

**Charakterisierung von Teratomcybriden mit der primären
LHON-Mutation G11778A**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr.rer.nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Susanne Schöler
geb. am 19.10.1976 in Mannheim

Gutachter: PD Dr. rer. Nat. E. Kirches
Prof. Dr. med. J. Weis

eingereicht am: 28.11.2007

verteidigt am: 04.07.2008

Danksagung

Ganz herzlich und in erster Linie danken möchte ich Herrn PD Dr. Kirches, für die Überlassung des Themas, die fachlich kompetente Unterstützung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen, unschätzbaren Tipps. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dietzmann bedanken, für die Möglichkeit in seinem Institut diese Arbeit anzufertigen, sowie die fachübergreifenden (Pausen-)Gespräche, die ich nach seinem Ausscheiden vermisst habe. Herrn Prof. Mawrin danke ich für seine fachlichen Anregungen. Fr. Dr. Chamaon stand mir während eines Großteils dieser Arbeit mit Tipps und Tricks zu Seite, und soll daher nicht unerwähnt bleiben. Danke.

Nicht vergessen sein sollen ebenso die (technischen) Mitarbeiter/-innen des Institutes, Fr. Helmecke, Fr. Weber, Fr. Wunderlich, Fr. Hartmann, Fr. Zajontz und Herr Konrad, für ihre immer recht interessanten Tischgespräche. Fr. Schellhase führte mich in die Zellkulturtechniken und den Laboralltag ein, und viele Sequenzierungen durch, wofür ich ihr danke. Herrn Pommer sei an dieser Stelle gedankt, für die experimentelle Kooperation.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben jedoch ebenso und gleichermaßen die Kooperation mit dem Institut für Neurologie (AG Prof. Siemen) und dem Institut für Neurobiologie (AG Dr. Kreutzmann) beigetragen. Mein Dank gilt deshalb beiden Instituten, sowie den technischen Assistentinnen Fr. Kaiser und Fr. Witzke, den Königinnen der Zählkammern. An dieser Stelle möchte ich besonders Fr. Dr. Hertel, Herrn Haroon, Herrn Dr. Kreutzmann und Fr. Dr. Winkler-Stuck erwähnen, in denen ich kompetente und humorvolle Mitstreiter gefunden habe. Herr Dr. Wartmann ermöglichte mir die Durchführung der Caspase-3 Assays, weshalb auch ihm mein Dank gilt, ebenso wie Herrn Weber, für seine Unterstützung in technischen Dingen.

Mein privater Dank geht vor allem an meine Familie, die mir in jeder Situation zur Seite stand und mir auch in dunklen Stunden den Rücken gestärkt hat. Ohne sie hätte ich es nie geschafft! Last but not least geht ein ebenfalls großes Dankeschön an meine Freunde, auch außerhalb Deutschlands, für ihre vielfältige Hilfe, Unterstützung und einfach unvergessliche Erlebnisse, die mein Leben bereichern.

Für Emma und Helmuth

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Mitochondrien	1-2
1.1.1.	Funktion der Mitochondrien	2-5
1.1.2.	Mitochondriale DNA	5-6
1.2.	Mitochondriopathien	6-7
1.2.1.	Durch mtDNA-Mutationen verursachte Erkrankungen	7
1.2.2.	Mitochondriale Enzephalomyopathien	7-8
1.3.	LHON: eine Zelltyp spezifische Erkrankung	8-13
1.4.	Antioxidative Mechanismen	14
1.5.	Transmitochondriale Cybridzellen	15
1.5.1.	Was sind Cybride?	15
1.5.2.	Gewinnung von Cybriden	16
2.	Zielsetzung	17-18
3.	Material	19
3.1.	Zellkulturlinien	19
3.2.	Primer	20
3.2.1.	RFLP Primer	20
3.2.2.	PCR- und <i>RT-PCR</i> Primer	20-21
3.2.3.	Sequenzierprimer	21
3.3.	Enzyme	21
3.4.	Antikörper	22
3.5.	Kits und Fertiglösungen	22-23
3.6.	Puffer und Lösungen	23-25
3.7.	Chemikalien und Reagenzien	25-28
3.8.	Geräte	28-29
3.9.	Verbrauchsmaterialien	29-30

4.	Methoden	31
4.1.	Zellkultur	31
4.1.1.	Zelllinien	31
4.1.2.	Versuche zur Herstellung eigener Cybride aus Neuroblastomzellen (SHSY-5Y)	31-32
4.1.3.	Kurzzeitdifferenzierung mit Retinolsäure in Neurobasalmedium	32
4.2.	Molekularbiologische Methoden	32
4.2.1.	DNA-Isolierung	32
4.2.2.	Genotypisierung	33-34
4.2.3.	RNA-Isolierung	34
4.2.4.	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	35
4.2.5.	PCR	35-36
4.2.6.	Polyacrylamidgele und Silberfärbung	37
4.2.7.	Quantitative PCR (<i>Real-Time PCR</i>)	37-38
4.2.8.	Mikrotiter-Tetrazolium-Test (MTT-Test).....	39
4.3.	Biochemische Methoden	40
4.3.1.	Proteinbestimmung	40
4.3.1.1.	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	40
4.3.1.2.	Proteinbestimmung nach Biuret	40
4.3.2.	Western Blot	41
4.3.2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41-42
4.3.2.2.	Proteindetektion mittels Immunreaktion (auf Western Blot)	42
4.3.3.	Enzymaktivitätsmessungen	43
4.3.3.1.	Glutathionperoxidase (GPx)	43
4.3.3.2.	Glutathionreduktase (GR)	43-44
4.3.3.3.	Superoxiddismutasen (CuZnSOD, MnSOD)	44-45
4.3.4.	Caspase-3 Assay	45
4.3.5.	ATP-Messung	45-46
4.3.6.	Bestimmung von Laktatkonzentrationen	46-47

4.3.7.	Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts	47-48
4.3.8.	Bestimmung des zellulären Sauerstoffverbrauchs	48-49
4.4.	Statistische Auswertung	49
5.	Ergebnisse	50
5.1.	Etablierung von Zellkulturbedingungen	50-51
5.2.	Genotypisierung	52-57
5.3.	Versuche zur Herstellung eigener Cybride aus Neuroblastomzellen (SHSY-5Y)	57-59
5.4.	Vitalität der NT2-Cybride unter Galaktosemedium und Apoptoseinduktoren	60
5.4.1.	Vitalität unter Stress in Glukose-freiem Galaktosemedium	60-62
5.4.2.	Überleben unter Apoptose-Induktoren	63-65
5.5.	Differenzierung von NT2-Cybriden mit Retinolsäure	65-69
5.6.	Atmungsmessungen	70-71
5.7.	Energetisierung der NT2/D1-Cybride	71-72
5.8.	Vitalität der NT2/D1-Cybride unter externem oxidativem Stress und neurotoxischen Substanzen	72-73
5.8.1.	Externer oxidativer Stress	73-76
5.8.2.	Ethanol und Methanol	77-78
5.8.3.	Beteiligung der Apoptose am H ₂ O ₂ -induzierten Zelltod von LHON-Cybriden	78-81
5.9.	Charakterisierung der antioxidativen Verteidigung der NT2/D1-Cybride	82
5.9.1.	Glutathion	82-84
5.9.2.	Expression antioxidativer Enzyme auf mRNA- und Proteinebene	85-87
5.9.3.	Enzymaktivitäten	88-89
6.	Diskussion	90
6.1.	Galaktose- versus Differenzierungs-Modell: Sind die Stressmodelle geeignet?	90
6.1.1.	ATP-Mangel ist nur unter metabolischem Stress erkennbar	90-91

6.1.2.	Galaktosemodell	91-92
6.1.3.	Differenzierung mit Retinolsäure	92-93
6.2.	Antioxidatives Verteidigungssystem	94
6.2.1.	Glutathion	94
6.2.1.1.	Verursachen LHON-Mutationen eine Glutathion-Depletion?	94-96
6.2.1.2.	Verstärkt eine Glutathion-Depletion die ATP-Depletion?	97-98
6.2.1.3.	Gibt es Hinweise auf ein verändertes Thiol-Redoxpotential bei Komplex I-Defekten mit chronischer <i>ROS</i> -Produktion?	98
6.2.1.4.	Die Thiolgruppen welcher Proteine des Energiestoffwechsels sind möglicherweise besonders <i>ROS</i> -sensibel?	98-99
6.2.2.	Ist die Aktivität antioxidativer Enzyme in LHON-Cybriden vermindert?	99-100
6.3	Führen LHON-Mutationen zur erhöhten Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress aus anderer Quelle?	101
6.3.1.	Externes H ₂ O ₂	101-102
6.3.2.	Substanzen mit <i>Redoxcycling</i>	102-103
6.4.	Staurosporin und Rezeptor-vermittelte Apoptose	103-105
6.5.	Ist das Cybridmodell ein geeigneter Standard zur Analyse von mtDNA-Mutationen?	105-107
6.6.	Resumee	107
6.6.1.	Erkenntnisse der bisherigen Literatur zum LHON-Mechanismus	107-108
6.6.2.	Stützt das NT2/D1-Modell diese Sicht?	108-109
6.6.3.	Weitere Untersuchungsansätze und Ausblick	109-110
7.	Zusammenfassung	111-112
8.	Abkürzungsverzeichnis	113-116
9.	Anhang	117
9.1.	Literaturverzeichnis	117-129
9.2.	Curriculum vitae	130
9.3.	Publikationsliste	131

1. Einleitung

Jeder Organismus setzt sich aus einer Vielfalt von Zellen zusammen, die miteinander in spezifischer Weise wechselwirken. Dieses Geflecht aus Aktion und Reaktion spiegelt sich auch auf zellulärer Ebene wieder - durch die Interaktion von Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren, Enzyme, etc.) in den Organellen der Zelle. Diese abgeschlossenen Kompartimente oder Reaktionsräume sind von einer (z.B. Lysosomen, Peroxisomen, endoplasmatisches Retikulum) oder mehreren Membranen (z.B. Zellkern, Mitochondrien) umgeben und ermöglichen somit, bestimmte Stoffwechselreaktionen unter definierten Bedingungen räumlich getrennt auszuführen.

1.1. Mitochondrien

Die Mitochondrien sind semiautonome Zellorganelle, welche im Zytosol aller eukaryotischen Zellen, außer den Erythrozyten, vorkommen. Diese 0,5 bis 10 μm langen Organellen sind von einer Doppelmembran umgeben, was sich phylogenetisch auf ihren evolutionären Ursprung als eigenständige Organismen zurückführen lässt (Endosymbiontentheorie (Schimper, 1883; Sagan 1967)). Die sie umgebende Doppelmembran unterteilt die Mitochondrien in vier Subkompartimente. Einerseits die Aussenmembran (AM) und die Innenmembran (IM), sowie andererseits die beiden wässrigen Reaktionsräume: den Intermembranspalt (IMS), und die Matrix, welche durch die IM umschlossen wird.

Die äußere Membran, die die Mitochondrien vom Zytosol abgrenzt, enthält zum Austausch von kleinen Molekülen (<4000- 5000 Da) und Ionen, Kanäle und Proteinkomplexe (z.B. Porin, TOM (*translocase of outer mitochondrial membrane*)) (Lill und Neupert, 1996). Im Gegensatz zur äußeren ist die innere Membran für die meisten kleinen Moleküle und Ionen, einschließlich H^+ , undurchlässig. Dies ist wesentlich für den Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung, deren Proteinkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran eingebettet sind. Zur Oberflächenvergrößerung der IM finden sich Einfaltungen, sogenannte Cristae, die tubuläre bis lamellenartige Formen annehmen können (Frey und Mannella 2000) und deren Struktur und Anzahl sowohl von der Gewebeart als auch den Wachstumsbedingungen abhängig sind (Perkins et al., 1998; Perkins et al., 2001; Mannella et al., 2001; Mannella 2006).

Der Im- und Export findet hier nur über bestimmte Transportsysteme statt, z.B. TIM (*translocase of inner mitochondrial membrane*) (Lill und Neupert 1996), mitochondriale Transporter für Anionen (z.B. Adenosin-Nukleotid-Transporter (ANT)), Transportsysteme für Redoxäquivalente (z.B. *Malat/Aspartat-shuttle*), und Kationentransporter.

In den Mitochondrien laufen Teilprozesse der Energiegewinnung und des Intermediärstoffwechsels ab, wie z.B. die oxidative Phosphorylierung, der Fettsäureabbau (β -Oxidation), die Häm-Biosynthese, der Zitronensäurezyklus und die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern (Scheffler, 2001).

1.1.1. Funktion der Mitochondrien

In Geweben mit gesteigertem Energiebedarf, wie Muskelfasern, Nerven- und Sinneszellen, findet sich eine erhöhte Anzahl Mitochondrien. Diese adaptive Anpassung beruht auf der Hauptaufgabe der Mitochondrien, der Synthese des wichtigsten Energieträgers der Zelle, dem Adenosintriphosphat (ATP).

Bei der **Atmungskettenphosphorylierung**, welche oft auch als **oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)** bezeichnet wird, kommt es zur Übertragung von Elektronen über in Serie geschaltete Enzymkomplexe (I bis IV) auf O_2 (Saraste, 1999) (s. Abb. 1). Die ATP-Synthese, welche in Komplex V (F_1F_0 -ATP-Synthase) stattfindet, ist hierbei an den Elektronentransport mittels eines elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran gekoppelt (**chemiosmotische Hypothese**, Mitchell, 1961). Die Energie für den Aufbau des Protonengradienten und damit der ATP-Synthese stammt aus der Potentialdifferenz zwischen primären Elektronendonatoren, wie NADH und Succinat, und molekularem Sauerstoff. Die Elektronen werden dabei durch eine Folge von Redoxreaktionen innerhalb der Atmungskette schrittweise übertragen. Als Elektronenakzeptoren und Donatoren fungieren hierbei eine Reihe prosthetischer Gruppen oder Coenzyme, wie Flavine, Ubichinone, Fe/S-Zentren und Cytochrome.

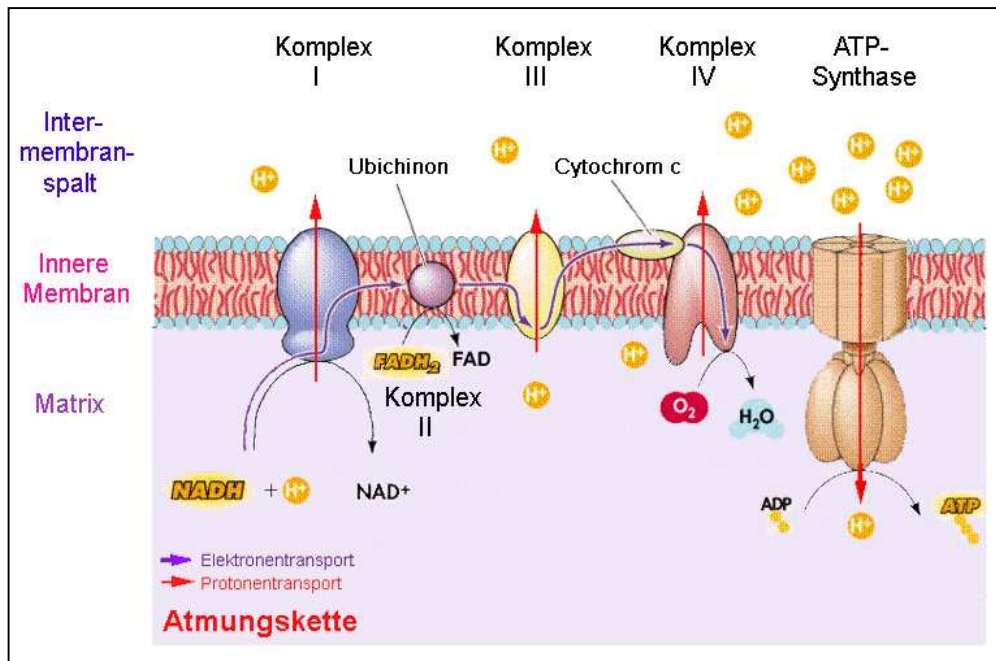


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Atmungskette

Serielle Übertragung von Elektronen entlang der Atmungskettenkomplexe (OXPHOS, lila Pfeile), welche mit einem Protonentransport (rote Pfeile) aus der Matrix in den Intermembranspalt, zum Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten, gekoppelt ist (chemiosmotische Hypothese). Bei der sich anschließenden ATP-Synthese fließen Protonen aus dem Intermembranspalt durch die ATP-Synthase in die Matrix. Modifiziert nach: www.homepages.compuserve.de/erichbeck2000/Bilder/Atmungskette_Innere_Membran_001.gif. 03.05.2007.

Der mit Abstand grösste Enzymkomplex der Atmungskette ist die 940 kDa grosse, transmembrane **NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase** (NADH Dehydrogenase; Komplex I), welche sich aus 46 Untereinheiten, von denen nur sieben mitochondrial kodiert werden (Carelli et al., 2004a), zusammensetzt (Löffler et al., 2006). Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase oxidiert das v.a. im Citratzyklus, der β -Oxidation und durch Pyruvatdehydrogenase (PDH) gebildete NADH und reduziert Ubichinon, einen mobilen Elektronenüberträger in der inneren Mitochondrienmembran. Durch die freiwerdende Redoxenergie können vier Protonen in den Intermembranraum transportiert werden. Der Komplex I lässt sich durch Chinonanaloge, z.B. Rotenon, oder höhere Konzentrationen an Barbituraten, wie Amytal, hemmen (Berg et al., 2003).

Der zweite Komplex der Atmungskette, die **Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase**, ist bedeutend kleiner und besteht aus 4 Untereinheiten. Die zwei hydrophilen Untereinheiten entsprechen der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyclus, bei dem Succinat zu Fumarat oxidiert wird. Als prosthetische Gruppe dient FAD (FADH_2), welches seine Elektronen ebenfalls auf Ubichinon überträgt. Das reduzierte Coenzym Q wird durch die aus elf Untereinheiten bestehende **Ubi-hydrochinon:Cytochromc-Oxidasereduktase** (Komplex III) reoxidiert, wobei erneut Proto-

nen in den IMS transloziert werden. Zum Transfer der Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff dient der vierte Komplex der Atmungskette, die aus 13 Untereinheiten bestehende **Cytochrom c-Oxidase** (Shoubridge, 2001; Zeviani et al., 2003).

Die pilzförmige **F₁-F₀-ATP-Synthase** ist der fünfte und letzte OXPHOS-Komplex, welcher sich aus 16 Untereinheiten zusammensetzt. Der F₀-Teil bildet einen Protonenkanal durch die innere Mitochondrienmembran, während der F₁-Teil in die Matrix hineinragt. Nur der vollständige F₀/F₁-Komplex ist zur ATP-Synthese, durch Ausnutzung der im elektrochemischen Protonengradienten ($\Delta\Psi$) gespeicherten Energie, in der Lage. Dabei fließen die durch den Elektronentransport in den Intermembranspalt transferierten Protonen über die F₀-Untereinheit zurück in den Matrixraum, wobei die F₁-Untereinheit ADP zu ATP phosphoryliert (Löffler et al., 2006).

Die Komplexe I und III der Atmungskette sind die Hauptquelle für die Bildung von intrazellulären, reaktiven Sauerstoffspezies (*ROS*), welche Zellschäden auslösen (Turrens, 1997; St-Pierre et al., 2002; Li et al., 2003, Muller et al., 2003; Kudin et al., 2005). Gleichzeitig stellen die Komplexe der Atmungskette jedoch auch ein Hauptziel für die *ROS*-vermittelten Schädigungen dar (Hillered und Ernster, 1983; Zhang et al., 1990).

Mittlerweile werden eine Reihe von Krankheitsbildern, wie z.B. Krebs, Diabetes Typ II, Arteriosklerose, chronische Entzündungsprozesse, sowie diverse neurodegenerative Erkrankungen im Zusammenhang mit oxidativem Stress diskutiert (Dröge, 2002; Schapira und DiMauro, 2002; Wallace, 2005).

Im Rahmen eines bestimmten Zelltod-Modus, der Apoptose, spielen die Mitochondrien eine entscheidende Rolle (Kroemer und Reed 2000; Goldenthal und Marin-Garcia, 2004). Dies geschieht v.a. durch die Freisetzung bestimmter proapoptotischer Proteine. Diese sind in vitalen Zellen auf die Mitochondrien beschränkt. Dazu gehören z.B. Cytochrom c, Endonuclease G, Smac/Diablo (Bernardi et al., 1999; Bernardi et al., 2001; Kuwana und Newmeyer 2003; Gibson, 2005). Im weiteren Verlauf kommt es zur ATP-abhängigen Bildung des Apoptosoms. Es besteht aus dem zytoplasmatischen Protein Apaf-1 (apoptotischer Protease-aktivierender Faktor 1), ATP, und aus dem Intermembranspalt freigesetztem Cytochrom c. Das aktive Apoptosom initiiert eine Kaskade proteolytischer Enzyme, beginnend mit Caspase 9. Dies löst in der Effektorphase schließlich Caspase 3 und andere Caspasen (v.a. 6 und 7) aus, was letztendlich zum Zelltod führt.

Ferner sind Mitochondrien an der zellulären Kalzium-Homöostase beteiligt, da sie in der Lage sind, Kalziumionen aufzunehmen, zu speichern und wieder abzugeben (Brookes et al., 2004; Nicholls, 2005).

1.1.2. Mitochondriale DNA

Eine Besonderheit der Mitochondrien besteht in der maternalen Vererbung einiger weniger Untereinheiten von OXPHOS-Komplexen über das Plasma der Eizelle. In Einzelfällen wurde eine paternale Vererbung beobachtet (Schwartz und Vissing 2002; Zsurka et al., 2005), doch stellt dieser Erbmodus offenbar eine seltene Ausnahme dar. Der Grund des maternalen Erbgangs einiger OXPHOS-Untereinheiten besteht darin, dass ihre Gene auf der mitochondrialen DNA (mtDNA) liegen. Die Mitochondrien verfügen über ihr eigenes Genom (Nass und Nass, 1963), welches sich als doppelsträngiges, zirkuläres, intronfreies Molekül im Matrixraum befindet.

Diese humane mtDNA (Abb.2), welche 37 Gene enthält, umfasst ca. 16,6 kb. Die Gene kodieren 13 Untereinheiten der OXPHOS-Komplexe I, III, IV und V, 22 tRNAs und zwei rRNAs. Ein eigener Satz von tRNAs wird zur Synthese der 13 Polypeptide benötigt, weil die mitochondriale Proteinbiosynthese streng getrennt von der zytoplasmatischen im Matrixraum stattfindet. Mehr als 90% der Proteine, aus denen die Mitochondrien bestehen, sind jedoch nukleär kodiert. Diese werden im Zytoplasma synthetisiert (translatiert) und im Anschluss über eine komplexe Translokationsmaschinerie (TOM; TIM, s.o.) durch die beiden Mitochondrienmembranen transportiert (Neupert et al., 1990).

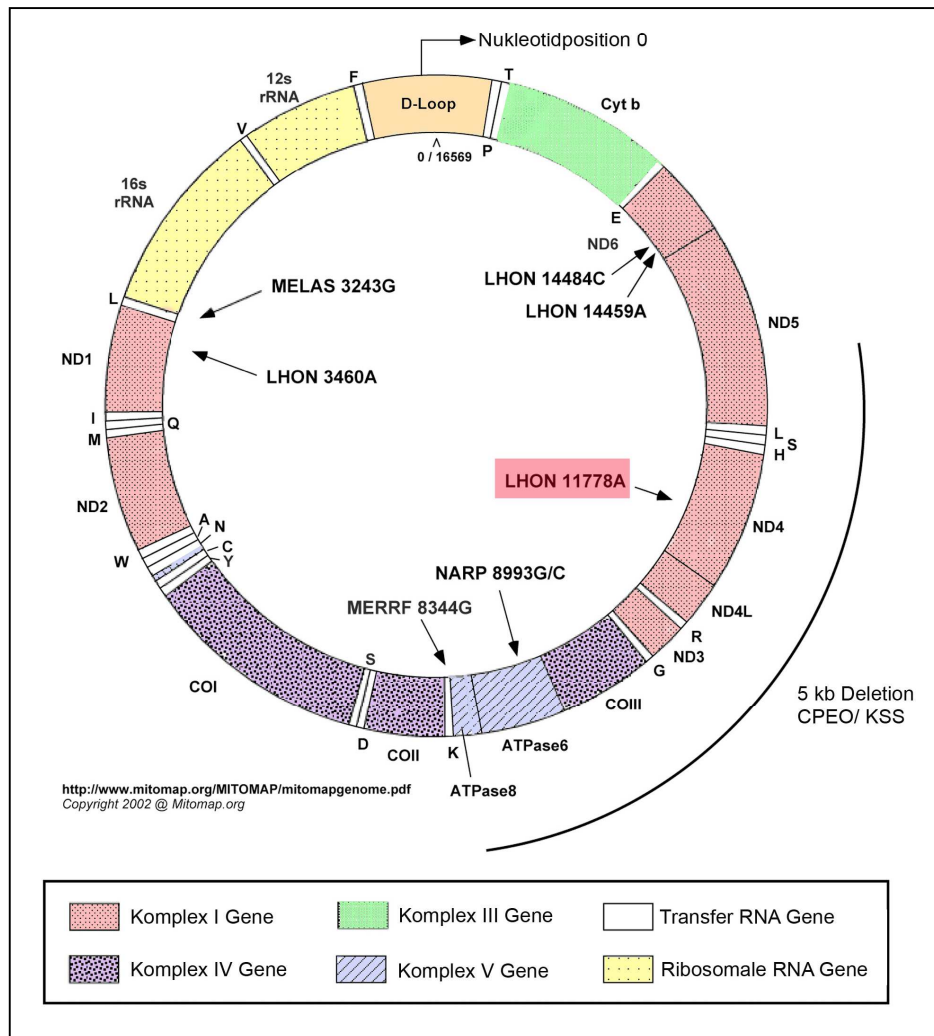


Abb. 2: Mitochondriale DNA, modifiziert nach www.Mitomap.org, Stand 21.11.2007

Die Abkürzungen LHON, MELAS, MERRF, NARP, KSS, CPEO bezeichnen z.T. auf den folgenden Seiten charakterisierte Mitochondriopathien. Die dazugehörigen Zahlenangaben stellen die Nukleotidposition (np) der entsprechenden Mutationen gemäss Cambridge-Referenzsequenz dar. Die Einbuchstabenabkürzungen bezeichnen tRNA-Gene entsprechend dem internationalen Code für Aminosäuren, die übrigen Abkürzungen kennzeichnen mitochondriale OXPHOS-Komponenten oder rRNAs, laut internationaler Vereinbarung. D-Loop= Displacement Loop (Kontrollregion von Transkription und Replikation).

1.2. Mitochondriopathien

Eine Reihe von Syndromen, die unter der Bezeichnung Mitochondriopathien zusammengefasst werden, sind zurückzuführen auf erworbene oder vererbte Mutationen des mitochondrialen Genoms (Schapira und DiMauro, 2002; Seppet et al., 2007). Die Ursachen der Mitochondriopathien sind dabei genauso breit gefächert wie deren klinischer Phänotyp. So können aufgrund von Mutationen der nukleären oder der mtDNA eines oder mehrere Proteine der β -Oxidation, des Fettsäuretransports, der Pyruvatverwertung, der Atmungskette oder der ATP-Synthese ge-

schädigt sein. In allen Fällen ergeben sich daraus Auswirkungen auf den gesamten Zellstoffwechsel, da letztendlich die energieerzeugende OXPHOS inhibiert wird (Schapira und DiMauro, 2002). Aus diesem Grund sind im Allgemeinen vornehmlich Organe und Gewebe betroffen, in denen besonders viel Energie benötigt wird, wie z.B. Skelettmuskulatur, Herz und Gehirn (Schapira und DiMauro, 2002).

1.2.1. Durch mtDNA-Mutationen verursachte Erkrankungen

In den 80-er Jahren wurden durch S. DiMauro und andere einige klinische Syndrome beschrieben und nachfolgend mit bestimmten mitochondrialen Mutationen assoziiert. Man bezeichnet diese, durch eine unmittelbare OXPHOS-Störung bedingten, Erkrankungen in der deutschsprachigen Literatur oft als „mitochondriale Enzephalomyopathien“. Dieser Terminus ist jedoch nicht vollkommen zutreffend, da die Erkrankungen nicht immer auf Muskulatur und Nervensystem beschränkt sind, sondern vielmehr Multisystemerkrankungen darstellen. Die in dieser Arbeit untersuchte Mitochondriopathie LHON hingegen stellt eine Ausnahme dar, da sie auf einen einzigen Zelltyp, die retinalen Ganglienzellen (*RGC*), beschränkt ist.

1.2.2. Mitochondriale Enzephalomyopathien

Den multisystemen Mitochondriopathien können verschiedene genetische Ursachen zugrunde liegen. Einerseits kann es zu singulären Deletionen der mtDNA, die einen Bereich von 2-8 kb umfassen, kommen (Holt et al., 1988; Gerbitz et al., 1990; Laforet et al., 1995). Diese führen phänotypisch z.B. zur Manifestation der chronisch progressiven, externen Ophthalmoplegie, kurz CPEO (Zierz, Jerusalem, Eger, 2003) oder dem Kearns Sayre Syndrom (KSS). Letzteres zeichnet sich durch Retinadegeneration, progressive externe Ophthalmoplegie und Herzblock aus (Kearns und Syre, 1958). Es können zudem Ataxie, Herzreizleitungsstörungen und erhöhtes Gesamteiweiß im Liquor (DiMauro et al., 1985), sowie ggf. weitere Symptome hinzukommen (Zierz, Jerusalem, Eger, 2003). Die Deletionen im Kilobasen-Bereich umfassen in der Regel ein oder mehrere tRNA-Gene, da diese über das ganze Genom verteilt sind (s. Abb. 2). Hierdurch kommt es zu einer gestörten mitochondrialen Proteinbiosynthese und in Folge dessen zu einer Defizienz der OXPHOS-Komplexe I, III, IV und V, welche eine mtDNA-kodierte Unter-einheit haben.

Andererseits können durch Punktmutationen auch direkt mitochondrial kodierte tRNAs betroffen sein. Auch hier betrifft der OXPHOS-Defekt dann fast alle Komplexe. Die beiden prominentesten Beispiele hierfür sind MELAS (Mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose

und schlaganfallähnliche Episoden) (Pavlakis et al., 1984) und MERFF (Myokloni, generalisierte Krampfanfälle, zerebelläre Ataxie und *ragged red fibers* (Fukuhara et al., 1980).

1.3. LHON: eine Zelltyp spezifische Erkrankung

Eine neurodegenerative Mitochondriopathie, bei der Punktmutationen ausschließlich Aminosäureaustausche im Komplex I der Atmungskette bewirken, ist die Lebersche hereditäre optische Neuropathie (LHON). Diese AS-Austausche führen zu einem vergleichsweise milden Phänotyp, denn sie erzeugen selbst bei Homoplasmie (100 % mutierte mtDNA) in der Regel ein relativ selektives Krankheitsbild (Optikusatrophie) und kein Multiorgansyndrom. LHON zeichnet sich durch den Verlust der retinalen Ganglienzellen (*RGC*), vor allem im Bereich der Makula, aus. Zum besseren Verständnis der betroffenen Gewebe sowie der involvierten Zellen bei LHON ist im Folgenden ein histologischer Querschnitt der Retina gezeigt (Abb. 3).

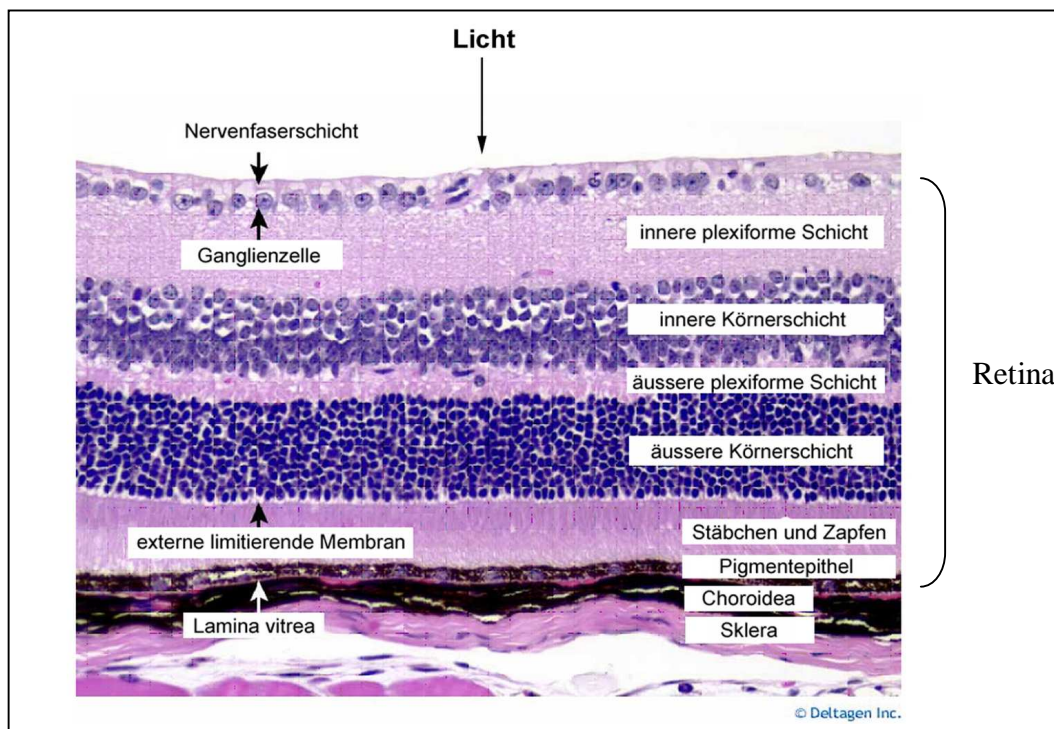


Abb. 3: Histologischer Querschnitt durch die hintere Wand des Augapfels

Die einschichtige Sklera ist die Aussenhaut, an die die ebenfalls einschichtige Choroidea angrenzt. Die Retina ist die innerste Augenhaut. Sie setzt sich aus verschiedenen Schichten zusammen: das retinale Pigmentepithel; die Rezeptorschicht, welche die Stäbchen und Zapfen enthält; die äußere Körnerschicht, mit den Zellkernen der Photorezeptoren; die äußere plexiforme Schicht, welche die Fortsätze der Rezeptoren enthält, sowie diese mit den Bipolar- und Horizontalzellen verschaltet; die innere Körnerschicht, welche aus den Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und den Müllerschen Stützzellen gebildet wird; die innere plexiforme Schicht, die die Fortsätze der Bipolar- und Amakrinzellen enthält, sowie die synaptische Verschaltung dieser mit den Ganglienzellen;

schicht, die Nervenfaserschicht, mit den Axonen der Ganglienzellen und die abschliessende innere Grenzmembran (nicht eingezeichnet). HE-Färbung, 40x-fache Vergrößerung. Quelle: www.deltagen.com/target/histology-atlas/atlas_files/sense/retina_40x.htm. 17.06.2007.

An der einschichtigen Sklera, der Aussenhaut, setzen die Augenmuskeln an, während die pigmentierte Choroidea reich an Blutgefässen ist und somit die angrenzenden Schichten (Sklera und äußere Retina) mit Nähr- und Sauerstoff versorgt.

Die einzelnen Schichten der Retina sind entwicklungsbiologisch bedingt invers angeordnet, d.h. das ursprünglich anterior zum Vitreum gelegene Pigmentepithel grenzt nun an die Choroidea (Inversauge). Die Körnerschichten, welche aus Zellkörpern von Photorezeptoren oder Interneuronen bestehen, alternieren hierbei mit den plexiformen Schichten, welche sich aus Neuriten zusammensetzen. Die Axone der retinalen Ganglienzellen bilden den optischen Nerv (Cavelli et al., 2004a). Sie lassen sich unterteilen in die *Parvo-* (P-) Zellen, welche sich durch sehr viel kleinere dendritische Fortsätze sowie dünnere Axone auszeichnen, und die sogenannten *Magno* (M)-Zellen (Livingston und Hubel, 1987), welche im Vergleich hierzu sehr gross sind. Ebenso wie die Morphologie (Wall und Sadun, 1989) ist auch die Verteilung (Polyak, 1941, Fine und Yanoff, 1979) der *RGC*-Typen sehr heterogen. In der perifovealen Makula, dem Ort des schärfsten Sehens, finden sich über 90 % P-Zellen. Das Verhältnis von P- zu M-Zellen ist in der Makula sehr hoch (Glaser und Sadun, 1990), während es sich in der Peripherie der Fovea dem Verhältnis 1:1 angleicht. Darüber hinaus finden sich abseits der Makula insgesamt deutlich weniger *RGC*.

Das Papillomakuläre Bündel (PMB), welches sich hauptsächlich aus Axonen von P-Zellen zusammensetzt, zieht von der Makula zur Papille, der Durchtrittsstelle der Axone durch die Augenhaut. An dieser Stelle bilden die 1,2 Millionen Axone der Nervenfaserschicht (*NFL*) den optischen Nervenkopf, der orthogonal abknickt, die Kollagenschichten der Lamina cribrosa durchbricht und als optischer Nerv ins Hirn zieht (Sadun 1998; Ogden 1983).

Die Axone des optischen Nervs sind von einer Myelinschicht umgeben, die von den sie umgebenden Oligodendrocyten gebildet wird. Insgesamt machen die Oligodendrocyten 70% der glialen Zellen des optischen Nervs aus. Ein weiterer glialer Zelltyp sind die Astrozyten, welche z.T. entlang der schmalen Blutgefässe (Kapillaren und Arteriolen) angeordnet sind. Sie dienen der Etablierung der Blut-Hirn-Schranke (Glaser und Sadun, 1990). Die Axone der Nervenfaserschicht, anterior der Lamina cribrosa, sind unmyelinisiert. Sie sind stark Cytochrom-c Oxidase (COX)-positiv, d.h. in diesem Bereich finden sich viele Mitochondrien (hohe OXPHOS-Kapazität). Posterior weisen die Axone hingegen eine Myelinschicht auf. In diesem Axonabschnitt

(COX negativ) finden sich deutlich weniger Mitochondrien (Glaser und Sadun, 1990; siehe Abb. 4). Ein möglicher Grund liegt in der Energieversorgung der jeweiligen Axonteile. Im unmyelinisierten Teil des Axons findet eine langsamere Reizweiterleitung statt, die einen wesentlich höheren Energiebedarf hat (u.a. zur Aufrechterhaltung des elektrischen Plasmamembranpotentials). Im Vergleich dazu ist der posteriore, myelinisierte Teil desselben Axons dank der saltatorischen Übertragung zeitlich und energetisch effizienter (Waxmann, 1978). Diverse Studien dokumentieren eine inverse Beziehung zwischen der mitochondrialen Aktivität (Energieversorgung) und der Myelinisierung entlang von Nervus opticus Axonen bei Vertebraten (Minckler et al., 1976, Andrews et al. 1999, Bristow et al., 2002).

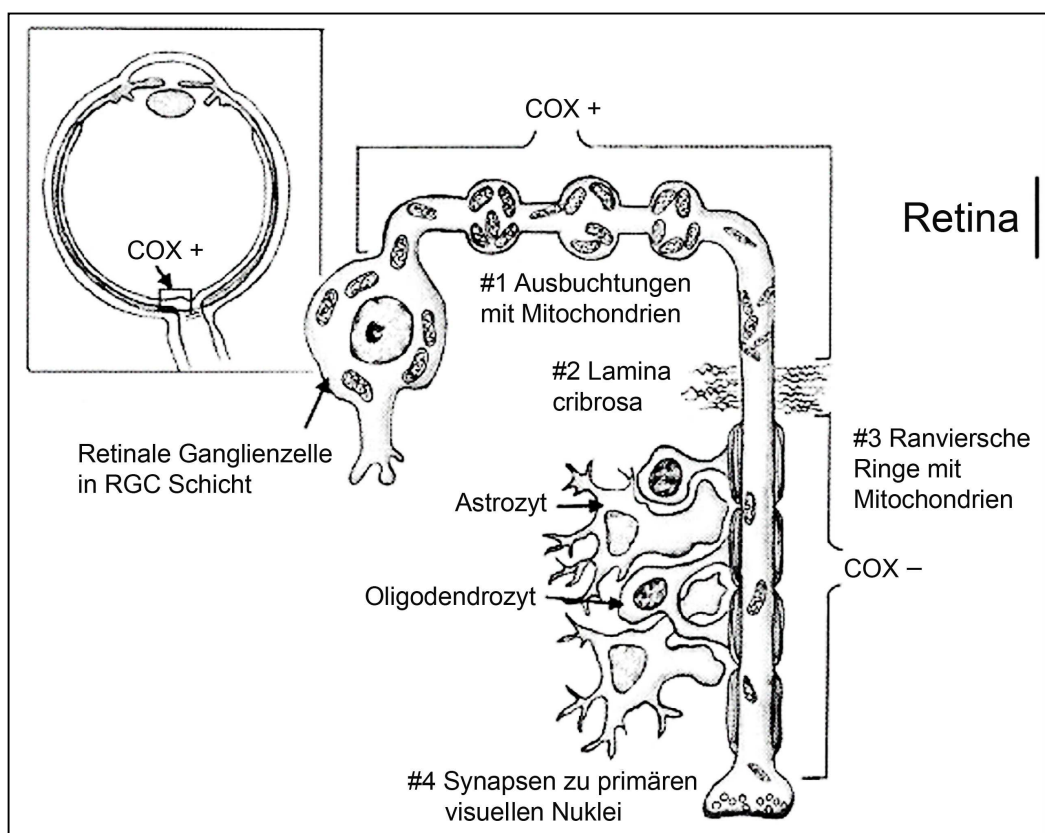


Abb. 4: Schematische Darstellung einer retinalen Ganglienzelle mit ihrem Axon

Modifiziert nach: Carelli et al., 2004a

Der unmyelinisierte, COX-positive Anteil der RGC-Axone macht diese sehr anfällig für bioenergetische Defizite, bzw. erhöht das Risiko für Schädigungen, die auf bioenergetische Defizite zurückzuführen sind (Howell, 1999, Carelli, et al., 2002). Darüber hinaus ist die Retina, aufgrund ihrer hohen Atmungsaktivität, eines der am stärksten Sauerstoff verbrauchenden Gewebe des menschlichen Körpers, mit der Folge sehr hoher Produktion toxischer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Yu und Cringle, 2006).

Bei der **Leberschen hereditären optischen Neuropathie (LHON)**, einem subakuten oder akuten centrocecalen, absoluten Skotom (Sehfeldverlust) (Carelli et al., 2004a), kommt es zum synchronisierten Absterben der meisten der 1,2 Mio. retinalen Ganglienzellen des optischen Nervs (Carelli et al., 2002). Hierbei gehen zu Beginn besonders die RGC der Makula (Axone des papillomakulären Bündels) unter.

Zu Beginn der Krankheit ist meist nur ein Auge betroffen, wobei das Zweite innerhalb von Tagen oder Wochen, in seltenen Fällen Jahren, folgt (Newman 1998; Carelli, 2002). Es tritt eine erhebliche Sehminderung auf, bei der in günstigen Fällen die Fähigkeit zum Zählen der ausgestreckten Finger einer Hand erhalten bleibt. Im schlimmsten Fall kommt es zur vollständigen Erblindung. Im Anfangsstadium zeichnet sich LHON durch drei Hauptmerkmale aus (Smith et al., 1973; Nikoskelainen et al., 1983; Nikoskelainen et al., 1984) (s. Abb 5):

- 1) circumpapilläre, teleangiektatische Mikroangiopathie
- 2) Schwellung der Nervenfaserschicht rund um die Papille → Pseudoödem
- 3) Fehlen von Gefässundichtigkeit bei der Fluoresceinangiographie, im Gegensatz zum echten Ödem

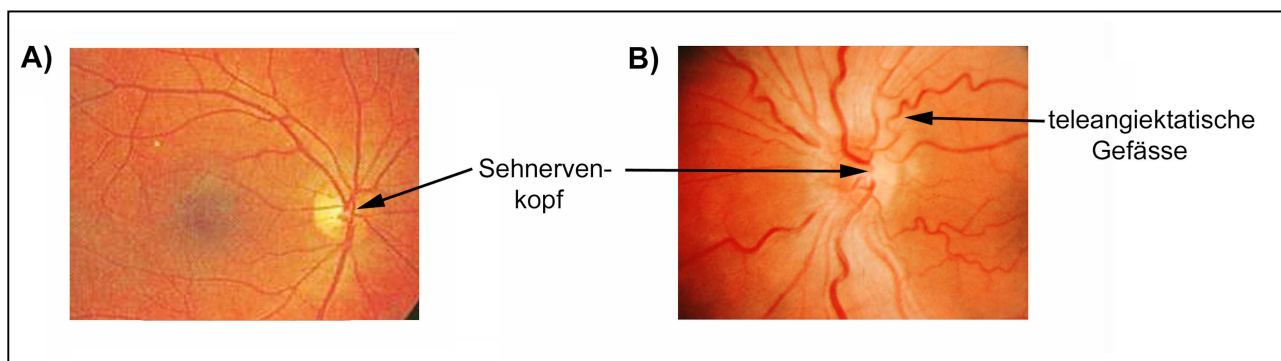


Abb. 5: Augenhintergrund eines a) Gesunden und b) LHON Patienten

In Abb. 5 A ist der Sehnervenkopf deutlich abgegrenzt, die Gefäße der Makula sind nicht degeneriert, während in Abb. 5 B die Papille geschwollen (Pseudoödem) und die Blutgefäße teleangiektatisch sind. Quelle: www.ruediger-weingarten.de. 19.06.2007.

Die Papille wirkt auf Grund des Pseudoödems hyperämisch mit gelegentlichen peripapillären Blutungen. Der Untergang der retinalen Ganglienzellen führt zunächst zur temporären Atrophie der Papille, mit partiellem Verlust des Farbsehens (Dyschromatopsie). Im fortschreitenden Verlauf kann die Papille verblassen (Carelli et al., 2004a). Des Weiteren wurden Fälle beschrieben bei denen diese Fundusveränderungen nur minimal ausgeprägt sind oder gänzlich fehlen. Die

Mikroangiopathie wurde z.T. auch bei asymptomatischen Familienmitgliedern, der maternalen Linie, festgestellt, wo sie über Jahre hinweg stabil war (Nikoskelainen et al., 1982).

Ultrastrukturelle Veränderungen im retolaminaren, myelinisierten Anteil der übrigen Axone (Carelli et al., 2002) fanden sich ebenso wie axoplasmatische Abnormalitäten, z.B. ungleichmäßige Akkumulation von Mitochondrien, zytoplasmatische Ablagerungen und Einschlüsse, sowie Veränderungen des Zytoskeletts. Ferner wurde eine hochvariable Demyelinisierung der RGC beschrieben. Es scheint eine enge Korrelation zwischen der Demyelinisierung und der Akkumulation der Mitochondrien in den betroffenen Fasern (RGC) zu bestehen (Carelli et al., 2004a). Erklären ließe sich dies als Reaktion auf die Demyelinisierung und den damit verbundenen, erhöhten Energiebedarf. Die Optikusatrophie mit dem permanenten, schweren Verlust der zentralen Sehkraft, stellt den meist irreversiblen Endpunkt der Krankheit dar.

Die 1858 erstmals symptomatisch von von Graefe (1858) beschriebene und als familiäres Krankheitsbild durch den Ophthalmologen Leber (1871) erkannte erbliche Mitochondriopathie, betrifft überwiegend junge Männer (im Alter von 20 bis 30 Jahren) und weist eine Prävalenz von 3,22: 100.000 in Nordengland (Man et al., 2003), bzw. von 1: ~25.000 (Chinnery et al., 2000) auf. Sie gilt somit als eine der häufigsten Mitochondriopathien (Chinnery et al., 2000). Die genetische Ursache lässt sich auf Punktmutationen der mtDNA zurückführen, welche ausschließlich Gene betreffen, die für Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette kodieren. Neben elf pathogenen Primärmutationen wurden mehrere Sekundärmutationen gefunden, bei denen man davon ausgeht, dass sie allein nicht pathogen sind, jedoch eine bestehende LHON-Mitochondriopathie phänotypisch verstärken, bzw. die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei gegebener Primärmutation erhöhen (Wallace, 1999).

Zwei Kennzeichen von LHON, die männliche Prävalenz sowie die unvollständige und variable Penetranz (Carelli et al., 2002), lassen sich nicht alleine auf die mitochondriale Mutation zurückführen. Es zeigte sich, dass in den meisten LHON-Familien die Träger der pathogenen Mutation für diese homoplasmisch sind. Jedoch entwickeln nicht alle maternal verwandten Mitglieder die Krankheit. In Familien mit einer sehr reduzierten Penetranz scheinen ausschließlich Männer betroffen zu sein (Sadun et al., 2003; Carelli et al., 2003). Je nach untersuchter Population kann die Penetranz von LHON unter männlichen Mutationsträgern zwischen ca. 25% und über 80% schwanken (Man et al., 2003, Mackey und Buttery, 1992; www.ncbi.nlm.nih.gov/omim 21.11.2007). Deshalb geht man davon aus, dass es zusätzlicher Einflüsse, wie z.B. eines nukleären Gens oder Umwelteinflüssen, wie z.B. Tabak- oder Alkoholo-

labusus (Sadun et al., 1994a und b), bedarf, um LHON zu manifestieren. Das X-Chromosom ist hierbei einer der favorisierten Kandidaten für einen modifizierenden, genetischen Faktor (Hudson et al., 2005), da ein rezessives X-Allel die männliche Prävalenz erklären würde. Trotz dieses intensiv diskutierten zwei-Loci Modells, konnte bislang kein entsprechendes Gen identifiziert werden (Bu und Rotter, 1991; Bu und Rotter 1992; Carelli et al, 2003).

Die drei häufigsten primären LHON-Mutationen äußern sich biochemisch unterschiedlich (Brown et al., 1999), wobei stets der Komplex I der *ETC* mehr oder weniger stark betroffen ist. Im Gegensatz zu 11778/ND4 und 14484/ND6 konnte für die 3460/ND1 Mutation eine verminderte Elektronentransportaktivität von Komplex I sicher nachgewiesen werden (Majander et al., 1991; Smith et al., 1994; Carelli et al., 1997; Carelli et al., 1999; Brown, 1999). Eine eingeschränkte Sensitivität für Rotenon, einen starken Komplex I Inhibitor (Antagonist zu Q-Intermediaten), wurde für die 11778/ND4 und 3460/ND1 Mutation beschrieben (Degli Esposti et al., 1994; Carelli et al., 1997; Cock et al., 1999; Majander et al., 1996).

Diese veränderte Rotenonsensitivität könnte auf eine alterierte Stabilität der Semichinon-Intermediate, welche im katalytischen Zyklus des Komplex I gebildet werden, zurückzuführen sein. Alles deutet darauf hin, dass die LHON Mutationen die Interaktion von Komplex I mit den Q-Substraten betreffen (Degli Esposti et al., 1994; Ghelli et al., 1997), d.h. dass die Atmungs-funktion auf dem Level der Chinol-Produkt Freisetzung oder der Protonenpumpe gestört ist. In jedem Fall ist die ATP-Synthese in LHON-Zellkulturen vermindert (Baracca et al., 2005), d.h. es könnte auf Grund einer Mutation zu einem Energiedefizit kommen (Zanna et al., 2003). Inwieweit sich die Dysfunktion auf die Energetisierung von *RGC* und des optischen Nerven auswirkt, ist bislang jedoch ungeklärt.

Darüber hinaus könnte es durch die Alteration in der Stabilität der Chinolbindung zu einer erhöhten *ROS*-Produktion kommen (Degli-Esposti et al., 1994; Carelli et al., 1997; Carelli et al., 1999; Carelli et al., 2002; Brown, 1999). Mittlerweile verdichten sich die Hinweise, dass die erhöhte *ROS*-Produktion und oxidativer Stress für die Pathophysiologie von LHON mitverantwortlich sind.

1.4. Antioxidative Mechanismen

Das antioxidative Verteidigungssystem der Zelle setzt sich sowohl aus enzymatischen als auch nichtenzymatischen Komponenten (z.B. Glutathion, andere Sulfhydrylgruppen, NADH sowie andere Reduktionsmittel) zusammen. Eine ganze Reihe antioxidativ wirkender Enzyme in der mitochondrialen Matrix und dem Zytoplasma katalysieren die Umwandlung der in der Atmungskette gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies (*ROS*) zum Endprodukt H_2O (Löffler et al., 2006). Zu diesen zählt neben der zytoplasmatischen Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (Cu-ZnSOD) deren mitochondriales Pendant, die Mangansuperoxiddismutase (MnSOD), die Glutathionreduktase (GR), die Glutathionperoxidase 1 (GPx1) und die Katalase (Löffler et al., 2006). Sowohl die CuZnSOD als auch die MnSOD wandeln einen Teil des in der Atmungskette entstehenden Superoxids (O_2^-) in H_2O_2 um. Die Reduktion des primären Abbauprodukts des Superoxids, das H_2O_2 , wird durch die Glutathionperoxidase (GPx1) katalysiert. GPx1 dient das Tripeptid Glutathion (GSH) als Co-Substrat. Die Glutathionreduktase, reduziert die oxidierte Form (GSSG) wieder zu GSH (s. Abb. 6).

Glutathion ist ein Tripeptid, welches sich aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein zusammensetzt und in fast allen Zellen in hoher Konzentration vorkommt. Mit seinen reduzierten Sulfhydrylgruppen wirkt es als eines der wichtigsten zellulären Reduktionsmittel. Die bei Redoxreaktionen, z.B. der GPx1-Reaktion, entstehende oxidierte Form des Glutathions (GSSG) wird hauptsächlich durch die Glutathionreduktase regeneriert, unter Einbeziehung von NADPH/ H^+ als Elektronendonator (s. Abb. 6). Ein verminderter Glutathiongehalt in der Zelle, etwa bei erhöhtem Verbrauch oder verminderter Synthese, führt letztlich zu einer verringerten Kapazität der antioxidativen Entgiftung.

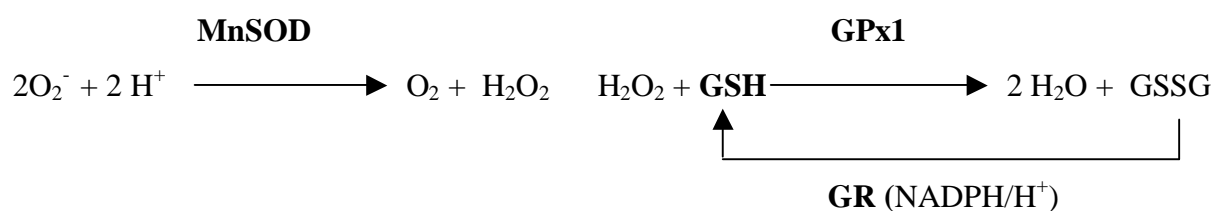


Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der antioxidativen Verteidigung gegen Superoxid aus der Atmungskette

Die Entgiftung des in der Atmungskette gebildeten Superoxidradikals zu H_2O geschieht in mehreren, enzymatisch katalysierten Teilschritten. MnSOD= Mangansuperoxiddismutase, GSH= reduzierte Form von Glutathion, GPx1 = Glutathionperoxidase, GSSG = oxidiertes Glutathion, GR= Glutathionreduktase.

1.5. Transmitochondriale Cybridzellen

1.5.1. Was sind Cybride?

Zur Untersuchung bzw. Aufklärung des Mechanismus von Mitochondriopathien werden seit knapp 20 Jahren (King und Attardi, 1989) transmitochondriale Zellen, sogenannte Cybride (**cy**-toplasmatische **Hybride**), verwendet. Zunächst sollten an diesen Zelllinien (Vergani et al., 1995; Hofhaus et al., 1996) bereits bestehende, biochemische Befunde von autoptischem Material (von LHON-Patienten) reproduziert werden, sowie etwaige Einflüsse des nukleären Genoms aufgedeckt werden (Cock et al., 1998). Neben Untersuchungen des Atmungskettendefekts (Robinson et al., 1992; Ghelli et al., 2003) besteht ein verstärktes Interesse in der Aufklärung des Untergangs der *RGC*, d.h. in der Charakterisierung des zugrunde liegenden apoptotischen Mechanismus (Danielson et al., 2002).

Die Besonderheit dieses Modells liegt in der direkten Vergleichbarkeit von Wildtyp versus Mutante. Beide Zelllinien haben einen identischen nukleären, genetischen Hintergrund und unterscheiden sich ausschließlich in ihrer mitochondrialen DNA. Hierdurch können störende Effekte, die auf nukleäre Ursachen zurückzuführen sind, im Vorfeld vermindert werden.

1.5.2. Gewinnung von Cybriden

Die Herstellung von Cybriden basiert auf der Polyethylenglukol (PEG)-induzierten Fusion von mtDNA-depletierten Rezipientenzellen (sogenannte ρ^0 -Zellen) mit sogenannten Zytoplasten aus enukleierten Fibroblasten des Patienten oder seinen Blutplättchen (King und Attardi, 1989). Letztere fungieren als mtDNA-Donorzellen.

Zur Gewinnung der benötigten ρ^0 -Zellen, wird die parentale Tumorzelllinie, z.B. die Osteosarkomlinie 143B.TK- oder die Teratomlinie NT2/D1 (s. Abb 7), über mehrere Wochen bis Monate mit einer sublethalen Dosis Rhodamin-6-G oder Ethidumbromid (EtBr) inkubiert. Das Rhodamin-6-G (EtBr) zerstört die mtDNA komplett, während die nukleäre DNA weitgehend intakt bleibt. Die daraus resultierenden Zellen sind Pyruvat und Uridin-auxotroph (King und Attardi, 1989). Der Verlust dieser Charakteristik dient als Selektionskriterium nach erfolgter Fusion.

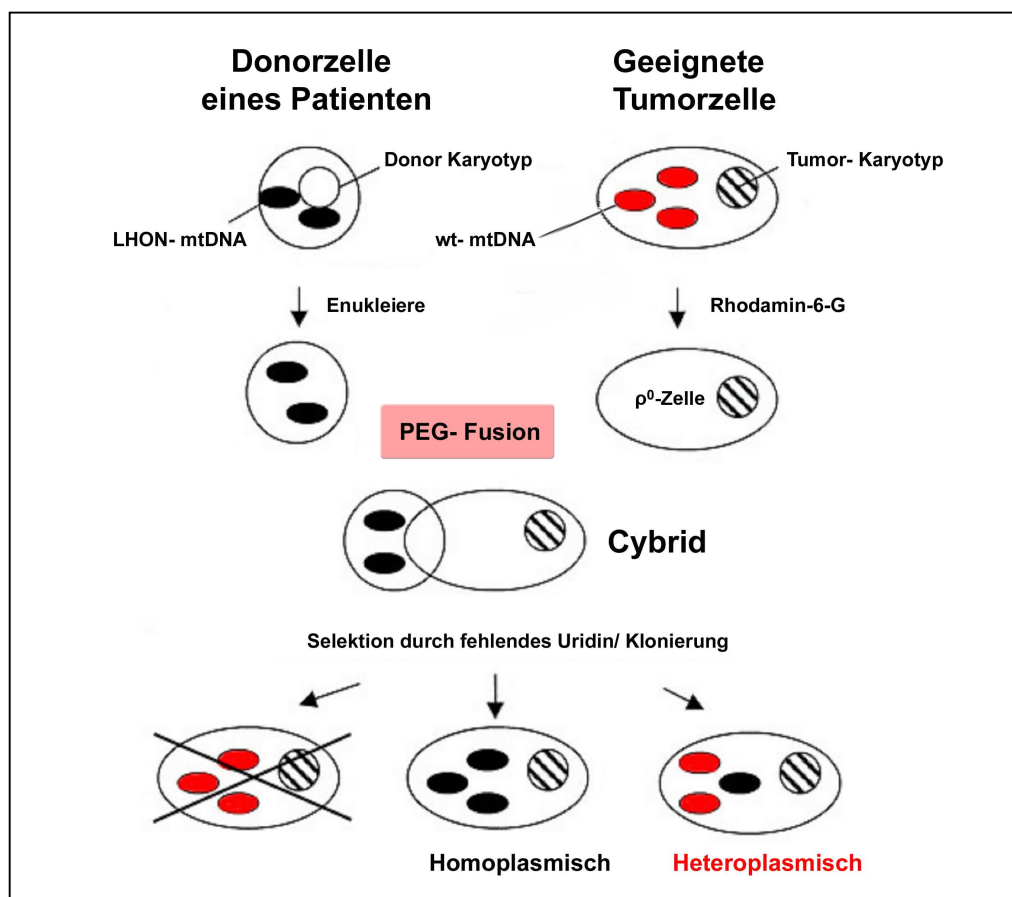


Abb 7: Schema zur Gewinnung von Cybridzellen

Durch Behandlung mit einer sublethalen Dosis Rhodamin-6-G werden geeignete Tumorzellen mtDNA depletiert, sodass Pyruvat- und Uridinauxotrophe ρ^0 -Zellen entstehen. Donorzellen (mtDNA) eines Patienten werden enukleiert, bzw. alternativ dessen Blutplättchen extrahiert. In einer anschließenden Polyethylenglykolfusion (PEG) dieser beiden Komponenten entsteht das Cybrid. Abschließend erfolgt eine Selektion durch fehlendes Uridin. Modifiziert nach: Wong et al., 2002.

2. Zielsetzung

Als eine wesentliche Ursache des plötzlich einsetzenden und schnell verlaufenden Untergangs der retinalen Ganglienzellen bei Patienten mit einer primären LHON-Mutation wird ein Energiedefizit, d.h. eine vergleichsweise plötzlich einsetzende Imbalance zwischen oxidativer ATP-Erzeugung und ATP-Verbrauch, angenommen. An einem Osteosarkomcybridmodell (143B.TK(-)) konnte in der Vergangenheit bereits eine verminderte ATP-Syntheserate mutierter Zellen nachgewiesen werden (Baracca et al., 2005). Die Hypothese einer ausschließlich durch ATP-Mangel verursachten Pathogenese scheint aufgrund jüngerer Erkenntnisse jedoch zweifelhaft zu sein. Daher wird vermutet, dass es im Verlauf dieser Erkrankung zusätzlich zu erhöhtem oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) aus dem mutierten Komplex I kommt. Dies könnte den (sub-)akuten Verlauf der Erkrankung besser erklären. Schon seit längerer Zeit wird bei Mitochondriopathien mit natürlichen Antioxidantien, wie z.B. Ubichinon, experimentiert. Bei der Friedreich Ataxie, einer mitochondrialen Erbkrankheit mit Beeinträchtigung der Atmungskette und erhöhter *ROS*-Produktion, wird derzeit bereits das Ubichinon-Analogon Idebenon therapeutisch genutzt (Mariotti et al., 2003; Buyse et al., 2003). Der Aspekt des oxidativen Stress` als Mitursache wurde bei LHON in der Literatur jedoch bislang kaum experimentell analysiert. Zudem beschränkten sich die aussagekräftigsten Arbeiten der Literatur zum LHON-Mechanismus auf ein einziges Cybridmodell (143B.TK(-)) unter metabolischem Stress, welcher durch Inkubation in Galaktosemedium ausgelöst wurde. Diese Zellen waren überdies aus einem einzigen ρ^0 -Klon der Zelllinie 143B.TK(-) hervorgegangen. Aus diesem Grund sollten an einem zweiten, unabhängigen Cybridmodell, welches auf der Teratomlinie NT2/D1 basiert, die folgenden Aspekte untersucht werden:

1) Auswirkungen von metabolischem Stress auf Teratomcybride

Es sollte geprüft werden, ob es Unterschiede bezüglich der Zellvitalität von Mutante versus Wildtyp in Galaktosemedium gibt. Ferner sollte nach Hinweisen oder Gegenbefunden dafür gesucht werden, dass es durch Galaktosemedium bzw. Andifferenzierung mit Retinolsäure zu der erwünschten Umschaltung des Energiestoffwechsels hin zur vermehrten Nutzung der Atmungskette kommt, welche die Wirkungen der Komplex I-Mutationen besser erkennbar machen soll.

2) Atmung und ATP

Die zellulären Atmungsraten, bedingt durch Komplex I der Atmungskette, und die Energetisierung (ATP-Gehalt) der Teratomcybride sollten bestimmt werden. Hierdurch sollte einerseits überprüft werden, ob sich die Hypothese einer verminderten Komplex I-Atmung der Mutante np11778 im Teratomcybridmodell bestätigt, und andererseits, ob diese primäre LHON- Mutation das postulierte Energiedefizit (Zanna et al., 2003) auch bei diesen Zellen erzeugt, obwohl es sich in Lymphozyten von LHON-Patienten nicht fand (Yen et al., 1998).

3) Apoptose-Sensitivität

Hierbei wurde nach Unterschieden in der Zellvitalität zwischen Mutante und Wildtyp nach Stimulation mit klassischen Apoptoseinduktoren, externem oxidativem Stress und anderen neurotoxischen Substanzen gesucht. Der Testung externer Oxidantien lag die Hypothese zu Grunde, dass das antioxidative Verteidigungssystem bei den Mutanten stärker gesättigt ist und deshalb ein geringerer externer Stimulus zur Induktion des Zelltods ausreicht. Ferner sollte geklärt werden, ob externer oxidativer Stress bei den Mutanten stärker Caspase-3 induziert als beim Wildtyp, obwohl am 143B.TK(-)-Cybridmodell z.T. ein von Effektorcaspasen unabhängiger Apoptose-Modus behauptet (Zanna et al., 2003 und 2005) und mit dem gleichzeitig vorliegenden ATP-Mangel begründet wurde.

4) Antioxidative Abwehrmechanismen

Ein weiteres Gebiet umfasste die Charakterisierung der bislang kaum untersuchten antioxidativen Abwehrmechanismen. Glutathiongehalt, Expression und Aktivität antioxidativer Enzyme sollten bei Mutanten und Wildtyp bestimmt werden, und zwar unter Bedingungen proliferierender Kulturen, wie auch nach Andifferenzierung mit Retinolsäure.

5) ρ^0 -Zellen aus Neuroblastomzellen

Ein Problem der Teratomcybride lag in der geringen Anzahl von vier verfügbaren Klonen, von denen außerdem nur drei mit Retinolsäure (RA) andifferenzierbar waren. Aus diesem Grund sollte in einem parallelen Ansatz untersucht werden, ob es möglich ist, aus der leichter differenzierbaren Neuroblastomlinie SHSY-5Y mit tragbarem Aufwand neue Cybridklone zu gewinnen. Dazu sollte die Effizienz der mtDNA-Depletion mit Ethidiumbromid zur Erzeugung von ρ^0 -Zellen getestet, sowie das Wachstumsverhalten und die Stabilität des mtDNA-Gehaltes dieser Klone beurteilt werden.

3. Material

3.1. Zellkulturlinien

Name	Herkunft		Bezugsquelle
NT2/D1 (*)	parentale Zelllinie	NT2/D1-Teratomezelllinien	ATCC, Manassas, VA, USA
CM	Cybrid, abgeleitet aus NT2/D1, Wildtyp		Prof. Cortopassi, Universität von Californien, Davis, CA, USA
11778-1 (*)	Cybrid, abgeleitet aus NT2/D1, Primäre LHON-Mutation		
MD	G11778A		
R3460-1 (*)	Cybrid, abgeleitet aus NT2/D1, Revertante der primären LHON-Mutation G3460A, daher Wildtyp		
CD _{wt}	Wildtyp-Cybrid	143 B.TK(-)- Osteosarkomezelllinien	Prof. Wei, Nationale Yang-Ming Universität, Taipeh, Taiwan
CD _{mut}	Mutante, enthält mitochondriale 5 kb „ <i>common deletion</i> “		

(*) = diese Zelllinien sind neuronal differenzierbar (Wong et al., 2002)

3.2. Primer

3.2.1. RFLP Primer

Name	Sequenz	Anlagerungs-temp. (°C)	Hersteller
LOH-NW in GPx1	5`-CTCCCCTTACAGTGCTTGTTTC-3` 5`-AGAAGGCATACACCGACTGG-3`	58°C	Biomers, Ulm
11778- Mutation	5`-ACTCAAACCTACGCACT-3` 5`-TATTTGATCAAACGTG-3`	55°C	
3460- Mutation	5`-CCTCCCTGTACGAAAGGAC-3` 5`-AGAAGAGCGATGGTGAGA-3`	58°C	
14484- Mutation	5`-CACCAAATCTCCACCTCCAT-3` 5`-CCCATCATACTCTTT CACCC-3`	55°C	
CD-Bruch- punkt	5`-CCCCTCTAGAGCCCCTGTA-3` 5`-GAGTGCTATAGGCGCTTGTC-3`	55°C	
hvr2	5`-CTATCACCCCTATTAACCACT-3` 5`-GTTAAAAGTGCATACCGCCA-3`	55°C	
p53 Exon 8	5`-ACTGCCTCTTGCTTCTCTTT-3` 5`-AAGTGAATCTGAGGCATAAC-3`	58°C	Eurogenetec, Seraing, Belgien

3.2.2. PCR und RT-PCR Primer

Name	Sequenz	Anlagerungs-temp. (°C)	Hersteller
CuZnSOD	5`-GGCATCATCAATTTTCGAGCA-3` 5`-CAAACCTCTATTATGTCGTC-3`	55°C	Eurogenetec, Seraing, Belgien
GPx1	5`-AAGGTACTACTTATCGAGAATGTG-3` 5`-GTACTTGAGGGAATTCAGAATC-3`	58°C	Biomers, Ulm
GR	5`-CAAGCCCACAATAGAGGTCA-3` 5`-ATCAGTGATGTCTTAGAACCCAG-3`	55°C	
GS	5`-GAGGGAGTATTGCTGAGGACG-3` 5`-GATGTCAAAGAGACGAGCGG-3`	60°C	
MnSOD	5`-GATAGCTCTTCAGCCTGCAC-3` 5`-CTTGCAGTGGATCCTGATTT-3`	55°C	

β 2MG	5`-CCAGCAGAGAAAAGTC-3` 5`-GATGCTGCTTGTCTCG-3`	58°C	Biomers, Ulm
γ -GCL	5`-CGAGGAGCTTCATGATTGTATC-3` 5`-GCCATGTCAACTGCACTTCTAG-3`	60°C	
<i>Random-Primer</i>	500 μ g/ml Hexanukleotide	42°C	

3.2.3. Sequenzierprimer

Name	Sequenz	Anlagerungs-temp. (°C)	Hersteller
11778-Mutation	5`-ACTCAAACACTACGCACT-3` 5`-TATTTGATCAAACGTG-3`	55°C	Biomers, Ulm
3460-Mutation	5`-CCTCCCTGTACGAAAGGAC-3` 5`-AGAAGAGCGATGGTGAGA-3`	58°C	

3.3. Enzyme

Name	Hersteller/Firma
<i>Hot-Start</i> Polymerase	Eurogentec, Seraing, Belgien
<i>Taq</i> -Polymerase (<i>Thermus aquaticus</i>)	
<i>Pfu</i> -Polymerase (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	New England Biolabs, Hitchin, Grossbritannien
Reverse Transkriptase (MuIV RT)	New England Biolabs, Hitchin, Grossbritannien
<i>Bsa</i> H1	New England Biolabs, Hitchin, Grossbritannien
<i>Sfa</i> N1	
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Laktatdehydrogenase (LDH)	

3.4. Antikörper

Name	Typ/Artikelbez.	Hersteller/Firma
Anti-Kaninchen Aktin , 1:200	A-2066	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Kaninchen CuZnSOD , 1:200	SA-117	Biomol, Plymoth Meeting, PA
Anti-Kaninchen GPx1 , 1:2.000	Ab16798	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen GR , 1:1.000	BP981	Acris, Hiddenhausen
Anti-Kaninchen MnSOD , 1: 5.000	SOD- 110	Stressgen, Ann Arbor, MI
Anti-Kaninchen, Peroxidase- gekoppelt		Amersham, Buckinghamshire, UK
Anti-Biotin, Peroxidase gekoppelt (Marker)		Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Biotin, Peroxidase- gekoppelter Antikörper		Cell Signaling, Danvers, MA, USA

3.5. Kits und Fertiglösungen

Produkt		Hersteller
ATP-Biolumineszenz Assay Kit CLS II		Roche Applied Science, Penzberg
Caspase-3 Assay Kit, Fluorimetrisch	CASP-3-F	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
cGPX-340 Assay Kit		Oxis International, Portland, Oregon, USA
DC Protein Assay Kit		BioRad, Hercules, CA, USA
ECL Western Blotting Analysis System		Amersham, Buckinghamshire, UK
GR-340 Assay Kit		Oxis International, Portland, Oregon, USA
Mentype Argus Y-MH Kit		Bio Type, Dresden
Mentype Nonaplex II PCR Kit		Bio Type, Dresden
Proteinmarker, vorgefärbt		BioRad, Hercules, CA, USA
QuantiTect Assay (<i>RT-PCR</i>)		Qiagen, Valencia, CA, USA

ROX 500 Standard		Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spin Tissue Mini Kit		Invitek, Berlin

3.6. Puffer und Lösungen

5-fach SDS-Probenpuffer:

250 mM Tris, pH: 6,8
 7,5% SDS
 30% Glycerin
 1% - β - Mercaptoethanol
 0,25% Bromphenolblau

Acryl-PDA:

7 g PDA
 362 ml 40%-iges Acrylamid
 648 ml Aqua dest.

APS-Lösung:

10 g APS
 ad 100 ml Aqua dest.

ATP-Probenpuffer:

100 mM TRIS
 4 mM Na₂-EDTA
 pH: 7,75

Blot-Puffer (pH: 8,3):

6,06 g Tris- Base (25 mM)
 22,52 g Glycin (150 mM)
 200 ml 10%-iges Methanol

Bradford Reagenz:

100 mg Coomassie Brillant Blue G-250
 50 ml 95%- Ethanol
 100 ml Phosphorsäure
 ad 1.000 ml Aqua dest.

Brain-Medium: 10 mM KH_2PO_4
60 mM KCl
60 mM Tris
110 mM Mannit
0,5 mM Na-EDTA
pH: 7,4

Entwicklerlösung für Silberfärbung von Gelen:

30 g/ l Natriumdicarbonat
0,5 ml/ l Formalin in Aqua dest.

Farbreagenz für GSSG/GSH-Messung:

7,25 ml Probenpuffer
3,75 ml 1 mM NADPH-Lösung
1,4 ml 2 mM DTNB-Lösung
20 *Units* GSH-Reduktase

Glutamatpuffer: 55,75 g L-(+)-Glutamat in 380 ml 1 M NaOH
ad 500 ml Aqua dest.

Laufpuffer (pH: 8,3): 15,1 g Tris-Base
72 g Glycin
5,0 g SDS
ad 5.000 ml Aqua dest.

Ponceau-Lösung: 0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Essigsäure

Puffer für GSSH/GSSG-Messung:

100 mM Na-Phosphat
1 mM EDTA
in Aqua dest.
pH: 7,5

Tris-Puffer: 90,75 g Tris-Base
5,21 ml 85%-ige Ameisensäure
ad 1.000 ml Aqua dest.

Tris-Succinat-Puffer (0,05 mol/l):

606 mg Tris
39,3 mg DTPA (Titriplex V)
in Aqua dest. lösen
mit Bernsteinsäure (0,05 mol/l) bei 25°C auf pH: 8,2 einstellen
ad 100 ml Aqua dest.

TBST: 1 x TBS
0,1% Tween-20

3.7. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Abkürzung/Summenformel/Trivialname	Bezugsquelle
1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridinium dichlorid	Benzylviologen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid hydrat	Paraquat, Pestanal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,2,3-Trihydroxybenzol	Pyrogallol	Merck, Darmstadt
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan	MTT Formazan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,4-Bis(acryl)piperazine	PDA	BioRad, Hercules, CA, USA
1,4-Dithio-DL-threitol	DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Hydroxybernsteinsäure	Malat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Vinylpyridin		Merck, Darmstadt
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	Hepes	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	DTNB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Nicotinamidadenindinukleotid	β -NAD	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acryl		Roth, Karlsruhe
Adenosindiphosphat	ADP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

All-trans-Retinolsäure	RA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	APS	Merck, Darmstadt
Ampicilin	Amp	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampullenwasser	Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
B27 Supplement, mit Oxidantien		Invitrogen, Karlsruhe
B27 Supplement, ohne Oxidantien		Invitrogen, Karlsruhe
Biotinylierter Grössenmarker		Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Bradford-Reagenz		Selbst hergestellt, s.u.
Bromphenolblau	BPB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Butandisäure	Bernsteinsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	CHCl ₃	Roth, Karlsruhe
DakoCytomation <i>Fluorescent Mounting Medium</i>		Dako Cytomation
Diethyltriaminpentaessigsäure	Titriplex V, DTPA	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Digitonin		Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ PO ₄ 2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe
DNA-Ladepuffer, reduzierend	Laemmli	Selbst hergestellt, s.u.
dNTPs		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dubelcco´s modifiziertes Eagle Medium	DMEM, <i>high glucose</i>	PAA, Pasching, Österreich
Dubelcco´s modifiziertes Eagle Medium, 1,5 % Bicarbonat	DMEM, <i>low bicarbonate, high glucose</i>	LGC Promochem, Wesel
Essigsäure		Roth, Karlsruhe
Ethanol	EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	EtBr	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	CH ₂ O	Roth, Karlsruhe
Formamid	HCONH ₂	Roth, Karlsruhe
Formylsäure (Methansäure)	Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Glycerin		Roth, Karlsruhe

GSH-Reduktase		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hank´s Puffer		PAA, Pasching, Österreich
Kaliumchlorid	KCl	Merck, Darmstadt
Laktat		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutaminsäure	Glutamat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver		Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	Roth, Karlsruhe
2-Hydroxybernsteinsäure	Malat	Roth, Karlsruhe
Methanol	MetOH	Mallinckrodt Baker, Griesheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin	TEMED	Serva, Heidelberg
Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat	NADPH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	NaOAc	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Neurobasalmedium	NB	Invitrogen, Karlsruhe
Oxidiertes Glutathion	GSSG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	PFA	Roth, Karlsruhe
Phenol		Roth, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid	PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	PAN, Aidenbach
Ponceau		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propan-2-ol	Isopropanol	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	RSA, BSA	PAA, Pasching, Österreich
Rotenon		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salpetersäure	HNO ₃	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	AgNO ₃	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat	SDS	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	2-ME	Roth, Karlsruhe
Standardmarker für Proteine		BioRad, Hercules, CA, USA
Sulfosalicylsäure	SSA	Roth, Karlsruhe

<i>Sybergreen</i>	SYBRgr	Qiagen, Valencia, CA, USA
Triethanolamin	TEA	Roth, Karlsruhe
Tris Base		Roth, Karlsruhe
Tris gepuffertes Salz	TBS	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl		Roth, Karlsruhe
Trizol		Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin		PAA, Pasching, Österreich
Tween-20		Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure	Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

3.8. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Digitalkamera	Powershot A 95	Canon, Amstelveen, Niederlande
<i>ELISA-Reader</i>	17 550	Anthos Labtec Instruments, Krefeld
Sonicator	UP 100 H	Dr. Hielscher, Teltow
Inkubator	Galaxy β	Nunc, Rochester, NY, USA
Inversmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Luminometer	TD-20/20 DLReady	Promega, Madison, WI, USA
Magnetrührer	Mono Vario MAG	H+P, Oberschleissheim
Mikrozentrifuge	Micro Centrifuge 110 VAC	Roth, Karlsruhe
Multistep pipette	Multipette Pro	Eppendorf, Hamburg
Netzgerät für Elektrophorese	Power Pack 25	Whatman Biometra, Göttingen
Oxopgraph	Oxygraph-2k	Oroboros, Innsbruck, Österreich
Phasenkontrastmikroskop	Eclipse, TE 300	Nikon, Düsseldorf
Photometer für Nukleinsäuremessungen	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe f. Zellkultur	Pipetus	Hirschmann, Herrenberg
Polyacrylamid	Multiphor 2	Pharmacia, Uppsala,

Elektrophoresekammer		Schweden
<i>RT-PCR</i> -Maschine	ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>Fluorescence Reader</i>	Safire	Tecan, Crailsheim
Scanner	CanoScan 4.200 F	Canon, Amstelveen, Niederlande
Sequenzer	ABI Prism C 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Homogenisator	Ultra- Turrax T 25 basic	IKA Werke, Staufen
Spektrophotometer	Cary 100	Varian Inc., Palo Alto, CA, USA
Sterilbank, Klasse 2	Herasafe 12	Heraeus, Hanau
<i>Thermocycler</i>	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpzentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortexer		Wilke & Witzel, Hamburg
Wasserbad	P5 E5	MS-L, Wiesloch
Western Blotapparatur	Mini Trans- Blot cell	BioRad, Hercules, CA, USA
Zentrifuge für Zellkultur	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge bis 2 ml	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

3.9. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
12-Lochplatte, steril	Cellstar TC	Greiner, Frickenhausen
24-Lochplatte, steril		Becton & Dickinson, Lincoln Park, NY, USA
48-Lochplatte, steril		Corning, NY, USA
6-Lochplatte, steril		Nunc, Rochester, NY, USA
96-Lochplatte, für <i>RT-PCR</i>		Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
96-Lochplatte, steril		Nunc, Rochester, NY, USA
Hyperfilm ECL		Amersham, Buckinghamshire, UK
Küvetten für ATP-Messung	UVette	Eppendorf, Hamburg

Mikroplatten, 96-Loch, weiss für Luminiszenz		Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefässe: 0,5 ml; 1,5 ml und 2,0 ml		Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulosemembran	Protran BA 85	Roth, Karlsruhe
Parafilm		Amersham, Buckinghamshire, UK
Pipettenspitzen	1 µl- 1 ml	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten	10 und 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röntgenfilme	Curix HAT 1.000 G Plus	AGFA, Mortsel, Belgien
Schaber	<i>Rubber Policeman</i>	Nunc, Rochester, NY, USA
Verpackungsfolie	Saran	The DOW Chemicals, Hamburg
Zellkulturflasche, 25 cm ² , steril		Greiner Bio- One, Frickenhausen
Zellkulturflasche, 75 cm ² , steril		Nunc, Rochester, NY, USA

4. Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1. Zelllinien

Bei den der folgenden Arbeit zugrunde liegenden Zelllinien handelt es sich um humane, trans-mitochondriale Zelllinien, sogenannte Cybride (s. Einleitung), welche aus Teratom- (NT2/D1) bzw. Osteosarkomzelllinien (143 B.TK(-)) hervorgegangen sind und uns von Prof. Cortopassi (Universität von Californien, USA) bzw. Prof. Wei (Nationale Yang Ming Universität, Taiwan) freundlicherweise überlassen wurden. Sie enthalten die häufigste LHON-Mutation G11778A bzw. die sog. 5 kb *common deletion* (Vgl. Tabelle in Abschnitt 3.1). Im Gegensatz zu allen übrigen stellt die parentale Kontrolllinie NT2/D1 kein Cybrid dar, da sie nicht die Prozedur von mtDNA-Depletion und Zytoplastenfusion durchlaufen hat.

Die NT2/D1-abgeleiteten Cybride wurden in DME-Medium (ATCC/PAN) mit verringertem Bicarbonatgehalt (1,5 g/l), 4,5 g/l Glucose, dem 10% FKS, und 1% Antibiotikastammlösung (Penicillin/Streptomycin, PAA) zugesetzt waren, kultiviert. Im Gegensatz dazu wurde bei den Osteosarkomcybriden DME-Medium (PAA) mit 50 µg/ml Uridin, 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l Bicarbonat, 10 % FKS und 1% Antibiotikastammlösung (Penicillin/Streptomycin) verwendet.

Alle Zelllinien wachsen adherent und wurden bei 37°C und 5 % CO₂ bei hoher Luftfeuchtigkeit in 25 cm² bzw. 75 cm² Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel alle 2- 4 Tage in Abhängigkeit von der Zelldichte. Zum Einsäen bzw. Vermehren wurden die Zellen mit Trypsin (0,5 mg/ml) abgelöst, mit 1 x PBS (Kalzium- und Magnesiumfrei) gewaschen, herunter zentrifugiert (1.000 rpm, +4°C, 10 Min.) und in der gewünschten Dichte ausgelegt.

4.1.2. Versuche zur Herstellung eigener Cybride aus

Neuroblastomzellen (SHSY-5Y)

Es wurde versucht, eigene Cybride aus Neuroblastomzellen herzustellen, da die Parentallinie SHSY-5Y neuronal differenzierbar ist. Hierzu wurde auf die Methode der mtDNA-Depletion durch chronische Ethidiumbromidvergiftung zurückgegriffen (King, Attardi 1989). Die Zellen wurden in mäßiger Dichte in 75 cm² großen Flaschen in DME-Medium eingesät. Nachdem sie eine adäquate Dichte erreicht hatten, wurde eine sublethale Dosis (5 µg/µl) Ethidiumbromid für 1 Woche zugesetzt, woraufhin ein Großteil der Zellen abstarb. Die überlebenden

Zellen wurden über einen Zeitraum von 2,5 Monaten mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 1,5 µg/µl inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wurde der mtDNA-Gehalt der auf diese Weise behandelten Zellen mittels *RT-PCR* (s.u.) überprüft. Die eingesetzten Primerpaare, hvr2 bzw. p53Exon8 (s.o.), amplifizieren Fragmente der mitochondrialen bzw. nukleären DNA. Sie erlaubten somit eine Bestimmung der mtDNA normiert auf das Kerngenom.

4.1.3. Kurzzeitdifferenzierung mit Retinolsäure in Neurobasalmedium

Die drei Linien NT2/D1, 11778-1 und R3460-1 lassen sich, im Gegensatz zu der MD-Linie, durch eine langfristige und aufwendige Behandlung mit Retinolsäure (RA) und Proteinbiosyntheseinhibitoren, auf einer Unterlage von Astrozyten, terminal neuronal differenzieren. Bei unseren Versuchen wurde auf eine solche terminale Differenzierung verzichtet. Stattdessen wurde eine Kurzzeitdifferenzierung durchgeführt, bei der die Zellen zu Beginn in geringer Dichte (750.000/75 cm² Flaschen) in DME-Medium ausgesät und über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Umstellung auf Neurobasalmedium (Serumfrei, Invitrogen), welchem 5% B27-Zusatz (mit Antioxidantien), RA (10 µM), 1% Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) und 2 mM L-Glutamin zugesetzt waren. Aus Gründen der geringeren Zellschädigung wurde im Gegensatz zur Ausgangsliteratur (Pleasure et al., 1992; Wong et al., 2002) nicht DMEM, *high glucose*, als Medium beibehalten. Die Zellen wurden insgesamt vier Tage bebrütet. Nach zwei Tagen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um eine gleichmäßige Konzentration an RA zu gewährleisten, da diese hitze- und lichtempfindlich und daher instabil ist. Sechs Stunden vor Versuchsbeginn wurden die andifferenzierten Zellen auf Neurobasalmedium ohne RA und mit B27 ohne Antioxidantien gesetzt.

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. DNA-Isolierung

Das Spin Tissue Mini Kit (Invitex, Berlin) wurde zur DNA-Isolierung aus Zellpellets (Zentrifugation für 10 Min. bei 1.000 rpm und +4°C) entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet. Die DNA-Konzentration in µg/µl wurde über die bei 260 nm photometrisch bestimmte optische Dichte ermittelt. Eine Extinktionseinheit bei 260 nm (OD₂₆₀) bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer Gesamt-DNA-Konzentration (dsDNA) von 0,05 µg/µl, wobei die Konzentrationsbestimmung automatisch erfolgte. Es wurde des Weiteren auf das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 nm zu 280 nm geachtet, anhand welchem man den Reinheitsgrad der DNA erkennen kann (optimal: 1,8).

4.2.2. Genotypisierung

Die Verifizierung des nukleären Genotyps aller Zelllinien wurde mittels Mentype® Nonaplex PCR mit freundlicher Unterstützung der AG Prof. Szibor, Institut für Rechtsmedizin der Otto-von-Guericke-Universität, durchgeführt. Hierzu wurden der Geschlechtmarker Amelogenin (Amelo) sowie diverse polymorphe, chromosomale Marker (D3S1358, D8S1179, ACT-BP2(SE33), TH01, FIBRA, D21S11, D18S51 und VWA) eingesetzt. Die nähere Analyse des Y-Chromosoms erfolgte mit dem Mentype® Argus Y-MH Kit, mit dem die folgenden Marker untersucht wurden: DYS19, DYS385-I, DYS385-II, DYS389-II, DYS390, DYS391, DYS392 und DYS393. Ferner konnte durch Sequenzierung der Hypervariablen Region 2 (hvr 2) der mitochondrialen D-Loop das mitochondriale Genom von NT2/D1-Tumorzellen von demjenigen aus Cybriden unterschieden werden.

Traten Allelverluste gemäß obiger PCR-Systeme auf Chromosomenarmen auf, die Gene der antioxidativen Verteidigung enthielten, so wurde der betreffende Locus näher analysiert. Dies wurde nötig für das Glutathion-Peroxidase-Gen (GPx1) auf Chromosom 3p. In diesem Fall wurde ein intragenischer polymorpher Marker (Alanin-repeat) ausgenutzt. Eingesetzt wurden die folgenden Primer und Bedingungen: 5`-CTCCCCTTACAGTGCTTGTC-3`, 5`AGAAG GCATACACCGACTGG-3` und 58°C *Annealing*-Temperatur.

Die homoplasmische mtDNA-Transition G11778A (Primäre LHON- Mutation), konnte mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und auch Sequenzierung nachgewiesen werden. Im Fall der Mutation G11778A schneidet das Enzym *Sfa*N1 die mtDNA nicht mehr. Des Weiteren sollte zu Beginn ebenfalls per RFLP und Sequenzierung geprüft werden, ob die Linie R3460-1 eine Mutation ihrer mitochondrialen DNA an der Nukleotidposition 3460 enthält oder nicht (Wildtyp). In diesem Fall wird im Restriktionsverdau nur der Wildtyp durch das Enzym *Bsa*H1 geschnitten. Die präzise Erkennung und Quantifizierung der 6-FAM-markierten PCR-Fragmente geschah über eine Kapillarelektrophorese auf dem 310 C-Sequencer. Der mitgeführte ROX 500-Standard erlaubte eine automatische Identifizierung der Fragmentlängen (Wildtyp/Mutante) mit Hilfe des Programms Gene Scan (Applied Biosystems). Die Bestimmung des *Common Deletion*-Bruchpunkts (143B.TK(-)-mut Cybrid) erfolgte durch eine *Primer-Shift*-PCR, bei der im Fall einer Deletion ein 350 bp Fragment mit den Primern 5`-CCCCTCTAGAGCCCACTGTA-3` und 5`-GAGTGCTATAGGCGCTTGT-C-3` unter den folgenden Bedingungen amplifiziert wurde: initiale Inkubation des Reaktionsansatzes bei 50°C für 2 Min., Aktivierung der *Hot-Start* Polymerase (95°C für 15 Min.), 40

Zyklen der Denaturierung (95°C), Primeranlagerung (*Annealing*, 55°C) und Polymerisation (72°C) für je 30 Sekunden. Der Nachweis der Deletion und der Reinheit des Produkts erfolgte auf einem 8%-igen, silbergefärbten Polyacrylamidgel.

Zur Überprüfung des Heteroplasmiegrades, als des Verhältnisses von mutierter zu Wildtyp mtDNA, wurde eine *Real-Time* PCR (s. 4.2.7.) auf hvr 2 und *CD* durchgeführt. Hierbei amplifizieren die hvr2-Primer die gesamte mtDNA (sowohl Wildtyp als auch Mutante), während die *CD*-Primer nur diejenigen Anteile der mtDNA vervielfältigen, die eine *common deletion* tragen. Liegt beispielsweise eine DNA vor, die mit den *CD*-Primern einen um 2 Zyklen höheren C_T -Wert hat, im Vergleich zu den hvr2-Produkten, dann ist in diesem Fall ca. 25% der mtDNA deletiert. Für eine bessere Schätzung der Heteroplasmie wurde jedoch berücksichtigt, dass der Amplifikationsfaktor pro PCR-Zyklus in der Realität unterhalb des Wertes zwei bleibt. Ferner muss eine möglichst geringe Differenz dieser Faktoren zwischen beiden PCR-Systemen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden bekannte Verdünnungsreihen von hvr2-Region und *CD*-Bruchpunkt mitgeführt, welche eine Berechnung der PCR-Effizienz erlauben (Schoeler et al., 2005).

4.2.3. RNA-Isolierung (Trizol)

Bei der Extraktion der Gesamt-RNA aus Zellen wurden diese zunächst in ein ml einer monophasischen Phenol-Guanidinisothiocyanatlösung (Trizol) lysiert, wodurch die Zellen aufgeschlossen, Proteine und RNasen denaturiert und präzipitiert bzw. inhibiert werden. Durch Zugabe von 200 μ l Chloroform, kurzer Inkubation (2-3 Min. bei Raumtemperatur) und anschließender Zentrifugation (10.000 *rpm*, +4°C, 15 Min.) separierte man die Lösung in eine wässrige Phase, welche die RNA enthielt, und eine organische Phase. Nach Isolierung der wässrigen Phase wurde die RNA durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol pro 600 μ l Volumen, Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation (10.000 *rpm*, 20°C, 10 Min.) gefällt. Es folgte ein Waschschrift mit 70%-igem Ethanol und eine kurze Trocknungsphase. Nach Aufnahme in DEPC-Wasser (30- 100 μ l) löste man die RNA durch 10-minütige Erwärmung auf 55-60°C (Thermomixer) und anschließende Abkühlung auf Eis. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde photometrisch (BioPhotometer) bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

4.2.4. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Mittels reverser Transkription ist man in der Lage, aus *mRNA* (Gesamt-RNA) cDNA herzustellen, welche man im weiteren Verlauf für die Durchführung von z.B. einer *Real-Time* PCR oder dem Einklonieren von eukaryotischen Genen in Prokaryoten benötigt. Für die Synthese der cDNA wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte Reverse Transkriptase, benutzt.

Die Herstellung von cDNA erfolgte in einer 20 μ l Reaktion aus 500 ng Gesamt-RNA nach dem folgenden Protokoll. Die Reverse Transkriptase benötigt zur cDNA-Synthese einen RNA-Einzelstrang, ohne Sekundärstrukturen, weshalb die Gesamt-RNA (Probe) für 10 Minuten auf 70°C erhitzt (Denaturierung) und fünf Minuten auf Eis abgekühlt wurde. Anschließend wurde der folgende Reaktionsmix zu 16,35 μ l Probe (= 500 ng RNA in DEPC-H₂O) gegeben:

1 μ l Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)
0,4 μ l *Random Primer* (500 μ g/ml Hexanukleotide)
2 μ l Reaktionspuffer (10-fach konzentriert)
0,25 μ l MuIV(*Moloney Murine Leukemia Virus*)-Transkriptase

und das Gemisch für 55 Minuten bei 42°C und 15 Minuten bei 70°C erhitzt.

Eine PCR auf β 2-Mikroglobulin wurde verwendet, um die Effizienz der cDNA-Synthese zu überprüfen.

4.2.5. PCR

Bei der PCR wird ein kurzer, genau definierter Teil eines DNA-Strangs mittels spezifischer Oligonukleotide, sogenannten *Primern*, und hitzebeständiger Enzyme, wie die *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase, amplifiziert. Die Produkte können anschließend auf einem Polyacrylamidgel durch Silberfärbung visualisiert werden.

Die entsprechenden Sequenzen der Primer sind unter Punkt 2.8 zu finden. Das folgende Protokoll wurde zur Durchführung der PCR auf β 2-Mikroglobulin verwendet, wobei der 25 μ l Reaktionsansatz auf andere PCR übertragbar ist, durch Änderung der *Annealtemperatur*, gemäss Punkt 3.2.:

Reaktionsansatz:

2,5 μ l	Puffer
1 μ l	cDNA oder 50-100 ng DNA
2 μ l (= 300 nM)	Vorwärtsprimer
2 μ l (= 300 nM)	Rückwärtsprimer
2 μ l (= je 200 μ M)	Nukleotidmix
1,5 μ l (= 1,5 mM)	MgCl
0,1 μ l (= 0,3 <i>Units</i>)	DNA-Polymerase
13,9 μ l	H ₂ O

Thermische Bedingungen:

95°C für 10 Minuten	
94°C für 1 Minute (Denaturierung)	} 30 Zyklen
55°C für 1 Minute (Bindung der Primer/ <i>Annealing</i>)	
72°C für 1 Minute (Extension)	
72°C für 5 Minuten	
4°C ∞	

Die erhaltenen *PCR*-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (s. folgenden Abschnitt) auf einem nicht-denaturierenden 8%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht und auf ihre Größe und Reinheit (Detektion bzw. Ausschluss von Artefakten) überprüft. Zur Längenbestimmung wurde eine Hae III-Spaltung von Φ X-174-DNA als Standard mitgeführt.

4.2.6. Polyacrylamidgele und Silberfärbung

Polyacrylamidgele werden eingesetzt um Proteine bzw. DNA-Fragmente entsprechend ihrer molekularen Größe elektrophoretisch aufzutrennen. In der vorliegenden Arbeit wurden 8%-ige Polyacrylamidgele zum Nachweise von PCR-Produkten bzw. 10%-ige oder 12%-ige Gele zur Durchführung von Western Blots (s. Abschnitt 4.3.2.) verwendet.

Gelzusammensetzung:

8%-ige PAA-Gele: gegossen zwischen zwei Glasplatten mit 0,5 mm dicken *Spacern* auf Trägerfolie
22,8 ml Acryl-PDA
17,2 ml Tris-Puffer
400 µl 10%-ige Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung
40 µl TEMED

Laufbedingungen: 5 Watt für 20 Min., danach 15 Watt bis zum Ende in einer Multiphor II-Horizontal Elektrophorese

Zur Fixierung der DNA-Produkte wurde das Gel für 3 Minuten in 3%-iger Salpetersäurelösung inkubiert und dreimal mit Aqua dest. gespült. Es folgte eine 20-minütige Lagerung in frisch angesetzter Silbernitratlösung (2 g/l in Aqua dest.), mit dreimaligem Spülen in Aqua dest. Die Entwicklung bis zur Sichtbarkeit der Banden fand in der entsprechenden Entwicklerlösung (s. Kap. 3.6.) statt und wurde durch zweiminütige Inkubation in 10%-iger Essigsäure gestoppt. Es schloss sich ein dreimaliger Spülschritt mit Aqua dest. an. Zur Konservierung des Gels wurde dieses für fünf Minuten in 5%-ige Glycerinlösung gegeben.

4.2.7. Quantitative PCR (*Real-Time PCR*)

Die *Real-Time PCR (RT-PCR)* beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, die darüber hinaus jedoch die Quantifizierung der Produkte, durch Fluoreszenzmessungen am Ende jedes Zyklus, beinhaltet (Higuchi et al., 1993, Ginzinger, 2002). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-*Green* interkaliert in die DNA, wodurch die Fluoreszenz proportional mit der Menge des PCR-Produktes zunimmt (Wittwer et al., 1997). Nach Abschluss der *RT-PCR* wurde zur Reinheitsbestimmung des Produkts eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Bestimmung der Kopienzahl einer Nukleinsäuresequenz in einer biologischen Probe geschieht dabei durch Vergleich mit einer Standardkurve auf der Basis des logarithmischen Zusammenhangs

zwischen Kopienzahl und C_t -Wert (Zykluszahl, bei der ein Fluoreszenzsignal erstmals erscheint). Die Kopienzahl in einer biologischen Probe hängt jedoch auch von der exakten eingesetzten DNA-Menge und der Effizienz der cDNA-Synthese ab. Daher wird zur Quantifizierung in der Regel ein Referenzgen (*House-keeping-Gen*, z.B. β 2-Mikroglobulin (β 2MG), Aktin, Tubulin, etc.) mit herangezogen. Die Angaben erfolgten in der vorliegenden Arbeit als Quotient der Kopienzahl von Zielgen und β 2MG, sofern im Ergebnisteil nichts anderes angegeben wurde.

Zu Beginn des Versuchs wurde jeweils eine Standardreihe (10^7 , 10^5 und 10^3 Kopien pro μ l) aus dem PCR-Produkt des zu untersuchenden Gens (z.B. MnSOD) bzw. einem entsprechenden Plasmid hergestellt. Der Berechnung der Kopienzahl wurde dabei die DNA-Konzentration in μ g/ μ l zu Grunde gelegt. Ausgehend davon konnte durch das durchschnittliche Molekulargewicht eines Mononukleotids, von 326,96 g/mol, die Molarität bestimmt werden und anhand der Avogadroschen Konstante ($N_A = 6,022 \times 10^{23}$ /mol) die Kopienzahl pro μ l. Die Verdünnung erfolgte mit DEPC-Wasser, wobei der 10^7 -Standard als Stammlösung zum Herstellen der beiden anderen Standards diente. Im Fall des Referenzgens β 2-Mikroglobulin konnte auf Plasmide, welche uns das Institut für Pathologie der Universität Magdeburg freundlicherweise zur Verfügung stellte, zurückgegriffen werden.

Die Bestimmung der *mRNA*-Menge des jeweiligen Gens erfolgte mittels *Cycling* in der *RT-PCR* unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR-Green*. Der folgende Reaktionsansatz, welcher auf 98 Reaktionen ausgelegt war, fand Verwendung:

810,1 μ l	Quanti Tect Kit (<i>Master Mix</i> , inkl. <i>SYBR-Green</i> und Polymerase)
98 μ l	Vorwärts- <i>Primer</i>
98 μ l	Rückwärts- <i>Primer</i>
519,4 μ l	DEPC- H_2O

Die Einzelproben wurden in dreifacher Wiederholung (Triplets) gemessen, wobei je ein μ l der cDNA eingesetzt wurde. Die *RT-PCR* wurde anschließend unter den folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt: 50°C für 2 Min., 95°C für 15 Min., je 40 Zyklen bei 95°C für 30 Sek. und 58°C für 30 Sek., abschließend 72°C für 1 Min.. Hierbei ist zu beachten, dass die *Annealing*-Temperatur von Primer zu Primer variiert (s. Abschn. 3.2.). Die Reinheit der Reaktionsprodukte wurde anhand der Schmelzkurven nach 40 Zyklen überprüft. Die Bestimmung der Grundlinie und Berechnung der Kopienzahl erfolgte mit Hilfe der ABI Prism SDS 7000-Software automatisch.

4.2.8. Mikrotiter-Tetrazolium-Test (MTT-Test)

Die Bestimmung der Zytotoxizität diverser (toxischer) Substanzen, wie z.B. H₂O₂, Paraquat, Benzylviologen, wurde mittels eines MTT-Test durchgeführt.

Das dem Test zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Reduktion des Tetrazolium-Rings des Farbstoffs MTT (3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) durch z.T. mitochondriale Reduktasen der lebenden Zellen, zu einem sichtbaren dunkelblauen Formazan-Reaktionsprodukt, welches sich in den Mitochondrien ablagert. Die Umsetzung des Substrats ist dabei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Durch Solubilisierung mit einem unpolaren Lösungsmittel, z.B. DMSO, wird das Formazanprodukt in eine dunkelviolette Lösung überführt, deren Absorption photometrisch quantifiziert werden kann (Mosmann, 1983; Carmichael et al., 1987).

Zur Durchführung des MTT-Test an undifferenzierten Zellen wurden diese in der gewünschten Dichte (3.000-4.500/Loch) in eine 96-Lochplatte im adäquaten Medium eingesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Fall der kurzzeitdifferenzierten Zellen wurden zu Beginn 4.000-5.000 Zellen pro Loch in eine 48 Lochplatte eingesät. Nach viertägiger Behandlung mit RA in Neurobasalmedium (s.o.) erfolgte ein Mediumwechsel (Neurobasalmedium ohne Antioxidantien), indem die Zellen vor Applikation der Noxen für sechs Stunden inkubiert wurden. Die Zugabe der zu testenden Substanzen (H₂O₂, Paraquat, Benzylviologen, etc.) erfolgte danach. Hierzu wurde eine Stammlösung hergestellt, von der ausgehend die entsprechenden Konzentrationen (s. Ergebnisteil) pro Loch hinzugegeben wurden. In allen Fällen wurde eine unbehandelte Lebendkontrolle mitgeführt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit (24 bzw. 48 Stunden) bei 37°C im Brutschrank wurde der MTT-Test durchgeführt.

Hierzu wurde eine 1,5 mg/ml MTT-Stammlösung in Medium hergestellt, und diese im Volumenverhältnis 1:1 zu den zuvor behandelten Zellen gegeben (finale Konz.: 0,75 mg/ml). Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde das Medium abgesaugt. Durch Zugabe von DMSO (ein Volumenteil) und 15-minütiger Inkubation auf dem Schüttler wurde der Farbstoff extrahiert. Es folgte eine Messung (ELISA Reader) der Absorption bei 562 nm, sowie 620 nm als Referenzwert. Der Prozentsatz der überlebenden Zellen wurde durch Bildung des Quotienten der Absorptionswerte mit dem Wert einer unbehandelten Lebendkontrolle errechnet.

4.3. Biochemische Methoden

4.3.1. Proteinbestimmung

Verwendet wurden, je nach Anwendungsgebiet, zwei verschiedene, kolorimetrische Methoden zur Messung der Proteinkonzentration.

4.3.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Bestimmung des Proteingehalts mittels des Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 fand bei den Western Blots Verwendung, da hierbei störende Einflüsse, wie z.B. durch Detergenzien (z.B. SDS) und Reduktionsmittel (DTT), im Vorfeld ausgeschlossen werden konnten.

Bei dieser Methode bildet der ungebundene Farbstoff sowohl mit den kationischen, als auch den unpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine in saurer Lösung Komplexe, wodurch der Farbstoff in seiner unprotonierten, blauen Sulfatform stabilisiert wird. Hieraus ergibt sich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm, welches photometrisch (*ELISA*-Reader) bestimmt werden kann. Die Referenzmessung wurde bei 470 nm durchgeführt. Anhand einer mitgeführten Standardreihe mit BSA (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 und 3,0 mg/ml) wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Zur Durchführung legte man 5 µl des Proteinlysats in einer 96-er Mikrolochplatte vor und gab 200 µl Bradfordreagenz hinzu. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 595 nm und 470 nm als Referenzwert.

4.3.1.2. Proteinbestimmung nach Biuret

Eine weitere, vielfach angewandte Methode zur Proteingehaltsbestimmung beruht auf der Biuret-Reaktion. In diesem kolometrischen Assay komplexieren zwei Biuret-Moleküle ein Kupferkation. Hieraus ergibt sich eine tief-violette Färbung der Lösung, welche sich photometrisch messen lässt (*ELISA*-Reader). Analog zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde in diesem Verfahren ebenfalls anhand einer BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet. Anwendung fand dieses Verfahren für ATP-Messung, GPx-1, GR-Aktivitätsmessung, SOD-Messung und Caspase-3 Assay. Zur Durchführung wurde das Biuret-Kit (DC Protein Assay, BioRad) gemäss den Herstellerangaben verwendet. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mittels eines *ELISA*-Readers bei den Wellenlängen 750 nm und 450 nm als Referenz.

4.3.2. Western Blot

Den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran, z.B. Nitrocellulose, bezeichnet man als Western Blot. Der spezifische Nachweis auf der Trägermembran kann durch verschiedene analytische Verfahren wie Immunodetektion (Reaktion mit spezifischen Antikörpern) erfolgen.

4.3.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgelegt und behandelt. Am Versuchstag wurden sie nach einmaligem Waschen mit Kalzium/ Magnesiumfreien PBS aus den Flaschen mittels eines Schabers (Rubber Policeman, Nunc) extrahiert und für 10 Min. bei 1.000 *rpm* und +4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 50-100 µl PBS/EDTA aufgenommen. Zum vollständigen Aufbrechen der Membranen wurde das Gemisch für eine Minute in Pulsen sonifiziert. Zur Pelletierung der Zellfragmente schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 Min. bei 2.000 *rpm* und +4°C) an.

In der vorliegenden Arbeit fand das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidsystem nach Laemli (Laemmli et al., 1970), mit 10-12%-igen Polyacrylamid-Trenngelen Anwendung. Die Mini Trans-Blot Cell Apparatur von BioRad wurde zum Gießen der Gele (max. Grösse: 7,5 x 10 cm) verwendet.

Sammelgel:

Acrylamidkonzentration in Prozent		5
30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid	(µl)	330
0,625 M Tris/HCl, pH: 6,8	(µl)	400
0,5% SDS	(µl)	400
bideist. H ₂ O	(µl)	870
TEMED	(µl)	2
10% APS	(µl)	10

Trenngel:

Acrylamidkonzentration in Prozent		10	12,5
30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid	(ml)	2,0	2,5
1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)	(ml)	1,2	1,2
0,5% SDS	(ml)	1,2	1,2

bidest. H ₂ O	(ml)	1,6	1,1
TEMED	(μ l)	5	5
10% APS	(μ l)	30	30

Zunächst wurde durch einminütiges Erhitzen auf 100°C in einem reduzierenden thiolhaltigen Probenpuffer (β -Mercaptoethanol) die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen. Der biotinylierte Größenmarker wurde zwei Minuten gekocht. Sofortiges Abkühlen auf Eis sollte die Beibehaltung des denaturierten Zustands garantieren.

In dem anschließenden elektrophoretischen Verfahren (10 Min. bei 10 mA, 50 Min. bei 25 mA) migrierten die negativ geladenen Proben durch das wie ein Sieb wirkende Gel, wobei die kleinen, leichteren Proteine schneller wanderten als diejenigen höheren Molekulargewichtes. Zum Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Mini Transblot *Cell*-System von BioRad unter den folgenden Bedingungen verwendet: 2 h bei 200 mA in Blotpuffer (s. 3.6.) bei Raumtemperatur. Durch einminütige Färbung mit 0,2%-iger Ponceaurot-Lösung wurden die Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran sichtbar gemacht.

4.3.2.2. Proteindetektion mittels Immunreaktion

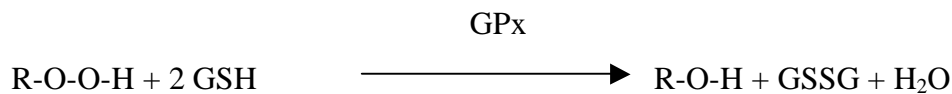
Durch Inkubation der Nitrocellulosemembran für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Blockierungslösung (4,5% Magermilchpulver in 1xTBST) wurden die freien Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Die Inkubation mit dem polyklonalen Primärantikörper in der erforderlichen Konzentration (s. Kap. 3.4.) erfolgte bei +4°C über Nacht auf dem Schüttler. Ungebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen (2 x 5 Min., 2 x 10 Min.) mit TBST entfernt. Die Membran wurde anschließend für 1-1,5 Stunden mit dem Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert, woran sich Waschschrte in 1xTBST nach dem obigen Schema anschlossen. Die spezifische Immunreaktion wurde durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck wurde das *ECL (enhanced chemiluminescence)*-Kit verwendet, bei dem die Blotmembran für eine Min. in *ECL*-Lösung inkubiert wurde. Der Blot wurde zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette gelegt. Nach entsprechender Expositionszeit (20 Sek. bis 30 Min.) wurde der Film entwickelt und konnte mit dem Programm Quantity 1 (BioRAD) densitometrisch ausgewertet werden.

4.3.3. Enzymaktivitätsmessungen

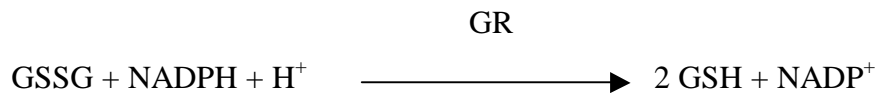
4.3.3.1. Glutathionperoxidase (GPx)

Die Messung der GPx-Aktivität erfolgte durch Anwendung des kolorimetrischen BIOXY-TECH® GPx-340™ Kit, gemäss den Herstellerangaben. Der Nachweis beruht auf einer indirekten Messung der GPx-Aktivität in einer zweistufigen Reaktion:

1. GPx-katalysierte Reduktion einer organischen Peroxidverbindung zum korrespondierenden Alkohol durch reduziertes Glutathion



2. Reduktion des dabei entstandenen GSSG durch NADPH, katalysiert durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR)

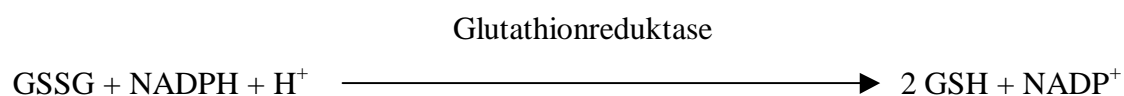


Da die Konzentrationen der Substrate R-O-O-H, GSH und NADPH hoch gewählt und das Enzym GR im Überschuss zugesetzt wurde, war die Gesamtreaktion nur durch die GPx-Aktivität limitiert, die somit gemessen werden konnte.

Die NADPH-Oxidation führte zur Abnahme der Absorption bei 340 nm (A_{340}), welche photometrisch (Cary 100) in Zeitabhängigkeit (kinetisch) gemessen wurde (nmol/min). Die Verminderung der Absorption (A_{340}) ist proportional zur GPx-Aktivität der Probe. Die Enzymaktivität wurde auf den Proteingehalt normiert (nmol/min/mg).

4.3.3.2. Glutathionreduktase (GR)

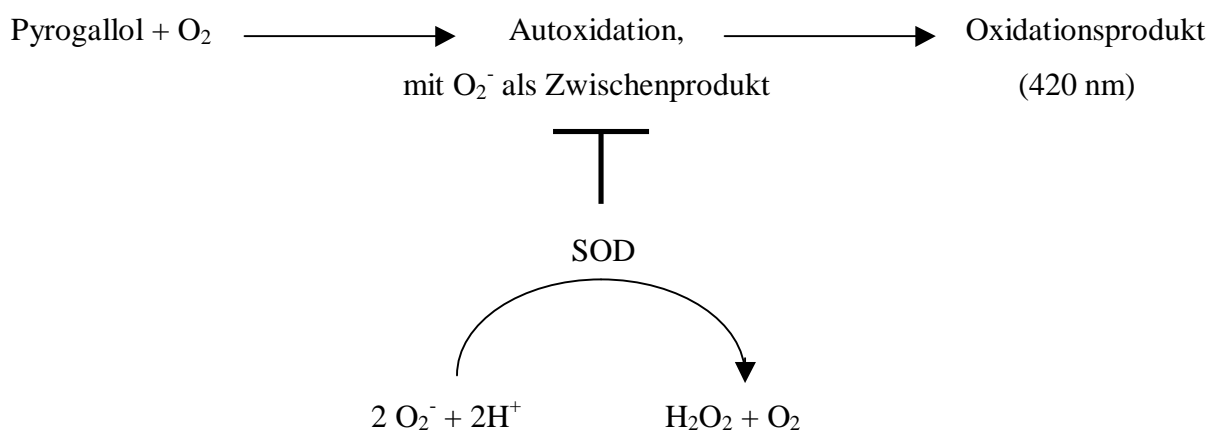
Für die Bestimmung der Glutathionreduktaseaktivität wurde das BIOXYTECH® GR-340™ Kit von Oxis Research entsprechend der Herstellerangaben verwendet. In einer GR-katalysierten Mehrschrittreaktion wird NADPH zu NADP^+ oxidiert.



Eine Einheit (*Unit*) der GR-Aktivität ist dabei durch die Menge an Enzym definiert, die die Reduktion von einem Mikromol GSSG pro Minute bei 25°C und pH 7,6 katalysiert. Die Reduktion von GSSG wird dabei indirekt über die Oxidation von NADPH gemessen (Cary 100). Dies wird als Abnahme der Absorption bei 340 nm im Zeitverlauf (nmol/min) dargestellt. Abschließend erfolgte eine Normierung auf den Proteingehalt (nmol/min/mg).

4.3.3.3. Superoxiddismutasen (CuZnSOD, MnSOD)

Die Enzymaktivitätsmessung der Superoxiddismutasen, d.h. sowohl MnSOD als auch CuZnSOD, erfolgte mittels eines kolorimetrischen Verfahrens, bei dem das Substrat Pyrogallol autooxidiert wird. Die Superoxiddismutasen inhibieren dabei diese Autoxidation, weil das Superoxidradikal an dieser Reaktion als Zwischenstufe beteiligt ist (Ein-Elektronenschritt). Die Extinktion des farbigen Oxidationsprodukts des Pyrogallols kann photometrisch bei 420 nm bestimmt werden (Marklund und Marklund, 1974).



Zur Messung der reinen MnSOD-Aktivität kann die CuZnSOD irreversibel durch KCN inhibiert werden.

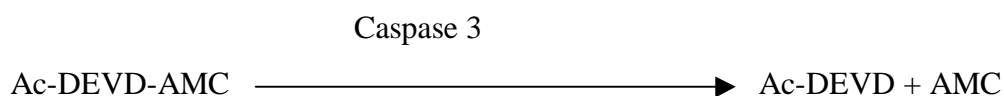
Es wurde eine wässrige 8 mM Pyrogallollösung angesetzt und ihre genaue Konzentration mit H₂O so eingestellt, dass der Absorptionsanstieg in der unten beschriebenen Messung ohne Zelleextrakt ($\Delta A / \text{Min}_{100\% \text{ Wert}}$) bei $0,02 \pm 0,002$ lag (Referenzwert). Das Lysat (pelletierte Zellen in 500 μl 1xPBS aufgenommen und ultraschalliert) wurde 1:200 mit Reinstwasser verdünnt. 16,6 μl der Probe wurden mit 950 μl Probenpuffer versetzt. Bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 33,3 μl Pyrogallollösung gestartet. Die Verminderung des Absorptionsanstieges gegenüber dem Referenzwert wurde kinetisch gemessen (Cary 100). Dazu wurde der Absorptionsanstieg ($\Delta A / \text{min}$) aus dem linearen Bereich berechnet. Eine Einheit bezeich-

net dabei die Enzymmenge, die nötig ist, um eine 50%-ige Inhibierung der Pyrogallol-Autoxidation zu erreichen, d.h. eine Senkung des Absorptionsanstiegs auf $\Delta A/\text{Min} = \frac{1}{2}\Delta A/\text{Min}_{100\%}$ (halber Referenzwert). Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Probe im Messpuffer wurden die Werte schließlich auf die Proteinkonzentration normiert.

4.3.4. Caspase-3 Assay

Die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität kann über zwei grundlegende Methoden erfolgen. Einerseits lässt sich per Antikörper auf Proteinebene (Western Blot) gespaltene, d.h. aktive, Caspase-3 nachweisen. Andererseits kann man auf einen fluorimetrischen Assay zurückgreifen. Da dieser die vergleichsweise sensitivere Methode ist, wurde dieses Verfahren angewendet.

Das Prinzip des Tests beruht auf der Hydrolyse des Peptidsubstrats Acetyl-Asp-Glu-Val-7-Amido-4-Methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) durch Caspase-3, welches zur Freisetzung des fluoreszierenden 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) führt.



Das fluorimetrische Caspase 3 Assay Kit von Sigma wurde entsprechend der Herstellerangaben, unter Einsatz von 9,46 μg Protein pro Messung, verwendet. Die Messung des freigesetzten AMCs erfolgte bei 400 nm (Exikation) und 505 nm (Emission) mit einem Safire *Fluoreszenz Reader* (Tecan, Crailsheim). Die Messwerte wurden auf mg Protein normiert.

4.3.5. ATP-Messung

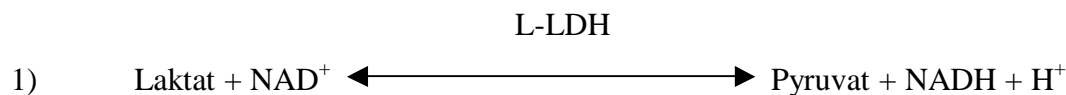
Zur quantitativen ATP-Bestimmung wurde das ATP-Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche) verwendet. Hierbei wird in einer ATP-abhängigen, Leuchtkäfer-Luziferase katalysierten Reaktion das Substrat D-Luciferin oxidiert, wodurch es zu einer Freisetzung von Biolumineszenz kommt. Das freigesetzte, grüne Licht hat ein Emissionsmaximum bei 562 nm und ist direkt proportional zur ATP-Konzentration.



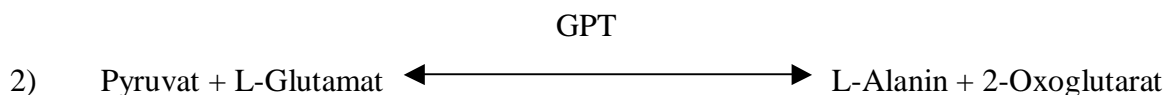
Die Durchführung der Messung erfolgte gemäss den Angaben des Herstellers in einem Lumino-
meter (TD-20/20 DLReady). Normiert wurde der ATP-Gehalt auf die Proteinkonzent-
ration der jeweiligen Probe.

4.3.6. Bestimmung von Laktatkonzentrationen

Die Laktatkonzentration im Medium wurde mittels eines gekoppelten Enzymassays indirekt
bestimmt (modifiziert nach Noll et al., 1984). In dieser zweistufigen Reaktion wird zunächst
in Anwesenheit von L-Laktatdehydrogenase (L-LDH) das L-Laktat durch Nikotinamid-
adenindinukleotid (NAD) zu Pyruvat oxidiert. Die in dieser Reaktion gebildete NADH-
Menge ist hierbei äquimolar zu dem im Medium enthaltenen Laktat und stellt die Messgröße
dar. Die Bestimmung des NADH-Gehalts erfolgte photometrisch bei 340 nm.



In dieser Reaktion liegt das Gleichgewicht weitestgehend auf der Seite des Laktats. Um es auf
die Seite des Pyruvats zu verschieben, wird in einer zeitgleichen zweiten Reaktion durch Ü-
berschuss von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat das Py-
ruvat abgefangen.



Zur Durchführung wurden je 250 µl Mediumüberstand von unbehandelten bzw. behandelten
Zellen abgenommen und bis zur Messung bei -18°C tiefgefroren. Der folgende Reaktions-
ansatz lag der Messung zu Grunde:

- 80 µl Probe (bzw. Medium als Kontrolle)
- 30 µl β-NAD-Lösung (37,7 mM in H₂O)
- 250 µl Glutamat-Puffer (0,76 M Glutamat in H₂O, pH 8,9)
- 30 µl Glutamat-Pyruvat-Transaminase (15 U)
- 700 µl Aqua dest.

Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend
die Extinktion (Basalwert) bei 340 nm gemessen (Cary 100). Zum Starten der Reaktion wurde
2 µl Laktatdehydrogenase (21 U) hinzugegeben und die Extinktion bei 340 nm kinetisch
(Steigung) gemessen. Die Steigung der vom Photometer aufgezeichneten Geraden (Δ OD

340/min) wurde jeweils innerhalb eines konstanten Zeitfensters zwischen drei und sechs Minuten bestimmt. Die Darstellung erfolgte nach Umrechnung in mM Laktat anhand des durch Laktat-Standard-Lösungen bestimmten Eichfaktors.

4.3.7. Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts

Zur Messung des Gesamtglutathiongehalts wurde eine Methode angewendet, bei der das photometrisch messbare Produkt TNB durch die Reduktion von DTNB durch GSH entsteht (Anderson, 1985; Bergemeyer, 1985; Baker, et al., 1990).

Durch die von GSSG-Reduktase katalysierte Reduktion von GSSG zu GSH wird das oxidierte Glutathion im Reaktionsansatz mitgemessen, und somit der Gesamtglutathiongehalt bestimmt (s. u.). Der spezifische Nachweis von oxidiertem Glutathion (GSSG) erfolgt durch die Umsetzung eines Aliquots der unbekanntenen Probe mit 2-Vinylpyridin, welches mit der reduzierten Form (GSH) irreversibel reagiert und diese daher aus der Reaktion entfernt.

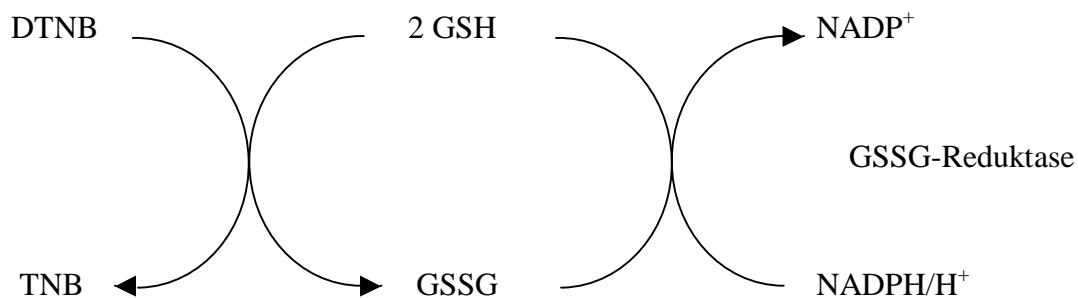


Abb. 8: Gesamtglutathionbestimmung mit der DTNB-Methode, modifiziert nach Baker et al., (1990).

Die Zellen wurden pelletiert und anschließend in 500 μl 1 x PBS aufgenommen. Zu einem 200 μl Aliquot wurde zur Proteinfällung Sulfosalicylsäure (SSA, 3,3% final) zugegeben. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 *rpm* für sechs Min. zur Pelletierung des Proteins an.

Für die GSH/GSSG-Messung aus dem Überstand wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

Gesamtglutathion	GSSG
90 µl Überstand	
10 µl Triethanolamin (TEA)	
4 µl Aqua dest.	4 µl Vinylpyridin
196 µl Glutathionprobenpuffer (Abschn. 3.6.)	

Als Negativkontrolle wurde eine 3,3%-ige Sulfosalicylsäurelösung (SSA) an Stelle des Überstandes verwendet. Ausgehend von einer 2 mg/ml (= 2,88 nmol/ µl) Stammlösung GSSG in Aqua dest. wurde eine Standardreihe (0; 2,16; 4,32; 10,8; 21,6; 43,2; 96 und 192 pmol GSSG/ 50 µl) aufgebaut und mitgeführt. Je 50 µl des Ansatzes wurden in einer 96 Lochplatte vorgelegt. Das Farbreagenz (je 100 µl, Zusammensetzung s. Kap. 3.6.) wurde mittels einer Acht-Kanalpipette zügig hinzugegeben und die Extinktion bei 405 nm kinetisch über 20 Min. bei Raumtemperatur gemessen.

Zur Auswertung der Proben wurde der lineare Bereich der Extinktionszunahme der Proben und Standards ermittelt. Aus den Differenzen der Extinktionswerte wurde die Zunahme der Extinktion in mOD/Min. berechnet. Die Kalibrierung wurde durch die Extinktionszunahme der Standards (mOD/Min) erstellt, anhand derer der Gehalt der Proben berechnet wurde. Abschließend wurde der Gesamtglutathiongehalt auf den Proteingehalt (nmol/mg) normiert.

4.3.8. Bestimmung des zellulären Sauerstoffverbrauchs

Mittels eines Oxygraphen (Oxygraph-2k) wurde der Sauerstoffverbrauch (pmol O₂/Sek. und ml) der Teratomcybride bestimmt. Die Zellen wurden hierzu in entsprechender Dichte, d.h. 0,85 Mio. für RA-Experimente und 5 Mio. für Experimente an undifferenzierten Zellen, in DMEM in großen Flaschen eingesät und behandelt. Am Messtag wurden sie enzymatisch (Trypsin) abgelöst, mit 1 x PBS gewaschen, herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 500 µl 1 x Hanks Puffer aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Unmittelbar vor dem Experiment wurden die Gesamtzellzahl, sowie der Anteil abgestorbener Zellen (Trypanblau), bestimmt. Die Zellsuspension wurde bei 14.000 rpm kurz (max. eine Min.) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in zwei ml *Brainmedium* aufgenommen. Bei allen Experimenten wurde der gesamte Ansatz zur Messung verwendet.

Die erhaltene Zellsuspension wurde in die Kammer des zuvor geeichten Oxygraphen überführt und die kinetische Bestimmung des O₂-Verbrauchs unter definierten Bedingungen in mehreren Intervallen durchgeführt. An eine zwei- bis fünfminütige Vorlaufphase, in der die Zellen die intern vorhandenen Substrate veratmeten, schloss sich die Permeabilisierung der Zellmembran durch Zugabe einer Digitoninlösung mit der Konzentration 5 mg/ml (je 2µl/Mio. Zellen) an. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass die nachfolgend in den Oxygraphen injizierten Substrate in die Mitochondrien gelangen. Durch Applikation von Malat (5 mM f. K.) und Glutamat (10 mM f. K.) sollte die Atmungskette indirekt über Bildung von NADH stimuliert werden. Die aus diesen Substraten entstandenen Reduktionsäquivalente (NADH) werden über Komplex I in die Atmungskette geschleust. Es wird somit eine Komplex I-abhängige Atmung gemessen. Abschließend wurde ADP (2 µM f. K.) hinzugegeben, um die OXPHOS maximal zu stimulieren. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt der Proben, welcher mittels der Biuretmethode bestimmt wurde, normiert (nmol O₂/Min./mg Protein). Durch Bildung des Respirationskoeffizienten (Atmung mit ADP versus Substrate ohne ADP) sollte gezeigt werden, dass die Mitochondrien nicht entkoppelt sind.

4.4. Statistische Auswertungen

Nach Rücksprache mit dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg erfolgten alle Mehrfachvergleiche durch Anwendung einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) auf dem Niveau von $p \leq 0,05$, mit anschließendem Tukey-Post-Hoc-Test. Im Falle von MTT-Assays mit variabler Noxenkonzentration, wurden Dunnett-Post-Hoc-Tests für die Vergleiche jeder Konzentration mit der unbehandelten Kontrolle derselben Zelllinie und der Tukey-Test für die Vergleiche der Zelllinien innerhalb einer Konzentrationsstufe genutzt, alles unter einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Einfache paarweise Vergleiche zweier Gruppen geschahen mit dem t-Student-Test für ungepaarte Stichproben, ebenfalls auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Programmpaket SPSS, Version 13 (SPSS, Chicago, USA).

5. Ergebnisse

5.1. Etablierung von Zellkulturbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den LHON-Teratomcybriden in einigen Experimenten als Referenz auch 143B.TK(-)-Osteosarkomcybride mit einer besonders schweren Mutation der mtDNA, der 5 kb „*common deletion*“, bzw. der korrespondierende Wildtyp verwendet. Zu Beginn wurde versucht, die optimalen Zellkulturbedingungen zu etablieren, da es sich zeigte, dass alle Teratomcybride in gewöhnlichem DME-Medium nicht optimal proliferierten bzw. z.T. innerhalb kurzer Zeit ihr Wachstum einstellten und abstarben. Durch eine Reihe von Medientests ergab sich, dass die Proliferation all dieser Linien in DMEM mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l), jedoch reduziertem Bicarbonatgehalt von 1,5 g/l (gegenüber 3,7 g/l), 10% fötalem Kälberserum der Kategorie EU-Gold (PAA, Pasching, Österreich), mit 4 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat bei 5% CO₂ am besten war.

Das Wildtyp-Cybrid CM wuchs jedoch auch in diesem Medium so schlecht, dass es nach einiger Zeit aufgegeben und für höhere Zellzahlen erfordernde Versuche nicht weiter verwendet wurde. Der Grund dieses selektiv schlechteren Wachstums, gerade bei einem Wildtyp-Klon, ist bislang ungeklärt. Auffällige genetische Aberrationen fanden sich in Tests mit einigen Mikrosatelliten-Markern nicht (s.u.). Für aufwendigere Versuche standen demzufolge später nur die Parentallinie (kein Cybrid) sowie eine Revertante (Cybrid) als Wildtyp zur Verfügung. Unter optimalen Wachstumsbedingungen konnten die Teratomlinien alle zwei bis vier Tage im Verhältnis eins zu vier bis sechs geteilt werden. Die Zugabe von 50 µg/ml Uridin in das Medium bei den LHON-Mutanten ergab keinen Unterschied bezüglich des Wachstums bzw. der Morphologie und wurde aus diesem Grund weggelassen. Obwohl die Uridin-Supplementation dem Herausdriften heteroplasmischer mtDNA-Mutationen aus Zellkulturen entgegenwirken soll, war mit solchen Effekten bei den LHON-Mutanten aufgrund ihrer Homoplasmie (100% mutierte mtDNA) nicht zu rechnen. Trotzdem wurde in zeitlichen Abständen stets die Homoplasmie der Linien 11778-1 und MD, mit der G11778A-Transition, anhand der unten geschilderten PCR-Technik überprüft. Die 143B.TK(-)-Zellen sind im Gegensatz zu den LHON-Cybriden heteroplasmisch (mtDNA nur teilweise mutiert), weshalb in diesem Fall stets 50 µg/µl Uridin zugesetzt wurde. Schon bei der Übernahme bzw. zum Zeitpunkt der Versuche lag der Heteroplasmiegrad der Linie CD_{mut} bei nur etwa 22% (ursprünglich ca. 80%, nach Angaben von Prof. Wei) und war somit im Vorfeld um ca. 58% gesunken (s.u.). Die 143B.TK(-)-Zellen wurden in normalem DMEM mit hohem Glukose- und hohem Bicarbonatgehalt (3,7 g/l) und 10% Serum kultiviert.

Die Teratomcybride unterschieden sich morphologisch erkennbar untereinander und von ihrer parentalen Linie (Abb. 9). NT2/D1 und besonders das LHON-Cybrid MD zeigten eine mehr länglich-bipolare bis verzweigte Morphologie mit Ansätzen feiner Fortsätze im Phasenkontrast, während die Zellen des LHON-Cybrids 11778-1 eine stärker symmetrisch-kubische Form hatten und zuweilen auch eine Tendenz zum Wachstum in Form kleiner Zellinseln aufwiesen.

Die Linie MD wuchs als Einzige nicht bis zum *Monolayer*. Indes reagierten auch die anderen Cybride sehr empfindlich auf Überwachsen. Die Kulturen überstanden in der Regel keinen *Monolayer*-Zustand für einen Tag und säuerten bei hoher Zelldichte das Medium sehr schnell an (Gelbfärbung des Indikators Phenolrot). Die Osteosarkomlinien CD_{wt} und CD_{mut}, unterschieden sich morphologisch nicht voneinander (nicht gezeigt) und zeigten beide ein ähnlich gutes Proliferationsverhalten.

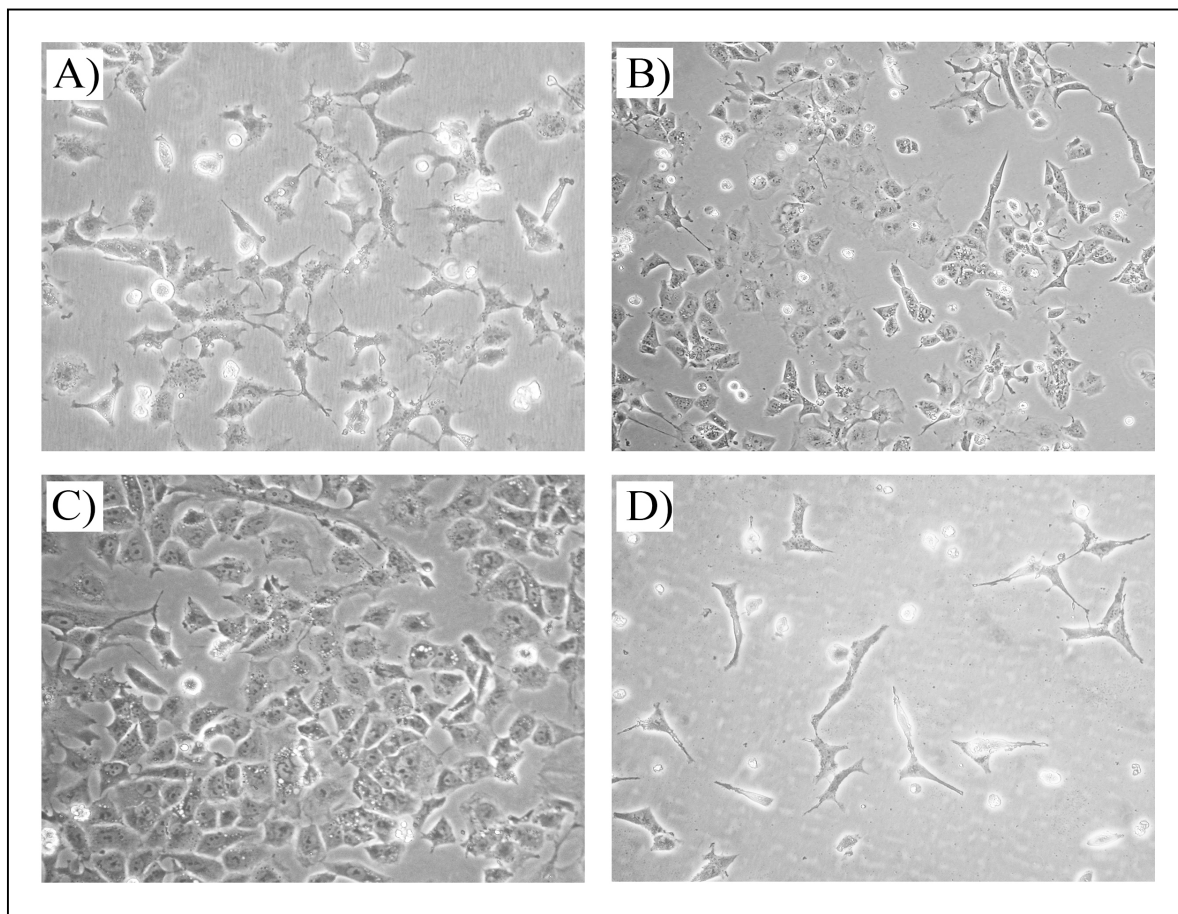


Abb. 9: Übersichtsbilder von NT2/D1-abgeleiteten Cybridzellen. A) NT2/D1, B) R3460-1, C) 11778-1 und D) MD, unbehandelt in DME-Medium mit verringertem Bicarbonatgehalt, 200-fache Vergrößerung, Phasenkontrast.

5.2. Genotypisierung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden alle Cybride zur Identifizierung auf ihren nukleären genetischen Hintergrund überprüft. Hierzu wurde eine Multiplex-PCR (Mentype Nonaplex II PCR Kit auf PTC 100 Thermal *Cycler*) auf acht polymorphe, chromosomale Marker, sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin (Amelo) durchgeführt. Die Auftrennung der Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte und die Identifizierung der Allele geschah auf einem Kapillarsequenziergerät (ABI310C) des Instituts für Rechtsmedizin der Otto-von-Guericke Universität mit freundlicher Unterstützung durch Frau Ines Plate.

Anhand dessen konnte gezeigt werden, dass die Teratom- bzw. Osteosarkomcybride alle der jeweils behaupteten parentalen Linie entstammten, da sie in allen Loci identische Allele aufwiesen (Tab. 1), abgesehen von den unten diskutierten Ausnahmen.

	Amelo	D3S1358 3p25.3	D8S1179 8q23.2	SE33 6q1.42	TH01 11p15.5	FIBRA 4q28.3	D21S11 21q21.1	D18S51 18q11.1	VWA 12p13.31
NT2/D1	X Y	15/16	13/15	17/18	9.3	23	30/31	14	18/19
NT2/D1-Derivate									
CM	X Y	15/16	13/15	17/18	9.3	23	30/31	14	18/19
11778-1	X Y	15/16	13/15	17/18	9.3	23	30/31	14	18/19
MD	X Y	15/16	13/15	17/18	9.3	23	30/31	14	18/19
R3460-1	X	16	13/15	17/18	9.3	23	30/31	14	18/19
143B.TK(-)-Derivate									
CD _{wt}	X X	15	14	21	6	24	31.2	17	17/18
CD _{mut}	X X	15	14	21	6	24	31.2	17	17/18

Tab. 1: Mentype Nonaplex-PCR zur Verifizierung des nukleären Genotyps der Cybride.

Dargestellt sind Namen und chromosomale Lokalisation der benutzten Marker (erste Zeile), sowie die für jeden Marker gefundenen Allele (X, Y bzw. arabische Zahlen).

Hierbei wurde festgestellt, dass die Linie R3460-1, einen Verlust des Allels 15 (LOH) im Marker D3S1358 auf Chromosom 3p25.3 aufwies. Auf diesem Chromosomenarm liegt auch das Gen für die zelluläre Glutathion-Peroxidase (GPx1), welches für die geplante Studie von Bedeutung

war. Zur Sicherheit wurde daher mittels eines spezifischen intragenischen Markers (Alanin-Repeat, s. Kap. 4.2.2.) geprüft, ob das Gen selbst vom chromosomalen Stückverlust betroffen war. Dies war jedoch nicht der Fall, da das Allelmuster heterozygot geblieben war. Ferner hatte diese Linie offensichtlich ihr Y-Chromosom verloren, was durch die negativen Ergebnisse einer PCR mit zehn Markern des Y-Chromosoms (s. Kap. 4.2.2.) bestätigt wurde. Die hypotriploiden Teratomzellen weisen keinen völlig homogenen Chromosomensatz auf, weshalb es vorstellbar ist, dass eine kleine Fraktion ebenfalls kein Y-Chromosom besitzt. Solch ein Klon wurde offenbar während der Erzeugung dieses Cybrids selektiert.

Zur Überprüfung des mitochondrialen Genotyps der Linien NT2/D1, CM, R3460-1, MD, und 11778-1 im Bereich der bei LHON mutierten Komplex-I-Gene wurden einerseits Sequenzierungen und andererseits spezifische PCR-RFLP-Tests mit fluoreszierenden Primern auf einem ABI310C Kapillarsequencer durchgeführt. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen exemplarisch einige Beispiele.

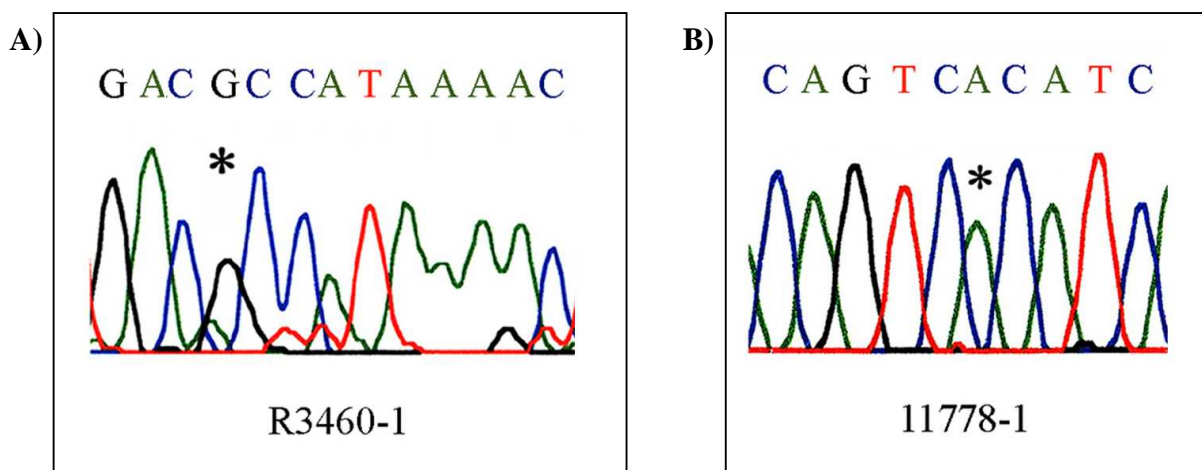


Abb. 10: Sequenzierung der LHON-Cybridlinien R3460-1 und 11778-1 zum Nachweis ihrer primären LHON-Mutationen. A) Sequenz der Linie R3460-1 (np3457- 3469), * = G bedeutet keine Transition an der np3460. B) Linie 11778-1 (np11773- 11782), * = homoplasmische G → A Transition an der np11778. Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

Hierbei zeigte sich, dass die Linie R3460-1, welche die LHON-Mutation G3460A enthalten sollte, die Wildtypsequenz aufwies. Sie hatte im Vorfeld ihre Mutation verloren und wurde aus diesem Grund fortan als Revertante (R) bezeichnet. Im Gegensatz hierzu waren sowohl die Linien 11778-1, als auch die hier nicht gezeigte Linie MD über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg stabil homoplasmisch für die primäre LHON-Mutation G11778A. Die Kontrollen NT2/D1 und CM zeigten an den drei häufigsten primären LHON-Positionen 11778, 3460 und 14484 im PCR-Test und Sequenzierung jeweils homoplasmisch den Wildtyp.

Eine weitere Methode zur Unterscheidung von Wildtyp und Mutante sind die Restriktionslängenpolymorphismen. Hierbei hängt die Schneidbarkeit eines markierten PCR-Produktes vom Nukleotid in der fraglichen Position ab, sodass Wildtyp und Mutante zu unterschiedlichen *Peaks* in der Kapillarelektrophorese führen. Wie in Abb. 11 A beispielhaft gezeigt, ist die Mutation G11778A resistent gegen die Spaltung durch die Endonuclease *Sfa*N1. Im Gegensatz hierzu wird der Wildtyp (NT2/D1) gespalten. Analog hierzu sollte die Mutation G3460A durch das Enzym *Bsa*H1 nicht geschnitten werden. Es zeigte sich jedoch, übereinstimmend mit der Sequenzierung, dass sowohl der Wildtyp als auch die vermeintliche Mutante enzymatisch gespalten werden (Abb. 11 B).

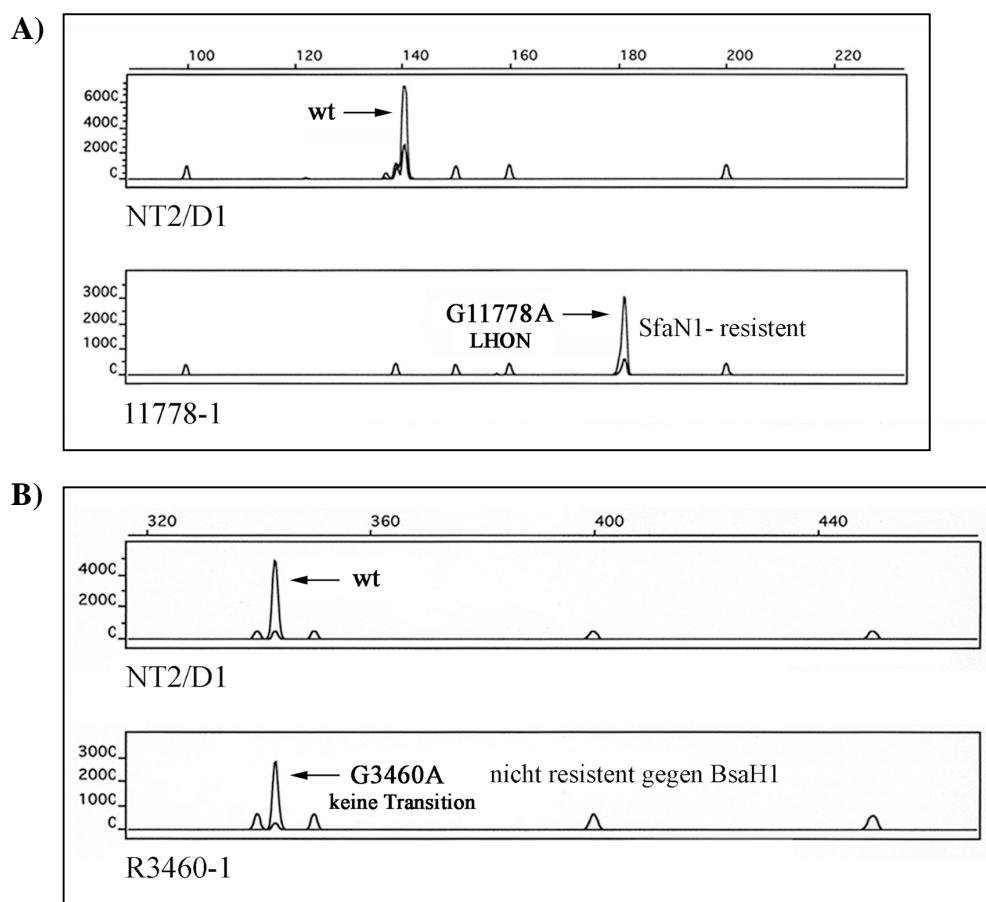


Abb. 11: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). A) Nachweis der mtDNA Transition G11778A der Zelllinie 11778-1 durch RFLP. Die Endonuclease *Sfa*N1schneidet die Wildtyp-DNA. Da die LHON-Linie nur einen *Peak* liefert, ist die Mutation im Rahmen der Messgrenze (ca. 1%) homoplasmisch. B) Überprüfung der G→A Transition an der np3460 der Linie R3460-1 durch RFLP mit dem Enzym *Bsa*H1. Die Mutante würde durch das Enzym nicht geschnitten. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Linie R3460-1 eine Revertante ist. Die kleinen Gipfel repräsentieren den ROX-markierten Längenstandard. Die Längenskala in den obigen Abbildungen ist in bp angegeben. Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

Wegen des Verlusts der 3460-Mutation war anzunehmen, dass im Gegensatz zur ursprünglichen Vermutung (Wong et al., 2002) die aus Patientenzellen eingeschleuste Mutation in diesem Fall heteroplasmisch war und aus der Cybridkultur herausdriften konnte. Die mtDNA wäre somit wieder vollständig durch diejenige der Rezipientenzellen (NT2/D1) ersetzt worden. Dies ließ sich aufgrund eines seltenen Markers in der D-Loop der Teratomlinie leicht prüfen. In der Abbildung 12 ist zu erkennen, dass sowohl die Parentallinie NT2/D1 als auch die Revertante R3460-1 über denselben charakteristischen Polycytosintrakt ($C_{10}TC_6$) in einer hypervariablen Region (hvr2) der D-Loop verfügen, der in Nicht-Tumorzellen mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 1% auftritt. Zudem war die gesamte D-Loop-Sequenz übereinstimmend, obwohl sie eine große Zahl polymorpher Basenpositionen einschließt.

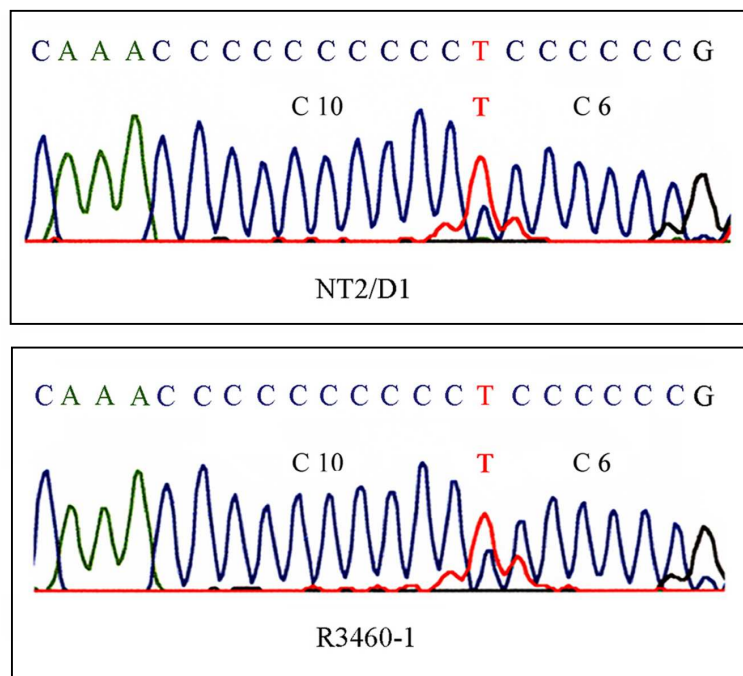


Abb. 12: Sequenzierung des Polycytosintrakts in der hypervariablen Region (hvr2) der mitochondrialen D-Loop der Linien NT2/D1 und R3460-1. Die Sequenzierung der Parentallinie zeigte den seltenen Genotyp $C_{10}TC_6$. Die Linie R3460-1 hat die Tumor-mtDNA. Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

Analog zu den Teratromcybriden wurde die 5 kb „*common deletion*“ (*CD*) des in einigen Versuchen verwendeten 143B.TK(-)-Cybrids durch eine spezifische quantitative PCR verifiziert und, da sie heteroplasmisch vorliegt, quantifiziert (Schoeler et al., 2005).

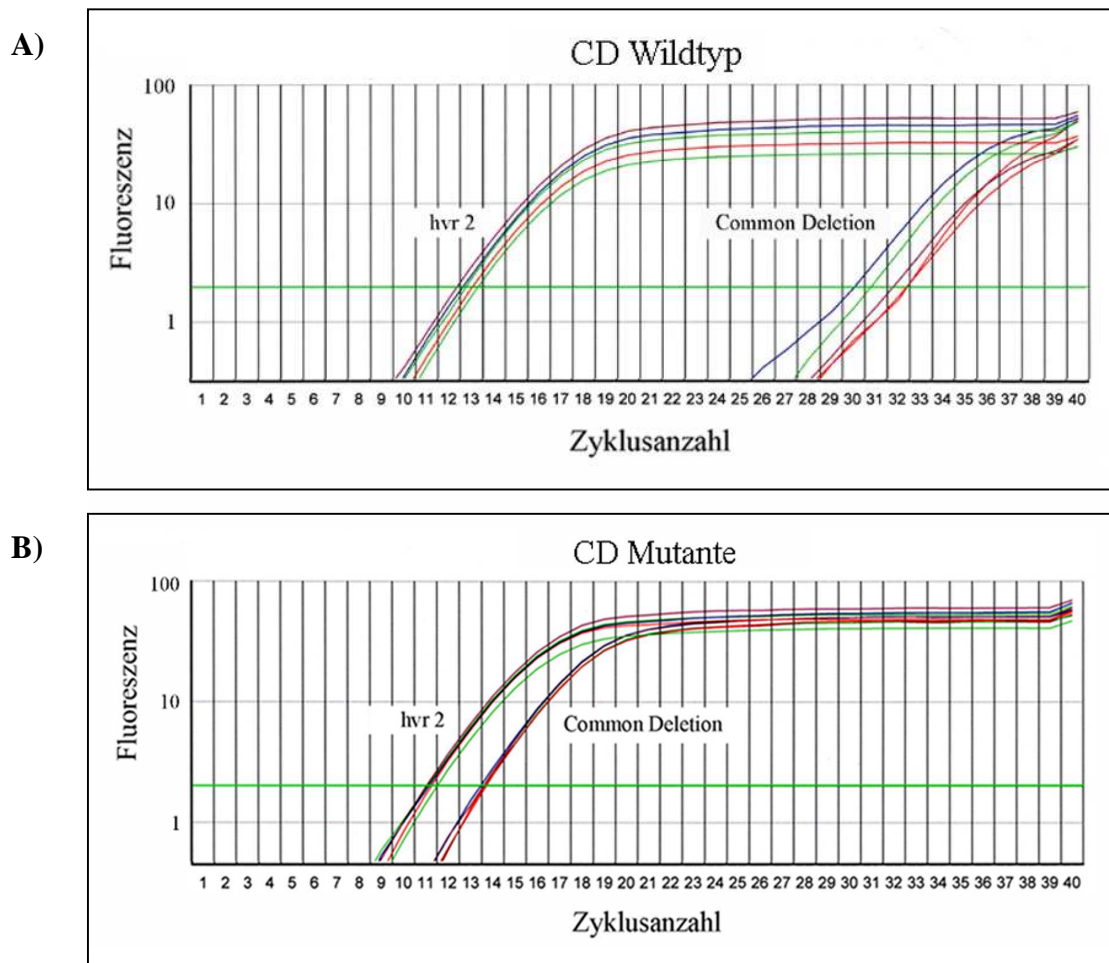


Abb. 13: Nachweis der mitochondrialen 5 kb *common deletion* mittels *Primer-shift* PCR.

A) 143B.TK(-)-Wildtyp B) 143B.TK(-)-Mutante, grüne Linie = Grenzwert.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft einige Amplifikationsplots der 143B.TK(-)-Cybride mit Wildtyp-mtDNA bzw. *common deletion* (*CD*), jeweils mit Primern für die mitochondriale hvr2-Region (als Maßstab für die gesamte mtDNA) bzw. selektiv für den *CD*-Bruchpunkt. Aufgrund der hohen Kopienzahl der mtDNA hatten die hvr2-Produkte stets kleine C_T -Werte (Zykluszahl, bei der der Grenzwert, d.h. die grüne Linie, geschnitten wird). Demgegenüber weisen die sehr hohen C_T -Werte für die *common deletion* beim Wildtyp darauf hin, dass hier nur Spuren dieser Deletion detektierbar sind. Dies darf der Fall sein, weil sich in vielen Zellen physiologisch irrelevante Spuren der Deletion finden. Das Konvergieren der *CD*-Plots an die hvr2-Plots bei der

Mutante, d.h. die Verringerung der C_t -Differenz, zeigt, dass hier physiologisch relevante Heteroplasmiegrade der Deletion vorliegen. Die quantitative Berechnung (Schoeler et al., 2005) ergab einen Heteroplasmiegrad von ca. 22%.

5.3. Versuche zur Herstellung eigener Cybride aus Neuroblastomzellen (SHSY-5Y)

Die Parentallinie NT2/D1, aus welcher sich die LHON-Cybride ableiten, ist selbst kein Cybrid (s. Kap. 4.1.1). Eine günstigere Wildtyp-Kontrolle wäre daher der Cybridklon CM. Dieser war jedoch wegen seines schlechten Wachstums für die meisten Versuche unbrauchbar (s.o.). Darüber hinaus unterscheiden sich die Linien in ihrer Fähigkeit, sich neuronal differenzieren zu lassen. Im Gegensatz zu CM und MD ist dies durch eine entsprechende Behandlung bei NT2/D1, R3460-1 und 11778-1 möglich. Die Vergleichbarkeit der Klone wurde durch diese Umstände limitiert. Resultierend hieraus wurde versucht, eigene Cybride aus Neuroblastomzellen (SHSY-5Y) zu gewinnen (s. Kap. 4.1.2), da diese Zellen vereinzelt bereits in der Literatur zu diesem Zweck verwendet wurden und sie sich zudem neuronal differenzieren lassen. Nach mehrwöchiger Behandlung mit einer sublethalen Dosis Etdhidiumbromid (1,5-5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in DME-Medium ergaben sich nur wenige überlebende Klone, von denen nur vier langsam, bis zur Einfrierbarkeit eines Aliquots in flüssigem Stickstoff, vermehrt werden konnten. Es wurde aus diesen Klonen mittels *RT-PCR* der Gehalt mitochondrialer DNA (*hvr2*), sowie nukleärer DNA (*p53 Exon8*) bestimmt. Parallele Versuche zur mtDNA-Depletion mit dem Farbstoff Rhodamin-6-G in einem breiten Konzentrationsbereich (0,5- 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) waren bereits anfänglich an der Toxizität des Farbstoffs gescheitert.

In Abb. 14 sind vergleichend die Amplifikationskurven von *p53Exon8* und *hvr2* bei unbehandelten (A) sowie EtBr-behandelten (B) SHSY-5Y-Zellen dargestellt. Hierbei ist erkennbar, dass durch die Inkubation mit EtBr die mtDNA depletiert wird. In unbehandelten Kulturen lag der C_t -Wert des *single-copy* Gens *p53* in diesem Versuch um ca. zehn Zyklen oberhalb desjenigen für die mtDNA (*hvr2*). Bei vergleichbarer PCR-Effizienz beider Systeme entspräche dies ca. 1.000 Kopien mtDNA pro *p53*-Kopie. Nach Langzeitbehandlung mit EtBr übertrifft jedoch sogar die Kopienzahl des *single-copy* Gens diejenige der mtDNA, da der C_t -Wert für *p53Exon8* diesmal kleiner ist als derjenige für *hvr2*. Diese Umkehr belegt eindeutig die Wirkung des EtBr, d.h. eine deutliche Depletion der mtDNA. Berechnungen analog zu denen für die *CD* (Schoeler et al., 2005) ergaben Rest-mtDNA-Gehalte der verschiedenen überlebenden Klone zwischen 0,011 und 1,3 Prozent.

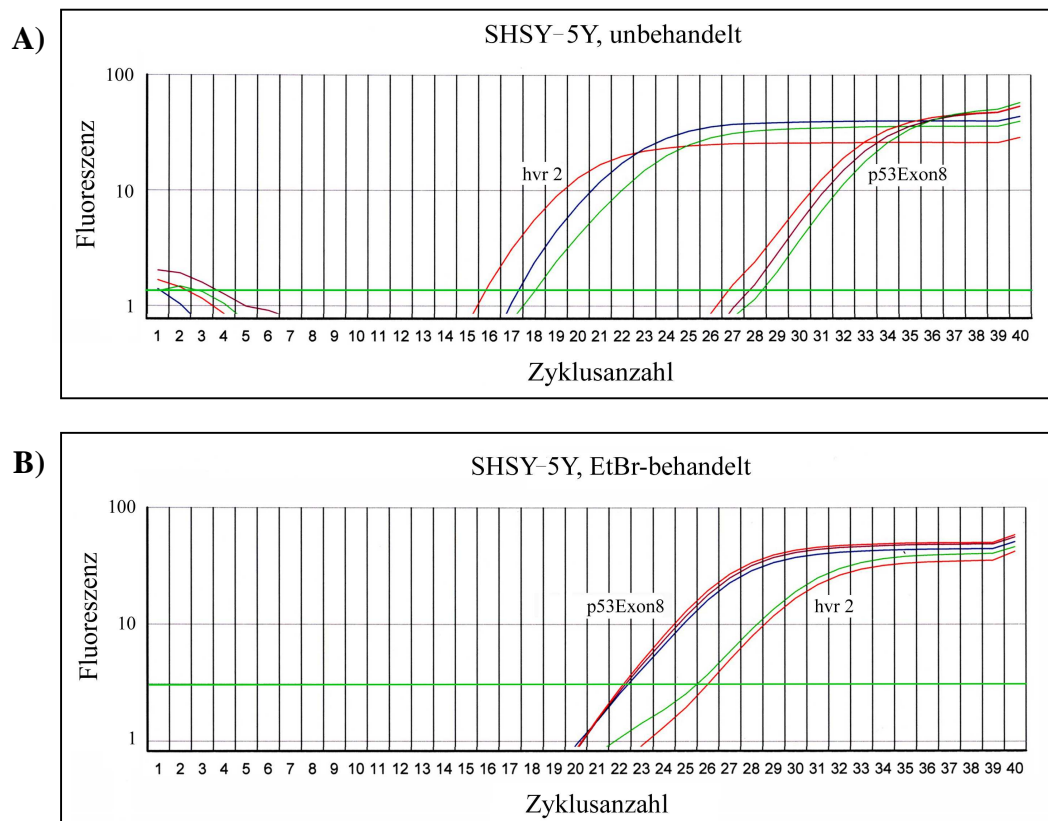
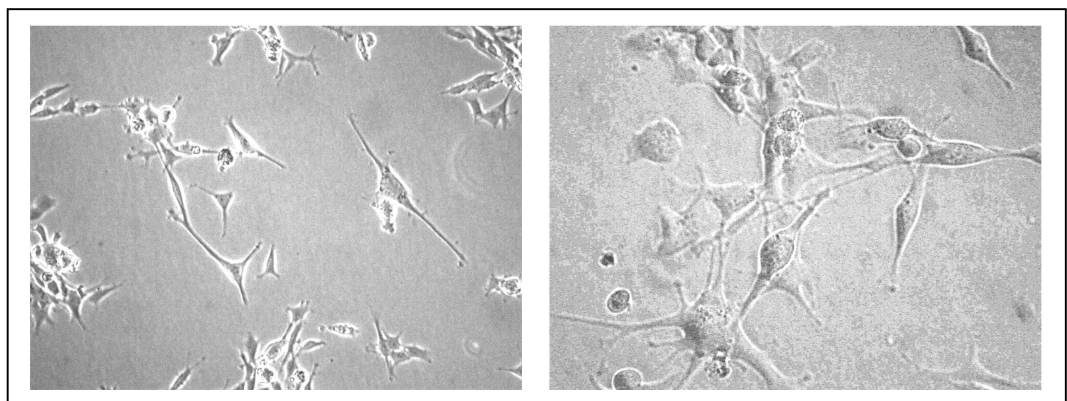


Abb. 14: Real-Time PCR zur Bestimmung des mtDNA-Gehalts in SHSY-5Y-Zellen vor (A) und nach mehrwöchiger Behandlung mit EtBR (B). In beiden Versuchen wurden die erhaltenen Kopienzahlen von p53Exon8 (nukleäre DNA) und hvr2 (mtDNA) bestimmt (s. Text). Durch Bildung des Verhältnisses von nukleärer zu mtDNA konnte nachgewiesen werden, dass EtBr zu einem verminderten mtDNA-Gehalt führt.

Exemplarisch sind in der Abb. 15 solche mtDNA-depletierte ρ^- -Zellen dargestellt. Man erkennt eine normale Morphologie inklusive dünner Fortsätze im Phasenkontrast (A). Fluoreszenzaufnahmen mit dem $\Delta\psi$ -unabhängigen Mitochondrien-Farbstoff Mitotracker (B) zeigten eine normale Zahl von Mitochondrien, da nicht die Mitochondrien insgesamt depletiert werden, sondern lediglich ihre mtDNA und damit 13 ihrer Polypeptide.

Abb. 15: A)



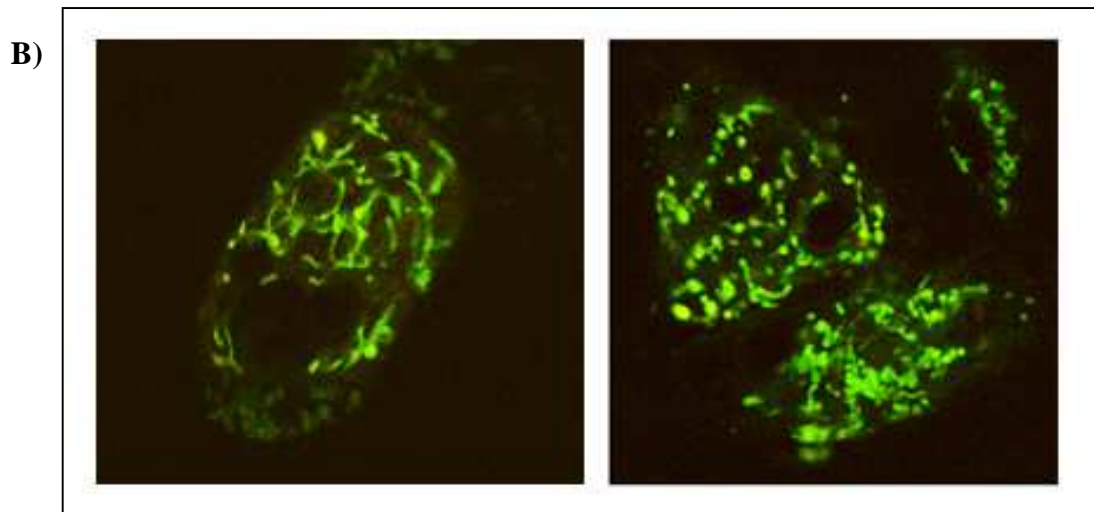


Abb. 15: ρ^- -Zellen der Linie SHSY-5Y. A) ρ^- -Zellen, Phasenkontrast, B) ρ^- -Zellen nach Mitotracker-Färbung im inversen Konfokalmikroskops. Die konfokalen Bilder wurden freundlicherweise von Herrn F. M. Haroon aus dem Institut für Neurobiologie der Otto-von-Guericke Universität aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

ρ^- -Zellen, mit einem rechnerischen Restgehalt von 0,04 % mitochondrialer DNA nach 2,5 Monaten EtBr-Behandlung, sollten entsprechend des Cybridisierungsverfahrens (s. Kap. 1.4.) mit Blutplättchen eines geeigneten Donors (LHON-Patienten) PEG-fusioniert werden. Dieser Schritt konnte jedoch entgegen Literaturbeschreibungen mit dieser Zelllinie nicht durchgeführt werden, da die ρ^- -Zellen unter EtBr fast nicht proliferierten, trotz Supplementierung des Kulturmediums mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Uridin und 2 mM Pyruvat. Ferner stellte sich heraus, dass nach Absetzen des Ethidiumbromids der Gehalt der mtDNA innerhalb weniger Tage in den zweistelligen Prozentbereich anstieg, sodass ein Absetzen der Noxe keine Lösung bot. ρ^- -Zellen mit einem Restgehalt oberhalb von ca. 1% mtDNA proliferierten auch unter EtBr recht gut, schieden jedoch von vornherein für die geplanten Fusionen aus. Eine komplette Wiederholung des Versuchs mit einer neuen Passage der Ausgangszellen führte zu keinen überlebenden EtBr-resistenten Klonen. Es wurde hierdurch gezeigt, dass die Gewinnung proliferationsfähiger ρ^- - oder gar ρ^0 -Zellen keine sicher reproduzierbare Methode ist. Für die vorliegende Arbeit konnte damit nur auf die bestehenden NT2/D1-Klone zurückgegriffen werden.

5.4. Vitalität der NT2/D1-Cybride unter Galaktosemedium und Apoptoseinduktoren

5.4.1. Vitalität unter Stress in Glukose-freiem Galaktosemedium

Ausgehend von der Theorie, dass Zellen mit einer primären LHON-Mutation eine beeinträchtigte Atmungskettenfunktion bzw. oxidative Phosphorylierung haben, sollten mutierte Cybride in Galaktosemedium laut Literaturmeinung leichter apoptotisch reagieren. Daher sollte zunächst die Vitalität der LHON-Cybride unter glukosefreiem Galaktosemedium überprüft werden. Das Substrat Glukose dient den Zellen zur Energiegewinnung in der Glykolyse und z.T. indirekt zur oxidativen ATP-Gewinnung. Da alle Cybride aus Tumorzellen abgeleitet sind, war es plausibel, einen stark erhöhten glykolytischen Umsatz bis zum Laktat unter normoxischen Bedingungen anzunehmen. Die selektiv schlechtere Vitalität der Mutanten in Galaktosemedium würde sich gemäss Literaturmeinung durch eine gestiegene Abhängigkeit aller Cybride von der Atmung begründen lassen. Das im Vergleich zu Glukose schlechtere Substrat Galaktose erlaubt nicht mehr die hohen glykolytischen Umsatzraten, die zur überwiegenden Gewinnung von ATP aus der Glykolyse notwendig sind. Bei niedrigerem glykolytischem Umlauf seien die Zellen zur vermehrten Pyruvatnutzung in der Atmung gezwungen. Obwohl diese Stoffwechsellage nicht näher untersucht wurde, war der Erklärungsansatz aus der Literatur plausibel, dass sich OXPHOS-Defekte in den Mutanten erst dann nachteilig auswirken, wenn die OXPHOS-Abhängigkeit groß genug ist.

In der vorliegenden Arbeit standen hypothetisch zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die OXPHOS-Abhängigkeit der Zellen zu erhöhen: a) Galaktosemedium und b) die, bei drei der Zelllinien mögliche, Differenzierung. Da eine finale neuronale Differenzierung schwierig ist und nur geringe Zellausbeuten erwarten ließ, wurde zunächst die Wirksamkeit von Galaktosemedium getestet. Die Zellen wurden in einer adäquaten Dichte (3.000 Zellen/Loch) in eine 96-Lochplatte eingesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank anwachsen gelassen. Nach Austausch des Mediums gegen glukosefreies Galaktosemedium (5mM Galaktose, f. K.) wurden die Zellen anschließend für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Durch einen MTT-Test wurde die Anzahl der überlebenden Zellen, unter Normierung auf die unbehandelte Lebendkontrolle, in Prozent bestimmt. Jeder Messwert setzt sich aus 16 Einzelwerten (biologische Replikate) zusammen.

Die Wirkung des Galaktosemediums war generell bei allen Zelllinien sehr hoch. Sämtliche Teratomzellen waren nach 48-stündiger Behandlung komplett abgestorben, im Gegensatz zu den 143B.TK(-)-Cybriden, an denen dieses Medium erstmals getestet worden war. Nach 24-

stündiger Inkubation betrug die Überlebensrate in der Regel jedoch noch mehr als 50% (s. Abb. 16 A). Im Gegensatz zu Befunden beim 143B.TK(-)-Modell (Zanna et al., 2003 und 2005) gab es keine signifikanten Differenzen zwischen der LHON-Mutante MD und den Wildtypen NT2/D1 und CM. Die LHON-Mutante 11778-1 reagierte sogar weniger sensitiv auf das Galaktosemedium als die korrespondierenden Kontrollen. Somit scheint das Verhalten in Galaktosemedium auch zelltypspezifisch zu sein. Die als Referenz mitgeführte Osteosarkomlinie CD_{mut}, welche eine schwerwiegende Mutation ihrer mtDNA (*common deletion*) aufweist, reagierte trotz des niedrigen Heteroplasmieniveaus (ca 22%) geringfügig sensitiver auf die Galaktose als der entsprechende Wildtyp.

In der vorliegenden Arbeit gab es also keinen Grund zu der Annahme, die biochemischen Effekte der 11778-Mutation könnten in Galaktosemedium verstärkt zu Tage treten. Da zudem alle Teratomzellen die Inkubation in Galaktosemedium für zwei Tage nicht überlebten, wurde im Weiteren auf diese Option verzichtet.

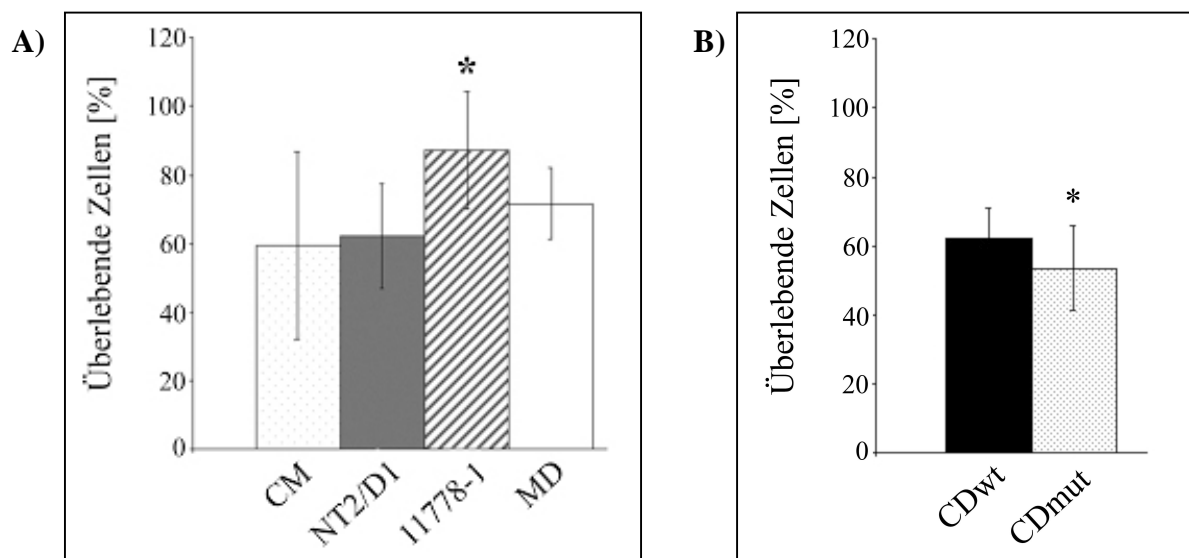


Abb. 16: Vitalitätstest (MTT-Assay) nach Galaktosemedium. Messung der überlebenden Zellen (in Prozent) nach 24-stündiger Inkubation in Glukose-freiem Galaktosemedium: A) Teratomcybride, n= 40 Wiederholungen, * = die Linie 11778-1 unterschied sich signifikant ($p \leq 0,01$) von allen restlichen Cybriden, B) Osteosarkomcybride, n= 40 Wiederholungen. * = CD_{mut} zeigte geringere Zellzahl als CD_{wt} ($p \leq 0,01$). In beiden Fällen wurden auf eine entsprechende, unbehandelte Lebendkontrolle ($\equiv 100\%$) normiert.

Obwohl aufgrund der Lebendzellzahlbestimmungen Galaktose nicht als geeignetes Stressmedium zur Verstärkung der Mutationswirkung erschien, sollten noch Laktatmessungen angeschlossen werden. Dies geschah, um abzuschätzen, ob sich überhaupt eine Wirkung auf die Stoffwechsellage zeigte. Falls das Galaktosemedium auch im NT2/D1-Modell einen erheblich niedrigeren glykolytischen Umsatz induzieren würde, so sollte dies mit einer verminderten Laktat-

bildung einhergehen. Daraus resultierend wurde die Laktatkonzentration im Medium unter kontrollierten Bedingungen bestimmt. Nach Inkubation einer definierten Zellzahl für 24 Stunden in T25-Flaschen in normalem DME-Medium (Kontrolle) bzw. mit Glukosefreiem Medium mit 5 mM Galaktose wurde der Laktatgehalt des Mediums gemessen. Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass auch im Galaktosemedium eine signifikante Laktatbildung bei allen Zelllinien vorkam. Die Cybride hatte demnach nicht vollständig auf die Einschleusung des Pyruvats in den oxidativen Stoffwechsel umgeschaltet. Für alle Zelllinien war die absolute Laktatproduktion in den Zellkulturflaschen unter Galaktose erheblich niedriger ($p \leq 0,05$). Jedoch konnte daraus nicht auf eine geringere Laktatbildungsrate der Zellen zurückgeschlossen werden, da die Zellzahlen in Galaktosemedium signifikant abnahmen, in DMEM aber zunahmen (direkte Zellzählung, Daten nicht gezeigt). Die Laktatbildungsraten pro Stunde und pro Million Zellen werden daher näher beieinander liegen als die tatsächlich gemessenen Konzentrationen. Da Zellzahlen nur am Anfang und Ende des 24 Stunden-Intervalls gezählt werden konnten, war eine korrekte Normierung auf die Gesamtzellzahl (oder Gesamtprotein) nicht möglich. Dies wäre nur bei kürzeren Inkubationszeiten, d.h. innerhalb weniger Stunden, möglich gewesen (konstante Zellzahl). In diesem Falle wären die Konzentrationsänderungen des Laktats jedoch nicht messbar gewesen.

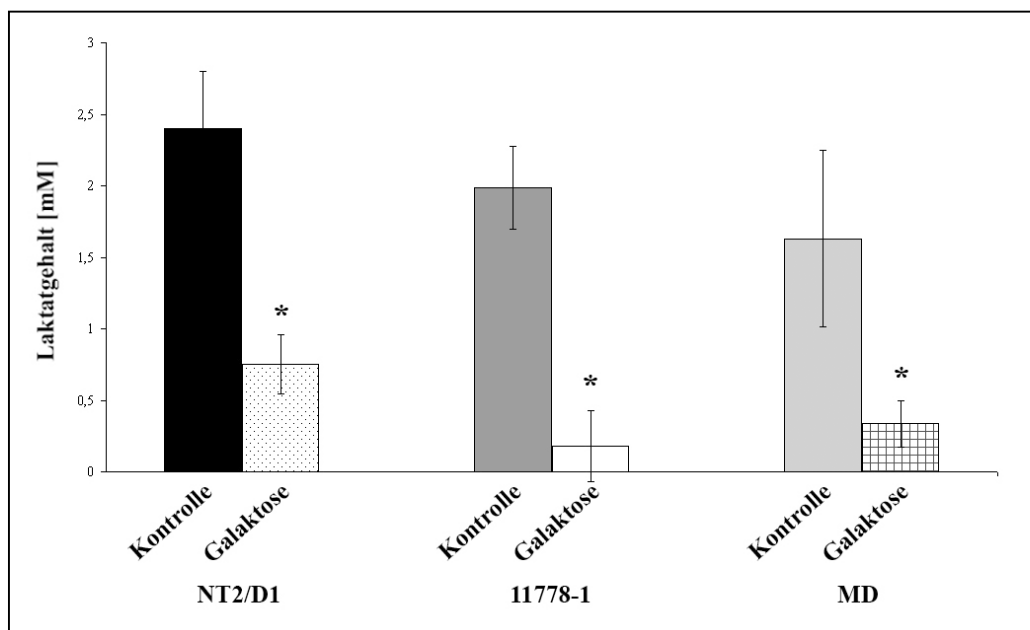


Abb. 17: Bestimmung des Laktatgehalts. Die Messung des Laktatgehalts in mM erfolgte an NT2/D1, 11778-1 und MD-Zellen in DMEM mit Glukose (Kontrolle) bzw. mit Galaktose in je sechs bzw. drei unabhängigen Ansätzen. * = signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

5.4.2. Überleben unter Apoptose-Induktoren

Nachdem der Stress durch Galaktose als C-Quelle nicht zu einer Unterscheidbarkeit von LHON-Mutanten und Wildtyp geführt hatte, wurde nun das Überleben der Zellen unter apoptotischer Induktion durch die klassischen Induktoren Staurosporin und *TRAIL* untersucht, um Hinweise auf eine generell erhöhte Apoptosebereitschaft der Mutanten infolge der geschädigten Mitochondrien zu erhalten. Der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin diente hierbei als Beispiel einer Substanz, die an vielen Zelltypen effizient eine mitochondrial-zentrierte Apoptose auslöst. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei *TRAIL* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) um einen Liganden, der an Todesrezeptoren (*Death receptor 4* oder *5*) der Plasmamembran bindet und auf diese Weise die Caspase-8 abhängige Apoptose der Zellen induziert (Thorburn, 2007). Diese kann einerseits unabhängig von den Mitochondrien ablaufen und andererseits den mitochondrialen Apoptoseweg anstoßen, z.B. durch mitochondriale Translokation des proapoptotischen Proteins BID.

Mittels MTT-Assay (acht unabhängige Wiederholungen) wurden die beiden Substanzen Staurosporin (Abb. 18) und *TRAIL* (Abb. 19) an LHON- und *CD*-Cybriden getestet. Staurosporin verminderte erwartungsgemäß über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg hochsignifikant die Lebendzellzahl bei allen Zelllinien ($p \leq 0,001$). Es ergab sich jedoch keine durchgängig höhere Sensibilität der beiden LHON-Mutanten 11778-1 und MD im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Linien. Die Linie 11778-1 war beispielsweise nur bei der höchsten Staurosporinkonzentration signifikant sensitiver als NT2/D1 ($p \leq 0,001$). Die Mutante MD hingegen war über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg signifikant insensitiver als der Wildtyp NT2/D1 ($p \leq 0,001$). Bei dem Induktor *TRAIL* ergab sich für die Teratomzellen generell eine nur geringe Empfindlichkeit, im Gegensatz zu den 143B.TK(-)-Zellen (vgl. Abb. 19 A und B). Im Gegensatz zu Versuchen zur Todesrezeptor-Stimulation im 143B.TK(-)-LHON-Modell (Danielson et al., 2002), fanden sich keine signifikanten Effekte der LHON-Mutationen im Teratommodell. Hier war im Gegenteil eine der Kontrollen (Cybrid CM) als einzige Linie signifikant sensitiver gegen *TRAIL* als die Übrigen ($p \leq 0,05$). Dies deutet darauf hin, dass für die Apoptose von LHON-Zellen über Todesrezeptoren auch der Zelltyp eine entscheidende Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit fand sich allerdings eine signifikante Wirkung der *common deletion* auf die *TRAIL*-Sensitivität im 143B.TK(-)-Modell.

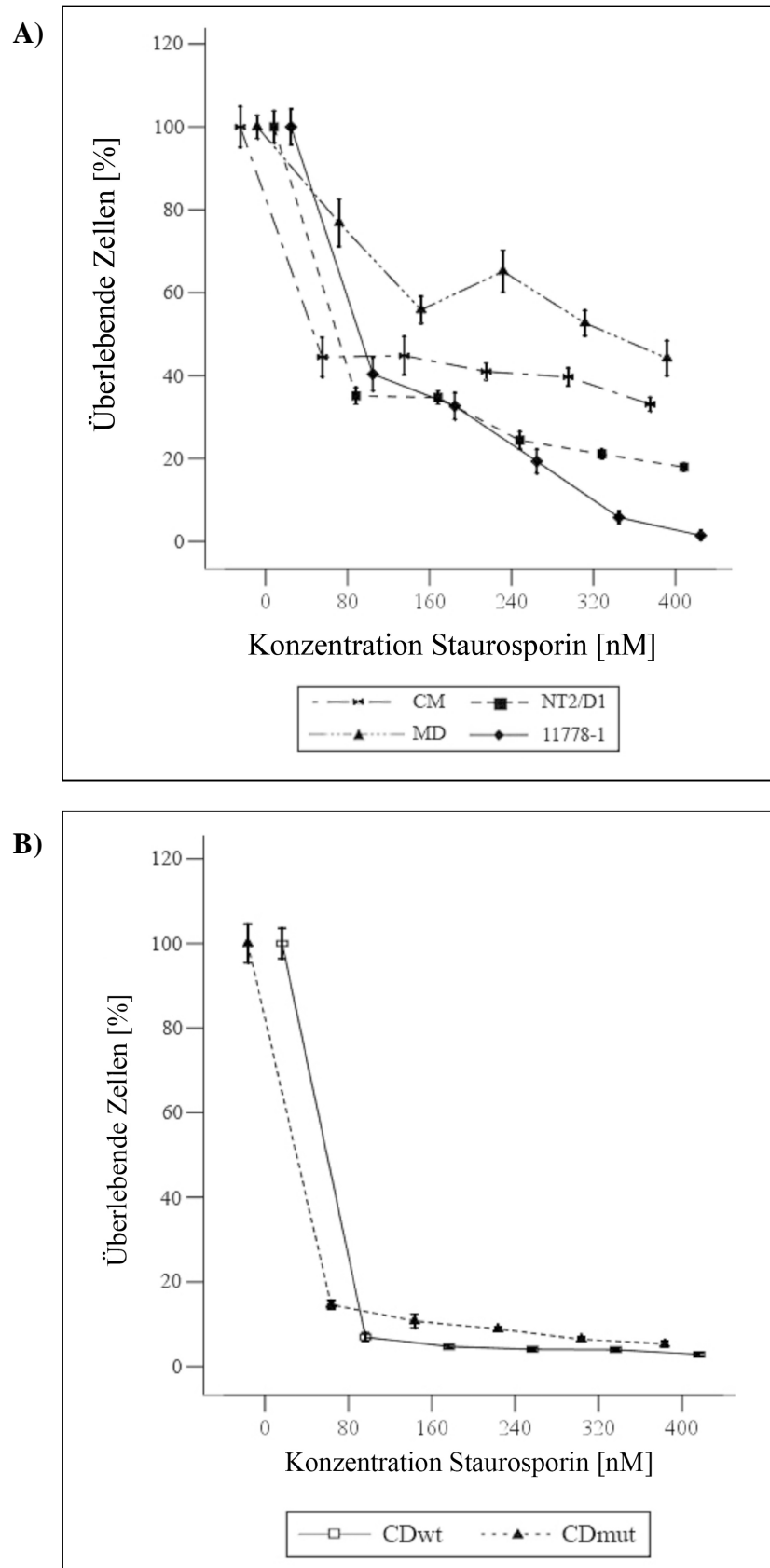


Abb. 18: Dosis-Wirkungskurven unter Einfluss von Staurosporin im MTT-Test. Anzahl der überlebenden Zellen [%] nach 24 Stunden, normiert auf unbehandelte Lebendkontrolle und aufgetragen gegen die Konzentration Staurosporin [nM]. A) Teratomcybride , bzw. B) Osteosarkomcybride , n= acht unabhängige Wiederholungen.

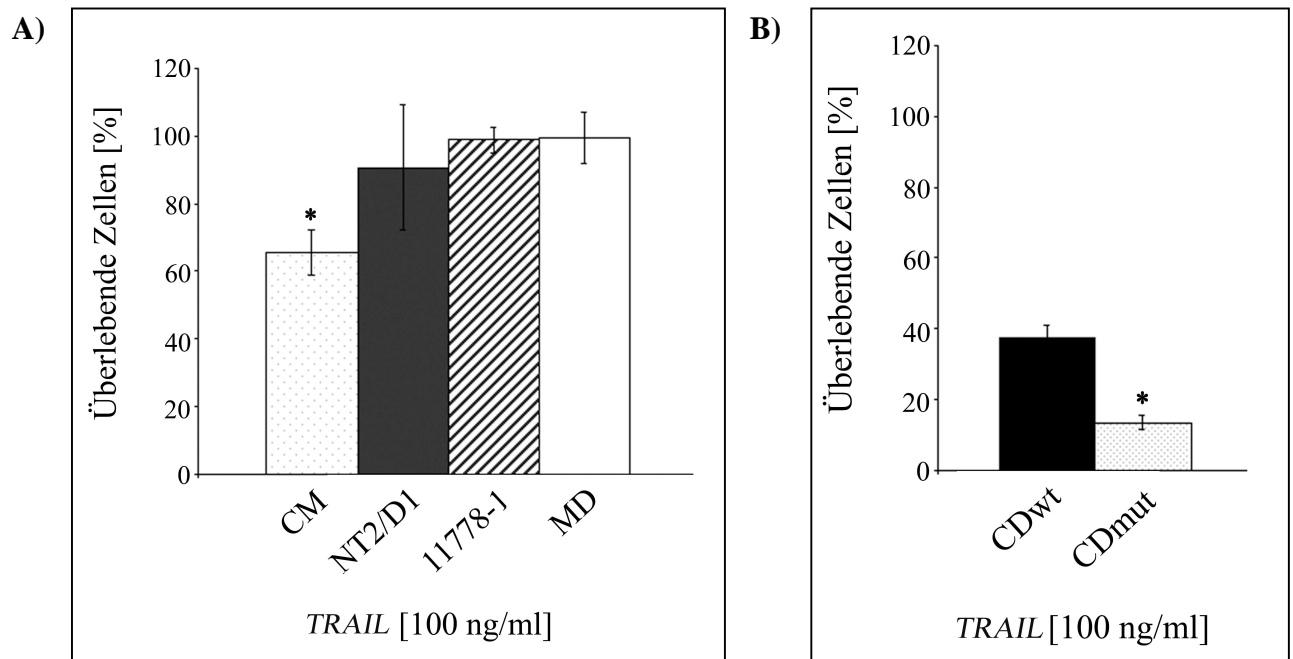


Abb. 19: Wirkung von *TRAIL* im MTT-Test. Anzahl der überlebenden Zellen [%], normiert auf unbehandelte Lebendkontrolle nach Behandlung mit *TRAIL* (100 ng/ml) für 24 Stunden. A) Teratomcybride, B) CD_{wt} versus CD_{mut}. * = signifikant ($p \leq 0,05$), n = acht unabhängige Wiederholungen.

5.5. Differenzierung von NT2/D1-Cybriden mit Retinolsäure

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass sich NT2/D1-Cybride in DMEM durch Retinolsäure (RA) über einige Wochen und kurzzeitige Hemmung der Proteinbiosynthese terminal zu Neuronen differenzieren lassen. Nur unter dieser Bedingung zeigten LHON-Mutanten Hinweise auf erhöhte ROS-Produktion, gemessen mit ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Wong et al., 2002). Die Differenzierung der Zellen böte somit eine zusätzliche Option bei der Untersuchung von oxidativem Stress. Die Methoden zur Differenzierung der Teratom-Cybride wurden nicht hinreichend detailliert von den Autoren beschrieben, es waren jedoch einige detaillierte Protokolle für die Parentallinie NT2/D1 verfügbar (Pleasure et al., 1992). Diese Protokolle konnten jedoch trotz mehrmaliger Versuche nicht an den Cybriden reproduziert werden. Ferner war zu erwarten, dass selbst im Erfolgsfall die Menge solcher Neuronen für Versuchszwecke, insbesondere für Enzymaktivitätsmessungen, nicht ausreichen würde. Aus diesem Grund wurde zu einer Kurzzeitdifferenzierung übergegangen, bei der die Zellen zunächst für vier bis zehn Tage in DMEM mit 10% FKS und 10 μ M RA inkubiert wurden. Schon nach etwa sieben Tagen bildeten sich sehr lange, dendritenartige Fortsätze konstanter Dicke, die zuweilen verzweigt waren. Die Zellausbeute war niedrig, da die meisten Zellen abgestorben waren.

Bereits nach wenigen Tagen der Behandlung erschienen die Zellen im Phasenkontrast hochgradig vakuolisiert und geschädigt. Daraus wurde geschlossen, dass ein konstanter Spiegel von zehn μM RA die Cybride innerhalb kurzer Zeit so stark vorschädigt, dass Versuche zur Sensitivität gegen externen oxidativen Stress und zum antioxidativen System der Zellen nicht mehr sinnvoll möglich sind. Aufgrund der günstigen Eigenschaften von Serum-freiem Neurobasalmedium (mit B27) für primäre Neuronenkulturen, wurde nun dieses Medium mit zehn μM RA als Alternative getestet. Innerhalb von 96 Stunden stellten alle Klone die Proliferation ein. Darüber hinaus wiesen sie eine hohe Überlebensrate auf, das morphologische Erscheinungsbild im Phasenkontrast war akzeptabel, die Länge der Fortsätze jedoch gering (Abb. 20). Die auf diese Weise behandelten Zellen, welche im Folgenden als „RA-differenziert“ bezeichnet werden, fanden neben den unbehandelten Zellen in DME-Medium für die Versuche Verwendung.

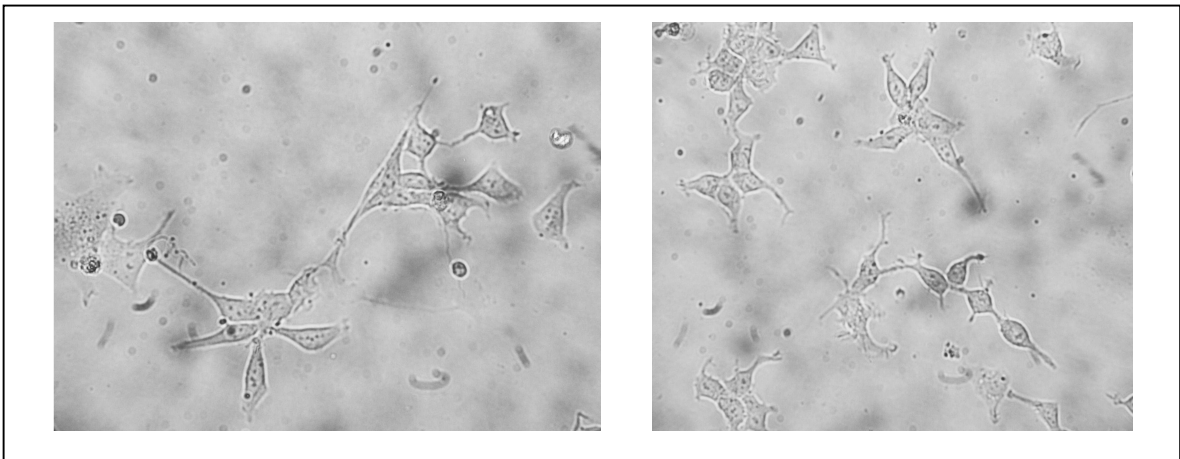


Abb. 20: 11778-1 Zellen, 24 h in Neurobasalmedium mit zehn μM Retinolsäure inkubiert.

Phasenkontrast

Der Hintergrund der Kurzzeit-Behandlung mit RA war die beschriebene höhere ROS-Produktion des Klons 11778-1 im Vergleich zu NT2/D1 nach neuronaler Differenzierung (Wong et al., 2002). Es wurde vermutet, dass die Zellen im Zuge ihrer Differenzierung die erwünschte stärkere OXPHOS-Abhängigkeit entwickeln, während sie als proliferierende Teratomzellen das benötigte ATP hauptsächlich über die Glykolyse gewinnen. Hieraus ergab sich, dass man die Laktatproduktion der Zellen in DMEM, sowie nach RA-Behandlung abschätzte. Es zeigte sich, dass speziell in DMEM ein vergleichsweise hoher Hintergrund an Laktat von den Messwerten abzuziehen war. Es stammte offenbar aus dem Kälberserum. Zur Messung der auf die Zellen zurückzuführenden Laktatkonzentration wurden daher wieder relativ lange Kultivierungsperioden benötigt. Wegen der gleichzeitigen Proliferation der Zellen war erneut keine präzise Nor-

mierung der Laktatproduktion möglich. Trotzdem ergaben sich einige interessante Resultate. Es wurden zunächst die beiden RA-responsiven Klone mit und ohne Mutation, sowie die nicht RA-responsive, identische Mutante MD in gleicher Zellzahl (250.000 Zellen) in T25-Flaschen eingesät und für 24 Stunden in DMEM mit 10% FKS kultiviert. Danach erfolgte, gemäß optimiertem Behandlungsschema, eine Umstellung auf Neurobasalmedium + B27 + 10 μ M RA. Erste Proben des Mediums zur Messung wurden zwei Tage nach Beginn der RA-Phase entnommen (Tag 1-2 in Abb. 21 A). Zur Erfassung der Laktatproduktion während der letzten zwei Tage der RA-Behandlung, wurde das Medium nach den ersten 48 Stunden gewechselt und nach weiteren 48 Stunden erneut gemessen (Tage 3-4 in Abb. 21 A). In Parallelansätzen wurde als Referenz Medium von 48 Stunden in DMEM bebrüteten Zellen abgenommen. Die Abbildung 21 A zeigt, dass alle Klone innerhalb von zwei Tagen eine erhebliche Laktatproduktion auch unter der RA-Behandlung aufwiesen, ohne signifikante Unterschiede zwischen der Anfangs- und Endphase. Da eine präzise Normierung auf eine mittlere Zellzahl nicht möglich war, sind in den Abbildungen nur die gemessenen Konzentrationen in mM (abzüglich des Medium-Leerwertes) dargestellt. Es zeigte sich jedoch qualitativ, dass auch nach zwei- oder viertägiger Differenzierung noch eine erhebliche Laktatbildung in den Kulturen stattfand.

In einem zweiten Schritt (Abb. 21 B) sollte untersucht werden, inwieweit der Zusatz des eigentlichen Differenzierungsagens RA einen Effekt auf die Laktatbildung hatte, im direkten Vergleich zu Neurobasalmedium mit B27 allein. Zu diesem Zweck wurden erneut Zellen nach einer DMEM-Vorkulturphase von 24 Stunden in Neurobasalmedium + B27 umgesetzt, jedoch nur bei einem Teil der Flaschen 10 μ M RA zugegeben. Vom Zellkulturmedium wurden nach 48 Stunden erneut Proben zur Laktatmessung entnommen. Bei allen drei Klonen fanden sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Behandlung mit und ohne RA (Abb. 21 B). Diese Versuche sprachen somit zunächst nicht für einen merklichen Einfluss von RA auf den glykolytischen Umsatz der Zellen unter normoxischen Bedingungen.

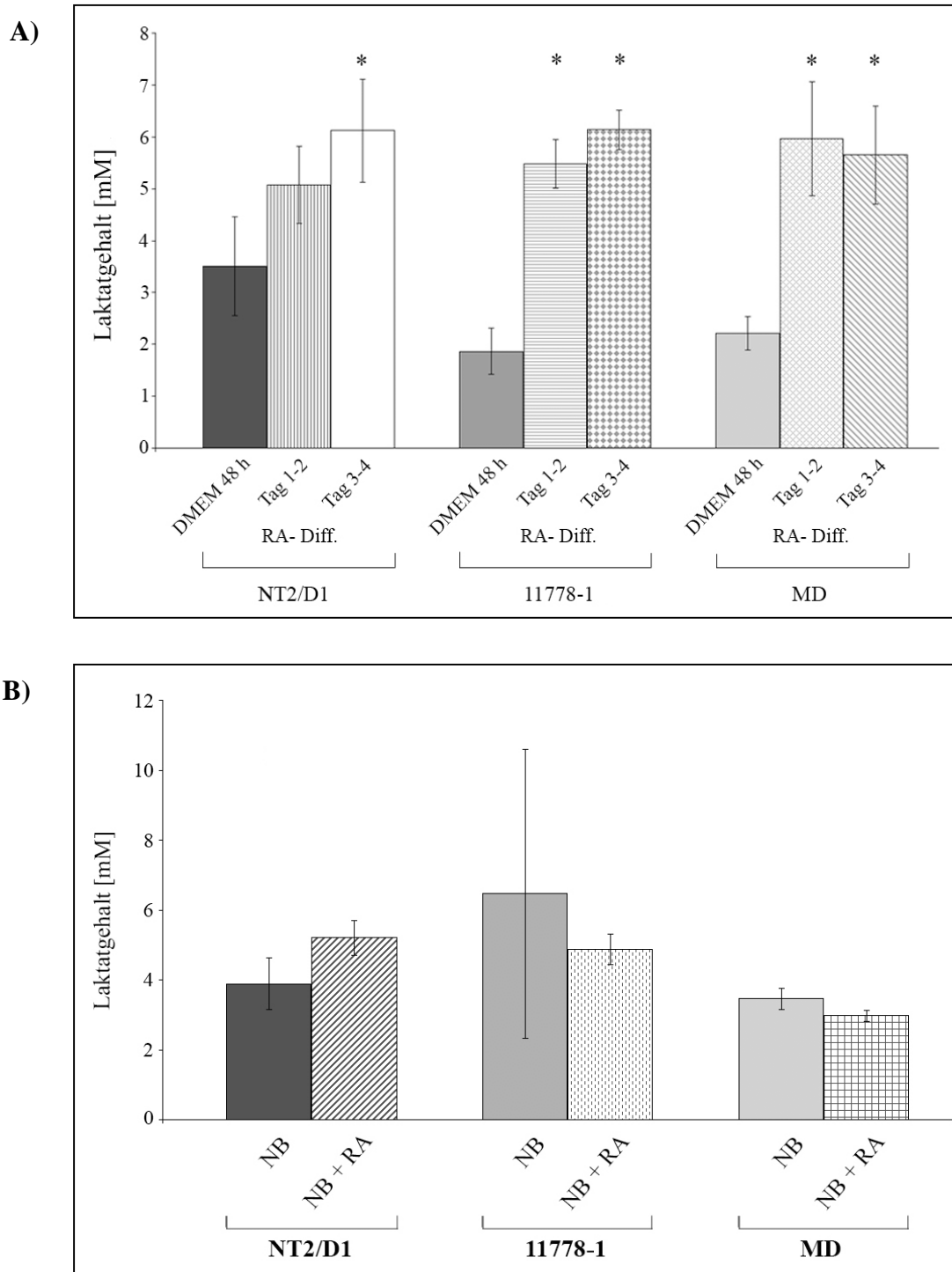


Abb. 21: Bestimmung des Laktatgehalts im Kulturmedium. A) undifferenzierte (DMEM) und RA-differenzierte NT2/D1-Cybride (Tag 1-2 bzw. Tag 3-4 in Neurobasalmedium + RA). B) NT2/D1-Cybride, inkubiert für 48 h in Neurobasalmedium (NB) oder Neurobasalmedium mit Retinolsäure (NB + RA) * = signifikante Unterschiede gegenüber DMEM-Inkubation ($p \leq 0,05$).

Alle sechs Gruppen aus Abbildung 21 B hatten bei diesem Experiment am Anfang der Behandlung gleiche Ausgangsbedingungen, denn alle Flaschen waren identisch beimpft und die Kulturen für 24 Stunden in DMEM belassen worden. Somit sollten auch die Zellzahlen für jede Zelllinie im paarweisen Vergleich mit und ohne RA zu Beginn der Behandlung vergleichbar gewesen sein. Eine höhere Zellzahl am Ende des 48-Stunden Behandlungsintervalls (gemäß direkter Zählung) sollte also auf eine höhere durchschnittliche Zellzahl während dieser Phase zurückschließen lassen. Es erschien daher sinnvoll, auch die pro Flasche erzeugte Molmenge Laktat bezogen auf 10^6 dieser am Ende vorhandenen Zellen zwischen den Gruppen zu vergleichen. Allerdings müssen diese Quotienten nicht notwendigerweise zu den tatsächlichen Produktionsraten direkt proportional sein.

Normierte man also in dieser Weise (Abb. 22), so schienen die Mittelwerte für die RA-Gruppen niedriger zu sein als für die jeweils korrespondierende Gruppe ohne RA. Allerdings erreichte diese Differenz nur für eine Zelllinie Signifikanz ($p \leq 0,05$), und zwar ausgerechnet für die nicht durch RA neuronal differenzierbare Linie MD, deren Laktatproduktion besonders hoch war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die RA in der Tat einen Einfluss auf den glykolytischen Umsatz der Zellen hat, d.h. dass die Zellen gezwungen werden vermehrt die OXPHOS zur Energiegewinnung zu verwenden. Vielleicht wäre diese Stoffwechselwirkung unabhängig von der RA-Responsivität im Sinne von Proliferationsstop und Differenzierung. Aus diesem Grund wurden an dieser Stelle Atmungsmessungen durchgeführt.

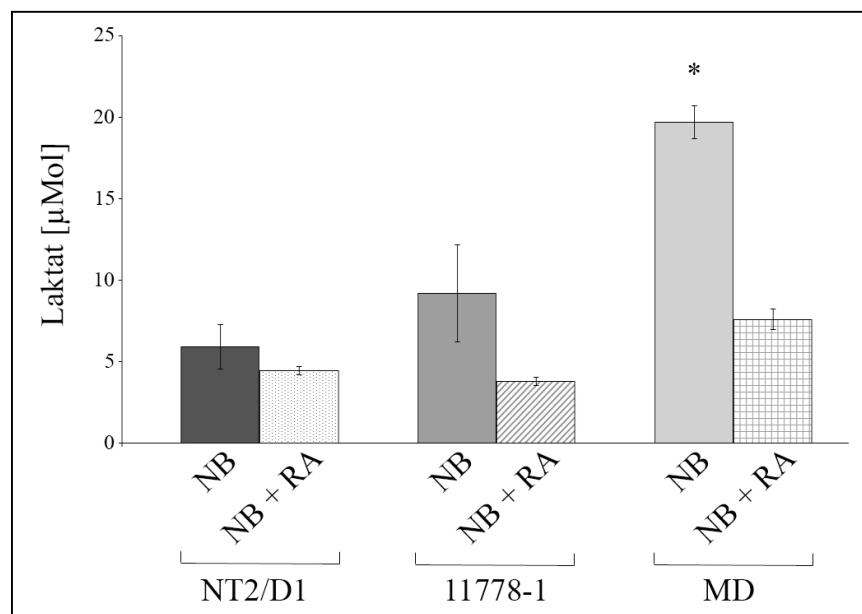


Abb. 22: Laktatproduktion von NT2/D1 und 11778-1 nach Inkubation mit Neurobasalmedium (NB) bzw. Neurobasalmedium + Retinolsäure (NB + RA). In 48 h pro Zellkulturflasche produziertes Laktat, normiert auf 10^6 der am Ende dieses Zeitraums in der Flasche vorhandenen Zellen (direkte Zählung). * = signifikante Differenz ($p \leq 0,001$).

5.6. Atmungsmessungen

Im Zuge der Differenzierung durch RA soll es hypothetisch zu einer höheren Nutzung der Atmungskette (OXPHOS) kommen. Dieser angestrebte Effekt von RA wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Atmungsmessungen überprüft. Gleichzeitig sollten diese Messungen darüber Auskunft geben, ob sich der in der Literatur kontrovers diskutierte Atmungsdefekt bei der 11778-LHON-Mutation (Carelli et al., 1997; Carelli et al., 1999 vs. Brown et al., 2000) am NT2/D1-Modell zeigt oder nicht.

Ohne Zugabe externer Atmungssubstrate zeigten die Digitonin-permeabilisierten Zellen im Oxygraphen einen nur minimalen Sauerstoffverbrauch, der erwartungsgemäß binnen Minuten auf Null zurückging, jedoch durch die Komplex I-Substrate Malat/Glutamat und weiter durch ADP (Maximalatmung, *state 3*) stimuliert werden konnte. Dies konnte somit als mitochondriale Atmung durch Komplex I interpretiert werden. Entgegen der Erwartung, dass die undifferenzierten Cybride einen geringeren Sauerstoffverbrauch aufweisen würden als die RA-differenzierten, zeigte sich, dass es zu keinem statistisch signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen kommt (Abb. 23). Darüber hinaus spielte auch das Medium (DMEM oder Neurobasal) innerhalb einer Zelllinie keine signifikante Rolle für die Respiration. Beim direkten Vergleich der beiden Gruppen Neurobasalmedium mit und ohne RA schienen die Mittelwerte zwar für alle Zelllinien außer R3460-1 in Gegenwart von RA geringfügig höher auszufallen, diese Differenzen wurden jedoch in keinem Fall signifikant. Es konnte somit hieraus nicht auf eine Atmungsstimulation durch RA geschlossen werden. Ebenfalls unterschieden sich die beiden Mutanten und die beiden Wildtyp-Klone bei gleichem Medium nicht signifikant voneinander.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass es bei diesen Messungen weder einen Effekt des Mediums noch einen mutationsspezifischen Effekt gibt. Diese Aussage steht jedoch unter dem Vorbehalt der mit einem Mittelwert von $1,7 \pm 0,12$ recht niedrigen respiratorischen Kontrolle durch ADP (Verhältnis von Maximalatmung zur Atmung ohne ADP). Dieses niedrige Verhältnis könnte auf generell funktionell beeinträchtigte, d.h. schlecht gekoppelte, Mitochondrien in den Präparationen trotz zügiger Aufarbeitung und Messung hinweisen.

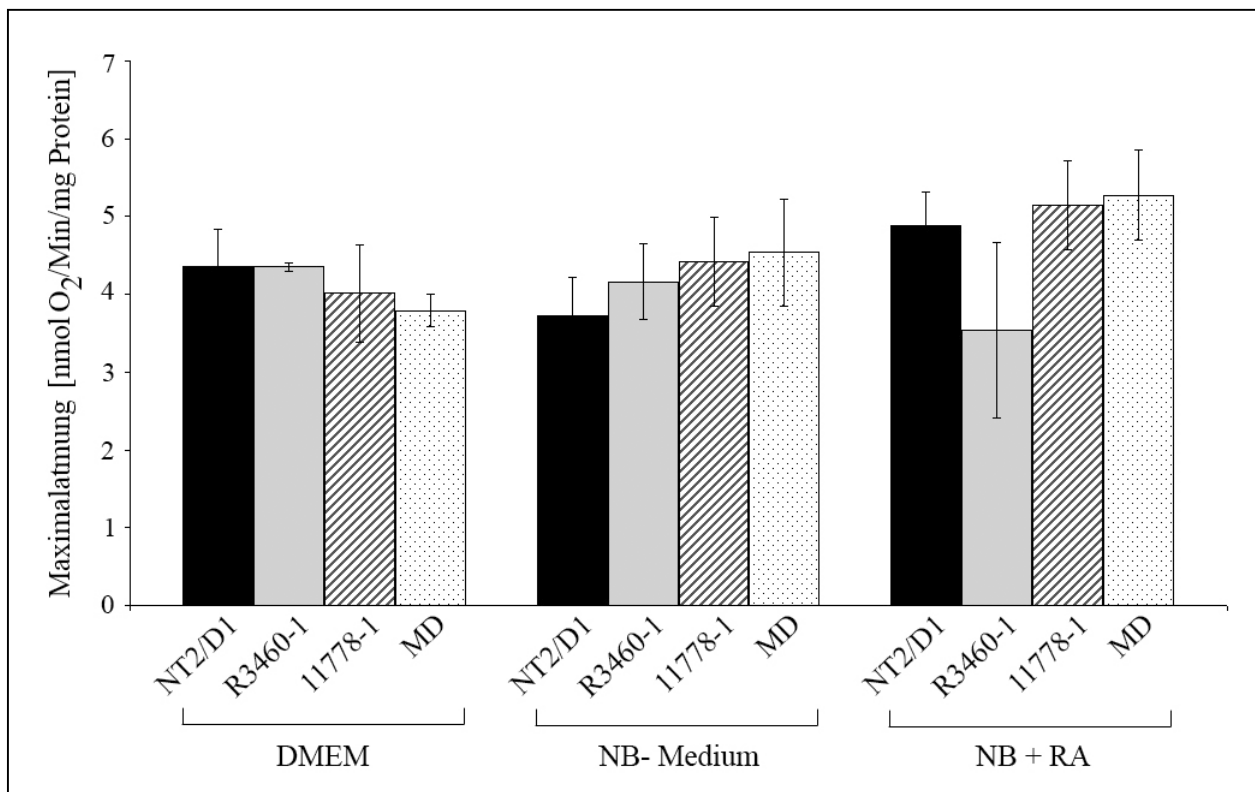


Abb. 23: Maximalatmungsraten von NT2/D1-Cybriden nach Stimulation mit Glutamat/Malat und ADP. O₂-Verbrauch in nmol/Min/mg zelluläres Protein nach Stimulation mit 10 mM Glutamat und 5 mM Malat sowie 2 μ M ADP bei Teratomcybriden nach Inkubation für 24 h in DME-Medium, nach Differenzierungsbehandlung für 4 Tage (NB + RA) oder identischer Behandlung in NB-Medium, jedoch ohne RA.

5.7. Energetisierung der NT2/D1-Cybride

Nach den Befunden von Zanna et al. (2003) und Baracca et al. (2005) sollte der Energiezustand der Teratomcybride im undifferenzierten sowie im andifferenzierten Zustand überprüft werden, um zu sehen, ob in den Mutanten möglicherweise ein Energiedefizit vorliegt, oder dies durch die RA-Behandlung entsteht.

Zur Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts wurden Zellen der durch RA differenzierbaren Mutante 11778-1 und von NT2/D1 entsprechend der in Kap. 4.3.5. angegebenen Methode aufgearbeitet. Jeder in Abb. 24 dargestellte Balken repräsentiert hierbei sechs unabhängige Wiederholungen. Der gemessene ATP-Gehalt wurde auf den zellulären Proteingehalt normiert. Im undifferenzierten Zustand hatte der Klon 11778-1 entgegen der Erwartung signifikant mehr ATP als die Kontrolle NT2/D1. Nach Andifferenzierung mit RA war jedoch keine Differenz vorhanden. Es gab also gemessen am Parameter ATP/mg zelluläres Protein keinen Beleg für ein OXPHOS-Defizit der Mutante. Da die Basiswerte von Mutante und Wildtyp in DME-Medium sehr unterschiedlich waren, blieb die Interpretation der signifikanten Absenkung des Messwerts durch die Differenzierung bei der Mutante fraglich.

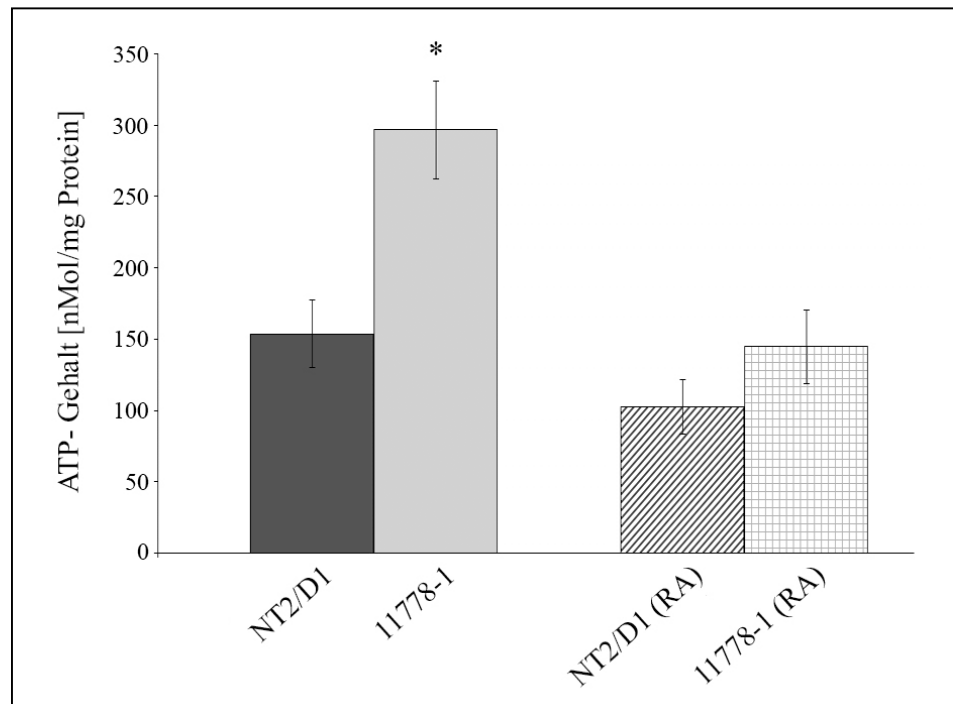


Abb. 24: ATP-Gehalt in nmol/mg zelluläres Protein. Links: Vergleich der undifferenzierten Klone NT2/D1 vs. 11778-1, Rechts: Vgl. von NT2/D1 und 11778-1 nach viertägiger Andifferenzierung in Neurobasalmedium mit RA, * = signifikanter Unterschied zu allen anderen Gruppen.

5.8. Vitalität der NT2/D1-Cybride unter externem oxidativem Stress und neurotoxischen Substanzen

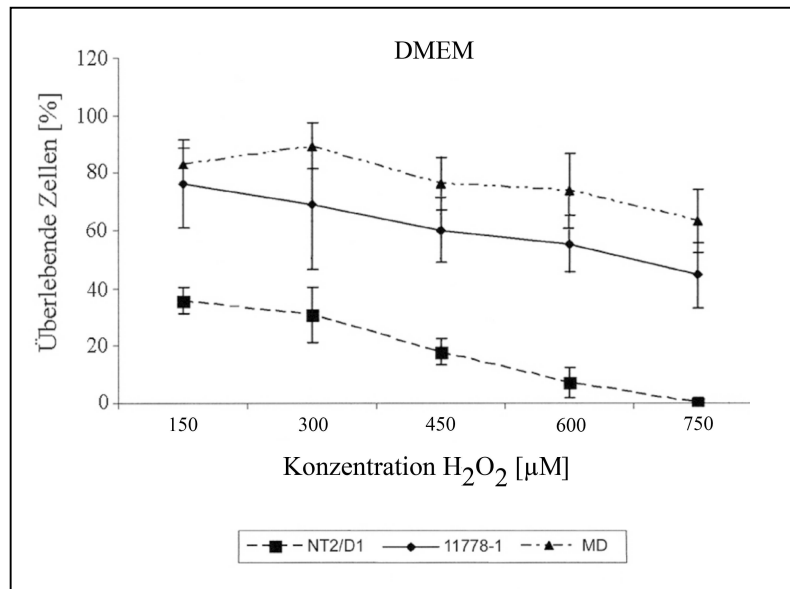
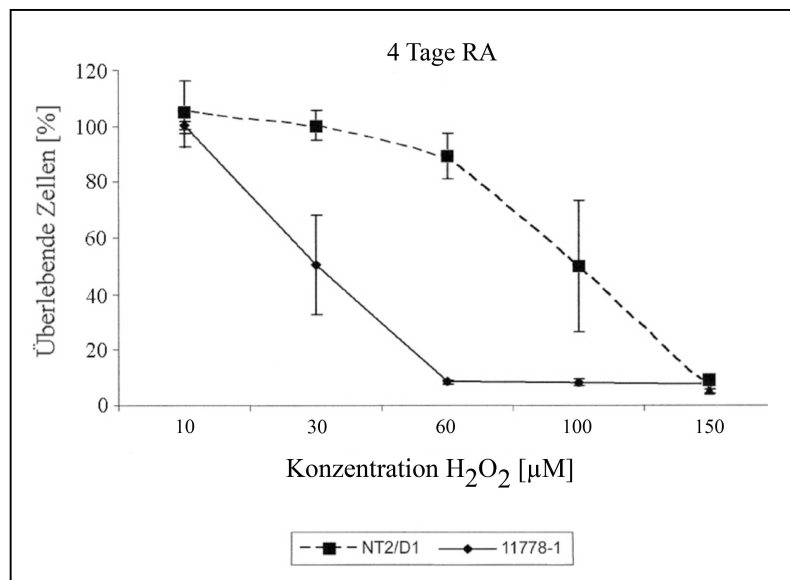
Eine erhöhte Superoxidproduktion durch Komplex I bei LHON ist eine der beiden favorisierten Erklärungen in der Literatur für den Untergang retinaler Ganglienzellen. Sie tritt im Teratommodell möglicherweise erst nach der Differenzierung der Zellen auf, gemäß Fluoreszenzmessungen mit *ROS*-sensitiven Farbstoffen (Wong et al., 2002). Aus diesem Grunde sollte anhand der RA-responsiven Linien 11778-1 und NT2/D1 geprüft werden, ob die Teratomzellen generell durch RA-Behandlung sensitiver gegenüber dem extern applizierten Oxidans H_2O_2 werden, und ob sich besonders deutlich, oder sogar nur im andifferenzierten Zustand ein Mutationseffekt zeigt. Die Hypothese dabei war, dass durch die mutationsbedingt erhöhte *ROS*-Produktion die antioxidative Verteidigung der Mutanten höher abgesättigt ist und die Schwelle für eine Überlastung niedriger liegt. Als Oxidans wurde zunächst H_2O_2 eingesetzt, weil es hinreichend membrangängig ist und die sekundäre *ROS*-Spezies (Abbauprodukt des Superoxids) darstellt, die hypothetisch von dem mutierten Komplex I gebildet wird. Die pleiotrope Wirkung des H_2O_2 , d.h. die Schädigung aller Membranen (z.B. Plasmalemma), sowie der steile zeitliche Konzentrationsverlauf bei direkter Applikation in das Zellkulturmedium stellen allerdings ei-

nen Nachteil dar. Ergänzend sollten daher Paraquat und Benzylviologen verwendet werden. Die beiden Substanzen bilden durch *Redox-Cycling* über einen längeren Applikationszeitraum (24 h) hinweg intrazelluläres Superoxid. Im Zuge der hierzu durchgeführten MTT-Tests wurden ferner die Alkohole Ethanol und Methanol mitgetestet. Diese Substanzen erzeugen zwar nur indirekt oxidativen Stress (s.u.), jedoch stellen sie für LHON zwei interessante Noxen dar. Beide sind generell als Auslöser optischer Neuropathien bekannt. Vor allem aber steht der Ethanolkonsum in einem signifikanten Zusammenhang mit der Ausbruchswahrscheinlichkeit von LHON bei Mutationsträgern (Sadun et al., 2002; Sadun et al., 2003; Sadun et al., 2004), wobei Methanol in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert wird (Sadun A., 1998). Die toxischen Effekte des Ethanols können z.T. über *ROS* generierende Enzymreaktionen ausgelöst werden (Castillo et al., 1992) bzw. mit mitochondrialer Glutathion-Depletion in Zusammenhang stehen (Fernandez-Checa et al., 1996; Mari et al., 2002; Coll et al., 2003). Am Zelltodmechanismus ist eine mitochondriale Apoptose mit Cytochrom-c-Ausschüttung beteiligt (Higuchi et al., 2001).

5.8.1. Externer oxidativer Stress

Zunächst wurde die H_2O_2 -Sensitivität der beiden Teratomklone mit LHON-Mutation gegen die Parentallinie in DME-Medium getestet (Schoeler et al., 2007). Die Dosis-Wirkungskurven beider Mutanten lagen über den gesamten Konzentrationsbereich jedoch weit oberhalb derjenigen für NT2/D1 (s. Abb. 25 A). Es ergab sich somit kein Anhaltspunkt dafür, dass in den undifferenzierten Tumorzellen die Mutation G11778A signifikant die H_2O_2 -Sensitivität bestimmte. Im Vergleich hierzu waren die als Referenz dienenden 143B.TK(-)-Cybride, unabhängig vom Vorliegen der Deletion, recht sensitiv (Abb. 25 C). Bei Applikation von H_2O_2 nach Kurzzeitdifferenzierung zeigte sich eindeutig eine generell höhere Empfindlichkeit der beiden RA-responsiven Teratomklone. Unter diesen Bedingungen reagierte die Mutante 11778-1 zudem über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg empfindlicher als der Kontrollklon NT2/D1 (Abb. 25 B). Die Differenz beider Linien war zwischen 30 μM und 60 μM H_2O_2 am grössten ($p \leq 0,05$). Die Inversion der H_2O_2 -Sensitivität von 11778-1 und NT2/D1 stützte zunächst die in der Literatur behauptete Differenzierungsabhängigkeit des oxidativen Stress‘ durch LHON-Mutationen (Wong et al., 2002). In ihren Versuchen hatten diese Autoren auch eine erhöhte *ROS*-Produktion für die Mutante 3460-1 nach Differenzierung gemessen. Das unserem Institut überstellte Aliquot dieser Linie war jedoch eine Revertante (s.o.). Diese Revertante (R3460-1) war zu Beginn der vorliegenden Arbeit bis hin zu den ersten Versuchen zum oxidativen Stress aufgrund ihrer chromosomalen Aberrationen nicht verwendet worden. Bei später nachgeholten Messun-

gen zeigte sich jedoch, dass ihre H_2O_2 -Sensitivität nach RA ebenfalls höher als diejenige von NT2/D1 war. Bei $30 \mu\text{M}$ H_2O_2 reagierte sie sogar noch empfindlicher als die Mutante ($p \leq 0,05$). Aufgrund dieser Widersprüche schienen unbekannte, andere Differenzen zwischen den Klonen die H_2O_2 -Sensitivität stark zu beeinflussen und Mutationseffekte zu überlagern.

Abb. 25:**A)****B)**

25 C)

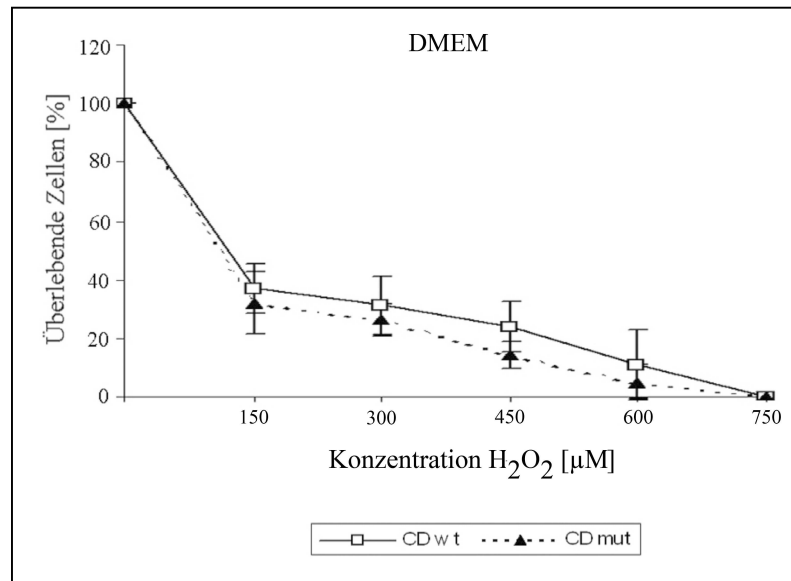


Abb. 25: Dosiswirkungskurve von H₂O₂ im MTT-Assay. In Abb. 25 ist der Einfluss von H₂O₂ auf das Überleben von LHON-Cybriden sowie CD-Cybriden gezeigt. Die Anzahl der im MTT-Test ermittelten überlebenden Zellen [%] ist hierbei gegen die Konzentration von H₂O₂ aufgetragen. A) undifferenzierten LHON-Cybride, B) RA-differenziert und C) 143B.TK(-)-Cybride. Normiert wurde in allen Experimenten auf eine unbehandelte Lebendkontrolle (= 100%). Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

Wegen der generell höheren Empfindlichkeit der Zellen gegenüber H₂O₂ nach RA-Behandlung wurden die folgenden Versuche mit Methyl- und Benzylviologen ausschließlich an den andifferenzierten Teratomcybriden durchgeführt. Das Herbizid 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium (Methylviologen, Paraquat) und dessen Derivat 1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid (Benzylviologen) wurden aufgrund ihrer Eigenschaft des *Redox-Cycling* im MTT-Test eingesetzt. Diese Substanzen können durch Aufnahme von Elektronen zum Radikal umgewandelt werden, welches das überschüssige Elektron auf ein Sauerstoffmolekül überträgt (Superoxidbildung).

Bei beiden Substanzen waren die Effekte, gemessen an der von anderen Zelltypen abgeleiteten Erwartung, sehr gering. Trotzdem ergaben sich bei Paraquat selektiv nur für die LHON-Mutante hochsignifikant erniedrigte Lebendzellzahlen ($p \leq 0,001$) über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg (Abb. 26 A). Ein identisches Verhalten konnte bei Benzylviologen nicht beobachtet werden (Abb. 26 B). Diese Substanz wirkte zwar insgesamt stärker, in diesem Fall reagierte die Kontrolle NT2/D1 jedoch signifikant sensitiver (ab 2 µM) auf die Substanz als die LHON-Mutante (ab 50 µM) und die Revertante (erst ab 200 µM), jeweils $p \leq 0,001$. Eine gleichgerichtete Reaktion der Teratomcybride auf beide Substanzen war somit nicht erkennbar.

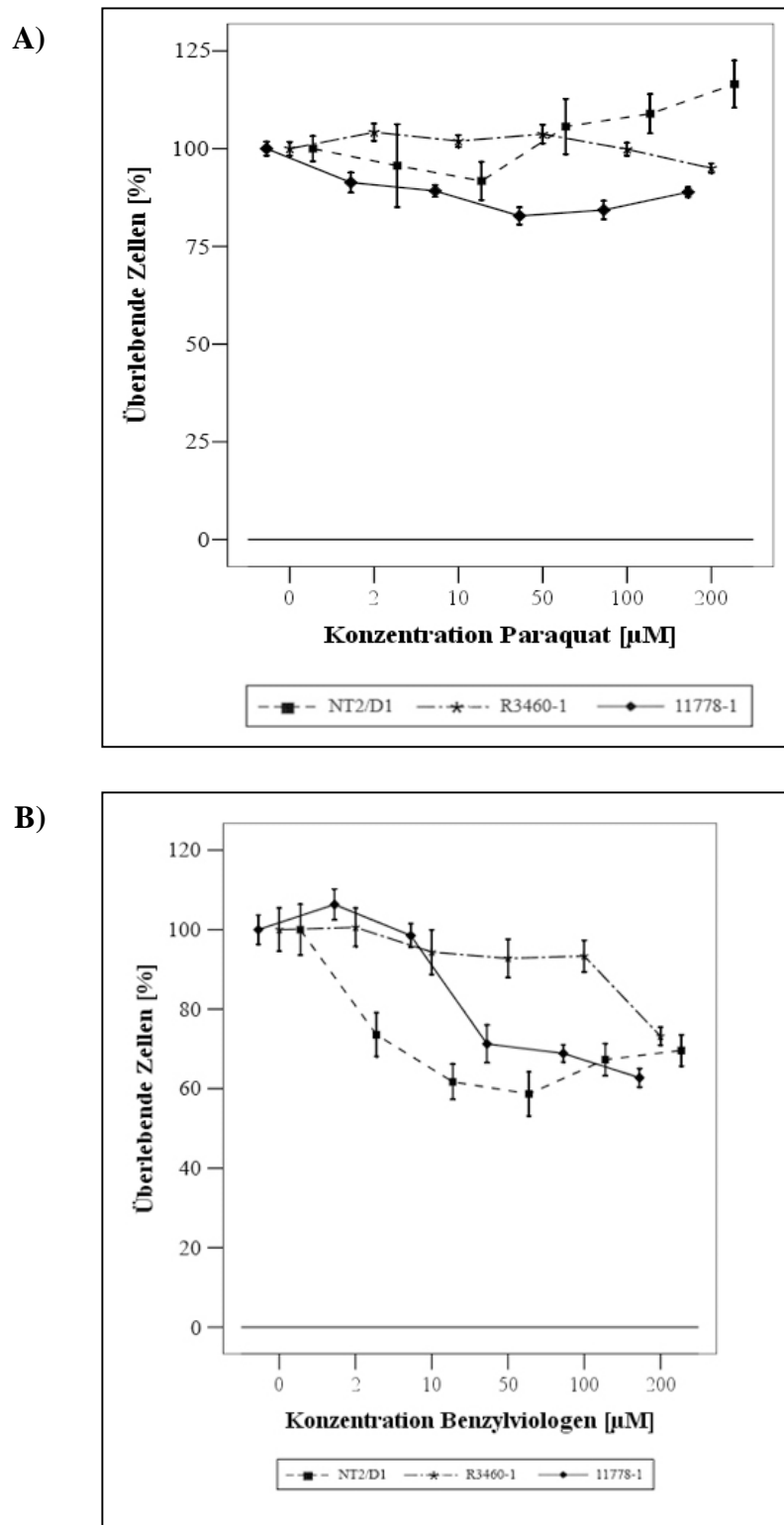


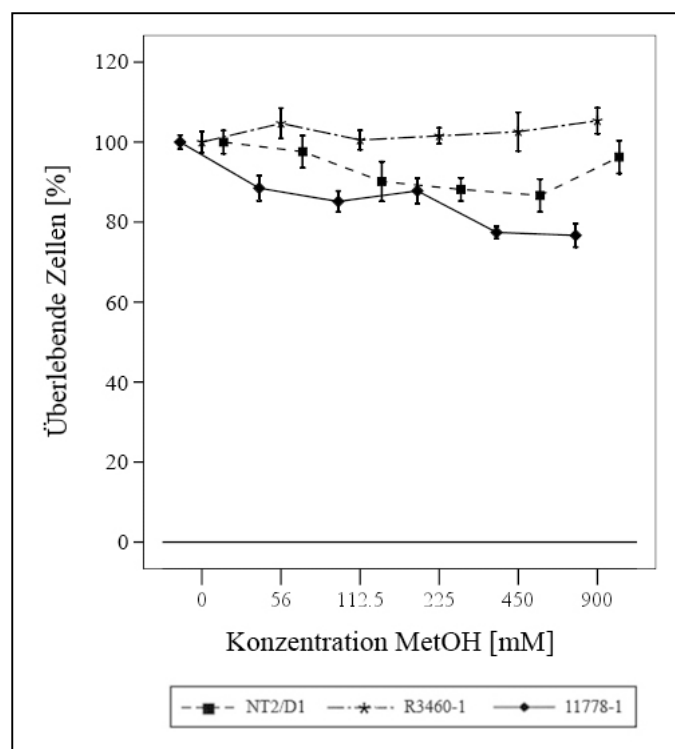
Abb. 26: Einfluss von Paraquat und Benzyliologen auf differenzierte LHON-Cybride (vier Tage Retinolsäure). Im MTT-Test bestimmte Anzahl überlebender Zellen [%], aufgetragen gegen die Konzentration an A) Paraquat [μM] bzw. B) Benzyliologen [μM].

5.8.2. Ethanol und Methanol

Nach 24-stündiger Inkubation RA-differenzierter Zellen mit Methanol- bzw. Ethanolkonzentrationen zwischen Null und 900 mM, zeigten sich unterschiedliche Effekte im Überleben der Zellen (s. Abb. 27 A und B).

Die Wirkung von Methanol über 24 h war generell unerwartet gering. Allerdings zeigte selektiv die LHON-Mutante einen signifikanten Abfall der Lebendzellzahl, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Lebendzellzahl der LHON-Mutante sank um insgesamt 23,1 %. Über den gesamten Konzentrationsbereich war das Methanol bei dieser Linie signifikant wirksam ($p \leq 0,05$) bei Vergleichen der einzelnen Stufen im Dunnett-Test gegen die Lebendkontrolle. Im Gegensatz dazu war bei Ethanol ab 112,5 mM eine hochsignifikante Wirkung ($p \leq 0,01$) für alle Zelllinien bei allen Konzentrationen im Dunnett-Test gegen die Lebendkontrolle festzustellen. Insgesamt reagierte die Mutante 11778-1 diesmal jedoch weniger sensitiv als die beiden Wildtyp-Klone. Bei 450 mM EtOH z.B. sanken die Lebendzellzahlen der Parentallinie (NT2/D1) und der Revertante (R3460-1) auf 51 % bzw. 53,3 %, im Gegensatz zu 11778-1 (82,1%) ab. Die Dosis-Wirkungskurve für 11778-1 verlief stets oberhalb derjenigen der beiden Wildtyp-Klone. Diese Differenz mit unerwartetem Vorzeichen war bei Vergleichen der Linien untereinander im Tukey-Test ab der Konzentrationsstufe von 450 mM ebenfalls hochsignifikant ($p \leq 0,001$). Zusammenfassend fand sich nur bei Methanol, bei welchem bislang nur vermutet wird, dass es mit LHON assoziiert ist, ein schwacher Mutationseffekt mit erwartetem Vorzeichen, während sich für die am Menschen nachweislich LHON-assoziierte Noxe Ethanol ein stärkerer Effekt mit umgekehrtem Vorzeichen an den Zellkulturen ergab.

Abb. 27:
A)



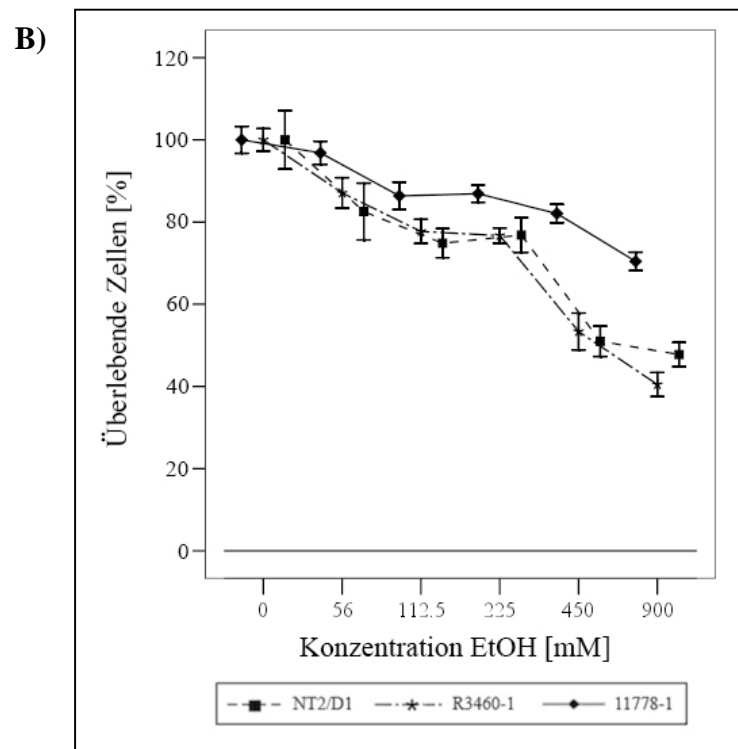


Abb. 27: Dosiswirkungskurven von Ethanol und Methanol: Messung der überlebenden, differenzierten NT2/D1-abgeleiteten Cybride im MTT-Test nach 24-stündiger Inkubation mit A) Methanol (0-900mM) oder B) Ethanol (0-900 mM), normiert auf unbehandelte Kontrolle (= 100 %) und aufgetragen gegen die Konzentration der Substanzen, acht unabhängige Wiederholungen.

5.8.3. Beteiligung der Apoptose am H_2O_2 -induzierten Zelltod von LHON-Cybriden

Zur selektiven Messung der Apoptose-Induktion durch H_2O_2 wurden Caspase-3 Assays durchgeführt. Caspase-3 ist eine Effektorcaspase, welche im letzten Schritt der apoptotischen Kaskade nach Freisetzung apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien aktiviert wird. Mit diesem fluorimetrischen Test konnte die proteolytische Aktivität der Caspase-3 vor bzw. nach Induktion mit H_2O_2 bestimmt werden. Die Zellen der Linien NT2/D1 und 11778-1 wurden hierzu in $75cm^2$ Flaschen eingesät, kultiviert, bzw. nach optimiertem Protokoll mit RA differenziert, und nach Mediumwechsel für 24 Stunden mit $100 \mu M H_2O_2$ behandelt. Jedes Experiment bestand aus sechs unabhängigen Wiederholungen. Insgesamt wurde jede Versuchsreihe dreimal wiederholt, d. h. Messungen an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Um eine direkte Vergleichbarkeit der einzelnen Mikrotiterplatten zu gewährleisten, wurde immer bei der gleichen Verstärkung des Fluorimeters (Faktor: 128) gemessen. Anzumerken ist, dass die RA-differenzierten Zellen beider Linien nach H_2O_2 -Behandlung zum grossen Teil abgeschwommen waren. Deshalb wurde zunächst der Überstand (auch bei den unbehandelten Kontrollen) abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit den übrigen, adherenten Zellen vereinigt. Da die absoluten Fluoreszenzwerte der unabhängigen Experimente zu sehr divergierten, konnten sie nicht

zusammengefasst werden. Aus diesem Grund sind sie in der folgenden Abbildung (Abb. 28 A und B) einzeln aufgeführt. Im undifferenzierten Zustand zeigte H_2O_2 bei beiden Linien in allen drei Ansätzen eine signifikante Wirkung (Abb. 28 A), d.h. dass nach H_2O_2 -Behandlung mehr aktive Caspase-3 nachgewiesen wurde ($p \leq 0,05$). Allerdings waren die relativen Anstiege z.T. sehr gering. Bis auf eine Ausnahme (11778-1, Abb. 28 B unten) wurde in der Regel auch an den RA-differenzierten NT2/D1 und 11778-1 Zellen eine signifikante Wirkung von H_2O_2 erzielt ($p \leq 0,05$). Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass die Caspase-3-Werte der undifferenzierten Zellen in einem deutlich engeren Fluoreszenzbereich lagen als die der RA-behandelten Zellen. Drückte man daher nur bei diesen drei Experimenten die Ergebnisse als relativen Fluoreszenzanstieg der behandelten Proben gegenüber unbehandelten Kontrollen aus, ergab sich auch in einer gemeinsamen Statistik (ANOVA) über alle Versuchstage hinweg eine signifikant höhere Induktion bei der Linie 11778-1 ($p \leq 0,05$). Eine entsprechende Normierung bei den RA-behandelten Kulturen erschien jedoch wegen der starken Schwankungen der absoluten Fluoreszenzen nicht statthaft. Das starke Abschwimmen dieser Zellen deutete darauf hin, dass die Ursache der großen Schwankungen dieser Messungen in der geringen Zeitspanne zwischen dem Beginn der Caspase-3-Aktivierung und der Zelllyse liegen könnte, d.h. das Zeitfenster der Messungen könnte sehr kritisch sein. Damit konnte die Frage, ob die RA-Behandlung die Apoptoseinduktion durch H_2O_2 erhöht, nicht entschieden werden. Die erhöhte Apoptoseinduktion der Mutante in DMEM stand im Widerspruch zu ihrer geringeren Sensitivität gegenüber H_2O_2 im MTT-Test, der vermutlich auch andere toxische Effekte des Oxidans erfasst. H_2O_2 löste offenbar einen nur zum geringen Teil apoptotischen Zelltod aus. Dies macht seine Applikation in Cybridstudien problematisch. Eine DAPI-Färbung von NT2/D1 oder 11778-1 Zellen nach $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 für 24 Stunden zeigte vereinzelt fragmentierte Zellkerne oder Chromatinkondensation in kleinen, runden Körperchen (*apoptotic bodies*) (Daten nicht gezeigt), die einen partiell apoptotischen Zelltod unterstützten.

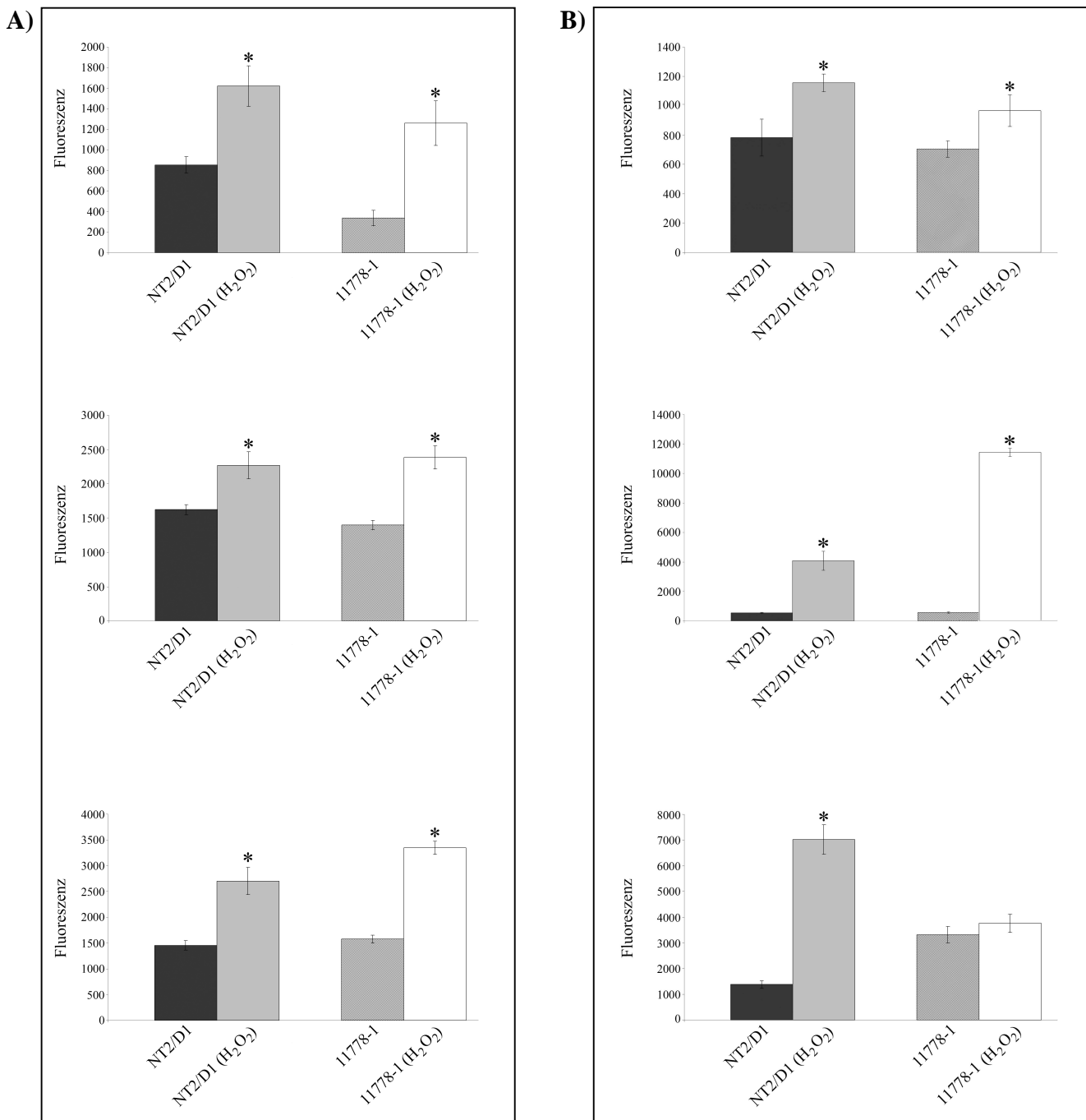


Abb. 28: Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-3 Aktivität vor bzw. nach apoptotischer Induktion durch H₂O₂. Relative Fluoreszenz nach Spaltung des fluorigenen Caspase-3 Substrats durch Zelllysate von A) undifferenzierten und B) 4 Tage Retinolsäure differenzierten LHON-Cybriden, ohne bzw. nach 24-stündiger Behandlung mit 100 µM H₂O₂, * = signifikant auf dem Niveau $p \leq 0,05$.

Neben den Teratomcybriden wurden die beiden 143B.TK(-)-Cybride als Referenz verwendet. Diesem Experiment lagen je sechs unabhängige Proben zugrunde. Die Zellen wurden mit 450 µM H₂O₂ für 24 Stunden in DMEM behandelt. In diesem Fall schwammen die Zellen nicht ab,

sodass sie gemäss der Beschreibung in Kap. 4.3.4. aufgearbeitet und der Assay durchgeführt werden konnte. Auch hier führte H_2O_2 bei beiden Osteosarkomlinien zu einer signifikanten Erhöhung ($p \leq 0,05$) der Caspase-3 Aktivität. Das Fluoreszenzverhältnis von behandelten zu unbehandelten Zellen lag bei der Mutante (3,1) höher als bei der Wildtyplinie (2,6) (s. Abb. 29).

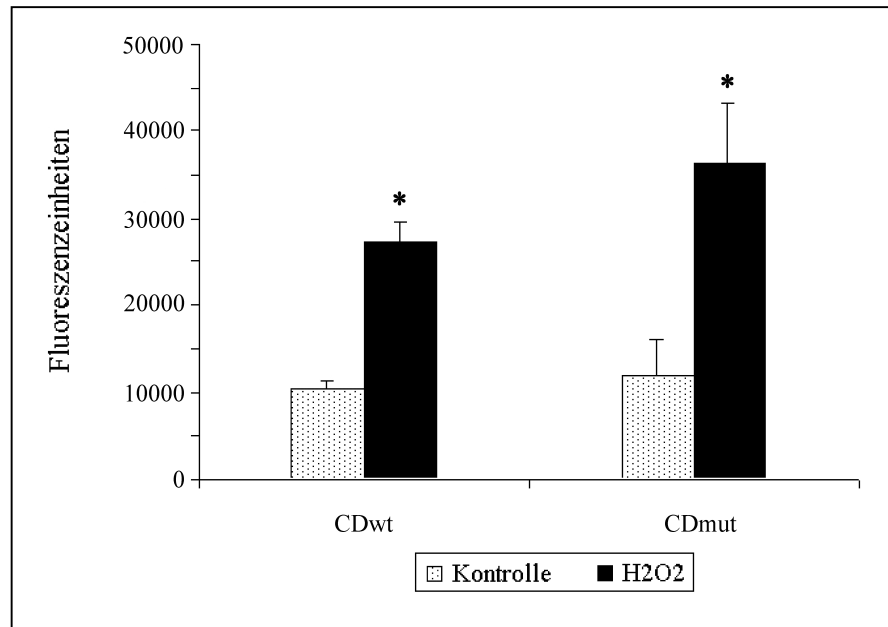


Abb. 29: Caspase-3 Assay vor bzw. nach Behandlung von *CD*-Cybriden mit H_2O_2 . Die Abb. 29 zeigt die relative Fluoreszenz nach Spaltung des fluorigenen Caspase-3 Substrats durch Zelllysate von *CD*-Cybriden (Wildtyp versus Mutante), welche unbehandelt waren (Kontrolle) bzw. 24 Stunden mit $450 \mu M H_2O_2$ inkubiert wurden. * = signifikant ($p \leq 0,05$).

5.9. Charakterisierung der antioxidativen Verteidigung der NT2/D1-Cybride

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von Galaktosemedium, extern applizierten Oxidantien, Apoptoseinduktoren und zytotoxischen Substanzen auf die Vitalität der Zellen untersucht. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob die Mutanten in Folge einer intern erhöhten ROS-Produktion systematisch sensitiver auf proapoptotische Stimuli reagieren als die im Vergleich getesteten Wildtyp-Klone. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Mutanten reagierten nicht sensitiver auf Galaktosemedium, der Apoptoseinduktor Staurosporin zeigte keine systematische Wechselwirkung mit der Mutation und auch gegenüber *TRAIL* erwies sich die Mutante als nicht sensitiver. Die Ergebnisse mit den Oxidantien H₂O₂, Paraquat und Benzylviologen waren ebenfalls widersprüchlich. Die mit Abstand deutlichsten Unterschiede zwischen den Zellklonen ergaben sich für H₂O₂. Gegenüber diesem Oxidans reagierte die Mutante 11778-1 nur nach RA-Behandlung sensitiver als die Parentallinie, während sich ein inverses Verhältnis im undifferenzierten Zustand zeigte. Diese Umkehr deutete auf einen differenzierungsabhängigen Effekt in der Sensitivität gegen oxidativen Stress hin, welche zu den Vorbefunden aus dem Labor von Prof. Cortopassi passen könnten (Wong et al., 2002). Allerdings war durch viele Widersprüchlichkeiten, wie z.B. das Verhalten der Revertante R3460-1 oder gravierende Diskrepanzen zwischen MTT-Test und Caspase-3-Messung, kein klarer Rückschluss auf oxidativen Stress in Teratomzellen mit der np11778 Mutation möglich. Als weiterer Ansatzpunkt wurden deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit Glutathion, sowie das enzymatische, antioxidative Verteidigungssystem auf Expressions-, Protein- und Aktivitätsebene untersucht.

5.9.1. Glutathion

Die Glutathiongehalte aller Cybride außer CM wurden in Normalmedium (DMEM) und für die differenzierbaren Linien auch nach der viertägigen RA-Behandlung gemessen. Hierzu wurden je fünf 75cm²-Flaschen, die dicht bewachsen waren (ca. 90 %), zusammengefasst und die Präparationen bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Lagerzeit überschritt den Zeitraum von 14 Tagen nicht und unterschied sich im Mittel nicht für die Passagen von Mutanten und Wildtyp, zwecks Minimierung eventueller Lagerungsartefakte. Insgesamt sechs (zehn) unabhängige Wiederholungen lagen den Messungen der Teratom-Cybride (143B.TK(-)-Cybride) zugrunde. Generell waren die gemessenen Gehalte an Gesamt-Glutathion bei den Teratomzellen mit Werten um drei nmol/mg Gesamtprotein im Vergleich zu anderen Zelllinien sehr gering. Passend zu diesem Befund war kein oxidiertes Glutathion (GSSG) messbar, welches im Normalfall nur einen sehr kleinen Anteil des Gesamtglutathions ausmachen sollte. In DMEM zeigten sich kei-

ne signifikanten Unterschiede zwischen allen getesteten Teratom-Linien (Daten nicht gezeigt). Erst nach der Andifferenzierung kam es, selektiv bei der RA-responsiven Mutante 11778-1 (Abb. 30 A), zu einer signifikanten ($p \leq 0,05$) Halbierung des Gesamt-Glutathiongehaltes (Schoeler et al., 2007). Dies konnte als Hinweis auf einen spezifischen Effekt der Mutation gewertet werden. Andererseits war auch in diesem Fall kein GSSG, als direkter Indikator für oxidativen Stress, nachweisbar. Die Verminderung des Gesamtglutathions senkt jedoch die Belastbarkeit der Zellen.

Als Referenz wurden zusätzlich die beiden 143B.TK(-)-Cybride untersucht, um zu überprüfen, ob die *common deletion*, welche laut Literatur bereits in DME-Medium eine erhöhte ROS-Produktion bewirkt (Peng et al., 2006), auch in diesem Medium ohne die Differenzierungsbehandlung einen verminderten Gesamtglutathiongehalt aufweist. Tatsächlich verfügte der Klon CD_{mut} , trotz des geringen Heteroplasmiegrads der *common deletion* (22%), über weniger Glutathion (Abb. 30 B). Der Gehalt an oxidiertem Glutathion war auch in diesem Fall nicht messbar.

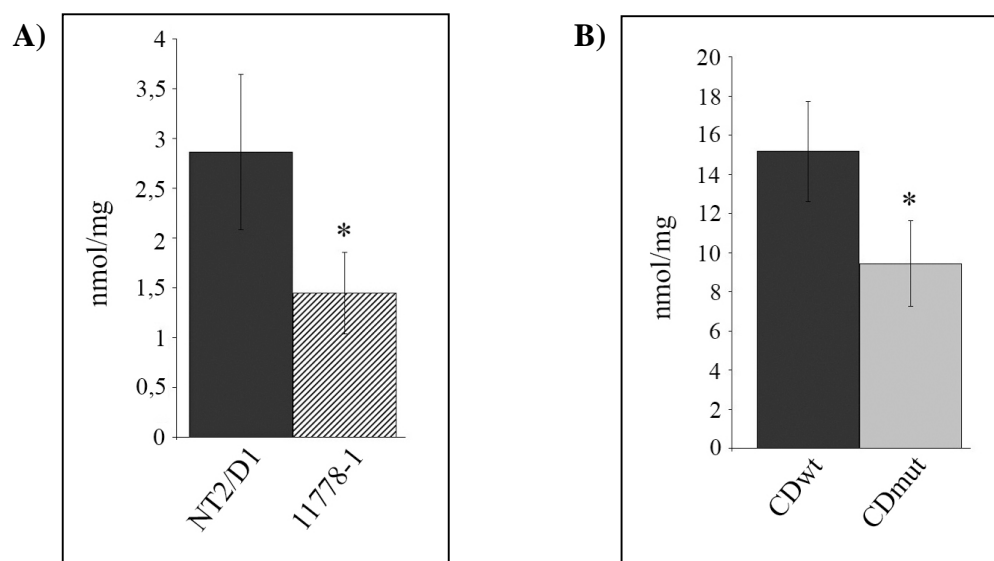


Abb. 30: Gesamtglutathiongehalt in nmol/mg zellulärem Protein bei NT2/D1-Cybriden und 143B.TK(-)-Cybriden. A) Gesamtglutathiongehalt von RA-differenzierten LHON Cybriden und B) 143B.TK(-)-Cybriden, normiert auf mg zelluläres Protein. * = Signifikante Differenz zum Wildtyp ($p \leq 0,05$), modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

Die Interpretation des verminderten Glutathiongehalts als eine Folge der LHON-Mutation in differenzierten Zellen beinhaltet eine Schwierigkeit. Der Klon NT2/D1 ist selbst kein Cybrid, d.h. er hat die zur Erzeugung dieser Zellen notwendige chemische Behandlung nicht durchlaufen. Es wurde seit langem darüber spekuliert und erstmals in einer kürzlich erschienenen Studie

experimentell gezeigt (Danielson et al., 2005), dass die Prozedur der Cybridisierung (besonders die mtDNA-Depletion) z.T. dauerhaft die Transkription einzelner Gene verändern kann. Diese Veränderungen können nach Absetzen der Behandlung persistieren. Es sollte daher ausgeschlossen werden, dass im vorliegenden Fall die Transkription von Genen des Glutathion-Syntheseweges bei dem Cybrid 11778-1 gegenüber NT2/D1 herunterreguliert war. Hierzu wurden die mRNA-Level der regulatorischen leichten Untereinheit (GCLM) der γ -Glutamat-Cystein-Ligase (γ GCL) und der Glutathionsynthetase (GS) überprüft. Beide Enzyme sind für die GSH-Synthese essentiell. Die γ GCL stellt im Regelfall den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese dar und wird u.a. auf Transkriptionsebene reguliert. Für die Bestimmung des mRNA-Gehaltes an RA-differenzierten NT2/D1- und 11778-1 Zellen, wurden jeweils drei unabhängige Kulturen untersucht und jeweils in Dreifachbestimmung gemessen. Die mRNA-Expression der GCLM war bei der Mutante jedoch nicht erniedrigt, sondern lag 1,5-fach höher als bei der Kontrolle ($p \leq 0,05$) (Abb. 31 A), während die mRNA-Expression der Glutathionsynthetase keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klonen aufwies (Abb. 31 B).

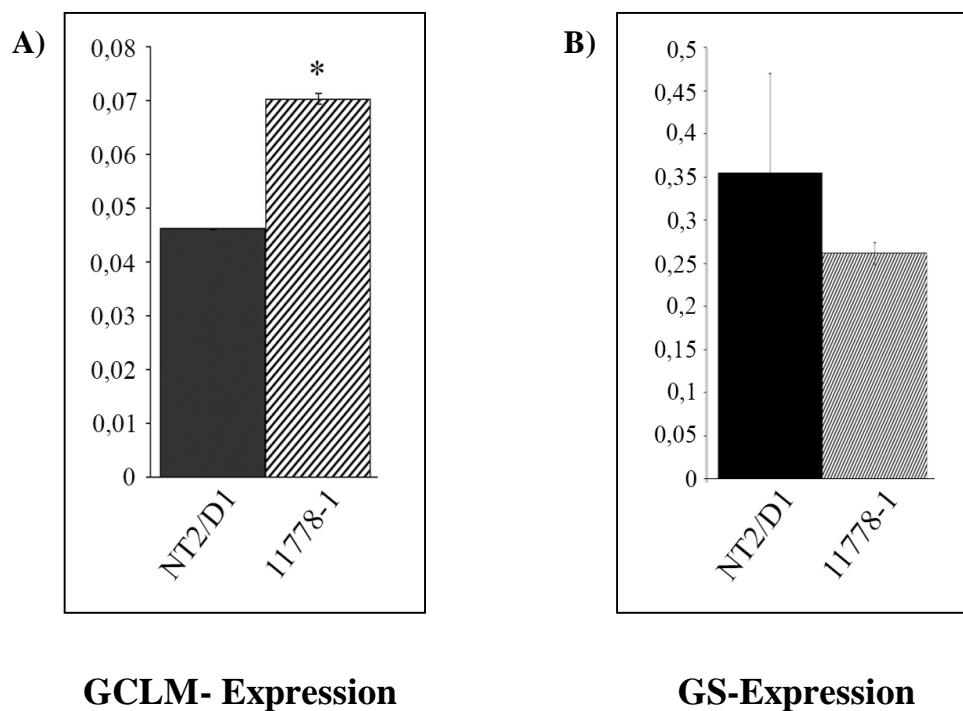


Abb. 31: mRNA-Expression von GCLM (A) und GS (B) bei NT2/D1 und 11778-1. Beide Zelllinien sind mit RA andifferenziert worden. Die mRNA-Expression wurde in beiden Fällen auf β 2-Mikroglobulin normiert. *= signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$). Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

5.9.2. Expression antioxidativer Enzyme auf mRNA- und Proteinebene

Vor Vergleichen der antioxidativen Enzymaktivitäten zwischen Mutante und Wildtyp sollte zunächst durch Expressionsstudien geklärt werden, welche Enzyme die Teratomcybride in Mengen exprimierten, die Aktivitätsmessungen aussichtsreich machten. Zudem sollte geprüft werden, ob sich Anzeichen einer adaptiven Induktion der entsprechenden Gene durch die Differenzierung mit RA finden ließen, weil ein differenzierungsabhängiger oxidativer Stress in diesen Zellen vermutet wurde (Wong et al., 2002), sich andererseits jedoch keine signifikant erhöhte Komplex-I-Atmung durch diese Behandlung gezeigt hatte (Vgl. Abb. 23).

Die in anderen Zelltypen zur H_2O_2 -Degradation wichtige Katalase, konnte in den Cybriden per *Real-Time-PCR* nicht quantifiziert werden (zu geringe Expression) und wurde daher nicht weiter analysiert. Für die übrigen Enzyme (CuZnSOD, MnSOD, GPx-1 und GR) wurden sechs biologische Replika je Linie und Behandlung verwendet. Die Einzelproben wurden je dreifach gemessen. Die Normierung der Enzym-mRNAs erfolgte auf das Haushaltsgen β 2-Mikroglobulin, weil dieses Gen einen mittleren Expressionslevel ohne signifikante Abhängigkeit von Zellklon oder RA-Behandlung aufwies.

Generell lässt sich sagen, dass mit wenigen Ausnahmen der mRNA-Gehalt fast aller Enzyme aller Linien nach Andifferenzierung mit RA signifikant höher war ($p \leq 0,05$) als im undifferenzierten Zustand (Abb. 32, Schoeler et al., 2007). Die Differenzierung schien zu einer generellen Hochregulation der untersuchten antioxidativen Gene in den Teratomzellen zu führen. Im Kontext einer generell erhöhten ROS-Produktion wären diese Ergebnisse plausibel. Eine systematische Gruppierung der Mutanten bzw. Wildtypklone ließ sich anhand der mRNA-Mengen jedoch nicht erkennen. Im Gegensatz zu den anderen Enzymen lagen für GPx-1 in DME-Medium alle Cybride signifikant unter dem Niveau der Parentallinie ($p \leq 0,05$), was auf ein Cybridisierungsartefakt hindeutet (Danielson et al., 2005).

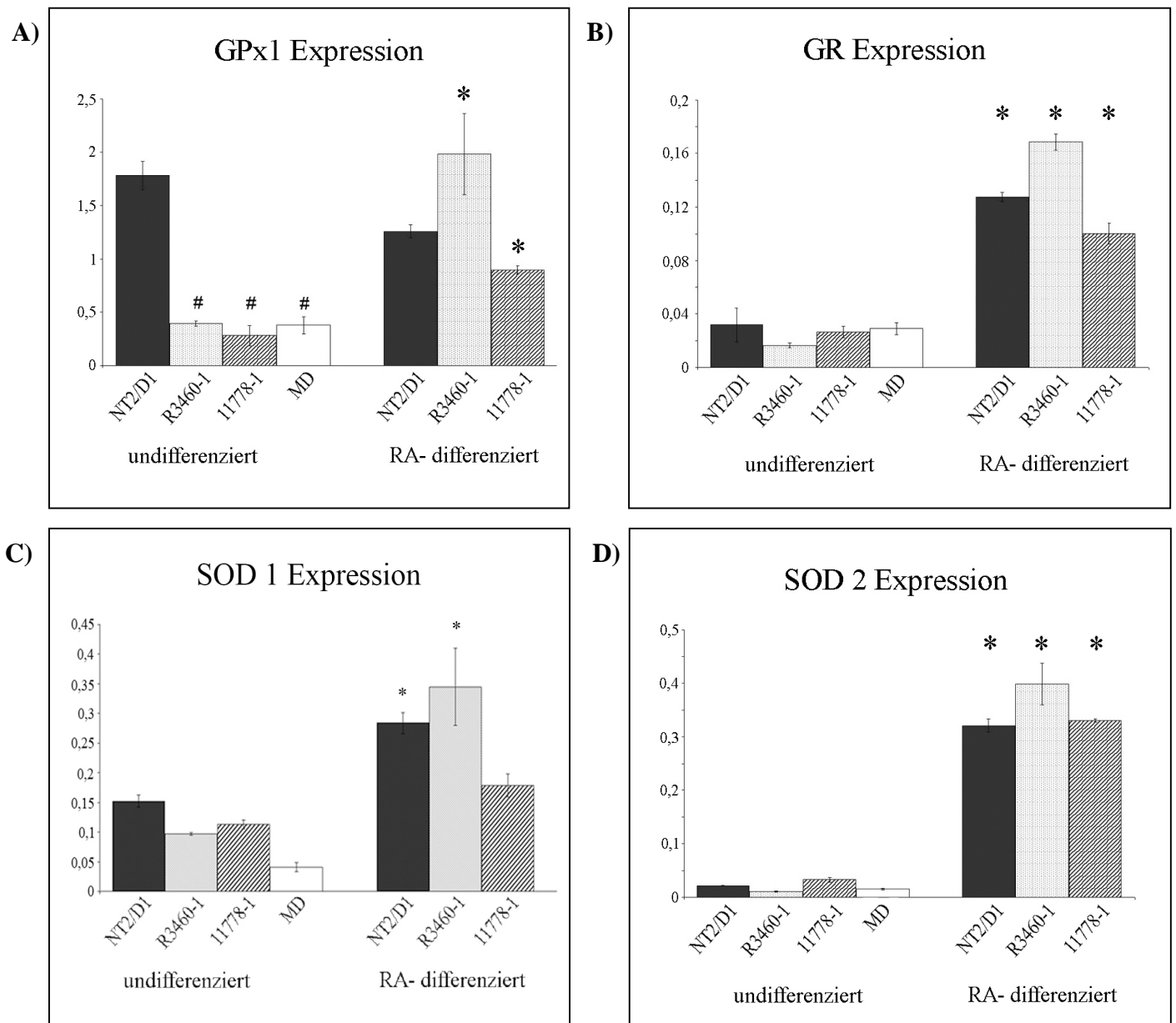


Abb. 32: Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Enzyme des antioxidativen Verteidigungssystems mittels SYBR-Green basierter *RT-PCR*. A) Glutathionperoxidase 1 (GPx1) B) Glutathionreduktase (GR) C) Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (SOD1), und D) Mangansuperoxiddismutase (SOD2) in den gezeigten Zelllinien. Normiert auf $\beta 2$ -Mikroglobulin. * = signifikante Unterschiede zu undifferenzierten Zellen derselben Linie ($p \leq 0,05$), # = signifikante Unterschiede zu undifferenzierten NT2/D1- Zellen ($p \leq 0,05$). Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

Um zu prüfen, ob eine stressbedingte Geninduktion durch die Andifferenzierung tatsächlich die Enzymproteinlevel steigert, oder ggf. nur den erhöhten Umsatz geschädigten Enzymproteins ausgleicht, wurden Western Blots mit den Klonen 11778-1 und NT2/D1 durchgeführt (Abb. 33, Schoeler et al., 2007). Zur Auftrennung des Gesamtproteins je zweier unabhängiger biologischer Replikas wurde ein 10%-iges SDS-Gel verwendet. Die Normierung der Proben erfolgte

durch *Strippen* und Inkubieren des jeweiligen Blots mit dem Referenzantikörper β -Aktin. Für die Enzyme GPx1, GR und CuZnSOD ergaben densitometrische Scans keine messbaren Effekte der RA-Behandlung auf die Proteinmengen (normiert auf β -Aktin).

GPx1 liegt nativ als selenhaltiges Homotetramer vor, dessen Monomere eine Grösse von je 22-23 kDa haben (Arthur, J.R., 2000). Unterhalb der spezifischen Bande generierte der benutzte Antikörper meist noch eine zarte, unspezifische Bande, die jedoch nicht weiter berücksichtigt wurde. Der Proteingehalt von GPx1 variierte zwischen den einzelnen Proben stark, wies aber im densitometrischen Vergleich innerhalb einer Linie keine signifikanten Unterschiede zwischen den undifferenzierten und den RA-differenzierten Proben auf. Obwohl für die Glutathionreduktase (GR) die Mittelwerte der RA-differenzierten Proben (sowohl Kontrolle als auch Mutante) höher lagen, als die der unbehandelten Zellen, erreichten diese Differenzen keine Signifikanz. Im Fall der CuZnSOD zeigten die Proben, analog zu GPx1, eine starke Varianz. Mittels der Densitometrie konnte gezeigt werden, dass der mittlere Proteingehalt der CuZnSOD nach Retinolsäurebehandlung bei beiden Zelllinien höher war als bei den korrespondierenden unbehandelten Proben, dies jedoch keine Signifikanz erreichte. Im Gegensatz hierzu zeigte sich nur bei der MnSOD, dem Enzym mit der höchsten Steigerung des mRNA-Gehaltes durch RA, auch ein um 2,5 bis 3,3-fach erhöhter Proteingehalt nach Behandlung mit RA in den NT2/D1 bzw. 11778-1 Zellen ($p \leq 0,05$).

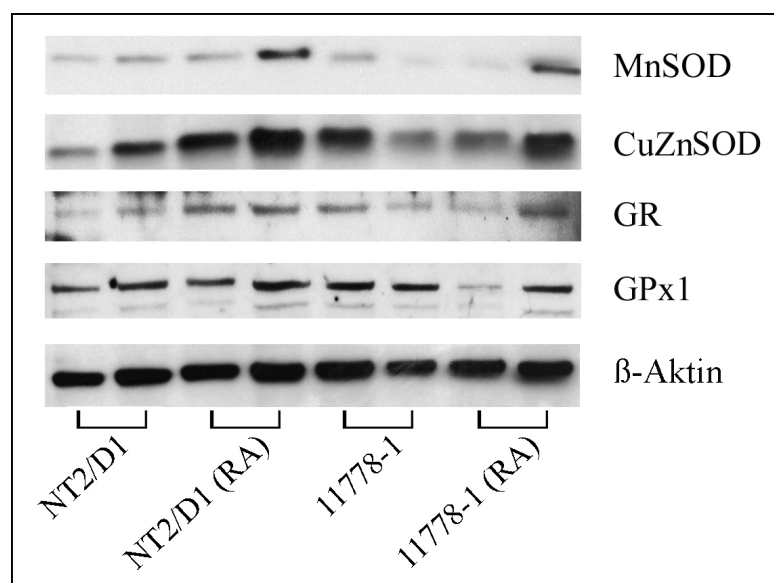


Abb. 33: Expression antioxidativer Enzyme auf Proteinebene: MnSOD, CuZnSOD, GR, GPx1 und sowie β -Aktin als Referenzprotein. 40 μ g Protein der Linien NT2/D1 und 11778-1 (undifferenziert sowie RA-differenziert) wurden geladen. Benachbarte Linien, die durch eine Klammer verbunden sind, stellen unabhängige, parallele Experimente dar. MnSOD und GR sowie CuZnSOD und GPx1 wurden auf demselben Blot detektiert. Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

5.9.3. Enzymaktivitäten

Als Maßstab des aktuellen Status der enzymatischen antioxidativen Abwehr wurden nun die auf Gesamtprotein normierten Enzymaktivitäten zwischen Mutante und Wildtyp verglichen, sowohl in DMEM, wie auch nach RA-Behandlung (Schoeler et al., 2007).

Im Fall von GPx1 und GR setzte sich die Messung aus fünf unabhängigen biologischen Replikas zusammen, die entsprechend der Beschreibung in Kap. 4.3.3.1. bzw. 4.3.3.2. aufgearbeitet wurden. Die erhaltenen Aktivitäten sind als nmol NADPH-Umsatz pro Minute und mg zelluläres Protein angegeben. Weder die GR-Aktivität der undifferenzierten, noch der RA-behandelten Linien wies signifikante Unterschiede auf, die auf die Mutation zurückzuführen sein könnten. Ebenso ließ sich kein Effekt der Retinolsäurebehandlung selbst innerhalb einer Zelllinie feststellen (s. Abb. 34 A). Im Vergleich der GPx1-Aktivität der undifferenzierten Zellen zeigte sich, dass die NT2/D1-Linie eine signifikant höhere Enzymaktivität hatte ($p \leq 0,05$) als die übrigen Linien, was ein eventuelles Cybridisierungsartefakt (Danielson et al., 2005) sein könnte. Im undifferenzierten Zustand lagen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Linien vor. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Differenzen beim paarweisen Vergleich der undifferenzierten zu RA-differenzierten Linien (s. Abb. 34B).

Die Bestimmung der SOD-Aktivität der NT2/D1 und 11778-1 Linien setzte sich aus vier unabhängigen biologischen Wiederholungen zusammen und wurde gemäß der Beschreibung in Kap. 4.3.3.3. durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die gesamte SOD-Aktivität der Zellen bestimmt. Zur selektiven Inhibierung der zytoplasmatischen CuZnSOD wurde im zweiten Schritt eine 5 mM Cyanidlösung verwendet. Die Aktivität der Cyanid-resistenten MnSOD hätte sich dann als Differenz der Messungen mit und ohne Cyanidgabe ergeben. Die SOD konnte jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit quantitativ gehemmt werden, sodass die Mangan-Form aus den Mitochondrien unterhalb des Messbereichs lag. Deshalb wird im Folgenden die Gesamt-SOD-Aktivität, als *Units* pro mg zellulärem Protein, dargestellt (s. Abb. 34 C). Hierbei zeigte sich bei den undifferenzierten, sowie RA-differenzierten Linien jeweils keine Differenz zwischen Mutante und Wildtyp. Die Mittelwerte erschienen zwar durch RA-Behandlung in beiden Fällen leicht erhöht, diese Differenz war jedoch nicht signifikant.

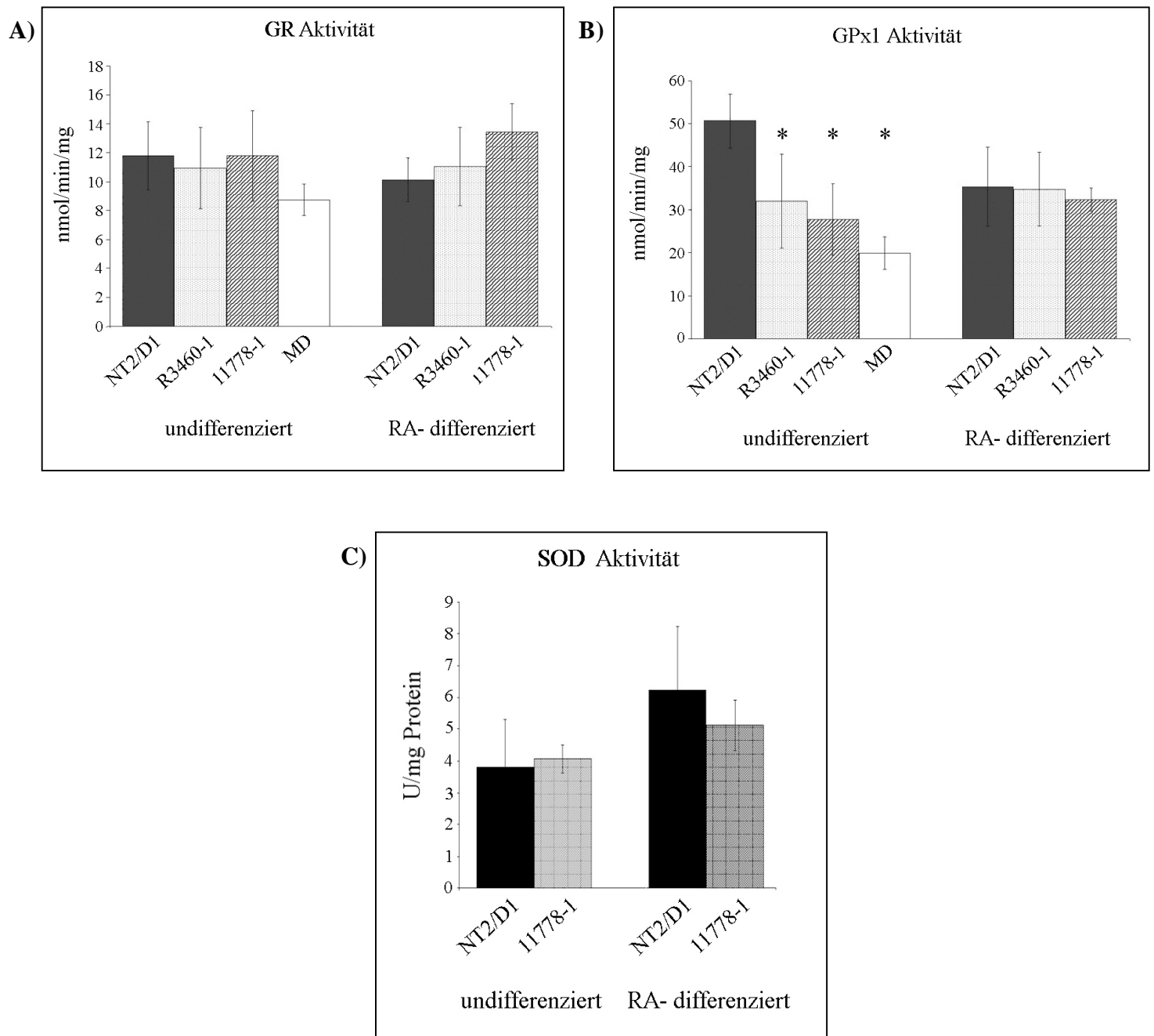


Abb. 34: Enzymaktivitäten von A) Glutathionreduktase (GR), B) Glutathionperoxidase 1 (GPx1) und C) Gesamt-Superoxiddismutase (SOD) der undifferenzierten bzw. RA-differenzierten NT2/D1-Cybride. Die GR- und GPx1-Aktivität wurden als Umsatz von nmol NADPH/Min/mg zellulärem Protein und die Gesamt-SOD-Aktivität in *Units*/mg zellulärem Protein gemessen. * = signifikante Differenz zu undifferenzierten NT2/D1- Zellen ($p \leq 0,05$). Modifiziert nach Schoeler et al. (2007).

6. Diskussion

6.1. Galaktose- versus Differenzierungs-Modell: Sind die Stressmodelle geeignet ?

6.1.1. ATP-Mangel ist nur unter metabolischem Stress erkennbar

Entgegen der Vorstellung, dass die primären LHON-Mutationen automatisch zu einem messbaren Defekt in der Enzymaktivität (Redox-Aktivität) des betroffenen Atmungskettenkomplexes führen (wie dies bei anderen Mitochondriopathien durchaus der Fall ist), konnte an Blutplättchen, Lymphoblasten und Cybridzellen nachgewiesen werden, dass dies für LHON nur bei der 3460/ND1-Mutation gilt, jedoch nicht zweifelsfrei für die beiden anderen primären Mutationen 11778/ND4 und 14484/ND6 (Howell et al., 1991; Majander et al., 1991; Smith et al., 1994; Carelli et al. 1997; Carelli et al. 1999; Brown et al. 2000). Bis heute bleibt somit die Frage nach einem verminderten Elektronenfluss in Komplex I für die letztgenannten Mutationen offen. Trotz nur geringer und in manchen Studien fehlender Belege für eine herabgesetzte NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase-Aktivität nach Maßgabe enzymkinetischer Messungen, stützen verschiedene oxygraphische Atmungsmessungen an Lymphoblasten und Cybridzellen auch für diese Mutationen einen gestörten Elektronenfluss (Brown et al. 2000; Floreani et al. 2005).

Messungen der Enzymaktivitäten der Komplexe I und III an undifferenzierten NT2/D1-Cybriden mit der 11778-Mutation, normiert auf Zitratsynthase als Maß für die Mitochondrienmenge, zeigten, dass auch in den in dieser Arbeit verwendeten LHON-Cybriden keine Störung nachweisbar war (persönliche Information von Fr. Dr. Winkler-Stuck, Institut für Neurologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg). Bei diesen Zellen fanden sich darüber hinaus jedoch auch keine signifikanten Differenzen zwischen Wildtyp und Mutante bezüglich der Atmung mit Komplex-I-Substraten (s. Abb. 23). Ein Energiedefizit wäre aufgrund dieser Befunde für die häufigste LHON-Mutation bislang nicht zwingend durch einen gestörten Elektronentransport erklärbar. Selbst im Falle einer normalen Funktion der Atmungskette könnte es jedoch zu einer verminderten ATP-Syntheserate und zum ATP-Mangel kommen, wenn auf indirekte Weise der vom Elektronenflux durch Komplex I abhängige elektrochemische Gradient ($\Delta\Psi$) vermindert wäre. Dies könnte z.B. durch eine verminderte Protonentranslokation in Komplex I verursacht werden. In jedem Falle ist der Messparameter, der alle denkbaren Mechanismen einer OXPHOS-Störung zusammenfasst, das ATP. Demzufolge befasste sich ein Forschungsansatz der letzten Jahre aus der Arbeitsgruppe um Valerio Carelli mit der Auf-

klärung einer gestörten ATP-Synthese und deren Auswirkung an Cybridkulturen. Da sich an 143B.TK(-)-Cybriden zunächst jedoch kein verminderter ATP-Gehalt der LHON-Mutante und auch keine verringerte Vitalität feststellen ließ, suchte man nach metabolischen Stressmodellen, die die Defekte der Mutanten erkennbar machten.

6.1.2. Galaktosemodell

Die dem System zugrunde liegende Idee ist, dass durch Anwendung eines Zellkulturmediums mit Galaktose als einziger C-Quelle die Zellen durch das schlechter in die Glykolyse einschleusbare Substrat gezwungen werden, zur Energiegewinnung vermehrt die Atmungskette zu benutzen. Ein latent vorhandener, und bis dato durch hohe Glykolyseraten kompensierter *ETC*-Defekt würde sich somit negativ auf das Überleben der Zellen auswirken.

Das Galaktosemodell wurde erstmals erfolgreich an Fibroblasten-Primärkulturen von Mitochondriopathiepatienten getestet (Robinson et al., 1992). Hierbei zeigte sich, dass Zellen mit einer gestörten *ETC* (schwere Defizienz in Komplex I, Cytochrom c-Oxidase, oder Pyruvatdehydrogenase (PDH), oder schwerer, generalisierter OXPHOS-Defekt) signifikant sensitiver reagierten als die Wildtyp-Kontrollen. Die Zellen wuchsen in Galaktosemedium kaum. Zellen mit einem nur leichten *ETC*-Defekt oder einer LHON-Mutation proliferierten hingegen gut in diesem Medium. Demgegenüber stehen Befunde von Zanna et al. (2003 und 2005), welche mutationsspezifische Effekte der 143B.TK(-)-LHON-Cybride in Galaktosemedium nachwiesen. Die Autoren zeigten eine erhöhte Apoptose und einen ATP-Mangel für die drei häufigeren primären LHON-Mutationen, die in DME-Medium nicht auftrat, obwohl der ATP-Synthesedefekt *per se* unabhängig vom Medium war (Baracca et al., 2005). Sie unterlegten diesen Befund mit der oben zitierten Hypothese einer Verschiebung des Energiestoffwechsels zugunsten der OXPHOS. Dabei unternahmen sie jedoch keinen Versuch, diese Stoffwechseländerung zu messen und ignorierten auch die dazu in Widerspruch stehenden Befunde von Robinson et al. (1992).

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Teratomcybriden konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Galaktosemedium kein signifikant vermindertes Überleben der Mutanten relativ zum Wildtyp festgestellt werden (s. Abb. 16 A). Darüber hinaus überlebte einer der beiden Klone mit der 11778-Mutation sogar geringfügig, aber signifikant besser in Galaktosemedium als alle übrigen Klone, inklusive der Kontrollen. Bei den als Referenz mitgeführten *CD*-Cybriden (143B.TK(-)), mit *common deletion*, zeigte sich hingegen eine erhöhte Sensitivität der Mutante (s. Abb. 16 B). Im weiteren Verlauf sollte durch die Laktatproduktion überprüft werden, ob das Galaktosemedium zu einer im Wesentlichen oxidativen Energiegewinn-

ung durch Einschleusung des Pyruvats in den Tricarbonsäurezyklus führt. Es war deutlich zu erkennen, dass dies für keinen der Klone zutrifft (Abb. 17), weil eine signifikante Laktatbildung auch in Galaktosemedium nachweisbar war. Demnach scheint die bei dem 143B.TK(-)-Cybridmodell postulierte Stoffwechselumschaltung bei den NT2/D1-Cybriden nicht vorzuliegen. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass aufgrund der widersprüchlichen Befunde das Galaktosemodell nur bedingt zur Detektion und Charakterisierung von OXPHOS-Defekten geeignet ist. Vielmehr scheint das Überleben der Zellen unter Galaktosemedium einerseits vom Zelltyp, sowie andererseits vom Schweregrad des OXPHOS-Defekts abzuhängen.

6.1.3. Differenzierung mit Retinolsäure

Als ein anderes Modell zur Detektion von mutationsspezifischen Defekten wird die Differenzierung von proliferierenden NT2/D1-Tumorzellen mit Retinolsäure (RA) diskutiert (Wong et al., 2002). Man geht hierbei davon aus, dass die gewünschte Umstellung des Energiestoffwechsels von der Glykolyse auf die OXPHOS im Zuge der neuronalen Differenzierung erfolgt. Eine terminale neuronale Differenzierung, wie diese von Wong et al. (2002) beschrieben wurde, scheiterte in der vorliegenden Arbeit allerdings trotz mehrmaliger Versuche. Möglicherweise ist eine Umsetzung andifferenzierter Zellen auf Nährschichten aus Ratten-Astrozyten bei den Cybriden doch unabdingbar notwendig, obwohl eine Kultur auf Polystyrol-Oberflächen (Ozdener, 2007) oder Matrigel-beschichteten Oberflächen (Pleasure et al., 1992) bei der Parentallinie selbst in der Literatur beschrieben wurde. Aus diesem Grunde konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine Kurzzeitbehandlung mit RA für vier Tage durchgeführt werden. Die Behandlung hatte eine klare Wirkung, wie der Proliferationsstop, die erhöhte H_2O_2 -Sensitivität und die Hochregulation verschiedener antioxidativer Enzyme auf mRNA-Ebene zeigten. Dieses Verhalten passte auf den ersten Blick zu der Hypothese einer durch Differenzierung erhöhten *ETC*-Nutzung mit entsprechend erhöhter *ROS*-Produktion. Unter dem Vorbehalt der schlechten ADP-Stimulation (schlechter Kopplungsgrad) der Mitochondrien aus den Cybridzellen, sprachen die Atmungsmessungen jedoch deutlich gegen diese Annahme. Auch im direkten Vergleich zwischen Neurobasalmedium mit und ohne zehn μM RA in parallelen Messungen am gleichen Versuchstag ergab sich für keine der vier getesteten Linien eine signifikante Differenz in der Maximalatmung (s. Abb. 23). Auch die Laktatmessungen im direkten Vergleich von Neurobasalmedium mit und ohne RA sprachen nicht eindeutig für eine Stoffwechselumschaltung. Nach Maßgabe dieser Messungen scheint also der durch Andifferenzierung induzierte oxidative Stress eher über einen *ETC*-unabhängigen

Mechanismus zu entstehen. In diesem Falle wäre die zugrunde liegende Idee des RA-Modells anzuzweifeln. Damit ist fraglich, ob die bislang selektiv nur an RA-differenzierten Teratomklonen mit LHON-Mutation gemessenen Effekte wirklich durch die Komplex-I-Dysfunktion verursacht wurden. Dies gilt für die selektiv erhöhte *ROS*-Produktion der Mutanten (Wong et al., 2002) und für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Glutathion-Depletion (Abb. 30 A). Oxidativer Stress könnte im Zuge der Differenzierung durch RA beispielsweise auch durch eine gesteigerte Häm-Synthese erklärbar sein, wie dies in jüngster Vergangenheit an Neuro2a- Zellen gezeigt wurde (Shinjyo und Kita, 2006 und 2007). Zudem fand sich auch unter RA keine ATP-Depletion der Mutante in den NT2/D1-Cybriden (Abb. 24).

Auf dem jetzigen Kenntnisstand bietet das Modell der RA-Differenzierung von NT2/D1-Cybriden die gleichen Unwägbarkeiten wie das von der Arbeitsgruppe um V. Carelli favorisierte Modell der Galaktosebehandlung von 143B.TK(-)-Cybriden. In beiden Fällen sind bestimmte Mutationseffekte beobachtbar. Das Zurückführen dieser Effekte auf eine Stoffwechselumschaltung, durch die gewählten Kulturbedingungen mit erhöhtem Elektronenfluss durch Komplex I, ist jedoch bislang eine experimentell nicht abgesicherte Hypothese. Diese Diskrepanz ist auch bereits aus der Publikation der Gruppe um G. Cortopassi ersichtlich (Wong et al., 2002). Die Autoren weisen zu recht darauf hin, dass sich eine erhöhte *ROS*-Produktion für die LHON-Mutationen np11778 und np3460 im Vergleich zur Parentallinie nur nachweisen lässt, wenn die Zellen mittels RA differenziert wurden. Dies galt sowohl für Messungen mit dem *ROS*-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff DCFDA, als auch für Messungen mit dem stärker für Superoxid aus den Mitochondrien spezifischen Farbstoff Dihydroethidium (DHE). Wenn der zugrunde liegende Mechanismus jedoch ein gesteigerter Flux durch Komplex I wäre, so sollte hypothetisch generell bei allen drei Linien bei den differenzierten Zellen ein höheres Fluoreszenzlevel messbar sein, als bei korrespondierenden unbehandelten Teratomzellen der gleichen Linie. Dies war jedoch nicht der Fall. Es zeigte sich z.T. ein inverser Effekt.

6.2. Antioxidatives Verteidigungssystem

6.2.1. Glutathion

6.2.1.1. Verursachen LHON-Mutationen eine Glutathion-Depletion?

Das Tripeptid Glutathion spielt eine wichtige Rolle in der antioxidativen Abwehr der Zelle, da ihm die Rolle als essentielles Cosubstrat von GPx in der Degradation von H_2O_2 zukommt, und es aufgrund seiner hohen intrazellulären Konzentrationen im Bereich von ca. 1–10 mM gleichzeitig den größten Teil des Redoxpotentials der Zelle determiniert (Schafer und Buettner, 2001; Wu et al., 2004; Vesce et al. 2005). Ein verminderter Glutathiongehalt kann folglich zur Einschränkung der Kapazitäten des antioxidativen Systems führen, woraus sich eine erhöhte Vulnerabilität der betroffenen Zellen gegenüber *ROS* ergibt. Die Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts der NT2/D1-Cybride zeigte nur bei den RA-differenzierten eine signifikante Reduktion ($p \leq 0,05$) um 49% bei der Mutante 11778-1 im Vergleich zum Wildtyp NT2/D1 (Abb. 30 A). Dass dieser gemessene Effekt kein mögliches Cybridisierungsartefakt, wie dies von Danielson et al. (2005) beschrieben wurde, darstellt, lässt sich einerseits durch die Tatsache belegen, dass er nur nach RA-Differenzierung zum Tragen kommt. Andererseits ergab die Bestimmung der mRNA-Gehalte der Glutathion synthetisierenden Enzyme Glutamat-Cystein-Ligase (γ GCL) und GS (Glutathionsynthetase) (s. Abb. 31) im RA-differenzierten Zustand keine Verminderung bei der Mutante. Die modulatorische Untereinheit (GCLM) der γ GCL ist für die Regulation des Synthesewegs von besonderer Bedeutung, da sie wahrscheinlich in den meisten Zelltypen die Enzymaktivität limitiert (Chen et al., 2005) und hypothetisch durch ein Cybridisierungsartefakt (Danielson et al., 2005) in ihrer mRNA-Expression dauerhaft reprimiert sein könnte. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen (s. Abb. 31). Kritisch muss jedoch angemerkt werden, dass der Mittelwert des Gesamtglutathion-Gehaltes bei der Revertante R3460-1 zwischen den Werten für die Linien NT2/D1 (Wildtyp) und 11778-1 (LHON) lag (Daten nicht gezeigt). Ein sicherer Schluss, dass die np11778-Mutation in RA-differenzierten Teratomzellen stets zu einer Glutathion-Depletion führt, kann jedoch auf der Basis nur eines Klons kaum gezogen werden und bedürfte künftiger Überprüfung mehrerer Klone. Die parallel begonnene Generierung neuer Cybride aus einfacher differenzierbaren Neuroblastomzellen gelang aufgrund der erheblichen technischen Schwierigkeiten nicht (siehe Kap. 6.5.).

Als weitere Kontrolle wurde der Glutathiongehalt der *CD*-Cybride bestimmt. Die heteroplasmische 5 kb *common deletion* betrifft sieben Strukturgene der Komplexe I, IV und V und deletiert fünf tRNA-Gene, die in die mitochondriale Proteinbiosynthese involviert sind. Hieraus

resultiert eine generelle Inhibierung der Aktivität der Atmungskettenenzyme, sowie eine erhöhte *ROS*-Produktion, ohne dass dazu spezielle Medienbedingungen benötigt werden. Auch hier zeigte sich eine signifikante Verminderung (38%) im Glutathiongehalt der Mutante (s. Abb. 31 B).

Im Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit stehen Befunde von Floreani et al. (2005), der im Galaktosemodell an 143B.TK(-)-Cybriden eine Zunahme des Gesamtglutathions bei Klonen mit den Mutationen np11778 und np3460 fand, im Vergleich zur Kontrolle bzw. zur LHON- Mutation np14484. Dieses Modell suggerierte demnach ein gegensätzliches Verhalten zwischen den beiden phänotypisch besonders gravierenden Mutationen einerseits und Kontrollen bzw. der phänotypisch benigneren Mutation andererseits. Interpretiert wurde der höhere Glutathiongehalt der „maligneren“ Mutanten als adaptive Reaktion auf den erhöhten oxidativen Stress. Unterstützt wurde diese Sichtweise durch den besonders für die Mutante np11778 deutlichen, aber auch für die Mutante np3460 noch signifikant höheren Anstieg des oxidierten Glutathions (GSSG) in Galaktosemedium. Demgegenüber konnte der in der Regel geringe Anteil an GSSG in den Teratomcybriden der vorliegenden Arbeit nicht gemessen werden, da der Gesamtglutathiongehalt mit ca. drei nmol/mg Protein *per se* zu gering war. Obwohl die adaptive Induktion der γ GCL-mRNAs (Tian et al.; 1997; Chen et al., 2005) im 143B.TK(-)-Modell von Floreani und Kollegen nicht überprüft wurde, interpretierten sie dies als die wahrscheinlichste Erklärungsmöglichkeit für ihre GSH-Messwerte. Sowohl die Gene der modulatorischen (GCLM), als auch der katalytischen Untereinheit (GCLC) des Enzyms besitzen redoxsensitive Promotorelemente, die z.B. über die redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und für GCLC auch über NF- κ B reguliert werden (Dickinson et al., 2004). Von Floreani und Kollegen wurde nicht weiter diskutiert, dass eine überregulierte GSH-Neusynthese jedoch für die in diesem Modell klar ATP-defizienten Zellen (Zanna et al., 2003) nachteilig sein sollte. Denn sie vermindert die zur oxidativen ATP-Synthese benötigten NAD(P)H-Reduktionsäquivalente weiter (Makarov et al., 2006). Es fällt also schwer, die Messungen von Floreani und Kollegen (2005) als einen erfolgreich induzierten Schutzmechanismus zu interpretieren.

Insgesamt also bleibt fraglich, warum es bei den beiden Modellen zu solch konträren Ergebnissen kommt. Eine Hypothese zur Auflösung dieses Widerspruchs lautet, dass im Fall einer erhöhten *ROS*-Produktion die Reaktion des Glutathion-Spiegels vom basalen Glutathiongehalt der verwendeten Zellen abhängt. Makarov et al. (2002) benutzten dazu ein klassisches Modell zur plötzlichen Erhöhung der mitochondrialen *ROS*-Produktion, durch Glukosedeprevation und Hypoxie/Reoxigenierung. Sie zeigten an astrogliareichen Primärkulturen zerebraler Kor-

tices der Ratte, dass bei einem hohen Basallevel an Glutathion (> 40 nmol/mg Protein) die Zellen auf den oxidativen Stress mit einer Erhöhung ihres Glutathionlevels reagierten. Wiesen die Zellen hingegen bei höherem Alter der Kultur einen niedrigeren basalen GSH-Gehalt auf (< 20 nmol/mg Protein), so kam es durch den abrupten oxidativen Stress zu einer GSH-Depletion. Tatsächlich lagen die basalen Glutathiongehalte der Teratomzellen mit drei nmol/mg unterhalb des von Makarov und Kollegen gefundenen Grenzwertes, diejenigen der Osteosarkomcybride von Floreani und Kollegen jedoch mit 30 – 40 nmol/mg darüber. Zudem mag die Lage eines solchen Schwellenwertes vom Zelltyp abhängen. Bei der Interpretation ist jedoch vor allem zu bedenken, dass zwar in den artifiziellen Cybridmodellen der oxidative Stress relativ plötzlich auftritt (Mediumwechsel), dies in den retinalen Ganglienzellen jedoch kaum anzunehmen ist. Viel eher würde man in einem chronischen Szenario eine erfolgreiche Adaptation erwarten. Dies übersieht jedoch Befunde wie die Glutathion-Depletion beim Morbus Parkinson, einer chronischen, neurodegenerativen Erkrankung mit erwiesenem Komplex-I-Defekt (Perry et al., 1982; Perry und Yong, 1986; Sian et al., 1994; Jenner und Olanow, 1996; Jenner 1998) und bei anderen Formen nigrostriataler Neurodegenerationen (Fitzmaurice et al., 2003).

Des Weiteren wäre im Hinblick auf die retinalen Ganglienzellen (*RGC*) die metabolische Kooperation zwischen Neuronen des ZNS und Astroglia zu berücksichtigen, die sich auch auf den Glutathion-Stoffwechsel erstreckt. Infolge dieses Zusammenwirkens sind die Neuronen nicht gezwungen, die gesamte Synthese ausschließlich aus endogenen Metaboliten zu vollziehen. Sie können stattdessen teilweise das von Gliazellen ausgeschiedene Glutathion nutzen, welches vom glialen Ektoenzym γ -Glutamyltranspeptidase zum CysGly-Dipeptid hydrolysiert wird, und zusammen mit ebenfalls aus der Glia stammendem Glutamin die neuronale Glutathion-Synthese antreiben kann (Dringen et al., 1999). Im Falle der Retina erfüllen diese Aufgabe die Müllerschen Gliazellen (Schütte und Werner, 1998; Bringmann et al., 2006). Es bleibt also die Frage, ob die Aktivität der neuronalen Enzyme der GSH-Biosynthese überhaupt eine kritische Rolle zur Aufrechterhaltung einer hinreichenden *de-novo*-Synthese in den *RGC* spielt, oder vielmehr die Verfügbarkeit von Metaboliten aus den Müller-Zellen. Da bei LHON-Patienten vermutlich auch die Müller-Zellen die Mutationen tragen (z.B. Homoplasmie der np11778-Mutation), ist nicht auszuschließen, dass die Glia in die Pathogenese involviert sein könnte.

6.2.1.2. Verstärkt eine Glutathion-Depletion die ATP-Depletion?

Eine moderate GSH-Depletion in ZNS-Neuronen kann eine signifikante ATP-Depletion nach sich ziehen (s.u.). Hierdurch könnte es im Fall von LHON zu einer Synergie von oxidativem Stress und „Energiekrise“ kommen.

Wüllner et al. (1999) zeigte an primären Neuronenkulturen (Körnerzellen des Kleinhirns), dass Neuronen mit einem erhöhten ATP-Bedarf auf eine moderate GSH-Depletion (ca. 50%) mit einer schnellen zytoplasmatischen ATP-Depletion reagieren. Durch Inhibierung der zytoplasmatischen GSH-Biosynthese mit L-Buthioninsulfoxamin (BSO) konnte von den Autoren ein langsamer GSH-Verlust in den Mitochondrien ausgelöst werden, welche ihr GSH indirekt durch einen Austausch mit dem Zytoplasma aufrechterhalten. Bei einer Reduktion des mitochondrialen Glutathions um ca. 50%, kam es zur neuronalen Degeneration. Im Gegensatz hierzu führte die Gabe der GSH-komplexierenden Substanz Ethakrinsäure (EA) zu einem wesentlich schnelleren Absinken des zellulären und mitochondrialen GSH-Gehalts, sowie zu einer rapiden Verminderung des Membranpotentials (welches schließlich ganz zusammenbrach) und letztendlich innerhalb kurzer Zeit zum Zelltod. Es wurde vermutet, dass die mitochondriale GSH-Depletion zu einer Verschiebung des Thiol-Redoxpotentials führte, woraus sich die Schädigung sensibler OXPHOS-Komponenten ergab, die zu gestörter ATP-Synthese und in letzter Konsequenz zum Zelltod führte.

Zur näheren Charakterisierung der akuten bioenergetischen Konsequenzen, die sich aus der GSH-Depletion ergeben, behandelten daher Vesce et al. (2005) zerebelläre Körnerzellen mit Monochlorbiman (MCB). Diese Substanz depletiert GSH durch Konjugation. An mit einem redox-sensitiven Fluoreszenzprotein (ro-GFP) transfizierten Kulturen, maßen sie bei der GSH-Depletion die erwartete Verschiebung im Redoxpotential. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass mit MCB konjugiertes GSH ein fluoreszierendes Produkt bildet, aufgrund dessen man den zeitlichen Verlauf der GSH-Depletion darstellen und diesen mit einer Reihe von funktionellen Parametern der Mitochondrien korrelieren kann. Hierdurch zeigten Vesce und Kollegen (2005), dass während der ersten Stunden der Glutathion-Depletion die klassischen biochemischen Parameter, wie das Membranpotential, die respiratorische Kapazität, die Protonendurchlässigkeit der inneren Membran und die Wirkung von entkoppelnden Substanzen, unverändert blieben. Hingegen kam es sehr rasch zu einer messbaren ATP-Depletion im Zytoplasma, noch bevor letztlich die anderen Parameter betroffen waren. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass zwar bereits eine moderate Reduktion des GSH-Gehalts in diesem Modell zu einer signifikanten ATP-Depletion führte, die Ursache hierfür aber kaum in einer Schädigung von OXPHOS-Komplexen zu suchen war, als vielmehr in der Beeinträch-

tigung anderer redoxsensitiver Proteine, wie beispielsweise dem Adenosin-Nukleotid-Transporter (ANT).

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Teratom-Cybridmodell fand sich jedoch entgegen der Erwartung unter keinen Kulturbedingungen eine ATP-Depletion der Mutante. Dies wurde auch durch Messungen von R. Pommer am Institut für Neuropathologie der Universität Magdeburg mit einer anderen Methode bestätigt (Pommer, 2007), wie auch von einem Kooperationspartner unseres Projektes in einer gemeinsamen Publikation (Haroon et al., 2007). Selbst unter Bedingungen einer signifikanten Glutathiondepletion der Mutante, also nach RA (s. Abb. 24), war kein verminderter ATP-Gehalt nachweisbar.

6.2.1.3. Gibt es Hinweise auf ein verändertes Thiol-Redoxpotential bei Komplex-I-Defekten mit chronischer ROS-Produktion?

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit gefundene GSH-Depletion bei LHON-Cybriden und den oben skizzierten Zusammenhang zwischen GSH und ATP in ZNS-Neuronen wäre es wichtig, zu untersuchen, ob es in Zellen anderer Mitochondriopathiepatienten mit bekannten Komplex I-Defekten und erhöhter ROS-Produktion zu einer signifikanten Verschiebung des Redoxpotentials kommt. An primären Neuronenkulturen von Patienten konnte dies naturgemäß nicht untersucht werden. Verkaart et al. (2007) führten aber solche Messungen an Fibroblasten verschiedener Mitochondriopathiepatienten mit Komplex-I-Defekt mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden durch. Die Autoren wiesen zunächst eine erhöhte ROS-Produktion nach. Sie fanden darüber hinaus jedoch keine Hinweise auf ein verändertes Redoxpotential. Diese Versuche sprechen somit dafür, dass zumindest in Fibroblasten eine moderat erhöhte, chronische ROS-Produktion nicht ausreichend ist, um zu einem signifikanten GSH-Verlust zu führen und über diesen Weg den ATP-Spiegel zu beeinflussen.

6.2.1.4. Die Thiolgruppen welcher Proteine des Energiestoffwechsels sind möglicherweise besonders ROS-sensibel?

Unabhängig davon, ob ein normaler GSH-Gehalt oder eine GSH-Depletion bei LHON vorliegen, erhebt sich die Frage, welches die besonders redox-sensitiven Proteine des Energiestoffwechsels sind. Hierbei ist interessant, ob diese bereits unter einem milden ROS-Stress oxidiert werden, der noch nicht zu einer Verschiebung des Redoxpotentials der Zellen führt (s.o.).

Unter diesen Annahmen wurde von Hurd et al. (2007) zur Identifizierung jener Proteine eine spezifizierte 2-D-Gelelektrophorese (Redox-Differenz-Gelelektrophorese, REDOX-DIGE)

eingeführt. Unter moderaten Szenarien von oxidativem Stress (z.B. 2,5 μM H_2O_2 oder reverser Elektronenfluss durch Komplex I aus dem Substrat Succinat) konnten hierdurch aus isolierten Herzmuskelmitochondrien diese sensitiven Proteine, anhand ihrer oxidierten Thiolgruppen, identifiziert werden. Ein Grossteil (85%) der besonders empfindlichen Proteine war dem mitochondrialen Energiestoffwechsel (v.a. Pyruvat- und Fettsäurestoffwechsel) zuzuordnen. Besonders anzumerken ist, dass ein nicht in diese Kategorie fallendes, oxidations-sensitives Protein VDAC (*voltage dependent anion channel*) war, welches ein Bestandteil der Permeabilitäts-Transitions-pore ist. Die Arbeiten zeigten also, dass es zur Oxidation besonders sensitiver Thiole durch geringe ROS-Konzentrationen kommen kann, selbst wenn sich dies nicht in einem insgesamt positiveren Redoxpotential im Homogenat manifestiert. Hurd und Kollegen interpretieren dies dahingehend, dass es eine bislang unentdeckte physiologische Redox-Regulation des Energiestoffwechsels gibt, zumal die gemessenen Thiol-Oxidationen reversibel waren. Trotzdem könnte man davon ausgehen, dass diese Proteinthiole auch dazu prädestiniert sind, unter dauerhaftem, pathologischem oxidativem Stress als erste oxidiert zu werden, um anschließend permanent alteriert zu bleiben, mit den sich daraus ergebenden negativen Folgen für den Energiestoffwechsel.

6.2.2. Ist die Aktivität antioxidativer Enzyme in LHON-Cybriden vermindert?

Neben Glutathion spielen diverse Enzyme eine wichtige Rolle bei der antioxidativen Verteidigung. In der vorliegenden Arbeit wurden GR, GPx1, CuZnSOD und MnSOD als die wichtigsten Vertreter näher charakterisiert. Bei keinem der untersuchten Enzyme (MnSOD war nicht messbar) konnte im NT2/D1-Modell ein mutations- oder differenzierungsspezifischer Effekt bzgl. der Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 34 A-C). Die einzige auftretende Signifikanz in diesen multiplen Vergleichen, eine Absenkung der GPx1-Aktivität bei allen Cybriden gegenüber der Parentallinie, wurde konservativ als wahrscheinliches Cybridisierungsartefakt interpretiert (s. Kap. 5.9.3.).

Floreani und Kollegen (2005) kamen an 143B.TK(-)-Cybriden zu z.T. abweichenden Befunden. Bereits in DME-Medium wiesen die Autoren eine signifikant verminderte GPx-Aktivität für die Mutation np3460, nicht jedoch für die Mutationen np11778 und np14484 nach. Desgleichen zeigten sie in DMEM eine reduzierte GR-Aktivität für die Mutanten np3460 und np11778. Die Reduktion der GR-Aktivität fiel nach 24-stündiger Inkubation in glukosefreiem DMEM mit 5 mM Galaktose für die Mutante np11778 noch deutlicher aus und wurde für die Mutante np14484 erst in diesem Medium signifikant. Die Autoren erklärten dies mit der

Hypothese des erhöhten metabolisch/oxidativen Stress im Galaktosemodell (Vgl. 6.1.2). Ebenfalls fanden Floreani et al. (2005) nach 24 Stunden in Galaktosemedium eine signifikante Reduktion der MnSOD-Aktivität aller Mutanten, sowie eine verminderte CuZnSOD-Aktivität bei dem Cybrid mit der Mutation np3460, im Gegensatz zu den beiden anderen Klonen np11778 und np14484. Die funktionelle Beeinträchtigung der MnSOD, jenes Enzyms, welches unmittelbar mit dem Superoxid aus Komplex I reagiert, war bei allen mutierten Klonen gravierend. Aus Abb. 7 der Publikation (Floreani et al., 2005) ergibt sich eine Restaktivität von lediglich ein Viertel bis ein Drittel des Wildtyps. Zusammen mit der zuvor gemessenen ATP-Depletion stützten diese Befunde den theoretischen Ansatz des Galaktosemodells, obwohl sich dieses Modell offenbar nicht ohne weiteres auf andere Zelltypen übertragen lässt (s.o.). In DME-Medium dagegen ergaben sich signifikante Unterschiede zum Wildtyp in der Regel nur nach einer, eher ungewöhnlichen Normierung auf im Westernblot densitometrisch bestimmte Gehalte des betreffenden Enzymproteins, nicht bei üblicher Normierung auf das Gesamtprotein. Problematisch erscheint diese Normierung alleine schon durch die mangelnde Linearität des benutzten nicht-radioaktiven Westernblot-Verfahrens. Dies schwächt jedoch nicht die Gesamtaussage einer geschädigten enzymatischen antioxidativen Abwehr in einer Stresssituation (Galaktosemedium).

Im Vergleich hierzu fanden sich in der vorliegenden Arbeit keine Änderungen in der Aktivität der Gesamt-SOD nach RA-Differenzierung. Die gemessene SOD-Aktivität ließ sich darüber hinaus komplett mit 5 mM Cyanid hemmen, woraus sich schließen lässt, dass ausschließlich die CuZnSOD-Form repräsentiert war und der Gehalt an MnSOD somit außerhalb des Messbereichs lag. Legt man diese Beobachtung zugrunde, so stimmen die auf den ersten Blick konträren Ergebnisse der SOD-Messungen an 143B.TK(-)-Cybriden mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit überein. Floreani et al. (2005) fand im Galaktosemodell nur bei der Mutante np3460 eine signifikant erniedrigte CuZnSOD-Aktivität, nicht jedoch bei dem Klon mit der Mutation np11778.

Insgesamt muss also festgehalten werden, dass sich im 143B.TK(-)-Galaktose-Modell deutliche Hinweise auf geschädigte antioxidative Enzyme fanden, die sich an den Teratomzellen mit der gleichen Mutation nicht zeigten. Problematisch bleibt dabei, dass bei letzteren die Messung des wichtigen Enzyms MnSOD nicht möglich war.

6.3. Führen LHON-Mutationen zur erhöhten Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress aus anderer Quelle?

6.3.1. Externes H₂O₂

Davon ausgehend, dass die Komplexe I und III der Atmungskette hauptsächlich für die interne, mitochondriale ROS-Produktion verantwortlich sind (Muller et al., 2004), würden Defekte dieser Komplexe zu einer erhöhten internen ROS-Produktion und der sich daraus ergebenden erhöhten Auslastung der antioxidativen Kapazitäten führen. Ein extern gesetzter oxidativer Stimulus sollte in den np11778-Mutanten daher synergistisch mit dem höheren internen ROS-Gehalt wirken. Hypothetisch sollte dies dazu führen, dass die Mutanten in einem Lebendzellzahl-Test vulnerabler reagieren als die entsprechende Kontrolle. In der Vergangenheit war bereits mittels Trypanblau-Färbung die erhöhte Sensitivität eines 143B.TK(-)-Cybridklons mit der np11778-Mutation gegenüber einer sechsstündigen H₂O₂-Behandlung gefunden worden (Wong und Cortopassi, 1997). Interessant ist, dass die von den Autoren gezeigte, partiell protektive Wirkung eines Kalzium-freien Zellkulturmediums (DMEM ohne Kalzium) und von 1 µM Cyclosporin A, einem PTP-Hemmer, für eine Beteiligung mitochondrial vermittelter Apoptose am Zelltod sprachen. Diese Versuche stützten also den Ansatz, dass sich ROS aus dem mutierten Komplex I und aus anderer Quelle synergistisch bei der Apoptose-Induktion verhalten.

Auch an den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Teratomzellen gab es mehrere Evidenzstränge, die diese Sicht unterstützten. Zunächst einmal induzierte H₂O₂ an Zellen in normalem DMEM Apoptose, gemäß der fluorimetrischen Caspase-3-Messungen, und zwar signifikant stärker beim Klon 11778-1 als bei den Parentalzellen. Zudem wurde Caspase-3 in einem Szenario erhöhter zytoplasmatischer Kalziumkonzentrationen ebenfalls bei der Mutante stärker induziert (Haroon et al., 2007). Auch dieser Effekt war durch Cyclosporin A hemmbar. Die direkteste Aussage erlaubten konfokalmikroskopische Fluoreszenz-Messungen. Mit einem ROS-sensitiven Farbstoff (DFF) konnte gezeigt werden, dass die LHON-Mutante nach Stimulation mit 100µM H₂O₂ einen höheren Gehalt nicht abgepufferter ROS aufwies als die Kontrolle (Haroon et al., 2007).

Die eigenen Versuche zur Sensitivität der Teratomcybride in DMEM gegenüber externem H₂O₂, gemessen mit einem Lebendzellzahl-Test, standen den Literaturbefunden kontrovers gegenüber. Aus unbekanntem Gründen war die Parentallinie in DMEM deutlich sensitiver als beide Klone mit der np11778-Mutation. Aus der Zusammenfassung aller Daten, inklusive der

direkten Fluoreszenzmessungen (Haroon et al., 2007), könnte folgendes hypothetisiert werden: a) Die Mutation erzeugt auch vor dem genetischen Hintergrund der NT2-Linie bereits ein erhöhtes *ROS*-Aufkommen und eine höhere Bereitschaft zu einer mitochondrial vermittelten Apoptose, b) die Anwendung von simplen Lebendzellzahlmessungen nach H_2O_2 repräsentiert nicht ohne weiteres ein realistisches Bild, weil andere zytotoxische Wirkungen des Oxidans überwiegen, und c) RA steigert vermutlich den oxidativen Stress, wobei fraglich bleibt, inwieweit dafür wirklich die Atmungskettenfunktion verantwortlich ist oder vollkommen andere Effekte, wie etwa ein alterierter Häm-Stoffwechsel nach RA (Shinyo und Kita, 2007).

Das externe H_2O_2 führt zu pleiotropen Effekten, wie beispielsweise der Permeabilisierung von Membranen, welches wiederum zur Induktion eines apoptoseunabhängigen Zelltodes führen kann. Darüber hinaus könnte die Zelldichte die Sensitivität der Zellen gegenüber externem H_2O_2 mit beeinflussen. Es zeigte sich in einer Reihe von Versuchen (Daten nicht gezeigt), dass eine zu niedrige bzw. zu hohe Zellzahl zu einem frühen und massiven Absterben (nahezu 100 %) der Zellen führt. Es ist plausibel, dass die Zelldichte die schnell abfallende Verlaufskurve der tatsächlichen H_2O_2 -Konzentration im Zellkulturmedium mitbestimmt. Bei Gabe des Oxidans als Bolus wird die Konzentration und damit die zytotoxische Wirkung wahrscheinlich bei hoher Zelldichte schneller abfallen, weil mehr oxidierbares organisches Material und ein höherer Gesamtgehalt antioxidativer Enzyme vorliegen. Daher machte eine zu geringe Zelldichte die Kulturen sensibler. Bei einer Zelldichte nahe der Konfluenz mag sich die Zelltod-Induktion an dicht bewachsenen Stellen auswirken, denn nachweislich überstanden die Cybridzellen kaum 24 Stunden Konfluenz. Diese starke Abhängigkeit von der Zelldichte sorgt selbst bei bestmöglich normierter Aussaat für eine erhebliche Variabilität in den Versuchen. Möglicherweise könnte dieses Problem künftig durch die aufwendigere Anwendung eines Gemisches aus Glukoseoxidase und Katalase im Medium, zur Applikation eines konstanteren Dauerspiegels von H_2O_2 , vermindert werden.

6.3.2. Substanzen mit *Redoxcycling*

Die toxischen Effekte von Paraquat, eines von vielen weitläufig verwendeten Bipyridylherbiziden, sowie des Derivats Benzylviologen, beruhen auf der Erzeugung von oxidativem Stress durch *Redoxcycling* in den Zellen. Die Toxizität dieser Herbizide entsteht u.a. durch Einschleusung, vermutlich über Wechselwirkung mit Komplex III, in die Atmungskette, wo sie als Elektronenakzeptoren enzymatisch zum kationischen Radikal umgewandelt werden. Durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff (Transfer des überschüssigen Elektrons) initiieren sie die Entstehung von internem Superoxid (Castello et al., 2007) und werden selbst

zum stabilen Kation reoxidiert. Der Vorgang kann von neuem beginnen (*Redoxcycling*). Bei der Paraquat-vermittelten ROS-Entstehung sind mehrere mitochondriale Enzyme beteiligt (Fukushima et al., 1995), der Vorgang kann aber auch von Elektronendonoren und Enzymen außerhalb der Mitochondrien vermittelt werden, wie z.B. durch mikrosomale (Ilett et al., 1974; Montgomery et al., 1976) und zytosolische Enzyme (Winterbourn et al., 1984; Day et al., 1999). Die Wirkung von Paraquat wurde bereits an zahlreichen Modellen untersucht (Bus und Gibson, 1984; Sato et al., 1995; Arkblad et al., 2005; Cicchetti et al., 2005; Bonilla et al., 2006; Bishop et al., 2007). Diese Substanzen als Modell einer gesteigerten internen Superoxid-Produktion bieten den Vorteil der Vermeidung von Bolus-Effekten (wie beispielsweise direkter H₂O₂-Applikation) und der größeren Nähe zu realen Szenarien von oxidativem Stress *in vivo*. Im Gegensatz zu Studien an anderen Zelltypen, in denen Paraquat einen deutlichen zytotoxischen Effekt im Bereich zwischen 5 und 160 µM hatte (Cappelletti et al., 1998; Gonzalez-Polo et al., 2004), fand sich dieser in der vorliegenden Arbeit im MTT-Test (s. Abb. 26A) bis zu Konzentrationen von 200µM an andifferenzierten Teratomcybriden nicht. Selbst 200 µM Paraquat hatte nur minimale toxische Effekte, diese allerdings selektiv bei der Mutante. Im Vergleich hierzu wies z.B. E18, eine spontan immortalisierte Ratten-Gliomlinie, nach 24 Stunden Inkubation mit Paraquat einen LD₅₀-Wert von ca. 25 µM auf (Niso-Santano et al., 2006). Darüber hinaus schien Paraquat an den Teratomzellen (s. Abb. 26A) sogar einen minimalen proliferationsstimulierenden Effekt auf die Kontrolle zu haben. Dies lässt vermuten, dass das *Redoxcycling* von Paraquat in den Teratomzellen nur in geringem Maße abläuft und daher nur eine minimale ROS-Produktion ergibt, die ggf. ein proliferationsförderndes Signal darstellen kann. Beim Benzylviologen zeigte sich im MTT-Test zwar eine etwas stärkere Reaktion (s. Abb. 26 B), jedoch nicht präferentiell bei der Mutante. Aufgrund der insgesamt sehr geringen Effekte und der widersprüchlichen Resultate mit beiden Substanzen, waren sie letztlich ohne signifikante Aussagekraft.

6.4. Staurosporin und Rezeptor-vermittelte Apoptose

Im MTT-Test fand sich nach Behandlung der Teratomcybride mit Staurosporin keine Abhängigkeit der Sensitivität von der Mutation (s. Abb. 18 A). Von den beiden getesteten Mutanten mit identischer np11778-Mutation reagierte nur 11778-1 bei der höchsten Staurosporinkonzentration von 400 nM signifikant sensitiver als die beiden Wildtyp-Klone. Der zweite Klon, MD, hingegen reagierte über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg am wenigsten sensitiv. Es fand sich somit auch in diesem Fall keine generelle Prädisposition der Mutante für die Apoptose, wobei es auffallend ist, dass die vier Klone insgesamt gravierende Dif-

ferenzen untereinander aufweisen. Während bei 11778-1 unter 400 nM Staurosporin nahezu 0% überlebende Zellen zu verzeichnen sind, weist MD eine Überlebensrate von ca. 50% auf. Aus diesem Befund lässt sich ableiten, dass zwischen den Cybridklonen unbekannte und ungewollte Differenzen bestehen, welche die Wirkung eines pleiotropen Agens, wie Staurosporin, beeinflussen.

Einen spezifischeren Stimulus des extrinsischen Apoptosewegs stellt demgegenüber die Stimulation von Todesrezeptoren durch ihre Liganden dar. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch *TRAIL* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) erreicht, woraus ein einheitlicheres Bild im MTT-Test resultierte (s. Abb. 19 A). Allerdings konnte auch in diesem Fall keine mutationsspezifische Sensitivität verzeichnet werden. Dagegen reagierten die als Prinzipkontrollen mitgeführten 143B.TK(-)-Cybride mit *common deletion* erwartungsgemäß wesentlich sensibler als die korrespondierende Kontrolle (Abb. 19 B). Die Resultate zur extern getriggerten Apoptose im 143B.TK(-)-Modell (Danielson et al., 2002) ergaben hingegen ein anderes Bild. Die Autoren zeigten durch Analyse einer größeren Serie von Cybriden mit np11778 und np3460-Mutationen in einem Lebendzellzahltest mit Trypan-Blau nach Fas-Stimulation eine durchweg höhere Sensitivität der Mutanten. Durch Applikation des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk konnte diese Sensitivität wieder auf das Kontrollniveau nivelliert werden, was den apoptotischen Zelltodmodus verifiziert. Darüber hinaus wurde dieser Befund in zusätzlichen Experimenten durch Caspaseassays, Annexin-V-FACS und DNA-Fragmentierungsassays bestätigt. Aus den Resultaten von Danielson und Kollegen kann man somit schließen, dass im Fall des 143B.TK(-)-Modells von einer generell erhöhten Apoptosebereitschaft durch alle drei häufigeren, primären LHON-Mutationen auszugehen ist. Offenbar verhalten sich die Mutationen aber auch gegenüber der Rezeptor-vermittelten Apoptose nicht in beiden Cybridsystemen identisch. Die Zelltyp-Abhängigkeit zeigt auf, dass man von den erhaltenen Ergebnissen nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf die (apoptotischen) Vorgänge in den RGC ziehen sollte.

Den Grund für die erhöhte Apoptosebereitschaft der Mutante in ihrem Modell vermuten Danielson und Kollegen (2002) am ehesten in einer erhöhten mPTP-Öffnungswahrscheinlichkeit aufgrund der Dysfunktion von Komplex I, wobei diese möglicherweise durch die ROS-Produktion vermittelt werden könnte. Hierbei fällt auf, dass die Autoren die beschriebene Apoptose-Sensibilisierung in DMEM als Zellkulturmedium fanden, während für die ATP-Depletion derselben Zellen Galaktosemedium essentiell notwendig ist (Zanna et al., 2003). In den Teratomcybriden (Haroon et al., 2007) fanden sich neben Hinweisen auf eine erhöhte

ROS-Produktion der Mutante (Fluoreszenzfarbstoffe) ebenfalls Anzeichen für eine erleichterte mPTP-Öffnung unter apoptotischer Stimulation (Kalziumüberladung).

6.5. Ist das Cybridmodell ein geeigneter Standard zur Analyse von mtDNA-Mutationen?

Mit der Entdeckung, dass bestimmte Erkrankungen auf Mutationen der mtDNA zurückzuführen sind, eröffnete sich ein weites Feld in der Erforschung der Mitochondriopathien. Die Entwicklung des Cybridsystems (King und Attardi, 1989) stellte erstmals ein zu diesen Zwecken geeignetes Modellsystem dar. Trotz der hypothetisch bestmöglichen Vergleichbarkeit von Kontrollen und Mutanten, weist es auch eine Reihe von Nachteilen auf.

So zeigen Cybridklone z.B. entgegen der gewünschten chromosomalen Identität in der Praxis auch unerwünschte genetische Differenzen. Sie verfügen beispielsweise nicht immer über einen exakt identischen Karyotyp, welches in ihrer Herkunft als immortalisierte Tumorzellen begründet liegt. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Klonen zeigten sich neben Karyotyp-Veränderungen (Verlust des Y-Chromosoms) auch chromosomale Stückverluste bei der Revertante R3460-1. Solche von Zelle zu Zelle heterogenen *Rearrangements* der chromosomalen DNA (*LOH*, Duplikationen, Translokationen) sind ebenfalls Kennzeichen von Tumoren bzw. aus ihnen hervorgegangener Zellkulturen (Murga und Fernández-Capetillo, 2007; Stallings, 2007). Solche Unterschiede sollten sich daher auch typischerweise zwischen zwei Cybridklonen finden lassen, wenn mit einer genügend großen Zahl von Mikrosatellitenmarkern gesucht wird. Diese genetischen Differenzen beeinflussen möglicherweise den Stoffwechsel der Zellen und verfälschen auf diese Weise u.U. einzelne Experimente. Auch sind heteroplasmische Cybride oftmals trotz Uridin-Supplementierung instabil, d.h. die mutierte mtDNA geht möglicherweise bei längerer Passagierung aus den Zellen verloren, wie dies beispielsweise bei dem Klon R3460-1 der Fall war.

Darüber hinaus müssen auch mögliche epigenetische Effekte, die durch die EtBr-Behandlung und PEG-Fusion ausgelöst werden, berücksichtigt werden. Mittels einer Microarray-Studie an den 143B.TK(-)-Cybriden konnte von Danielson und Kollegen nachgewiesen werden, dass es zu cybridisierungsabhängigen, stabilen transkriptionellen Veränderungen von Genen kommen kann (Danielson et al., 2005). Die Mehrheit der persistierenden Alterationen der mRNA-Transkripte ließ sich hierbei auf den Prozess der mtDNA-Depletion zurückführen. Die Autoren zeigten am Beispiel der 143B.TK(-)-Zellen, dass vor allem nukleäre Gene, die in den Mitochondrien exprimiert werden und die funktionell in die OXPHOS und den Zitronensäure-

Zyklus involviert sind, betroffen waren. Die identifizierten mitochondrialen Gene waren präferentiell in die ATP-Synthese bzw. die *ETC* involviert. Solche Cybridisierungsartefakte waren wahrscheinlich auch die Ursache der bei den Teratomcybriden gemessenen Auffälligkeiten bei der GPx1-Expression.

Abgesehen von diesen technischen Problemen, liegt eine wesentliche Einschränkung in der Verwendung proliferierender Tumorzellen zur Charakterisierung von Defekten, die sich bei Mitochondriopathiepatienten in postmitotischen Zellen ereignen (z.B. *RGC*). Die Tumorzellen repräsentieren nur unzureichend Neuronen, sowohl was den Energiestoffwechsel betrifft, wie auch im Hinblick auf oxidativen Stress. Darüber hinaus gibt es in Tumorzellen mögliche apoptotische Blockaden etwa bei p53- oder bax/bcl2-Signalwegen, was zu einem zusätzlichen Problem für Apoptosestudien werden kann (Harrington et al., 1994; Lee und Bernstein, 1995; Shen und White, 2001). Möglicherweise liegt hier auch ein Grund für die gegenüber vielen Noxen beobachtete geringere Sensitivität der Teratomklone im Vergleich zu den beiden Osteosarkomklonen in dieser Arbeit.

Aus den oben aufgeführten Gründen, und den sich daraus ergebenden Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse wurde versucht, eigene LHON-Cybride zu gewinnen, die sich darüber hinaus neuronal differenzieren lassen. Zu diesem Zweck wurden Neuroblastomzellen (SHSY-5Y) 2,5 Monate mit einer sublethalen Dosis EtBr behandelt. Es stellte sich heraus, dass sich die Gewinnung der benötigten ρ^0 -Zellen nicht problemlos reproduzieren lässt. Die Klonausbeuten waren minimal und es scheint ein inverses Verhältnis zu bestehen zwischen Vitalität und Rest-mtDNA-Gehalt. Die Cybrid-Generierung sollte daher nicht als etabliertes Verfahren bezeichnet werden, wie dies gelegentlich in der Literatur geschieht. Zwar gelang es nach einiger Zeit ρ^- -Zellen zu erzeugen, doch wiesen diese noch immer einen Restgehalt an mtDNA auf und waren durch die EtBr-Behandlung in ihrer Proliferation sehr stark eingeschränkt worden. Auch von King und Attardi (1989) waren letztlich nur zwei ρ^0 -Klone genutzt worden. Später wurde unter diesen weiter subkloniert, um zu einem optimal proliferierenden Klon zu gelangen. Darüber hinaus stieg in der vorliegenden Arbeit der mtDNA-Gehalt, sobald die EtBr-Behandlung eingestellt wurde. Unter diesen Umständen war eine Fusion mit Donorzytoplasten oder Blutplättchen nicht möglich. In einem zweiten, folgenden Ansatz erhielt man indes keine überlebenden Zellen, sodass dieses Verfahren gänzlich eingestellt werden musste. Die Ergebnisse sind übereinstimmend mit Befunden anderer Autoren (von Wurmb-Schwark et al., 2006). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass höhere Dosen von EtBr (25-50 μM) zur erwarteten Abnahme des mtDNA-Gehalts von NT2/D1-Zellen führen und darüber hinaus Zellen mit weniger als 10% mtDNA-Gehalt anfangen, abzusterben. Daraus

könnte geschlossen werden, dass es einen Schwellenwert des mtDNA Gehalts für das Überleben der Zellen gibt.

6.6. Resumee

6.6.1. Erkenntnisse der bisherigen Literatur zum LHON-Mechanismus

Zur Charakterisierung des Mechanismus von LHON haben innerhalb des letzten Jahrzehnts die Arbeitsgruppe um den Neurologen V. Carelli in Bologna, sowie die mit ihm assoziierten italienischen Gruppen wesentlich beigetragen (Carelli et al., 2004b). Trotzdem wird der exakte Mechanismus dieser Mitochondriopathie bislang kontrovers diskutiert. Die zu Beginn durchgeführten Studien mit dem CoenzymQ-Antagonisten Rotenon, welcher bei der Mutante zu einer verminderten Inhibierung des Komplex I führte (Degli-Esposti et al., 1994; Carelli et al., 1997; Ghelli et al., 1997; Carelli et al., 1999), und mit den Chinolen Myxothiazol und Nonyl-Benzochinol (Carelli et al., 1999), welche den mutierten Komplex I stärker inhibierten, wiesen auf eine erhöhte Produkthemmung des mutierten Komplex I hin. Diese erhöhte Produkthemmung wurde auch durch Daten einer anderen Arbeitsgruppe gestützt (Majander et al., 1996). Gemäß der Flux-Kontrolltheorie könnte dies in einem verminderten Elektronenfluss durch die gesamte Atmungskette resultieren. Dessen Folge wäre eine Senkung des elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran und eine entsprechende Senkung der ATP-Syntheserate. Ferner könnte eine alterierte Ubichinol-Bindung die Bildungswahrscheinlichkeit von Superoxid erhöhen, welches in den Matrixraum hinein entlassen würde. Die in den besagten Studien gemessenen Effekte spiegeln jedoch nicht zwangsläufig eine Hemmung des mutierten Komplex I unter natürlichen Bedingungen wieder, deren Nachweis bislang, außer für die Mutation np3460, umstritten ist. Bei einer mehrfach nachgewiesenen verminderten Atmung (Brown et al., 2000; Floreani et al., 2005), konnte bisher mit enzymatischen Messtechniken meist keine verminderte Komplex I-Aktivität aufgezeigt werden. Die Hypothese eines Energiedefizits bei LHON wird bislang vor allem von positiven Befunden im 143B.TK(-)-Galaktosemodell unterstützt (Zanna et al., 2003), dort allerdings für alle drei untersuchten LHON-Mutationen. Darüber hinaus sprechen frühere Befunde an Lymphozyten von LHON-Patienten gegen eine Energiedepletion als Auslöser für LHON (Yen et al., 1998). Diese konträren Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, dass das 143B.TK(-)-Galaktosemodell eher dem neuronalen Energiestoffwechsel entspricht, als dies bei den Lymphozyten der Fall ist.

Die sich hieraus ergebenden Studien zum Zelltodmodus von 143B.TK(-)-Cybriden in Galaktosemedium wiesen anhand klassischer Parameter, wie Cytochrom c-Freisetzung ins Zytop-

lasma, Chromatin-Kondensation und Fragmentierung der chromosomalen DNA eine höhere Apoptoserate der Mutante (Ghelli et al., 2003) nach. Auffällig hierbei ist jedoch, dass es entgegen einer normal verlaufenden Apoptose hier trotz der Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien offenbar nicht zur Bildung und Aktivierung des Apoptosoms kommt (Zanna et al., 2003 und 2005). Die Autoren begründen dies mit dem existierenden ATP-Defizit der Mutante unter Galaktosemedium, da zur Bildung des Apoptosoms, durch Interaktion mit Apaf-1, Energie in Form von ATP benötigt wird. Darüber hinaus zeigten sie, dass die aus den Mitochondrien in großer Menge freigesetzten Faktoren Endonuklease G und AIF (Apoptose-induzierender Faktor) ausreichen, um die Apoptose unter Umgehung der Effektor-Caspasen zu initiieren (Zanna et al., 2005). In jüngerer Zeit wurden zudem Anhaltspunkte dafür gefunden, dass die Kapazitäten der enzymatischen antioxidativen Verteidigungsmechanismen der Mutante unter den gewählten metabolischen Stressbedingungen (Galaktosemedium) überfordert sein könnten (Floreani et al., 2005). Nach Ansicht von Carelli und Kollegen kommt es zu einer Synergie von ATP-Depletion und erhöhtem oxidativem Stress, welche zum apoptotischen Untergang der RGC führt. Der genaue Modus der Apoptose hängt dabei möglicherweise von der Balance der beiden Vorgänge ab.

6.6.2. Stützt das NT2/D1-Modell diese Sicht?

Verglichen mit den oben genannten Hypothesen zum Mechanismus von LHON unterstützt das NT2/D1-Modell nur einzelne Punkte dieser Sichtweise. Einerseits konnte erhöhter oxidativer Stress der Mutanten durch direkte Messung mit ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden (Wong et al., 2002; Haroon et al., 2007), andererseits wurde die erhöhte Apoptosebereitschaft der Mutante unter externem oxidativen Stress (H_2O_2), anhand der Caspase-3-Aktivierung aufgezeigt (vorliegende Arbeit). Ebenso fand sich eine erhöhte Caspase-3-Induktion der Mutante unter Kalzium-Stress (Haroon et al., 2007).

Das NT2/D1-Modell unterstützt hingegen nicht den postulierten ATP-Mangel der Mutante (Zanna et al., 2003), sowie die daraus resultierende „atypische“, d. h. ohne Caspase-3 Aktivierung ablaufende, Apoptose (Zanna et al., 2005). Weder bei Normierung des ATP-Gehaltes der Zellen auf mg Gesamtprotein (diese Arbeit), noch bei Bestimmung des ATP/ADP-Verhältnisses (Pommer, 2007) fand sich ein Energiedefizit des Klons 11778-1 gegenüber der Parentallinie. Ebenso zeigten die Atmungsraten beider mutierter Klone mit oder ohne Retinolsäure (diese Arbeit) im Gegensatz zum 143B.TK(-)-Modell keine Unterschiede zum Wildtyp. Es fanden sich somit bei diesem Modell keine messbaren Veränderungen in den klassischen bioenergetischen Parametern bei den Mutanten. Ferner konnten in der vorliegenden

Arbeit, sowie Schoeler et al. (2007), keine spezifischen Defekte der enzymatischen antioxidativen Abwehr gefunden werden, im Gegensatz zu Floreani et al. (2005), dafür aber Hinweise auf einen verminderten Glutathion-Gehalt unter Retinolsäure.

Es lässt sich kaum anzweifeln, dass die von Carelli und Kollegen (2004b) beschriebenen biochemischen Phänotypen im 143B.TK(-)-Modell wirklich auf Mechanismen beruhen, die allen primären LHON-Mutationen gemein sind, da die Autoren sämtlichen Experimenten Klone mit drei Primärmutationen zugrunde legen konnten und diese sich gleich verhielten. Obwohl im NT2/D1-Modell nur zwei Klone mit identischer Mutation verfügbar waren, deuten die Daten aber auf einen Einfluss des Zelltyps hin und lassen Zweifel aufkommen an einer generellen Übertragung von Cybridbefunden auf *RGC*.

6.6.3. Weitere Untersuchungsansätze und Ausblick

Die bislang durchgeführten Arbeiten zur Aufklärung des LHON-Mechanismus beruhen größtenteils auf der Anwendung des Cybridmodells, welches jedoch Mängel aufweist (s.o.). Günstig wäre deshalb ein geeignetes Tiermodell, das tatsächlich mutierte Ganglienzellen (*RGC*) repräsentiert. Dessen Entwicklung traf lange Zeit auf unüberwindliche Schwierigkeiten, weil keine Vektoren verfügbar waren, die in die Mitochondrien eintransportiert werden konnten. Daher musste zunächst ein Transfektionssystem entwickelt werden, bei dem eine zytoplasmatisch translatierbare Kopie des mitochondrialen Proteins hergestellt wurde, indem einige vom nicht-universellen Code der Mitochondrien abweichende Codons ausgetauscht wurden (sog. „allotope Expression“). Diese Konstrukte wurden mit geeigneten mitochondrialen Leitpeptiden fusioniert. Als vorläufiger Endpunkt dieser Arbeitsrichtung wurde erst in jüngster Vergangenheit von der Arbeitsgruppe um John Guy (Qi et al., 2007) ein Mausmodell entwickelt. Dabei wurde ein rekombinantes Virus (AAV) in den Glaskörper des Auges eingespritzt. Das Virus enthielt eine für die allotope Expression modifizierte ND4-Untereinheit des Komplexes I mit der Mutation G11778A. Das Konstrukt erzeugte bei Mäusen eine LHON-ähnliche Erkrankung, im Gegensatz zu Kontrollkonstrukten mit Wildtyp-ND4. Die auf diese Weise behandelten Mäuse entwickelten innerhalb kurzer Zeit die klassischen Symptome von LHON, d.h. Schwellung des Nervenkopfes ohne Anzeichen einer Entzündung, sowie im weiteren Verlauf Degeneration und teilweiser Verlust der *RGC*.

Anhand dieses Tiermodells könnte man die pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten durch Neuroprotektiva *in vivo* testen. Interessante Wirkstoffkandidaten wären beispielsweise Ubichinon, sein verbessert die Blut-Hirnschranke überwindendes Derivat Idebenon und das Antibiotikum Minocyclin. Das Coenzym Q-Derivat Idebenon, welches die Bildung von ATP sti-

mulieren soll, antioxidativ wirkt und *in vivo* die kardiale Komponente der Friedreich-Ataxie günstig beeinflusst, wurde und wird auch an LHON-Patienten getestet (Cortelli et al., 1997; Mashima et al., 2000; Barnils et al., 2007). Die bislang erhaltenen Ergebnisse sind jedoch kontrovers.

Minocyclin, ein tetracyclisches Breitbandantibiotikum, zeigte in ersten Versuchen an Zellkulturen eine protektive Wirkung bei LHON (Haroon et al., 2007), und rückt auf Grund seiner zyto- und neuroprotektiven Eigenschaften zunehmend in den Blickpunkt der Forschung (Jordan et al., 2007). Obgleich das Mausmodell die Vorgänge bei LHON *in vivo* darstellt und sich an ihm pharmakologische Eingriffsmöglichkeiten testen lassen, sind Versuche zur Aufklärung des Mechanismus auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene nicht möglich. Sie bleiben also weiter eine Domäne der Cybridkulturen. Hierzu gehören z.B. Messungen der Kalziumhomöostase nach apoptotischen Stimuli mit Echtzeit-Bildgebungsverfahren oder die Klärung der Rolle der PTP bei der Apoptose, die besonders weitergeführt werden sollte. Ein neuerer Aspekt ist auch die mögliche Rolle erhöhter Glutamat-Exzitotoxizität durch einen Transporterdefekt (Beretta et al., 2004), der theoretisch den Müller-Zellen einen Anteil an der Pathogenese zuweisen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bislang noch viele ungeklärte Details im Zusammenhang mit der LHON-Pathogenese gibt. Aus diesem Grund sollte die Forschung weiter auf Cybridmodelle und parallel dazu auf das neue Tiermodell zurückgreifen, solange noch keine überzeugende Behandlungsoption für die Erkrankung existiert.

7. Zusammenfassung

Bei der zelltypspezifischen Mitochondriopathie LHON kommt es zum plötzlich einsetzenden und schnell verlaufenden Untergang retinaler Ganglienzellen (*RGC*) mit entsprechender Degeneration des Nervus opticus, die zu schwerer Visusminderung oder Erblindung führt. Primäre Ursache sind maternal vererbte Punktmutationen der mitochondrialen DNA mit Aminosäureaustausch in Komplex I der Atmungskette. Nukleäre Gene, Ethanol und andere Noxen werden als weitere Faktoren kontrovers diskutiert, da nicht alle Mutationsträger erkranken und eine männliche Prävalenz vorliegt. Trotz zahlreicher Zellkulturstudien sind der präzise biochemische Mechanismus der LHON-Mutationen, sowie der Modus der Zelltodinduktion noch ungeklärt. Hinweise deuten jedoch auf eine Synergie zwischen Energiedepletion (ATP-Mangel) und oxidativen Stress hin. Richtungweisende Befunde stammen bislang vor allem aus einem einzigen Cybrid-Zellkulturmodell (143B.TK(-)-Osteosarkom). Zur näheren experimentellen Charakterisierung von LHON wurde in der vorliegenden Arbeit ein alternatives Cybridmodell (NT2/D1-Teratoma) verwendet, das zudem den Vorteil der neuronalen Differenzierbarkeit dieser Klone bietet.

Ein Aspekt umfasste die Auswirkungen von metabolischem Stress, ausgelöst durch Inkubation der Zellen in Galaktosemedium oder durch Differenzierung mit Retinolsäure. Hierdurch sollten die Wirkungen der Mutation detektierbar gemacht werden. Die mutierten Zellen zeigten im Vergleich zum Wildtyp unter Stressbedingungen jedoch keine verminderten Überlebensraten. Eine überwiegende Abhängigkeit des Energiestoffwechsels von der Atmungskette wurde auch durch Differenzierung mit Retinolsäure nicht erreicht. Ferner zeigte sich keine signifikante Erniedrigung der Atmungsraten mit Komplex I-Substraten und auch keine Verminderung des ATP-Gehaltes bei den Mutanten, letzteres im Gegensatz zu Vorbefunden im 143B.TK(-)-Modell. Nach Maßgabe klassischer bioenergetischer Parameter waren die Auswirkungen der Mutation somit nicht detektierbar.

Gemäß der These einer höheren Sättigung der antioxidativen Abwehr bei der Mutante, wurde die Reaktion der Zellen in einem Lebendzellzahltest auf externen oxidativen Stress geprüft. Proliferierende Zellen zeigten entgegen der theoretischen Erwartung eine geringere Sensitivität der Mutanten gegenüber H_2O_2 , ein Resultat, das durch Retinolsäure z.T. umgekehrt wurde. An proliferierenden Zellen ergab sich gleichzeitig eine signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhte Caspase-3-Aktivierung durch dieses Oxidans bei mutierten Zellen, sodass der im Lebendzellzahltest messbare Zelltod offenbar nur partiell apoptotisch war. Trotz verbliebener Unklarheiten stützten die Befunde eher die These einer erhöhten Sättigung der antioxidativen Mechanismen bei

der Mutante, insbesondere im Zusammenhang mit jüngst publizierten Daten eines Kooperationspartners. Die Superoxid generierenden Substanzen Paraquat und Benzylviologen zeigten generell geringe Wirkung, ohne Korrelation mit dem Mutationsstatus. Entsprechendes galt für die Noxen Ethanol und Methanol. Selbst die Reaktion auf klassische Vermittler der intrinsischen und extrinsischen Apoptosewege (Staurosporin und *TRAIL*) war im NT2/D1-Modell sehr gering, im Vergleich zu 143B.TK(-)-Zellen, welche zu Kontrollzwecken mitgeführt wurden. Es zeigte sich auch hier keine Korrelation mit der Mutation.

Die Aktivitätsmessung der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase ergab, z.T. im Gegensatz zu Vorbefunden, keine verminderten Enzymaktivitäten bei den Mutanten, auch nicht nach Differenzierung mit Retinolsäure. Nach Differenzierung fand sich ein mutationsspezifisch verminderter Gehalt an Glutathion ($p \leq 0.05$).

Die teilweise kontroversen Befunde dieser Arbeit im Vergleich zum bislang für LHON genutzten Modell deuten darauf hin, dass auch der Cybrid-Zelltyp einen wesentlichen Einfluss auf die Konsequenzen der G11778A-Mutation für den oxidativen Energiestoffwechsel und für den Zelltod unter metabolischen bzw. oxidativen Stressbedingungen hat. Aus diesem Grunde sollten die an Cybridkulturen gewonnenen Resultate, inklusive der sich daraus ergebenden pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten, nicht vorbehaltlos auf *RGC* übertragen werden.

8. Abkürzungsverzeichnis

11778-1	Teratomcybrid mit der LHON-Mutation G11778A
143B.TK(-)	Osteosarkomzelllinie
β 2MG	β 2-Mikroglobulin
β -NAD	β -Nikotinamidadenindinukleotid
γ GCL	Gamma-Glutamat-Cystein-Ligase
A	Absorption
AAV	rekombinantes Adenovirus
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
<i>AIF</i>	Apoptose-induzierender Faktor
AK	Antikörper
AM	äußere Mitochondrienmembran
ANT	Adenosin-Nukleotid-Transporter
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	L-Buthioninsulfoxamin
<i>CD</i>	<i>Common deletion</i>
CD _{wt}	Osteosarkomcybrid (143B.TK(-)), Kontrolle
CD _{mut}	Osteosarkomcybrid (143B.TK(-)) mit der <i>common deletion</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CM	Teratomcybridklon, Wildtyp (<i>control mitochondria</i>)
COX	Cytochrom-c Oxidase
CPEO	chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie
CuZnSOD	Kuper-Zink-Superoxiddismutase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dubelccos modifiziertes Eagle Medium (verringertes Bicarbonatgehalt)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Gesamt-DNA (<i>double-strand DNA</i>)
DTNB	5,5-Dithiobis(2-nitrobenzylsäure)
DTPA	Titriplex V
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethakrinsäure (<i>ethacrinic acid</i>)
<i>ECL</i>	<i>enchanced chemiluminiscence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
<i>ETC</i>	Elektronentransportkette (<i>electron transport chain</i>)
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduziert
FKS	fötale Kälberserum
f. K.	Endkonzentration (finale Konzentration)
FMN	Flavinmononukleotid
GCLC	katalytische Untereinheit der Gamma-Glutamat-Cystein-Ligase
GCLM	regulatorische Untereinheit der Gamma-Glutamat-Cystein-Ligase
GPx1	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GS	Glutathionsynthase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
GTP	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
hvr2	Hypervariable Region 2
IM	innere Mitochondrienmembran
IMS	Intermembranspalt
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KSS	Kearns Sayre Syndrom

l	Liter
LHON	Lebersche Hereditäre Optische Neuropathie
L-LDH	L-Laktatdehydrogenase
<i>LOH</i>	Verlust der Heterozygotie (<i>loss of heterozygoty</i>)
M	molar
MCB	Monochlorbiman
MD	Teratomcybrid mit der LHON-Mutation G11778A
MELAS	Mitochondriale Enzephalopathie Laktatazidose Schlaganfallähnliche Symptome
MERRF	Myoklonie, Epilepsie, ragged red fibers
MetOH	Methanol
Min	Minute
mM	millimolar
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	Mikrotitertetrazolim- Test
M-Zellen	Magno-Zellen
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid, oxidiert
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NARP	Neuropathie Ataxie Retinitis Pigmentosa
NB	Neurobasalmedium
nDNA	nukleäre DNA
NF-κB	Transkriptionsfaktor
<i>NFL</i>	Nervenfaserschicht (<i>nerve fiber layer</i>)
NT2/D1	parentale Teratomlinie (NTera2/D1)
OD	Optische Dichte
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEG	Polyethylenglukol

PMB	Papillomakuläres Bündel
PTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore
P-Zellen	Parvo-Zellen
ρ^0 -Zellen	<i>Rho-Zero</i> Zellen (Zellen ohne mtDNA)
ρ^- -Zellen	<i>Rho-Minus</i> Zellen (Zellen, deren mtDNA z.T. depletiert ist)
RA	Retinolsäure
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
RGC	Retinale Ganglienzellen (<i>retinal ganglion cells</i>)
rRNA	ribosomale RNA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Quantitative PCR (Echtzeit-PCR)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHSY-5Y	Neuroblastomlinie
SSA	Salicylsäure
SOD	Gesamt-Superoxiddismutase
Taq	thermostabile DNA Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat EDTA
TIM	<i>Translocase of inner mitochondrial membrane</i>
TNB	5,5-Dithiobis(2-nitrobenzylsäure)
TOM	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane</i>
TRAIL	<i>TNF- related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Trishydroxyaminomethan
tRNA	transfer-RNA
VDAC	spannungsabhängiger Anionenkanal (<i>voltage dependent anion channel</i>)
ZNS	zentrales Nervensystem

9. Anhang

9.1. Literaturverzeichnis

- Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 1985; 113: 548-55.
- Andrews RM, Griffiths PG, Johnson MA, Turnbull DM. Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 231-5.
- Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Stenvall J, et al. A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1518-25.
- Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1825-35.
- Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990; 190: 360-5.
- Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baruzzi A, Schapira AH, et al. Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. *Arch Neurol* 2005; 62: 730-6.
- Barnils N, Mesa E, Munoz S, Ferrer-Artola A, Arruga J. [Response to idebenone and multivitamin therapy in Leber's hereditary optic neuropathy]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82: 377-80.
- Beretta S, Mattavelli L, Sala G, Tremolizzo L, Schapira AH, Martinuzzi A, et al. Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain* 2004; 127: 2183-92.
- Berg JM, Tymoczko, J.L., Stryer, L. *Biochemie*. Vol 5. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- Bergemeyer H. *Glutathione and Glutathione Disulphide*. New York, 1985.
- Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 112-7.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 264: 687-701.
- Bishop AL, Rab FA, Sumner ER, Avery SV. Phenotypic heterogeneity can enhance rare-cell survival in 'stress-sensitive' yeast populations. *Mol Microbiol* 2007; 63: 507-20.
- Bonilla E, Medina-Leendertz S, Villalobos V, Molero L, Bohorquez A. Paraquat-induced oxidative stress in *drosophila melanogaster*: effects of melatonin, glutathione, serotonin, minocycline, lipoic acid and ascorbic acid. *Neurochem Res* 2006; 31: 1425-32.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006; 25: 397-424.
- Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, Johnson MA, Turnbull DM. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 791-6.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C817-33.
- Brown MD. The enigmatic relationship between mitochondrial dysfunction and Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Sci* 1999; 165: 1-5.
- Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC. Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J Biol Chem* 2000; 275: 39831-6.
- Bu X, Rotter JI. Leber hereditary optic neuropathy: estimation of number of embryonic precursor cells and disease threshold in heterozygous affected females at the X-linked locus. *Clin Genet* 1992; 42: 143-8.
- Bu XD, Rotter JI. X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8198-202.
- Bus JS, Gibson JE. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* 1984; 55: 37-46.
- Buyse G, Mertens L, Di Salvo G, Matthijs I, Weidemann F, Eyskens B, et al. Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology* 2003; 60: 1679-81.
- Cappelletti G, Maggioni MG, Maci R. Apoptosis in human lung epithelial cells: triggering by paraquat and modulation by antioxidants. *Cell Biol Int* 1998; 22: 671-8.
- Carelli V, Ghelli A, Bucchi L, Montagna P, De Negri A, Leuzzi V, et al. Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 1999; 45: 320-8.
- Carelli V, Ghelli A, Ratta M, Bacchilega E, Sangiorgi S, Mancini R, et al. Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype. *Neurology* 1997; 48: 1623-32.
- Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003; 19: 257-62.
- Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 2004a; 23: 53-89.

- Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem Int* 2002; 40: 573-84.
- Carelli V, Rugolo M, Sgarbi G, Ghelli A, Zanna C, Baracca A, et al. Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2004b; 1658: 172-9.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47: 936-42.
- Castello PR, Drechsel DA, Patel M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem* 2007; 282: 14186-93.
- Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1992; 16: 992-6.
- Chen Y, Shertzer HG, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem* 2005; 280: 33766-74.
- Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000; 48: 188-93.
- Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke BW, et al. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis* 2005; 20: 360-71.
- Cock HR, Cooper JM, Schapira AH. Functional consequences of the 3460-bp mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Sci* 1999; 165: 10-7.
- Cock HR, Tabrizi SJ, Cooper JM, Schapira AH. The influence of nuclear background on the biochemical expression of 3460 Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 1998; 44: 187-93.
- Coll O, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology* 2003; 38: 692-702.
- Cortelli P, Montagna P, Pierangeli G, Lodi R, Barboni P, Liguori R, et al. Clinical and brain bioenergetics improvement with idebenone in a patient with Leber's hereditary optic neuropathy: a clinical and 31P-MRS study. *J Neurol Sci* 1997; 148: 25-31.
- Danielson SR, Carelli V, Tan G, Martinuzzi A, Schapira AH, Savontaus ML, et al. Isolation of transcriptomal changes attributable to LHON mutations and the cybridization process. *Brain* 2005; 128: 1026-37.

- Danielson SR, Wong A, Carelli V, Martinuzzi A, Schapira AH, Cortopassi GA. Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 5810-5.
- Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12760-5.
- Degli Esposti M, Carelli V, Ghelli A, Ratta M, Crimi M, Sangiorgi S, et al. Functional alterations of the mitochondrially encoded ND4 subunit associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *FEBS Lett* 1994; 352: 375-9.
- Dickinson DA, Levonen AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM, et al. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1152-9.
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985; 17: 521-38.
- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 1999; 19: 562-9.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- Fernandez-Checa JC, Yi JR, Garcia Ruiz C, Ookhtens M, Kaplowitz N. Plasma membrane and mitochondrial transport of hepatic reduced glutathione. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 147-58.
- Fine BS, Yanoff, M. *Ocular histology. A text and Atlas.* New York, 1979.
- Fitzmaurice PS, Ang L, Guttman M, Rajput AH, Furukawa Y, Kish SJ. Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18: 969-76.
- Floreani M, Napoli E, Martinuzzi A, Pantano G, De Riva V, Trevisan R, et al. Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Febs J* 2005; 272: 1124-35.
- Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 319-24.
- Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 1980; 47: 117-33.
- Fukushima T, Tawara T, Isobe A, Hojo N, Shiwaku K, Yamane Y. Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 1995; 42: 385-90.

- Gerbitz KD, Obermaier-Kusser B, Zierz S, Pongratz D, Muller-Hocker J, Lestienne P. Mitochondrial myopathies: divergences of genetic deletions, biochemical defects and the clinical syndromes. *J Neurol* 1990; 237: 5-10.
- Ghelli A, Degli Esposti M, Carelli V, Lenaz G. Changes in mitochondrial complex I activity and coenzyme Q binding site in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). *Mol Aspects Med* 1997; 18 Suppl: S263-7.
- Ghelli A, Zanna C, Porcelli AM, Schapira AH, Martinuzzi A, Carelli V, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *J Biol Chem* 2003; 278: 4145-50.
- Gibson BW. The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 927-34.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-12.
- Glaser JS, Sadun A.A. *Anatomy of the visual sensory system*. Philadelphia, 1990.
- Goldenthal MJ, Marin-Garcia J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* 2004; 262: 1-16.
- Gonzalez-Polo RA, Rodriguez-Martin A, Moran JM, Niso M, Soler G, Fuentes JM. Paraquat-induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells. *Brain Res* 2004; 1011: 170-6.
- Graefe von A. Ein ungewöhnlicher Fall von hereditärer Amaurose: *Arch. Ophthalmol.* 4, 1858: 266-268.
- Haroon MF, Fatima A, Scholer S, Gieseler A, Horn TF, Kirches E, et al. Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): Studies of cybrid cells bearing 11778 mutation. *Neurobiol Dis* 2007.
- Harrington EA, Fanidi A, Evan GI. Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 120-9.
- Higuchi H, Adachi M, Miura S, Gores GJ, Ishii H. The mitochondrial permeability transition contributes to acute ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 34: 320-8.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 1026-30.
- Hillered L, Ernster L. Respiratory activity of isolated rat brain mitochondria following in vitro exposure to oxygen radicals. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983; 3: 207-14.
- Hofhaus G, Johns DR, Hurko O, Attardi G, Chomyn A. Respiration and growth defects in transmitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Biol Chem* 1996; 271: 13155-61.

- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-9.
- Howell N. Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers. *Int Rev Cytol* 1999; 186: 49-116.
- Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, et al. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 939-50.
- Hudson G, Keers S, Yu Wai Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, et al. Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 1086-91.
- Hurd TR, Prime TA, Harbour ME, Lilley KS, Murphy MP. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 22040-51.
- Ilett KF, Stripp B, Menard RH, Reid WD, Gillette JR. Studies on the mechanism of the lung toxicity of paraquat: comparison of tissue distribution and some biochemical parameters in rats and rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974; 28: 216-26.
- Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13 Suppl 1: 24-34.
- Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996; 47: S161-70.
- Jordan J, Fernandez-Gomez FJ, Ramos M, Ikuta I, Aguirre N, Galindo MF. Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. *Curr Drug Deliv* 2007; 4: 225-31.
- Kearns TP, Sayre GP. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol* 1958; 60: 280-9.
- King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989; 246: 500-3.
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513-9.
- Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Kunz WS. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 163-8.
- Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 691-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.

- Laforet P, Lombes A, Eymard B, Danan C, Chevally M, Rouche A, et al. Chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers: clinical, morphological and genetic investigations in 43 patients. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 399-413.
- Leber T. Über hereditäre und congenital- angelegte Sehnervenleiden: *Arch. Ophthalmol.* 17, 1871: 249-291.
- Lee JM, Bernstein A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 149-61.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 2003; 278: 8516-25.
- Lill R, Neupert W. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 56-61.
- Livingstone MS, Hubel DH. Psychophysical evidence for separate channels for the perception of form, color, movement, and depth. *J Neurosci* 1987; 7: 3416-68.
- Löffler GP, P.E., Heinrich, P.C. *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol 8. Berlin, 2006.
- Mackey DA, Buttery RG. Leber hereditary optic neuropathy in Australia. *Aust N Z J Ophthalmol* 1992; 20: 177-84.
- Majander A, Finel M, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Wikstrom M. Catalytic activity of complex I in cell lines that possess replacement mutations in the ND genes in Leber's hereditary optic neuropathy. *Eur J Biochem* 1996; 239: 201-7.
- Majander A, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Wikstrom M. Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Lett* 1991; 292: 289-92.
- Makarov P, Kropf S, Wiswedel I, Augustin W, Schild L. Consumption of redox energy by glutathione metabolism contributes to hypoxia/ reoxygenation-induced injury in astrocytes. *Mol Cell Biochem* 2006; 286: 95-101.
- Makarov PR, Wiswedel I, Augustin W, Schild L. Hypoxia/reoxygenation-induced damage to mitochondrial activity is determined by glutathione threshold in astroglia-rich cell cultures. *Brain Res* 2002; 933: 91-7.
- Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 333-9.
- Mannella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 140-7.
- Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru, II, Slepchenko B, Loew LM, et al. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB*

- Life 2001; 52: 93-100.
- Mari M, Bai J, Cederbaum AI. Toxicity by pyruvate in HepG2 cells depleted of glutathione: role of mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 73-83.
- Mariotti C, Solari A, Torta D, Marano L, Fiorentini C, Di Donato S. Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology* 2003; 60: 1676-9.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974; 47: 469-74.
- Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *J Neuroophthalmol* 2000; 20: 166-70.
- Minckler DS, McLean IW, Tso MO. Distribution of axonal and glial elements in the rhesus optic nerve head studied by electron microscopy. *Am J Ophthalmol* 1976; 82: 179-87.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-8.
- Montgomery MR. Interaction of paraquat with the pulmonary microsomal fatty acid desaturase system. *Toxicol Appl Pharmacol* 1976; 36: 543-54.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004; 279: 49064-73.
- Muller FL, Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM. Architecture of the Qo site of the cytochrome bc1 complex probed by superoxide production. *Biochemistry* 2003; 42: 6493-9.
- Murga M, Fernandez-Capetillo O. Genomic instability: on the birth and death of cancer. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 216-20.
- Nass MM, Nass S. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* 1963; 19: 593-611.
- Neupert W, Hartl FU, Craig EA, Pfanner N. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell* 1990; 63: 447-50.
- Newman NJ. *Leber's optic neuropathy*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998.
- Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 2005; 38: 311-7.
- Nikoskelainen E, Hoyt WF, Nummelin K. Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy. I. Fundus findings in asymptomatic family members. *Arch Ophthalmol*

- 1982; 100: 1597-602.
- Nikoskelainen E, Hoyt WF, Nummelin K. Ophthalmoscopic findings in Leber's hereditary optic neuropathy. II. The fundus findings in the affected family members. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1059-68.
- Nikoskelainen E, Hoyt WF, Nummelin K, Schatz H. Fundus findings in Leber's hereditary optic neuroretinopathy. III. Fluorescein angiographic studies. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 981-9.
- Niso-Santano M, Moran JM, Garcia-Rubio L, Gomez-Martin A, Gonzalez-Polo RA, Soler G, et al. Low concentrations of paraquat induces early activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, protein kinase B, and c-Jun N-terminal kinase 1/2 pathways: role of c-Jun N-terminal kinase in paraquat-induced cell death. *Toxicol Sci* 2006; 92: 507-15.
- Noll F. L-(+)- Lactate. Vol 3. New York: Bergmeyer HU, 1984.
- Ogden TE. Nerve fiber layer of the owl monkey retina: retinotopic organization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 265-9.
- Ozdener H. Inducible functional expression of Bcl-2 in human astrocytes derived from NTera-2 cells. *J Neurosci Methods* 2007; 159: 8-18.
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984; 16: 481-8.
- Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wu HY, Wei YH, et al. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 241-55.
- Perkins GA, Renken CW, van der Klei IJ, Ellisman MH, Neupert W, Frey TG. Electron tomography of mitochondria after the arrest of protein import associated with Tom19 depletion. *Eur J Cell Biol* 2001; 80: 139-50.
- Perkins GA, Song JY, Tarsa L, Deerinck TJ, Ellisman MH, Frey TG. Electron tomography of mitochondria from brown adipocytes reveals crista junctions. *J Bioenerg Biomembr* 1998; 30: 431-42.
- Perry TL, Godin DV, Hansen S. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* 1982; 33: 305-10.
- Perry TL, Yong VW. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* 1986; 67: 269-74.
- Pleasure SJ, Page C, Lee VM. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* 1992; 12: 1802-15.
- Polyak SL. *The Retina*. The University of Chicago Press. Chicago, 1941.

- Pommer R. Wirkung von Ethambutol auf Cybridzellen mit Mutationen für die Leber'sche Hereditäre Optische Neuropathie (LHON). Institut für Neuropathologie. Magdeburg: Otto-von-Guericke Universität, 2007.
- Qi X, Sun L, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J. The mutant human ND4 subunit of complex I induces optic neuropathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1-10.
- Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol* 1992; 48: 122-6.
- Sadun A. Acquired mitochondrial impairment as a cause of optic nerve disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1998; 96: 881-923.
- Sadun AA, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Quiros P, Sadun F, et al. A very large Brazilian pedigree with 11778 Leber's hereditary optic neuropathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002; 100: 169-78; discussion 178-9.
- Sadun AA, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Quiros PA, Sadun F, et al. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 2003; 136: 231-8.
- Sadun AA, Martone JF. Cuba: response of medical science to a crisis of optic and peripheral neuropathy. *Int Ophthalmol* 1994a; 18: 373-8.
- Sadun AA, Martone JF, Muci-Mendoza R, Reyes L, DuBois L, Silva JC, et al. Epidemic optic neuropathy in Cuba. Eye findings. *Arch Ophthalmol* 1994b; 112: 691-9.
- Sadun F, De Negri AM, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Andrade R, et al. Ophthalmologic findings in a large pedigree of 11778/Haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 271-7.
- Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 1967; 14: 255-74.
- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 1999; 283: 1488-93.
- Sato B, Tanaka A, Mori S, Yanabu N, Kitai T, Tokuka A, et al. Quantitative analysis of redox gradient within the rat liver acini by fluorescence images: effects of glucagon perfusion. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268: 20-6.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-212.
- Schapira A H V DS. *Mitochondrial disorders in Neurology 2*. Boston: Butterworth- Heinemann, 2002.
- Scheffler IE. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49: 3-26.
- Schimper AFW. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. 41: *Bot. Z.*, 1883: 102-113.

- Schoeler S, Szibor R, Gellerich FN, Wartmann T, Mawrin C, Dietzmann K, et al. Mitochondrial DNA deletions sensitize cells to apoptosis at low heteroplasmy levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332: 43-9.
- Schoeler S, Winkler-Stuck K, Szibor R, Haroon MF, Gellerich FN, Chamaon K, et al. Glutathione depletion in antioxidant defense of differentiated NT2-LHON cybrids. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 536-44.
- Schutte M, Werner P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 1998; 246: 53-6.
- Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002; 347: 576-80.
- Seppet G, Trumbeckaite, Zierz, Striggow, Gellerich. *Molecular System Bioenergetics: Energy for Life*. In: V. S, editor. Vol 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2007.
- Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 2001; 82: 55-84.
- Shinjyo N, Kita K. Up-regulation of heme biosynthesis during differentiation of Neuro2a cells. *J Biochem (Tokyo)* 2006; 139: 373-81.
- Shinjyo N, Kita K. Relationship between reactive oxygen species and heme metabolism during the differentiation of Neuro2a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 130-5.
- Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 2001; 106: 46-52.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994; 36: 348-55.
- Smith JL, Hoyt WF, Susac JO. Ocular fundus in acute Leber optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1973; 90: 349-54.
- Smith PR, Cooper JM, Govan GG, Harding AE, Schapira AH. Platelet mitochondrial function in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Sci* 1994; 122: 80-3.
- Stallings RL. Are chromosomal imbalances important in cancer? *Trends Genet* 2007; 23: 278-83.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-90.
- Thorburn A. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway signaling. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 461-5.
- Tian L, Shi MM, Forman HJ. Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 126-33.
- Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997; 17:

3-8.

- Vergani L, Martinuzzi A, Carelli V, Cortelli P, Montagna P, Schievano G, et al. MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 880-8.
- Verkaart S, Koopman WJ, Cheek J, van Emst-de Vries SE, van den Heuvel LW, Smeitink JA, et al. Mitochondrial and cytosolic thiol redox state are not detectably altered in isolated human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 1041-51.
- Vesce S, Jekabsons MB, Johnson-Cadwell LI, Nicholls DG. Acute glutathione depletion restricts mitochondrial ATP export in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 2005; 280: 38720-8.
- von Wurmb-Schwark N, Cavelier L, Cortopassi GA. A low dose of ethidium bromide leads to an increase of total mitochondrial DNA while higher concentrations induce the mtDNA 4997 deletion in a human neuronal cell line. *Mutat Res* 2006; 596: 57-63.
- Wall M, Sadun, A.A. *New methods of sensory visual testing*. New York: Springer, 1989.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-8.
- Wallace DC. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 363-74.
- Waxman SG. Prerequisites for conduction in demyelinated fibers. *Neurology* 1978; 28: 27-33.
- Winterbourn CC, Sutton HC. Hydroxyl radical production from hydrogen peroxide and enzymatically generated paraquat radicals: catalytic requirements and oxygen dependence. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235: 116-26
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22: 130-1, 134-8.
- Wong A, Cavelier L, Collins-Schramm HE, Seldin MF, McGrogan M, Savontaus ML, et al. Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 431-8.
- Wong A, Cortopassi G. mtDNA mutations confer cellular sensitivity to oxidant stress that is partially rescued by calcium depletion and cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 139-45.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134: 489-92.
- Wullner U, Seyfried J, Groscurth P, Beinroth S, Winter S, Gleichmann M, et al. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res* 1999; 826: 53-62.
- Yen MY, Lee JF, Liu JH, Wei YH. Energy charge is not decreased in lymphocytes of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with the 11,778 mutation. *J Neuroophthalmol*

1998; 18: 84-5.

Yu DY, Cringle SJ. Oxygen distribution in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1109-12.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Carelli V, Martinuzzi A, Rugolo M. Apoptotic cell death of cybrid cells bearing Leber's hereditary optic neuropathy mutations is caspase independent. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 213-7.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G. *Apoptosis* 2005; 10: 997-1007.

Zeviani M, Spinazzola A, Carelli V. Nuclear genes in mitochondrial disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 262-70.

Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 1990; 265: 16330-6.

Zierz S, JF, Eger K. *Muskelerkrankungen*. Vol 3. Stuttgart: Thieme Verlag, 2003.

Zsurka G, Kravtsov Y, Kudina T, Kornblum C, Elger CE, Khrapko K, et al. Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy. *Nat Genet* 2005; 37: 873-7.

9.2. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Schöler
Vorname	Susanne
Geburtsdatum/-ort	19.10.1976 in Mannheim
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1983-1987	Grundschule in Hüttenfeld
1987-1996	Gymnasialer Zweig der additiven Gesamtschule Alexander-von-Humboldt in Viernheim
1996	Abitur

Studium

Oktober 1996 - Dezember 2002	Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH) Hauptfächer: Genetik, Zoologie Nebenfächer: Umwelt- und Strahlentoxikologie, Organische Chemie
Januar 2003 - Dezember 2003	Diplomarbeit am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) des Forschungszentrum Karlsruhe „Identifizierung der zygotischen Transkription im Vertebratenembryo (<i>Danio rerio</i>) an ausgewählten Beispielen, sowie der Nachweis deren Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit vom generellen Transkriptionsfaktor (TF) TBP“
Seit September 2004	Promotion am Institut für Neuropathologie der Otto-von-Guericke Universität

9.3. Publikationsliste

Publikationen

Braeuninger S, Chamaon K, Kropf S, Mawrin C, Wiedemann FR, Hartig R, et al. Short incubation with 2-methoxyestradiol kills malignant glioma cells independent of death receptor 5 upregulation. *Clin Neuropathol* 2005; 24: 175-83.

Haroon MF, Fatima A, Scholer S, Gieseler A, Horn TF, Kirches E, et al. Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): Studies of cybrid cells bearing 11778 mutation. *Neurobiol Dis* 2007; 28: 237-50.

Schoeler S, Hertel S, Haroon MF, Winkler-Stuck K, Mawrin C, Kirches E. Absence of major accumulation of mitochondrial ND5 mutations in Parkinson patient muscle. *Clin Neuropathol* 2007; 26: 164-8.

Schoeler S, Szibor R, Gellerich FN, Wartmann T, Mawrin C, Dietzmann K, et al. Mitochondrial DNA deletions sensitize cells to apoptosis at low heteroplasmy levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332: 43-9.

Schoeler S, Winkler-Stuck K, Szibor R, Haroon MF, Gellerich FN, Chamaon K, et al. Glutathione depletion in antioxidant defense of differentiated NT2-LHON cybrids. *Neurobiol Dis* 2007; 25: 536-44.

Posterbeiträge

Antioxidative defences in LHON cybrides

S.Schoeler, E. Kirches

ProRetina Kongress, Potsdam, 2006

Antioxidative defences in Lebers hereditary Optic Neuropathy

S.Schöler, E. Kirches

Neurowoche, Mannheim, 2006

