

Standard-Reaktionsansatz für die *PvuII*-Spaltung der mitochondrialen DNA (40 μl):

1 bzw. 3 μl	gereinigte mtDNA
4 μl	10 \times Reaktionspuffer G
ad 38 μl	ddH ₂ O
2 μl	<i>PvuII</i> (10 U/ μl)

Es wurden von jeder mtDNA-Probe jeweils 1 und 3 μl eingesetzt und als Kontrollen jeweils auch Ansätze mit 1 und 3 μl mtDNA und ddH₂O statt der Restriktionsendonuklease durch-

Methoden

geführt. Der Ansatz wurde für 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (3.2.4.1).

3.2.5.2. Dephosphorylierung von DNA am 5'-Ende

Um bei einer Klonierung eine Religation eines mit nur einem Restriktionsenzym linearisierten Vektors zu verhindern, wird eine Dephosphorylierung am 5'-Ende durchgeführt. Zur hydrolytischen Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen werden Alkalische Phosphatasen eingesetzt.

Benötigtes Material:

Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)

10× Reaktionspuffer

Durchführung:

Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte meist direkt im Anschluss an die Restriktionsspaltung. Dazu wurden 2 U der SAP direkt zum Restriktionsansatz gegeben. Dies ist möglich, da das Enzym nach Herstellerangaben in sämtlichen Restriktionspuffern aktiv ist. War die DNA vorher bereits aufgereinigt worden, wurde folgender Ansatz genutzt:

2-5 pmol	freie 5'-DNA-Enden
2 µl	10× SAP-Reaktionspuffer
ad 18 µl	ddH ₂ O
2 µl	SAP (1 U/µl)

Der Ansatz wurde bei 37°C für 30-45 min inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Ansatz anschließend für 20 min auf 65°C erhitzt.

3.2.5.3. Phosphorylierung von DNA am 5'-Ende

Die T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK, aus dem Bakteriophagen T4) katalysiert die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf das freie 5'-Ende einer Desoxyribonukleinsäure. Diese Reaktion wurde zur Phosphorylierung von DNA-Fragmenten ohne 5'-Phosphatgruppen

vor einer Ligation in einen dephosphorylierten Vektor sowie zur Phosphorylierung von PCR-Primern verwendet.

Benötigtes Material:

T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)
10× Reaktionspuffer
10 mM ATP

Durchführung:

Standardansatz zur Phosphorylierung linearer DNA:

1-20 pmol freie 5'-DNA-Enden
2 µl 10× T4-PNK-Reaktionspuffer
2 µl ATP (10 mM)
ad 19 µl ddH₂O
1 µl T4-PNK (10 U/µl)

Ansatz für die Primerphosphorylierung:

300 pmol PCR-Primer
5 µl 10× T4-PNK-Reaktionspuffer
5 µl ATP (10 mM)
ad 49 µl ddH₂O
1 µl T4-PNK (10 U/µl)

Die Ansätze wurden zunächst für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend erfolgte eine Inaktivierung der T4-Polynukleotidkinase bei 65°C für 15 min.

3.2.5.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Der Vorgang der Ligation dient dazu, zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden beziehungsweise ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Klonierungsvektor zu inserieren. Das hierzu verwendete Enzym, die T4-DNA-Ligase, katalysiert die ATP-abhängige Bildung

Methoden

von Phosphodiester-Bindungen zwischen doppelsträngiger DNA mit freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen.

Benötigtes Material:

T4-DNA-Ligase

10× T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer

50% PEG 4000 (w/v)

Durchführung:

Zur Ligation von Fremd-DNA mit einer dephosphorylierten Vektor-DNA wurde bei *sticky-end*-Ligationen ein molares Verhältnis von 4:1 (Insert:Vektor) und bei *blunt-end*-Ligationen ein molares Verhältnis von 10:1 (Insert:Vektor) gewählt.

Ligationsansatz (20 µl):

x µl	dephosphorylierte Vektor-DNA
y µl	Insert
2 µl	10× T4-PNK-Reaktionspuffer
2 µl	PEG 4000 (50% w/v)
ad 19 µl	ddH ₂ O
1 µl	T4-DNA-Ligase (5 U/µl)

Für das Zusammenfügen von komplementären kohäsiven DNA-Enden (*sticky ends*) wurde der Reaktionsansatz bei 16°C über Nacht, bei *blunt-end*-Ligationen bei 4°C für 24-48 h inkubiert. Abschließend erfolgte eine Inaktivierung der T4-DNA-Ligase bei 65°C für 15 min.

3.2.5.5. TOPO[®]-TA-Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der TOPO[®]-TA und TOPO[®]-XL PCR Cloning[®] Kit verwendet. Statt einer T4-DNA-Ligase werden hier geöffnete, mit *Vaccinia* Topoisomerase I-aktivierte Vektoren verwendet, die an ihrer Klonierungsstelle einen 3'-Überhang aus einem Desoxythymidin besitzen. Die Topoisomerase ist an beiden Enden des Vektors über eine 3'-Phosphorylgruppe kovalent gebunden und katalysiert die Ligation

mit dem PCR-Produkt in 5 min. Voraussetzung dafür ist, dass das PCR-Produkt an seinen 3'-Enden Desoxyadenosin-Überhänge mitbringt (Abb. 3-1). Diese werden bei der Vervielfältigung mit der *Taq*-DNA-Polymerase durch deren terminale Transferaseaktivität generiert. Die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität der *Pfu*-DNA-Polymerase verhindert die Bildung von A-Überhängen, so dass die generierten DNA-Fragmente glatte Enden besitzen.

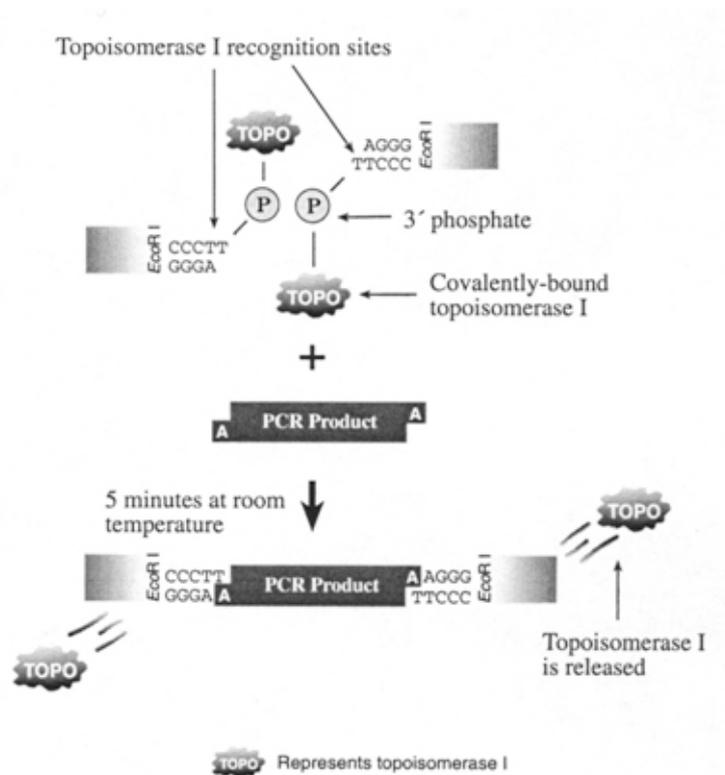


Abb. 3-1: Darstellung des TOPO[®]-TA-Prinzips
(Quelle: www.invitrogen.com)

Benötigtes Material:

Topoisomeraseaktivierter Vektor (pCR[®] II-TOPO[®] und pCR[®]-XL-TOPO[®])

Salt Solution (aus Kit)

Durchführung:

Die PCR-Produkte wurden direkt nach der PCR gelelektrophoretisch analysiert, aufgereinigt und für die Ligation mit den TOPO[®]-Vektoren eingesetzt: Generell wurden halbe Ansätze (3 µl) verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte nach Anleitung des TOPO[®]-TA und TOPO[®]-XL PCR Cloning[®] Kits.

Methoden

Reaktionsansatz (3µl):

- 1-2 µl PCR-Produkt
- ad 2 µl ddH₂O
- 0,5 µl Salt Solution
- 0,5 µl TOPO[®]-Vektor

Erfolgte die PCR mit einer korrekturlesenden *Pfu*-DNA-Polymerase, so wurde im Anschluss an die DNA-Amplifikation PCR-Ansätze mit 1 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl) versetzt, für 10 min bei 72°C inkubiert, auf Eis kurz kühl gestellt und direkt in die Ligation mit einem TOPO[®]-Vektor eingesetzt.

3.2.5.6. *Blunting* von DNA-Fragmenten

Bei Klonierungen von DNA-Fragmenten kann es vorkommen, dass die Enden der Fragmente nicht zueinander kompatibel sind. In diesem Fall müssen die Enden der Fragmente so behandelt werden, dass sie keine Überhänge mehr besitzen. Dies kann sowohl durch Auffüllen als auch durch Entfernen der Überhänge geschehen.

3.2.5.6.1. Auffüllen von 5'-Überhängen und Entfernen von 3'-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Polymerase- und eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Die Exonuklease-Aktivität ist gegenüber der des Klenow-Fragmentes mehr als 200-mal stärker. Somit eignet sich die T4-DNA-Polymerase auch hervorragend für die Entfernung von 3'-Überhängen.

Benötigtes Material:

- T4-DNA-Polymerase
- 5× T4-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
- dNTP-Mix, 2 mM each

Durchführung:

Standard-Reaktionsansatz:

- 1 µg lineare DNA
- 4 µl 5× T4-DNA-Polymerase-Reaktionspuffer
- 1 µl dNTP-Mix (2 mM each)
- ad 20 µl ddH₂O
- 0,2 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl)

Der Ansatz wurde bei 11°C für 20 min inkubiert und anschließend die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 10 min gestoppt.

3.2.5.6.2. Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment

Bei dem Klenow-Fragment handelt es sich um das große Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I. Es besitzt die 5'→3'-Polymerase- und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I; die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität fehlt jedoch.

Benötigtes Material:

Klenow-Fragment

10× Klenow-Fragment-Reaktionspuffer

dNTP-Mix, 2 mM each

Durchführung:

Standard-Reaktionsansatz:

- 0,1-5 µg lineare DNA
- 2 µl 10× Klenow-Fragment-Reaktionspuffer
- 0,5 µl dNTP-Mix (2 mM each)
- ad 20 µl ddH₂O
- 0,1-0,5 µl Klenow-Fragment (10 U/µl)

Der Ansatz wurde bei 37°C für 10 min inkubiert und anschließend die Reaktion durch Erhitzen auf 75°C für 10 min gestoppt.

Methoden

3.2.5.6.3. Entfernen von 5'- und 3'-Überhängen mit der S1-Nuklease

Die S1-Nuklease baut einzelsträngige Nukleinsäuren ab und ist in der Lage, auch bei doppelsträngiger DNA durch Einzelstrangbrüche, Lücken, *Mismatches* oder *Loops* entstandene einzelsträngige Regionen zu spalten.

Benötigtes Material:

S1-Nuklease

5× S1-Nuklease-Reaktionspuffer

0,5 M EDTA

Durchführung:

Standard-Reaktionsansatz:

1 µg DNA
6 µl 5× S1-Nuklease-Reaktionspuffer
ad 30 µl ddH₂O
0,1 µl S1-Nuklease (10 U/µl)

Der Ansatz wurde bei RT für 30 min inkubiert (optimale Dauer muss unter Umständen experimentell herausgefunden werden). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und durch Erhitzen auf 70°C für 10 min gestoppt.

3.2.6. Enzymatische DNA-Amplifikation

3.2.6.1. Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Fragmente variabler Größe vervielfältigen und modifizieren (Saiki et al., 1988; Mullis, 1990). Man benötigt für diese Amplifizierung zwei Primer, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt einrahmen und sich gegenläufig an den komplementären Strängen spezifisch anlagern. Im ersten Reaktionszyklus wird der DNA-Doppelstrang durch thermische Denaturierung (92-96°C) in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend wird die Temperatur so weit erniedrigt, dass sich die beiden Primer an die Einzelstränge anlagern können (Annealing). Mit Hilfe einer DNA-Polymerase und in Gegenwart von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) erfolgt

dann die DNA-Synthese (Elongation). Es entstehen zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle. Durch die Wiederholung der einzelnen Schritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) über mehrere Reaktionszyklen erfolgt eine exponentielle und selektive Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnitts.

Primer und Primerdesign

Für das Gelingen einer PCR sind bestimmte Eigenschaften der Primer essentiell: (1) Ihre Sequenz sollte möglichst spezifisch für das gewünschte Amplifikat sein. (2) Die Primer sollten nicht miteinander hybridisieren und keine Haarnadelschleifen ausbilden. (3) Ihre komplementäre Sequenz sollte nur einmal auf der eingesetzten Template-DNA vorkommen. (4) Die Schmelztemperatur (T_m) der beiden verwendeten Primer sollte etwa gleich hoch sein und der GC-Gehalt ihrer Sequenzen sollte 60% nicht überschreiten. Die Schmelztemperatur kann mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden:

$$T_m = \left[2 \cdot \sum (A+T) + 4 \cdot \sum (G+C) \right] \text{ °C}$$

Die Annealing-Temperatur wird für Primer mit bis zu 15 Nukleotiden etwa 5°C unter der errechneten T_m gewählt. Für Primer mit mehr als 20 Nukleotiden nutzt man eine um circa 5°C verringerte T_m , berechnet nach der *Nearest Neighbour*-Formel (vom Hersteller angegeben).

DNA-Polymerasen

Die PCR wurde mit zwei verschiedenen DNA-Polymerasen durchgeführt: zum einen mit der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, zum anderen mit der *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Bei diesen beiden Stämmen handelt es sich um hyperthermophile Bakterien beziehungsweise Archaea (*Pyrococcus*), deren Enzyme aufgrund ihres natürlichen, sehr heißen Habitats enorm hitzestabil sind. Dies ermöglicht ein mehrfaches zyklisches Erhitzen während der PCR, ohne ein Denaturieren des Proteins zu verursachen.

Die *Taq*-DNA-Polymerase hat den Vorteil der höheren Einbaugeschwindigkeit gegenüber der *Pfu*, jedoch besitzt die *Pfu*-DNA-Polymerase eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität. Dies ermöglicht ihr, Nukleotide auf Korrektheit des Einbaus zu überprüfen und gegebenenfalls auszutauschen.

Methoden

Benötigtes Material:

Taq- bzw. *Pfu*-DNA-Polymerase

10× Reaktionspuffer (mit Mg²⁺)

Forward-Primer

Reverse-Primer

dNTP-Mix, 10 mM each

Durchführung:

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden nachfolgende Ansätze mit einem Reaktionsvolumen von 100 µl auf Eis zusammen pipettiert. Dabei wurde stets eine Negativkontrolle mit ddH₂O statt DNA mitgeführt.

PCR-Ansatz mit *Taq*-DNA-Polymerase:

x µl Template-DNA (50 pg - 100 ng)
2 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
2 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)
2 µl dNTP-Mix (10 mM each)
10 µl 10× *Taq*-Reaktionspuffer (mit Mg²⁺)
ad 99,5 µl ddH₂O
0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)

Reaktionsbedingungen für die *Taq*-PCR:

93°C	2 min	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
93°C	30 s		Denaturierung
T _m -5°C	30 s	25-35 Zyklen	Annealing
72°C	1 min/kb		Elongation
72°C	7 min	1 Zyklus	Finale Elongation
4°C	∞		Kühlung

PCR-Ansatz mit *Pfu*-DNA-Polymerase:

x µl	Template-DNA (50 pg - 100 ng)
2 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	dNTP-Mix (10 mM each)
10 µl	10× <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer (mit Mg ²⁺)
ad 99 µl	ddH ₂ O
1 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Reaktionsbedingungen für die *Pfu*-PCR:

95°C	2 min	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
95°C	30 s		Denaturierung
T _m -5°C	30 s	25-35 Zyklen	Annealing
72°C	2 min/kb		Elongation
72°C	7 min	1 Zyklus	Finale Elongation
4°C	∞		Kühlung

Um Restriktionsschnittstellen an den Enden eines DNA-Fragments einzubringen, wurden Primer mit einer Erkennungssequenz für die jeweilige Endonuklease im 5'-Überhang (*Tail*-Sequenz) verwendet. Zur Amplifikation des DNA-Abschnitts wurde eine *Two-Step*-PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

95°C	2 min	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
95°C	30 s		Denaturierung
T _{m core} -5°C	30 s	5 Zyklen	Annealing
72 C	2 min/kb		Elongation
95°C	30 s		Denaturierung
T _{m core+tail} -5°C	30 s	30 Zyklen	Annealing
72°C	2 min/kb		Elongation
72°C	7 min	1 Zyklus	Finale Elongation
4°C	∞		Kühlung

Die entstandenen PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese (3.2.4) analysiert.

Methoden

3.2.6.2. Kolonie-PCR

Die PCR kann auch als Methode zum Nachweis positiver bakterieller Klone verwendet werden, um diese auf das Vorliegen einer bestimmten DNA-Sequenz beziehungsweise eines zuvor transformierten Plasmids zu überprüfen. Dabei nutzt man die Tatsache aus, dass die zu testenden Bakterien während der initialen Denaturierung durch die Hitze zerstört werden und die in ihnen enthaltene DNA als Template für eine Polymerase-Kettenreaktion zur Verfügung steht.

Durch geschickte Auswahl der Primer können die Kolonien nicht nur auf das Vorhandensein des Plasmids, sondern auch auf die Orientierung des Inserts im Vektor getestet werden, sofern zwei Orientierungen, zum Beispiel aufgrund einer *blunt-end*-Ligation, möglich sind.

Benötigtes Material:

Taq-DNA-Polymerase

10× *Taq*-(NH₄)₂SO₄-Reaktionspuffer (mit Mg²⁺)

Forward-Primer

Reverse-Primer

dNTP-Mix, 10 mM each

Durchführung:

Es wurde ein Mastermix auf Eis zusammengestellt, der für jede zu analysierende Bakterienkolonie, für eine Positiv- (Plasmid oder positive Bakterienkultur) und eine Negativkontrolle (ddH₂O) sowie für eine Reserve-Reaktion je einen 40 µl-Reaktionsansatz enthielt:

- 1 µl Forward-Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl)
- 0,75 µl dNTP-Mix (10 mM each)
- 4 µl 10× *Taq*-(NH₄)₂SO₄-Reaktionspuffer (mit Mg²⁺)
- 33 µl ddH₂O
- 0,25 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)

Der Mastermix wurde durch Schütteln gut gemischt und auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Mit einer Pipettenspitze wurden die auf der zu testenden Platte befindlichen Kolonien

einzel gepickt und auf einer Replika-Platte (Abb. 3-2) ausgestrichen. Die restlichen an der Pipettenspitze befindlichen Bakterien wurden in den PCR-Ansatz überführt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette mit diesem gemischt.

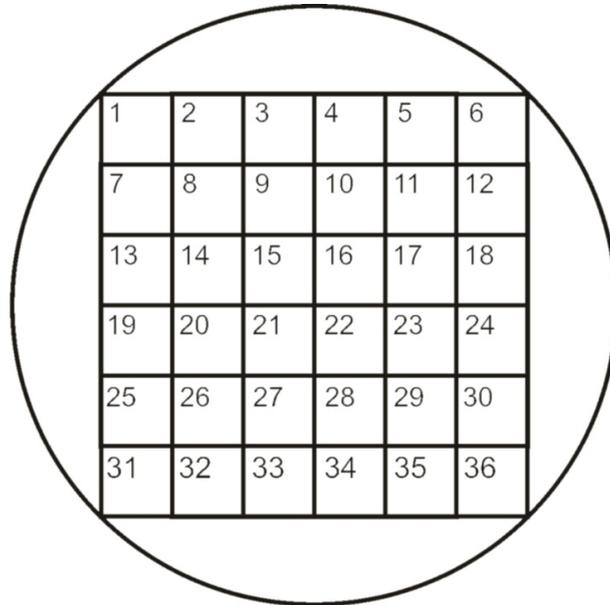


Abb. 3-2: Schematische Darstellung einer Replika-Platte

Eine Vorlage dieses Rasters wurde ausgedruckt und auf die Rückseite einer Agar-Selektionsplatte geklebt. Die Zahlen markieren die Bereiche, in welche die gepickten Klone überimpft wurden.

Reaktionsbedingungen für die Kolonie-PCR:

95°C	5 min	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
93°C	30 s		Denaturierung
T _m -5°C	30 s	35 Zyklen	Annealing
72°C	1 min/kb		Elongation
72°C	7 min	1 Zyklus	Finale Elongation
4°C	∞		Kühlung

Die Replika-Platte wurde anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Sofern die Kolonie-PCR als Ergebnis positive Klone bestätigte, konnten von diesen unter Zuhilfenahme der Replika-Platte Übernachtflüssigkulturen (3.1.1) angesetzt werden, um die gewünschte DNA durch Plasmidpräparation (3.2.1.1) aus den Bakterien zu isolieren. Des Weiteren wurde eine Spaltung mithilfe von Restriktionsendonukleasen (3.2.5.1) durchgeführt, um das Ergebnis der Kolonie-PCR zu verifizieren. Um zu verhindern, dass auf der Ursprungsplatte verbliebene

Methoden

Reste des Ligationsansatzes ein falsch positives Ergebnis liefern, wurden die Kolonien der Replika-Platte zum Teil auf eine zweite überführt und nochmals bei 37°C über Nacht kultiviert. Erst von diesen Kolonien wurde dann eine Kolonie-PCR durchgeführt.

3.2.6.3. Zielgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe dieser Methode können in doppelsträngige DNA sequenzspezifisch Punktmutationen eingeführt werden. Zur zielgerichteten Mutagenese benötigt man ein methyliertes Plasmid, welches das zu mutierende Insert enthält, sowie zwei Primer, die in der Mitte ihrer Sequenz die gewünschte Mutation aufweisen. In einer PCR-Reaktion binden diese Primer, die zueinander revers komplementär sind, an die DNA-Stränge des Plasmids und werden durch *Pfu*-DNA-Polymerase elongiert. Am Ende der Reaktionsfolge liegen Duplexe aus einem neu synthetisierten DNA-Strang vor, der am 5'-Ende des Primers einen Strangbruch aufweist, und aus dem ursprünglichen, methylierten Ausgangs-DNA-Strang. Aufgrund dessen ist es in einem zweiten Schritt möglich, den methylierten Strang mithilfe der Restriktionsendonuklease *DpnI* zu fragmentieren, da dieses Enzym spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an den Zielsequenzen 5'-Gm₆ATC-3' spaltet. Anschließend wird die mutierte DNA mit dem Strangbruch in Bakterien transformiert (3.1.5), wo sie durch das bakterielle Ligase-System wieder in doppelsträngige geschlossene DNA konvertiert wird. Einen schematischen Überblick über die Methode zeigt Abb. 3-3.

Benötigtes Material:

Pfu-DNA-Polymerase

10× *Pfu*-Reaktionspuffer (mit Mg²⁺)

Forward-Primer

Reverse-Primer

dNTP-Mix, 10 mM each

Durchführung:

Das Protokoll wurde abgeleitet aus der Anleitung zum QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene. Die Konstruktion der Primer erfolgte anhand der folgenden Angaben aus dieser Anleitung: Die Primerlänge sollte zwischen 25 und 45 Basen

liegen und eine Schmelztemperatur von $\geq 78^\circ\text{C}$ aufweisen. Zur Berechnung der Schmelztemperatur wurde folgende Formel verwendet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{675}{N} - \%mismatch$$

- N – Länge des Primers in Basen
- %GC – GC-Gehalt des Primers in % (ganzzahlig)
- %mismatch – Anteil der Fehlpaarungen in % (ganzzahlig)

Zudem sollte sich die Mutation in der Mitte des Primers mit 10-15 Basen der korrekten Sequenz an beiden Seiten befinden. Der GC-Gehalt sollte optimalerweise mindestens 40% betragen und die Primer sollten mit einer oder mehreren G- oder C-Basen enden.

Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR:

- 5-50 ng Template-DNA
- 1 μl Forward-Primer (10 pmol/ μl)
- 1 μl Reverse-Primer (10 pmol/ μl)
- 1 μl dNTP-Mix (10 mM each)
- 5 μl 10 \times *Pfu*-Reaktionspuffer (mit Mg^{2+})
- ad 49 μl ddH₂O
- 1 μl *Pfu*-DNA-Polymerase (2,5 U/ μl)

PCR-Programm für die *Pfu*-PCR:

95°C	1 min	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
95°C	1 min		Denaturierung
55°C	1 min	18 Zyklen	Annealing
68°C	2 min/kb		Elongation
4°C	∞		Kühlung

Zur Spaltung der methylierten Ausgangs-DNA wurde nach der PCR-Reaktion 1 μl *DpnI* (10 U/ μl) in das PCR-Reaktionsgefäß gegeben, vermischt und mindestens 1 h bei 37°C

Methoden

inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 min bei 80°C. Alternativ wurde die *Dpn*I-Restriktionsspaltung über Nacht bei 37°C in folgendem Ansatz durchgeführt:

- 50 µl PCR-Ansatz
- 6 µl 10× *Dpn*I-Reaktionspuffer
- 3 µl ddH₂O
- 1 µl *Dpn*I (10 U/µl)

Mit 5 und 30 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend kompetente *E. coli* des Bakterienstammes XL1-Blue transformiert (3.1.5). Die Plasmid-DNA der transformierten Klone wird durch Sequenzierung (3.2.7) oder, wenn möglich, durch spezifische Restriktionsspaltung (3.2.5.1) auf die gewünschte Mutation hin untersucht.

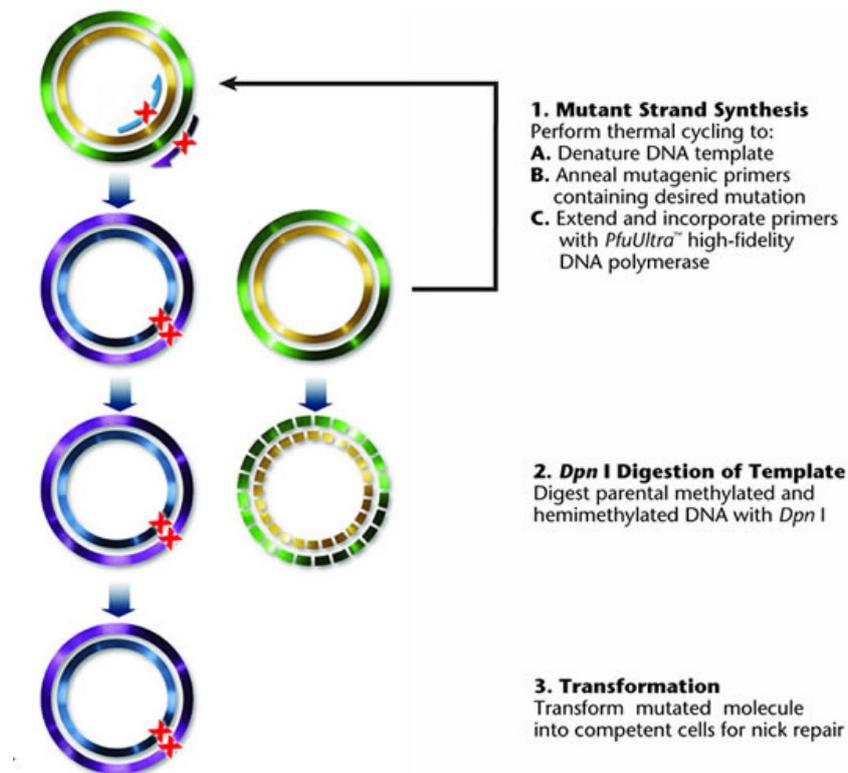


Abb. 3-3: Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe einer PCR-Reaktion
(Quelle: QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, 2006)

3.2.7. Southern Blot

Durch die Methode des Southern Blot wird gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA durch das Anlegen eines Kapillarsoges aus dem Gel heraus auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und dort aufgrund der kovalenten Bindung permanent immobilisiert. Die DNA kann später durch Hybridisierung mit markierten Sonden nachgewiesen werden.

3.2.7.1. Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Eine mit Digoxigenin (DIG) markierte Sonde wurde durch die Methode des *Random Priming* hergestellt. Dabei wird die doppelsträngige Template-DNA denaturiert und mit Zufallshexameren hybridisiert, die einem Klenow-Fragment als Primer dienen. Der komplementäre Strang wird aus einer dNTP-Mischung, die DIG-11-dUTP (Abb. 3-4) enthält, synthetisiert. Dabei werden etwa 10-30 markierte Nukleotide pro 1.000 bp eingebaut.

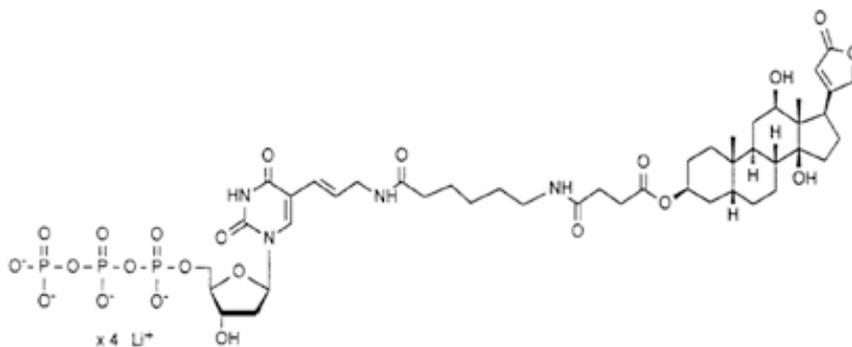


Abb. 3-4: Strukturformel von DIG-11-UTP
(Quelle: DIG DNA Labeling Kit, Roche, 2004)

Benötigtes Material:

Template-DNA

DIG DNA Labeling Kit

Random Hexamer Primer

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde mit 1,5 µg Template-DNA wie in der Kit-Anleitung (Stand: Oktober 2004) angegeben hergestellt, über Nacht bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA 15 min bei 65°C inaktiviert. Die Konzentration der resultierenden Sonde

Methoden

wurde nach einer Fällung (3.2.2.2) photometrisch ermittelt (3.2.3.1). Abschließend wurde die Sonde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.7.2. Gelelektrophorese

Benötigtes Material:

Agarose-Gel

TAE-Puffer

Durchführung:

Die DNA-Proben wurden nach der Restriktionsspaltung (3.2.5.1) auf 12 cm langen Agarose-Gelen bei 4°C und 120 V elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.4), anschließend unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) analysiert und fotografisch festgehalten.

3.2.7.3. Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran

Die treibende Kraft beim Kapillar-Blot ist ein Flüssigkeitsstrom, der von einem Reservoir ausgehend von unten durch das Gel weiter durch die Membran zu einem Stapel saugfähigen Materials läuft. Die Flüssigkeit ist eine alkalische Pufferlösung, welche die DNA wieder in Einzelstränge zerlegt. Dieser Strom zieht die DNA aus dem Gel mit, die anschließend auf der Membran hängen bleibt. Wichtig ist, dass sich nirgendwo im Aufbau Luftblasen befinden, da sie den Flüssigkeitsstrom unterbrechen würde und an dieser Stelle die DNA nicht übertragen werden würde.

Benötigtes Material:

Southern-Denaturierungspuffer

Nylon-Membran (Porablot NY⁺)

Whatman-Papier 3MM Chr

Papierhandtücher

Parafilm bzw. Kunststoffschablone

2× SSC

Durchführung:

Das zu blottende DNA-Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese und Fotografieren des Gels für 30 min in Denaturierungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die DNA-Blot-Apparatur (Abb. 3-5) aufgebaut: Über einen in das Denaturierungspuffer-Reservoir eintauchenden Whatman-Papierstreifen wurden 6-8 genau zugeschnittene und angefeuchtete Whatman-Papiere blasenfrei übereinandergelegt. Auf diesen Stapel wurde nun das Gel (mit den Geltaschen-Öffnungen nach unten) platziert. Die Bereiche des Gels, die nicht geblottet werden sollten, wurden mit Parafilm bzw. einer Kunststoffschablone abgedeckt. Anschließend wurde die mit ddH₂O angefeuchtete Nylonmembran und weitere 6-8 Whatman-Papiere blasenfrei aufgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Nylonmembran und die aufzulegenden Papiere ein wenig größer sein sollten als der zu blottende Bereich des Gels. Darauf wurde ein Stapel zugeschnittener Papiertücher (ca. 10 cm hoch) geschichtet, mit einer Glasscheibe abgedeckt und mit einer gefüllten Glasflasche beschwert. Der Transfer der DNA auf die Membran wurde über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Blotting-Apparatur abgebaut, die Nylonmembran auf der DNA-Seite mit einem Bleistift markiert, zweimal 5 min in 2× SSC gewaschen und unter UV-Licht ($\lambda=320$ nm) analysiert und fotografiert. Anschließend wurde sie für 15 min luftgetrocknet und für 2 h im Hybridisierungsofen bei 80°C gebacken, um die DNA zu fixieren. Die Membran wurde nun direkt für die Hybridisierung mit einer markierten Sonde (3.2.7.4) genutzt oder für eine spätere Analyse zwischen zwei Whatman-Papier-Lagen mit Frischhalte- und Aluminiumfolie eingepackt und bei -20°C gelagert.

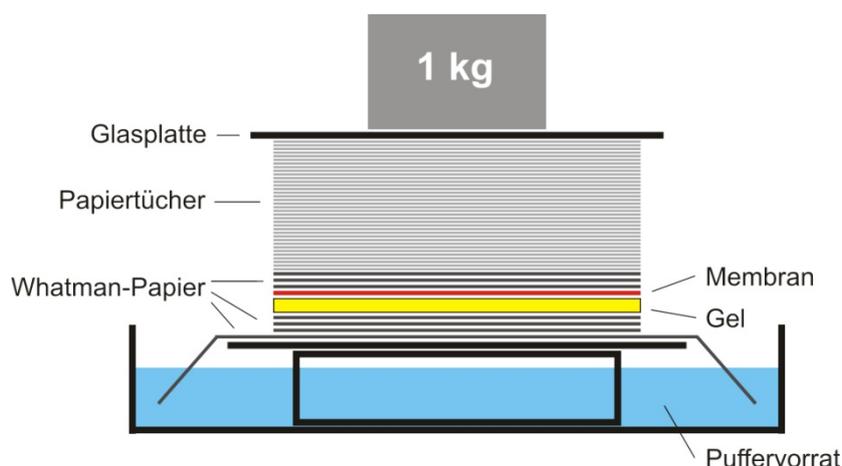


Abb. 3-5: Aufbau der Blotting-Apparatur

3.2.7.4. Hybridisierung der DNA mit einer DIG-markierten Sonde

Die Sonde wird kurz vor Gebrauch zu einzelsträngiger DNA denaturiert. Nur so kann sie mit der ebenfalls einzelsträngigen DNA auf der Membran Basenpaarungen eingehen. Dieser Schritt erfolgt bei einer Temperatur, die garantiert, dass sich die Sonde nur an die gesuchte Zielsequenz bindet und keine unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Sequenzen oder Membranteilen auftreten.

Benötigtes Material:

Southern-Hybridisierungspuffer

DIG-markierte Sonde

Durchführung:

Die Nylonmembran mit der gebundenen DNA wurde für 2 h bei 40°C im Hybridisierungsofen mit 30-40 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde 5 min in kochendem Wasser erhitzt, anschließend mit einer Endkonzentration von 25 ng/ml zu 40 ml neuem Hybridisierungspuffer zugegeben, um die Sonde im denaturierten (einzelsträngigen) Zustand zu erhalten, und mit der Membran über Nacht bei 40°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran umgehend zur Detektion der Sonde eingesetzt.

3.2.7.5. Immundetektion der gebundenen Sonde durch eine Farbreaktion

Nach dem Hybridisieren kann die Sonde durch ein Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat nachgewiesen werden. Das Konjugat besteht aus einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der die in der Sonde enthaltenen DIG-11-dUTPs erkennt und bindet. Der Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, die im anschließenden Schritt eine Farbreaktion katalysiert. Diese Reaktion (Abb. 3-6) hat die Bildung eines wasserunlöslichen Indigo-Farbstoffs zur Folge, der sich an der Bindungsstelle des Antikörpers auf dem Blot niederschlägt.

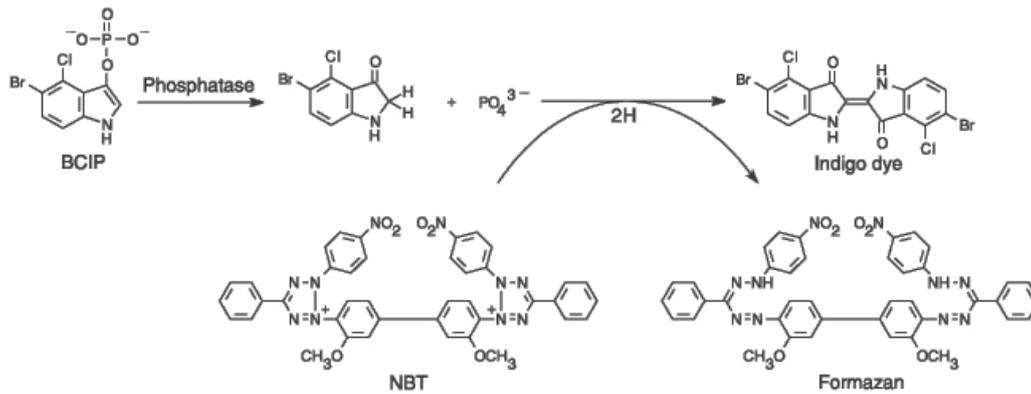


Abb. 3-6: Prinzip der Umsetzung von NBT/BCIP durch Alkalische Phosphatase
(Quelle: Molecular Probes: The Handbook, Invitrogen)

Benötigtes Material:

2× SSC + 0,1% SDS

0,5× SSC + 0,1% SDS

Southern-Waschpuffer

Southern-Blocking Solution

DIG-Detektionspuffer

50× NBT/BCIP-Lösung

AP-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper

Durchführung:

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal für 5 min mit 2× SSC + 0,1% SDS bei RT, zweimal für 15 min mit 0,5× SSC + 0,1% SDS bei 65°C und einmal für 5 min mit Waschpuffer bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt mit Blocking Solution für 45 min bei 35°C, um nichtspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Der Antikörper wurde nun 1:10.000 (v/v) in 30-40 ml Blocking Solution verdünnt und für 45 min bei 35°C mit dem Blot inkubiert. Ab diesem Schritt musste der Blot immer feucht gehalten werden, um bei der späteren Detektion keine falschen Signale zu bekommen. Es folgten zwei Waschschrte für 15 min mit jeweils 150 ml Waschpuffer und ein Waschschrte für 5 min mit 40 ml Detektionspuffer. Anschließend wurden 800 µl der 50× NBT/BCIP-Lösung in 40 ml Detektionspuffer verdünnt, auf den Blot gegeben und dann im Dunkeln (Schublade) so lange inkubiert, bis die Banden in der gewünschten Intensität zu sehen waren. Die Farbreaktion wurde mit ddH₂O abgestoppt, der Blot fotografiert/eingescannt, zwischen zwei Lagen Whatman-Papier unter einer Glasplatte getrocknet und danach lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.8. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger (Sanger et al., 1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass die Elongation dann abbricht, wenn 2',3'-Dideoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs, so genannte Terminatoren) eingebaut werden, an die eine DNA-Polymerase wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe an der Ribose des Nukleotids kein weiteres anfügen kann. Auf diese Weise erhält man DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Die verwendeten ddNTPs sind fluoreszenzmarkiert, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff versehen ist (Adenin: R6G, grün; Thymin: ROX, rot; Cytosin: TAMRA, gelb; Guanin: R110, blau). Im Sequenziergerät laufen die unterschiedlich langen DNA-Stücke einer Sequenzierungsreaktion zunächst in einer gelgefüllten Glaskapillare entlang eines elektrischen Feldes, analog einer Gelelektrophorese; die Farbmarkierungen der ddNTPs werden dabei an einem bestimmten Messpunkt von einem Laser detektiert und von einem Rechner in die entsprechende Nukleotidsequenz überführt.

Benötigtes Material:

Sequenzierungsprimer (Standardprimer werden von der Sequenzierstelle gestellt)

Durchführung:

Alle Sequenzierreaktionen im Rahmen dieser Arbeit wurden von den Mitarbeitern der Sequenzierstelle des IZKF Leipzig, Zentraler Funktionsbereich DNA-Sequenzierung, durchgeführt.

3.2.9. *In-vitro*-Transkription mitochondrialer Plasmide

3.2.9.1. Herstellung eines mitochondrialen *in-vitro*-Transkriptionsextraktes (modifiziert nach Fernandez-Silva *et al.*, 1996)

Bei der *in-vitro*-Transkription erfolgt die Synthese der RNA anhand einer Template-DNA in einem zellfreien System. Da die Mitochondrien ein eigenes Transkriptionssystem besitzen, kann für die *in-vitro*-Transkription mitochondrialer Gene keines der etablierten Transkriptionssysteme genutzt werden. Durch die Herstellung eines Transkriptionsextraktes aus isolierten Mitochondrien ist es jedoch möglich, die Transkription mit mitochondrialen Promotoren zu nutzen.

Benötigtes Material:

aufgereinigte Mitochondrien aus Placenta
MS-Puffer (mitochondria suspension buffer)
ML-Puffer (mitochondria lysis buffer)
Tween 20
5 M KCl

Durchführung:

Die aufgereinigten Mitochondrien aus humaner Placenta (3.2.1.3) wurden in zwei Volumen MS-Puffer aufgenommen und anschließend für 10 min bei 4°C und 13.000× g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Volumen ML-Puffer aufgenommen, mit 0,5% Tween 20 sowie 0,5% KCl versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde im Glas-Homogenisator durch 10 Hübe bei 100 rpm suspendiert und bei 4°C und 13.000× g für 45 min zentrifugiert. Der klare Überstand (S-13-Extrakt) wurde vorsichtig abgenommen, aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Der Extrakt blieb mindestens ein Jahr lang aktiv.

3.2.9.2. *In-vitro*-Transkription

Die Template-DNA muss vor dem Einsatz in der *in-vitro*-Transkription durch eine Restriktionsendonuklease stromabwärts des Promotors und des zu transkribierenden

Methoden

Fragmentes linearisiert werden. Geschieht dies nicht, erhält man aufgrund der Prozessivität der RNA-Polymerasen eine Vielzahl unterschiedlicher RNAs. Zum Schutz der entstehenden RNA-Moleküle vor eventuell vorhandenen RNasen ist die Zugabe eines RNase-Inhibitors sinnvoll.

Benötigtes Material:

linearisierte Template-DNA

RiboLock™ RNase-Inhibitor

rNTP-Mix, 25 mM each

DEPC-H₂O

S-13-*in-vitro*-Transkriptionsextrakt

2× Transkriptionspuffer

Transkriptions-Stop-Puffer

Durchführung:

Zur *in-vitro*-Transkription wurde der folgende Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 100 µl auf Eis zusammenpipettiert:

x µl	Template-DNA (2 µg)
2,5 µl	RiboLock™ RNase-Inhibitor (100 U)
4 µl	rNTP-Mix
ad 35 µl	DEPC-H ₂ O
15 µl	S13- <i>in-vitro</i> -Transkriptionsextrakt
50 µl	2× Transkriptionspuffer

Der Ansatz wurde bei 30°C für 45 min inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Transkriptions-Stop-Puffer gestoppt.

3.2.9.3. Aufreinigung der RNA aus dem *in-vitro*-Transkriptionsextrakt

Um RNA aus dem Reaktionsansatz, der einen hohen Proteinanteil besitzt, isolieren zu können, wird der Ansatz einer Phenol-/Chloroform-Extraktion unterzogen. Durch den Einsatz von Phenol mit einem pH-Wert von 4,5-5 wird die RNA in der wässrigen Phase angereichert,

während sich die DNA eher in der Interphase ansammelt, so dass die DNA-Kontamination im RNA-Eluat vermindert wird. Das Lösungsmittel Phenol stört nachfolgende enzymatische Reaktionen und muss deshalb sorgfältig durch mehrmaliges Ausschütteln mit Chloroform entfernt werden.

Benötigtes Material:

Phenol pH 4,5-5

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1 (v/v/v)

Chloroform/Isoamylalkohol, 24:1 (v/v)

Chloroform

DEPC-H₂O

Durchführung:

Die RNA-Lösung wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol, einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils bei RT bei 14.000× g zentrifugiert, bis die Phasen vollständig getrennt waren und anschließend wurde die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um sicherzustellen, dass kein Phenol mehr in der RNA-Lösung vorhanden ist, erfolgte die Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion bis zu fünf Mal (es durfte keine Interphase mehr zu sehen sein). Beim letzten Schritt wurde Chloroform statt Chloroform/Isoamylalkohol verwendet. Anschließend erfolgte eine Fällung der Nukleinsäuren mittels Ethanol (3.2.2.2). Das Pellet wurde in 25 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

3.2.10. Reverse Transkription von RNA

Bei der Reversen Transkription werden vorhandene RNA-Moleküle mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in die komplementäre ssDNA, die cDNA, umgeschrieben. Diese cDNA-Moleküle können anschließend im Gegensatz zu RNA-Molekülen durch PCR amplifiziert werden. Vor der Reversen Transkription muss die RNA durch eine DNase-Behandlung vollständig von vorhandener DNA befreit werden, da diese in nachfolgenden Schritten stören könnte.

Methoden

3.2.10.1. Entfernung von DNA-Verunreinigungen der RNA

Benötigtes Material:

DNase I, RNase-frei, hc, 1:10 verdünnt

10× DNase-Reaktionspuffer

RiboLock™ RNase-Inhibitor

50 mM EDTA, pH 8

DEPC-H₂O

Durchführung:

Es wurde der folgende Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 100 µl auf Eis zusammenpipettiert:

- 5 µl RNA aus *in-vitro*-Transkription
- 0,5 µl RiboLock™ RNase-Inhibitor (20 U)
- 2 µl 10× DNase-Reaktionspuffer
- 10,5 µl DEPC-H₂O
- 2 µl DNase I, RNase-frei (10 U)

Der Ansatz wurde bei 37°C für 60 min inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 50 mM EDTA gestoppt und die DNase I für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

3.2.10.2. Reverse Transkription

Benötigtes Material:

RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase

5× Reaktionspuffer

Primer

RiboLock™ RNase-Inhibitor

dNTP-Mix, 10 mM each

DEPC-H₂O

Durchführung:

Es wurde der folgende Standardreaktionsansatz auf Eis zusammenpipettiert, wobei immer auch eine Kontrollreaktion mit DEPC-H₂O statt RNA mitgeführt wurde:

- 5 µl RNA (DNase-behandelt)
- x µl Primer (20 pmol genspezifischer Primer bzw. 100 pmol Oligo dT-Primer)
- ad 12,5 µl DEPC-H₂O

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, langsam abgekühlt und danach auf Eis gelagert. Anschließend wurden folgende Komponenten für die eigentliche Reverse Transkription hinzugegeben:

- 4 µl 5× Reaktionspuffer
- 0,5 µl RiboLock™ RNase-Inhibitor (20 U)
- 2 µl dNTP-Mix, 10 mM each
- 1 µl RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase (200 U)

Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch eine Hitzeinaktivierung von 10 min bei 70°C gestoppt. Die Proben wurden entweder direkt in PCR-Reaktionen eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine im elektrischen Feld allein nach ihrer Masse aufgetrennt. Erreicht wird dies durch die Zugabe von SDS und einer Hitzedenaturierung in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol. Das Detergenz SDS zerlegt oligomere Proteine in ihre Untereinheiten. Dabei wird durch die Bindung der SDS-Moleküle an die entfalteten Peptide eine stark negative Ladung übertragen, weshalb die ursprüngliche Ladung der Proteine keine Rolle mehr spielt. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol und den anschließenden Erhitzungsschritt werden vorhandene Disulfidbrücken gespalten, so dass sich diese Peptidketten vollständig entfalten können (Laemmli, 1970).

3.3.1.1. Gießen eines SDS-Polyacrylamid-Gels

Benötigtes Material:

PAGE-Lösung A

PAGE-Lösung B

PAGE-Lösung C

PAGE-Lösung D

APS-Stammlösung (10% (w/v) in ddH₂O)

TEMED

Durchführung:

Es wurden ausschließlich Minigele mit dem „Mini-Protean 3“-System der Firma Bio-Rad benutzt. Zunächst wurden jeweils zwei Glasplatten übereinander gelegt, in dem mitgelieferten Halter fixiert und in den Gelgießstand eingesetzt. In dem Gelgießstand wurden die Platten an der Unterseite verschlossen, so dass kein weiteres Abdichten notwendig war. Anschließend wurde der Kamm eingesetzt und eine Markierung ca. 5-7 mm unterhalb der Taschen auf die Glasplatte aufgebracht. Je nach gewünschter Trenngel-Konzentration wurde die Lösungen (Tab. 3-4) in einem 15-ml-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, gut gemischt, mit einer Pasteurpipette bis zur Markierung eingefüllt und sofort mit ddH₂O überschichtet. Nach rund

30 min wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel vorbereitet (Tab. 3-5). Das Sammelgel wurde nun über das Trenngel geschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach weiteren 30 min war das Gel auspolymerisiert und konnte für die Gelelektrophorese verwendet oder in Folie eingepackt bei 4°C gelagert werden.

Gelkonzentration	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%
ddH ₂ O	5,4 ml	5,1 ml	4,7 ml	4,4 ml	4,1 ml	3,7 ml	3,4 ml
PAGE-Lösung A	2,0 ml	2,3 ml	2,7 ml	3,0 ml	3,3 ml	3,7 ml	4,0 ml
PAGE-Lösung B	2,5 ml						
PAGE-Lösung C	100 µl						
APS	100 µl						
TEMED	10 µl						

Tab. 3-4: Pipettierschema für Trenngele bei der SDS-PAGE nach Laemmli

Gelkonzentration	4%	5%	6%	7%
ddH ₂ O	6,1 ml	5,7 ml	5,4 ml	5,1 ml
PAGE-Lösung A	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,3 ml
PAGE-Lösung D	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
PAGE-Lösung C	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tab. 3-5: Pipettierschema für Sammelgele bei der SDS-PAGE nach Laemmli

3.3.1.2. Vorbereitung der Proben

Benötigtes Material:

4× Protein-Probenpuffer

Unstained Protein Molecular Weight Marker

Durchführung:

Für einen Zellextrakt wurde das abgeerntete Zellpellet (3.4.2) einer konfluent bewachsenen 35-mm-Kulturschale in 90 µl ddH₂O resuspendiert und mit 30 µl 4× Protein-Probenpuffer

Methoden

versetzt. Andere Proteinproben wurden mit ddH₂O auf 12 µl aufgefüllt und 4 µl 4× Protein-Probenpuffer zugegeben. Alle Proteinproben wurden ebenso wie ein 5 µl-Aliquot des Größenstandards für 5 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen gelagerter Proben wurde der Erhitzungsvorgang wiederholt.

3.3.1.3. Gelelektrophorese

Benötigtes Material:

1× Laemmli-Laufpuffer

Durchführung:

Die Gele (3.3.2.1) wurden aus dem Halter herausgenommen, in den Elektrophorese-Einsatz eingespannt und in die Gelkammer eingesetzt. Anschließend wurde der Innenraum des Elektrophorese-Einsatzes bis 3 mm unterhalb des oberen Endes der Glasplatten und die Gelkammer bis ungefähr 2 cm über der Gelunterseite mit 1× Laemmli-Laufpuffer befüllt. Daraufhin wurden die Kämme entfernt und die Proben in die Taschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Danach wurde das Gel mit 150 V gefahren, bis die Farbstofflauffront des Probenpuffers die Unterkante des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde dann mit Coomassie gefärbt (3.3.2.4) oder geblottet (3.3.3).

3.3.1.4. Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R250 kann unter sauren Bedingungen an die Proteine im Gel binden, wodurch die Proteinbanden nach dem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffs sichtbar werden.

Benötigtes Material:

Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Entfärbelösung

Durchführung:

Das Gel wurde vorsichtig in die Färbelösung gegeben und für 30-45 min unter leichtem Schütteln gefärbt. Danach wurde die Färbelösung durch die Entfärbelösung ausgetauscht und das Gel so lange darin leicht geschüttelt, bis der überschüssige Farbstoff aus dem Gel gewaschen war. Das Gel wurde anschließend im Durchlicht abfotografiert und auf einem Filterpapier getrocknet (3.3.2.5).

3.3.1.5. Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Benötigtes Material:

Whatman-Papier 3MM Chr

Frischhaltefolie

Durchführung:

Das Gel wurde auf ein angefeuchtetes Filterpapier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und auf dem Plattentrockner unter Vakuum bei 55°C für 45-50 min getrocknet. Danach wurde die Frischhaltefolie abgezogen und das Gel auf dem Filterpapier archiviert.

3.3.2. Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine, die zuvor mittels einer SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, auf eine Membran aus Nitrocellulose, Nylon oder PVDF transferiert. Durch diesen Transfer wird eine darauffolgende Detektion vereinfacht, da die Proteine direkt auf der Oberfläche der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden vorliegen und somit für die zur Detektion eingesetzten Antikörper leicht zugänglich sind. Außerdem ist bei den häufigen Wasch- und Inkubationsschritten die wesentlich höhere mechanische Stabilität der Membran gegenüber einem Polyacrylamid-Gel von Vorteil. Die gebräuchlichste Methode für den Western Blot ist der elektrophoretische Transfer der Proteine nach dem Tank-Blot- bzw. dem Semi-Dry-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979).

3.3.2.1. Transfer auf eine PVDF-Membran

Benötigtes Material:

100% Methanol

Western-Transferpuffer

TBS

PVDF-Membran

Whatman-Papier 3MM Chr

Durchführung:

Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mit der Mini Trans-Blot[®]-Apparatur der Firma Bio-Rad durchgeführt. Zu Beginn wurde das Polyacrylamid-Gel (3.3.1.3) 15 min in dem Transferpuffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden die PVDF-Membran und die Filterpapiere auf die entsprechende Größe zugeschnitten. Die Membran wurde kurz in 100% Methanol angefeuchtet und dann zusammen mit den beiden Filterpapieren in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde der Blot, wie in Abb. 3-7 beschrieben, aufgebaut und anschließend in den Halter eingelegt. Der Halter wurde unter Beachtung der korrekten Orientierung in den Blottingeinsatz eingesteckt und zusammen mit einem Kühlakku in die Gelkammer eingesetzt. Nach dem vollständigen Befüllen der Gelkammer mit Transferpuffer wurde der Transfer bei 70 V für eine Stunde durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran für zwei Minuten in 1× TBS gewaschen. Die Erfolg des Transfers konnte daraufhin mit einer Ponceau S-Färbung (3.3.2.2) überprüft werden.

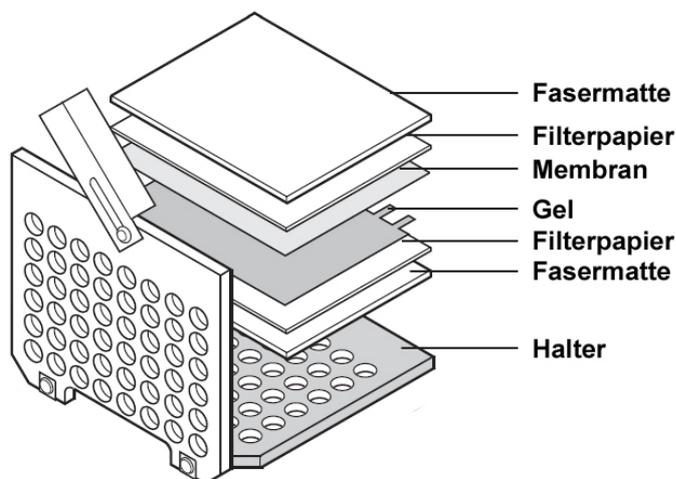


Abb. 3-7: Aufbau des Western Blot-Stapels
(modifiziert nach Originalanleitung der Blottingapparatur)

3.3.2.2. Ponceau S-Färbung

Im Gegensatz zu der Proteinfärbung mit Coomassie ist die Färbung mit Ponceau S reversibel, weshalb keine Beeinträchtigungen bei dem darauffolgenden immunochemischen Nachweis zu erwarten sind.

Benötigtes Material:

Ponceau S-Färbelösung

Durchführung:

Die Membran wurde dreimal für 5 min mit ddH₂O gewaschen und daraufhin für 1-2 min in der Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Danach wurde die Membran so lange mit ddH₂O gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Die Banden des Größenstandards wurden mit einem weichen Bleistift markiert und die Membran abfotografiert.

3.3.2.3. Spezifischer Proteinnachweis mit Antikörpern

Benötigtes Material:

Western-Blockierlösung

TBS

TBST

DIG-Detektionspuffer

50× NBT/BCIP-Lösung

Primärantikörper

AP-gekoppelter Sekundärantikörper

Durchführung:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Blot nach der Ponceau S-Färbung für eine Stunde unter leichtem Schütteln in Blockierlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschritte für je 5 min in 1× TBST, bevor die Membran mit dem Primärantikörper in Blockierlösung bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert wurde. Daraufhin folgten drei je fünfminütige Waschschritte in 1× TBST und eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper in Blockierlösung. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit 1× TBST

Methoden

wurde die Membran noch zweimal mit 1× TBS gespült, um noch vorhandenes Tween 20 zu entfernen. Anschließend wurden 200 µl der 50× NBT/BCIP-Lösung in 10 ml Detektionspuffer verdünnt, auf die Membran gegeben und dann im Dunkeln (Schublade) so lange inkubiert, bis die Banden in der gewünschten Intensität zu sehen waren. Die Farbreaktion wurde mit ddH₂O abgestoppt, der Blot fotografiert/eingescannt, zwischen zwei Lagen Whatman-Papier unter einer Glasplatte getrocknet und danach lichtgeschützt aufbewahrt.

3.4. Zellkultur

3.4.1. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen wurde unter Einhaltung aller Sicherheitsmaßnahmen bei keimarmen Bedingungen durchgeführt. Das Zellwachstum wurde mithilfe eines Inversmikroskops mit Phasenkontrasteinrichtung überprüft. Grundsätzlich galten die in Tab. 3-4 angegebenen Richtwerte für die verwendeten Kulturgefäße.

Gefäß	Fläche (cm ²)	Zelldichte beim Aussäen	Zelldichte bei Konfluenz	Wachstums- medium (ml)	PBS (ml)	Trypsin (ml)
Flaschen						
TC 25	25	0,7×10 ⁶	2,8×10 ⁶	5	2	1
TC 80	75	2,0×10 ⁶	8,0×10 ⁶	15	6	2
Schalen						
35 mm	8	0,3×10 ⁶	1,2×10 ⁶	2,5	2	0,5
60 mm	21	0,7×10 ⁶	3,2×10 ⁶	5	4	1
100 mm	55	2,0×10 ⁶	8,0×10 ⁶	10	8	2
150 mm	148	5,0×10 ⁶	2,1×10 ⁷	20	15	4

Tab. 3-6: Richtwerte für die Kultivierung von Zellen

Um etwaige Kontaminationen mit Mykoplasmen zu detektieren, wurden regelmäßig Kontrollen mit Hilfe des VenorGeM[®] Mycoplasma Detection Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Zellen wurden routinemäßig bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im CO₂-begasteten Brutschrank kultiviert und je nach Wachstumseigenschaften alle zwei bis vier Tage passagiert. Die verschiedenen verwendeten Zelllinien und Medien sind im Materialteil in Tab. 2-1 und Tab. 2-2 aufgeführt.

Methoden

3.4.2. Ablösen und Ernten von Zellen

3.4.2.1. Mechanische Ablösung von Zellen

Mit Hilfe eines Zellschabers können Zellen von der Oberfläche eines Kulturgefäßes gelöst werden. Diese Methode wurde nur zur Ernte von Zellen für Folgeexperimente eingesetzt.

Benötigtes Material:

PBS

Zellschaber

Durchführung:

Zunächst wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt. Danach wurden die Zellen dreimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und schließlich mit einem Zellschaber in 4 ml kaltem PBS vom Kulturgefäß gelöst. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Um den Verlust an Zellen möglichst gering zu halten, wurden 4 ml kaltes PBS in das Kulturgefäß gegeben, verteilt, abgenommen und in das Reaktionsgefäß mit der restlichen Zellsuspension transferiert. Die Zellen konnten nun bei 1.000× g und 4°C für 5 min pelletiert, schockgefroren und letztlich bei -80°C gelagert werden.

3.4.2.2. Enzymatische Ablösung von Zellen

Um adhärente Zellen von der Kulturschale abzulösen, wurde das proteolytische Enzym Trypsin verwendet. Aufgrund der schonenden Ablösung von Zellen wird diese Methode sowohl zur Passagierung als auch zur Ernte von Zellen für Folgeexperimente eingesetzt.

Benötigtes Material:

PBS

Trypsin-EDTA-Lösung

Durchführung:

Das verbrauchte Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese 5-10 min bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Da sich die Zelllinien hinsichtlich der optimalen Zeitdauer für das Ablösen unterschieden, war es wichtig, diesen Vorgang zu kontrollieren, um Zellschäden zu vermeiden. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurden die noch lose anhaftenden Zellen mit Kulturmedium vom Boden gespült.

Für Folgeexperimente wurde eine Zellkulturschale wie oben beschrieben behandelt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 1.000× g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in PBS aufgenommen und wiederholt unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands konnte das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

3.4.3. Bestimmung der Zellzahl

Benötigtes Material:

Röhrchen für Zellzähler

Durchführung:

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem Waschen in einer definierten Menge Medium homogen resuspendiert, 0,5-1 ml in die Probengefäße gefüllt, die in den Zellzähler Vi-CELL XR gestellt wurden. Die Gesamtzahl der Zellen konnte nach der Messung am Bildschirm abgelesen werden.

3.4.4. Kryokonservierung von Zellen

Zellen können mit Hilfe der Kryokonservierung über einen langen Zeitraum bei -196°C in flüssigem Stickstoff deponiert werden. Dabei erfolgt die Lagerung der Zellen in einem speziellen Gefriermedium, das DMSO enthält. Diese Komponente verhindert die Beschädigung der Zellen durch die Bildung von Eiskristallen und wirkt gegen die Dehydratation des Zytoplasmas, da sie das Zellwasser ersetzt. Weil Serum ebenfalls einen

Methoden

geringen schützenden Effekt beim Einfrieren besitzt, wird bei dieser Methode serumhaltiges Medium verwendet.

Benötigtes Material:

Einfriermedium (Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO)
Kryoröhrchen

Durchführung:

Die Zellen einer konfluenten 100-mm-Zellkulturschale wurden durch eine Trypsin-Behandlung (3.4.2.1) abgelöst, in ein 15-ml-Röhrchen gefüllt und bei $1.000\times g$ für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 8 ml des Einfriermediums resuspendiert und je 1,8 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gefüllt. Dieses wurde von Isopropanol umgeben zunächst für 24 h bei -80°C gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.5. Auftauen von Zellen

Nach einer korrekt durchgeführten Kryokonservierung können Zellen aus der Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wieder völlig intakt aufgetaut werden und erlangen nach wenigen Stunden ihre volle Teilungsaktivität wieder. Dazu wird das im Einfriermedium enthaltene DMSO aus den Zellen und dem Medium entfernt. Da DMSO ein starkes Zellgift ist, muss dies sehr schnell geschehen.

Benötigtes Material:

Kulturmedium

Durchführung:

Die Zellen in dem Kryoröhrchen wurden direkt aus dem flüssigen Stickstoff in das 37°C warme Wasserbad übertragen und dort inkubiert, bis sich gerade die letzten Eisbröckchen gelöst hatten. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15-ml-Röhrchen übertragen und mit 10-12 ml zelllinienspezifischem Kultivierungsmedium gemischt. Nach dem Pelletieren der Zellen bei $1.000\times g$ für 5 min wurde der Überstand mit dem größten Anteil an Einfriermedium abgesaugt, die Zellen in 5 ml serumhaltigem Medium resuspendiert und auf

einer 60-mm-Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um das restliche DMSO und Glycerin aus dem Überstand zu entfernen.

3.4.6. Transfektion eukaryontischer Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Dies erlaubt der Zelle, fremde (heterologe) Gene nach der DNA-Aufnahme zu exprimieren und ermöglicht somit dem Experimentator, bestimmte gewünschte Proteine, darunter zum Beispiel Markerproteine wie das GFP, in den zu untersuchenden Zelllinien herzustellen sowie Effekte einer Überexpression eines Proteins zu analysieren.

Man unterscheidet zwischen zwei Arten der Transfektion: Bei der transienten Transfektion wird ein Vektor in die Wirtszelle eingebracht, um eine vorübergehend starke Expression eines heterologen Gens zu erreichen. Diese Expression geht jedoch mit der Verdünnung des Vektors bei jeder Zellteilung rapide zurück. Sehr selten kommt es durch illegitime Rekombination zu einer Integration des Vektors in das Genom der Zelle, so dass die Verdünnung nicht mehr fortschreitet. Bei der stabilen Transfektion wird durch den dauerhaften Einbau der Vektor-DNA in das Wirtsgenom eine langfristige Genexpression anvisiert. Voraussetzung ist allerdings, dass ein selektierbares Gen mittransfiziert wird. Werden retrovirale Expressionsvektoren eingesetzt, ist eine stabile Integration der Vektor-DNA gewährleistet.

3.4.6.1. Transfektion mit dem Transfektionsreagenz METAFECTENE[®] PRO

METAFECTENE[®] PRO ist ein polykationisches Transfektionsreagenz, das in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Der Eintritt von DNA in die Zellen findet statt, indem die zu transfizierende DNA zunächst in kompakte Strukturen komplexiert und endozytotisch in die Zellen aufgenommen wird. Innerhalb der Zelle wird die Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Endosomen durch Puffereigenschaften der Komplexbildner bewerkstelligt, die zu einem Anstieg des osmotischen Druckes in dem Endosom führen, so dass die Membran aufbricht. Dieser Prozess wird durch die Eigenschaften der kationischen Lipide unterstützt, die durch die Ansäuerung durch Protonen die Endosomen destabilisieren (*Repulsive Membrane Acidolysis*). Da die Aufnahme der DNA in den Zellkern überwiegend

Methoden

während des Zusammenbruchs der Kernhülle (Mitose) erfolgt, sollte die Transfektion am besten mit stark proliferierenden Zellen durchgeführt werden.

Benötigtes Material:

METAFACTENE[®] PRO

Durchführung:

Die Transfektionen erfolgten nach der mitgelieferten Anleitung (Stand: Juli 2005). Um eine mögliche Adsorption der Reagenzien an die Gefäßwände zu verhindern, wurden für die Transfektion ausschließlich Gefäße aus Polystyrol verwendet.

3.4.6.2. Transfektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE[®] HD

Bei FuGENE[®] HD handelt es sich um ein nicht-liposomenbasiertes Transfektionsreagenz, das einen Komplex mit der zu transfizierenden DNA bildet und diese anschließend in die Zelle transportiert. Ebenso wie bei METAFACTENE[®] PRO sollte eine Transfektion mit FuGENE[®] HD nur an stark proliferierenden Zellen durchgeführt werden.

Benötigtes Material:

FuGENE[®] HD

Durchführung:

Die Transfektionen erfolgten nach der mitgelieferten Anleitung (Stand: Oktober 2005).

3.4.6.3. Transfektion mit dem Transfektionsreagenz MATra-A

Diese Transfektionsreagenz nutzt magnetische Nanopartikel (MagTag[™]), um die gewünschte DNA in die Zellen einzuschleusen. Im ersten Schritt wird die DNA an die Nanopartikel gebunden, welche dann durch magnetische Anziehung (mittels einer Magnetplatte, die unter die Kulturschale gestellt wird) in die Zellen eindringen und dort die DNA auf ihrer Oberfläche abgeben können. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Zellmembran nicht durch chemische Reagenzien beeinflusst wird und sie auch bei Zellen gute Ergebnisse liefert,

die mit auf Liposomen basierenden Transfektionsreagenzien nur schlecht zu transfizieren sind.

Benötigtes Material:

MATra-A

Magnetplatte

Durchführung:

Die Transfektionen erfolgten nach der mitgelieferten Anleitung (Stand: Juli 2006).

3.4.7. Selektion transfizierter Zellen durch Antibiotika

Für eine stabile Transfektion ist eine Selektion positiver Klone unabdingbar. Nur so wird eine Reinkultur an Zellen erzielt, die das gewünschte Konstrukt enthält.

Benötigtes Material:

Selektionsantibiotikum

Durchführung:

Die Selektion der transfizierten Zellen wurde über Antibiotika sichergestellt, für die auf den jeweiligen Konstrukten die entsprechenden Resistenzgene vorhanden waren, um ein Überleben der positiven Klone zu gewährleisten.

Für jedes Antibiotikum wurde zunächst ermittelt, ab welcher Konzentration alle untransfizierten Zellen einer Kulturschale abstarben bzw. das Wachstum einstellten. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien in den entsprechenden Kulturmedien ausgesät und mit dem jeweiligen Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Das selektive Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen über insgesamt acht Tage hinweg beobachtet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne Antibiotikum in dem Standardmedium inkubiert wurden. Die benötigte Menge an Antibiotikum für die Selektion nach einer Transfektion wurde durch die Konzentration ermittelt, bei der nach vier bis fünf Tagen alle Zellen in der Kulturschale abgestorben waren. Mit der Selektion wurde zwischen 24 und 48 h nach der Transfektion begonnen.

Methoden

3.4.8. Selektion von mit mtDNA transfizierten ρ^0 -Zellen

Für die Selektion von mit mtDNA transfizierten ρ^0 -Zellen steht nur ein metabolischer Test zur Verfügung. Bei diesem Test wird die Abhängigkeit der ρ^0 -Zellen von Uridin und Pyruvat ausgenutzt, um die mit mtDNA repopulierten Zellen zu selektieren. Diese Zellen können im Gegensatz zu den ρ^0 -Zellen auch ohne Zugabe von Uridin und Pyruvat wachsen und bilden somit Klone auf der Kulturplatte, während die ρ^0 -Zellen nach einiger Zeit absterben.

Benötigtes Material:

ρ^0 -Selektionsmedium

Durchführung:

Die zu untersuchenden Zellen wurden enzymatisch von der Zellkulturschale abgelöst (3.4.2.1) und auf eine 150-mm-Kulturschale mit Selektionsmedium neu ausgesät. Das Medium wurde ungefähr eine Woche lang alle zwei Tage und danach jeden vierten Tag gewechselt. Wenn nach drei bis vier Wochen keine Klone zu erkennen waren, wurde die Kulturschale entsorgt.

3.4.9. Herstellung von dialysiertem FCS

Durch Dialyse können niedermolekulare Bestandteile des FCS schonend entfernt werden. Dies ist vor allem für die Verwendung des FCS im Selektionsmedium für ρ^0 -Zellen wichtig, da hierbei eventuell vorhandene Uridin- und Pyruvat-Moleküle stören.

Benötigtes Material:

Dialyseschlauch, MWCO 3,5 kDa

Verschlussklammern

FCS-Dialyse-Puffer

Sterilfilter

Durchführung:

Zunächst wurde das eine Ende des Dialyseschlauches doppelt umgefaltet und anschließend mit einer Verschlussklammer verschlossen. Danach wurde das FCS in den Dialyseschlauch eingefüllt und genauso wie am anderen Ende sorgfältig verschlossen. Dabei wurde darauf

geachtet, dass sich keine Luftblasen im Inneren des Schlauches befanden. Der Schlauch wurde in einem 10-l-Kunststoffeimer mit 8 l FCS-Dialyse-Puffer so befestigt, dass er nicht mit dem Rührfisch in Berührung kam. Die Dialyse erfolgte bei 4°C, wobei der Dialyse-Puffer nach zwei und weiteren vier Stunden gewechselt wurde. Anschließend wurde die Dialyse noch über Nacht weitergeführt. Am nächsten Morgen wurde das FCS aus dem Schlauch entnommen, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

3.4.10. Färbung von Mitochondrien mit MitoTracker®-Farbstoffen

Mit Hilfe der MitoTracker®-Farbstoffe können selektiv Mitochondrien in lebenden Zellen gefärbt werden. Die rot fluoreszierenden MitoTracker®-Farbstoffe sind Derivate entweder von Tetramethylrosamin oder X-Rosamin und enthalten eine thiol-reaktive Chlormethyl-Einheit, die wahrscheinlich für ihre Assoziation mit den Mitochondrien verantwortlich ist.

Benötigtes Material:

MitoTracker® Red CMXRos bzw. MitoTracker® Deep Red FM

Durchführung:

Zum Medium lebender Zellen wurde MitoTracker® Red CMXRos oder MitoTracker® Deep Red FM in einer 1:1.000-Verdünnung gegeben und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation von 15 bis 120 Minuten im Brutschrank bei 37°C, bevor die Zellen am Mikroskop untersucht bzw. fixiert wurden.

3.4.11. Induktion von Megamitochondrien

Für die Transformation der Mitochondrien durch mechanische Methoden ist die Induktion von Megamitochondrien essentiell, da normalgroße Mitochondrien zu klein sind, um mit diesen Methoden effektiv penetriert zu werden.

3.4.11.1. Induktion über Ansäuerung des Mediums mit Milchsäure

Die Ansäuerung des Kulturmediums mit Milchsäure stellt eine Möglichkeit dar, ein Anschwellen der Mitochondrien zu induzieren.

Benötigtes Material:

2 M Milchsäure

Durchführung:

Das Kulturmedium wurde bis zu einem pH-Wert von 6,4-6,5 mit 2 M Milchsäure versetzt und anschließend in einer Kulturschale im Brutschrank für einige Stunden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Danach wurde der pH-Wert nochmals überprüft und bei Bedarf nochmals mit 2 M Milchsäure eingestellt.

Die Zellen wurden mit dem angesäuerten Kulturmedium für eine bis mehrere Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor sie für die entsprechenden Versuche verwendet wurden.

3.4.11.2. Induktion über Zugabe von Valinomycin

Valinomycin ist ein K⁺-selektives Zyklodepsipeptid, welches als Ionophor agiert und die oxidative Phosphorylierung entkoppelt. Dabei kommt es innerhalb weniger Stunden zu einem Anschwellen der Mitochondrien.

Benötigtes Material:

Valinomycin-Stammlösung (10 mM in DMSO)

Durchführung:

Die Induktion erfolgte durch Zugabe der Valinomycin-Stammlösung im Verhältnis von 1:1.000 zum Kulturmedium.

3.4.11.3. Induktion über Ansäuerung des Mediums mit Natriumacetat

Benötigtes Material:

3 M Natriumacetat, pH 5,2

Durchführung:

Das Natriumacetat wurde in der gewünschten Endkonzentration zusammen mit dem Kulturmedium in einer 60-mm-Kulturschale für 20 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend auf die ausgesäten Zellen gegeben.

3.4.11.4. Induktion über Ansäuerung des Mediums mit Essigsäure

Benötigtes Material:

Essigsäure

Durchführung:

Die Essigsäure wurde in der gewünschten Endkonzentration zusammen mit dem Kulturmedium in einer 60-mm-Kulturschale für 20 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend auf die ausgesäten Zellen gegeben.

3.5. Sonstige Methoden

3.5.1. Partikelbeschuss mit der *Gene Gun*

Bei der *Gene Gun* werden DNA-beschichtete Mikropartikel mit hohem Druck in die Zellen transportiert (geschossen), wo die DNA freigesetzt wird. Dabei ist es möglich, die ganze Bandbreite von Zellen (Bakterien, Hefen, Säuger- oder Pflanzenzellen) und Geweben (z.B. ganze Blätter) zu transformieren indem unterschiedliche Partikelmaterialien (Gold, Wolfram), -größen und verschiedene Umgebungsbedingungen (Beschussdruck, Kammervakuum) verwendet werden.

Bei dem hier genutzten Gerät handelte es sich um das PDS-1000/He-System der Firma Bio-Rad, das eine evakuierbare Kammer besitzt. In diese Kammer mündet ein Druckkolben, der mit einer Kunststoffscheibe (*Rupture Disk*) verschlossen ist, die bei einem spezifischen Druck reißt. Steigt der Heliumdruck über diesen Wert an, reißt die Scheibe und durch das ausschießende Heliumgas wird eine weitere darunterliegende Kunststoffscheibe (*Macrocarrier*) beschleunigt. Auf dieser Scheibe befinden sich an der Unterseite die DNA-beschichteten Mikropartikel, welche somit ebenfalls beschleunigt werden. Nach einer kurzen Wegstrecke trifft die Kunststoffscheibe dann auf ein Metallnetz und wird daran gestoppt, während die Mikropartikel ungehindert weiterfliegen können. Am Ende ihrer Flugstrecke treten die Mikropartikel in die Zielzellen ein und die DNA auf ihrer Oberfläche wird freigesetzt.

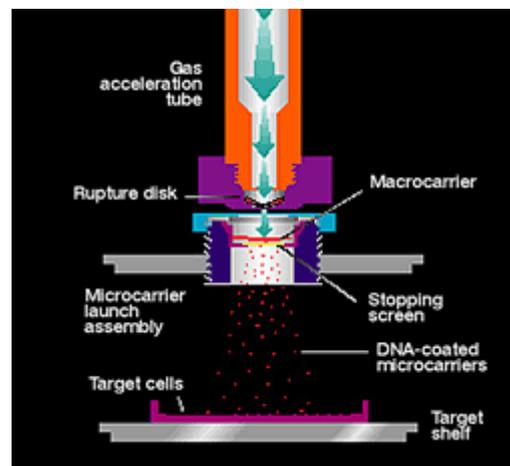


Abb. 3-8: Aufbau und Funktionsprinzip der *Gene Gun*
(Quelle: Bio-Rad Biolistic Particle Delivery Systems Brochure, Rev A)

3.5.1.1. Vorbereitung des Geräts

Zu Beginn jeder Nutzung muss das Gerät sowie ein Teil der später genutzten Materialien vorbereitet werden. Dabei werden das gesamte Leitungssystem sowie der Druckkolben mit Helium gespült. Außerdem werden die *Macrocarrier* für die spätere Nutzung vorbereitet.

Benötigtes Material:

Helium-Druckflasche

Macrocarrier

Edelstahlhalter für *Macrocarrier*

Rupture Disk (entsprechend dem verwendeten Druck)

Stopping Screen

Durchführung:

Zum Spülen des Systems mit Helium wurde der Druckkolben wie in der Anleitung beschrieben mit einer *Rupture Disk* verschlossen und eine *Stopping Screen* in den dafür vorgesehenen Halter (oberste Ebene) eingelegt. Nach dem Anlegen eines Kammervakuums wurde der Druckaufbau bis zum Reißen der Disk durchgeführt. Danach wurde die Kammer belüftet und der Druckkolben gleich wieder mit einer neuen *Rupture Disk* verschlossen.

Die *Macrocarrier* wurden in die zugehörigen Edelstahlhalter eingelegt, wobei darauf zu achten war, dass die *Macrocarrier* genau in die dafür vorgesehen Rille eingepasst wurden.

3.5.1.2. Präparation der Goldpartikel

Vor der Beschichtung mit DNA müssen die Goldpartikel vorbereitet werden. Durch die Vorbehandlung soll sichergestellt werden, dass die Partikel steril und frei von sonstigen Verunreinigungen sind und dass sie möglichst nicht als Konglomerate vorliegen.

Benötigtes Material:

Goldpartikel (0,6 µm, 1,0 µm oder 1,6 µm Durchmesser)

70% Ethanol p.a. (v/v)

50% Glycerin (v/v), steril

Steriles Wasser

Methoden

Durchführung:

Zunächst wurden 30 mg der Goldpartikel in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß abgewogen. Nun wurde 1 ml 70% Ethanol zugegeben, für 4-5 min auf dem Vortexer bei höchster Geschwindigkeit durchgemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Goldpartikel wurden für 5 s abzentrifugiert (mittels der *Short Spin*-Taste) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Goldpartikel in 1 ml sterilem Wasser für 1 min auf dem Vortexer gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Abzentrifugation der Goldpartikel und nach dem Verwerfen des Überstandes wurde dieser Waschschritt noch zweimal wiederholt. Zum Schluss wurden die Goldpartikel in 500 µl 50% Glycerin aufgenommen (Endkonzentration: 60 mg/ml) und für 3x 10 s durch Ultraschall vereinzelt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

3.5.1.3. Beschichten der Goldpartikel mit DNA

Damit die DNA mit den Goldpartikeln in die Zelle eingebracht werden kann, muss die DNA erst auf die Partikel aufgebracht werden. Dies geschieht, indem die DNA im Beisein der Partikel durch CaCl_2 ausfällt. Dabei bindet die DNA auf der Oberfläche der Partikel und kann anschließend mit diesen präpariert werden. Durch die Zugabe von Spermidin kann dieser Vorgang noch verstärkt werden.

Benötigtes Material:

Goldpartikel (60 mg/ml, aus 3.5.1.2)

DNA-Lösung (333 ng/µl)

2,5 M CaCl_2

0,1 M Spermidin

70% Ethanol p.a. (v/v)

100% Ethanol p.a.

Durchführung:

Die vorbereiteten Goldpartikel aus 3.5.1.2 wurden nochmals durch Ultraschall vereinzelt und 60 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Um eine gleichmäßige Verteilung der DNA auf den Goldpartikeln sicherzustellen, erfolgte im Abstand von jeweils 10 s die Zugabe von 20 µl DNA-Lösung, 75 µl 2,5 M CaCl_2 und 30 µl 0,1 M Spermidin unter

kontinuierlichem Mischen auf dem Vortexer (mittlere Geschwindigkeit). Nach weiteren 3 min auf dem Vortexer wurden die nun beschichteten Goldpartikel für 5-10 min bei RT stehen gelassen, damit sie sich am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen konnten. Nach einer Zentrifugation für 2-3 s (keinesfalls länger! mittels *Short-Spin*-Taste) wurde der Überstand verworfen und die Goldpartikel unverzüglich mit einer Pipette in 180 µl 70% Ethanol resuspendiert. Nachdem die Goldpartikel sich für 5-10 min bei RT sedimentieren konnten erfolgte wiederum eine Zentrifugation für 2-3 s. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal mit 100% Ethanol wiederholt, die Partikel in 60 µl 100% Ethanol aufgenommen und anschließend gleich zum Beschuss eukaryontischer Zellen eingesetzt.

3.5.1.4. Partikelbeschuss humaner Zellen

Humane Zelllinien sollten für den Beschuss mit Mikropartikeln in Kunststoff-Kulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm kultiviert werden. Da die maximale beschossene Fläche ungefähr der Größe einer 35-mm-Schale entspricht bringt der Einsatz größerer Schalen keine Vorteile.

Benötigtes Material:

DNA-beschichtete Goldpartikel (aus 3.5.1.3)

Macrocarrier in den Edelstahlhaltern (aus 3.5.1.1)

Rupture Disks (entsprechend dem verwendeten Druck, meist 1800 psi)

Stopping Screens

humane Zellen auf 35-mm-Schale (30-70% Konfluenz, je nach Anwendung und Zelllinie)

Kulturmedium (evtl. mit Antibiotikum)

Durchführung:

Die DNA-beschichteten Goldpartikel (3.5.1.3) wurden nochmals sorgfältig mit einer Pipette resuspendiert und jeweils 10 µl auf die Mitte der vorbereiteten *Macrocarrier* (3.5.1.1) getropft. Nach dem Trocknen (ca. 10 min) wurden ein Edelstahlhalter mit einem *Macrocarrier* sowie eine *Stopping Screen* laut Bedienungsanleitung in den dafür vorgesehenen Halter eingesetzt (Goldpartikel auf der Unterseite). Das Kulturmedium auf den Zellen wurde nahezu vollständig abgenommen und die Kulturschale unverzüglich in die Apparatur eingesetzt (zweite Ebene von unten). Nach dem Evakuieren (je nach Versuch,

Methoden

meist 25-27 in Hg) der Kammer erfolgte der Beschuss mit dem Druck entsprechend der eingesetzten Rupture Disk. Auf die Kulturschale wurde nach dem sofortigen Belüften der Kammer 2 ml Kulturmedium gegeben und anschließend die Schale in den Brutschrank gestellt. Dieses Vorgehen wurde mit den restlichen Kulturschalen (insg. sechs Stück) wiederholt. Der Erfolg des Partikelbeschusses wurde nach 24-48 h am Mikroskop kontrolliert.

3.5.2. Mikroskopie

3.5.2.1. Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Farbstoffe genutzt, um Proteine oder Strukturen in Zellen zu lokalisieren. Fluoreszierende Farbstoffe haben die Eigenschaft, Licht eines spezifischen Wellenlängenbereichs zu absorbieren und dann wiederum Licht im längerwelligeren Bereich zu emittieren (Tab. 3-7).

Bei einem Fluoreszenzmikroskop wird das Licht einer Lampe durch einen Filter gestrahlt, der nur den zur Anregung des Farbstoffes gewünschten Wellenlängenbereich des Spektrums passieren lässt. Der Lichtstrahl wird nun über einen dichromatischen Spiegel auf das Objekt reflektiert und kann dort den Farbstoff zur Emission anregen. Das emittierte Licht kann aufgrund der längeren Wellenlänge den dichromatischen Spiegel passieren und wird entweder durch das Okular ins Auge des Betrachters geleitet oder durch eine Kamera detektiert.

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
EGFP	488 nm	507 nm
Alexa Fluor® 488	495 nm	519 nm
MitoTracker® Red CMXRos	579 nm	599 nm
MitoTracker® Deep Red FM	640 nm	662 nm

Tab. 3-7: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluoreszenzmikroskope vom Typ Leica DMI 4000 B und DMI 6000 B mit einer Schwarz-Weiß-Kamera DFC-350FX und der Software Leica Application Suite genutzt (2.14).

3.5.2.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist ein spezielles Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie. Bei ihr wird das Anregungslicht nicht von einer Lampe, sondern von Lasern emittiert, wodurch eine nahezu punktförmige Lichtquelle einer spezifischen Wellenlänge zur Verfügung steht. Durch eine aufwändige Optik mit beweglichen Spiegeln wird dieser Laserstrahl dabei in einer Fokusebene rasterförmig über das zu untersuchende Objekt geführt. Das vom Farbstoff emittierte Licht wird durch die Optik zu einer Lochblende (*Pinhole*) geleitet, die nur die Signale aus der Fokusebene des Objekts passieren können, während die darüber- und darunterliegenden Ebenen ausgeblendet werden. Der Lichtstrahl trifft daraufhin auf einen elektronischen Detektor (*Photomultiplier*), der die Signale an einen Computer weiterleitet. Dort wird das Signal dann wieder zu einem gerasterten Bild zusammensetzt.

Die Aufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP5 wurden mit der Bediensoftware Leica Application Suite Advanced Fluorescence durchgeführt und mit Adobe Photoshop CS4 und CorelDraw X3 (2.14) bearbeitet.

3.5.2.3. Fixierung von Kulturzellen mit Formaldehyd

Benötigtes Material:

PBS

2% Formaldehyd in 1× PBS

0,1% Triton X-100 in 1× PBS

Durchführung:

Auf Deckgläschen (Durchmesser: 12 mm) kultivierte Zellen wurden nach der Färbung mit MitoTracker[®] (3.4.10) kurz in 1× PBS gewaschen und im Anschluss für 10 min mit 2% Formaldehyd in 1× PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit 1× PBS erfolgte eine Permeabilisierung der Membranen mit 0,1% Triton X-100 in 1× PBS für 10 min. Die Deckgläschen wurden nochmals mit 1× PBS für 5 min gewaschen und konnten für die Immunlokalisation verwendet werden.

3.5.2.4. Immunlokalisation an Kulturzellen

Bei der Immunlokalisation werden Proteinantigene durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers (Primärantikörper) markiert. In einem zweiten Schritt wird die speziesspezifische F_c -Region des Primärantikörpers durch einen markierten Sekundärantikörper erkannt. Für diese Markierung werden häufig fluoreszierende Farbstoffe genutzt, jedoch findet man auch andere Markierungen wie z.B. Enzyme, die mit bestimmten Substraten die Bildung von unlöslichen Farbstoffen katalysieren.

Benötigtes Material:

PBS

1% BSA in $1\times$ PBS

Primärantikörper, verdünnt in 1% BSA/ $1\times$ PBS

Sekundärantikörper, verdünnt in 1% BSA/ $1\times$ PBS

Mowiol-Einbettmedium

Durchführung:

Nach der Fixierung der Zellen (3.5.2.3) wurden die Deckgläschen zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 30 min mit 1% BSA in $1\times$ PBS sowie anschließend für eine Stunde mit dem verdünnten Primärantikörper in einer Feuchtekammer inkubiert. Daraufhin folgten drei je fünfminütige Waschschrte mit $1\times$ PBS, bevor die Deckgläschen für eine Stunde im Dunkeln mit der Sekundärantikörperlösung behandelt wurden. Zum Schluss wurden die Deckgläschen erneut dreimal je 5 min mit $1\times$ PBS gewaschen und mit einem kleinen Tropfen (10-15 μ l) Mowiol auf einem Objektträger eingebettet.

3.5.3. Mikroinjektion

Mit der Mikroinjektion können kleinste Volumina (bis 100 pl) unterschiedlichster Lösungen (DNA, Proteine, sonstige Substanzen) direkt in Kulturzellen eingebracht werden. Dabei werden die Zellen mit einer kleinen Glaskapillare mechanisch penetriert und durch einen angelegten Druck kann daraufhin das sich in der Kapillare befindliche Material in die Zelle injiziert werden. Die Mikroinjektion erlaubt zum Beispiel die direkte Transfektion von DNA in sich nichtteilende Zellen, indem die Kapillare bis in den Zellkern geschoben wird.

Benötigtes Material:

Injektionskapillare FemtoTip II

Glasboden-Kulturschale mit Raster

Durchführung:

Für die Mikroinjektion wurden die Kulturzellen auf Glasbodenschalen mit integriertem Raster ausgesät, um die injizierten Zellen später leichter auffinden zu können. Nach der Induktion von Megamitochondrien (3.4.11) wurden die Zellen an einem Leica DMI 4000 D mit angebauter Injektionsapparatur der Firma Eppendorf (FemtoJet Mikroinjektor und Mikromanipulator InjectMan NI 2) injiziert. Dazu wurde die Injektionskapillare mit der DNA-Lösung (50-350 ng/ μ l) befüllt, an die Apparatur angeschlossen und mit dem Mikromanipulator an die zu injizierenden Zellen herangeführt. Die eigentliche Injektion erfolgte direkt axial in die vergrößerten Mitochondrien mit einem Injektionsdruck von 90-120 hPa, einer Injektionszeit von 0,1-0,2 s und einem Haltedruck von 40-50 hPa. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Mitochondrien zwischen der Injektionskapillare und dem Zellkern lagen, damit ein Widerstand gegen die Spitze der Kapillare aufgebaut werden konnte. Nach der Injektion wurden die Zellen wieder im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag am Fluoreszenzmikroskop auf leuchtende Mitochondrien untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. Mitochondriale Expressionsvektoren

4.1.1. Konstruktion mitochondrialer Expressionsvektoren

Ein mitochondrialer Expressionsvektor muss, um seine Funktion erfüllen zu können, mindestens zwei Bestandteile enthalten: einen mitochondrialen Promotorbereich und ein zu exprimierendes Gen. Vorteilhaft sind noch andere Bestandteile, wie beispielsweise Signalsequenzen für die Transkriptions-Termination oder Replikationsursprünge um die Vermehrung und Weitergabe der Vektoren auf andere Mitochondrien bzw. Tochterzellen zu ermöglichen. Idealerweise sollte zusätzlich ein Selektionsmarker integriert werden, der die Unterscheidung zwischen transfizierten und nichttransfizierten Zellen zulässt und eine dauerhafte Weitergabe des Vektors bevorzugt.

Um die korrekte Prozessierung eigener Genkonstrukte zu gewährleisten, sollten - wie im mitochondrialen Genom - flankierende tRNAs an beide Seiten des jeweiligen Genes fusioniert werden. Diese tRNAs markieren nach der Transkription die Prozessierungsstellen, indem sie ihre klassische Kleeblattstruktur einnehmen und dann aus dem Transkript herausgeschnitten werden. Dadurch werden die RNAs der flankierten Genbereiche freigesetzt und können anschließend weitergehend modifiziert (zum Beispiel polyadenyliert) werden.

Bei der Planung eigener Genkonstrukte ist zu beachten, dass die Mitochondrien Abweichungen beim genetischen Code im Vergleich zum Kerngenom aufweisen. Deshalb ist das Konstrukt auf diese Veränderungen hin zu untersuchen. So könnte es in ungünstigen Fällen zu Strukturänderungen oder vorzeitigen Kettenabbrüchen bei der Translation des Zielgenes kommen.

Die Benennung der Vektoren erfolgte nach folgendem Schema:

pMAG^{x-y} (MAG: Mitochondrial Artificial Genome)

Dabei entsprach x der Gruppe (beginnend mit 11), die sich nach den in dem jeweiligen Vektor verwendeten Bestandteilen der mitochondrialen DNA sowie dem genutzten Promotor richtete (Tab. 4-1), und y der fortlaufenden Nummer innerhalb der jeweiligen Gruppe.

Vektorgruppe	mitochondriale Bestandteile	genutzter Promotor
11	D-Loop + TTS	L-Strang
12	D-Loop + TTS	H-Strang
13	D-Loop + TTS + L-Strang-Replikationsursprung	H-Strang
14	D-Loop + L-Strang-Replikationsursprung + 16S rRNA (Cam ^R)	H-Strang
15	D-Loop + 16S rRNA(Cam ^R)	H-Strang
16	D-Loop	H-Strang
17	D-Loop + L-Strang-Replikationsursprung	H-Strang

Tab. 4-1: Gruppeneinteilung der konstruierten mitochondrialen Expressionsvektoren

4.1.1.1. pMAG11-1

Bei diesem Vektor sollte EGFP als Reportergen eingebaut werden, um einen einfachen und schnell nachzuvollziehenden Nachweis für eine gelungene Transfektion zu erhalten. Die flankierenden tRNAs wurden so ausgewählt, dass sie in der selben Orientierung wie in der mitochondrialen DNA vorlagen. In diesem Fall wurden die tRNAs für Glycin und Arginin genutzt, die normalerweise das ND3-Gen flankieren, das eine Untereinheit der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase codiert. Dabei war zu beachten, dass das Stop-Codon des ND3-Gens unvollständig ist, d.h. es besteht nur aus einem T, das durch die Polyadenylierung zu einem TAA vervollständigt wird (Ojala *et al.*, 1981).

Die beiden tRNAs wurden jeweils aus vier Oligonukleotiden (GFP Link 1-4 bzw. GFP-Link 5-8) zusammengesetzt, die in einer Annealing-Reaktion aneinander binden konnten. An beiden Enden entstanden Überhänge mit einer Länge von vier Nukleotiden, um an das EGFP-Gen sowie den Vektor binden zu können. Das EGFP-Gen wurde aus dem Vektor pEGFP-Mito (2.4.3) mit den Primern EGFP-001-FOR (4) und EGFP-716-REV (4) amplifiziert. Dabei wurden an den Enden *Bsa*I-Schnittstellen angebracht um zu den tRNAs kompatible Überhänge zu erhalten. Dieses Enzym spaltet die DNA nicht in ihrer Erkennungssequenz, sondern um ein Nukleotid versetzt in 3'-Richtung. Dabei entsteht ein vier Basen umfassender 5'-Überhang, der durch die Sequenz des verwendeten PCR-Primers definiert werden konnte. Anschließend wurden die tRNAs zusammen mit dem *Bsa*I-behandelten PCR-Produkt in den mit *Bcl*I und *Hind*III aufgeschnittenen Vektor pMAG2-2 (2.4.2) ligiert. Der entstandene Vektor wurde sequenziert und erhielt den Namen pMAG11-1.

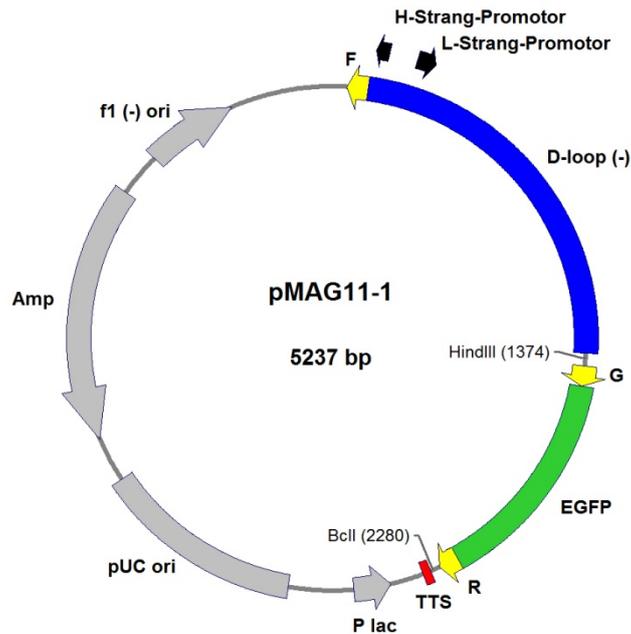


Abb. 4-1: Vektorkarte von pMAG11-1

4.1.1.2. pMAG11-2

Bei dem Vektor pMAG11-2 wurde ein zusätzlicher Sicherheitsmechanismus eingebaut, um eine Expression des EGFP-Gens nach einer möglichen Integration in das Kerngenom zu verhindern. Dazu sollte das EGFP-Gen so verändert werden, dass es nach der Translation in den Mitochondrien funktionell war, während eine Translation im Zytosol ein nicht funktionsfähiges Protein entstehen lassen sollte. Solch eine Veränderung war möglich, da die mitochondriale DNA im Vergleich zum Kerngenom einige Unterschiede bei der Codon-Nutzung aufweist (O'Brien *et al.*, 1990). Das Kern-Stop-Codon UAG codiert in den Mitochondrien für Tryptophan und konnte somit genutzt werden, um bei einer Translation im Zytosol einen Abbruch zu initiieren und das Protein in einer nicht aktiven Form zu erhalten.

Bei der Mutagenese-PCR des Vektors pMAG11-1 wurden die Primer EGFP-156-FOR und EGFP-191-REV eingesetzt, um das Tryptophan an der Stelle 58 des EGFP in der oben genannten Weise zu verändern. Nach der Sequenzierung wurde das korrekte mitochondriale EGFP (mtEGFP) und einige umgebende Bereiche mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *NotI* ausgeschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pMAG11-1 ligiert. Das neu entstandene Plasmid trug den Namen pMAG11-2.

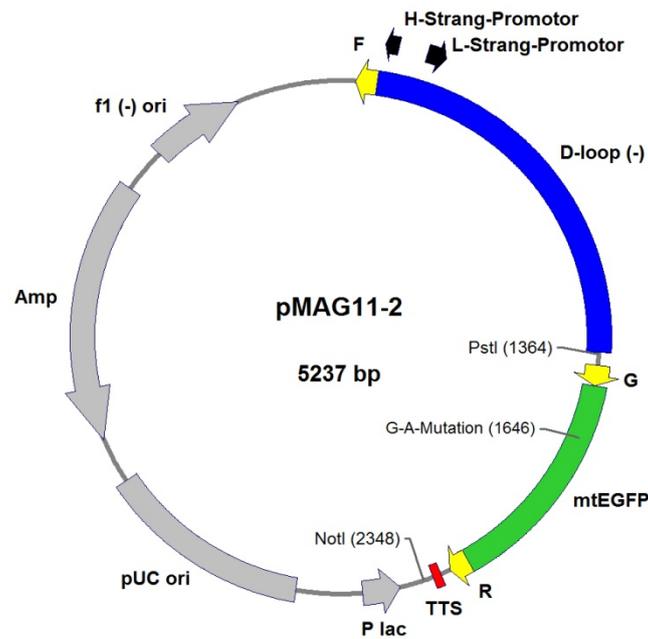


Abb. 4-2: Vektorkarte von pMAG11-2

4.1.1.3. pMAG12-1

Im mitochondrialen Genom befinden sich, mit Ausnahme des ND6-Gens, alle proteincodierenden Bereiche auf dem H-Strang (Anderson *et al.*, 1981; Attardi *et al.*, 1982). Der H1-Promotor besitzt eine 20-30-fach höhere Transkriptionsrate als der H2-Promotor und ist ungefähr doppelt so stark wie der L-Strang-Promotor (King und Attardi, 1993). Um die Expression des mtEGFP zu optimieren, sollte deshalb der H-Strang-Promotor und nicht der L-Strang-Promotor wie im Vektor pMAG11-2 genutzt werden. Dabei musste das mtEGFP-Gen inklusive der angehängten tRNAs und der TTS in umgekehrter Orientierung auf die andere Seite des D-Loops kloniert werden.

Dazu wurde das Plasmid pMAG2-1 (2.4.1) mit *XhoI* und das Plasmid pMAG11-2 mit *XhoI* und *NruI* geschnitten. Da die Enden nicht zueinander kompatibel waren, wurden alle freien DNA-Enden durch eine Behandlung mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Nach der anschließenden Kontrolle der korrekten Orientierung der mtEGFP-Kassette wurde der Vektor sequenziert und erhielt den Namen pMAG12-1.

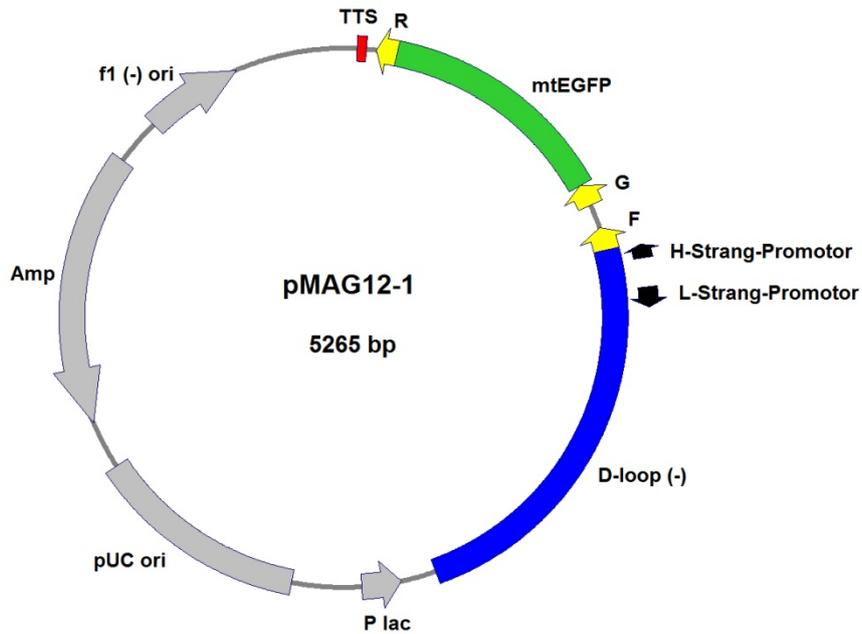


Abb. 4-3: Vektorkarte von pMAG12-1

4.1.1.4. pMAG13-1

Der Vektor pMAG12-1 konnte zwar in Bakterien, nicht aber in den Mitochondrien repliziert werden, da er nur den Replikationsursprung für den H-Strang trug, der sich im D-Loop-Bereich befindet. Der Replikationsursprung für den L-Strang liegt in der mitochondrialen DNA jedoch in einem Bereich, der nicht im konstruierten Plasmid pMAG12-1 vorhanden war. Die Replikation war insoweit unverzichtbar, da das Plasmid sonst immer nur an eine der Tochterzellen weitergegeben werden kann und somit eine dauerhafte Expression in einer Zelle unmöglich wäre. Deshalb wurde ein 800 bp großer Bereich um den L-Strang-Replikationsursprung der mitochondrialen DNA in den Bereich des f1 (-) Origin des Vektors pMAG12-1 integriert. Da der f1 (-) Origin nicht für die Anzucht des Plasmides in Bakterien benötigt wurde, war dies ein geeigneter Ort. Zudem befand sich der Replikationsursprung des L-Strangs nunmehr in ungefähr der gleichen Anordnung gegenüber dem H-Strang-Replikationsursprung wie in der mitochondrialen DNA.

Der Bereich um den Replikationsursprung des L-Strangs wurde durch Amplifikation mit den Primern 05465-FOR und 06266-REV aus aufgereinigter Placenta-mtDNA gewonnen. Der Vektor pMAG12-1 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Dra*III linearisiert und die überstehenden 3'-Enden anschließend mit Klenow-Fragment entfernt. Nach der Ligation des

PCR-Produktes in den Vektor wurde die Orientierung überprüft und der Vektor sequenziert. Der entstandene Vektor erhielt den Namen pMAG13-1.

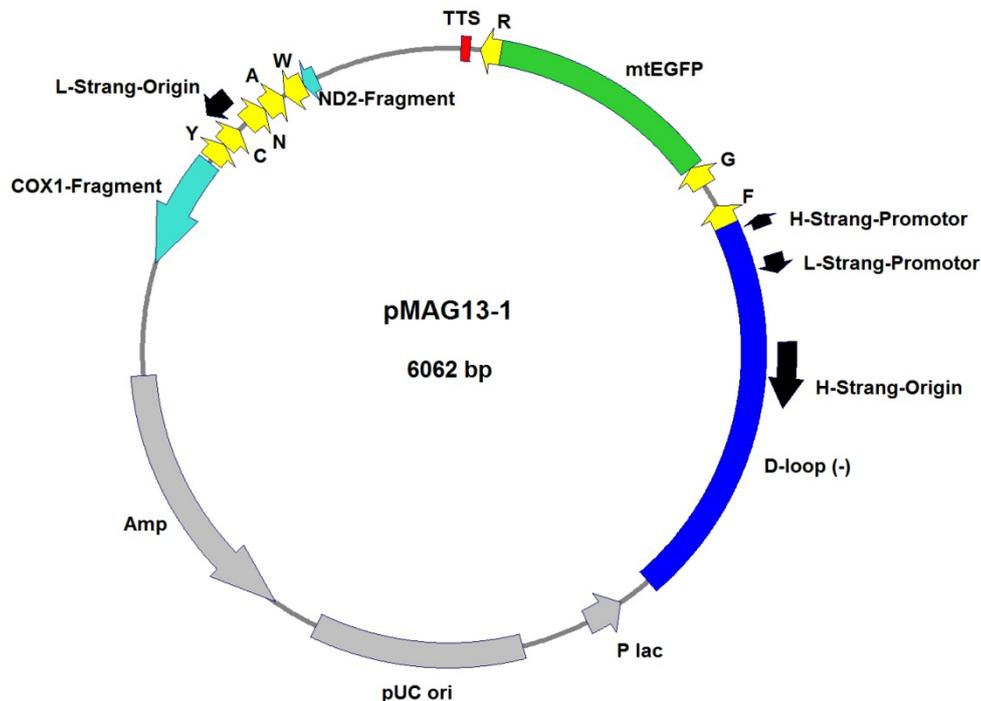


Abb. 4-4: Vektorkarte von pMAG13-1

4.1.1.5. pMAG14-1

Die bisher konstruierten Vektoren haben den Nachteil, dass die Erkennung positiver Transfektanten nur auf dem Vorhandensein der mtEGFP-Fluoreszenz beruht. Diese Fluoreszenz kann jedoch so schwach sein, dass sie nicht am Fluoreszenzmikroskop nachweisbar ist. Aus diesem Grund sollte ein zweites Markergen in den Expressionsvektor integriert werden, das nach einer Einbringung des Vektors in Mitochondrien zur Ausübung eines Selektionsdrucks auf die Zellen genutzt werden konnte. Die Wahl fiel auf eine Chloramphenicol-Resistenz, da bereits Mitte der 70er Jahre von Wallace *et al.* eine Chloramphenicol-resistente menschliche Zelllinie beschrieben wurde (Wallace *et al.*, 1975; Wallace *et al.*, 1977). Deren Resistenz beruht auf einem Basenaustausch (T zu C) im mitochondrialen 16S rRNA-Gen an Position 2991 (Blanc *et al.*, 1981). Wird dieses Gen in einen replikativen und transkriptionsaktiven Vektor eingefügt, so sollte es nach der

Ergebnisse

Transfektion einer Chloramphenicol-sensitiven Zelllinie zur Ausbildung der Resistenz kommen. Ein Anteil von 10% der Chloramphenicol-resistenten 16S rRNA reicht dabei aus, um den Phänotyp einer Zelllinie zu ändern (Wallace *et al.*, 1977).

Das 16S rRNA-Gen wurde zusammen mit den flankierenden tRNAs für Valin und Leucin aus einer Gesamt-DNA-Extraktion der Zelllinie HeLa 296-1, mit der gewünschten Chloramphenicol-Resistenz, mit Hilfe der Primer 01562-FOR und 03351-REV amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend mit dem TOPO-TA[®] Cloning Kit in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] (2.4.7) ligiert. Nach einer Sequenzierung des gesamten Inserts wurde durch eine Restriktionsspaltung mit *XhoI* und *BclI* das 16S rRNA-Gen mit den tRNAs herausgeschnitten. Der Vektor pMAG13-1 wurde ebenfalls mit *XhoI* und *BclI* behandelt, so dass die TTS-Sequenz entfernt wurde. Das 16S rRNA-Gen konnte nun mit dem Vektorfragment zu dem neuen Vektor pMAG14-1 ligiert werden. Dabei wurde automatisch die vorher entfernte TTS-Sequenz wieder eingefügt, da sie sich in der Leucin-tRNA befindet, welche als flankierender Bereich der 16S rRNA mitkloniert wurde.

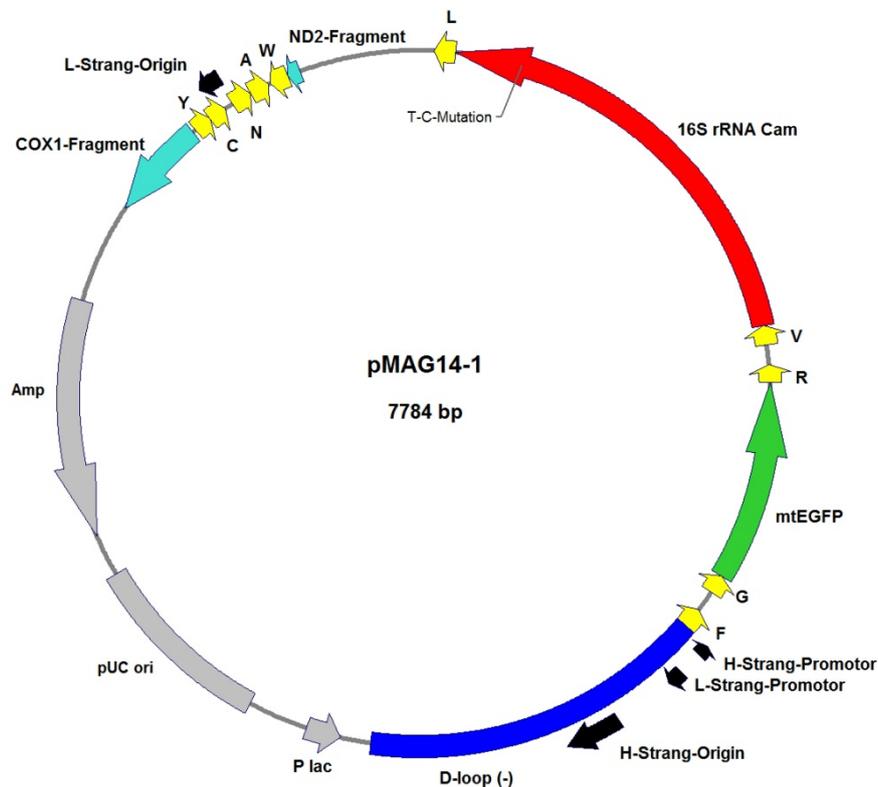


Abb. 4-5: Vektorkarte von pMAG14-1

4.1.1.6. pMAG14-2

Für die Konstruktion weiterer mitochondrialer Expressionsvektoren wurde ein Ausgangsvektor benötigt, der neben der T7-RNA-Polymerase (genauer unter 4.1.1.9 beschrieben) und der Chloramphenicol-Resistenz zusätzlich den Replikationsursprung des L-Stranges enthielt, damit die neuen Vektoren in den Mitochondrien repliziert werden konnten. Der L-Strang-Replikationsursprung wurde dabei an der gleichen Stelle wie im Vektor pMAG13-1 eingebaut.

Der Bereich um den L-Strang-Replikationsursprung wurde aus dem Vektor pMAG14-1 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NaeI* und *XhoI* ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *NaeI* und *XhoI* behandelten Vektor pMAG15-2 (4.1.1.9) ligiert. Das neu entstandene Plasmid bekam den Namen pMAG14-2 und wurde zum Bau anderer Vektorkonstrukte verwendet. Bei den durchgeführten Transfektionsversuchen wurde dieser Vektor jedoch nicht genutzt.

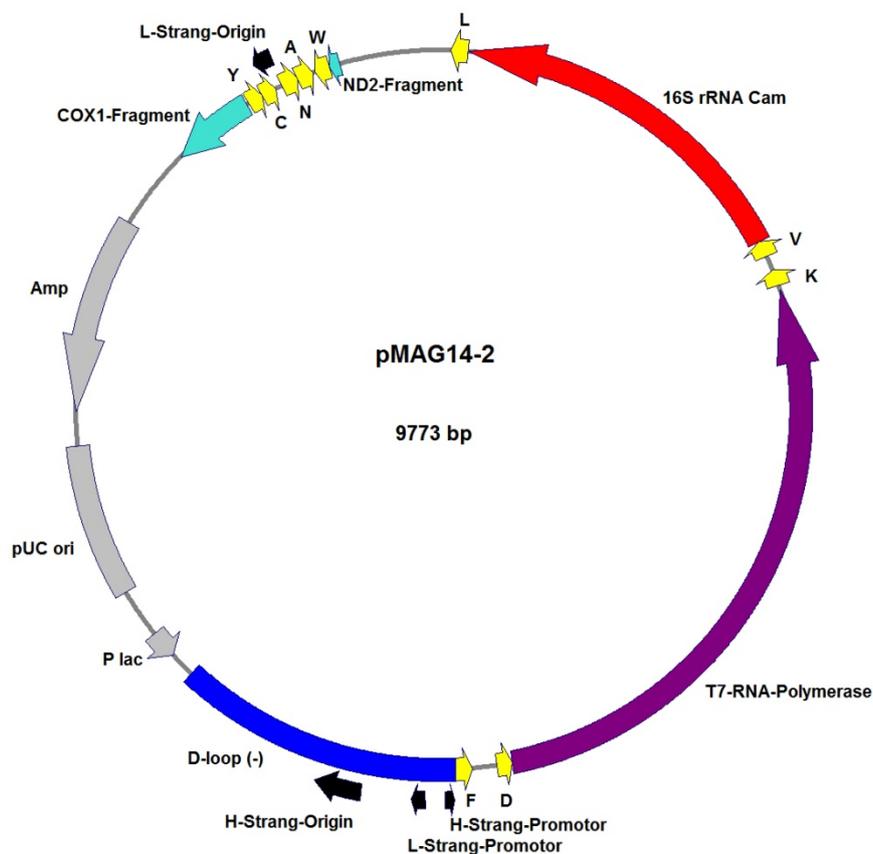


Abb. 4-6: Vektorkarte von pMAG14-2

4.1.1.7. pMAG14-3

Dem zuvor beschriebenen Vektor pMAG14-2 fehlte noch das mtEGFP-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors, das einen relativ schnell nachzuvollziehenden Nachweis für eine gelungene Transfektion darstellt. In den Vektor pMAG14-3 sollte dieses Gen integriert werden, um einen in Mitochondrien replizierbaren Expressionsvektor zu erhalten, bei dem sowohl auf Fluoreszenz durch das mtEGFP, als auch auf die Chloramphenicol-Resistenz selektiert werden konnte. Dabei sollte sich die T7-RNA-Polymerase, ebenso wie die Chloramphenicol-Resistenz, unter der Kontrolle eines mitochondrialen Promotors befinden, damit sie in den Mitochondrien exprimiert werden konnten. Die T7-Promotor-gesteuerte Expression des mtEGFP sollte jedoch nicht durch die mitochondriale Transkription behindert werden. Deshalb wurde das Gen hinter der Leucin-tRNA am Ende des 16S rRNA-Gens, in den Vektor integriert, wobei die tRNA, die die Transkriptions-Terminationsstelle enthält und somit den größten Teil der mitochondrialen Transkriptionsvorgänge stoppt.

Da der Ausgangsvektor pMAG14-2 in dem relevanten Bereich zwischen der Leucin-tRNA und dem Replikationsursprung des L-Stranges nur wenige Restriktionsschnittstellen besitzt, musste eine diffizile Methode zur Herstellung des Zielvektors angewendet werden: In einem ersten Schritt wurde das mtEGFP aus dem Vektor pCRII-TOPO-mtEGFP (4.1.1.12.1) mit den Restriktionsendonukleasen *PsiI* und *XhoI* herausgeschnitten und anschließend mit dem durch *XhoI* und *NdeI* aus dem Vektor pMAG14-2 gewonnenen und dephosphorylierten 16S rRNA-Gen über die *XhoI*-Überhänge ligiert. Im zweiten Schritt wurde das entstandene DNA-Fragment aus 16S rRNA und mtEGFP in den mit *PsiI* und *NdeI* behandelten Vektor pMAG14-2 ligiert. Der entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pMAG14-3.

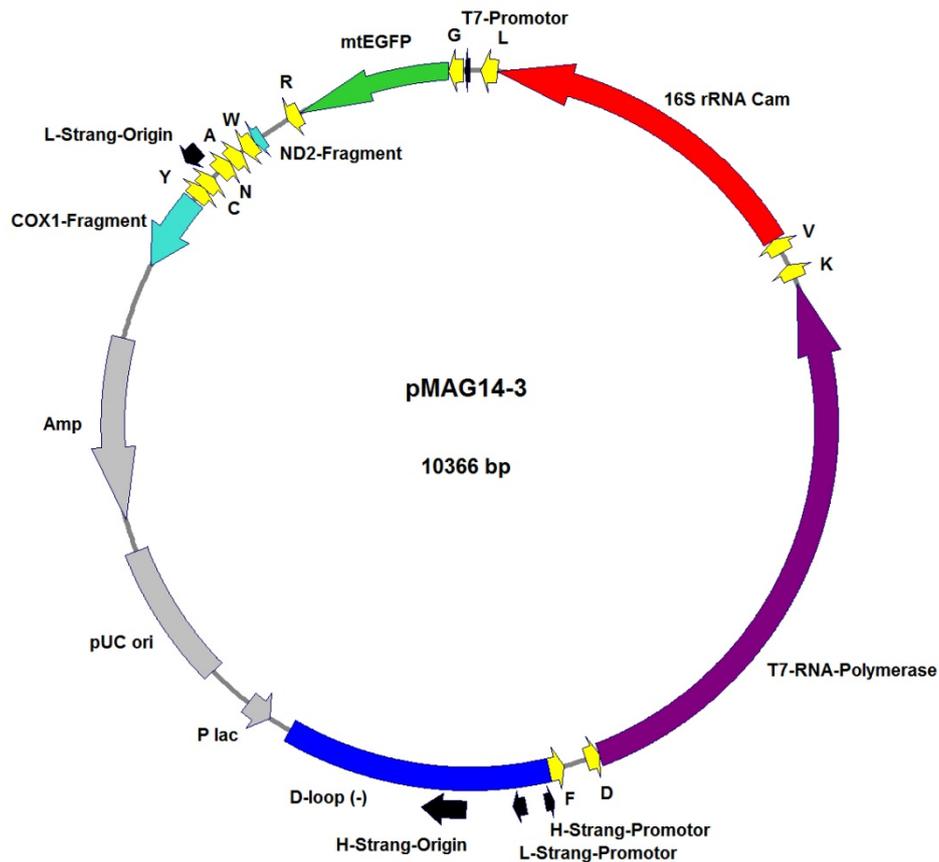


Abb. 4-7: Vektorkarte von pMAG14-3

4.1.1.8. pMAG15-1

Der Vektor pMAG15-1 stellt eine Abwandlung des Vektors pMAG14-1 dar. Er enthält neben dem mtEGFP-Gen zusätzlich das 16S rRNA-Gen mit der Punktmutation für die Chloramphenicol-Resistenz. Jedoch fehlt diesem Vektor der Replikationsursprung des L-Stranges.

Zur Herstellung wurde das 16S rRNA-Gen samt den flankierenden tRNAs für Valin und Leucin mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BclI* aus dem Vektor pMAG14-1 herausgeschnitten und in den ebenfalls mit diesen beiden Enzymen geschnittenen Vektor pMAG12-1 ligiert. Der entstandene Vektor pMAG15-1 wurde für weitere Vektorkonstruktionen benutzt, bei den Transfektionsversuchen kam er jedoch nicht zum Einsatz.

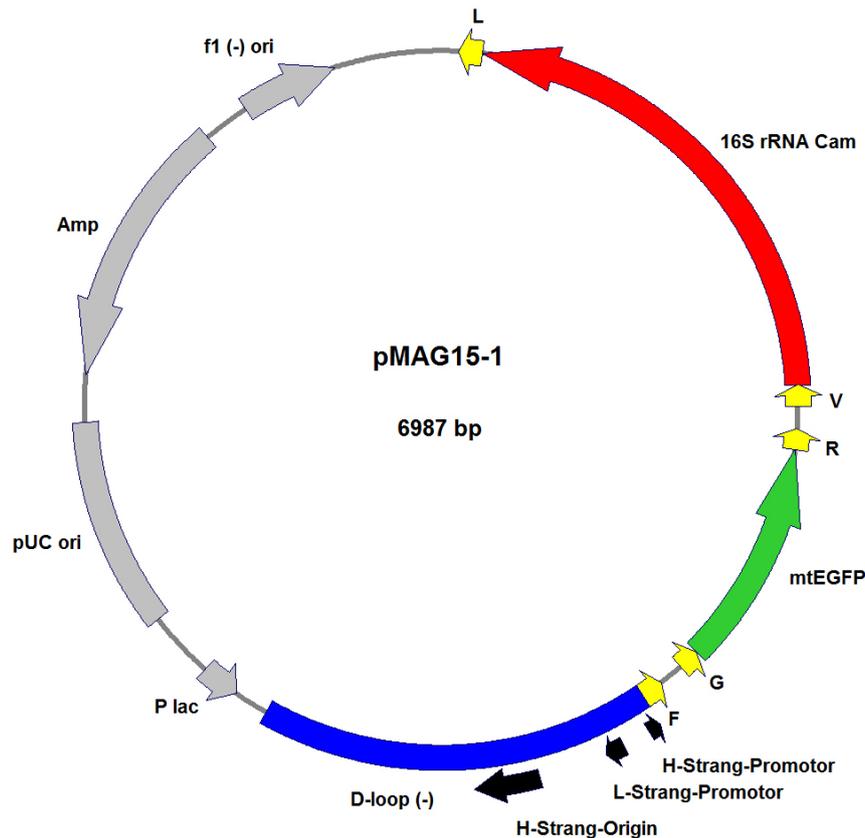


Abb. 4-8: Vektorkarte von pMAG15-1

4.1.1.9. pMAG15-2

Um die Expressionsrate des mtEGFP zu erhöhen, sollte die RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 genutzt werden, um die Transkription des Reportergens mtEGFP zu verstärken. Dazu war es notwendig, die T7-RNA-Polymerase in den Vektor zu integrieren und unter die Kontrolle des mitochondrialen Promotors zu stellen. Wie schon beim EGFP mussten mitochondriale tRNAs an die Enden des T7-RNA-Polymerase-Gens angefügt werden, um eine korrekte Prozessierung zu gewährleisten. Die Wahl fiel auf die tRNAs für Aspartat und Lysin, die das COX2-Gen in der mitochondrialen DNA flankieren. Neben der T7-RNA-Polymerase wurde auch noch eine Chloramphenicol-Resistenz integriert. Da dieser Vektor kein mtEGFP besitzt, wurde er ausschließlich zur Konstruktion weiterer Expressionsvektoren benutzt.

Aus dem Vektor pCR-XL-TOPO-T7 (4.1.1.12.2) wurde das Gen der T7-RNA-Polymerase und die flankierenden Aspartat- und Lysin-tRNAs durch eine Restriktionsspaltung mit *Bam*HI

und *PstI* gewonnen. Das mtEGFP-Gen und die Glycin- und Arginin-tRNAs wurden mit Hilfe von *HindIII* und *BclI* aus dem Vektor pMAG15-1 entfernt. Anschließend wurden sowohl die Enden des Vektors als auch die des T7-RNA-Polymerase-Fragmentes durch eine Behandlung mit Klenow-Fragment aufgefüllt, da die Restriktionsschnittstellen nicht zueinander kompatibel waren. Nach der Ligation beider Fragmente wurde die korrekte Orientierung der T7-RNA-Polymerase überprüft und der Vektor pMAG15-2 sequenziert.

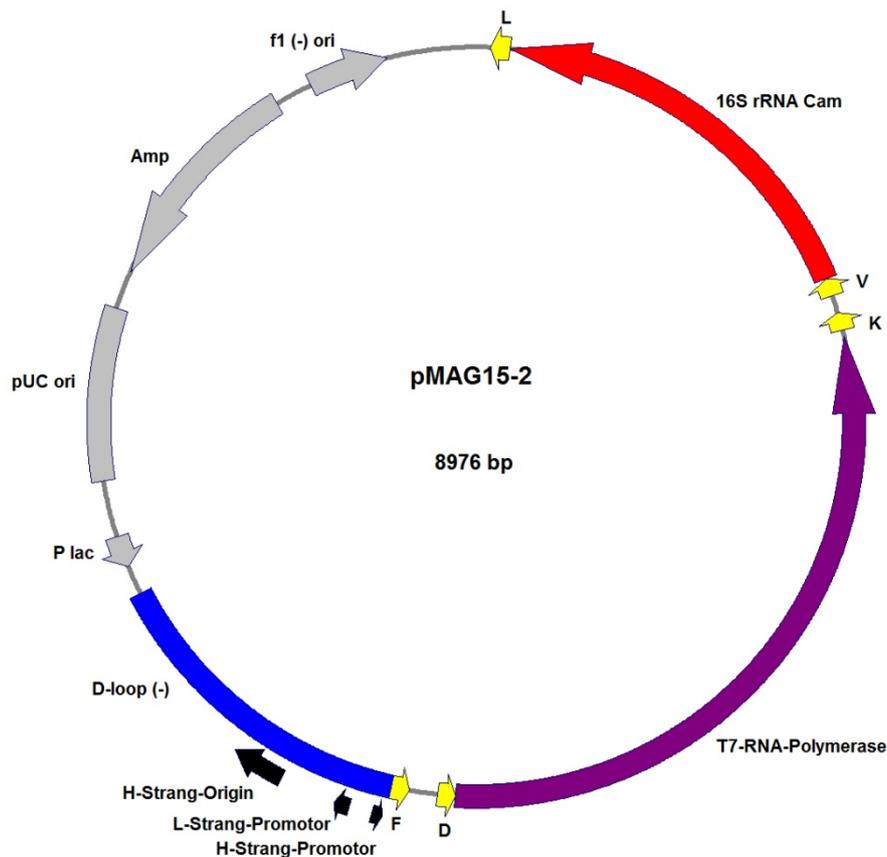


Abb. 4-9: Vektorkarte von pMAG15-2

4.1.1.10. pMAG16-1

Der Vektor pMAG16-1 war das erste Expressionsvektor-Konstrukt, bei dem das mtEGFP unter der Kontrolle eines T7-Promotors stand. Durch diesen Promotor sollte die Expression verstärkt werden, da die T7-RNA-Polymerase nicht an die Regulation des mitochondrialen

Ergebnisse

Transkriptionsapparates gebunden ist und somit kontinuierlich das mtEGFP-Gen ablesen kann.

Aus dem Vektor pMAG14-2 wurde das 16S rRNA-Gen mit der Chloramphenicol-Resistenz durch eine Restriktionsspaltung mit *PsiI* und *HindIII* entfernt und die *HindIII*-Enden durch eine Behandlung mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Das mtEGFP wurde mitsamt den tRNAs aus dem Vektor pCRII-TOPO-mtEGFP (4.1.1.12.1) mit den Restriktionsendonukleasen *PsiI* und *XhoI* herausgeschnitten und die Enden ebenfalls aufgefüllt, so dass es anschließend in den Vektor ligiert werden konnte. Nachdem die Orientierung des mtEGFP kontrolliert wurde, erhielt der Vektor die Bezeichnung pMAG16-1. Aufgrund des fehlenden Replikationsursprungs des L-Stranges wurde dieser Vektor nicht für Transfektionsversuche eingesetzt.

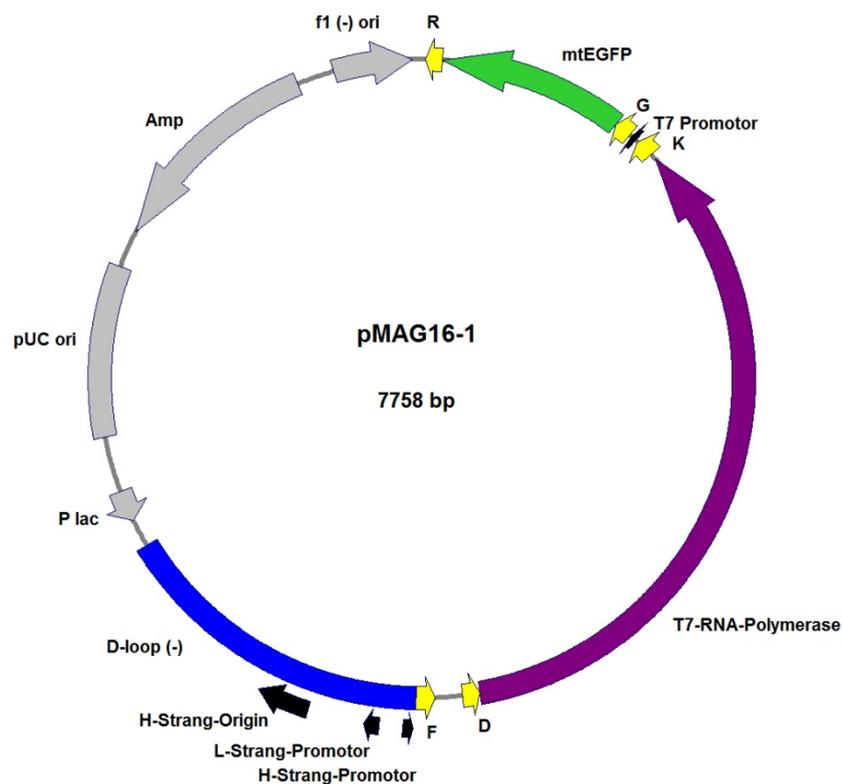


Abb. 4-10: Vektorkarte von pMAG16-1

4.1.1.11. pMAG17-1

Ein weiterer Vektor, bei dem die Expression des mtEGFPs durch die T7-RNA-Polymerase verstärkt werden soll, ist der Vektor pMAG17-1.

Zur Herstellung wurde aus dem Vektor pCRII-TOPO-mtEGFP (4.1.1.12.1) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *PsiI* das mtEGFP-Gen inklusive der flankierenden tRNAs herausgeschnitten und das 5'-überhängende *XhoI*-Ende durch eine Behandlung mit T7-DNA-Polymerase aufgefüllt. Der Vektor pMAG14-2 (4.1.1.6) wurde ebenfalls einer Restriktionsspaltung mit *PsiI* unterzogen, das dabei entstandene kleine Fragment verworfen und der Rest des Vektors dephosphoryliert. Nach der Ligation mit dem präparierten mtEGFP-Fragment wurde die Orientierung des Inserts durch Sequenzierung überprüft.

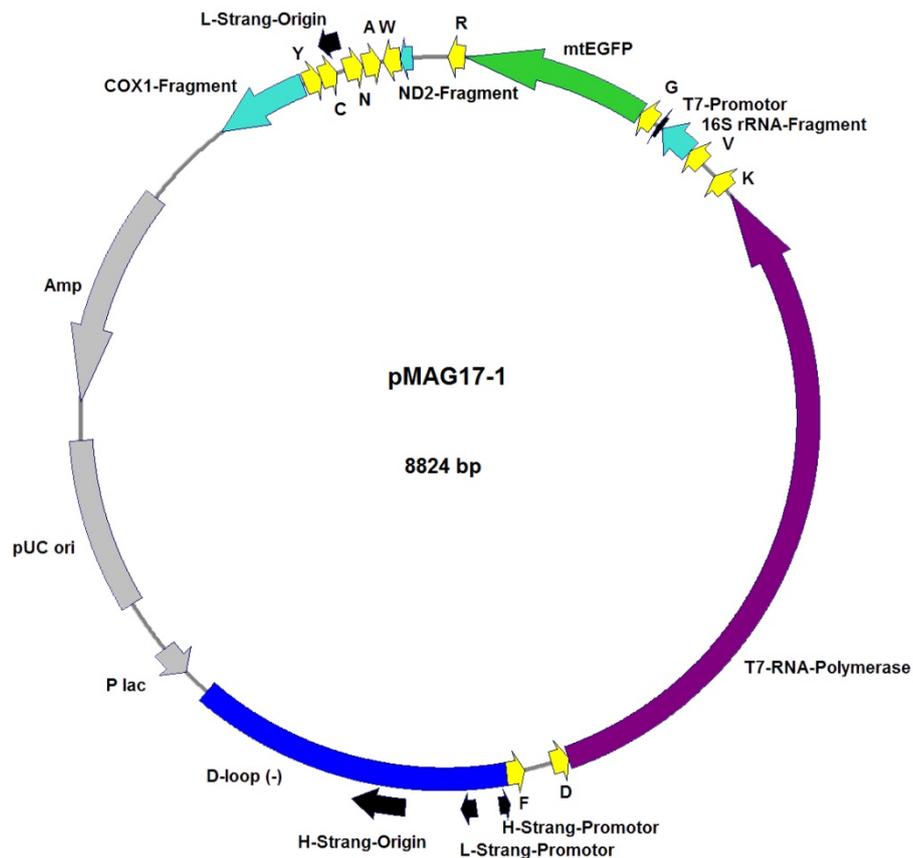


Abb. 4-11: Vektorkarte von pMAG17-1

4.1.1.12. Hilfsvektoren

4.1.1.12.1. pCRII-TOPO-mtEGFP

Der Hilfsvektor pCRII-TOPO-mtEGFP enthält das unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehende mtEGFP-Gen, inklusive der Glycin- und Arginin-tRNAs. Zur Herstellung dieses Vektors wurde das mtEGFP-Gen mit den Primern 5'-Xho-T7p-Cox3 und 3'-ND4L-Psi aus dem Vektor pMAG12-1 amplifiziert, wobei zusätzlich der T7-Promotor-Bereich an das 5'-Ende fusioniert wurde. Das PCR-Produkt wurde daraufhin mit dem TOPO-TA[®] Cloning Kit in den Vektor pCR[®]II-TOPO[®] (2.4.7) kloniert.

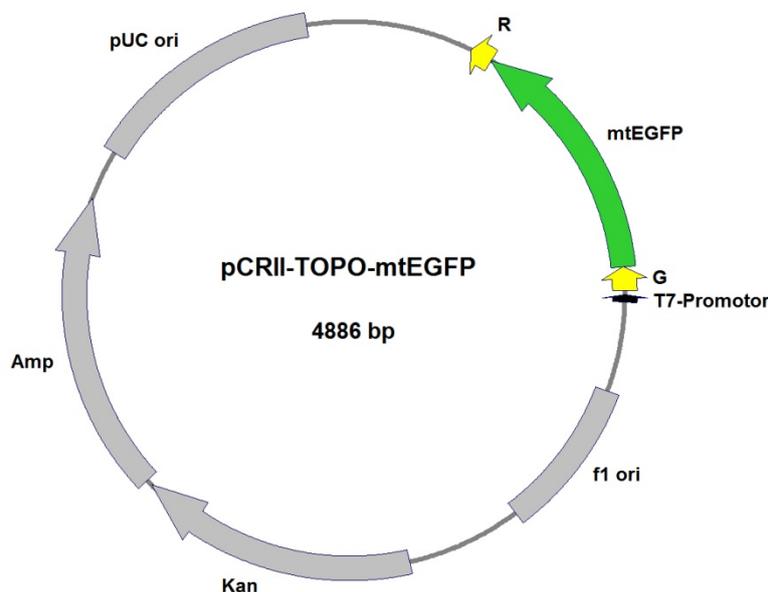


Abb. 4-12: Vektorkarte von pCRII-TOPO-mtEGFP

4.1.1.12.2. pCR-XL-TOPO-T7

Dieser Vektor wurde bei der Klonierung des T7-RNA-Polymerase-Gens hergestellt. Mit den Primern 5'-Bcl1-trnD-T7 und 3'-T7-trnK-HindIII wurde das Gen aus dem Vektor pAR1219 (2.4.6) amplifiziert und dabei die tRNAs für Aspartat und Lysin, die das COX2-Gen in der mitochondrialen DNA flankieren, an die Enden fusioniert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem TOPO[®]-XL PCR Cloning Kit in den Vektor pCR[®]-XL-TOPO[®] (2.4.8) ligiert.

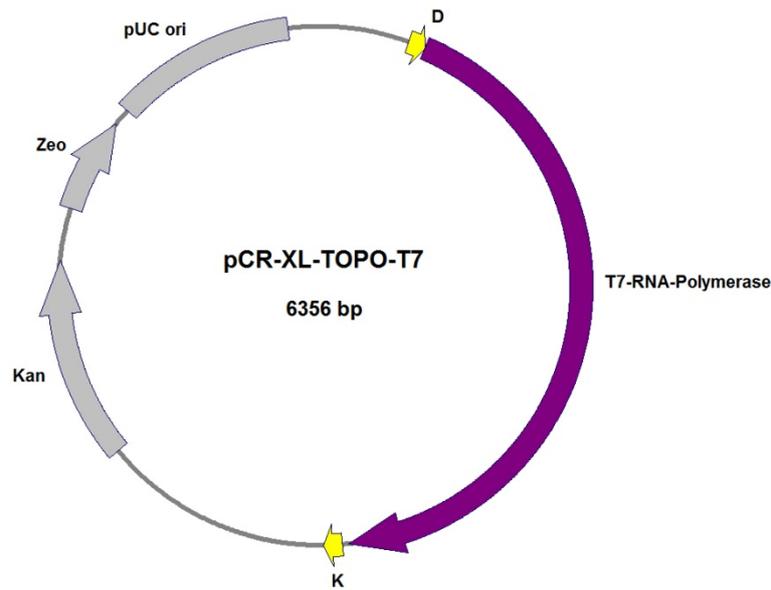


Abb. 4-13: Vektorkarte von pCR-XL-TOPO-T7

4.1.2. Überprüfung der Funktionsfähigkeit

Um die Funktionsfähigkeit der mitochondrialen Expressionsplasmide zu überprüfen, wurde ein mitochondriales *in-vitro*-Transkriptionssystem benutzt, das im wesentlichen aus einem Lysat menschlicher Mitochondrien besteht und somit alle benötigten Proteine enthält (Fernandez-Silva *et al.*, 1996). Der Nachweis der entstandenen RNAs nach einer Reversen Transkription (RT) zu cDNA erfolgte mit Hilfe von PCR-Reaktionen.

4.1.2.1. Transkription

Die Transkriptionsnachweise verliefen in zwei Schritten: Zuerst wurde die Transkription von Vektoren untersucht, bei denen das mtEGFP-Gen unter der Kontrolle der mitochondrialen Promotoren stand. Im zweiten Schritt wurden die Vektoren mit der T7-RNA-Polymerase auf ihre mitochondriale Transkriptionsfähigkeit untersucht.

Die mtEGFP-enthaltende Plasmide pMAG11-2, pMAG12-1, pMAG13-1 und pMAG14-1 wurden mit *Bsp1407I* linearisiert und anschließend bei der *in-vitro*-Transkription als *Template*-DNA genutzt. Nach der Reinigung der RNA erfolgte eine DNase I-Behandlung zur Entfernung noch vorhandener Plasmid-DNA-Reste. Im nächsten Schritt wurde die RNA mit

Ergebnisse

dem mtEGFP-spezifischen Primer EGFP-655-REV durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Für den tatsächlichen Nachweis wurde die entstandene cDNA in einer PCR-Reaktion mit den mtDNA-spezifischen Primern EGFP-068-FOR und EGFP-424-REV amplifiziert. Zur Kontrolle, dass keine DNA-Verunreinigungen der RNA zu einem Amplifikat führten, wurde jeweils eine entsprechende Menge der RNA vor der Reversen Transkription in der PCR-Reaktion eingesetzt. Wenn in diesen RNA-Ansätzen ein Produkt entstand, wurde die RNA nochmals mit DNase I behandelt und wiederum eine Reverse Transkription durchgeführt. In einer weiteren Kontroll-PCR-Reaktion wurde ein Reverser Transkriptionsansatz ohne den Einsatz von RNA verwendet.

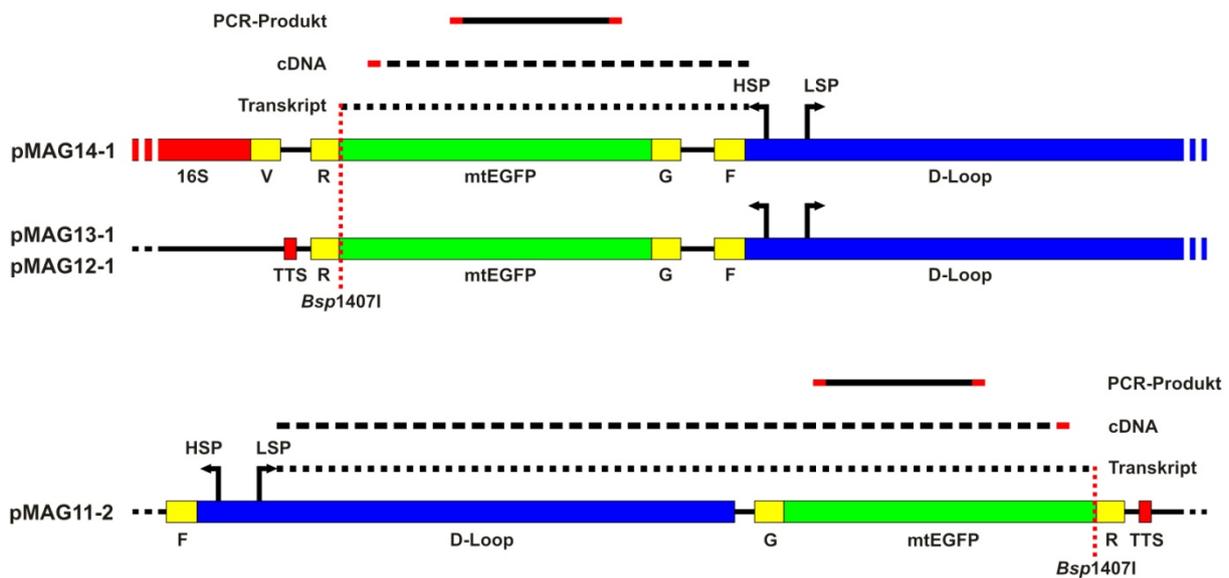


Abb. 4-14: Schematische Ansicht des Transkriptionsnachweises für mtEGFP
Primersequenzen sind bei den cDNAs und PCR-Produkten rot hervorgehoben

Wie man in Abb. 4-15 erkennen kann, konnten alle Plasmide in dem *in-vitro*-Transkriptionsextrakt transkribiert werden (Spuren 2, 4, 6 und 8) – es entstand ein PCR-Produkt derselben Größe von 357 bp wie bei der PCR-Kontrolle (Spur 12). Das Signal des Plasmids pMAG11-2 in Spur 2 war jedoch etwas schwächer als die Signale der anderen drei Plasmide, was unter Umständen auf den verwendeten Promotor zurückzuführen ist. In den entsprechenden RNA-Proben (Spuren 3, 5, 7 und 9), der RT-Kontrolle ohne RNA (Spur 10) und der H₂O-PCR-Kontrolle war kein Amplifikat zu erkennen.

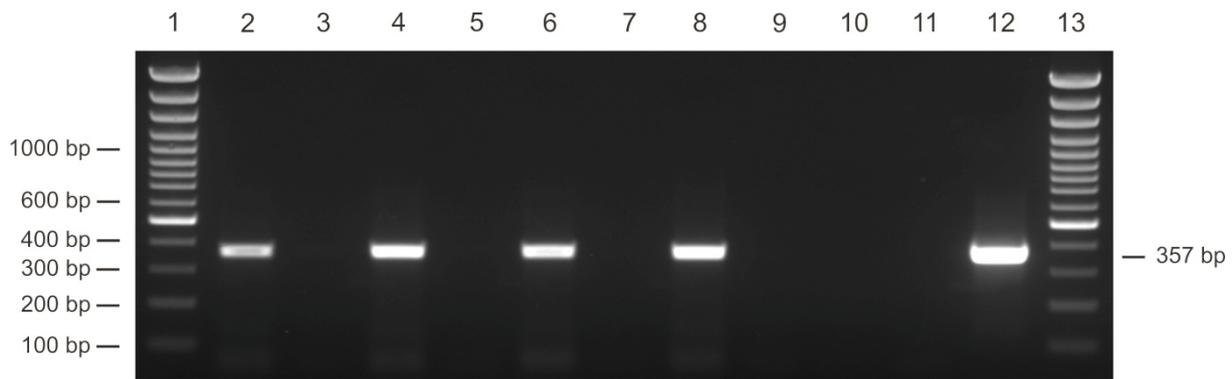


Abb. 4-15: Nachweis zur Transkription des mtEGFP-Gens durch PCR

Agarose-Gel (1,5%), Spur 1 und 13: 0,5 µg GeneRuler™ 100bp Plus-Marker, Spur 2: cDNA (pMAG11-2/*Bsp*1407I), Spur 3: RNA (pMAG11-2/*Bsp*1407I), Spur 4: cDNA (pMAG12-1/*Bsp*1407I), Spur 5: RNA (pMAG12-1/*Bsp*1407I), Spur 6: cDNA (pMAG13-1/*Bsp*1407I), Spur 7: RNA (pMAG13-1/*Bsp*1407I), Spur 8: cDNA (pMAG14-1/*Bsp*1407I), Spur 9: RNA (pMAG14-1/*Bsp*1407I), Spur 10: cDNA (H₂O-Kontrolle), Spur 11: H₂O-Kontrolle, Spur 12: pMAG12-1 (PCR-Kontrolle)

Für den Nachweis der Transkription der T7-RNA-Polymerase wurden die Plasmide pMAG14-2, pMAG14-3 und pMAG17-1 mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Nde*I linearisiert. Die weiteren Schritte erfolgten analog zum mtEGFP-Transkriptions-Nachweis. Bei der Reversen Transkription wurde der T7-RNA-Polymerase-spezifische Primer T7-2018-REV und für die nachfolgende PCR-Reaktion die T7-RNA-Polymerase-spezifischen Primer T7-0912-FOR und T7-1506-REV verwendet.

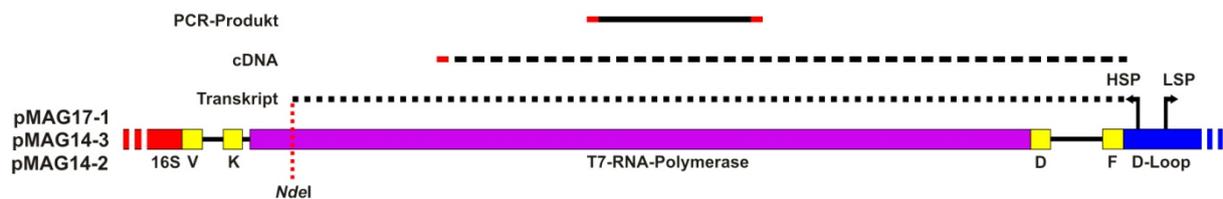


Abb. 4-16: Schematische Ansicht des Transkriptionsnachweises für die T7-RNA-Polymerase

Primersequenzen sind bei der cDNA und dem PCR-Produkt rot hervorgehoben

Auch hier konnte die Transkription aller drei Plasmide (Spuren 2, 3 und 5) im *in-vitro*-Transkriptionsextrakt nachgewiesen werden (Abb. 4-17). Die PCR-Reaktionen lieferten Banden, deren Größe von 595 bp mit der der Kontroll-PCR-Reaktion mit pMAG17-1 (Spur 10) identisch war. Bei allen RNA-Proben (Spuren 3, 5 und 7) sowie den Kontrollreaktionen (Spuren 10 und 11) entstand wie erwartet kein PCR-Produkt.

Ergebnisse

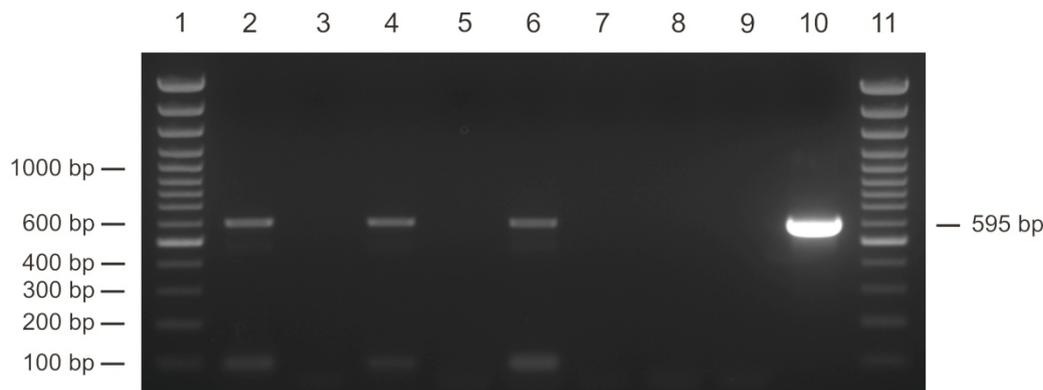


Abb. 4-17: Nachweis zur Transkription des T7-RNA-Polymerase-Gens durch PCR

Agarose-Gel (1,5%), Spur 1 und 11: 0,5 µg GeneRuler™ 100bp Plus-Marker, Spur 2: cDNA (pMAG14-2/NdeI), Spur 3: RNA (pMAG14-2/NdeI), Spur 4: cDNA (pMAG14-3/NdeI), Spur 5: RNA (pMAG14-3/NdeI), Spur 6: cDNA (pMAG17-1/NdeI), Spur 7: RNA (pMAG17-1/NdeI), Spur 8: cDNA (H₂O-Kontrolle), Spur 9: H₂O-Kontrolle, Spur 10: pMAG17-1

4.1.2.2. Prozessierung

Die Polyadenylierung der RNAs im *in-vitro*-Transkriptionsextrakt wurde durch die Nutzung des Primers Anker2 bei der Reversen Transkription ermöglicht, der am 3'-Ende über einen Oligo-dT-Schwanz verfügt, mit dem er an Poly-A-Bereiche binden kann. Somit wurden nur RNAs in cDNAs umgeschrieben, die zuvor polyadenyliert wurden.

Die Plasmide pMAG11-2, pMAG12-1, pMAG13-1 und pMAG14-1 wurden für diesen Nachweis mit *BclI* linearisiert und in der *in-vitro*-Transkription eingesetzt. Dies ermöglichte gleichzeitig auch noch, ein eventuelles Herausschneiden der Arginin-tRNA am 3'-Ende des mtEGFP durch eine Verkürzung des PCR-Produktes nachzuweisen. daraufhin wurden die RNAs analog zum Nachweis der Transkription (4.1.2.1) gereinigt. Nach der Reversen Transkription mit dem Primer Anker2 wurde bei der nachfolgenden PCR-Amplifizierung neben dem mtEGFP-spezifischen Primer EGFP-283-FOR der Primer UAPkurz verwendet, der mit dem 5'-Ende des Primers Anker2 identisch ist. Dadurch konnte der gesamte Bereich von der Bindungsstelle des Primers EGFP-283-FOR innerhalb des mtEGFP-Gens bis an das Ende des Poly-A-Bereichs in der PCR-Reaktion amplifiziert werden (vgl. Abb. 4-18).

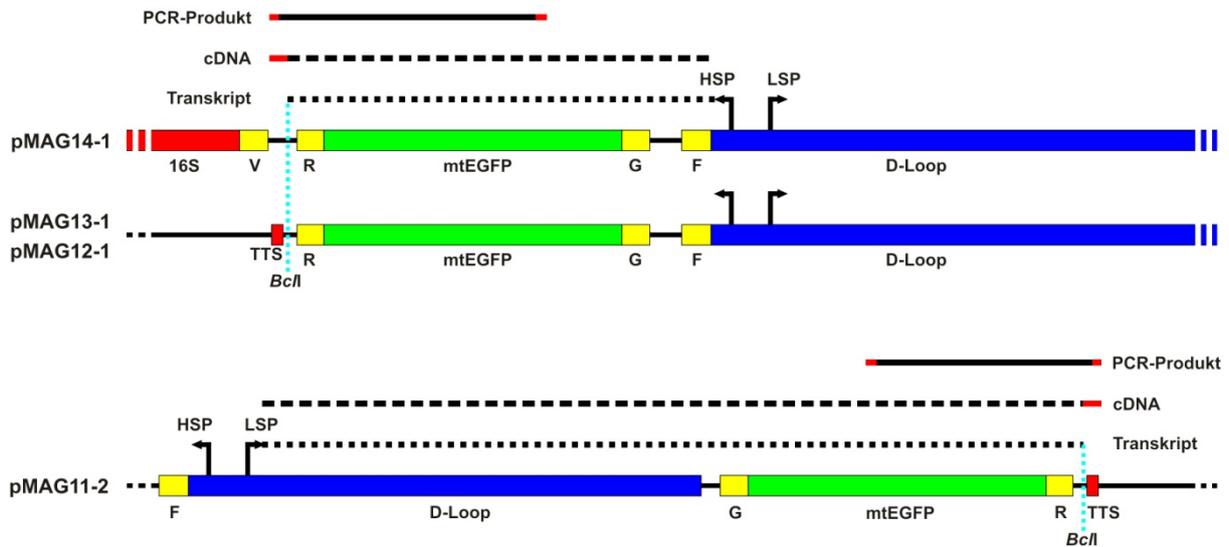


Abb. 4-18: Schematische Ansicht des Prozessierungsnachweises für mtEGFP
 Primersequenzen sind bei den cDNAs und PCR-Produkten rot hervorgehoben

Die PCR-Reaktion zeigte, dass bei allen Transkriptionsansätzen (Spuren 2, 4, 6 und 8) eine Polyadenylierung der RNA-Enden stattgefunden hatte (Abb. 4-19). Die Banden waren jedoch um ein Vielfaches schwächer als beim Transkriptionsnachweis. Alle Kontrollreaktionen mit den entsprechenden RNA-Proben (Spuren 3, 5, 7 und 9) sowie die RT- (Spur 10) und PCR-H₂O-Kontrolle (Spur 11) zeigten keine Banden.

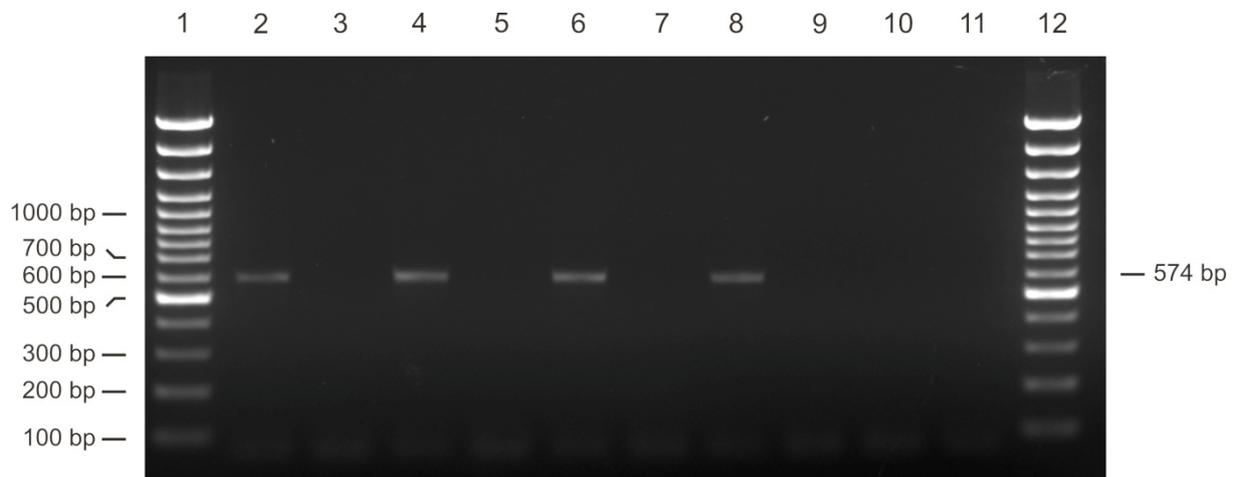


Abb. 4-19: Nachweis zur Prozessierung des mtEGFP-Gens durch PCR
 Agarose-Gel (1,5%), Spur 1 und 12: 0,5 µg GeneRuler™ 100bp Plus-Marker, Spur 2: cDNA (pMAG11-2/*BclI*), Spur 3: RNA (pMAG11-2/*BclI*), Spur 4: cDNA (pMAG12-1/*BclI*), Spur 5: RNA (pMAG12-1/*BclI*), Spur 6: cDNA (pMAG13-1/*BclI*), Spur 7: RNA (pMAG13-1/*BclI*), Spur 8: cDNA (pMAG14-1/*BclI*), Spur 9: RNA (pMAG14-1/*BclI*), Spur 10: cDNA (H₂O-Kontrolle), Spur 11: H₂O-Kontrolle

Ergebnisse

Aufgrund der Länge der amplifizierten DNA-Fragmente ließ sich folgern, dass kein Herausschneiden der Arginin-tRNA stattfand. Die Fragmentlänge deutete vielmehr darauf hin, dass die linearisierten Plasmide bis zur *BclI*-Restriktionschnittstelle transkribiert wurden und dort die Polyadenylierung erfolgte (erwartete Bandengröße: 564 bp). Im Falle eines Herausschneidens der tRNA und einer anschließenden Polyadenylierung an dieser Stelle hätte ein rund 100 bp kürzeres PCR-Produkt entstehen müssen.

Zur Überprüfung wurden die PCR-Produkte mit dem TOPO-TA[®] Cloning Kit in den Vektor pCR[®] II-TOPO[®] (2.4.7) ligiert und jeweils sechs Klone sequenziert. Die Sequenzierungen ergaben ebenfalls, dass neben der Polyadenylierung keine weiteren Prozessierungsvorgänge in diesem Bereich stattfanden. Jedoch wurde bei einigen der 24 Klone eine Verkürzung des Transkripts um zwei bis sechs Basen direkt vor dem Poly-A-Bereich festgestellt.

Zur Untersuchung der Polyadenylierung bei den T7-RNA-Polymerase enthaltenden Plasmiden pMAG14-2, pMAG14-3 und pMAG15-2 wurden diese mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *PsiI* linearisiert. Dadurch ergab sich die Gelegenheit, ein mögliches Herausschneiden der tRNAs für Lysin bzw. Valin zu detektieren. Die Reverse Transkription wurde wiederum mit dem Primer Anker2 durchgeführt und bei der PCR-Reaktion wurden der T7-RNA-Polymerase-spezifische Primer T7-2391-FOR und der bereits oben erwähnte Primer UAPkurz verwendet.

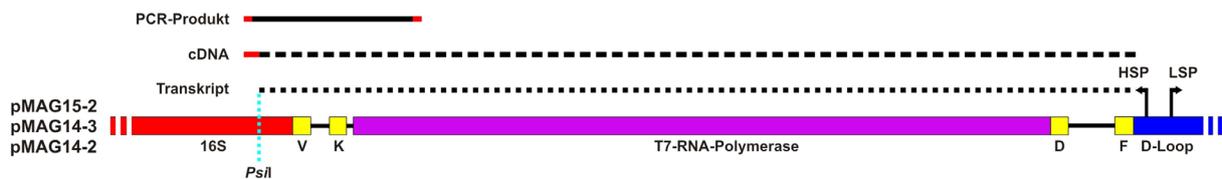


Abb. 4-20: Ansicht des Prozessierungsnachweises für die T7-RNA-Polymerase
Primersequenzen sind bei der cDNA und dem PCR-Produkt rot hervorgehoben

Auch hier konnte in allen drei Transkriptionsansätzen (Spuren 2, 4 und 6) eine Polyadenylierung nachgewiesen werden (Abb. 4-21). Alle Kontrollreaktionen (Spuren 3, 5, 7, 8 und 9) waren wie erwartet negativ.

Die Länge der PCR-Amplifikate legte wie beim vorhergehenden Versuch das Fehlen von anderen Prozessierungsschritten neben der Polyadenylierung nahe, da alle Banden auf der Höhe der erwarteten 673 bp zu finden waren.

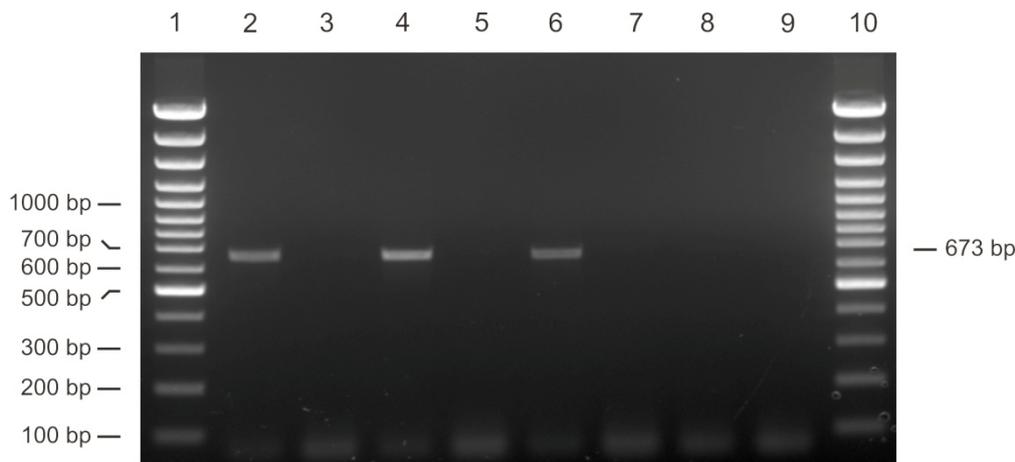


Abb. 4-21: Nachweis zur Prozessierung des T7-RNA-Polymerase-Genes durch PCR

Agarose-Gel (1,5%), Spur 1 und 11: 0,5 µg GeneRuler™ 100bp Plus-Marker, Spur 2: cDNA (pMAG14-2/*PsiI*), Spur 3: RNA (pMAG14-2/*PsiI*), Spur 4: cDNA (pMAG14-3/*PsiI*), Spur 5: RNA (pMAG14-3/*PsiI*), Spur 6: cDNA (pMAG15-2/*PsiI*), Spur 7: RNA (pMAG15-2/*PsiI*), Spur 8: cDNA (H₂O-Kontrolle), Spur 9: H₂O-Kontrolle, Spur 10: pMAG17-1

Nach der Ligation der PCR-Produkte in den Vektor pCR®II-TOPO® wurden jeweils acht Klone sequenziert. Bei einem Klon des PCR-Produkts vom *in-vitro*-Transkriptionsansatz mit dem Plasmid pMAG15-1 erfolgte die Polyadenylierung am Ende der 25 bp-langen Spacer-Sequenz direkt vor dem Beginn der Lysin-tRNA, die offensichtlich korrekt herausgeschnitten wurde. Die restlichen 23 Klone bestätigten die Ergebnisse des Prozessierungstests beim mtEGFP: Bis auf kurze Längenveränderungen im Bereich der Restriktionsschnittstelle für die Linearisierung wurden keine Abweichungen festgestellt.

4.2. Zelllinien mit T7-RNA-Polymerase in den Mitochondrien

Um den Nachweis der Expression über Fluoreszenzmikroskopie durchführen zu können, müssen sich genügend maturierte Proteinmoleküle in den Mitochondrien befinden. Da die Transkriptionsaktivität der konstruierten Vektoren unter Umständen zu schwach für eine Detektion sein könnte, sollte die RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 genutzt werden, um die Transkription des Reportergens mtEGFP zu verstärken. Hierfür mussten dazu auch die verwendeten Plasmide so angepasst werden, dass sie eine kompatible Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase enthielten.

Um sicherzustellen, dass sich ausreichende Mengen der Polymerase in den Mitochondrien befanden, wurde das T7-RNA-Polymerase-Gen im Kern exprimiert und anschließend durch eine anfusionierte N-terminale Signalsequenz in die Mitochondrien transportiert.

4.2.1. Konstruktion des Expressionsvektors für die T7-RNA-Polymerase

Das T7-RNA-Polymerase-Gen wurde ausgehend vom Plasmid pCR-XL-TOPO-T7 (4.1.1.12.2) mittels PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase und den Primern T7-0001-FOR und T7-2651-REV amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend mit dem TOPO-TA[®] Cloning Kit in den Vektor pCR[®] II-TOPO[®] (2.4.7) ligiert. Nach einer Sequenzierung des gesamten Inserts wurde durch eine Restriktionsspaltung mit *Age*I und *Not*I das T7-RNA-Polymerase-Gen herausgeschnitten. Der Vektor pEGFP-Mito (2.4.3) wurde ebenfalls mit *Age*I und *Not*I behandelt, so dass das EGFP-Gen entfernt wurde, die mitochondriale Signalsequenz jedoch weiterhin vorhanden war. Das T7-RNA-Polymerase-Gen konnte nun mit dem Vektorfragment zu dem neuen Vektor pT7-Mito ligiert werden, der unter der Kontrolle des CMV-Promotors für ein Fusionsprotein aus einer mitochondrialen Signalsequenz und der T7-RNA-Polymerase codiert (Abb. 4-22).

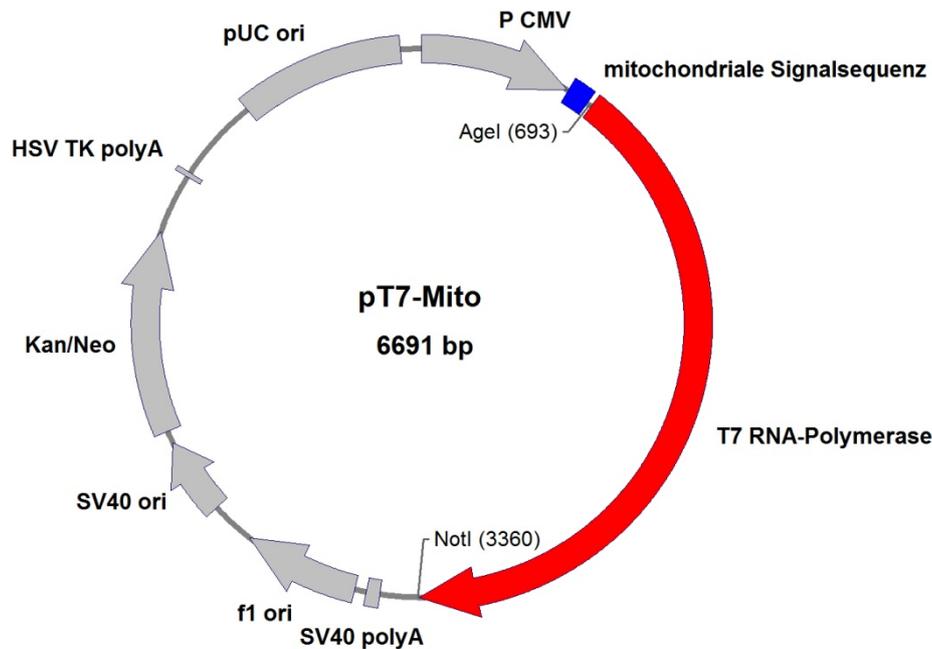


Abb. 4-22: Vektorkarte von pT7-Mito

4.2.2. Herstellung einer Zelllinie mit T7-RNA-Polymerase in den Mitochondrien

Der Expressionsvektor aus dem vorhergehenden Abschnitt wurde mit dem Transfektionsreagenz METAFECTENE[®] PRO in die Zelllinie 143B.TK⁻ transfiziert. Nach einer Kultivierung von einem Monat unter Selektion mit G418 wurde die Zelllinie auf die Expression der T7-RNA-Polymerase untersucht. Parallel dazu erfolgte der Nachweis in einer am Vortag transfizierten Zelllinie. Da kein Reportergen wie zum Beispiel EGFP in dem Expressionsvektor vorhanden war, konnte der Expressionsnachweis nicht *in-vivo* durchgeführt werden. Stattdessen wurde die T7-RNA-Polymerase in den Zelllinien durch andere Methoden nachgewiesen, die im folgenden Abschnitt beschrieben sind.

4.2.3. Nachweis der T7-RNA-Polymerase

Für den Nachweis des Plasmids in der Zelllinie wurde die genomische DNA extrahiert und damit eine PCR mit den Primern pEGFP-Mito-0597-FOR und T7-2559-REV durchgeführt. Die Primer binden am Anfang der mitochondrialen Signalsequenz bzw. kurz vor dem Ende der T7-RNA-Polymerase, wodurch ein PCR-Produkt von 2673 bp entsteht. Wie in Abb. 4-23 zu erkennen ist, war nach einem Monat fast kein Plasmid mehr nachweisbar: Lediglich beim

Ergebnisse

Einsatz von 300 ng genomischer DNA (Spur 9) ist noch eine minimale Bande auf der Höhe der Kontroll-PCR mit dem reinen Plasmid (Spur 14) erkennbar. Bei der frisch transfizierten Zelllinie konnte das Plasmid jedoch problemlos nachgewiesen werden (Spuren 10-13).

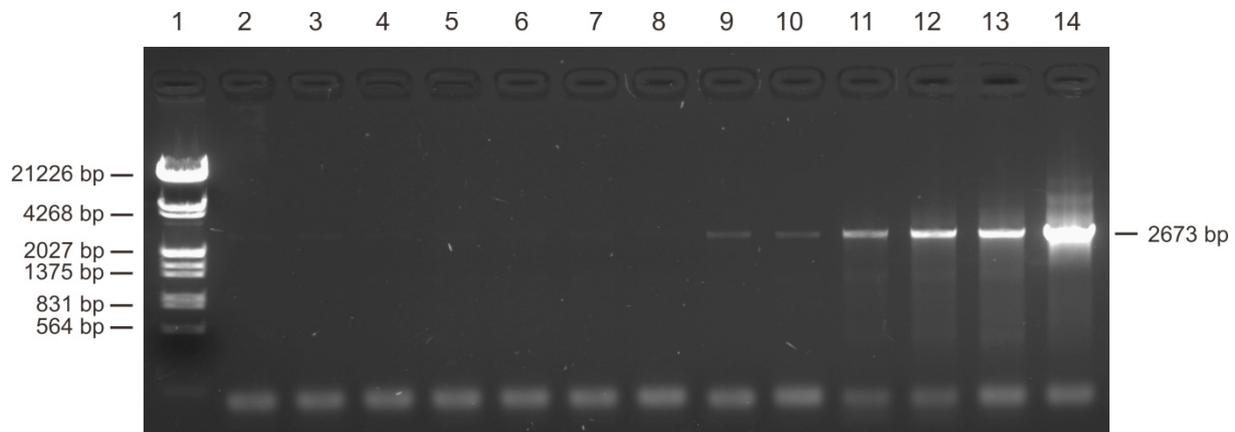


Abb. 4-23: Nachweis von pT7-Mito in transfizierten Zelllinien

Agarose-Gel (1,5%), Spur 1: 1 µg λ/EcoRI+HindIII-Marker, Spur 2-5: 10, 30, 100 bzw. 300 ng genomische DNA aus untransfizierten 143B.TK⁻, Spur 6-9: 10, 30, 100 bzw. 300 ng genomische DNA aus einem Monat vorher transfizierten 143B.TK⁻, Spur 10-13: 10, 30, 100 bzw. 300 ng genomische DNA aus frisch transfizierten 143B.TK⁻, Spur 14: 1 ng pT7-Mito

Zum direkten Nachweis der T7-RNA-Polymerase-Expression in den transfizierten 143B.TK⁻ wurde jeweils eine konfluente 60-mm-Kulturschale von untransfizierten und frisch transfizierten 143B.TK⁻ abgerntet und daraus ein Proteinextrakt hergestellt. Die Extrakte wurden auf Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Als Kontrolle wurde dabei eine T7-RNA-Polymerase-Präparation der AG Schön in zwei Verdünnungen aufgetragen. In Abb. 4-24 ist in Spur 13 die T7-RNA-Polymerase-Kontrolle in der 1:10-Verdünnung zu erkennen (Pfeil), in den anderen Spuren ist sie nicht zu sehen.

Ein identisches Polyacrylamid-Gel wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Hilfe eines T7-RNA-Polymerase-Antikörpers detektiert. Zum optischen Nachweis wurde NBT/BCIP in Verbindung mit einer antikörpergekoppelten alkalischen Phosphatase genutzt.

In Abb. 4-25 ist das Ergebnis des Western Blots zu sehen: Neben dem starken Signal der 1:10-verdünnten T7-RNA-Polymerase in Spur 13 ist auch bei der 1:100-Verdünnung in Spur 14 eine Bande zu erkennen. Auch bei den Proteinextrakten aus frisch transfizierten 143B.TK⁻ in Spur 3, 7 und 17 ließ sich ein Signal auf der Höhe der T7-RNA-Polymerase identifizieren (Pfeile), während bei den Extrakten aus untransfizierten Zellen (Spuren 2, 5 und 9) keine Bande auf dieser Höhe zu erkennen war. Zudem waren noch viele andere Signale zu sehen, da der Antikörper anscheinend ebenso andere Proteine in den Zellextrakten erkennen konnte.

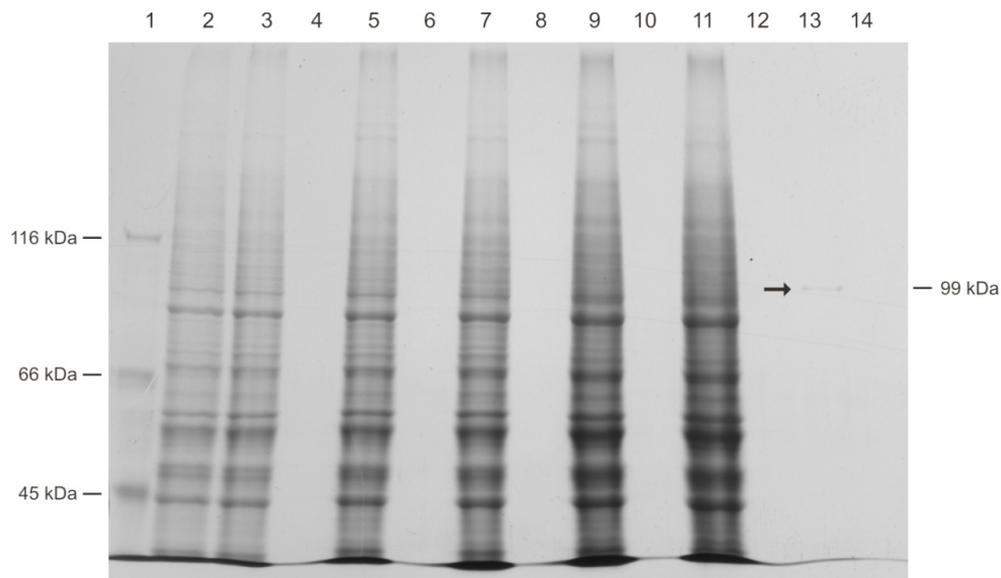


Abb. 4-24: SDS-PAGE zum Nachweis von T7-RNA-Polymerase in 143B.TK

Coomassie-gefärbtes Polyacrylamid-Gel (8%), Spur 1: 5 µl Unstained Protein Molecular Weight Marker, Spuren 2, 5 bzw. 9: 2, 4 bzw. 8 µl Zellextrakt aus nichttransfizierten 143B.TK⁻ ohne pT7-Mito, Spuren 3, 7 bzw. 11: 2, 4 bzw. 8 µl Zellextrakt aus mit pT7-Mito frisch transfizierten 143B.TK⁻, Spur 13: 2 µl T7-RNA-Polymerase (AG Schön), 1:10 verdünnt, Spur 14: 2 µl T7-RNA-Polymerase (AG Schön), 1:100 verdünnt, Spuren 4, 6, 8, 10, 12: Leerspuren (nur mit Probenpuffer beladen)

Bei den länger transfizierten Zelllinien konnte keine Expression mehr nachgewiesen werden, weshalb die Zellen für die Transfektionsversuche spätestens nach 1-2 Wochen neu mit dem Plasmid pT7-Mito transfiziert wurden.

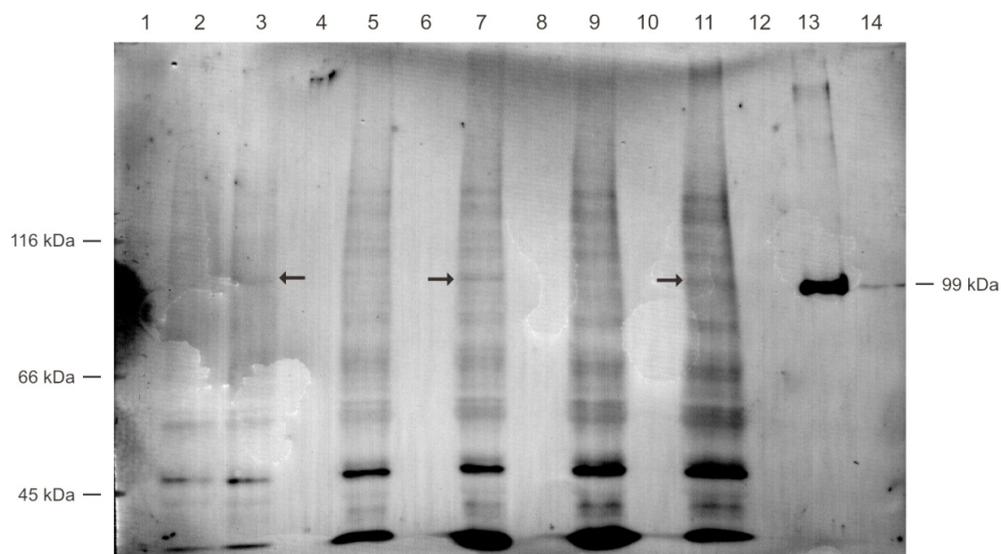


Abb. 4-25: Western Blot zum Nachweis von T7-RNA-Polymerase in 143B.TK

Spur 1: 5 µl Unstained Protein Molecular Weight Marker, Spuren 2, 5 bzw. 9: 2, 4 bzw. 8 µl Zellextrakt aus nichttransfizierten 143B.TK⁻ ohne pT7-Mito, Spuren 3, 7 bzw. 11: 2, 4 bzw. 8 µl Zellextrakt aus mit pT7-Mito frisch transfizierten 143B.TK⁻, Spur 13: 2 µl T7-RNA-Polymerase (AG Schön), 1:10 verdünnt, Spur 14: 2 µl T7-RNA-Polymerase (AG Schön), 1:100 verdünnt, Spuren 4, 6, 8, 10, 12: Leerspuren (nur Probenpuffer)

Ergebnisse

Zur Überprüfung der korrekten Lokalisation der T7-RNA-Polymerase in den Mitochondrien wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen an den Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden 143B.TK⁻ Zellen auf 12-mm-Deckgläser ausgesät und eine Hälfte davon mit dem Plasmid pT7-Mito transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Formaldehyd fixiert und die T7-RNA-Polymerase mit dem bereits für den Western Blot eingesetzten Antikörper durch Immunfluoreszenz lokalisiert.

Bei den Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop (Abb. 4-26, A-F) zeigte sich mit dem Antikörper gegen die T7-RNA-Polymerase sowohl bei den untransfizierten als auch bei den transfizierten Zellen eine deutliche Färbung im Zellkern, die verstärkt in den Nukleoli auftrat. Auch über das gesamte Zytosol der untransfizierten Zellen war ein schwaches Fluoreszenzsignal zu erkennen, das jedoch keine Übereinstimmung mit den Mitochondrien aufwies. Bei den mit dem Plasmid pT7-Mito-transfizierten Zellen waren jedoch im Zytosol Strukturen mit dem Antikörper angefärbt worden (Pfeile in Bild D), die eine Kolokalisation mit den durch MitoTracker[®] Deep Red FM angefärbten Mitochondrien zeigten. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die Präparate zusätzlich mit dem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht, da dieses eine höhere Vergrößerung ermöglicht.

Die Aufnahmen (Abb. 4-26, G-L) brachten im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie bei der Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop. So war auch hier der Zellkern relativ stark durch den Antikörper angefärbt, jedoch waren die Nukleoli nahezu nicht erkennbar. Das Zytosol zeigte ebenso eine schwache Färbung, die recht homogen verteilt war. Bei den transfizierten Zellen konnten wieder zusätzliche Strukturen nachgewiesen werden (Pfeile in Bild J), die auch hier eine Kolokalisation mit den Mitochondrien aufwiesen.

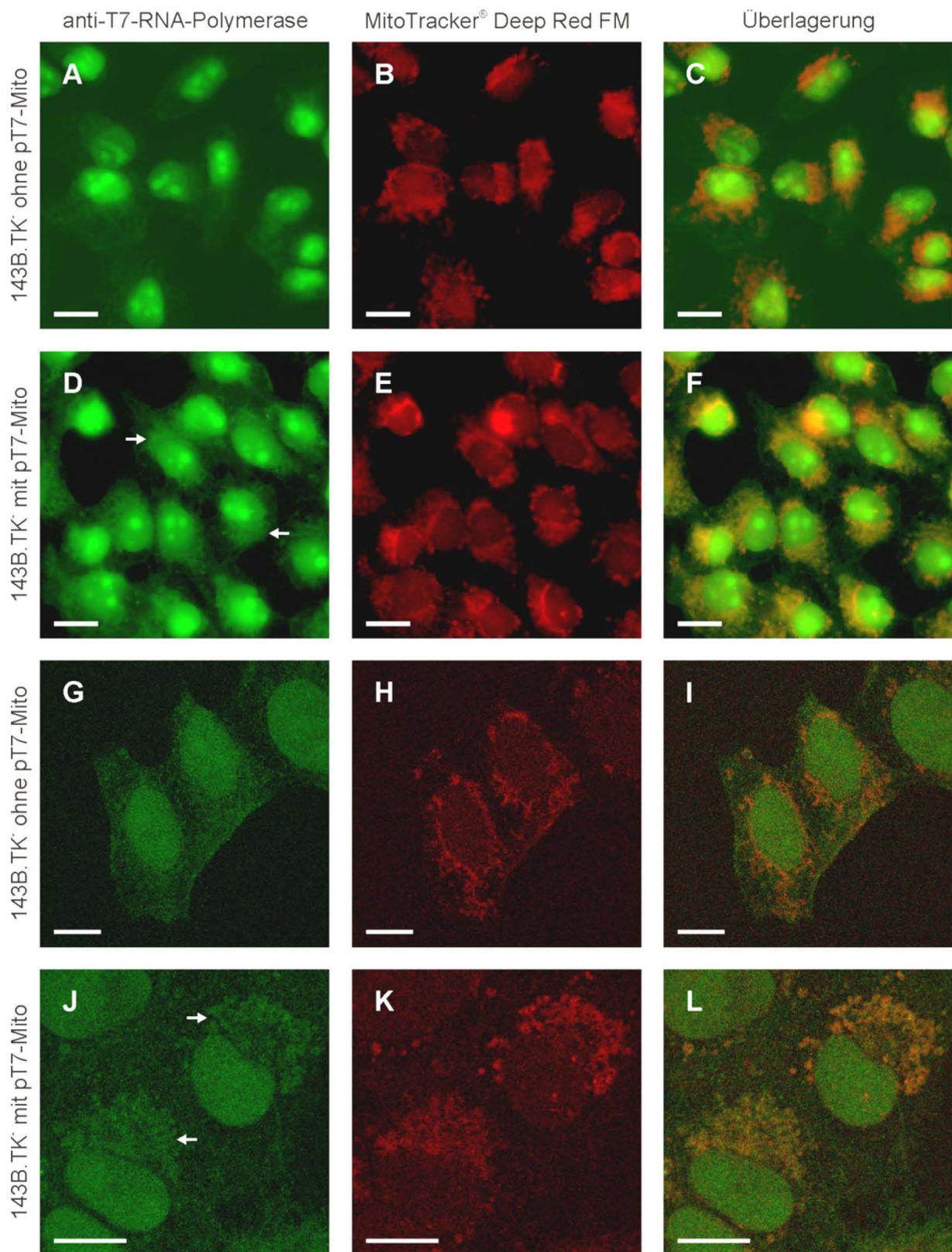


Abb. 4-26: Lokalisierung der T7-RNA-Polymerase in 143B.TK⁻ durch Immunfluoreszenz

A-F: Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop, G-L: Aufnahmen am Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die Eichstriche entsprechen jeweils 10 µm.

4.3. Induktion von Megamitochondrien

Megamitochondrien können in tierischen Zellen auf unterschiedlichsten Wegen induziert werden. Neben der Gabe von Chemikalien wie Valinomycin, H₂O₂ oder Hydrazin (Karbowski *et al.*, 1997; Malka *et al.*, 2005), ist auch die Inkubation der Zellen in saurem Kulturmedium eine Möglichkeit, Mitochondrien zum Schwellen zu bringen. Das Medium kann hierfür zum einen durch Milchsäure azidifiziert werden, zum anderen ist auch die Übertragung von „verbrauchtem“ Kulturmedium eine geeignete Methode, um ein schnelles Ansäuern zu erreichen (Kukat, 2007, Dissertation). In den folgenden Versuchsreihen sollten ausgetestet werden, ob auch andere pH-Wert-senkende Substanzen wie Natriumacetat und Essigsäure zur Induktion von Riesenmitochondrien geeignet sind und ob dadurch eine weitere Vergrößerung der Organellen zu erzielen ist.

4.3.1. Induktion mit Natriumacetat

Zwischen 2×10^5 und 3×10^5 Zellen der mit dem Plasmid pEGFP-Mito (2.4.3) transfizierten Zelllinie 143B.TK⁻ wurden auf 35-mm-Glasbodenschalen ausgesät und in Kulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen (45, 50, 55, 60 und 65 mM) Natriumacetat kultiviert. Am Tag 1 und Tag 2 nach der Zugabe des angesäuerten Mediums wurden die Zellen am Mikroskop auf die Bildung von vergrößerten Mitochondrien untersucht.

Während die Kontrollzellen in Natriumacetat-freiem Medium nach dem ersten Tag ein Netzwerk aus dünnen schlauchförmigen Mitochondrien enthielten (Abb. 4-27, A+B), zeigten die Zellen mit 45 mM Natriumacetat erste Ansätze von verdickten Mitochondrien (Abb. 4-27, E+F). Bei 50 und 55 mM waren fast kugelförmige Mitochondrien mit einem Durchmesser von bis zu 4 µm erkennbar (Abb. 4-27, I+J und M+N), während interessanterweise in denselben Zellen teilweise auch noch ein schlauchförmiges Netzwerk zu sehen war. Bei den weiter erhöhten Konzentrationen von 60 und 65 mM Natriumacetat nahm die Größe der Mitochondrien wieder ab und auch ihre Form veränderte sich zu teils tropfenförmigen Verdickungen des Netzwerks (Abb. 4-27, Q+R und U+V).

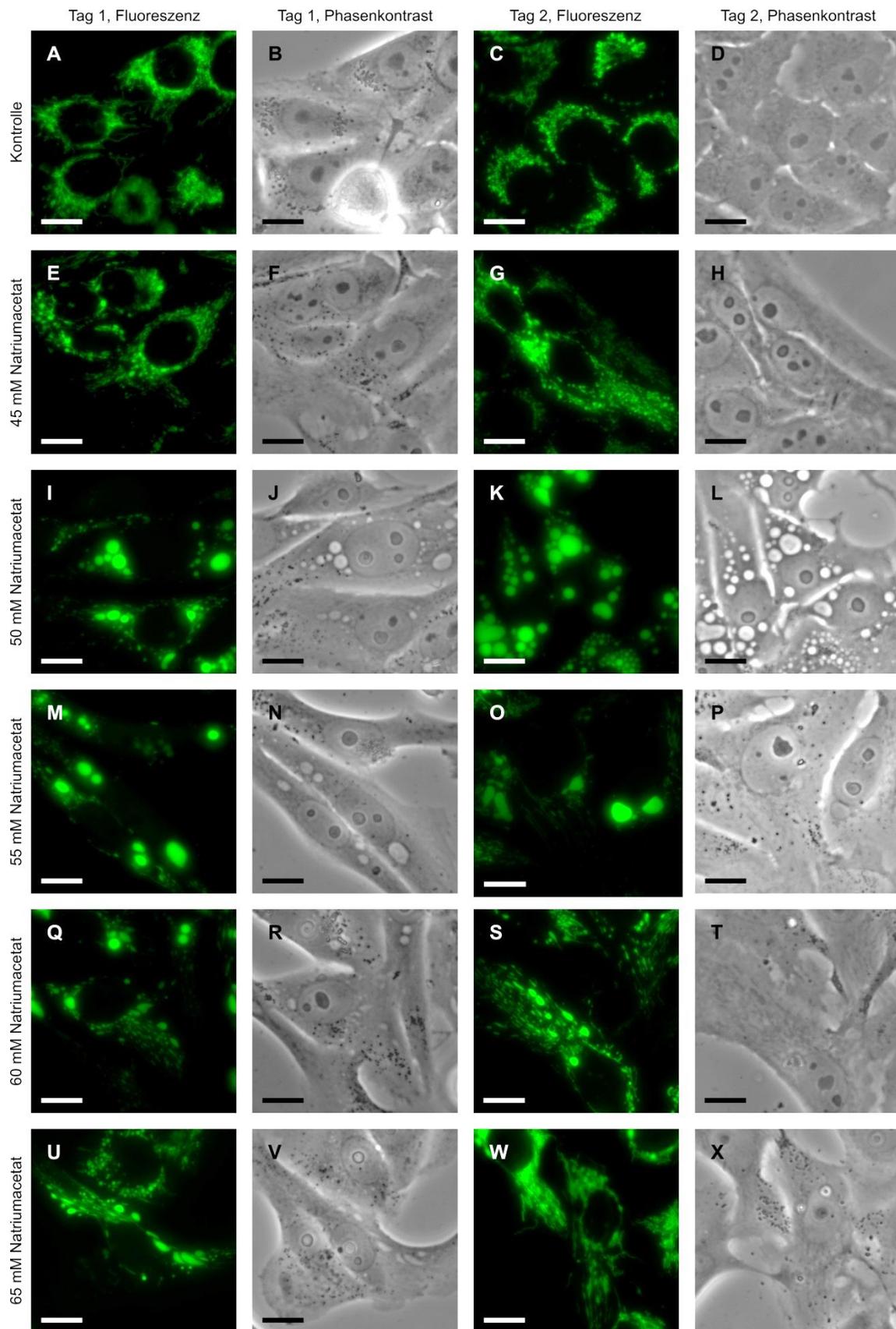


Abb. 4-27: Induktion von Megamitochondrien durch Natriumacetat

Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von mit Natriumacetat induzierten Riesenmitochondrien in der mit pEGFP-Mito transfizierten Zelllinie 143B.TK. Die Eichstriche entsprechen 10µm.

Ergebnisse

Am zweiten Tag war das Kulturmedium der Kontrollzellen leicht orangefarbig und auch die Mitochondrien bildeten kein Netzwerk mehr, sondern lagen fast punktförmig vor (Abb. 4-27, C+D). Bei 45, 55, 60 und 65mM zeigten sich nahezu keine Veränderungen zum Vortag (Abb. 4-27, G+H, O+P, S+T und W+X), während die Mitochondrien der Zellen in 50 mM Natriumacetat nun nur noch als Kugeln mit bis zu 6 μm Größe vorlagen (Abb. 4-27, K+L). In weiteren Versuchsreihen stellte sich heraus, dass die optimale Konzentration bei jeder neuen Kulturmedium- und FCS-Charge neu zu bestimmen war; sie lag aber meist zwischen 50 und 60 mM Natriumacetat.

Bei einigen Versuchen konnte ein Anschwellen der Mitochondrien bis fast auf die Größe des Zellkerns erzielt werden. In Abb. 4-28 sind solche riesigen Mitochondrien zu sehen (Pfeile bei A und D). Bei der hier verwendeten Zelllinie handelte es sich wiederum um die Zelllinie 143B.TK⁻, die stabil mit pEGFP-OMP (2.4.5) transfiziert wurde und bei der deshalb die äußere Mitochondrienmembran angefärbt war.

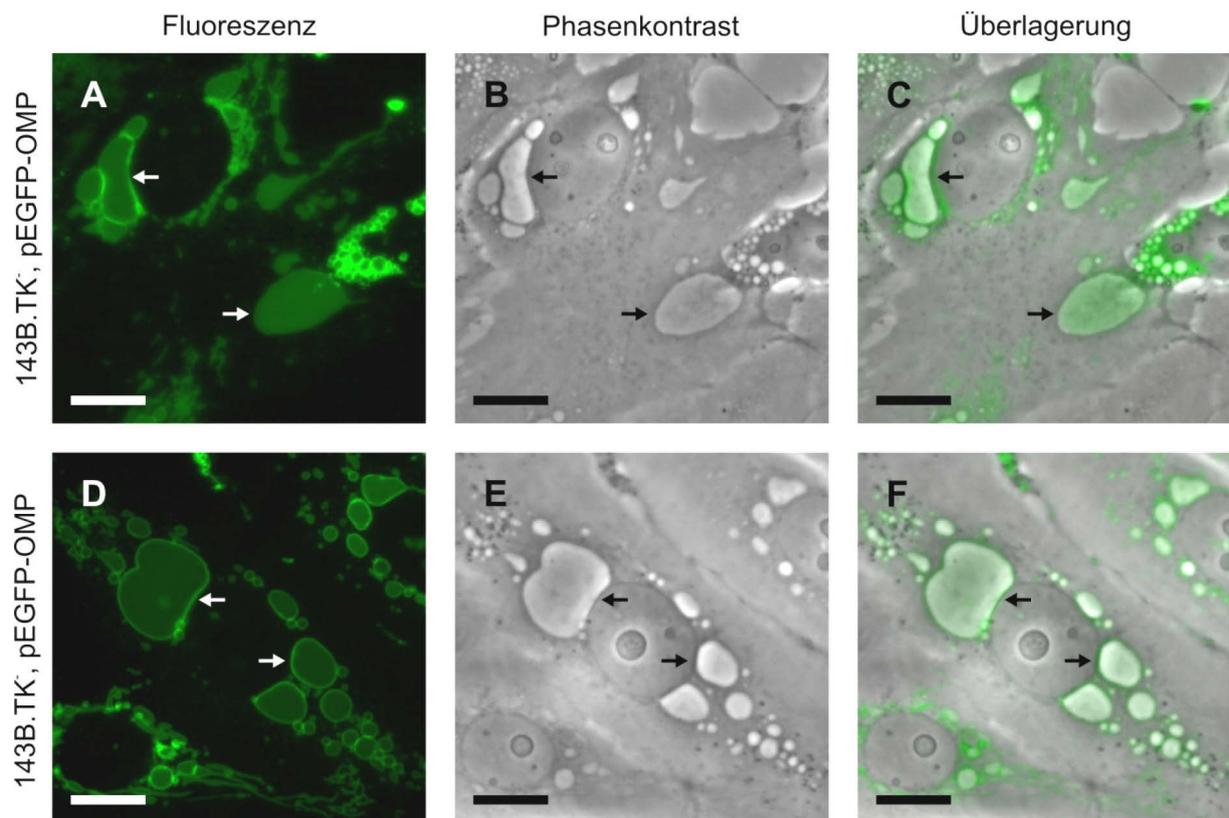


Abb. 4-28: Megamitochondrien

Aufnahmen der mit pEGFP-OMP stabil transfizierten Zelllinie 143B.TK⁻. Riesenmitochondrien sind mit Pfeilen markiert. A+D: Fluoreszenzaufnahmen, B+E: Phasenkontrastaufnahmen, C+F: Überlagerung von A und B bzw. D und E. Die Eichstriche entsprechen 10 μm .

4.3.2. Induktion mit Essigsäure

Für die Induktion der Megamitochondrien wurde das Kulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen (25-40 mM) Essigsäure versetzt und anschließend in ihm 2×10^5 bis 3×10^5 Zellen der mit pEGFP-Mito (2.4.3) transfizierten Zelllinie 143B.TK⁻ in 30 mm Glasbodenschalen weiterkultiviert. Nach einem und einem weiteren Tag erfolgte eine Untersuchung am Mikroskop.

Die Zellen in 40 mM Essigsäure waren schon am ersten Tag abgestorben, während die anderen Konzentrationen keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zelllinie zeigten. Wie erwartet zeigten die Zellen der Kontrolle ein fadenförmiges Mitochondriennetzwerk (Abb. 4-29, A+B), während die Zellen bei den beiden niedrigen Essigsäurekonzentrationen bis 1 μm durchmessende Verdickungen des Netzwerks aufwiesen (Abb. 4-29, F+G und J+K). Bei der 35 mM Essigsäure konnten zusätzlich auch einzelne Mitochondrien mit einem Durchmesser von bis zu 5 μm entdeckt werden (Abb. 4-29, M+N).

Am Tag 2 zeigten sich bei der Kontrolle und der Zelllinie in 25 mM Essigsäure keine nennenswerten Veränderungen (Abb. 4-29, C+D und G+H), bei den Mitochondrien der Zellen in 30 mM Essigsäure wurden vereinzelt Durchmesser von 4 μm gemessen (Abb. 4-29, K+L). Die Zellen mit der höchsten Konzentration Essigsäure konnten gegenüber dem Vortag noch einmal vergrößerte Riesenmitochondrien vorweisen, die zum Teil 7 μm durchmaßen. Gleichzeitig war in einigen Zellen immer noch ein schlauchförmiges Netzwerk zu erkennen (Abb. 4-29, O+P).

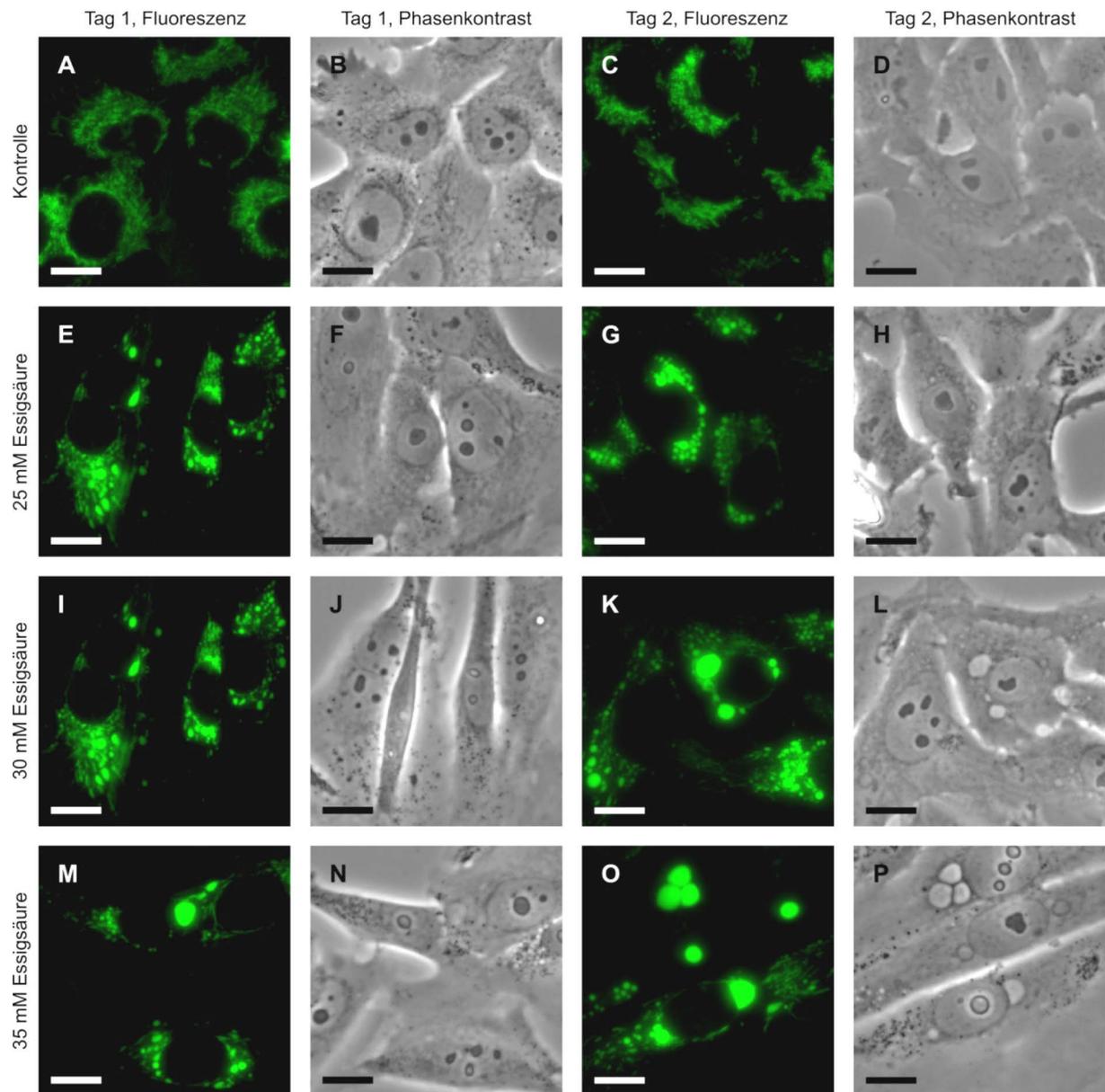


Abb. 4-29: Induktion von Megamitochondrien durch Essigsäure

Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von mit Essigsäure induzierten Riesenmitochondrien in der mit pEGFP-Mito transfizierten Zelllinie 143B.TK⁻. Die Eichstriche entsprechen 10µm.

4.3.3. Morphologieänderung bei Megamitochondrien

Die mit Natriumacetat induzierten Megamitochondrien zeigten bei einigen Versuchen größere Formveränderungen in kurzer Zeit. Diese morphologische Dynamik konnte besonders bei Mitochondrien beobachtet werden, die in „relaxierter“ Form vorlagen und somit keine prall gefüllten Kugeln bildeten. In Abb. 4-30 sind die Mitochondrien einer mit pEGFP-OMP (2.4.5) transfizierten 143B.TK⁻-Zelle dargestellt (A-C). Die Morphologieänderungen der

Mitochondrien innerhalb des Ausschnitts aus der Phasenkontrastaufnahme sind über einen Zeitraum von rund 40 Minuten in der Teilabbildung D zu sehen. Zwischen den einzelnen Bildern liegen allerdings keine konstanten Zeitabstände. Wie man gut erkennen kann, kommt es zu Fusionen und Fissionen sowie allgemeinen Formveränderungen.

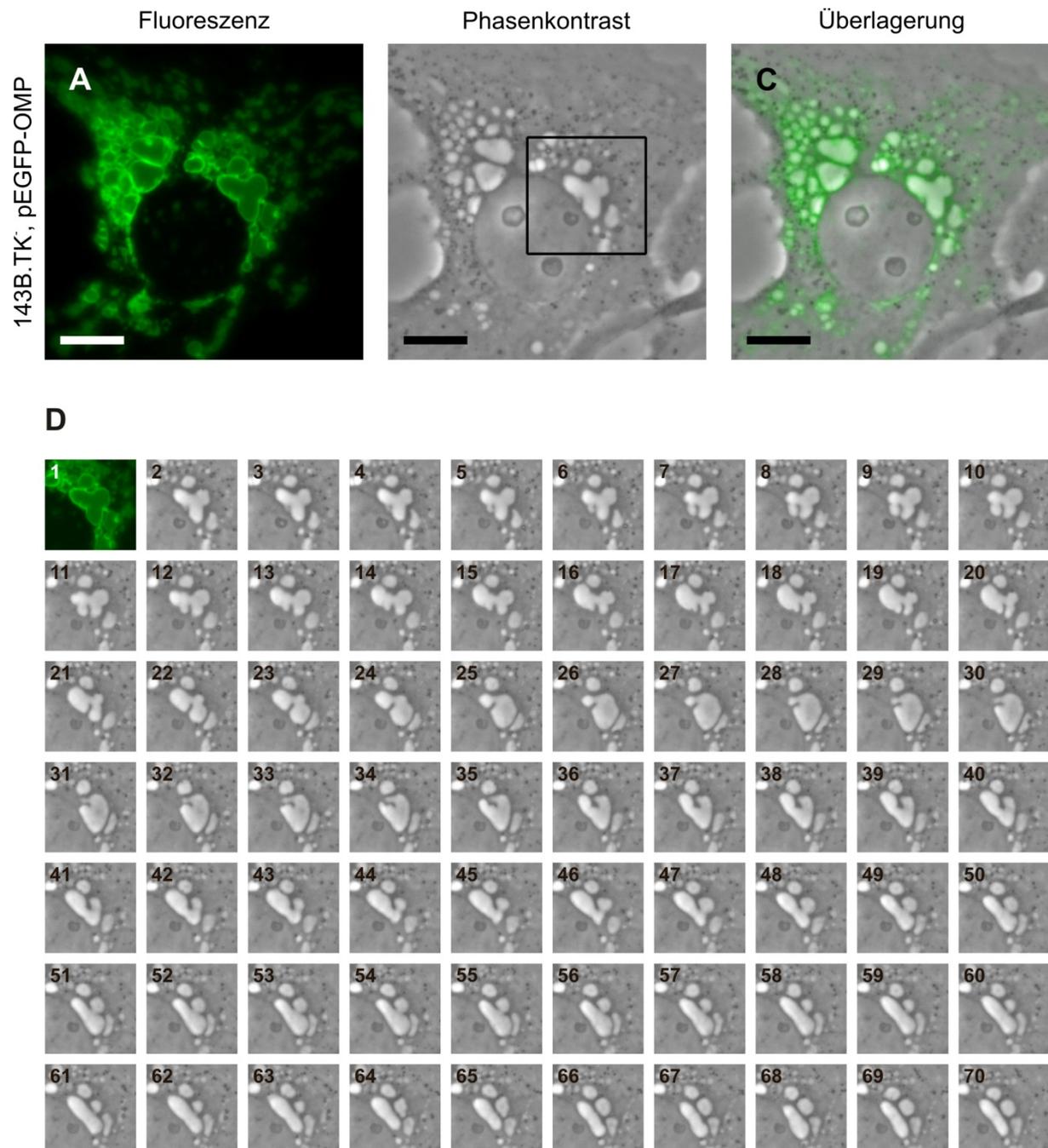


Abb. 4-30: Morphologieänderungen bei Megamitochondrien

Änderungen der Mitochondrienmorphologie in mit pEGFP-OMP transfizierten 143B.TK-Zellen. A: Fluoreszenzaufnahme der gesamten Zelle, B: Phasenkontrastaufnahme, C: Überlagerung von A und B. D: Zeitreihe des Ausschnitts von B über 40 Minuten. Die Eichstriche entsprechen 10 μ m.

4.4. Methoden zur Transfektion von Mitochondrien mit Plasmid-DNA

Da bisher keine Methoden für die Transfektion von Mitochondrien mit Plasmid-DNA in Säugerzellen bekannt sind, wurden die unterschiedlichsten Methoden ausprobiert: das Beschießen der Zellen mit DNA-beschichteten Goldpartikeln in der *Gene Gun*, die Transfektion mit Hilfe magnetischer Partikel und die Mikroinjektion. Alle diese Methoden haben gemein, dass bei ihnen die Mitochondrienmembranen mechanisch überwunden werden, um die Plasmid-DNA in die Matrix zu transportieren.

4.4.1. Partikelbeschuss mit der *Gene Gun*

Bei der *Gene Gun* handelt es sich um ein biolistisches Verfahren zur Einbringung von Nukleinsäuren und anderen Substanzen in Zellen mit Hilfe von Gold- oder Wolframpartikeln. Diese Methode wird häufig bei der Transfektion von Pflanzenzellen, insbesondere der darin enthaltenden Plastiden, sowie bei Hefen und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet (Boynton *et al.*, 1988; Kanevski und Maliga, 1994; Butow *et al.*, 1996). In seltenen Fällen wird dieses Verfahren auch bei tierischen Kulturzellen eingesetzt. Jedoch hat es hier nur eine geringe Bedeutung, da für diese Zellen eine Vielzahl von Transfektionsmethoden existieren, die meist auch eine höhere Effizienz aufweisen. Allerdings werden oft lebende Mäuse mit Hilfe der *Gene Gun* immunisiert, indem mit Antigenen beladene Partikel durch deren Haut geschossen werden.

4.4.1.1. Bestimmung der Durchführungsbedingungen

Bisher gibt es keine Berichte über die Transfektion von Säugermitochondrien, jedoch wurden bereits Plastiden in Pflanzenzellen sowie die Mitochondrien in Hefen mit der *Gene Gun* transfiziert. Da diese jedoch in ihrer Größe und Beschaffenheit nur schlecht mit Säugermitochondrien zu vergleichen sind, mussten die Durchführungsbedingungen erst experimentell bestimmt werden. Um die Variablen einzugrenzen, wurde ein Vergleich zu der zytoplasmatischen Transfektion der später verwendeten Zelllinie 143B.TK⁻ angestellt.

In ersten Vorversuchen wurde das Streuverhalten der Partikel in Abhängigkeit von der verwendeten Einschubebene (A-D) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass bei Nutzung der

untersten Ebene (D) viele Goldpartikel über den Rand der verwendeten 35-mm-Kulturschalen hinaus verteilt wurden. Ein Einsetzen des Kulturschalenträgers auf der obersten Ebene (A) direkt unterhalb des Macrocarrier-Halters mündete in einem Trefferbild, bei dem nur eine rund einen cm durchmessende kreisförmige Region in der Mitte der Schale von den Goldpartikeln getroffen wurde. In dieser Region lagen die Partikel so dicht aneinander, dass dort - entweder durch den plötzlich einwirkenden Heliumstrahl oder direkt durch den Aufschlag der Partikel - keine Zellen mehr zu finden waren. Bei der nächsten darunterliegenden Ebene (B) konnte ein ähnlicher, jedoch abgeschwächter Effekt beobachtet werden: Die Goldpartikel konnten nur in einem ungefähr zwei cm durchmessenden Bereich gefunden werden und auch hier zeigte sich, dass ein großer Teil der Zellen innerhalb dieser Region abgelöst bzw. zerstört wurden. Bei der Verwendung der zweituntersten Ebene (C) war der Anteil an abgelösten Zellen viel niedriger und die Goldpartikel zeigten ein homogeneres Verteilungsmuster über fast die gesamte Fläche der Kulturschale. Jedoch konnte auch in der Schalenmitte weiterhin ein kleiner Bereich ausgemacht werden, bei dem die Goldpartikel in einer relativ hohen Konzentration zu finden waren. Da hier die besten Ergebnisse bezüglich der Partikelverteilung und der Überlebensrate der Zellen erzielt werden konnten, wurden alle folgenden Versuche mit Kulturschalen auf dieser Ebene durchgeführt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Optimierung der Kombination aus angelegtem Unterdruck (in *in Hg, inches of mercury*) und der verwendeten *Rupture Disk*-Drücke (in *psi, pounds per square inch*). Dafür wurden je zwei 35 mm-Kulturschalen mit Zellen (ca. 40-60% Konfluenz) mit je 600 µg der 0,6 µm durchmessenden Goldpartikel beschossen, die vorher mit 600 ng des Plasmids pEGFP-N1 (2.4.4) beschichtet wurden. Zum Vergleich der Transfektionsrate mit herkömmlichen Methoden erfolgte zusätzlich eine Transfektion einer Kulturschale mit dem Reagenz FuGENE® HD. Nachdem alle Kombinationen aus 15, 20, 25 und 27 in Hg Unterdruck und den *Rupture Disks* für 1350, 1550, 1800 und 2000 psi angewendet wurden, erfolgte am nächsten Tag die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop. Es wurden jeweils mehrere Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen angefertigt und anschließend mit ihnen die transfizierten sowie die Gesamtzahl der Zellen durch Auszählen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Zählung und die daraus errechneten Transfektionsraten sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Ergebnisse

Versuchsbedingungen (<i>Rupture Disk</i> /Unterdruck)	Gesamtzahl der Zellen	Anzahl transfizierter Zellen	Transfektionsrate
1350 psi / 15 in Hg	13534	3	0,022%
1550 psi / 15 in Hg	13038	4	0,031%
1800 psi / 15 in Hg	13700	5	0,036%
2000 psi / 15 in Hg	13886	7	0,050%
1350 psi / 20 in Hg	19014	12	0,063%
1550 psi / 20 in Hg	21808	16	0,073%
1800 psi / 20 in Hg	18730	16	0,085%
2000 psi / 20 in Hg	18828	9	0,048%
1350 psi / 25 in Hg	15492	23	0,148%
1550 psi / 25 in Hg	14560	65	0,446%
1800 psi / 25 in Hg	20572	95	0,462%
2000 psi / 25 in Hg	17810	61	0,343%
1350 psi / 27 in Hg	2888	85	2,94%
1550 psi / 27 in Hg	2179	140	6,42%
1800 psi / 27 in Hg	3846	310	8,06%
2000 psi / 27 in Hg	3348	127	3,79%
FuGENE [®] HD	20102	4372	24,7%

Tab. 4-2: Bestimmung der Transfektionsrate unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Bei dem Kammervakuum von 15 in Hg konnten nur vereinzelt transfizierte Zellen gefunden werden (Abb. 4-31, A-D). Die Transfektionsraten erreichten dementsprechend nur sehr niedrige Werte, die sich mit steigendem Schussdruck von 0,022 auf 0,050% erhöhten. Die Steigerung des Kammervakuums auf 20 in Hg brachte nur wenig Besserung: Die Transfektionsraten schwankten zwischen 0,048 und 0,085%, was auch auf den entsprechenden Aufnahmen (Abb. 4-31, M-P) anhand weniger Transfektanten zu sehen war. Erneut zeigte sich, dass sich die Transfektionsrate mit steigendem Druck erhöhte, jedoch bei Verwendung der stärksten *Rupture Disks* (2000 psi) auf den niedrigsten Wert absank.

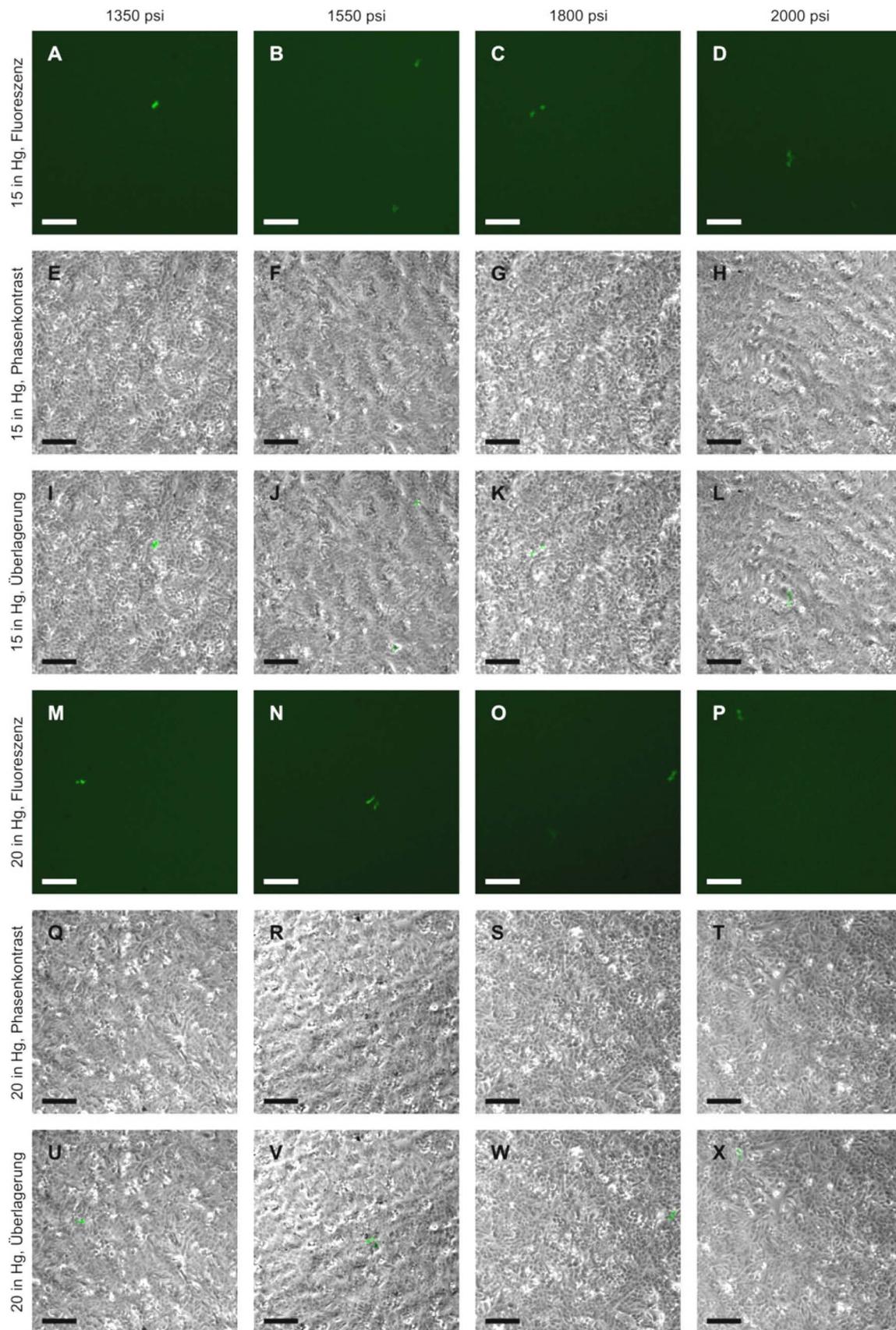


Abb. 4-31: Optimierung der Versuchsparameter zur Nutzung der *Gene Gun*, 15 und 20 in Hg
 A-D bzw. M-P: Fluoreszenzaufnahmen der Zelllinie 143B.TK, E-H bzw. Q-T: Phasenkontrastaufnahmen, I-L
 bzw. U-X: Überlagerung aus Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen. Die Eichstriche entsprechen 100 μm .

Ergebnisse

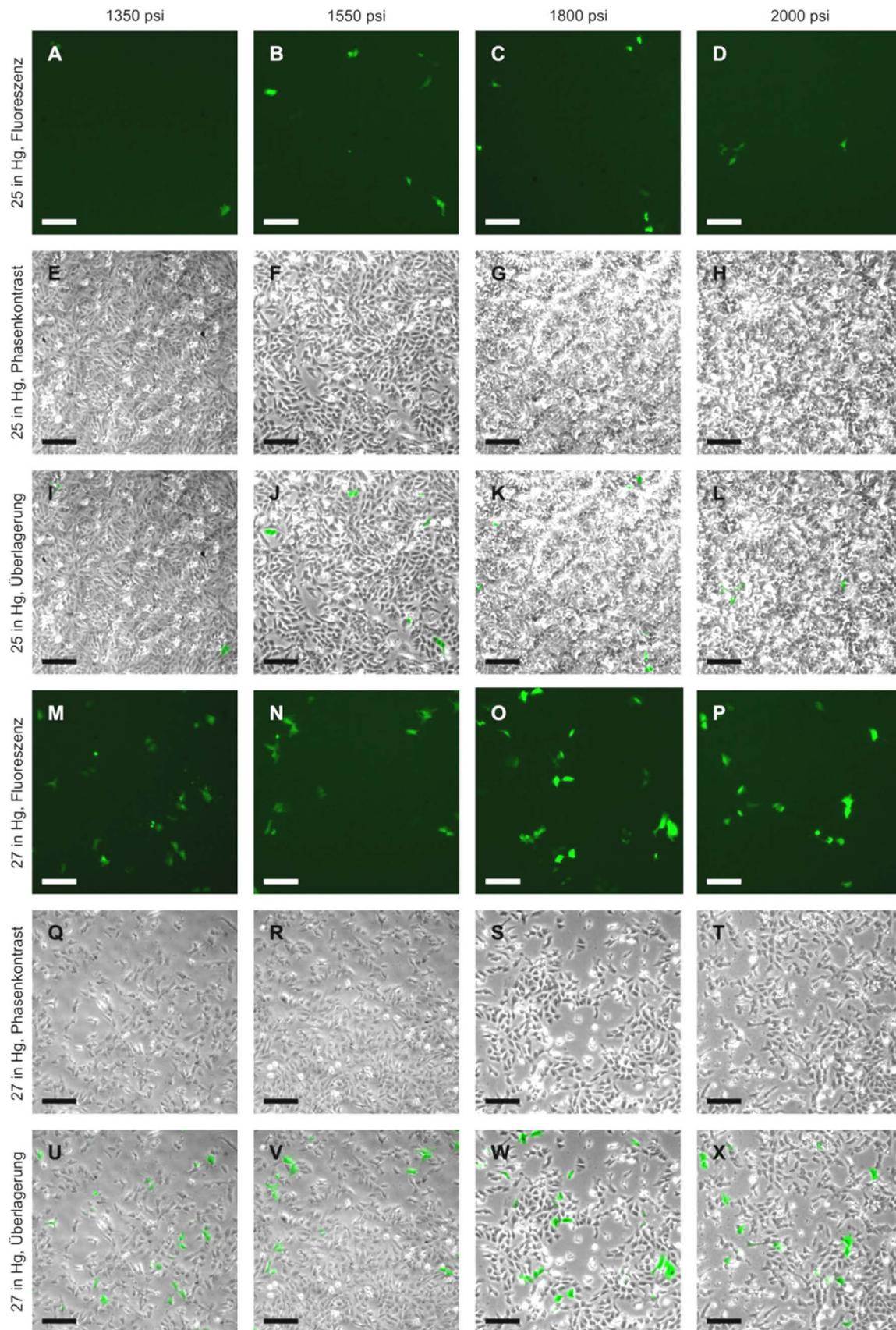


Abb. 4-32: Optimierung der Versuchsparameter zur Nutzung der *Gene Gun*, 25 und 27 in Hg
 A-D bzw. M-P: Fluoreszenzaufnahmen der Zelllinie 143B.TK, E-H bzw. Q-T: Phasenkontrastaufnahmen, I-L bzw. U-X: Überlagerung aus Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen. Die Eichstriche entsprechen 100 µm.

Bei 25 in Hg Kammervakuum waren auf den Fluoreszenzaufnahmen vermehrt grün leuchtende Zellen zu erkennen (Abb. 4-32, A-D) und auch die Transfektionsrate stieg dementsprechend auf bis zu 0,462% bei 1800 psi Schussdruck an. Durch die Verwendung des höchsten Kammervakuums von 27 in Hg konnte die Transfektionsrate nochmals um ungefähr Faktor 20 erhöht werden: Es wurden Werte zwischen 2,94% bei Verwendung von *Rupture Disks* für 1350 psi und 8,06% bei 1800 psi-*Rupture Disks* erzielt. Dies konnte auch durch die Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen bestätigt werden (Abb. 4-32, M-P).

Im Vergleich dazu lieferte der Einsatz des Transfektionsreagenz FuGENE[®] HD eine nochmals 3-fach erhöhte Transfektionsrate von 24,7% (vgl. Abb. 4-33).

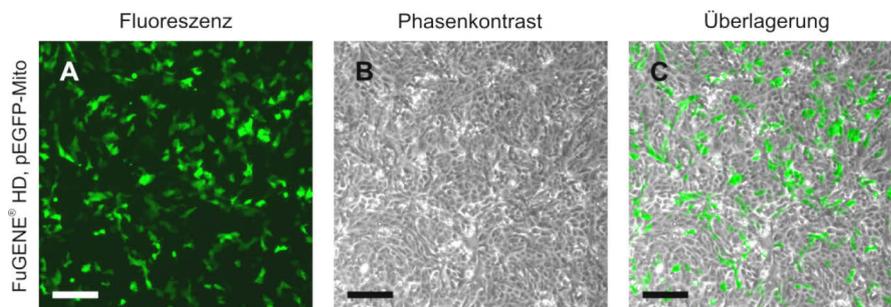


Abb. 4-33: Vergleichs-Transfektionsrate von FuGENE[®] HD
Die Eichstriche entsprechen 100 μ m.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Transfektionsversuche an der *Gene Gun* mit den folgenden Parametern durchgeführt:

- Nutzung der zweiten Ebene von unten
- Kammervakuum von 27 in Hg
- Verwendung von *Rupture Disks* für 1800 psi

4.4.1.2. Induktion von Megamitochondrien

Da Mitochondrien nur einen Durchmesser von 0,5-1 μm aufweisen, ist es nahezu unmöglich, sie in lebenden Zellen mit Goldpartikeln von 0,6 μm so zu treffen, dass die DNA auf den Goldpartikeln die Mitochondrienmatrix erreicht.

Zu Beginn wurde ausgetestet, welche Methode am besten geeignet ist, um Megamitochondrien vor den Transfektionsversuchen mit der *Gene Gun* zu induzieren. Dazu wurde die stabile Zelllinie 143B.TK⁻+pEGFP-Mito, die grüne Mitochondrien besitzt, über einen Tag zum einen in mit Milchsäure auf einen pH-Wert von 6,3 eingestelltem Kulturmedium und zum anderen mit Kulturmedium, das 10 μM Valinomycin enthielt, kultiviert. Als Kontrolle wurde dieselbe Zelllinie in unverändertem Kulturmedium mitgeführt. Nach einer, zwei, fünf und 24 Stunden erfolgte eine Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop. Die Mitochondrien in der Kontrollzelllinie zeigten in den ersten fünf Stunden keine Morphologieänderungen - sie bildeten ein Netzwerk ohne nennenswerte Verdickungen (Abb. 4-34, A-C). Nach einem Tag jedoch war das Kulturmedium leicht orange gefärbt und einige der Mitochondrien waren kugelförmig angeschwollen bzw. verdickt (Abb. 4-34, D). Bei der mit Milchsäure behandelten Zelllinie war nach einer Stunde das gesamte mitochondriale Netzwerk aufgelöst und es konnten nur noch kugelförmige Mitochondrien erkannt werden, die zum Teil schon eine Vergrößerung zeigten (Abb. 4-34, E). In den folgenden Stunden und am nächsten Tag konnte eine weitere Größenzunahme festgestellt werden, so dass die Megamitochondrien sehr deutlich zu sehen waren (Abb. 4-34, F-H). Die Zugabe von Valinomycin induzierte ebenfalls schon nach einer Stunde kugelförmige Mitochondrien, die allerdings etwas größer als im Milchsäuremedium waren, was auch nach zwei Stunden der Fall war (Abb. 4-34, I+J). Nach fünf bzw. 24 Stunden konnten nahezu keine Unterschiede in der Mitochondriengröße zwischen den Versuchsreihen festgestellt werden (Abb. 4-34, K+L).

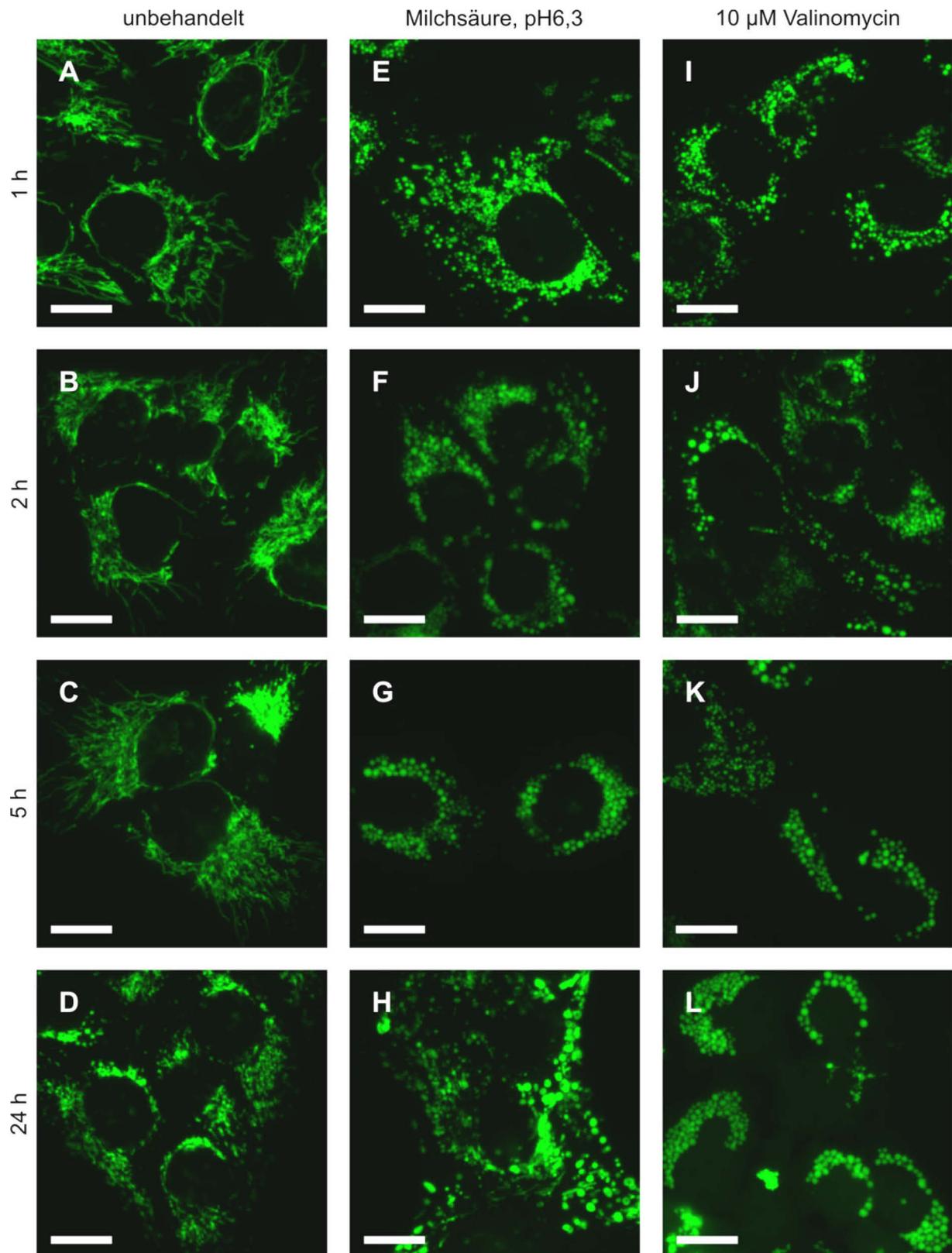


Abb. 4-34: Induktion von Megamitochondrien durch Milchsäuremedium bzw. Zugabe von Valinomycin
 Fluoreszenzaufnahmen, A-D: 143B.TK⁺pEGFP-Mito in normalem Kulturmedium, E-H: 143B.TK⁺pEGFP-Mito in mit Milchsäure auf einen pH-Wert von 6,3 eingestelltem Kulturmedium, I-L: 143B.TK⁺pEGFP-Mito in Kulturmedium mit 10 μ M Valinomycin. Die Eichstriche entsprechen 100 μ m.

Ergebnisse

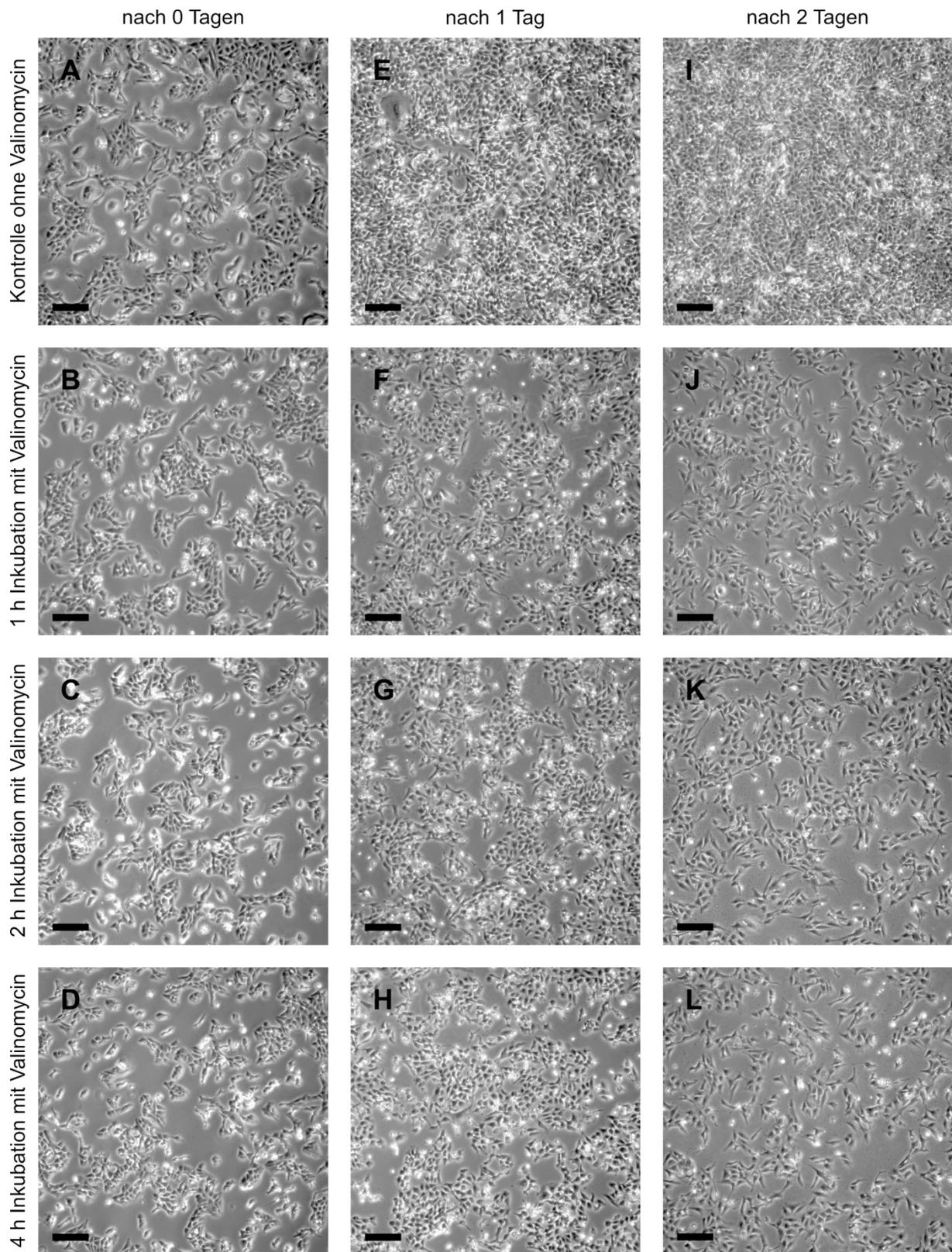


Abb. 4-35: Wachstumshemmung durch Behandlung mit Valinomycin

Phasenkontrastaufnahmen, A-C: 143B.TK⁻ ohne Valinomycinbehandlung, D-F: 143B.TK⁻ nach einstündiger Valinomycinbehandlung, G-I: 143B.TK⁻ nach zweistündiger Valinomycinbehandlung, J-L: 143B.TK⁻ nach vierstündiger Valinomycinbehandlung. Die Eichstriche entsprechen 100 µm.

Bei der Beobachtung der mit Valinomycin behandelten Zelllinie fiel auf, dass sich die Zellen nach 24 Stunden nahezu nicht vermehrt hatten. Da dies zu Problemen bei der folgenden Transfektion führen konnte, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Zelllinie 143B.TK⁻ für eine, zwei und vier Stunden in Kulturmedium mit 10 μ M Valinomycin inkubiert wurde. Als Kontrolle diente dieselbe Zelllinie in Valinomycin-freiem Medium. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal für 10 Minuten in normalem Kulturmedium gewaschen, um das Valinomycin zu entfernen. Im Anschluss an die Waschschriffe erfolgten Aufnahmen am Mikroskop, um die Ausgangsdichte der Zellen zu dokumentieren (Abb. 4-35, A-D). An den zwei folgenden Tagen wurden erneut Aufnahmen angefertigt. Dabei zeigte sich, dass sich unabhängig von der Inkubationsdauer alle mit Valinomycin behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen nahezu nicht mehr teilten (Abb. 4-35, E-H). Die Aufnahmen vom zweiten Tag nach der Inkubation zeigten sogar eine Abnahme der Zelldichte, was den Schluss zuließ, dass einige Zellen nach der Valinomycinbehandlung abstarben (Abb. 4-35, I-L). Die schnelle Induktion von Megamitochondrien durch Valinomycin wäre wünschenswert, aber aufgrund dieser Beobachtungen wurde von der Induktion von Megamitochondrien durch die Zugabe von Valinomycin zum Kulturmedium abgesehen, da nicht bekannt war, ob dadurch das Transfektionsergebnis beeinflusst werden könnte.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob die Dauer der Inkubation in angesäuertem Medium einen Einfluss auf die anschließende Transfektion mit der *Gene Gun* hat. Dabei zeigte sich, dass eine Inkubation für mehr als zwei Stunden zu einem verstärkten Ablösen der Zellen beim Beschuss mit Goldpartikeln führte. Aus diesem Grund wurden die Zellen bei den folgenden Versuchen ungefähr 60 bis 120 Minuten vor Versuchsbeginn mit Milchsäure-Medium behandelt.

Nach dieser Zeit waren die vergrößerten Mitochondrien bereits im Phasenkontrast sichtbar (Abb. 4-36, A+B). Nach fünf Stunden Inkubation waren diese - wie nach den Ergebnissen der vorigen Versuchsreihe erwartet - noch besser sichtbar (Abb. 4-36, C).

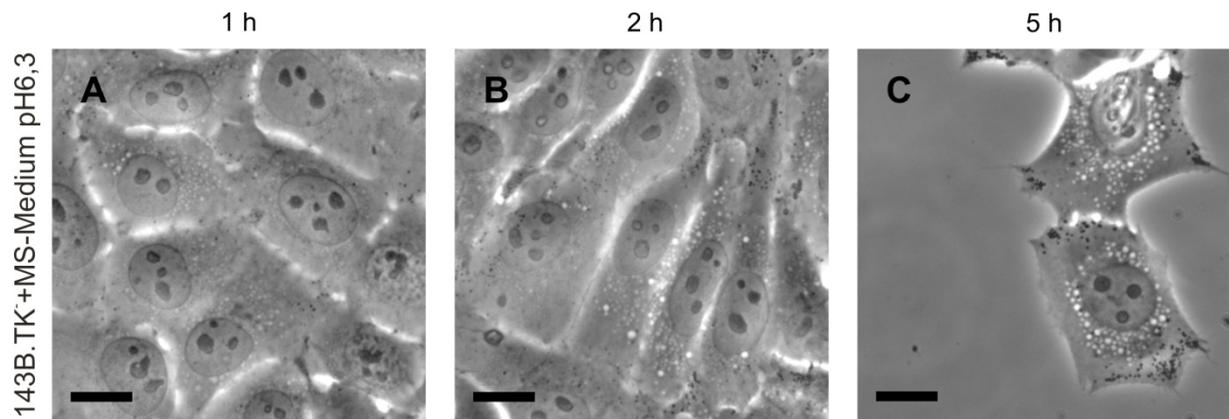


Abb. 4-36: Sichtbarkeit der Megamitochondrien im Phasenkontrast

Phasenkontrastaufnahmen von 143B.TK⁻ in mit Milchsäure auf einen pH-Wert von 6,3 eingestelltem Kulturmedium. Die Eichstriche entsprechen 10 μm .

4.4.1.3. Transfektion mit mtDNA

Zu Beginn wurde pro Transfektionsansatz 1 μg einer Cäsiumchloridgradienten-gereinigten mtDNA mit 0,5 μg Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 0,6 μm verwendet. Schon beim Beschichten der Goldpartikel zeigte sich eine starke Aggregatbildung, die nach dem Beschuss der ρ^0 -Zelllinie 143B.TK⁻ K7 auch lichtmikroskopisch auf der Kulturplatte nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu mit dem Plasmid pMAG13-1 beschichteten Goldpartikeln (Abb. 4-37, A) war bei der Verwendung von mtDNA deutlich eine Bildung großer Aggregate zu erkennen (Abb. 4-37, Pfeile bei B+C). Die Verteilung der Goldpartikel beschränkte sich größtenteils auf einen 1-1,5 cm durchmessenden Bereich in der Mitte der Kulturschale, in dem sich auch die Zellen sehr stark ablösten. Um diese vermutlich DNA-abhängige Aggregatbildung zu reduzieren, wurde die Menge der mtDNA auf 0,5 μg pro Transfektionsansatz verringert, wodurch tatsächlich eine leichte Besserung auftrat. Zusätzlich wurden auch Goldpartikel mit 1,0 bzw. 1,6 μm Durchmesser ausgetestet. Auch hier konnte eine weitere leichte Verringerung der Aggregation festgestellt werden. Aufgrund dieser Resultate erfolgten je 18 Transfektionen mit 0,5 μg mtDNA und 0,5 μg Goldpartikeln mit den drei aufgeführten Durchmessern. Die Zellen wurden nach einer eintägigen Kultivierung in ρ^0 -Medium auf 150-mm-Kulturschalen umgesetzt und in ρ^0 -Selektionsmedium weiterkultiviert. Nach jeweils drei bis vier Wochen konnten jedoch keine lebenden Klone gefunden werden.

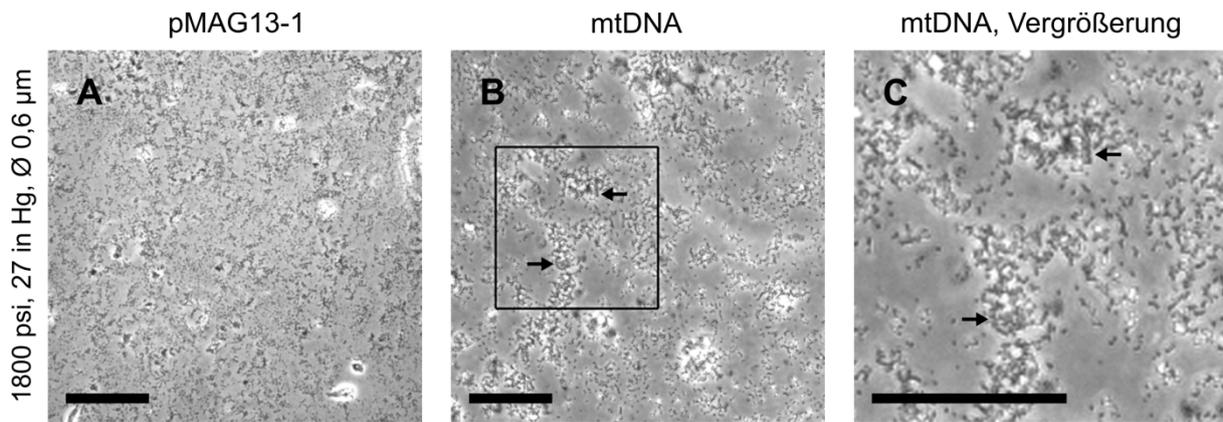


Abb. 4-37: Aggregation der Goldpartikel durch mtDNA

Phasenkontrastaufnahmen von Goldpartikeln nach dem Beschuss einer Kulturschale. A: mit pMAG13-1 beschichtete Goldpartikel als Kontrolle, B: mit mtDNA beschichtete Goldpartikel, C: Vergrößerung von B. Die Eichstriche entsprechen 30 µm.

4.4.1.4. Transfektion mit mitochondrialen Expressionsvektoren

Vor Beginn der jeweiligen Versuchsreihen wurden je fünf 35-mm-Kulturschalen mit dem verwendeten Plasmid und dem Transfektionsreagenz FuGENE® HD transfiziert, um eine Kontamination der DNA-Präparation mit anderen EGFP-exprimierenden Vektoren ausschließen zu können. Wenn am nächsten Tag keine grün fluoreszierenden Zellen gefunden wurden, konnte die DNA-Präparation für die Transfektionsversuche mit der *Gene Gun* eingesetzt werden.

Pro Transfektionsansatz wurden 1 µg des jeweiligen Plasmids und 0,5 µg Goldpartikel mit dem Durchmesser von 0,6 µm verwendet. Damit die Zellen nach 1,5-2 Tagen noch gut beobachtet werden konnten, wurden Kulturschalen verwendet, bei denen die Zellen ungefähr eine Konfluenz von 50-60% aufwiesen. Zur Auswertung wurde jede Schale am übernächsten Tag vollständig am Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung gründlich auf Fluoreszenzsignale abgesucht. Da unbekannt war, wie stark die Expression des mtEGFP-Gens war, wurde die Zeitspanne bis zur Beobachtung absichtlich so groß gewählt.

Zu Beginn wurde das Plasmid pMAG12-1 verwendet, mit dem insgesamt 66 Kulturschalen mit der Zelllinie 143B.TK⁻ behandelt wurden. Allerdings konnten keine Zellen mit fluoreszierenden Mitochondrien gefunden werden. Mit der Fertigstellung des Plasmids pMAG13-1 wurden die Transfektionsversuche mit pMAG12-1 eingestellt.

Ergebnisse

Der Vektor pMAG13-1 enthielt zusätzlich noch einen Replikationsursprung für den L-Strang, so dass eine Vermehrung innerhalb der Mitochondrien stattfinden konnte und somit eine Verstärkung der Expression möglich war. Das Plasmid wurde mit den gleichen Bedingungen wie sein Vorgänger pMAG12-1 für die Transfektionsversuche eingesetzt. Es kam wiederum die Zelllinie 143B.TK⁻ zum Einsatz, welche 96-mal behandelt wurde. Beim Absuchen der Platten konnten sehr schwache Fluoreszenzsignale entdeckt werden, die nach dem Vergleich mit dem entsprechenden Phasenkontrastbild eine Lokalisierung der Signale in den Mitochondrien der Zelle ergaben (Abb. 4-38). Zwei Tage später konnten die Zellen jedoch nicht mehr aufgefunden werden.

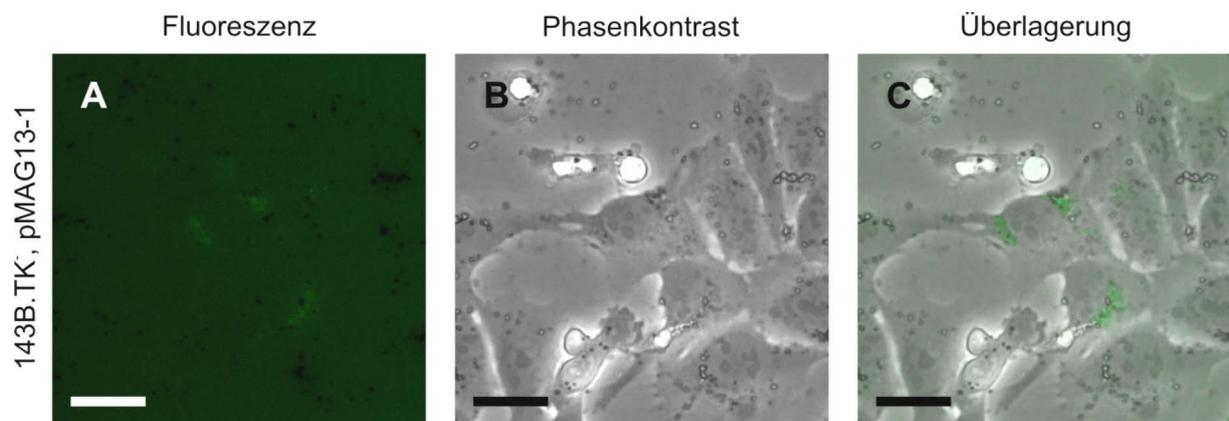


Abb. 4-38: Fluoreszierende Mitochondrien nach *Gene Gun*-Beschuss mit pMAG13-1

A: Fluoreszenzaufnahme (verstärkt) der Zellen, B: Phasenkontrastaufnahme der Zellen, C: Überlagerung von A und B. Die Eichstriche entsprechen 20 μm .

Um die Zellen bzw. ihre Mitochondrien einem Selektionsdruck für die eingebrachten Plasmide zu unterwerfen, wurde ein weiterer mitochondrialer Expressionsvektor eingesetzt: Bei dem Plasmid pMAG14-1 war zusätzlich zu den Genen des Plasmids pMAG13-1 noch ein 16S rRNA-Gen integriert, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol vermittelt.

Nach der Behandlung von 72 Schalen der Zelllinie 143B.TK⁻ konnten keine fluoreszierenden Mitochondrien gefunden werden. Die gleichzeitige Zugabe von Chloramphenicol in das Kulturmedium erlaubte die Nutzung einer zusätzlichen Screeningmethode, die mit der Selektion von mit mtDNA transfizierten ρ^0 -Zellen (4.4.1.3) übereinstimmte. Die Zellen wurden jeweils auf 150-mm-Schalen umgesetzt und nach zwei bis drei Wochen Kultivierung

im Selektionsmedium mit Chloramphenicol auf Klone hin untersucht. Allerdings konnten auch mit dieser Methode keine Transfektanten nachgewiesen werden.

Um die Expression des mtEGFP noch zu verstärken, wurden daraufhin Vektoren entwickelt, bei denen das mtEGFP-Gen durch die hochprozessive T7-RNA-Polymerase transkribiert werden sollte. In einem ersten Schritt wurde versucht, das Plasmid pCRII-TOPO-mtEGFP mit der *Gene Gun* in Zellen zu transfizieren, die die T7-RNA-Polymerase mit einer N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz im Kern exprimierten (4.2). Bei einer geglückten Transfektion würde somit die in die Mitochondrien importierte T7-RNA-Polymerase das mtEGFP-Gen auf dem Plasmid transkribieren und ein Fluoreszenzsignal wäre sichtbar.

Das Plasmid wurde entsprechend der bisher verwendeten mitochondrialen Expressionsplasmide in 60 Transfektionsversuchen eingesetzt, jedoch konnten auch hier keine transfizierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop gefunden werden.

Anschließend wurden die Plasmide pMAG17-1 und pMAG14-3 bei den Transfektionsversuchen eingesetzt, die beide das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des mitochondrialen H-Strang-Promotors enthielten. Bei diesen beiden Plasmiden zeigte sich - ähnlich wie bei den Transfektionsversuchen mit der mitochondrialen DNA (4.4.1.3) - eine Aggregation der Goldpartikel, die aber nicht so stark war und durch die Reduktion der pro Versuch eingesetzten DNA-Menge vollständig verhindert werden konnte. Dementsprechend wurden nur 0,5 µg Plasmid-DNA auf 0,5 µg Goldpartikel eingesetzt.

Nachdem 78 Schalen mit dem Plasmid pMAG17-1 behandelt wurden, konnten wiederum keine Transfektanten gefunden werden und es wurde mit dem Plasmid pMAG14-3 fortgefahren, das zusätzlich das 16S rRNA-Gen für die Chloramphenicol-Resistenz enthielt. Nach 66 Transfektionsversuchen wurden auch bei diesem Plasmid keine fluoreszierenden Mitochondrien am Fluoreszenzmikroskop entdeckt, und auch die Selektion auf die Chloramphenicol-Resistenz endete ohne positives Ergebnis.

4.4.2. Transfektion mit magnetischen Partikeln

Bei dem Transfektionsreagenz MATra-A werden magnetische Partikel genutzt, um DNA in die Zellen zu transportieren. Nach dem Beschichten mit der DNA werden die Partikel über

Ergebnisse

den Zellen im Kulturmedium verteilt und durch eine Magnetplatte in die Zellen gezogen, wo sie die DNA freigeben können.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit MATra-A wurden die Megamitochondrien durch eine eintägige Inkubation in mit Milchsäure auf einen pH-Wert von 6,3 eingestelltem Kulturmedium (vgl. 4.4.1.2) in 35-mm-Kulturschalen induziert. Anschließend erfolgte die eigentliche Transfektion mit 3 µg des entsprechenden Plasmids.

Nach der Transfektion mit dem Plasmid pMAG13-1 konnten nach zwei Tagen mit dem Fluoreszenzmikroskop überall auf der Schale leicht grün leuchtende Strukturen entdeckt werden. Da die, nach den *Gene Gun*-Versuchen erwartete Intensität der Fluoreszenzsignale ebenfalls nur sehr niedrig war, wurden diese Strukturen näher untersucht. Aufgrund von Vergleichen mit den entsprechenden Phasenkontrastbildern wurden die Partikel als Auslöser der Fluoreszenz verdächtigt. Nach dem Einsatz von MATra-A-Partikeln ohne Plasmid-DNA konnten diese Strukturen wiederum in bzw. auf den Zellen entdeckt werden (Abb. 4-39), was diese Vermutung bestätigte.

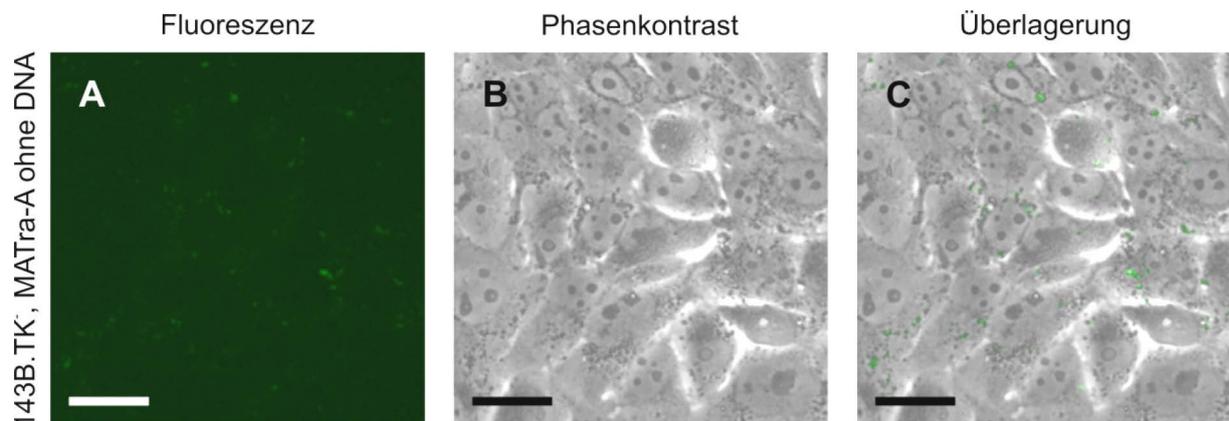


Abb. 4-39: Fluoreszenz der MATra-A-Partikel

Aufnahmen von MATra-A-Partikeln ohne DNA auf 143B.TK⁻-Zellen, A: Fluoreszenzaufnahme B: Phasenkontrastaufnahme, C: Überlagerung von A und B. Die Eichstriche entsprechen 20 µm

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die mit MATra-A transfizierten Zellen nicht auf die Expression des mtEGFP-Gens hin untersucht. Daraufhin erfolgten noch 25 Transfektionen mit dem Plasmid pMAG14-1, das eine Chloramphenicol-Resistenz vermitteln kann. Nach dem Umsetzen der Zellen auf 150-mm-Kulturschalen konnten jedoch auch hier nach einer drei bis vier Wochen dauernden Weiterkultivierung keine Chloramphenicol-resistenten Klone gefunden werden.

4.4.3. Transfektion durch Mikroinjektion von DNA

Bei der Mikroinjektion wird eine Glaskapillare durch die Zellmembran geschoben, durch die anschließend unterschiedlichste Moleküle wie Nukleinsäuren, Proteine oder auch Wirkstoffe in die Zelle eingebracht werden können. Überlebt die Zelle diese Prozedur, erhält man eine Transfektionsrate von nahezu 100%. Ein Nachteil ist jedoch, dass jede Zelle einzeln injiziert werden muss und somit nur wenige Zellen transfiziert werden können. Die Injektion in normale Säuger-Mitochondrien ist nicht möglich, weil der Kapillardurchmesser mindestens 0,3 μm beträgt. Durch die neuen Methoden zur Induktion von Megamitochondrien eröffnet sich nun die Möglichkeit, Injektionsversuche mit diesen Organellen durchzuführen.

Es stellte sich heraus, dass die normale Injektionsmethode nicht nutzbar war, da sich die Mitochondrien dabei verschoben. Aus diesem Grund wurde eine neue Injektionsstrategie verfolgt: Nachdem die Kapillare in die Zelle eingeführt worden war, wurde sie axial auf ein möglichst großes Mitochondrium ausgerichtet, das nicht prall aufgebläht war. Dabei war zu beachten, dass der Zellkern möglichst hinter dem Mitochondrium liegen musste, um es so am Verschieben zu hindern.

Die Zelllinie 143B.TK⁻ wurde auf Glasbodenschalen ausgesät und die Megamitochondrien mit Natriumacetat induziert (4.3.1). Das Plasmid pMAG13-1 fand in Konzentrationen von 50-350 ng/ μl Verwendung, wobei die Injektionseinstellungen ebenfalls variiert wurden. Nach der Injektion wurden die Zellen mit Antibiotika weiterkultiviert, um mögliche Kontaminationen durch die Injektion an der offenen Schale zu minimieren. Am nächsten Tag wurden die Kulturschalen am Fluoreszenzmikroskop auf Transformanten abgesucht. Es konnten sehr schwache Signale innerhalb von Zellen entdeckt werden, die auf eine gelungene Transfektion von Mitochondrien schließen ließen (Abb. 4-40). Injektionsversuche mit mitochondrialer DNA in ρ^0 -Zellen wurden nicht durchgeführt, da es in diesen Zellen nicht gelang, Megamitochondrien in entsprechender Größe zu induzieren.

Ergebnisse

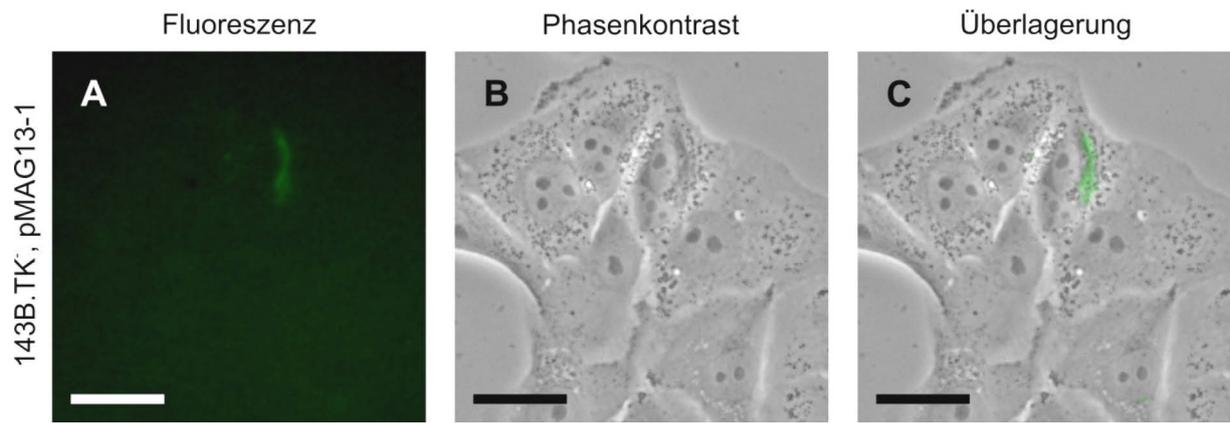


Abb. 4-40: Fluoreszierende Mitochondrien nach Mikroinjektion mit pMAG13-1

A: Fluoreszenzaufnahme (verstärkt) der Zellen, B: Phasenkontrastaufnahme der Zellen, C: Überlagerung von A und B. Die Eichstriche entsprechen 20 μm .

5. Diskussion

5.1. Mitochondriale Expressionsvektoren

In der Literatur ist bisher keine Methode beschrieben, mit der exogene DNA in die Mitochondrien lebender tierischer Zellen eingebracht und dort anschließend nachweisbar exprimiert wurde. Es wurde schon versucht, Plasmid-DNA durch den Einsatz kationischer Lipidvesikel (DQAsomen) in die Nähe der Mitochondrien zu bringen und dort freizusetzen. Anhand der Fluoreszenz konnte anschließend eine Lokalisation des DNA-Lipidvesikel-Komplexes an den Mitochondrien festgestellt werden. Bei der Verwendung einer linearen DNA mit einem konjugierten Signalpeptid wurde nach 10 Stunden eine gleichmäßigere Verteilung der fluoreszierenden Moleküle auf den Mitochondrien beobachtet (D'Souza *et al.*, 2005). Da die DNA aber kein Reportergen für die Expression in Mitochondrien enthielt, beruhte dieser Nachweis jedoch nur auf der Lokalisation der Fluoreszenz der DNA in bzw. an den Mitochondrien. An isolierten Mitochondrien konnte die Transfektion mit DNA hingegen schon nachgewiesen werden: So wurden mit einem mitochondrialen Signalpeptid gekoppelte lineare DNA-Fragmente mit einer Länge von 17 bis 322 bp in die Matrix isolierter Rattenmitochondrien importiert (Seibel *et al.*, 1995). Auch die Translokation einer Plasmid-DNA in die Mitochondrien von Mäusen durch Elektroporation konnte bereits gezeigt werden (Collombet *et al.*, 1997). Auch bei diesen Versuchen erfolgte der Nachweis der mitochondrialen Lokalisation der eingebrachten DNA jedoch nicht über deren Expression; vielmehr wurden die DNA-Moleküle an sich in der Matrix der Mitochondrien detektiert.

Da der endgültige Beweis einer Transfektion von Mitochondrien lebender Zellen nur über die Expression eines Reportergens geführt werden kann, stellt die Entwicklung mitochondrialer Expressionsvektoren eine wichtige Grundlage für die spätere Austestung der unterschiedlichen Transfektionsmethoden dar.

5.1.1. Konstruktion mitochondrialer Expressionsvektoren

Bei der Konstruktion der mitochondrialen Expressionsvektoren müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden: Zum einen sollte sich der Aufbau der Expressionskassette möglichst am mitochondrialen Genom orientieren, um eine korrekte Expression zu erreichen,

Diskussion

zum anderen ist bei Verwendung eigener Genkonstrukte zu beachten, dass der genetische Code der Mitochondrien einige Abweichungen zum Kerngenom aufweist (O'Brien *et al.*, 1990), die bei Nichtbeachtung in fehlerhaften Proteinen resultieren können.

Als Promotorbereich wurde in allen Vektoren der *D-Loop* des mitochondrialen Genoms verwendet, der alle für die Transkriptionsinitiation wichtigen Sequenzen enthält. Dazu zählen die Promotoren für den L- bzw. H-Strang (LSP bzw. HSP1 und HSP2), konservierte Sequenzblöcke sowie Terminations-assoziierte Sequenzen (Anderson *et al.*, 1981). Damit die Genkonstrukte korrekt prozessiert werden können, wurden analog zum mitochondrialen Genom flankierende tRNA-Sequenzen an beide Enden der einzelnen Gene angefügt, die nach der Transkription durch Ausbildung ihrer klassischen Kleeblattstrukturen die Prozessierungsstellen markieren. Danach können die freigesetzten RNA-Moleküle der flankierten Genbereiche weitergehend modifiziert werden (Ojala *et al.*, 1980; Ojala *et al.*, 1981; Montoya *et al.*, 1983).

Bei dem ersten Vektorkonstrukt pMAG11-1 wurde das grünfluoreszierende Protein EGFP als Reporter gen verwendet. An die beiden Enden wurden die tRNAs für Glycin und Arginin angefügt, die normalerweise das ND3-Gen in der mitochondrialen DNA flankieren. Das ND3-Gen besitzt kein vollständiges Stop-Codon, vielmehr wird das einzelne T durch Polyadenylierung zu einem TAA vervollständigt (Ojala *et al.*, 1981). Das EGFP-Gen wurde zusammen mit den tRNAs so in den Vektor kloniert, dass es unter der Kontrolle des L-Strang-Promotors stand. Der Vektor enthielt zusätzlich hinter diesem EGFP-tRNA-Sequenzbereich eine Transkriptions-Terminations-Sequenz (TTS), um die Transkription zu stoppen.

Unter ungünstigen Umständen kann das EGFP-Gen so in das Kerngenom integriert werden, dass eine Expression möglich ist. Wenn diese Integration zusätzlich dazu führt, dass an das EGFP eine mitochondriale Signalsequenz angehängt wird, können falsch-positive Zellen entstehen. Aus diesem Grund wurde im Vektor pMAG11-2 ein Sicherheitsmechanismus eingebaut: Das im EGFP-Gen enthaltene Codon TGG für Tryptophan wurde in das Codon TGA mutiert, welches bei einer zytoplasmatischen Translation zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und somit zu einem funktionsunfähigen Protein führt. In Mitochondrien wird das Protein jedoch korrekt synthetisiert. Dieser Austausch wurde durch die bereits erwähnten Unterschiede bei der Codon-Nutzung zwischen Kern und Mitochondrien ermöglicht (O'Brien *et al.*, 1990).

In der mitochondrialen DNA sind fast alle proteincodierenden Bereiche auf dem H-Strang codiert, welcher durch die beiden Promotoren HSP1 und HSP2 transkribiert wird (Anderson *et al.*, 1981; Attardi *et al.*, 1982). Dabei wird der Promotor HSP1 20-30-fach häufiger transkribiert als der HSP2 und ungefähr doppelt so stark wie der Promotor LSP für den L-Strang (King und Attardi, 1993). Aufgrund dieser Unterschiede in der Transkriptionsrate wurde zur Verstärkung der Expression im Vektor pMAG12-1 das Reportergen samt der tRNA-Sequenzen und der TTS in umgekehrter Orientierung auf die andere Seite des *D-Loops* kloniert, so dass es danach unter der Kontrolle des H-Strang-Promotors stand.

Die bis dahin konstruierten Vektoren hatten alle den Nachteil, dass sie nur den Replikationsursprung für den H-Strang enthielten, der im Gegensatz zum L-Strang-Replikationsursprung im *D-Loop* codiert ist. Daher konnten sie nicht in den Mitochondrien repliziert werden, wodurch nach einer Zellteilung die Weitergabe des Vektors an beide Tochterzellen verhindert wird und somit eine dauerhafte Expression nicht möglich ist. Der Replikationsursprung für den L-Strang wurde mit den umgebenden 800 bp aus der mtDNA amplifiziert und anschließend so in den Vektor pMAG13-1 integriert, dass er im Vergleich zum *D-Loop* in ähnlicher Weise wie im mitochondrialen Genom angeordnet war. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Replikation nach dem gleichen Mechanismus wie der der mitochondrialen DNA ablaufen kann.

Da das Fluoreszenzsignal zur Detektion positiver Transfektanten zu schwach für einen Nachweis am Fluoreszenzmikroskop sein könnte, wurde im Vektor 14-1 ein zweites Markergen verwendet. Dabei handelte es sich um eine Chloramphenicol-Resistenz, die bereits Mitte der 70er Jahre beschrieben wurde (Wallace *et al.*, 1975; Wallace *et al.*, 1977). Aufgrund eines Basenaustauschs von T zu C an der Position 2991 im mitochondrialen Genom wird die Translation an den Mitoribosomen mit dieser veränderten 16S rRNA nicht durch das Antibiotikum Chloramphenicol inhibiert (Blanc *et al.*, 1981). Nach der geglückten Transformation einer Chloramphenicol-sensitiven Zelllinie mit dem Vektor pMAG14-1 sollte sich somit eine Resistenz ausbilden. Dies wird auch dadurch begünstigt, dass bereits ein Anteil von 10% der Chloramphenicol-resistenten 16S rRNA ausreicht, um den Phänotyp einer Zelllinie zu ändern (Wallace *et al.*, 1977).

Um die Expressionsrate des mtEGFP noch weiter zu erhöhen, sollte die RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 genutzt werden, um die Transkription zu verstärken. Dazu musste das T7-RNA-Polymerase-Gen ebenfalls an den Enden mit tRNAs versehen und in Vektoren

integriert werden. In diesem Fall wurden die tRNAs für Aspartat und Lysin ausgewählt, die normalerweise das COX2-Gen flankieren. Damit eine Transkriptionsverstärkung durch die T7-RNA-Polymerase genutzt werden konnte, musste das Reporter-gen mtEGFP zusätzlich noch mit einem T7-Promotor versehen werden. Dadurch steht nur noch die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle der mitochondrialen Promotoren und das eigentliche Reporter-gen wird durch die hochprozessive Bakteriophagen-Polymerase (Davanloo *et al.*, 1984) in großen Mengen produziert.

In dem Vektor pMAG17-1 wurde die T7-RNA-Polymerase direkt hinter den H-Strang-Promotor des *D-Loops* kloniert. Es folgte das unter der T7-Promotor-Kontrolle stehende mtEGFP und abschließend der Bereich mit dem Replikationsursprung des L-Strangs.

Der Vektor pMAG14-3 enthielt zusätzlich noch das 16S rRNA-Gen mit der Punktmutation, die die Chloramphenicolresistenz vermittelt, wodurch eine Selektion mit Chloramphenicol möglich wird. Als Nebeneffekt wurde durch die das 16S rRNA-Gen flankierende Leucin-tRNA eine Transkriptions-Terminations-Sequenz integriert, die die vom H1-Promotor ausgehende Transkription abstoppt. Somit konnte verhindert werden, dass eine mögliche Behinderung der T7-Promotor-gesteuerten Expression des mtEGFP-Gens durch die mitochondrialen Transkriptionsvorgänge auftritt.

5.1.2. *In-vitro*-Nachweis der Transkription

Die Transkriptionsfähigkeit der konstruierten mitochondrialen Expressionsvektoren stellt eine grundlegende Bedingung für die folgenden Versuche dar.

Die Transkription in Mitochondrien beginnt an den drei Promotor-Bereichen innerhalb des *D-Loops* (Montoya *et al.*, 1982; Bogenhagen *et al.*, 1984). Dazu binden zuerst Transkriptionsfaktoren in der Nähe der Promotoren an die mitochondriale DNA und ermöglichen dadurch die Bindung der mitochondrialen RNA-Polymerase, die dann mit der Transkription beginnen kann (Fisher und Clayton, 1985; Parisi und Clayton, 1991; Falkenberg *et al.*, 2002). Von den Promotoren LSP und HSP2 aus werden zunächst Primärtranskripte gebildet, die beinahe über die gesamte Länge des Genoms reichen. Die Transkripte, die vom Promotor HSP1 aus entstehen, enden nach 16S rRNA an der Transkriptions-Terminations-Sequenz im Bereich der Leucin-tRNA (Christianson und Clayton, 1986; Kruse *et al.*, 1989).

Für den Transkriptionsnachweis wurde ein *in-vitro*-Transkriptionssystem verwendet, das aus menschlichen Mitochondrien gewonnen wurde und somit alle benötigten Proteinbestandteile enthält (Fernandez-Silva *et al.*, 1996). Nach der Transkription der einzelnen linearisierten Plasmide wurde die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis erfolgte daraufhin durch eine PCR-Amplifikation der gewünschten Sequenzbereiche. Die Transkription des mtEGFP-Gens konnte in allen getesteten Ansätzen nachgewiesen werden. Bei dem Vektor pMAG11-2 war das Signal jedoch etwas schwächer als bei den weiteren drei Vektoren pMAG12-1, pMAG13-1 und pMAG14-1. Dies könnte daran liegen, dass das mtEGFP in diesem Vektor im Gegensatz zu den anderen Vektoren unter der Kontrolle des L-Strang-Promotors steht, der eine niedrigere Transkriptionsrate als der H1-Promotor aufweist (King und Attardi, 1993). Ein weiterer Grund könnte auch in der unterschiedlichen Länge der Transkripte zu sehen sein: Bei dem Vektor pMAG11-2 ist das vollständige Transkript mit rund 1900 bp ungefähr doppelt so groß wie das rund 930 bp lange Transkript der anderen Vektoren. Da sich das nachzuweisende mtEGFP-Gen am hinteren Ende der Transkripte befindet, könnten durch vorzeitige Transkriptionsabbrüche bei den langen Transkripten weniger RNA-Moleküle vorliegen, die dann auch ein schwächeres Amplifikationssignal liefern.

Der Nachweis der Expression der T7-RNA-Polymerase ergab bei allen Proben ein positives Signal, das allerdings bei allen Proben sehr schwach ausfiel. Da alle Vektoren den gleichen Promotor nutzen, könnte eine mögliche Erklärung wiederum in der großen Länge der Transkripte liegen, die ungefähr 2761 bp lang sein sollten.

5.1.3. *In-vitro*-Nachweis der Prozessierung

Nach dem erfolgten Nachweis, dass die mitochondrialen Expressionsplasmide transkribiert werden können, wurde untersucht, ob in dem *in-vitro*-Transkriptionssystem weitergehende Modifikations- bzw. Prozessierungsschritte an den entstandenen RNAs erfolgten. In den Mitochondrien werden die einzelnen Protein-Gene durch Prozessierungsenzyme aus polycistronischen Primärtranskripten herausgeschnitten. Als Erkennungssequenzen dienen dabei Sekundärstrukturen, die in den meisten Fällen durch die flankierenden tRNA-Sequenzen entstehen (Ojala *et al.*, 1981; Montoya *et al.*, 1981; Fernandez-Silva *et al.*, 1996). Direkt nach diesem Herausschneiden erfolgt eine Polyadenylierung der mRNAs und rRNAs

Diskussion

am 3'-Ende durch eine mitochondriale Poly(A)-Polymerase (Rose *et al.*, 1975; Amalric *et al.*, 1978; Dubin *et al.*, 1982).

Die Ergebnisse zeigen, dass die *in-vitro*-Transkripte an den durch die Linearisierung des Expressionsvektors entstandenen 3'-Enden polyadenyliert wurden, die nicht mit den normalerweise in den Mitochondrien entstehenden 3'-Enden übereinstimmen. Dadurch lässt sich auf eine signalunabhängige Polyadenylierung schließen, die direkt an freien 3'-Enden von RNAs erfolgt. Die Prozessierung konnte anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse nur in einem Fall nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Transkripte der Expressionsvektoren grundsätzlich in Mitochondrien prozessiert werden können. Das verwendete *in-vitro*-Transkriptionssystem in der bestehenden Form kann jedoch nicht für weitere Untersuchungen in dieser Richtung verwendet werden. Ein Grund dafür könnte die ursprüngliche Optimierung des *in-vitro*-Systems in Richtung Transkription sein (Fernandez-Silva *et al.*, 1996). Durch eine Veränderung der Zusammensetzung könnte wahrscheinlich eine Verbesserung des Prozessierungsergebnisses erzielt werden. Eine weitere Möglichkeit liegt darin, dass die Polyadenylierung an den geschnittenen 3'-Enden nicht oder nur sehr langsam erfolgte, so dass die Prozessierungsprodukte nur schwer über die verwendete PCR-Nachweismethode detektierbar sind und somit auch keine Klonierung mit anschließender Sequenzierung erfolgen konnte.

5.2. Zelllinien mit mitochondrial lokalisierter T7-RNA-Polymerase

Als Alternative zu den mitochondrialen Expressionsvektoren, die die T7-RNA-Polymerase enthielten, sollte auch eine Zelllinie verwendet werden, bei der eine zytoplasmatisch produzierte T7-RNA-Polymerase vorlag, die anschließend durch eine anfusionierte mitochondriale Targeting-Sequenz in die Mitochondrien importiert wird. Da die Zelllinie vor den Transfektionsversuchen auf die Expression der T7-RNA-Polymerase getestet wurde, konnte somit der Vorteil der hohen Prozessivität und Spezifität der T7-RNA-Polymerase (Davanloo *et al.*, 1984) mit ihrer garantierten Anwesenheit in den Mitochondrien kombiniert werden. Der dann in diese Zelllinien zu transfizierende Vektor müsste nur den T7-RNA-Polymerase-Promotor und das Reportergen inklusive der flankierenden tRNAs enthalten. Als Nebeneffekt könnten somit kleinere Vektoren bei den Transfektionsversuchen genutzt werden, die dadurch eine bessere Transfektionseffizienz aufweisen.

Das T7-RNA-Polymerase-Gen wurde in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert, der bereits die Signalsequenz der Untereinheit VIII der menschlichen Cytochrom c-Oxidase enthielt. Die Expression dieses Signalsequenz-Polymerase-Konstrukts stand unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, der eine kontinuierlich hohe Expressionsrate garantieren sollte. Nach der Transfektion des T7-RNA-Polymerase-Vektors wurde die Zelllinie über einen Monat hinweg unter Selektion mit G418 kultiviert und anschließend im Vergleich mit einer frisch transfizierten Zelllinie auf die T7-RNA-Polymerase untersucht.

Im ersten Schritt erfolgte der Nachweis des Plasmids in den Zelllinien durch PCR, wobei sich herausstellte, dass nach einem Monat unter Selektion nahezu kein Plasmid mehr feststellbar war. Die nachgewiesene Menge entsprach nur noch rund 1/30 der Menge in frisch transfizierten Zellen. Unter Umständen lag dies an einer Integration des Resistenz-Gens in das Kerngenom, bei der das T7-RNA-Polymerase-Gen inaktiviert oder nicht vollständig übernommen wurde.

Im nächsten Schritt wurden Proteinextrakte von transfizierten Zellen mit Hilfe eines T7-RNA-Polymerase-Antikörpers untersucht. Im Western Blot zeigten sich im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen zusätzliche Banden in den Extrakten der transfizierten Zellen. Aufgrund der Größe entsprachen diese Banden der T7-RNA-Polymerase. Die Menge konnte mit ungefähr 1:100 der Kontrolle abgeschätzt werden. Neben den T7-RNA-Polymerase-Banden zeigte sich noch eine Vielzahl weiterer Banden, was den Schluss zuließ, dass der Antikörper

Diskussion

auch andere Proteine in eukaryontischen Zellen detektieren kann. In länger transfizierten Zelllinien konnte keine Expression der T7-RNA-Polymerase mehr festgestellt werden. Die Zellen wurden daher für Transfektionsversuche mit mitochondrialen Expressionsvektoren maximal 12 Wochen nach der Transfektion mit der T7-RNA-Polymerase verwendet.

Zum Abschluss wurde immunhistochemisch untersucht, ob die T7-RNA-Polymerase auch wirklich in den Mitochondrien der transfizierten Zellen lokalisiert war. Bei den Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass sowohl die transfizierten als auch die nichttransfizierten Zellen deutlich angefärbt waren. Bei beiden waren die Zellkerne deutlich erkennbar, wobei die Färbung in den Nukleoli intensiver zu sehen war. Auch im gesamten Zytoplasma war eine leichte Fluoreszenz zu sehen, die jedoch bei den transfizierten Zellen zusätzlich deutliche Strukturen aufzeigte. Diese Strukturen konnten mit Mitochondrien durch eine Gegenfärbung kolokalisiert werden. Auch anschließende Untersuchungen am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit höheren Vergrößerungsfaktoren bestätigten diese Ergebnisse. Es waren ebenfalls die zusätzlichen Strukturen im Zytoplasma zu erkennen, die wiederum eine Kolokalisation mit den Mitochondrien aufwiesen. Allerdings konnte keine stärkere Fluoreszenz der Nukleoli in den angefärbten Zellkernen entdeckt werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die T7-RNA-Polymerase in den transfizierten Zellen exprimiert und auch in die Mitochondrien transportiert wurde. Jedoch war es nicht möglich, die Expression über einen längeren Zeitraum zu stabilisieren, so dass die Zelllinien jeweils kurz vor ihrem Einsatz der Transfektion unterzogen wurden. Die unspezifische Bindung des Antikörpers an andere Proteine als die T7-RNA-Polymerase konnte nach dem Ergebnis des Western Blots auch durch die Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

5.3. Induktion von Megamitochondrien

Mitochondrien, die gegenüber normalen Mitochondrien erheblich vergrößert sind, so dass sie sogar im Lichtmikroskop ohne Anfärben zu erkennen sind, werden als Mega- bzw. Riesenmitochondrien (engl.: *giant mitochondria*) bezeichnet (Teranishi *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich nicht nur um ein simples Anschwellen, auch Fusionsereignisse sowie eine gehemmte Fission der Mitochondrien spielen bei ihrer Bildung eine Rolle (Teranishi *et al.*, 1999; Wakabayashi, 1999).

Für die geplante Mikroinjektion von DNA in die Mitochondrien ist die Induktion von Megamitochondrien eine unerlässliche Vorbedingung, da die Injektionskapillaren einen Durchmesser von mindestens 0,3 µm haben und somit normalgroße Mitochondrien nicht penetriert werden können.

Megamitochondrien wurden unter unterschiedlichsten Bedingungen beobachtet: So können sie in Säugern unter physiologischen Bedingungen zum Beispiel in der Leber (Wills, 1965; Tauchi und Sato, 1968; Sato und Tauchi, 1975) oder Lymphozyten (Rancourt *et al.*, 1975) vorkommen. Auch bei vielen humanen Erkrankungen wie der Fett-Leber (Rubin *et al.*, 1970; Petersen, 1977; Chedid *et al.*, 1980) und mitochondrialen Myopathien (Price *et al.*, 1967; Hyman *et al.*, 1977) treten Megamitochondrien auf. Durch die Gabe von Wirkstoffen in das Kulturmedium können ebenfalls Megamitochondrien induziert werden. Beispiele hierfür sind Valinomycin (Azzi und Azzone, 1965; Malka *et al.*, 2005), Chloramphenicol (Albring *et al.*, 1975), Cuprizon (Suzuki, 1969) und Hydrazin (Karbowski *et al.*, 1997; Teranishi *et al.*, 1999). Auch die Inkubation der Zellen in angesäuertem Medium ist eine Möglichkeit, Megamitochondrien zu induzieren. Hierfür kann das Medium beispielsweise mit Milchsäure azidifiziert werden oder es wird „verbrauchtes“ Kulturmedium einer anderen Kulturschale zum Ansäuern übertragen (Kukat, 2008, Dissertation). In den durchgeführten Versuchen sollten andere pH-Wert-senkende Substanzen auf ihre Eignung zur Induktion von Megamitochondrien getestet werden. Dabei fiel die Wahl auf Natriumacetat und die korrespondierende Säure.

5.3.1. Induktion mit Natriumacetat

Die mit dem Plasmid pEGFP-Mito transfizierte Zelllinie wurden über zwei Tage hinweg mit unterschiedlichen Konzentrationen (45, 50, 55, 60 und 65 mM) Natriumacetat kultiviert und die Größe der Mitochondrien jeweils nach dem ersten und zweiten Tag am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Am ersten Tag zeigte sich, dass bei der niedrigsten Konzentration (45 mM) nur leichte Verdickungen zu entdecken waren, während bei 50 und 55 mM Natriumacetat Mitochondrien mit einem Durchmesser von bis zu 4 μm auftraten. Interessanterweise waren in diesen Zellen gleichzeitig auch noch schlauchförmige Mitochondrien zu erkennen. Im Vergleich dazu ändert sich nach der Induktion mit Valinomycin oder „verbrauchtem“ Kulturmedium die Morphologie aller Mitochondrien gleichzeitig (Kukat, 2008, Dissertation). Bei den höheren Acetat-Konzentrationen nahm die Größe wieder ab und es traten in einigen Fällen Verdickungen in Tropfenform auf. Am zweiten Tag konnte bei den Kontrollzellen im Vergleich zum Vortag eine leichte Azidifizierung des Mediums festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen durch ihre Laktatproduktion das Kulturmedium ansäuerten. Dementsprechend waren die Mitochondrien nun nicht mehr schlauch-, sondern punktförmig, wobei sich ihr Durchmesser nur minimal vergrößert hatte. Die Ansäuerung des Kulturmediums durch Laktat kann bei ρ^0 -Zellen in noch viel stärkerem Maße festgestellt werden (Jakobs *et al.*, 1994), was darauf zurückzuführen ist, dass diese Zellen ihr ATP ausschließlich durch Glykolyse erzeugen können und deshalb Pyruvat zu Laktat reduzieren müssen, um NADH zu NAD^+ zu oxidieren (King und Attardi, 1996). Bei den mit 50 mM Natriumacetat inkubierten Zellen waren nun alle Mitochondrien vollständig kugelförmig vergrößert, wobei einige einen Durchmesser von bis zu 6 μm aufwiesen. Bei allen anderen Natriumacetat-Konzentrationen zeigte sich das gleiche Bild wie am Vortag. Bei weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums und des FCS Einfluss auf die optimale Natriumacetat-Konzentration hatte. Die optimale Konzentration lag in einem Bereich von 50 und 60 mM. Bei einigen Versuchen entstanden auf diese Weise Megamitochondrien, die annähernd die Größe des Zellkerns erreichten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ansäuerung des Kulturmediums mit Natriumacetat eine alternative Methode zur Induktion von Megamitochondrien darstellt. Es können dadurch sogar Mitochondrien erzeugt werden, die beinahe die Größe des Zellkerns aufweisen und somit ideale Voraussetzungen für die Mikroinjektion darstellen.

In der Literatur finden sich bisher keine Berichte zu einer Induktion von Megamitochondrien durch Zugabe von Natriumacetat. Acetat wird in Zellen zusammen mit dem Coenzym A (CoA) durch die Acetyl-CoA-Synthetase in Acetyl-CoA umgewandelt. Bei diesem Vorgang wird ein ATP-Molekül zu AMP und Pyrophosphat umgesetzt. Dies erklärt auch die Berichte, dass durch hohe Acetat-Konzentrationen die Pyrophosphat-Menge in Leberzellen drastisch erhöht wird (Veech *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989). Wenn in den Mitochondrien das Pyrophosphat in höheren Konzentrationen vorliegt, bildet es Komplexe mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , die daraufhin ausfallen können (Wiers, 1971). Beavis und Galid berichteten 1987, dass durch eine Erniedrigung der Mg^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien die Bildung der mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) bewirkt wird (Beavis und Galid, 1987), wodurch ein Influx in die Mitochondrien zum Anschwellen der Mitochondrien führen könnte. Allerdings ist die Öffnung der mPTP in der Regel mit einer Depolarisierung der Mitochondrien, der Freisetzung von Cytochrom c und somit der Apoptose bzw. Nekrose der Zelle verknüpft (Halestrap *et al.*, 2002). Jedoch wird auch berichtet, dass die Dauer und das Ausmaß der Öffnung der Pore an einem einzelnen Mitochondrium entscheidend sein könnte, ob es seine Integrität wieder herstellen kann oder nicht. Die Menge der verbleibenden Mitochondrien entscheidet dann, ob die Zelle überlebt oder in die Apoptose/Nekrose übergeht (Honda und Ping, 2006). Falls die Öffnung der mPTP in Reaktion auf die erhöhte Acetat-Konzentration nur in einer „sanften“ Art erfolgt, könnte dies einen möglichen Mechanismus der Megamitochondrienbildung durch Natriumacetat darstellen. Jedoch kann dadurch nur der Beginn der Größenzunahme erklärt werden; das weitere Anwachsen der Mitochondrien muss jedoch auf einem anderen Weg als dem reinen Anschwellen durch Wasser erfolgen.

5.3.2. Induktion mit Essigsäure

Auch bei der Versuchsreihe zur Induktion von Megamitochondrien mit Essigsäure wurden verschiedene Konzentrationen (25-40 mM) ausgetestet, wobei allerdings bei der Maximalkonzentration von 40 mM alle Zellen bereits am ersten Tag abgestorben waren. Anscheinend konnte das Kulturmedium solch große Mengen Essigsäure nicht ausreichend abpuffern, so dass der pH-Wert zu weit absank. Bei den anderen Ansätzen konnte mit steigender Essigsäurekonzentration auch eine verstärkte Bildung von Megamitochondrien beobachtet werden. Nach einem Tag waren bei den Zellen, die mit 35 mM Essigsäure versetzt waren, teilweise Mitochondrien mit einem Durchmesser von 5 μm zu sehen, die sich am

Diskussion

zweiten Tag sogar noch auf 7 μm vergrößerten. Auch hier zeigte sich - wie bei der Behandlung mit Natriumacetat - das Phänomen, dass gleichzeitig auch noch schlauchförmige Mitochondrien in den Zellen zu erkennen waren. Bei 30 mM bildeten sich nach zwei Tagen immerhin noch 4 μm durchmessende Mitochondrien, während bei der niedrigsten Essigsäure-Konzentration nur Verdickungen bis 1 μm gefunden wurden.

Somit ist auch die Azidifizierung des Kulturmediums mit Essigsäure eine Methode, die sich zur Induktion von Megamitochondrien für die Mikroinjektion eignet. Der Mechanismus sollte mit dem der Induktion mit Natriumacetat übereinstimmen, da es sich bei der Essigsäure um die korrespondierende Säure des Acetats handelt.

5.3.3. Morphologieänderung bei Megamitochondrien

Bei einigen Versuchen zeigte sich bei den mit Natriumacetat induzierten Megamitochondrien eine hohe morphologische Dynamik. Dabei konnten Formveränderungen unterschiedlichster Art beobachtet werden. Diese reichten von Fusions- und Fissionsereignissen bis zur Bildung von Ausstülpungen der Mitochondrienmembran. Diese Veränderungen waren hauptsächlich bei Mitochondrien zu erkennen, die in einer „relaxierten“ Form vorlagen - bei Zellen, die überwiegend prall gefüllte kugelförmige Megamitochondrien enthielten, konnten solche Ereignisse nicht entdeckt werden. Dadurch bestätigt sich auf eine interessante Weise, dass die Größenzunahme der Mitochondrien nicht nur durch den Influx von Flüssigkeit ausgelöst wird, sondern dass auch andere Faktoren wie Änderungen der Fissions- und Fusionshäufigkeit eine Rolle bei der Megamitochondrienbildung spielen (Teranishi *et al.*, 1999; Wakabayashi, 1999).

5.4. Methoden zur Transfektion von Mitochondrien mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von Säuger-Mitochondrien stellt den limitierenden Schritt bei der Behandlung mitochondrialer Erkrankungen dar, da es bisher noch keine Methode gibt, mit der exogene DNA zuverlässig in die Matrix der Mitochondrien transportiert werden kann. Die bisherigen Versuche beruhten alle auf dem aktiven Transport über die Mitochondrienmembran - entweder durch die Verwendung kationischer Vesikel, die mit der Membran verschmelzen sollen, oder über die Nutzung des mitochondrialen Proteinimport-Systems, indem Signalpeptide an die DNA gekoppelt wurden, die die DNA dann beim Import in die Mitochondrienmatrix „ziehen“ sollten (vgl. 5.1). Durch die Möglichkeit, Megamitochondrien mit Durchmessern von mehreren μm in beliebigen Zelllinien reversibel zu induzieren, ergibt sich erstmals die Gelegenheit, die Mitochondrien in Säugerzellen mechanisch zu penetrieren und so die DNA in die Matrix einzuführen. Im Folgenden werden die Versuche diskutiert, die DNA mittels Partikelbeschuss mit der Gene Gun, unter Zuhilfenahme magnetischer Partikel oder durch Mikroinjektion in die Mitochondrien zu transportieren.

5.4.1. Partikelbeschuss mit der Gene Gun

Bei der *Gene Gun* handelt es sich um ein biolistisches Verfahren zur Einbringung von Nukleinsäuren und anderen Substanzen in Zellen mit Hilfe von Gold- oder Wolframpartikeln. Die DNA wird dabei auf die Oberfläche der Partikel aufgebracht, die anschließend unter hohem Druck auf das Ziel (die Zelle) geschossen werden. Am Zielort wird die DNA anschließend freigesetzt und kann dort exprimiert werden.

5.4.1.1. Bestimmung der Durchführungsbedingungen

Für die Transfektion von Mitochondrien in Säugerzellen durch einen Beschuss mit DNA-beladenen Goldpartikeln existieren bisher keine Erfahrungswerte zu den benötigten Durchführungsbedingungen. Für Plastiden in Pflanzenzellen und Mitochondrien in Hefen sind zwar bereits entsprechende Erfahrungswerte vorhanden (Butow *et al.*, 1996; De Marchis *et al.*, 2009), jedoch sind diese nicht einfach auf Säugermitochondrien übertragbar. So besitzen Pflanzenzellen eine stabile Zellwand, die ihnen eine erhöhte Stabilität gegenüber veränderten

Diskussion

Umweltbedingungen verleiht. Dadurch können diese Zellen unter anderem für kurze Zeit einem angelegten Vakuum ausgesetzt werden, das bei den relativ instabilen Säugerzellen zum Platzen der Zellen führen würde. Außerdem werden auch höhere Schussdrücke benötigt, damit die Partikel die Zellwand durchdringen können. Aus diesem Grund wurden die benötigten Einstellungen experimentell ermittelt. Als Anhaltspunkt diente die Transfektionseffizienz eines im Kern exprimierten Vektors bei menschlichen Zellen. Der einzige von den Versuchen an Pflanzen und Hefen übertragbare Parameter war die Größe der verwendeten Goldpartikel, die so klein wie möglich sein sollten, damit die Mitochondrien penetriert werden können. Die optimalen Parameter zur Durchführung der folgenden Experimente wurden an der Zelllinie 143B.TK⁻ ermittelt, die auch in den späteren Versuchen Verwendung fand.

Nach den ersten Tests stellte sich heraus, dass die zweitunterste Ebene (Ebene C) optimal für die Verwendung von 35-mm-Kulturschalen geeignet war, da hier der beschossene Bereich am besten ausgenutzt wurde. Außerdem konnten auf dieser Ebene die besten Ergebnisse bezüglich der Partikelverteilung und der Überlebensrate der beschossenen Zellen erzielt werden. Dies ist nicht verwunderlich, da die Goldpartikel nach dem Ablösen vom *Macrocarrier* in einem kegelförmigen Strahl weiterflogen. Auf der obersten Ebene waren die Partikel in diesem Strahl noch sehr fokussiert und trafen mit einer hohen Geschwindigkeit auf die Kulturschale und die darin befindlichen Zellen auf. Durch die hohe Aufschlagsenergie und die große Anzahl der Partikel wurden die Zellen im Zentrum der Platte regelrecht zerrissen, während die Zellen am Rand der Schale nicht getroffen wurden. Mit größerer Entfernung von der Auslassdüse wurden die Partikel auf einen größeren Bereich gestreut, was der gewünschten Verteilung zu Gute kam.

Im nächsten Schritt erfolgte die Optimierung des angelegten Unterdrucks sowie der verwendeten *Rupture Disk*. Dabei zeigte sich, dass die Goldpartikel selbst bei Unterdruck noch stark abgebremst werden können. Bei Kammerunterdrücken von 15 und 20 in Hg konnten nicht einmal 1% der Zellen einer Schale transfiziert werden. Erst bei einem erhöhten Kammerunterdruck von 25 in Hg zeigte sich eine deutliche Steigerung auf rund 4,5%, die allerdings immer noch nicht akzeptabel war. Erst bei der Verwendung eines Unterdrucks von 27 in Hg konnten Transformationsraten erreicht werden, die in die Bereiche von herkömmlichen Transfektionsreagenzien kamen. Die besten Ergebnisse von rund 8% Transformanten konnten bei der Verwendung von 1800 psi-*Rupture Disks* erzielt werden. Im

Vergleich dazu wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGENE[®] HD eine etwa 3-fach höhere Transformationsrate von 24,7% erreicht. Somit wurden die späteren Transformationsversuche auf der zweituntersten Ebene C bei 27 in Hg Kammervakuum und mit 1800 psi-*Rupture Disks* durchgeführt.

5.4.1.2. Induktion von Megamitochondrien

Aufgrund ihrer Dicke von 0,5-1 μm ist es nahezu unmöglich, Mitochondrien in lebenden Zellen mit Goldpartikeln eines Durchmessers von 0,6 μm so zu penetrieren, dass die DNA von den Partikeln in die Mitochondrienmatrix abgegeben werden kann. Aus diesem Grund ist es unabdingbar, die Mitochondrien vor dem Beschuss in der *Gene Gun* zu vergrößern. Dies kann sowohl durch die Gabe von Wirkstoffen wie Valinomycin (Azzi und Azzone, 1965; Malka *et al.*, 2005) als auch durch Ansäuern des Wachstumsmediums geschehen. Die Ansäuerung kann direkt durch Zugabe von Milchsäure bis zu einem pH-Wert von 6-6,7 in das Medium (Kukat, 2007, Dissertation) oder durch Kultivierung der Zellen über einige Tage ohne Medienwechsel erfolgen. Dabei sorgt das von den Zellen produzierte Laktat für die Absenkung des pH-Werts, die durch eine Farbänderung des pH-Indikators im Wachstumsmedium von Rot nach Gelborange beobachtet werden kann.

Bei dem Vergleich zwischen den mit Milchsäure und Valinomycin induzierten Megamitochondrien zeigte sich, dass bei beiden Methoden schon nach ein bis zwei Stunden deutlich vergrößerte kugelförmige Mitochondrien zu erkennen waren, die mit fortschreitender Zeit immer größer wurden. Allerdings fiel nach einem Tag auf, dass sich die Valinomycin-behandelten Zellen nicht oder nur langsam vermehrten. Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe gestartet, bei der überprüft werden sollte, ob durch eine verkürzte Inkubation mit Valinomycin eine Normalisierung der Teilungsrate möglich war. Dabei zeigte sich, dass sich die Zellen selbst nach einer Valinomycinbehandlung von nur einer Stunde nahezu nicht mehr teilten und nach zwei Tagen sogar eine Abnahme der Zellzahl zu erkennen war. Dieses Resultat war relativ überraschend, da die Induktion von Riesenmitochondrien durch Valinomycin eine gängige Methode darstellt. In Retikulozyten konnte festgestellt werden, dass selbst geringe Konzentrationen von Valinomycin die Proteinbiosynthese teilweise hemmen. Bei der verwendeten Valinomycin-Konzentration wird die Proteinbiosynthese nahezu vollständig blockiert (Herzberg *et al.*, 1974; Breitbart, 1981). Dies erklärt, warum sich

die Zellen nicht mehr teilen konnten, da mit der Blockade der Proteinbiosynthese auch der Zellzyklus ins Stocken gerät. Dass dieser Effekt keine Beachtung in der Literatur findet, liegt wohl daran, dass die Zellen nach fast allen Untersuchungen der mit Valinomycin induzierten Megamitochondrien nicht weiterkultiviert wurden. Aus diesem Grund wurde von der Verwendung von Valinomycin zur Induktion von Megamitochondrien abgesehen, da nicht bekannt war, ob dadurch das Transfektionsergebnis beeinflusst werden könnte.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen nach einer Inkubation von mehr als zwei Stunden verstärkt nach dem Beschuss mit den Goldpartikeln ablösten. Deshalb wurden die Zellen bei allen *Gene Gun*-Versuchen ungefähr 60 bis 120 Minuten vor Versuchsbeginn mit Milchsäure-Medium behandelt. Die dabei entstehenden Riesenmitochondrien konnten bereits im Phasenkontrastmikroskop erkannt werden. Die Nutzung von Zellen mit noch größeren Mitochondrien würde das Transfektionsergebnis vermutlich deutlich verbessern, da eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Goldpartikel die Mitochondrien treffen können. Deshalb sollten solche Zellen bevorzugt eingesetzt werden, sobald eine mit der *Gene Gun* kompatible Methode gefunden wird, die eine Induktion größerer Mitochondrien ermöglicht.

5.4.1.3. Transfektion mit mtDNA

Die Transfektion von Mitochondrien in ρ^0 -Zellen mit mitochondrialer DNA ist relativ leicht nachweisbar, da die mtDNA nach dem Erreichen der Matrix innerhalb kurzer Zeit so stark vermehrt wird, dass die transfizierten Zellen in ρ^0 -Selektionsmedium wachsen können, während die nichttransfizierten Zellen nach einiger Zeit absterben. Die wachsenden Zellen sind nach ein bis zwei Wochen als Kolonien auf der Kulturschale sichtbar.

Zu Beginn der Versuchsreihen zeigte sich schon beim Beschichten der Goldpartikel eine starke Aggregatbildung, die dann auch am Mikroskop nach dem Beschuss auf der Kulturschale nachgewiesen werden konnte. Dabei entstand der Verdacht, dass die Größe der DNA bzw. ihre Menge eine Rolle spielt. Deshalb wurde die DNA-Menge reduziert und auch größere Goldpartikel ausgetestet. Es wurde festgestellt, dass die Aggregatbildung mit der niedrigeren DNA-Menge und der Verwendung größerer Partikel abnahm. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich eine Quervernetzung der Partikel durch die im Vergleich zu normalen Plasmiden relativ große mitochondriale DNA. Durch die Verwendung größerer Partikel wird

ein mtDNA-Molekül vollständig auf einem einzigen Goldkugelchen gebunden und der Kontakt zu anderen Partikeln minimiert. Die anschließend durchgeführten Transfektionsversuche an ρ^0 -Zellen lieferten nach einer Selektion von 3-4 Wochen keine positiven Ergebnisse. Eine Erklärung liegt darin, dass sich trotz der Optimierung weiterhin Aggregate bildeten, die zwar optisch nicht erkennbar, jedoch groß genug waren, dass diese „Superpartikel“ nicht in die Mitochondrien eindringen konnten. Aus demselben Grund ist auch die Verwendung größerer Goldpartikel problematisch zu sehen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die DNA-Moleküle die Partikel auch weiterhin quervernetzten, durch die hohe Schussgeschwindigkeit jedoch auseinander gerissen wurden, so dass die DNA zerstört wurde.

5.4.1.4. Transfektion mit mitochondrialen Expressionsvektoren

Im Gegensatz zur Transfektion von ρ^0 -Zellen mit mtDNA ermöglicht die Transfektion mit mtEGFP-exprimierenden Plasmiden schon nach ein bis zwei Tagen eine Erfolgskontrolle, da das mtEGFP schon nach kurzer Zeit am Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann. Das mtEGFP hat auch den Vorteil, dass es nur in der Matrix der Mitochondrien funktionsfähig exprimiert werden kann, weil es durch eine Mutation so verändert wurde, dass die Translation im Zytoplasma vorzeitig abbrechen würde und das entstandene Protein funktionsunfähig wäre (vgl. 5.1.1).

Bei der Transfektion mit dem Vektor pMAG12-1 konnten keine Fluoreszenzsignale entdeckt werden, die mit Mitochondrien in Verbindung gebracht werden konnten. Erst bei der Verwendung des Vektors pMAG13-1 wurden Zellen gefunden, deren Mitochondrien fluoreszierten. Diese Signale waren allerdings äußerst schwach ausgeprägt und konnten erst nach einer relativ langen Belichtungszeit von der Kamera detektiert werden. Dies ist nicht verwunderlich, da die Genexpression in den Mitochondrien nicht in dem Ausmaß erfolgt wie zum Beispiel bei der Expression eines nukleären Plasmids unter der Kontrolle eines sehr starken CMV-Promotors. Außerdem werden bei der Transfektion mit der *Gene Gun* auch nur einzelne Plasmide in die Mitochondrien eingebracht, weil die Oberfläche eines einzelnen Goldpartikels zu klein für die Bindung vieler DNA-Moleküle ist. Aufgrund der schwachen Fluoreszenz war es nicht möglich, die Mitochondrien mit einem spezifischen Farbstoff gegenzufärben, da die Filtersätze des verwendeten Mikroskops keine vollständige Trennung

Diskussion

beider Farben ermöglicht. Da das mtEGFP aufgrund des verwendeten Tryptophan-Codons nicht im Zytoplasma, sondern nur in Mitochondrien exprimiert werden kann, handelt es sich bei den Signalen eindeutig um transfizierte Mitochondrien. Zudem spricht auch die Form der entdeckten Signale dafür, dass sie mitochondrial lokalisiert sind: Bei der verwendeten Zelllinie sind die Mitochondrien bei Zellen in den Randzonen eines konfluenten Bereichs sehr häufig ebenso traubenförmig wie die detektierten Signale an den Zellkern angelagert. Ein weiteres Indiz stellt auch das Vorhandensein zweier Zellen mit grün gefärbten Mitochondrien dar: Dies deutet darauf hin, dass sich die Zelle nach der Transfektion geteilt hat. Eine Doppeltransfektion zweier benachbarter Zellen ist aufgrund der geringen Transfektionsrate auszuschließen. Nach zwei Tagen konnten die Zellen jedoch nicht mehr aufgefunden werden, was daran liegen könnte, dass der Vektor bei weiteren Zellteilungen ausgedünnt wurde und deshalb kein identifizierbares Signal mehr produziert werden konnte.

Bei weiteren Transfektionsversuchen mit den Vektoren pMAG14-1, pMAG14-3 und pMAG17-1 wurden keine Transformanten gefunden. Auch die Selektion mit Chloramphenicol brachte keine resistenten Klone zum Vorschein. Die Wirkung von Chloramphenicol als Selektionsmittel beginnt erst nach ungefähr fünf Zellteilungen. Aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks während der ersten Zellteilungen kann das Plasmid also bereits verloren gegangen sein, bevor eine Wirkung nachweisbar wäre. Dies könnte eventuell durch eine Vorinkubation der Zellen mit Chloramphenicol reduziert werden, die aber möglicherweise die Expression des mtEGFPs vermindern würde.

Um die schwachen Signale zu verstärken, wurden auch Zellen verwendet, die die hochprozessive T7-RNA-Polymerase in den Mitochondrien enthielten. An ihr wurden Transformationsversuche mit dem Vektor pCRII-TOPO-mtEGFP, der das mtEGFP unter der Kontrolle eines T7-Promotors enthält, durchgeführt. Durch die hohe Aktivität der T7-RNA-Polymerase sollte die RNA-Synthese und somit auch die Produktion des mtEGFP verstärkt werden. Jedoch waren auch hier keine positiven Zellen zu sehen. Da die T7-RNA-Polymerase normalerweise kein Signalpeptid besitzt, kann es sein, dass dadurch ihre Aktivität reduziert ist bzw. sie vollständig inhibiert wird. Zudem könnte es nach dem Import des Proteins in die Mitochondrien zu einer Fehlfaltung gekommen sein, die ebenfalls die Aktivität herabsetzen könnte, wodurch keine Transkription des mtEGFP-Gens erfolgt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einsatz der Gene Gun eine geeignete Methode zur Transfektion von Mitochondrien darstellt und dass es mit dieser Methode erstmalig

gelingen ist, exogene DNA in Mitochondrien einzubringen und das darauf befindliche mtEGFP zu exprimieren. Allerdings ist die Transformationsrate äußerst niedrig, weshalb über Verbesserungen nachzudenken ist. Ein Grund für die schlechten Transformationsergebnisse könnte darin liegen, dass die Partikel doch zu groß für die Mitochondrien sind. Diese sind zwar vergrößert, aber bei weitem nicht in dem Maße wie bei den Zellen, die für die Mikroinjektion verwendet wurden. Wenn es gelingt, größere Mitochondrien in den verwendeten Zellen zu induzieren und diese Zellen den Beschuss mit der *Gene Gun* aushalten, könnte die Transformationsrate sicher deutlich erhöht werden.

5.4.2. Transfektion mit magnetischen Partikeln

Bei der Transfektion mit dem Transfektionsreagenz MATra-A werden magnetische Partikel genutzt, um DNA in die Zellen zu transportieren. Dazu wird die DNA auf die Oberfläche der Partikel aufgebracht. Nachdem die Partikel anschließend in dem Kulturmedium über den Zellen verteilt wurden, werden sie durch eine Magnetplatte unter der Kulturschale angezogen und durch die Membran in die Zellen eindringen. Im Inneren der Zelle kann die aufgebrachte DNA dann freigesetzt werden. Damit überhaupt die Möglichkeit besteht, dass die Partikel die Mitochondrien einer Zelle penetrieren können, müssen die Mitochondrien deutlich vergrößert sein.

Nach dem Betrachten der Kulturschale am Fluoreszenzmikroskop fielen sehr viele über die gesamte Schale verteilte grün fluoreszierende Strukturen auf, die mit den magnetischen Partikeln in Deckung gebracht werden konnten. Auch nach einem Transfektionsversuch ohne DNA trat diese Fluoreszenz auf, weshalb vermutet wurde, dass diese Partikel eine leichte Eigenfluoreszenz aufwiesen. Da das zu erwartende Fluoreszenzsignal bei einer erfolgreichen Transfektion der Mitochondrien ebenfalls nur schwach ausfallen könnte, wurden keine weiteren Versuche mit mtEGFP-Vektoren durchgeführt. Die Transfektion eines Vektors mit einer Chloramphenicolresistenz endete nach einer Weiterkultivierung in Chloramphenicolhaltigem Medium ohne positives Ergebnis. Möglicherweise können die magnetischen Partikel auch nicht die kugelförmigen Megamitochondrien penetrieren: Der Vorgang des Eindringens in die Zelle erfolgt relativ langsam und führt zu einer Einstülpung der Zellmembran. Dadurch können die Mitochondrien zur Seite geschoben werden, wodurch eine Penetration der Mitochondrien unmöglich wird.

5.4.3. Transfektion durch Mikroinjektion von DNA

Bei der Mikroinjektion wird eine Glaskapillare durch die Zellmembran geschoben, durch die anschließend unterschiedlichste Moleküle wie Nukleinsäuren, Proteine oder auch Wirkstoffe in die Zelle eingebracht werden können. Werden Kapillaren mit großen Durchmessern benutzt, ist sogar der Transfer von Organellen und anderen Zellbestandteilen zwischen zwei Zellen möglich. Bestes Beispiel hierfür ist die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI), bei der Spermien in Eizellen injiziert werden, um diese zu befruchten. Meist wird die Mikroinjektion jedoch dazu verwendet, Nukleinsäuren in Zellen einzuschleusen. Dabei erhält man beim Überleben der injizierten Zelle eine Transfektionsrate von nahezu 100%, jedoch ist die absolute Anzahl der transfizierten Zellen recht niedrig, da jede Zelle einzeln penetriert werden muss. Ein weiterer Vorteil der Mikroinjektion ist die Möglichkeit, auch nicht-mitotische Zellen zu transfizieren, indem man die Kapillare direkt in den Zellkern schiebt und dort die DNA freisetzt. Die Injektion in andere Organellen tierischer Zellen ist jedoch aufgrund des Kapillardurchmessers von mindestens 0,3 µm nicht möglich. Durch die neuen Methoden zur Induktion von Megamitochondrien eröffnet sich nun die Möglichkeit, Injektionsversuche mit diesen Organellen durchzuführen.

Da die Mitochondrien durch ihre Doppelmembran ein recht stabiles Gebilde darstellen und nicht fest in der Zelle verankert sind, können sie durch die Injektionskapillare leicht innerhalb der Zelle verschoben werden. Deshalb wurde die Injektionskapillare axial auf das Mitochondrium ausgerichtet und dann in die Zelle eingeführt. Erst danach wurde das Mitochondrium penetriert, wobei darauf geachtet wurde, dass das möglichst große Mitochondrium direkt in einer Gerade zwischen Kern und Injektionskapillare lag. Es war auch von Vorteil, wenn das Mitochondrium nicht in Kugelform, sondern in leicht dem Zellkern angeschmiegt Form vorlag. Dadurch kam es nach der Penetration mit der Injektionskapillare viel seltener zu einem Platzen der Mitochondrien und zum Auslaufen ihres Inhalts ins Zytoplasma.

Auch mit der Methode der Mikroinjektion konnten Mitochondrien mit dem Plasmid pMAG13-1 transfiziert werden, was durch die Fluoreszenz des Codon-angepassten mtEGFP eindeutig nachgewiesen wurde. Wie bei der Transfektion mit der *Gene Gun* (5.4.1.4) lassen sich die schwachen Fluoreszenzsignale durch die vergleichsweise niedrige Aktivität des mitochondrialen Expressionsapparats sowie die vermutlich sehr niedrige Kopienzahl des injizierten Plasmids erklären. Auch hier konnten die Fluoreszenzsignale nicht über einen

längeren Zeitraum beobachtet werden, da die entsprechenden Zellen nicht mehr aufgefunden werden konnten. Dies deutet wiederum auf eine Ausdünnung sowie ein ineffektives Replikationsverhalten des Vektors hin.

Da bei der Mikroinjektion sehr große Mitochondrien verwendet werden und man optisch verfolgen kann, ob die Mitochondrien wirklich penetriert wurden, stellt diese Methode wahrscheinlich die erfolgversprechendste Möglichkeit dar, Mitochondrien zu transfizieren.

5.5. Ausblick

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Transfektion und Expression exogener DNA in Mitochondrien erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sollte der Transfektionsvorgang jedoch noch weiter optimiert werden, um die Effizienz zu steigern.

Außerdem sollte ein Schwerpunkt auf die Transfektion von Mitochondrien in ρ^0 -Zellen mit mitochondrialer DNA gelegt werden. Durch das Einbringen spezifisch veränderter mtDNA-Moleküle in ρ^0 -Zellen eröffnet sich eine Vielzahl neuer Möglichkeiten zur Erforschung mitochondrialer Erkrankungen. Auf diese Weise wäre man bei der Erkennung der krankheitsauslösenden Veränderungen der mtDNA nicht mehr auf Patientenmaterial angewiesen und könnte die Auswirkungen der entsprechenden Mutationen zweifelsfrei nachweisen.

In einem weiteren Schritt könnten dann auch Zellen hergestellt werden, deren Mitochondrien nach der Transfektion mit einer veränderten DNA auf eine andere Zelle übertragen werden. Damit wären die ersten Schritte für eine somatische Gentherapie getan, bei der Gendefekte der mitochondrialen DNA korrigiert werden können.

6. Zusammenfassung

Bei einer Vielzahl neuromuskulärer und neurodegenerativer Erkrankungen spielen Fehlfunktionen der Mitochondrien eine wichtige Rolle. Da die Proteine der Atmungskettenkomplexe sowohl durch die mitochondriale DNA als auch durch das Kerngenom codiert werden, können Mutationen in beiden Genomen die Auslöser dieser Erkrankungen darstellen. Veränderungen der mitochondrialen DNA lassen sich - im Gegensatz zum Kerngenom - bisher nicht korrigieren, weshalb bei einem großen Teil der Erkrankungen nur die Symptome und nicht die Auslöser behandelt werden können. Das grundlegende Problem stellt dabei der Transport der DNA in die Mitochondrien dar.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von physikalischen Transfektionsmethoden exogene DNA in die Mitochondrien menschlicher Kulturzellen einzubringen. Dazu wurden unterschiedliche Vektoren hergestellt, die in Mitochondrien das an die Mitochondrien angepasste grün fluoreszierende mtEGFP exprimieren sollen. Die Expressionsfähigkeit und Prozessierung dieser Konstrukte konnte in *in-vitro*-Assays mit einem Mitochondrienextrakt nachgewiesen werden.

Bei Transfektionsversuchen mit der *Gene Gun* gelang es erstmals, exogene Plasmid-DNA in die Mitochondrien menschlicher Zellen einzubringen. Das durch die transfizierten Vektoren exprimierte mtEGFP konnte am Fluoreszenzmikroskop eindeutig in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert werden. Eine Transfektion mit Hilfe magnetischer Partikel erwies sich jedoch nicht als zielführend, da die die Partikel eine Eigenfluoreszenz aufwiesen, die eine Detektion der mtEGFP-Expression verhinderten.

Eine wichtige Voraussetzung für die Transfektion von Mitochondrien durch mechanische Methoden wie die Mikroinjektion ist die reversible Induktion von Megamitochondrien, da sie erst in diesem Zustand penetriert werden können. Durch eine Ansäuerung des Kulturmediums mit Natriumacetat bzw. Essigsäure konnten Mitochondrien erzeugt werden, die beinahe die Größe des Zellkerns aufwiesen und somit ideale Bedingungen für die Mikroinjektion darstellen. Bei den anschließenden Mikroinjektionsversuchen mit den hergestellten mitochondrialen Expressionsvektoren wurden wiederum Zellen mit eindeutig grün fluoreszierenden Mitochondrien gefunden.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig menschliche Mitochondrien mit exogener DNA transfiziert. Dies stellt einen grundlegenden Schritt für die Entwicklung

Zusammenfassung

neuer Therapieformen bei mitochondrialen Myopathien dar. Zuvor müssen die Transfektionsmethoden jedoch noch weiter optimiert werden, um eine höhere Transfektions-effizienz zu erreichen.

7. Summary

Mitochondrial dysfunctions play an important role in a variety of neuromuscular and neurodegenerative diseases. As the proteins of the respiratory chain complexes are encoded by the mitochondrial DNA as well as the nuclear genome, mutations in both could trigger solely the diseases. Up to now, changes of the mitochondrial DNA could not be corrected, hence, therapies were designed to decrease symptoms in patients. In this context, the limiting factor to cure these disease relies on the DNA transport into the mitochondria.

The aim of this work was to insert exogenous DNA into the mitochondria of human cultured cells by physical transfection methods. A variety of different vectors was constructed to express the mitochondrially adapted green fluorescent mtEGFP within mitochondria. The ability of these constructs to be expressed and processed was proved by in vitro assays using a mitochondrial extract.

In the transfection experiments using the gene gun, we succeeded for the first time to introduce exogenous plasmid DNA into human mitochondria. The mtEGFP expressed by the transfected vectors could definitely be localized to the mitochondria of the cells. Transfections using magnetic particles as mediator could not be used, because the particles exhibit an autofluorescence which prevents a detection of the mtEGFP expression.

An essential prerequisite for the transfection of mitochondria by mechanical methods like microinjection is the reversible induction of megamitochondria, since they could not be penetrated as small regular organelles. Acidification of the culture medium with sodium acetate or acetic acid led to mitochondria exhibiting almost the size of the nucleus, thus giving ideal conditions for microinjection. In the applied microinjection experiments using the mitochondrial expression vectors, cells displayed mitochondria with distinct green fluorescence.

In summary, human mitochondria were transfected successfully for the first time with mitochondrial expression vectors. This is a fundamental step in the development of new therapies targeting mitochondrial myopathies. However, the transfection methods have to be optimized to achieve higher transfection efficiencies.

8. Literaturverzeichnis

- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. und Nussberger, S.** (2001). Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* 153, 1151-1160.
- Albring, M., Griffith, J. und Attardi, G.** (1977). Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1348-1352.
- Albring, M., Radsak, K. und Thoenes, W.** (1975). Chloramphenicol-induced giant hepatic mitochondria. *Naturwissenschaften.* 62, 43-44.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S. S. und Wissinger, B.** (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211-215.
- Altmann, R.** (1890). Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit. Leipzig.
- Amalric, F., Merkel, C., Gelfand, R. und Attardi, G.** (1978). Fractionation of mitochondrial RNA from HeLa cells by high-resolution electrophoresis under strongly denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* 118, 1-25.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. und Young, I. G.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290, 457-465.
- Attardi, G., Chomyn, A., Montoya, J. und Ojala, D.** (1982). Identification and mapping of human mitochondrial genes. *Cytogenet. Cell Genet.* 32, 85-98.
- Attardi, G. und Ojala, D.** (1971). Mitochondrial ribosomes in HeLa cells. *Nat. New Biol.* 229, 133-136.
- Avner, B. P., Liao, S. K., Avner, B., DeCell, K. und Oldham, R. K.** (1989). Therapeutic murine monoclonal antibodies developed for individual cancer patients. *J. Biol. Response Mod.* 8, 25-36.
- Azzi, A. und Azzone, G. F.** (1965). Potassium-transport-linked swelling induced by valinomycin in liver mitochondria. *Biochem. J.* 96, 1C-2C.
- Barat, M., Rickwood, D., Dufresne, C. und Mounolou, J. C.** (1985). Characterization of DNA-protein complexes from the mitochondria of *Xenopus laevis* oocytes. *Exp. Cell Res.* 157, 207-217.
- Barone, P., Zhang, X. H. und Widholm, J. M.** (2009). Tobacco plastid transformation using the feedback-insensitive anthranilate synthase [α]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker. *J. Exp. Bot.* 60, 3195-3202.
- Beavis, A. D. und Garlid, K. D.** (1987). The mitochondrial inner membrane anion channel. Regulation by divalent cations and protons. *J. Biol. Chem.* 262, 15085-15093.

- Benda, C.** (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und hoererer Evertbraten, II. Theil: Die Histogenese der Spermien. *Arch. Anal. Physiol.* 393-398.
- Bereiter-Hahn, J. und Vöth, M.** (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198-219.
- Berk, A. J. und Clayton, D. A.** (1974). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *J. Mol. Biol.* 86, 801-824.
- Blanc, H., Wright, C. T., Bibb, M. J., Wallace, D. C. und Clayton, D. A.** (1981). Mitochondrial DNA of chloramphenicol-resistant mouse cells contains a single nucleotide change in the region encoding the 3' end of the large ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 3789-3793.
- Bogenhagen, D. und Clayton, D. A.** (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell.* 11, 719-727.
- Bogenhagen, D. F., Applegate, E. F. und Yoza, B. K.** (1984). Identification of a promoter for transcription of the heavy strand of human mtDNA: in vitro transcription and deletion mutagenesis. *Cell.* 36, 1105-1113.
- Bogenhagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L. und Kobayashi, R.** (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol. Cell Proteomics.* 2, 1205-1216.
- Böhni, P. C., Daum, G. und Schatz, G.** (1983). Import of proteins into mitochondria. Partial purification of a matrix-located protease involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides. *J. Biol. Chem.* 258, 4937-4943.
- Borst, P. und Grivell, L. A.** (1971). Mitochondrial ribosomes. *FEBS Lett.* 13, 73-88.
- Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A. und Holt, I. J.** (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J. Biol. Chem.* 278, 50961-50969.
- Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. und .** (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science.* 240, 1534-1538.
- Breitbart, H.** (1981). Effect of ionophores and metabolic inhibitors on protein synthesis in rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 656, 160-166.
- Brierley, G. P., Baysal, K. und Jung, D. W.** (1994). Cation transport systems in mitochondria: Na⁺ and K⁺ uniports and exchangers. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 519-526.
- Brown, R.** (1833). Observations on the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. *Trans. Linn. Soc. London.* 16, 685-745.
- Brown, W. M., George, M., Jr. und Wilson, A. C.** (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 1967-1971.
- Bua, E., Johnson, J., Herbst, A., Delong, B., McKenzie, D., Salamat, S. und Aiken, J. M.** (2006). Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 469-480.

- Butow, R. A., Henke, R. M., Moran, J. V., Belcher, S. M. und Perlman, P. S.** (1996). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria using the biolistic gun. *Methods Enzymol.* 264, 265-278.
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J. und Walker, J. E.** (2003). Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol. Cell Proteomics.* 2, 117-126.
- Case, J. T. und Wallace, D. C.** (1981). Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somatic. Cell Genet.* 7, 103-108.
- Castora, F. J., Lazarus, G. M. und Kunes, D.** (1985). The presence of two mitochondrial DNA topoisomerases in human acute leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 854-866.
- Castora, F. J. und Simpson, M. V.** (1979). Search for a DNA gyrase in mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.* 254, 11193-11195.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. und Pfanner, N.** (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell.* 138, 628-644.
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A. E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Truscott, K. N., Guiard, B., Pfanner, N. und Rehling, P.** (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell.* 120, 817-829.
- Chang, D. D. und Clayton, D. A.** (1984). Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell.* 36, 635-643.
- Chang, D. D. und Clayton, D. A.** (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 351-355.
- Chedid, A., Jao, W. und Port, J.** (1980). Megamitochondria in hepatic and renal disease. *Am. J. Gastroenterol.* 73, 319-324.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. und Chan, D. C.** (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189-200.
- Chinnery, P. F., Taylor, R. W., Diekert, K., Lill, R., Turnbull, D. M. und Lightowlers, R. N.** (1999). Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria. *Gene Ther.* 6, 1919-1928.
- Chinnery, P. F. und Turnbull, D. M.** (2001). Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am. J. Med. Genet.* 106, 94-101.
- Choi, S. Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J. und Frohman, M. A.** (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1255-1262.
- Chomyn, A., Cleeter, M. W., Ragan, C. I., Riley, M., Doolittle, R. F. und Attardi, G.** (1986). URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science.* 234, 614-618.

- Christianson, T. W. und Clayton, D. A.** (1986). In vitro transcription of human mitochondrial DNA: accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6277-6281.
- Christopher, P. J., Grohmann, G. S., Millson, R. H. und Murphy, A. M.** (1978). Parvovirus gastroenteritis--a new entity for Australia. *Med. J. Aust.* 1, 121-124.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2172-2175.
- Clayton, D. A.** (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell.* 28, 693-705.
- Clayton, D. A.** (1984). Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 573-594.
- Clayton, D. A., Davis, R. W. und Vinograd, J.** (1970). Homology and structural relationships between the dimeric and monomeric circular forms of mitochondrial DNA from human leukemic leukocytes. *J. Mol. Biol.* 47, 137-153.
- Collombet, J. M., Wheeler, V. C., Vogel, F. und Coutelle, C.** (1997). Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. A novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders. *J. Biol. Chem.* 272, 5342-5347.
- Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W. und Arnheim, N.** (1992). A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7370-7374.
- Crews, S., Ojala, D., Posakony, J., Nishiguchi, J. und Attardi, G.** (1979). Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature.* 277, 192-198.
- D'Souza, G. G., Boddapati, S. V. und Weissig, V.** (2005). Mitochondrial leader sequence--plasmid DNA conjugates delivered into mammalian cells by DQAsomes co-localize with mitochondria. *Mitochondrion.* 5, 352-358.
- Daems, W. T. und Wisse, E.** (1966). Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J. Ultrastruct. Res.* 16, 123-140.
- Darrouzet, E., Moser, C. C., Dutton, P. L. und Daldal, F.** (2001). Large scale domain movement in cytochrome bc(1): a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26, 445-451.
- Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Studier, F. W.** (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2035-2039.
- De Marchis, F., Wang, Y., Stevanato, P., Arcioni, S. und Bellucci, M.** (2009). Genetic transformation of the sugar beet plastome. *Transgenic Res.* 18, 17-30.
- de Souza-Pinto, N. C., Maynard, S., Hashiguchi, K., Hu, J., Muftuoglu, M. und Bohr, V. A.** (2009). The recombination protein RAD52 cooperates with the excision repair protein OGG1 for the repair of oxidative lesions in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 29, 4441-4454.

- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. und Hamel, C. P.** (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207-210.
- Desjardins, P., Frost, E. und Morais, R.** (1985). Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 5, 1163-1169.
- Dianov, G. L., Souza-Pinto, N., Nyaga, S. G., Thybo, T., Stevnsner, T. und Bohr, V. A.** (2001). Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 68, 285-297.
- DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M. und DeVivo, D. C.** (1985). Mitochondrial myopathies. *Ann. Neurol.* 17, 521-538.
- Doda, J. N., Wright, C. T. und Clayton, D. A.** (1981). Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6116-6120.
- Doersen, C. J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. und Attardi, G.** (1985). Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J. Biol. Chem.* 260, 5942-5949.
- Dubin, D. T., Montoya, J., Timko, K. D. und Attardi, G.** (1982). Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* 157, 1-19.
- Entelis, N. S., Kolesnikova, O. A., Dogan, S., Martin, R. P. und Tarassov, I. A.** (2001). 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J. Biol. Chem.* 276, 45642-45653.
- Esaki, M., Kanamori, T., Nishikawa, S., Shin, I., Schultz, P. G. und Endo, T.** (2003). Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation. *Nat. Struct. Biol.* 10, 988-994.
- Esaki, M., Shimizu, H., Ono, T., Yamamoto, H., Kanamori, T., Nishikawa, S. und Endo, T.** (2004). Mitochondrial protein import. Requirement of presequence elements and tom components for precursor binding to the TOM complex. *J. Biol. Chem.* 279, 45701-45707.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. und Mihara, K.** (2006). Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J. Cell Sci.* 119, 4913-4925.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M.** (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* 31, 289-294.
- Falkenberg, M., Larsson, N. G. und Gustafsson, C. M.** (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 679-699.
- Farr, C. L., Wang, Y. und Kaguni, L. S.** (1999). Functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 14779-14785.

- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A. und Montoya, J.** (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* 88, 41-56.
- Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V. und Attardi, G.** (1997). The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *EMBO J.* 16, 1066-1079.
- Fernandez-Silva, P., Micol, V. und Attardi, G.** (1996). Mitochondrial DNA transcription initiation and termination using mitochondrial lysates from cultured human cells. *Methods Enzymol.* 264, 129-139.
- Finsterer, J.** (2008). Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr. Neurol.* 39, 223-235.
- Finsterer, J.** (2009). Treatment of mitochondrial disorders. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*
- Fisher, R. P. und Clayton, D. A.** (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 11330-11338.
- Fisher, R. P., Topper, J. N. und Clayton, D. A.** (1987). Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell.* 50, 247-258.
- Flierl, A., Jackson, C., Cottrell, B., Murdock, D., Seibel, P. und Wallace, D. C.** (2003). Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence-conjugated peptide nucleic acid. *Mol. Ther.* 7, 550-557.
- Fox, T. D., Sanford, J. C. und McMullin, T. W.** (1988). Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7288-7292.
- Garlid, K. D.** (1994). Mitochondrial cation transport: a progress report. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 537-542.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Blik, A. M. und Spelbrink, J. N.** (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol. Biol. Cell.* 14, 1583-1596.
- Gasser, S. M., Daum, G. und Schatz, G.** (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13034-13041.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. und Wallace, D. C.** (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6715-6719.
- Goto, Y., Nonaka, I. und Horai, S.** (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 348, 651-653.
- Gray, M. W.** (1993). Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 884-890.
- Gray, M. W. und Boer, P. H.** (1988). Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 319, 135-147.
- Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F.** (1999). Mitochondrial evolution. *Science.* 283, 1476-1481.

Literaturverzeichnis

- Graziewicz, M. A., Longley, M. J. und Copeland, W. C.** (2006). DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem. Rev.* 106, 383-405.
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. und van der Blik, A. M.** (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792-18798.
- Grohmann, K., Amairic, F., Crews, S. und Attardi, G.** (1978). Failure to detect "cap" structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 5, 637-651.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D. und Rojo, M.** (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell.* 100, 315-325.
- Gunter, T. E.** (1994). Cation transport by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 465-469.
- Hajek, P., Chomyn, A. und Attardi, G.** (2007). Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J. Biol. Chem.* 282, 5670-5681.
- Halestrap, A. P., McStay, G. P. und Clarke, S. J.** (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 84, 153-166.
- Hansford, R. G.** (1994). Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 495-508.
- Henle, J. (1841).** Allgemeine Anatomie. Leipzig.
- Herzberg, M., Breitbart, H. und Atlan, H.** (1974). Interactions between membrane functions and protein synthesis in reticulocytes. Effects of valinomycin and dicyclohexyl-18-crown-6. *Eur. J. Biochem.* 45, 161-170.
- Hess, J. F., Parisi, M. A., Bennett, J. L. und Clayton, D. A.** (1991). Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 351, 236-239.
- Hiraoka, J. und Hirao, Y.** (1988). Fate of sperm tail components after incorporation into the hamster egg. *Gamete Res.* 19, 369-380.
- Hixson, J. E. und Clayton, D. A.** (1985). Initiation of transcription from each of the two human mitochondrial promoters requires unique nucleotides at the transcriptional start sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2660-2664.
- Hixson, J. E., Wong, T. W. und Clayton, D. A.** (1986). Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *J. Biol. Chem.* 261, 2384-2390.
- Hoke, G. D., Payco, P. A., Ledwith, B. J. und Van Tuyle, G. C.** (1990). Structural and functional studies of the rat mitochondrial single strand DNA binding protein P16. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 116-124.
- Holt, I. J., Harding, A. E. und Morgan-Hughes, J. A.** (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331, 717-719.

- Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K. und Morgan-Hughes, J. A.** (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 428-433.
- Holt, I. J. und Jacobs, H. T.** (2003). Response: The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28, 355-356.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E. und Jacobs, H. T.** (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell.* 100, 515-524.
- Honda, H. M. und Ping, P.** (2006). Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 20, 425-432.
- Hutchison III, C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S. und Edgell, M. H.** (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.* 251, 536-538.
- Hyman, B. N., Patten, B. M. und Dodson, R. F.** (1977). Mitochondrial abnormalities in progressive external ophthalmoplegia. *Am. J. Ophthalmol.* 83, 362-371.
- Iborra, F. J., Kimura, H. und Cook, P. R.** (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC. Biol.* 2, 9.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Paabo, S. und Gyllensten, U.** (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 408, 708-713.
- Inoue, K., Ito, S., Takai, D., Soejima, A., Shisa, H., LePecq, J. B., Segal-Bendirdjian, E., Kagawa, Y. und Hayashi, J. I.** (1997). Isolation of mitochondrial DNA-less mouse cell lines and their application for trapping mouse synaptosomal mitochondrial DNA with deletion mutations. *J. Biol. Chem.* 272, 15510-15515.
- Inoue, T., Yamada, T., Furuya, E. und Tagawa, K.** (1989). Ca²⁺-induced accumulation of pyrophosphate in mitochondria during acetate metabolism. *Biochem. J.* 262, 965-970.
- Ishihara, N., Eura, Y. und Mihara, K.** (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 117, 6535-6546.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. und Mihara, K.** (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966-2977.
- Jakobs, B. S., van den Bogert, C., Dacremont, G. und Wanders, R. J.** (1994). Beta-oxidation of fatty acids in cultured human skin fibroblasts devoid of the capacity for oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1211, 37-43.
- Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. und Butow, R. A.** (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science.* 240, 1538-1541.
- Kagawa, Y.** (1999). Biophysical studies on ATP synthase. *Adv. Biophys.* 36, 1-25.
- Kanamori, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Shin, I., Schultz, P. G. und Endo, T.** (1999). Uncoupling of transfer of the presequence and unfolding of the mature domain in precursor translocation across the mitochondrial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3634-3639.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K. F. und Yonekawa, H.** (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4542-4546.

- Kanevski, I. und Maliga, P.** (1994). Relocation of the plastid *rbcL* gene to the nucleus yields functional ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in tobacco chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1969-1973.
- Karbowski, M., Kurono, C., Nishizawa, Y., Horie, Y., Soji, T. und Wakabayashi, T.** (1997). Induction of megamitochondria by some chemicals inducing oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1349, 242-250.
- Karbowski, M., Neutzner, A. und Youle, R. J.** (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 178, 71-84.
- Kasamatsu, H. und Vinograd, J.** (1974). Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 43, 695-719.
- Kholodenko, B. N., Zhilinskene, V. I., Borutaite, V. I., Ivanovene, L. I. und Toleikis, A. I.** (1988). [The role of adenine nucleotide translocator in the regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria]. *Biokhimiia.* 53, 1009-1012.
- King, M. P. und Attardi, G.** (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 246, 500-503.
- King, M. P. und Attardi, G.** (1993). Post-transcriptional regulation of the steady-state levels of mitochondrial tRNAs in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10228-10237.
- King, M. P. und Attardi, G.** (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 264, 304-313.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. und Lill, R.** (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 18, 3981-3989.
- Klingenberg, M., Mayer, I. und Dahms, A. S.** (1984). Interaction of fluorescent adenine nucleotide derivatives with the ADP/ATP carrier in mitochondria. 2. [5-(Dimethylamino)-1-naphthoyl]adenine nucleotides as probes for the transition between c and m states of the ADP/ATP carrier. *Biochemistry.* 23, 2442-2449.
- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. und Mihara, K.** (1998). Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis. *EMBO J.* 17, 3886-3898.
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. und Chan, D. C.** (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science.* 305, 858-862.
- Krayl, M., Lim, J. H., Martin, F., Guiard, B. und Voos, W.** (2007). A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol. Cell Biol.* 27, 411-425.
- Kruse, B., Narasimhan, N. und Attardi, G.** (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell.* 58, 391-397.
- Kukat, A.** (2007). Mitochondriale Fusions- und Fissionsvorgänge am Modellsystem von Mega-Mitochondrien einer ρ^0 -Zelllinie. Dissertation, Universität Würzburg.

- Kukat, A., Kukat, C., Brocher, J., Schafer, I., Krohne, G., Trounce, I. A., Villani, G. und Seibel, P.** (2008). Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res.* 36, e44.
- Kukat, C.** (2008). Fusion, Fission und Nucleoids in Megamitochondrien. Dissertation, Universität Würzburg.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lancaster, C. R. und Kröger, A.** (2000). Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta.* 1459, 422-431.
- Lauber, J., Marsac, C., Kadenbach, B. und Seibel, P.** (1991). Mutations in mitochondrial tRNA genes: a frequent cause of neuromuscular diseases. *Nucleic Acids Res.* 19, 1393-1397.
- Lee, D. Y. und Clayton, D. A.** (1997). RNase mitochondrial RNA processing correctly cleaves a novel R loop at the mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *Genes Dev.* 11, 582-592.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A. und Rojo, M.** (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* 117, 2653-2662.
- Levin, C. J. und Zimmerman, S. B.** (1976). A DNA ligase from mitochondria of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 514-520.
- Li, B., Pilcher, K. Y., Wyman, T. E. und Machida, C. A.** (1997). Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA. *Biotechniques.* 23, 603-6, 608.
- Liao, H. X. und Spremulli, L. L.** (1989). Interaction of bovine mitochondrial ribosomes with messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 264, 7518-7522.
- Linder, T., Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Pellegrini, M., Larsson, N. G., Falkenberg, M., Samuelsson, T. und Gustafsson, C. M.** (2005). A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. *Curr. Genet.* 48, 265-269.
- Logan, D. C.** (2007). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 58, 1225-1243.
- Lowell, B. B. und Spiegelman, B. M.** (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 404, 652-660.
- Maceluch, J. A. und Niedziela, M.** (2006). The clinical diagnosis and molecular genetics of kearns-sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 4, 117-137.
- Magnusson, J., Orth, M., Lestienne, P. und Taanman, J. W.** (2003). Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp. Cell Res.* 289, 133-142.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A. und Rojo, M.** (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6, 853-859.
- Man, P. Y., Turnbull, D. M. und Chinnery, P. F.** (2002). Leber hereditary optic neuropathy. *J. Med. Genet.* 39, 162-169.

Literaturverzeichnis

- Margulis, L.** (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 21-38.
- Martin, M., Cho, J., Cesare, A. J., Griffith, J. D. und Attardi, G.** (2005). Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell.* 123, 1227-1240.
- Martin, R. P., Schneller, J. M., Stahl, A. J. und Dirheimer, G.** (1979). Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry.* 18, 4600-4605.
- Martinez-Caballero, S., Grigoriev, S. M., Herrmann, J. M., Campo, M. L. und Kinnally, K. W.** (2007). Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23. *J. Biol. Chem.* 282, 3584-3593.
- Masters, B. S., Stohl, L. L. und Clayton, D. A.** (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell.* 51, 89-99.
- Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B. und Nedergaard, J.** (1999). The bioenergetics of brown fat mitochondria from UCP1-ablated mice. Ucp1 is not involved in fatty acid-induced de-energization ("uncoupling"). *J. Biol. Chem.* 274, 28150-28160.
- McFarland, R., Taylor, R. W. und Turnbull, D. M.** (2007). Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 77, 113-155.
- Meinecke, M., Wagner, R., Kovermann, P., Guiard, B., Mick, D. U., Hutu, D. P., Voos, W., Truscott, K. N., Chacinska, A., Pfanner, N. und Rehling, P.** (2006). Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science.* 312, 1523-1526.
- Meunier, B.** (2001). Site-directed mutations in the mitochondrially encoded subunits I and III of yeast cytochrome oxidase. *Biochem. J.* 354, 407-412.
- Miller, S. W., Trimmer, P. A., Parker, W. D., Jr. und Davis, R. E.** (1996). Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties. *J. Neurochem.* 67, 1897-1907.
- Moberg, P., Nilsson, S., Stahl, A., Eriksson, A. C., Glaser, E. und Mäler, L.** (2004). NMR solution structure of the mitochondrial F1beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Mol. Biol.* 336, 1129-1140.
- Model, K., Meisinger, C. und Kuhlbrandt, W.** (2008). Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase. *J. Mol. Biol.* 383, 1049-1057.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Popov-Celeketić, D., Mapa, K., Gevorgyan-Airapetov, L., Zohary, K., Hell, K., Azem, A. und Neupert, W.** (2009). Role of Tim50 in the transfer of precursor proteins from the outer to the inner membrane of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 20, 1400-1407.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M. und Attardi, G.** (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7195-7199.
- Montoya, J., Gaines, G. L. und Attardi, G.** (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell.* 34, 151-159.

- Montoya, J., Ojala, D. und Attardi, G.** (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*. 290, 465-470.
- Moraes, C. T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A. F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L. C., Servidei, S., Nonaka, I., Koga, Y., Spiro, A. J., Brownell, A. K., Schmidt, B., Schotland, D. L., Zupanc, M., DeVivo, D. C., Schon, E. A. und Rowland, L. P.** (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* 320, 1293-1299.
- Morais, R., Desjardins, P., Turmel, C. und Zinkewich-Peotti, K.** (1988). Development and characterization of continuous avian cell lines depleted of mitochondrial DNA. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24, 649-658.
- Mullis, K. B.** (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 48, 579-582.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I. und Hayashi, J. I.** (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934-940.
- Nass, M. M.** (1969). Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *J. Mol. Biol.* 42, 521-528.
- Nass, S. und Nass, M. M.** (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J. Cell Biol.* 19, 613-629.
- Nedergard, J. and Cannon, B.** The uncoupling protein thermogenin and mitochondrial thermogenesis. Ernster, L. *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* 23, 385-420. 1992. London, Elsevier Science.
- Nelson, I., Hanna, M. G., Wood, N. W. und Harding, A. E.** (1997). Depletion of mitochondrial DNA by ddC in untransformed human cell lines. *Somat. Cell Mol. Genet.* 23, 287-290.
- Neupert, W. und Herrmann, J. M.** (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723-749.
- O'Brien, T. W., Denslow, N. D., Anders, J. C. und Courtney, B. C.** (1990). The translation system of mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1050, 174-178.
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R. und Attardi, G.** (1980). The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell.* 22, 393-403.
- Ojala, D., Montoya, J. und Attardi, G.** (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*. 290, 470-474.
- Olichon, A., Guillou, E., Delettre, C., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L. J., Mils, V., Daloyau, M., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G. und Belenguer, P.** (2006). Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763, 500-509.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. und Hayashi, J. I.** (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 272-275.

Literaturverzeichnis

- Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K. und Muto, A.** (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* 56, 229-264.
- Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W. und Hartl, F. U.** (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature.* 341, 125-130.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A. und Mootha, V. K.** (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell.* 134, 112-123.
- Palade, G. E.** (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* 114, 427-451.
- Parisi, M. A. und Clayton, D. A.** (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science.* 252, 965-969.
- Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Camara, Y., Shi, Y., Pellegrini, M., Gaspari, M., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M. und Larsson, N. G.** (2007). MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell.* 130, 273-285.
- Perocchi, F., Jensen, L. J., Gagneur, J., Ahting, U., von, M. C., Bork, P., Prokisch, H. und Steinmetz, L. M.** (2006). Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle. *PLoS. Genet.* 2, e170.
- Petersen, P.** (1977). Abnormal mitochondria in hepatocytes in human fatty liver. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* 85, 413-420.
- Piko, L. und Matsumoto, L.** (1976). Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. *Dev. Biol.* 49, 1-10.
- Price, H. M., Gordon, G. R., Munsat, T. L. und Pearson, C. M.** (1967). Myopathy with atypical mitochondria in type I skeletal muscle fibers. A histochemical and ultrastructural study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26, 475-497.
- Prieto-Martin, A., Montoya, J. und Martinez-Azorin, F.** (2001). A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein. *FEBS Lett.* 503, 51-55.
- Raha, S. und Robinson, B. H.** (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502-508.
- Rancourt, M. W., McKee, A. P. und Pollack, W.** (1975). Mitochondrial profile of a mammalian lymphocyte. *J. Ultrastruct. Res.* 51, 418-424.
- Rehling, P., Brandner, K. und Pfanner, N.** (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 519-530.
- Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M. und Bonnefoy, N.** (2006). High-efficiency biolistic transformation of Chlamydomonas mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4771-4776.

- Robin, E. D. und Wong, R.** (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell Physiol.* 136, 507-513.
- Rojo, A., Campos, Y., Sanchez, J. M., Bonaventura, I., Aguilar, M., Garcia, A., Gonzalez, L., Rey, M. J., Arenas, J., Olive, M. und Ferrer, I.** (2006). NARP-MILS syndrome caused by 8993 T>G mitochondrial DNA mutation: a clinical, genetic and neuropathological study. *Acta Neuropathol.* 111, 610-616.
- Rose, K. M., Morris, H. P. und Jacob, S. T.** (1975). Mitochondrial poly(A) polymerase from a poorly differentiated hepatoma: purification and characteristics. *Biochemistry.* 14, 1025-1032.
- Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R. und Sbisà, E.** (1995). Human mitochondrial tRNA processing. *J. Biol. Chem.* 270, 12885-12891.
- Rubin, E., Beattie, D. S. und Lieber, C. S.** (1970). Effects of ethanol on the biogenesis of mitochondrial membranes and associated mitochondrial functions. *Lab Invest.* 23, 620-627.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-491.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T. und Kohda, D.** (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* 26, 4777-4787.
- Samuels, D. C., Schon, E. A. und Chinnery, P. F.** (2004). Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet.* 20, 393-398.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Santel, A. und Fuller, M. T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.
- Sato, T. und Tauchi, H.** (1975). The formation of enlarged and giant mitochondria in the aging process of human hepatic cells. *Acta Pathol. Jpn.* 25, 403-412.
- Scheffler, I. E.** (2001). Mitochondria make a come back. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, 3-26.
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H. und Craig, E.** (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10206-10211.
- Schon, E. A., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Nakase, H., Zeviani, M. und DiMauro, S.** (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science.* 244, 346-349.
- Schultz, B. E. und Chan, S. I.** (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 23-65.
- Schwartz, M. und Vissing, J.** (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347, 576-580.

Literaturverzeichnis

- Seibel, P., Trappe, J., Villani, G., Klopstock, T., Papa, S. und Reichmann, H.** (1995). Transfection of mitochondria: strategy towards a gene therapy of mitochondrial DNA diseases. *Nucleic Acids Res.* 23, 10-17.
- Shadel, G. S. und Clayton, D. A.** (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 409-435.
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M., Seibel, P., Ballinger, S. W. und Wallace, D. C.** (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell.* 61, 931-937.
- Shoubridge, E. A.** (2001). Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2277-2284.
- Shuster, R. C., Rubenstein, A. J. und Wallace, D. C.** (1988). Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1360-1365.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C.** (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13207-13212.
- Silvestri, G., Ciafaloni, E., Santorelli, F. M., Shanske, S., Servidei, S., Graf, W. D., Sumi, M. und DiMauro, S.** (1993). Clinical features associated with the A->G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology.* 43, 1200-1206.
- Simpson, L. und Shaw, J.** (1989). RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell.* 57, 355-366.
- Slutsky-Leiderman, O., Marom, M., Iosefson, O., Levy, R., Maoz, S. und Azem, A.** (2007). The interplay between components of the mitochondrial protein translocation motor studied using purified components. *J. Biol. Chem.* 282, 33935-33942.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. und van der Bliek, A. M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 12, 2245-2256.
- Spelbrink, J. N.** (2009). Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: History, recent developments, and future challenges. *IUBMB. Life.* 62, 19-32.
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G. M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H. T., Zeviani, M. und Larsson, C.** (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 223-231.
- Suissa, M. und Schatz, G.** (1982). Import of proteins into mitochondria. Translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondria-bound cytoplasmic polysomes. *J. Biol. Chem.* 257, 13048-13055.
- Sulo, P., Groom, K. R., Wise, C., Steffen, M. und Martin, N.** (1995). Successful transformation of yeast mitochondria with RPM1: an approach for in vivo studies of mitochondrial RNase P RNA structure, function and biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 23, 856-860.

- Sutovsky, P., Navara, C. S. und Schatten, G.** (1996). Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. *Biol. Reprod.* 55, 1195-1205.
- Suzuki, K.** (1969). Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with cuprizone. *Science.* 163, 81-82.
- Taanman, J. W.** (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta.* 1410, 103-123.
- Tamura, Y., Harada, Y., Shiota, T., Yamano, K., Watanabe, K., Yokota, M., Yamamoto, H., Sesaki, H. und Endo, T.** (2009). Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *J. Cell Biol.* 184, 129-141.
- Tanaka, M., Borgeld, H. J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J. S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K., Shamoto, M., Fuku, N., Kurata, M., Yamada, Y., Nishizawa, K., Akao, Y., Ohishi, N., Miyabayashi, S., Umemoto, H., Muramatsu, T., Furukawa, K., Kikuchi, A., Nakano, I., Ozawa, K. und Yagi, K.** (2002). Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *J. Biomed. Sci.* 9, 534-541.
- Tapper, D. P. und Clayton, D. A.** (1981). Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *J. Biol. Chem.* 256, 5109-5115.
- Tarrago-Litvak, L., Viratelle, O., Darriet, D., Dalibart, R., Graves, P. V. und Litvak, S.** (1978). The inhibition of mitochondrial DNA polymerase gamma from animal cells by intercalating drugs. *Nucleic Acids Res.* 5, 2197-2210.
- Tauchi, H. und Sato, T.** (1968). Age changes in size and number of mitochondria of human hepatic cells. *J. Gerontol.* 23, 454-461.
- Taylor, R. W., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M. und Lightowers, R. N.** (1997). Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat. Genet.* 15, 212-215.
- Taylor, R. W., Wardell, T. M., Lightowers, R. N. und Turnbull, D. M.** (2000). Molecular basis for treatment of mitochondrial myopathies. *Neurol. Sci.* 21, S909-S912.
- Teranishi, M., Karbowski, M., Kurono, C., Soji, T. und Wakabayashi, T.** (1999). Two types of the enlargement of mitochondria related to apoptosis: simple swelling and the formation of megamitochondria. *J. Electron Microsc. (Tokyo).* 48, 637-651.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350-4354.
- van Goethem, G., Martin, J. J. und Van, B. C.** (2003). Progressive external ophthalmoplegia characterized by multiple deletions of mitochondrial DNA: unraveling the pathogenesis of human mitochondrial DNA instability and the initiation of a genetic classification. *Neuromolecular. Med.* 3, 129-146.
- Veech, R. L., Gitomer, W. L., King, M. T., Balaban, R. S., Costa, J. L. und Eanes, E. D.** (1986). The effect of short chain fatty acid administration on hepatic glucose, phosphate, magnesium and calcium metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 194, 617-646.

Literaturverzeichnis

- Vellai, T. und Vida, G.** (1999). The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. Biol. Sci.* 266, 1571-1577.
- Wakabayashi, T.** (1999). Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim. Pol.* 46, 223-237.
- Wallace, D. C.** (1982). Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol. Rev.* 46, 208-240.
- Wallace, D. C.** (1986). Mitochondrial genes and disease. *Hosp. Pract. (Off Ed).* 21, 77-2.
- Wallace, D. C.** (1987). Maternal genes: mitochondrial diseases. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 23, 137-190.
- Wallace, D. C., Bunn, C. L. und Eisenstadt, J. M.** (1975). Cytoplasmic transfer of chloramphenicol resistance in human tissue culture cells. *J. Cell Biol.* 67, 174-188.
- Wallace, D. C., Bunn, C. L. und Eisenstadt, J. M.** (1977). Mitotic segregation of cytoplasmic determinants for chloramphenicol resistance in mammalian cells II: Fusions with human cell lines. *Somatic. Cell Genet.* 3, 93-119.
- Wallace, D. C., Lott, M. T., Shoffner, J. M. und Brown, M. D.** (1992). Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. *J. Inherit. Metab Dis.* 15, 472-479.
- Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J. und Nikoskelainen, E. K.** (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 242, 1427-1430.
- Wang, Y. und Bogenhagen, D. F.** (2006). Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 281, 25791-25802.
- Wasiak, S., Zunino, R. und McBride, H. M.** (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* 177, 439-450.
- Wiers, B. H.** (1971). Precipitation Boundaries in Calcium-Pyrophosphate and Calcium-Ethane-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonate Systems. *Inorganic Chemistry.* 10, 2581-2584.
- Wiesner, R. J., Ruegg, J. C. und Morano, I.** (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 553-559.
- Wills, E. J.** (1965). Crystalline structures in the mitochondria of normal human liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 24, 511-514.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. und Nunnari, J.** (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151, 341-352.
- Wong, T. W. und Clayton, D. A.** (1985). In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell.* 42, 951-958.
- Xu, B. und Clayton, D. A.** (1996). RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J.* 15, 3135-3143.

- Yamada, T., Inoue, T., Nishida, T., Furuya, E. und Tagawa, K.** (1988). Hepatic accumulation of pyrophosphate during acetate metabolism. *J. Biochem.* 104, 847-850.
- Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A. E., Jensen, R. E. und Endo, T.** (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* 283, 3799-3807.
- Yamasaki, T., Kurokawa, S., Watanabe, K. I., Ikuta, K. und Ohama, T.** (2005). Shared molecular characteristics of successfully transformed mitochondrial genomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 58, 515-527.
- Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H. T. und Holt, I. J.** (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell.* 111, 495-505.
- Yoneda, M., Tanno, Y., Horai, S., Ozawa, T., Miyatake, T. und Tsuji, S.** (1990). A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA(Lys) of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem. Int.* 21, 789-796.
- Zeviani, M. und Carelli, V.** (2007). Mitochondrial disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 564-571.
- Zhang, H., Barcelo, J. M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C. und Pommier, Y.** (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10608-10613.

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
ANT	Adenin-Nukleotid Translokator
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP6	ATP-Synthase Untereinheit 6
ATP8	ATP-Synthase Untereinheit 8
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
cDNA	<i>copy (complementary) DNA</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> , konfokales Laser Scanning Mikroskop
CMV	Cytomegalievirus
COX1	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 1
COX2	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 2
COX3	Cytochrom c-Oxidase Untereinheit 3
CPEO	<i>chronic progressive external ophthalmoplegia</i>
CSBI	<i>conserved sequence block 1</i> , konservierter Sequenzblock 1
CSBII	<i>conserved sequence block 2</i> , konservierter Sequenzblock 2
CSBIII	<i>conserved sequence block 3</i> , konservierter Sequenzblock 3
CsCl	Cäsiumchlorid
CTP	Cytosintriphosphat
CYTB	Cytochrom b
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan
ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
D-Loop	<i>displacement loop</i>

DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verbessertes grün fluoreszierendes Protein
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	reduziertes Flavinadenindinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
G	Guanin
H-Strang	<i>heavy strand</i> , schwerer Strang
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HMG	<i>high mobility group</i>
HSP1	<i>heavy strand promotor 1</i> , Promotor 1 des schweren Strangs
HSP2	<i>heavy strand promotor 2</i> , Promotor 2 des schweren Strangs
in Hg	<i>inches of mercury</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IT _{H1}	<i>initiation of transcription site on the heavy strand 1</i>
IT _{H2}	<i>initiation of transcription site on the heavy strand 2</i>
IT _L	<i>initiation of transcription site on the light strand</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KSS	<i>Kearns-Sayre syndrome</i>
lacZ	β-Galaktosidase
L-Strang	<i>light strand</i> , leichter Strang
LHON	<i>Leber's hereditary optic neuropathy</i>
LSP	<i>light strand promotor</i> , Promotor des leichten Strangs
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
MELAS	<i>mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and strokelike episodes</i>
MERFF	<i>myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease</i>
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIB	Mitofusin-Bindeprotein
MIP	<i>mitochondrial intermediate peptidase</i>
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Messenger-RNA
mtDNA	<i>mitochondrial DNA</i> , mitochondriale DNA
mtEGFP	an Mitochondrien angepasstes EGFP
mtHSP70	<i>mitochondrial heat shock protein70</i> , mitochondriales Hitzeschockprotein 70
mTERF	<i>mitochondrial termination factor</i> , mitochondrialer Terminationsfaktor
mtRNApol	<i>mitochondrial RNA polymerase</i> , mitochondriale RNA Polymerase
mtSSB	<i>mitochondrial single strand binding protein</i> , mitochondriales Einzelstrang-Bindeprotein
mtTFA	<i>mitochondrial transcription factor A</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , Ausschlußgenze
N-Terminus	Aminoterminus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid
Na ₂ HPO ₄	<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat
NARP	Neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ND1	NADH Dehydrogenase Untereinheit 1
ND2	NADH Dehydrogenase Untereinheit 2
ND3	NADH Dehydrogenase Untereinheit 3
ND4	NADH Dehydrogenase Untereinheit 4
ND4L	NADH Dehydrogenase Untereinheit 4L
ND5	NADH Dehydrogenase Untereinheit 5
ND6	NADH Dehydrogenase Untereinheit 6
NEA	<i>non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
OD	optische Dichte
O _H	<i>origin of heavy-strand replication</i> , Replikationsursprung des schweren Strangs
O _L	<i>origin of light-strand replication</i> , Replikationsursprung des leichten Strangs
ori	origin of replication, Replikationsursprung
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBF	<i>presequence binding factor</i> , präsequenzbindender Faktor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNA	<i>peptide nucleic acid</i> , Peptidnukleinsäure
PNK	Polynukleotidkinase
POLG	DNA-Polymerase γ
POLRMT	mitochondriale RNA-Polymerase
psi	<i>pounds per square inch</i> , Pfund pro Quadratzoll
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ρ^0 -Zellen	Zellen ohne mitochondriale DNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rNTP	<i>ribonucleoside triphosphate</i> , Ribonucleosid-5'-triphosphat
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur Reverse Transkription
SAP	<i>shrimp alkaline Phosphatase</i> , Alkalische Shrimp-Phosphatase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>saline-sodium citrate buffer</i>
STE	Sucrose-Tris-EDTA-Puffer
STEM	Sucrose-Tris-EDTA-Puffer mit Magnesiumchlorid
T	Tymin
Tab.	Tabelle
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA buffer</i> , Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAS	<i>termination associate sequence</i> , Terminations-assoziierten Sequenz
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i> , Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFAM	<i>mitochondrial transcription factor A</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
TFB1M	<i>mitochondrial transcription factor B1</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor B1
TFB2M	<i>mitochondrial transcription factor B2</i> , mitochondrialer Transkriptionsfaktor B2
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i> , Translokationskomplex der inneren Membran
T_m	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i> , Translokationskomplex der äußeren Membran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i> , Transfer-RNA
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i> , Transformations- und Lagerungslösung
TTS	Transkriptions-Terminations-Sequenz

Abkürzungsverzeichnis

U	Uracil <i>unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume/volume</i> , Volumen/Volumen
w/v	<i>weight/volume</i> , Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.1. Abbildungen

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondriums	2
Abb. 1-2:	Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette mit ihren fünf Proteinkomplexen.....	3
Abb. 1-3:	Genkarte des humanen mitochondrialen Genoms	6
Abb. 1-4:	Schematische Übersicht der <i>D-Loop</i> -Region in der humanen mtDNA sowie der daran ablaufenden Transkriptionsinitiation	9
Abb. 1-5:	Die zwei Modelle der mitochondrialen Replikation	13
Abb. 1-6:	Schema des Proteinimports in Mitochondrien	15
Abb. 2-1:	Vektorkarte von pMAG2-1	28
Abb. 2-2:	Vektorkarte von pMAG2-2	28
Abb. 2-3:	Vektorkarte von pEGFP-Mito.....	29
Abb. 2-4:	Vektorkarte von pEGFP-N1.....	29
Abb. 2-5:	Vektorkarte von pEGFP-OMP	30
Abb. 2-6:	Vektorkarte von pAR1219	30
Abb. 2-7:	Vektorkarte und MCS von pCR [®] II-TOPO [®]	31
Abb. 2-8:	Vektorkarte und MCS von pCR [®] -XL-TOPO [®]	32
Abb. 2-9:	Verwendete DNA-Längenstandards	37
Abb. 2-10:	Verwendeter Protein-Längenstandard.....	37
Abb. 3-1:	Darstellung des TOPO [®] -TA-Prinzips	69
Abb. 3-2:	Schematische Darstellung einer Replika-Platte	77
Abb. 3-3:	Zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe einer PCR-Reaktion	80
Abb. 3-4:	Strukturformel von DIG-11-UTP.....	81

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 3-5:	Aufbau der Blotting-Apparatur.....	83
Abb. 3-6:	Prinzip der Umsetzung von NBT/BCIP durch Alkalische Phosphatase.....	85
Abb. 3-7:	Aufbau des Western Blot-Stapels	96
Abb. 3-8:	Aufbau und Funktionsprinzip der Gene Gun.....	110
Abb. 4-1:	Vektorkarte von pMAG11-1	120
Abb. 4-2:	Vektorkarte von pMAG11-2.....	121
Abb. 4-3:	Vektorkarte von pMAG12-1	122
Abb. 4-4:	Vektorkarte von pMAG13-1	123
Abb. 4-5:	Vektorkarte von pMAG14-1	124
Abb. 4-6:	Vektorkarte von pMAG14-2.....	125
Abb. 4-7:	Vektorkarte von pMAG14-3.....	127
Abb. 4-8:	Vektorkarte von pMAG15-1	128
Abb. 4-9:	Vektorkarte von pMAG15-2.....	129
Abb. 4-10:	Vektorkarte von pMAG16-1	130
Abb. 4-11:	Vektorkarte von pMAG17-1	131
Abb. 4-12:	Vektorkarte von pCRII-TOPO-mtEGFP	132
Abb. 4-13:	Vektorkarte von pCR-XL-TOPO-T7.....	133
Abb. 4-14:	Schematische Ansicht des Transkriptionsnachweises für mtEGFP.....	134
Abb. 4-15:	Nachweis zur Transkription des mtEGFP-Gens durch PCR	135
Abb. 4-16:	Schematische Ansicht des Transkriptionsnachweises für die T7-RNA-Polymerase	135
Abb. 4-17:	Nachweis zur Transkription des T7-RNA-Polymerase-Gens durch PCR	136
Abb. 4-18:	Schematische Ansicht des Prozessierungsnachweises für mtEGFP.....	137
Abb. 4-19:	Nachweis zur Prozessierung des mtEGFP-Gens durch PCR.....	137
Abb. 4-20:	Ansicht des Prozessierungsnachweises für die T7-RNA-Polymerase.....	138
Abb. 4-21:	Nachweis zur Prozessierung des T7-RNA-Polymerase-Genes durch PCR.....	139

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 4-22:	Vektorkarte von pT7-Mito	141
Abb. 4-23:	Nachweis von pT7-Mito in transfizierten Zelllinien.....	142
Abb. 4-24:	SDS-PAGE zum Nachweis von T7-RNA-Polymerase in 143B.TK ⁻	143
Abb. 4-25:	Western Blot zum Nachweis von T7-RNA-Polymerase in 143B.TK ⁻	143
Abb. 4-26:	Lokalisierung der T7-RNA-Polymerase in 143B.TK ⁻ durch Immunfluoreszenz.....	145
Abb. 4-27:	Induktion von Megamitochondrien durch Natriumacetat.....	147
Abb. 4-28:	Megamitochondrien	148
Abb. 4-29:	Induktion von Megamitochondrien durch Essigsäure	150
Abb. 4-30:	Morphologieänderungen bei Megamitochondrien.....	151
Abb. 4-31:	Optimierung der Versuchsparameter zur Nutzung der <i>Gene Gun</i> , 15 und 20 in Hg.....	155
Abb. 4-32:	Optimierung der Versuchsparameter zur Nutzung der <i>Gene Gun</i> , 25 und 27 in Hg.....	156
Abb. 4-33:	Vergleichs-Transfektionsrate von FuGENE [®] HD	157
Abb. 4-34:	Induktion von Megamitochondrien durch Milchsäuremedium bzw. Zugabe von Valinomycin.....	159
Abb. 4-35:	Wachstumshemmung durch Behandlung mit Valinomycin	160
Abb. 4-36:	Sichtbarkeit der Megamitochondrien im Phasenkontrast	162
Abb. 4-37:	Aggregation der Goldpartikel durch mtDNA	163
Abb. 4-38:	Fluoreszierende Mitochondrien nach <i>Gene Gun</i> -Beschuss mit pMAG13-1	164
Abb. 4-39:	Fluoreszenz der MATra-A-Partikel	166
Abb. 4-40:	Fluoreszierende Mitochondrien nach Mikroinjektion mit pMAG13-1.....	168

10.2. Tabellen

Tab. 1-1: Unterschiede zwischen nukleärem und mitochondrialem Code	11
Tab. 2-1: Auflistung der verwendeten Zelllinien.....	25
Tab. 2-2: Auflistung der verwendeten Zellkulturmedien.....	26
Tab. 2-3: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme	27
Tab. 2-4: Auflistung der eingesetzten Oligodesoxynukleotide.....	33
Tab. 2-5: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	36
Tab. 3-1: Eingesetzte Antibiotika-Konzentrationen	47
Tab. 3-2: Auflistung der mit spezifischen Wellenlängen gemessenen Substanzen	61
Tab. 3-3: Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Trennbereiche für lineare DNA	62
Tab. 3-4: Pipettierschema für Trenngele bei der SDS-PAGE nach Laemmli.....	93
Tab. 3-5: Pipettierschema für Sammelgele bei der SDS-PAGE nach Laemmli.....	93
Tab. 3-6: Richtwerte für die Kultivierung von Zellen	99
Tab. 3-7: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ...	114
Tab. 4-1: Gruppeneinteilung der konstruierten mitochondrialen Expressionsvektoren	119
Tab. 4-2: Bestimmung der Transfektionsrate unter verschiedenen Reaktionsbedingungen	154

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich,

dass ich die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbständig angefertigt habe,

dass diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat,

und dass ich noch keine akademischen Doktorgrade erworben habe und früher auch noch nicht versucht habe einen akademischen Doktorgrad zu erwerben.

Würzburg, den 29.07.2011

Ingo Schäfer

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Seibel bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, diese Dissertation anzufertigen und dafür, dass er mir immer alle Freiheiten bei der Durchführung der Experimente gegeben hat.

Mein Dank für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar.

Ein weiterer Dank geht an Frau PD. Dr. Astrid Schön für die Hilfe bei der Durchführung von Methoden, die manchmal schon in Vergessenheit geraten waren.

Danke auch an Frau Angela Mühlberg für das Lösen aller Probleme und Fragestellungen, die während des Korrekturlesens aufgetaucht sind.

Bei Frau Christina Paul möchte ich mich für die Unterstützung bei einem Teil der Versuche und das Korrekturlesen recht herzlich bedanken.

Herrn Mario Krehan danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und musikalische Beschallung desselben.

Weiterhin danke ich allen weiteren namentlich nicht genannten aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Molekularen Zelltherapie für die gute Zusammenarbeit.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich dafür bedanken, dass sie mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.