

**EINE HYPOFUNKTIONELLE MUTATION  
IN DER POLYNUKLEOTID-PHOSPHORYLASE  
FÜHRT ZU EINER  
AUTOSOMAL-REZESSIVEN NICHT-SYNDROMALEN HÖRSTÖRUNG**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR  
ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

VORGELEGT VON  
SIMON VON AMELN  
AUS AACHEN

**KÖLN 2012**

Die vorliegende Dissertation wurde mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln am Institut für Humangenetik (Direktorin: Prof. Dr. Brunhilde Wirth) der Universität zu Köln unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Langer und Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Langer

Prof. Dr. Christian Kubisch

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Dezember 2011

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das auditorische System	1
1.1.1	Die Anatomie des Ohrs	1
1.1.2	Struktur und Funktionsweise des Corti-Organs	2
1.2	Kongenitale Hörstörungen	3
1.2.1	Nicht-syndromale Hörstörung	3
1.2.2	Heterogenität der nicht-syndromalen Hörstörung	3
1.3	Identifizierung eines Gendefekts durch genomweite Kopplungsanalyse und positionelle Klonierung	4
1.3.1	Genomweite Kopplungsanalyse	4
1.3.2	Positionelle Klonierung	5
1.4	<i>PNPT1</i> - Polynukleotid-Phosphorylase	5
1.4.1	Funktionen und Struktur der PNPase in Bakterien	7
1.4.2	Die PNPase in Säugetieren	8
1.5	Hörstörung bedingt durch mitochondriale Dysfunktion	13
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen	14
2.2	Standardpuffer und -lösungen	16
2.3	Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs)	16
2.4	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	16
2.5	Sonstige Nukleinsäuren	17
2.6	Enzyme	17
2.6.1	Polymerasen	17
2.6.2	Restriktionsenzyme	17
2.6.3	Weitere Enzyme	17
2.7	Substanzen für die Agarose-Gel-Elektrophorese	17
2.8	Reagenzien und Zubehör für die <i>Real-time</i> PCR	18
2.8.1	<i>Taqman Assays</i>	19
2.9	Medien zur Kultivierung und Selektionierung von Bakterien	19
2.10	Bakterienstämme	21
2.11	Klonierungsvektoren	21
2.12	Zellkultur	23
2.12.1	Zelllinien	23

---

2.12.2	Medium zur Kultivierung von Säugetierzellen	23
2.12.3	Einfriermedium für Säugetierzellen	24
2.12.4	Transfektionsreagenz	24
2.12.5	Material für die Zellernte	24
2.13	Chemikalien zur Auslösung von Zellstress	24
2.14	Materialien für die <i>Western-Blot</i> -Analyse	24
2.15	Substanzen für die Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen	25
2.16	Immunfluoreszenzmarkierung von Organellen	26
2.16.1	Zellkernmarkierung	26
2.16.2	Mitochondrienmarkierung	26
2.17	Materialien für die Präparation des murinen Innenohrs	26
2.18	Eindeckelmedien	26
2.19	Antikörper	27
2.19.1	Primärantikörper	27
2.19.2	<i>HRP</i> -konjugierte Sekundärantikörper	27
2.19.3	Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper	27
2.20	Morpholinos	27
2.21	Sanger-Sequenzierungen	27
2.22	Kommerzielle Reagenziensysteme („ <i>Kits</i> “)	27
2.23	Geräte	28
2.24	Datenbanken und Internetseiten	30
2.25	Software	30
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
3.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA	31
3.2	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	31
3.2.1	Funktionsweise und Komponenten der PCR	31
3.2.2	Phasen der PCR	32
3.2.3	<i>Design</i> von Oligonukleotiden (Primern)	33
3.2.4	PCR-Reaktionsansätze	33
3.2.5	PCR-Temperaturprofile zur Amplifikation von DNA und cDNA	34
3.3	RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	36
3.4	<i>Real-time</i> PCR	36
3.4.1	Funktionsweise der <i>Real-time</i> PCR	36
3.4.2	Quantitativer Nachweis von miRNAs mit <i>Taqman</i> Sonden	37
3.5	<i>RACE</i> -PCR	37
3.6	Agarose-Gel-Elektrophorese	38

---

3.7	Aufreinigung von Nukleinsäuren	39
3.7.1	Aufreinigung eines PCR-Produktes mit „ <i>ExoTSAP</i> “	39
3.7.2	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	40
3.8	Sanger-Sequenzierung	40
3.8.1	Theoretischer Hintergrund	40
3.8.2	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden	41
3.9	Klonierung	41
3.9.1	TA-Klonierung mit dem <i>pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit</i>	42
3.9.2	Das <i>Gateway</i> Klonierungssystem	43
3.10	Kompetente Bakterien	44
3.11	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien	44
3.12	Bakterien-Übernachtskulturen	44
3.13	Glycerolstocks zur Konservierung transformierter Bakterien	45
3.14	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (MiniPrep)	45
3.15	Mutagenese mit dem <i>QuikChange® II Site-directed Mutagenesis Kit</i>	45
3.15.1	Mutagenese-PCR und Transformation	46
3.16	Restriktionsenzyme	47
3.16.1	Kontrollverdau isolierter Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	47
3.16.2	Verdau von PCR-Produkten	48
3.17	Zellkultur und Transfektion	48
3.17.1	Kultivierung von Säugetierzellen	48
3.17.2	Subkultivierung von Säugetierzellen	48
3.17.3	Transfektion von Säugetierzellen mit Expressionsvektoren	49
3.18	<i>Western-Blot</i> -Analyse	49
3.18.1	Vorbereitung von Proteinproben	49
3.18.2	Proteinauftrennung durch <i>SDS-PAGE</i>	49
3.18.3	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	50
3.18.4	Inkubation mit Antikörpern und Chemilumineszenz-Detektion	50
3.18.5	Praktische Durchführung	51
3.19	Indirekte Immunfluoreszenz-Markierung von Zellen	51
3.19.1	Transfizieren von MEFs mit <i>pcDNA3.1-hPNPT1-WT-V5-His</i> -Konstrukten	52
3.19.2	<i>Splitten</i> auf Deckgläschen	52
3.19.3	Fixierung mit Methanol	52
3.19.4	Blocken und Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern	52
3.19.5	Zellkernfärbung und Eindeckeln	52
3.20	Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien	52
3.20.1	Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien durch <i>pDsRed1-Mito</i>	52

---

3.20.2	Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien mit <i>MitoTracker</i> ®	53
3.21	Innenohr-Präparation	53
3.21.1	Präparation und Fixierung des murinen Innenohrs	53
3.21.2	Einbettung und Herstellung von Gefrierschnitten	53
3.21.3	Immunhistochemie auf Cochlea-Gefrierschnitten	54
3.22	<i>In situ</i> Hybridisierung im Zebrafisch	54
3.22.1	Generierung einer DIG-markierten RNA-Sonde für die <i>in situ</i> Hybridisierung	54
3.22.2	<i>In situ</i> Hybridisierung (Labor Prof. Dr. Hammerschmidt, Köln)	54
3.23	Morpholino- <i>Knockdown</i> von <i>PNPT1</i> im Zebrafisch	55
3.23.1	Morpholino- <i>Design</i>	55
3.23.2	Morphologische Untersuchungen	56
3.23.3	Hör-Tests	56
3.24	Komplementationsversuche in <i>E. coli</i>	56
3.24.1	<i>Spot</i> Tests	56
3.24.2	Flüssigkulturen	57
3.25	Nicht-denaturierende Gel-Elektrophorese (Teitell und Koehler)	57
3.26	<i>In vitro</i> RNA-Import-Versuche (Teitell und Koehler)	57
3.27	miRNA Degradationsversuch	57
3.27.1	Gewinnung von RNA inkl. miRNAs aus murinen Geweben	57
3.27.2	<i>In vitro</i> Translation von rekombinanten PNPase-Proteinen	58
3.27.3	Inkubation von RNA/miRNA mit rekombinanter PNPase	58
3.28	Expressionsanalyse von microRNAs in unterschiedlichen Geweben	58
3.29	Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe	58
<b>4</b>	<b>Eigene Vorarbeiten</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
6.1	Ausschluss der verbliebenen Kandidatengene	63
6.2	Expression von PNPase-V5-His-Konstrukten in Hek293T-Zellen	64
6.3	Stabilität von PNPase-Wildtyp und -Mutante unter oxidativem Stress	65
6.4	Immunlokalisierung von PNPase-WT bzw. -E475G in COS7-Zellen	67
6.5	Expressionsnachweis des <i>PNPT1</i> -Gens in murinen Geweben	68
6.6	Expressionsnachweis der endogenen PNPase in murinen Geweben	68
6.7	Immunlokalisierung der endogenen PNPase in MEFs	70
6.8	Immunhistochemie auf Cochleapräparaten	70
6.8.1	Antikörper-Validierung für mitochondriale Marker	70
6.8.2	Expression der PNPase in der murinen Cochlea	71

6.9	<i>PNPT1</i> im Modellorganismus <i>Danio rerio</i>	73
6.9.1	Aufklärung des <i>PNPT1</i> -Gens im Zebrafisch	73
6.9.2	Alignment von hPNPase und zfPNPase	75
6.9.3	Bioinformatische Analyse des mitochondrialen Zielpeptids	76
6.9.4	Immunlokalisierung rekombinanter zfPNPase in MEFs	77
6.9.5	<i>In situ</i> Hybridisierung in Zebrafisch-Embryonen	77
6.10	Morpholino- <i>Knockdown</i> des <i>PNPT1</i> -Gens im Zebrafisch	79
6.10.1	Morpholino- <i>Design</i>	79
6.10.2	Morpholino- <i>Knockdown</i> mittels ATG-Morpholino	80
6.10.3	Morpholino- <i>Knockdown</i> mittels <i>Splice</i> -Morpholino	80
6.11	Komplementationsversuche in <i>E.coli</i>	84
6.11.1	Komplementation durch die humane PNPase	84
6.11.2	Komplementation durch die bakterielle PNPase von <i>E.coli</i>	86
6.12	Versuchsergebnisse von Kollaborationspartnern	88
6.12.1	<i>Blue Native</i> Gelelektrophorese	88
6.12.2	RNA-Import-Versuche	90
6.13	MicroRNA Degradationsversuche	92
6.13.1	Expressionsprofil von miR-96 in unterschiedlichen murinen Geweben	92
6.13.2	Vorversuch mit unaufgereinigter PNPase	94
6.13.3	MicroRNA Degradation mit aufgereinigter PNPase	94
6.14	Subzelluläre Lokalisierung von miRNA-96, -182 und -183	96
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>98</b>
7.1	Eine <i>Missense</i> -Mutation in <i>PNPT1</i> führt zu erblicher Taubheit	98
7.2	Die E475G-Mutation beeinträchtigt weder die Proteinstabilität noch die subzelluläre Lokalisierung der PNPase	100
7.3	Die PNPase ist in essentiellen Strukturen der Cochlea exprimiert	101
7.4	Die PNPase des Zebrafisches	102
7.4.1	Das Zebrafisch-Genom kodiert für ein orthologes <i>PNPT1</i> -Gen	102
7.4.2	Die Zebrafisch-PNPase ist bereits maternal exprimiert	103
7.4.3	Der <i>Knockdown</i> des zf <i>PNPT1</i> -Gens führt zu schweren Entwicklungsstörungen	103
7.5	Die E430G-Substitution führt zu einer Hypofunktion der <i>E. coli</i> PNPase	106
7.6	<i>In vitro</i> werden die microRNAs miR-96, -182 und -183 durch die PNPase nicht degradiert	107
7.7	Haarzellspezifisch exprimierte microRNAs sind nicht in Mitochondrien aus Lungengewebe angereichert	108
7.8	Die E475G-Mutation beeinträchtigt die Trimerisierung der PNPase	110
7.9	Die E475G-Mutation führt zu einem reduzierten mitochondrialen RNA-Import	110

7.10	Die Akkumulation unprozessierter mitochondrialer Transkripte könnte ursächlich für die Taubheit sein	112
7.11	Die Taubheit im <i>DFNB70</i> -Locus basiert vermutlich auf einer mitochondrialen Dysfunktion	112
7.12	Trotz ubiquitärer Expression und essentieller Funktion führt die E475G-Mutation zu einem gewebespezifischen Phänotyp	113
7.13	Mutationen in kernkodierten Genen können durch mitochondriale Dysfunktion zu einer Hörstörung führen	114
7.14	<i>PNPT1</i> -Mutationen könnten zu unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen führen	116
7.15	<i>PNPT1</i> als Kandidatengen für altersbedingte Schwerhörigkeit	117
7.16	Die Häufigkeit von <i>PNPT1</i> -Varianten ist sehr gering	118
7.17	Ausblick	119
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Abstract</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>125</b>
10.1	Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	125
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>12</b>	<b>Anhang</b>	<b>136</b>
12.1	Vektorkarten	136
12.1.1	TOPO-TA-Vektor (Invitrogen)	136
12.1.2	<i>Gateway</i> -Vektoren (Invitrogen)	137
12.2	Primertabellen	140
12.3	Audiogramme	149
12.4	<i>GenomeScan</i>	149
12.5	Ausschluss der Region auf Chromosom 12	150
12.6	Übersicht über die gekoppelte Region auf Chromosom 2	151
12.7	Gene in der gekoppelten Region auf Chromosom 2	152
12.8	Aufklärung des <i>PNPT1</i> -Gens und -Proteins im Zebrafisch	153

## Erklärung



## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
<i>Blast</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CCG	<i>Cologne Center for Genomics</i>
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonucleotid-5'-Triphosphat
<i>DDS</i>	<i>Deafness-Dystonia-Syndrome</i>
<i>DFNB</i>	Bezeichnung für nicht-syndromale autosomal-rezessive Taubheits-Loci
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EST</i>	<i>expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Kälberserum
F-Primer	Vorwärts-Primer
Hek-Zellen	<i>human embryonic kidney</i> Zellen
hpf	<i>hours post fertilisation</i> (Stunden nach der Befruchtung)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IMS	Intermembranraum
JLNS	Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom
KO-Maus	<i>Knockout-Maus</i>
LB	Luria Bertani
<i>LOD</i>	<i>Logarithm of the odds</i>
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktat-Azidose und schlaganfallähnlichen Episoden
MERFF	<i>myoclonic epilepsy with ragged-red fiber disease</i>
MIDD	<i>maternally inherited diabetes mellitus and deafness</i>
miR	microRNA
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

---

MPP	<i>Matrix processing protease</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MTS	Mohr-Tranebjaerg-Syndrom
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPI	Poly-A-Polymerase I
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNPase	Polynukleotid-Phosphorylase
<i>PNPT1</i>	<i>Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
R-Primer	Rückwärts-Primer
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RWS	Romano-Ward-Syndrom
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TIM	<i>Translocase of the inner membrane</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TOM	<i>Translocase of the outer membrane</i>
TPBS	Temtamy-Preaxial-Brachydaktylie-Syndrom
tRNA	Transfer-RNA
TSAP	Thermosensitive Alkaline Phosphatase
U	<i>Unit</i> / Einheit
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
UTR	untranslatierte Region

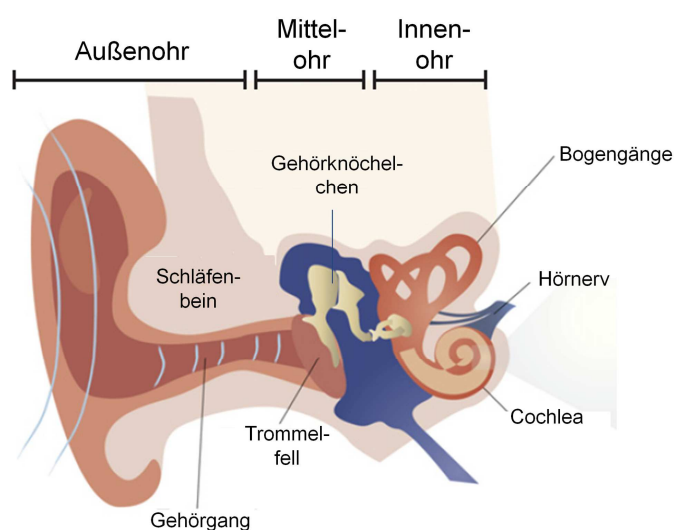
# 1 Einleitung

## 1.1 Das auditorische System

Das auditorische System ermöglicht die Wahrnehmung von akustischen Signalen aus der Umwelt. Ausschlaggebend für diese Fähigkeit ist die Funktion des Innenohrs, mechanische Reize in Form von Schallwellen in elektrische Signale zu übertragen, die letztlich vom Gehirn interpretiert werden und zu der eigentlichen Geräuschwahrnehmung führen. Das menschliche Ohr kann akustische Signale um mehr als das Hundertfache verstärken und ist in der Lage einen Frequenzbereich von 20 Hz bis maximal 20 kHz wahrzunehmen.

### 1.1.1 Die Anatomie des Ohrs

Das Säugetierohr setzt sich aus drei Bereichen zusammen, dem Außen-, Mittel- und Innenohr (Abbildung 1.1). Zum äußeren Ohr gehören die Ohrmuschel, der äußere Gehörgang und das Trommelfell. Das Mittelohr besteht aus der luftgefüllten Paukenhöhle, die sich vom Trommelfell bis zum ovalen Fenster erstreckt. In der Paukenhöhle befinden sich die Gehörknöchelchen (Hammer, Amboss, Steigbügel), die für die Übertragung der Schallwellen vom Trommelfell auf das ovale Fenster verantwortlich sind. Das Innenohr ist anatomisch in das auditorische System und in den Vestibularapparat (Gleichgewichtssinn) unterteilt. Der Vestibularapparat wird von den Bogengängen und den beiden Maculaorganen, Utriculus und Sacculus, gebildet und ermöglicht die Wahrnehmung der Schwerkraft und die dreidimensionale Orientierung. Das eigentliche Hörorgan, das sogenannte Corti-Organ (Corti, 1851), befindet sich in der spiralförmigen flüssigkeitsgefüllten Cochlea.



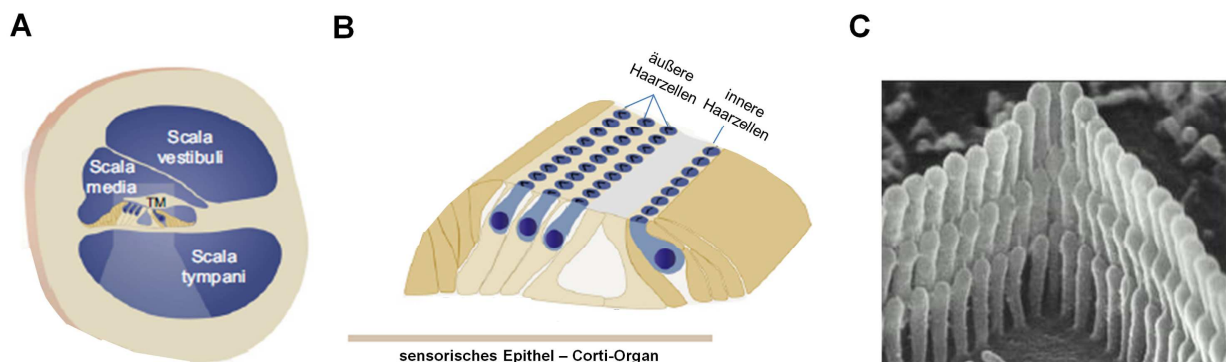
**Abbildung 1.1 Anatomie des menschlichen Ohrs**

Das Ohr besteht aus Außen-, Mittel- und Innenohr. Die Cochlea, die für das Hören verantwortlich ist, und die Bogengänge, die für das Gleichgewicht zuständig sind, bilden das Innenohr. [abgewandelt nach (Dror & Avraham, 2010)]

### 1.1.2 Struktur und Funktionsweise des Corti-Organ

Das Corti-Organ beinhaltet das sensorische Epithel, welches der Basiliarmembran aufliegt. Es enthält spezialisierte Sinneszellen, die sogenannten Haarzellen. Die äußeren Haarzellen sind in drei Reihen und die inneren Haarzellen in einer Reihe angeordnet (Abbildung 1.2B). An der Spitze jeder Haarzelle befinden sich stufenartig angeordnete Stereozilien (Abbildung 1.2C), die an ihren apikalen Enden über sogenannte *tip links* miteinander verbunden sind. Die Stereozilien inserieren in die stark kaliumhaltige Endolymphe der *Scala media*, die das Corti-Organ umgibt. Apikal liegt den Stereozilien eine extrazelluläre Struktur auf, die sogenannte Tektorialmembran. Zwei weitere Kompartimente, die *Scala vestibuli* und die *Scala tympani*, sind mit Perilymphe, einer stark natriumhaltigen Flüssigkeit, gefüllt (Abbildung 1.2A).

Die durch Schallwellen ausgelösten mechanischen Vibrationen werden über die Gehörknöchelchen an die Cochlea weitergeleitet und auf die flüssigkeitsgefüllten Kompartimente übertragen. Diese mechanische Stimulation bewirkt eine Verschiebung der Basilarmembran relativ zur Tektorialmembran und als Folge dessen kommt es zu einer Deflektion der Stereozilien. Vermittelt durch die *tip links* werden mechanosensitive Ionenkanäle an den apikalen Enden der Stereozilien geöffnet. Der daraufhin einsetzende Einstrom von Kalium- und Calciumionen aus der Endolymphe löst eine Depolarisierung der einzelnen Haarzellen aus. Am basalen Ende der Haarzelle kommt es an spezialisierten Synapsen, den sogenannten *Ribbon*-Synapsen, zur Freisetzung von Neurotransmittern. Afferente Neuronen leiten das elektrische Signal über die Spiralganglien und den Hörnerv an das Zentralnervensystem weiter. Im Gehirn werden die Signale dann vom auditorischen Cortex in Bezug auf die Intensität, die Frequenz und den Zeitverlauf analysiert.



**Abbildung 1.2 Funktionelle Komponenten des auditorischen Systems**

(A) Im Cochleaquerschnitt ist die Anordnung von drei flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten zu erkennen. Die *Scala media* ist mit Endolymphe gefüllt, wohingegen die *Scala vestibuli* und die *Scala tympani* mit Perilymphe gefüllt sind. Die Tektorialmembran (TM) liegt über dem Corti-Organ. (B) Das Corti-Organ bildet das sensorische Epithel. Die äußeren Haarzellen sind in drei Reihen, die inneren Haarzellen in einer Reihe angeordnet. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme der stufenartigen Anordnung von Stereozilien einer äußeren Haarzelle. (A) und (B) abgewandelt nach (Dror & Avraham, 2010). (C) aus (Alberts, 2002).

## 1.2 Kongenitale Hörstörungen

Mit einer Prävalenz von 1 bis 2 auf 1000 Neugeborene ist eine hochgradige Hörstörung beim Menschen die häufigste Erkrankung der Sinnesorgane. Es wird zwischen Schallleitungsschwerhörigkeit (*conductive hearing impairment*) und Schallempfindungsschwerhörigkeit (*sensorineural hearing impairment*) unterschieden. Bei der Schallleitungsschwerhörigkeit handelt es sich um Defekte des Außen- und/oder Mittelohrs, wohingegen Defekte der Cochlea bis hin zum auditorischen Kortex zur Schallempfindungsschwerhörigkeit führen. Die Mehrheit prälingualer nicht-syndromaler Taubheitsfälle ist auf Störungen der Schallempfindung zurückzuführen.

Kongenitale Taubheit kann sowohl genetische als auch umweltbedingte Ursachen haben. Zu den umweltbedingten Faktoren zählen z.B. maternale Infektionen mit dem Cytomegalievirus, Toxoplasmose oder Röteln. In Industrieländern liegt jedoch bei mindestens 50-60% der Fälle frühkindlicher Hörstörung eine genetische Ursache vor (Morton & Nance, 2006).

Bei erblich bedingten Hörstörungen wird zwischen syndromalen und nicht-syndromalen Formen unterschieden. Bei syndromalen Formen tritt die Schwerhörigkeit zusammen mit Anomalien oder Symptomen anderer Organsysteme auf. Liegen keine weiteren Symptome vor, spricht man von einer nicht-syndromalen Hörstörung.

### 1.2.1 Nicht-syndromale Hörstörung

Von den genetisch bedingten Hörstörungen können circa 70% als nicht-syndromal klassifiziert werden. In Abhängigkeit des Vererbungsmodus wurde eine Nomenklatur für Taubheits-Loci eingeführt. Mit 80-85% sind die autosomal-rezessiv vererbten Formen nicht-syndromaler Taubheit die häufigsten und werden als *DFNB*-Loci bezeichnet. Autosomal-dominante Erbgänge werden mit *DFNA* und Formen mit X-chromosomaler Vererbung mit *DFNX* klassifiziert (Petit *et al.*, 2001; Van Camp, 2011).

Bisher sind mehr als 70 *DFNB*-Loci bekannt, wobei bislang für circa die Hälfte dieser Loci die ursächliche Genmutation identifiziert werden konnte. Eine regelmäßig aktualisierte Übersicht über Taubheits-Loci und bereits identifizierte Gene wird auf der *Hereditary Hearing Loss Homepage* ([www.hereditaryhearingloss.org](http://www.hereditaryhearingloss.org)) veröffentlicht.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der *DFNB70*-Locus untersucht, dem eine autosomal-rezessive Form nicht-syndromaler Taubheit zugrunde liegt.

### 1.2.2 Heterogenität der nicht-syndromalen Hörstörung

Die Komplexität des auditorischen Systems spiegelt sich auch in der Heterogenität der Gene wider, die im Zusammenhang mit erblichen Taubheitsformen identifiziert wurden. Mutationen wurden z.B. in Transkriptionsfaktoren wie *POU3F4*, *POU4F3* und *ESRRB*, die die Entwicklung des Innenohrs steuern (de Kok *et al.*, 1995; Vahava *et al.*, 1998; Collin *et al.*, 2008), identifiziert. Die Genregulation durch microRNAs ist ebenfalls essentiell für die Funktion des Innenohrs. Eine Mutation in der microRNA-96 führt z.B. zu einer progressiven

Form von dominanter Hörstörung (Mencia *et al.*, 2009). Zudem sind viele Gene, die für unterschiedliche Transporter und Ionenkanäle kodieren, im Ohr stark exprimiert und sorgen für die Aufrechterhaltung der Ionenkonzentrationen in der Endo- und Perilymphe. Für die mechanische Stimulation der Haarzellen sind extrazelluläre Strukturen wie die Tektorial- und Basilarmembran unerlässlich. So wurden Mutationen in Genen, die für extrazelluläre Matrixproteine wie *TECTA*, *COL11A2* und *COCH* kodieren, bei verschiedenen Taubheitsformen identifiziert (Robertson *et al.*, 1998; Mustapha *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005).

Die Heterogenität der involvierten Gene macht es schwierig, ein ursächliches Gen durch einen direkten Kandidatengenansatz zu identifizieren. In der Mehrzahl der Fälle werden daher genomweite Kopplungsuntersuchungen und positionelle Klonierungsansätze zur Aufklärung der zugrundeliegenden Gendefekte angewendet.

### **1.3 Identifizierung eines Gendefekts durch genomweite Kopplungsanalyse und positionelle Klonierung**

#### **1.3.1 Genomweite Kopplungsanalyse**

Für die Identifikation krankheitsverursachender Mutationen, v.a. in konsanguinen Familien, hat sich die genomweite Kopplungsanalyse als erfolgreiche Vorgehensweise herausgestellt. Unter Kopplung versteht man die gemeinsame Vererbung von Genen oder DNA-Abschnitten auf einem Chromosom. Je weiter Chromosomenbereiche voneinander entfernt sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Trennung dieser Abschnitte im Rahmen meiotischer Rekombinationsereignisse. Nah zusammen liegende Abschnitte werden hingegen mit höherer Wahrscheinlichkeit gemeinsam, d.h. gekoppelt, vererbt (Altshuler *et al.*, 2008).

Wie der Stammbaum der in dieser Arbeit untersuchten Familie zeigt (siehe Kapitel 4), sind die Eltern Cousin bzw. Cousine ersten Grades. Diese Verwandtschaftsbeziehung wird sich in der Kopplungsanalyse zunutze gemacht. Es kann davon ausgegangen werden, dass beide Elternteile heterozygote Anlagenträger für die gleiche Mutation sind, welche sie von einem gemeinsamen Vorfahren (Großmutter oder Großvater) geerbt haben. Da es sich um einen autosomal-rezessiven Erbgang handelt, ist zu erwarten, dass die ursächliche Mutation bei betroffenen Individuen in einem homozygoten chromosomalen Bereich zu finden ist.

Für eine genomweite Kopplungsanalyse werden heutzutage über das gesamte Genom verteilte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in großer Stückzahl (10.000-250.000 SNPs) über chipbasierte *Arrays* (*GenomeScan*) genotypisiert. SNPs sind Polymorphismen einzelner Basen, die innerhalb der Bevölkerung sehr variabel sind. Sie werden als genetische Marker herangezogen, deren Abfolge zur Erstellung von Haplotypen genutzt wird. Die Rekonstruktion der Haplotypen ermöglicht die Identifizierung derjenigen Region, die mit dem Krankheitsgen assoziiert ist (Leykin *et al.*, 2005).

Die statistische Auswertung einer solchen Kopplungsanalyse wird mittels des Logarithmus der Wahrscheinlichkeiten (*logarithm of the odds, LOD*) angegeben. Der *LOD-Score* berechnet sich aus dem Verhältnis der Wahrscheinlichkeit, dass der Locus gekoppelt vorliegt zur Wahrscheinlichkeit, dass der Locus nicht gekoppelt ist (Altshuler *et al.*, 2008). Dieser Wert wird als Logarithmus zur Basis 10 angegeben. Eine Kopplung wird generell angenommen, wenn der *LOD-Score*  $\geq 3$  ist, d.h. eine vorliegende Kopplung 1000x wahrscheinlicher ist als keine Kopplung (Ott & Hoh, 2000).

### 1.3.2 Positionelle Klonierung

Unter positioneller Klonierung versteht man die systematische Suche nach einer pathogenen Veränderung in den Genen einer gekoppelten Kandidatengenregion. Um die über die Kopplungsanalyse mittels SNP-Typisierung identifizierte Kandidatengenregion zu bestätigen und ggf. möglichst genau einzugrenzen, wird diese Region oftmals zusätzlich durch Mikrosatellitenmarker analysiert. Mikrosatelliten sind kurze, sich wiederholende Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotid-Sequenzen, die in großer Zahl über das gesamte Genom verteilt sind. Sie eignen sich besonders gut als genetische Marker, da die Anzahl an Wiederholungen von Individuum zu Individuum stark variiert (Yue *et al.*, 2009). Sie sind im Vergleich zu den biallelischen SNPs informativer und eignen sich gut für die Feinkartierung.

Konnten auf diese Weise die genauen Grenzen der Kandidatengenregion bestimmt werden, werden im nächsten Schritt die Gene innerhalb des gekoppelten Abschnitts systematisch auf potentiell pathogene Mutationen untersucht (Strachan, 2005). Dazu werden im Allgemeinen die Sequenzen von proteinkodierenden Bereichen (Exons) und die zugehörigen Spleißstellen eines betroffenen Individuums mittels PCR und Sanger-Sequenzierung bestimmt und mit dem humanen Referenzgenom verglichen.

Gekoppelte Regionen können u.U. mehrere Hundert Gene beinhalten. Da die systematische Analyse aller Gene sehr zeitintensiv ist, kann es sinnvoll sein, in einem ersten Schritt gezielt positionelle Kandidatengene auszuwählen. Expressionsdatenbanken können dabei z.B. Aufschluss darüber geben, ob ein bestimmtes Gen in dem betroffenen Organ exprimiert ist. Aufgrund der funktionellen Heterogenität der bisher identifizierten „Taubheits-Gene“, war eine hypothesengestützte Vorauswahl von Kandidatengen des in dieser Arbeit untersuchten Taubheits-Locus nicht anwendbar. Die systematische Analyse aller Gene innerhalb des *DFNB70*-Locus führte jedoch zu der Identifizierung einer potentiell pathogenen *Missense*-Veränderung in dem Gen *PNPT1*.

## 1.4 *PNPT1* - Polynukleotid-Phosphorylase

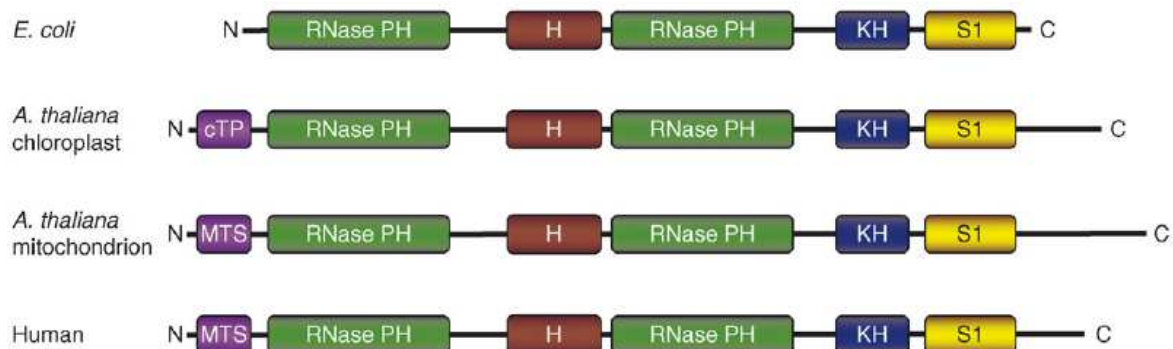
Das *PNPT1*-Gen kodiert für das Protein Polynukleotid-Phosphorylase, abgekürzt bezeichnet als PNPase. Die PNPase wurde erstmalig von der Arbeitsgruppe von Severo Ochoa beschrieben (Grunberg-Manago *et al.*, 1956). Ochoa identifizierte die PNPase als erstes Enzym, das in der Lage ist, RNA-Polynukleotide außerhalb einer Zelle, also *in vitro*, zu

synthetisieren. Für seine Studien über die Polymerase-Aktivität der PNPase erhielt Ochoa 1959 den Nobelpreis für Medizin/Physiologie.

Obwohl die PNPase seit ihrer Entdeckung intensiv studiert worden ist, sind bisher keine Beeinträchtigungen der Expression oder der Funktion der humanen PNPase in Verbindung mit einem klinischen Phänotyp beim Menschen beschrieben worden.

Bis heute sind über 800 wissenschaftliche Artikel über die Polynukleotid-Phosphorylase verzeichnet. Die enorme Menge an Studien hat zu der Entdeckung von vielfältigen zum Teil sehr kontrovers diskutierten Funktionen der PNPase geführt. Allen Studien gemein ist jedoch, dass die PNPase als ein RNA-prozessierendes Enzym bezeichnet werden kann (Chen *et al.*, 2007). Hervorzuheben ist der hohe evolutionäre Konservierungsgrad der PNPase. Sie ist, mit Ausnahme von der Hefe, Trypanosomen und Archaeobakterien (Leszczyniecka *et al.*, 2004; Kao & Read, 2005), im gesamten Tierreich sowie in Pflanzen und Bakterien anzutreffen (Leszczyniecka *et al.*, 2003; Sarkar & Fisher, 2006b). In allen Spezies besteht die PNPase aus fünf Domänen (Abbildung 1.3). Den N-Terminus bilden zwei über eine  $\alpha$ -helikale Struktur miteinander verbundene katalytische Domänen, die, aufgrund ihrer hohen Homologie zu der RNase PH aus *Escherichia coli* (*E. coli*), als RNase PH Domänen bezeichnet werden. Zwei konservierte RNA-bindende Domänen, KH und S1, sind am C-Terminus lokalisiert (Yehudai-Resheff *et al.*, 2003; Sarkar & Fisher, 2006b).

Die Säugetier-PNPase trägt zusätzlich ein N-terminales mitochondriales Zielpeptid aus 37 Aminosäuren (Rainey *et al.*, 2006), was eine Lokalisation der PNPase in den Mitochondrien zur Folge hat. Pflanzen hingegen haben sowohl eine PNPase mit einem mitochondrialen Zielpeptid, als auch eine PNPase, welche ein Zielpeptid trägt, das die subzelluläre Lokalisation in den Chloroplasten zur Folge hat. Beide Proteine werden von zwei verschiedenen Genen kodiert (Yehudai-Resheff *et al.*, 2003).



### 1.3 Domänenstruktur der Polynukleotid-Phosphorylase

Alle PNPasen bestehen aus zwei RNase PH Domänen, die über eine  $\alpha$ -Helix miteinander verbunden sind, und aus zwei RNA-bindenden Domänen, KH und S1. Pflanzen, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana* haben zwei Gene, die für die PNPase kodieren. Ein Gen kodiert ein mitochondriales Zielpeptid (MTS), das andere ein Zielpeptid das den Transport in Chloroplasten vermittelt (cTP). Die humane PNPase trägt ein mitochondriales Zielpeptid (MTS). Abbildung aus (Chen *et al.*, 2007).



### 1.4.1 Funktionen und Struktur der PNPase in Bakterien

Die bakterielle PNPase wurde hauptsächlich in *E. coli*, aber auch in *B. subtilis* und *S. antibioticus* untersucht. Die PNPase katalysiert sowohl die RNA-Degradation durch 3'-5'-Phosphorolyse als auch die umgekehrte Reaktion, die 5'-3'-Polymerisierung von RNA (Donovan & Kushner, 1986; Mohanty & Kushner, 2000). *In vivo* fungiert die *E. coli* PNPase hauptsächlich als 3'-5'-Exoribonuklease, wobei sie unter Verwendung von Phosphat die Phosphorolyse von RNA katalysiert. Als Spaltungsprodukte entstehen dabei Nukleosiddiphosphate (Sarkar & Fisher, 2006b).

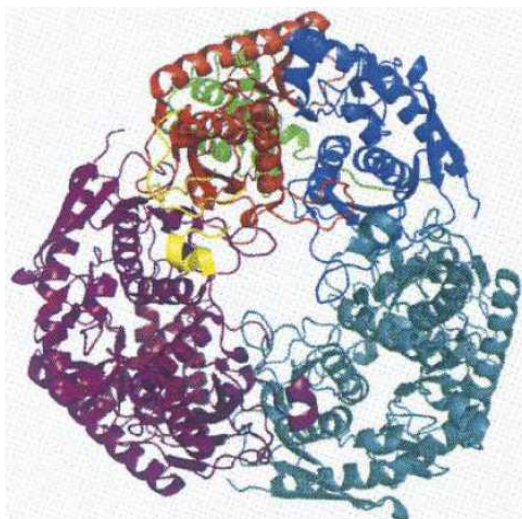
Die *E. coli* PNPase kann mit dem Degradosom oder mit der RNA Helikase B assoziiert sein, oder aber auch unabhängig von weiteren Proteinkomponenten vorliegen.

Das Degradosom ist ein Multiproteinkomplex der die wesentliche RNA-Degradationsmaschinerie in *E. coli* darstellt (Carpousis *et al.*, 1994). Die Hauptkomponenten des Degradosoms bilden die RNase E, die RNA Helikase B, die Enolase und die PNPase (Miczak *et al.*, 1996). Die kooperative RNA-Degradation wird dabei durch die Auflockerung von RNA-Sekundärstrukturen durch die RNA Helikase B, durch die Poly-A-Nuklease- und Endonukleaseaktivität der RNase E sowie durch die 3'-5'-Exoribonukleaseaktivität der PNPase gewährleistet.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass ein Komplex bestehend aus der PNPase und der RNA Helikase B, jedoch ohne RNase E, in der Lage ist, sowohl einzel- als auch doppelsträngige RNA *in vitro* und *in vivo* zu degradieren (Liou *et al.*, 2002; Lin & Lin-Chao, 2005).

Eine weitere Funktion der PNPase besteht in dem Schutz der Bakterienzelle vor oxidativem Stress. Unabhängig von weiteren Proteinkomponenten bindet die PNPase mit hoher Affinität an geschädigte RNA, in der Guanin-Nukleotide zu 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) oxidiert wurden (Hayakawa *et al.*, 2001). PNPase defiziente *E. coli*-Stämme, die oxidativem Stress, induziert durch Wasserstoffperoxid, ausgesetzt wurden, zeigen ein deutliches Wachstumsdefizit im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen. Weiterhin akkumuliert 8-oxoG-geschädigte RNA in PNPase defizienten Stämmen im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen deutlich stärker. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass eine weitere Funktion der PNPase *in vivo* im Abbau von oxidiertem RNA besteht, und dass sie auf diese Weise dazu beiträgt, die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen (Wu *et al.*, 2009).

Die Kristallstruktur der PNPase des Bakteriums *S. antibioticus* konnte erstmalig im Jahr 2000 durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden (Abbildung 1.4). Es zeigte sich, dass drei PNPase-Moleküle über ihre sechs RNase PH Domänen eine ringförmige Struktur mit einem zentralen Kanal bilden (Symmons *et al.*, 2000). Diese Homotrimerstruktur weist große Ähnlichkeit mit einem humanen RNA-Degradationskomplex, dem Exosom, auf (Liu *et al.*, 2006), was auf eine evolutionäre Verbindung zwischen beiden Komplexen schließen lässt (Lin-Chao *et al.*, 2007).



#### 1.4 Kristallstruktur der PNPase von *S. antibioticus*

Die PNPase bildet ein ringförmiges Trimer mit einem zentralen Kanal. Jedes Monomer ist in einer anderen Farbe dargestellt und in einem Monomer sind zusätzlich die einzelnen Domänen farblich markiert. Abbildung aus (Portnoy *et al.*, 2008).

Im Jahr 2008 konnte auch die Kristallstruktur der *E. coli* PNPase determiniert werden. Neben der Struktur der *E. coli* Wildtyp-PNPase, die mit der von *S. antibioticus* vergleichbar ist, konnte zusätzlich die Struktur einer artifizialen Mutante, der die RNA-bindenden Domänen KH und S1 fehlen ( $\Delta$ KH/S1), bestimmt werden (Shi *et al.*, 2008). Die  $\Delta$ KH/S1-Mutante war in ihrer Fähigkeit, RNA zu binden und zu degradieren, stark beeinträchtigt, wodurch die Bedeutung der beiden Domänen für die Bindung von RNA belegt werden konnte.

Neben der *in vivo* 3'-5'-Exoribonukleaseaktivität der *E. coli* PNPase, die als deren Hauptfunktion angesehen wird, konnten weitere *in vivo* Funktionen nachgewiesen werden. Für den Abbau von RNA in *E. coli* ist die Polyadenylierung von essentieller Bedeutung (Hajnsdorf *et al.*, 1995). Die poly(A)-Polymerase I (PAPI) von *E. coli* ist für die Polyadenylierung von 90-95% aller mRNA-Transkripte verantwortlich (Mohanty & Kushner, 1999). Bei PAPI defizienten *E. coli*-Stämmen konnte nachgewiesen werden, dass die PNPase für die Polyadenylierung der verbleibenden 5-10% verantwortlich ist und darüber hinaus auch heteropolymere Anhänge synthetisiert (Mohanty & Kushner, 2000).

Zusammenfassend belegen die Erkenntnisse über die Funktion der PNPase ihre vielseitige und bedeutende Rolle für den RNA-Metabolismus in *E. coli*.

### 1.4.2 Die PNPase in Säugetieren

#### 1.4.2.1 Primäre Erkenntnisse über die PNPase in Säugetieren

Das circa 54kb umfassende humane *PNPT1*-Gen besteht aus 28 Exons und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p16.1). Diese chromosomale Region ist aufgrund ihrer Anfälligkeit für Deletionen und Amplifikationen, die mit Krebserkrankungen wie dem B-Zell-Lymphom (Fukuhara *et al.*, 2006) und weiteren genetischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Kirschner *et al.*, 1999), relativ instabil.

Im Rahmen einer Suche nach Genen, die in ausdifferenzierten und somit durch irreversiblen Wachstumsstopp gekennzeichneten Zellen hochreguliert sind, wurde das humane *PNPT1*-Gen erstmalig kloniert (Leszczyniecka *et al.*, 2002). Weitere Studien postulierten, dass die humane PNPase (hPNPase) durch ihre RNA-degradierende Aktivität im Cytosol zur Zelldifferenzierung und Zellalterung beiträgt (Sarkar *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2005).

Die einzigen bisher bekannten Regulatoren der *PNPT1*-Transkription sind Typ-I-Interferone. Interferone sind Zytokine, die typischerweise von Zellen als Immunantwort auf virale Infektionen sezerniert werden. Die hPNPase wurde in diesem Zusammenhang als potentieller Mediator der Immunantwort beschrieben (Sarkar & Fisher, 2006b; a).

Wie die bakterielle PNPase bildet auch die hPNPase einen homotrimeren Komplex. Die Untersuchung einer *in vitro* generierten Mutante mit einer Punktmutation (D135G) an einer hochkonservierten Stelle in der N-terminalen RNase PH Domäne ergab, dass die Mutante nicht mehr in der Lage war, einen trimeren Komplex auszubilden (Portnoy *et al.*, 2008). Die N-terminale RNase PH Domäne scheint demnach für die Trimerbildung der hPNPase bedeutend zu sein.

#### 1.4.2.2 Subzelluläre Lokalisierung der Säugetier-PNPase

Die subzelluläre Lokalisierung der Säugetier-PNPase, die für die Bestimmung ihrer Funktion von essentieller Bedeutung ist, wurde in der Literatur zunächst kontrovers diskutiert. Exogen überexprimierte N-terminal markierte hPNPase ist im Cytosol lokalisiert (Leszczyniecka *et al.*, 2002). Aktuellere Studien ergaben jedoch, dass die N-terminale Markierung der PNPase zur Blockierung des mitochondrialen Zielpeptids führt. Als Folge dessen kann das mitochondriale Zielpeptid von der Zelle weder erkannt noch prozessiert werden und es kommt zu einer Fehllokalisierung der PNPase im Cytosol (Piwowarski *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006). Wie durch Immunfluoreszenz- und Zellfraktionierungsexperimente gezeigt werden konnte, ist hingegen sowohl C-terminal markierte als auch endogene Säugetier-PNPase in Mitochondrien lokalisiert (Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Auch wenn minimale Mengen an funktionell relevanter PNPase in anderen Zellkompartimenten nicht definitiv ausgeschlossen werden können, sind die unter 1.4.2.1 beschriebenen propagierten PNPase-Funktionen mit der primär mitochondrialen Lokalisierung kaum in Einklang zu bringen.

Das mitochondriale Genom ist in der Mitochondrienmatrix lokalisiert. Die bei der Transkription entstehenden polycistronischen Transkripte werden u.a. von der RNase P und von weiteren teilweise noch unidentifizierten RNasen prozessiert (Gagliardi *et al.*, 2004). Aufgrund der mitochondrialen Lokalisierung der PNPase wurde zunächst angenommen, dass die PNPase an der Prozessierung dieser mitochondrialen Transkripte beteiligt sei. Mithilfe von *protease-protection-assays* konnte die subzelluläre Lokalisierung jedoch genauer aufgeklärt werden. Die Ergebnisse belegten, dass die PNPase als peripheres

Membranprotein im Intermembranraum (IMS) von Mitochondrien und nicht, wie zunächst angenommen, in der Matrix lokalisiert ist (Chen *et al.*, 2006).

Nach bisherigen Erkenntnissen ist der IMS von Mitochondrien frei von RNAs (Chen *et al.*, 2007). Die Lokalisierung der Säugetier-PNPase im IMS wirft daher die zentrale Frage nach dem Substrat bzw. den Substraten der PNPase auf. Da aufgrund von fehlenden RNA-Substraten im IMS die *in vivo* Funktion der Säugetier-PNPase vermutlich nicht wie in Bakterien die 3'-5'-RNA-Degradation ist, kann davon ausgegangen werden, dass die PNPase im Verlauf der Evolution eine Funktionsänderung erfahren hat.

#### 1.4.2.3 Die Säugetier-PNPase erhält die mitochondriale Homöostase

Mithilfe von siRNA-*Knockdown*-Experimenten in kultivierten Hek293-Zellen wurde der Einfluss der PNPase auf die mitochondriale Homöostase untersucht. Kontroll-Hek293-Zellen zeigten ein typisches filamentöses mitochondriales Netzwerk, wohingegen das mitochondriale Netzwerk in PNPase-*Knockdown*-Zellen eine deutliche Fragmentierung aufwies. Die Autoren schlossen aus diesem Befund, dass der PNPase-*Knockdown* zu einer Verschiebung der Balance zwischen Teilung und Verschmelzung der Mitochondrien zu Gunsten der Teilung erfolgt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass das mitochondriale Membranpotenzial in PNPase-*Knockdown*-Zellen reduziert und dass die enzymatische Aktivität der Komplexe der Atmungskette um 30-40% verringert ist (Chen *et al.*, 2006).

Diese Daten belegen somit, dass die PNPase über einen noch unbekanntem Mechanismus die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase reguliert.

#### 1.4.2.4 Die PNPase vermittelt den Import von kleinen RNAs in Mitochondrien

Das mitochondriale Genom selbst kodiert nur für einen kleineren Teil der Proteine, die in Mitochondrien zu finden sind. Kernkodierte Proteine müssen in großem Umfang in Mitochondrien importiert werden. Dieser Protein-Import-Mechanismus ist sehr gut charakterisiert (Chacinska *et al.*, 2009). Im Gegensatz zum Protein-Import ist über den mitochondrialen RNA-Import-Mechanismus, der für die Replikation, die Transkription und die Translation des mitochondrialen Genoms wichtig ist, bisher nur wenig bekannt. In Säugetier-Mitochondrien konnten sowohl kernkodierte tRNAs, als auch die 5S rRNA und microRNAs nachgewiesen werden (Rubio *et al.*, 2008; Alfonzo & Soll, 2009; Duchene *et al.*, 2009; Kren *et al.*, 2009).

Die Transkription des mitochondrialen Genoms erfolgt in Form von langen polycistronischen Transkripten (Bonawitz *et al.*, 2006). Gene für Komponenten der Elektronentransportkette sind dabei häufig durch tRNA-Gene getrennt (Doersen *et al.*, 1985). Für die Prozessierung dieser polycistronischen Transkripte sind zwei Proteinkomplexe notwendig, die RNase MRP und die RNase P. Beide Komplexe beinhalten auch eine kernkodierte RNA-Komponente, die RNase MRP RNA bzw. die RNase P RNA, die folglich in Mitochondrien importiert werden müssen (Chang & Clayton, 1987).

Um die *in vivo* Funktion der PNPase zu studieren, haben Wang *et al.* eine konditionale *Pnpt1-Knockout-Maus* (*Pnpt1<sup>neo-flox</sup>*) generiert. Der vollständige *Knockout* von *Pnpt1* ist embryonal letal, was auf die essentielle Funktion der PNPase hindeutet (Wang *et al.*, 2010). Es konnte jedoch ein leberspezifischer *Knockout* generiert werden, der Nachkommen in der erwarteten Frequenz lieferte.

Diese *Pnpt1-Knockout-Leberzellen* (HepKO) zeigten, wie bereits zuvor in siRNA-*Knockdown*-Experimenten beschrieben, eine Fragmentierung der Mitochondrien. Des Weiteren war die oxidative Phosphorylierung um den Faktor 1,5 bis 2,0 verringert. Als Ursache für die verringerte oxidative Phosphorylierung konnten Wang *et al.* sowohl in siRNA-*Knockdown*-Experimenten als auch in HepKO-Zellen feststellen, dass die Prozessierung der polycistronischen Transkripte gestört ist. Da deren Prozessierung u.a. auf der Funktion der RNase P beruht, wurde in HepKO-Mitochondrien das Vorhandensein der RNA-Komponente der RNase P analysiert. Es zeigte sich, dass die Menge an RNase P RNA in HepKO-Mitochondrien um 75% reduziert war. Auch konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die RNase P RNA als auch die RNase MRP RNA spezifisch an die PNPase binden (Wang *et al.*, 2010).

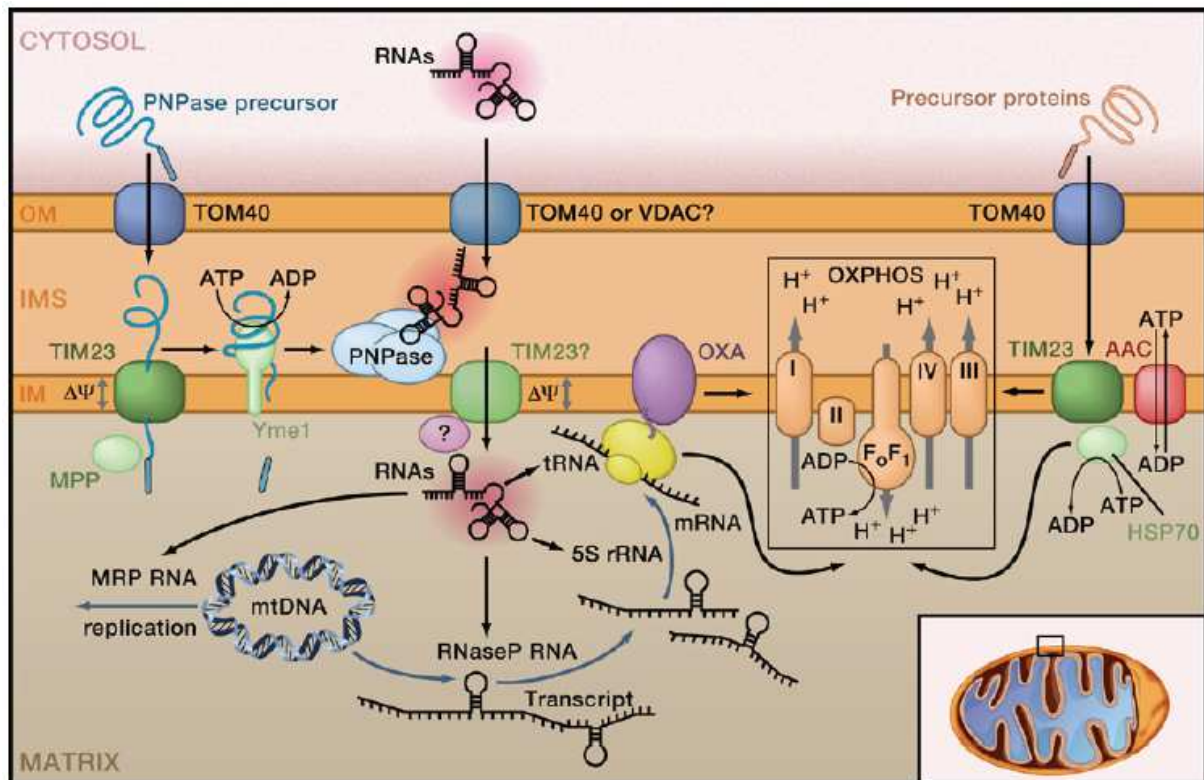
Schlussfolgernd aus diesen Erkenntnissen stellten die Autoren die Hypothese auf, dass die PNPase den Import der RNase P RNA und der RNase MRP RNA in die Mitochondrien vermittelt. Über RNA-Import-assays wurde der PNPase-abhängige RNA-Import untersucht. Radioaktiv markierte RNase P RNA wurde von Wildtyp-Mitochondrien importiert, nicht jedoch von HepKO-Mitochondrien. Neben der RNase P RNA konnten auch die RNase MRP RNA und die 5S rRNA als Importssubstrate der PNPase identifiziert werden. Diese Ergebnisse konnten auch im Hefemodell verifiziert werden. Hefestämme, die humane oder murine PNPase exogen exprimieren, zeigten ebenfalls einen Import der drei genannten RNAs.

Des Weiteren konnte das Import Signal sowohl der RNase P RNA als auch der RNase MRP RNA in Form einer RNA-Haarnadelstruktur bestehend aus 20 Nukleotiden identifiziert werden. GAPDH-RNA wird nicht von der PNPase importiert. Versieht man diese RNA jedoch mit einer der beiden identifizierten RNA-Haarnadelstrukturen, findet auch hier ein erfolgreicher Import in die Mitochondrien statt.

Wang *et al.* konnten mit der PNPase somit erstmalig ein Protein identifizieren, das den Import von spezifischen RNAs in die mitochondriale Matrix bei Mammaliern vermittelt. Auch konnten die Autoren nachweisen, dass der PNPase-abhängige Import sowohl für die Prozessierung mitochondrialer polycistronischer Transkripte als auch für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase von essentieller Bedeutung ist. Unabhängig konnten diese Erkenntnisse teilweise von Mercer *et al.* bestätigt werden, die im Rahmen einer mitochondrialen Transkriptomanalyse die RNase P RNA, die RNase MRP

RNA und die 5S rRNA in der mitochondrialen Matrix nachweisen konnten (Mercer *et al.*, 2011).

Von Endo *et al.* wurde basierend auf den bisherigen Erkenntnissen über die Säugetier-PNPase ein Modell für den PNPase-abhängigen Import von RNA in die mitochondriale Matrix erstellt (Abbildung 1.5).



### 1.5 Die Säugetier-PNPase vermittelt den Import von RNAs in die mitochondriale Matrix

Vorläufer der PNPase werden über einen Translocase-Komplex (TOM40) in der äußeren Mitochondrienmembran (OM) importiert. Vermittelt durch einen Translocase-Komplex (TIM23) in der inneren Mitochondrienmembran (IM) und einer Protease in der Matrix (MPP) wird das mitochondriale Zielpeptid der PNPase prozessiert (Rainey *et al.*, 2006). Assoziiert mit der inneren Mitochondrienmembran assembliert die PNPase im Intermembranraum (IMS) zu einem Homotrimer und vermittelt den Import von RNAs in die mitochondriale Matrix. Möglicherweise notwendige RNA-Importfaktoren in der äußeren Mitochondrienmembran sind bisher nicht bekannt. In der Matrix prozessieren RNase P und RNase MRP assoziiert mit ihren RNA-Komponenten die polycistronischen Transkripte. Die Translationsprodukte werden assembliert und bilden die Komplexe der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Abbildung aus (Endo *et al.*, 2010).

#### 1.4.2.5 Degradation von microRNAs durch die PNPase

Eine potentielle weitere Funktion der PNPase wurde von Das *et al.* beschrieben, wobei die Autoren zeigten, dass die hPNPase selektiv die microRNA-221 degradiert. Mittels einer microRNA *microarray* Analyse wurde die Expression von microRNAs in Melanomzellen, die entweder einen Leervektor oder die hPNPase exprimieren, untersucht. Die microRNA-221 war in hPNPase überexprimierenden Melanomzellen im Vergleich zu Kontrollzellen stark herunterreguliert. Die Autoren schlossen daraus, dass die PNPase für die Degradation der microRNA-221 verantwortlich ist, und konnten dieses Ergebnis ebenfalls in *in vitro* Degradationsversuchen nachweisen (Das *et al.*, 2009), wobei keine Stellung dazu bezogen

wurde, wie die neu postulierte Funktion mit der mitochondrialen Lokalisation des Proteins in Einklang zu bringen ist.

## 1.5 Hörstörung bedingt durch mitochondriale Dysfunktion

Neben Mutationen in kernkodierten Genen wurden auch mitochondriale Mutationen beschrieben, die sowohl zu syndromaler als auch zu nicht-syndromaler Taubheit führen können.

Das humane mitochondriale Genom kodiert für 13 Proteine, die Bestandteil der Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung sind, sowie für zwei rRNAs und 22 tRNAs, die essentiell für die mitochondriale Proteinsynthese sind (Anderson *et al.*, 1981). Zusammen mit circa 60 kernkodierten Proteinen bilden die 13 mitochondrial kodierten Gene die fünf Komplexe der oxidativen Phosphorylierung, die durch ATP-Synthese die Energieversorgung der Zelle gewährleisten (Wallace, 1999).

Zu den bekannten Syndromen, die Taubheit als eines von mehreren Symptomen zeigen, wurde beispielsweise das MELAS-Syndrom (Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktat-Azidose und schlaganfallähnlichen Episoden) beschrieben, das durch Mutationen in der mitochondrialen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> verursacht wird (Goto *et al.*, 1990). Weitere Beispiele sind das MERRF-Syndrom (*myoclonic epilepsy with ragged-red fiber disease*) ausgelöst durch Mutationen in den mitochondrialen tRNAs tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> oder tRNA<sup>Lys</sup> (Shoffner *et al.*, 1990) und das MIDD-Syndrom (*maternally inherited diabetes mellitus and deafness*), in dem Mutationen entweder in der tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> oder in den tRNAs tRNA<sup>Lys</sup> und tRNA<sup>Glu</sup> identifiziert werden konnten (Hao *et al.*, 1995; Rigoli *et al.*, 2001).

Nicht-syndromale Formen mitochondrialer Hörstörungen können sowohl durch Mutationen in der mitochondrialen 12S rRNA, wobei die A1555G-Mutation die häufigste Ursache darstellt (Estivill *et al.*, 1998), als auch durch Mutationen in der tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> bedingt sein (Sue *et al.*, 1999; Hutchin *et al.*, 2000).

Obwohl noch nicht vollständig geklärt ist, wie die mitochondrialen Mutationen zu Hörstörungen führen, scheinen eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Proteinbiosynthese, der oxidativen Phosphorylierung und somit der Energieversorgung die hauptsächlichen pathogenen Faktoren zu sein (McKenzie *et al.*, 2004).

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Chemikalien, organische Substanzen und Lösungsmittel wurden von den folgenden Firmen bezogen:

**Tabelle 2.1: Auflistung verwendeter Chemikalien und deren Lieferanten**

Hersteller / Lieferant	Chemikalien	Katalognummer	Firmensitz
Applichem	Ethanol absolut zur Analyse	#A1613	Darmstadt
	Methanol absolut zur Analyse	#A0688	
	Tween® 20 für die Molekularbiologie	#A4974	
	Ethidiumbromid 10mg/ml	#A1152	
	Magermilchpulver	#A0830	
	Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Molekularbiologie	#A3006	
	Glycerin 87%	#A0970	
	EDTA	#A1104	
	Formamid	#A2156	
	PBS 10x, Pulver	#A0965	
	Natriumchlorid für die Molekularbiologie	#A2942	
	Chloroform	#A3691	
	2-Propanol	#A3465	
	Xylencyanol	#A4976	
	Bromphenolblau	#A2331	
	Kaliumchlorid	#A2939	
Glukose	#A3730		
β-Mercaptoethanol	#A4338		
A. Hartenstein Laborbedarf	<i>Tissue-Tek - O.C.T.™ Compound</i>	#TTEK	Würzburg
Sigma-Aldrich	Triton® X-100	#T8787	Taufkirchen
	Wasserstoffperoxid-Lösung 30%	#H3410	
	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	#32670	
	L-Arabinose	#A3256	
	Sucrose	#84097	
	<i>Low melting type VII agarose</i>	#A4018	
	Agarose	#A9539	
	Kanamycin	#K1876	



Hersteller / Lieferant	Chemikalien	Katalognummer	Firmensitz
Sigma-Aldrich	Ampicillin	#A9393	Taufkirchen
	Penicillin-Streptomycin - <i>Solution stabilized</i>	#P4333	
	Amphotericin B Lösung	#A2942	
	Magnesiumsulfat	#230391	
Invitrogen	TRIZOL® Reagent	#15596-026	Karlsruhe
	<i>Fetal Bovine Serum (Heat Inactivated) Origin: EU Approved (South American)</i>	#10500-064	
	<i>Horse Serum, heat-Inactivated</i>	#26050-070	
	0,05% Trypsin-EDTA	#25300	
	HBSS- <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>	#14065	
	OPTI-MEM® I	#31985	
	Hepes 1M	#15630	
	<i>NuPAGE Transfer buffer (20x)</i>	#NP0006-1	
	<i>NuPAGE MOPS SDS Running buffer (20x)</i>	#NP0001	
	<i>NuPAGE Antioxidant</i>	#NP0005	
	<i>NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 10 well</i>	#NP0321BOX	
	<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)</i>	#NP0008	
	Texas Red®-X-phalloidin	#T7471	
Merck	Magnesiumchlorid	#TA914333116	Darmstadt
Lonza	DMEM 4.5g/L Glucose w/ L-Glutamine	#BE12-604F	Basel, Schweiz
New England Biolabs	Restriktionsenzyme	diverse	Frankfurt a. M.
	Deoxynucleotide Solution Set	#N0446S	
	2log ladder	#N3200S	
Roche	FuGENE® HD <i>Transfection Reagent</i>	#04709691001	Mannheim
	T4 Ligase	#10481220001	
Qiagen	RNAlater RNA <i>Stabilization Reagent</i>	#76104	Hilden
Ambion	RNaseZap® <i>Wipes</i>	#AM9786	Darmstadt
BD biosciences	Bacto™ Trypton	#211705	Heidelberg
	Bacto™ Hefe-Extrakt	#212750	
	Bacto™ Agar, <i>granulated</i>	#214530	
Thermo Scientific	Objekträger Superfrost® Plus	#J1800AMNZ	Braunschweig

**Verbrauchsmaterialien** wie Reaktionsgefäße, serologische Pipetten, Zellkulturschalen und weitere Kunststoffeinwegwaren wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

## 2.2 Standardpuffer und -lösungen

Für das Herstellen von Puffern und anderen Lösungen wurde autoklaviertes Millipore®-H<sub>2</sub>O verwendet. Bei erforderlicher pH-Wert Einstellung erfolgte dies mit NaOH bzw. HCl. Für Reaktionen in kleinen Volumina (bzw. PCR) wurde *pcr-grade water* von Sigma-Aldrich benutzt.

### TE-Puffer

5ml 1M Tris-HCl

1ml 0,5M EDTA

ad 500ml H<sub>2</sub>O

Der TE-Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8 eingestellt, steril filtriert und zum Lösen von DNA in Stammlösungen verwendet.

### TE<sup>-4</sup>-Puffer

1ml 1M Tris-HCl

20µl 0,5M EDTA

ad 100ml H<sub>2</sub>O

Der TE<sup>-4</sup>-Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8 eingestellt, steril filtriert und zum Lösen von lyophilisierten Primern verwendet.

### 10x PBS-Lösung (*phosphate buffered saline*)

PBS 10x Pulver (#A0965)

Applichem

95,50g in einem Liter H<sub>2</sub>O lösen

### 1x PBS-Lösung (*phosphate buffered saline*)

100ml 10x PBS-Lösung

ad 1000ml H<sub>2</sub>O

## 2.3 Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs)

Die dNTPs (ATP, CTP, GTP und TTP) wurden von der Firma *New England Biolabs* (NEB) bezogen. Die Stammlösungen mit einer Konzentration von jeweils 100mM je dNTP wurden mit TE<sup>-4</sup>-Puffer auf eine 10mM Arbeitslösung verdünnt und bei 4°C gelagert.

## 2.4 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Primer wurden bei der Firma Metabion (Martinsried) in lyophilisiertem Zustand bestellt. Mit TE<sup>-4</sup>-Puffer wurde die Konzentration der Primer-Stammlösungen auf 100pmol/µl eingestellt. Aus den Stammlösungen wurden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10pmol/µl

hergestellt. Arbeitslösungen wurden bei 4°C gelagert, Stammlösungen bei -20°C. Primer für *in vitro* Mutagenesen und für Gateway-Klonierungs-PCRs wurden mittel HPLC aufgereinigt. Alle für diese Arbeit verwendeten Primer sind tabellarisch im Anhang (siehe Kapitel 12.2) aufgeführt.

## 2.5 Sonstige Nukleinsäuren

Als Matrize für die Klonierung von humanen Genen wurde *Human-Universal-cDNA* verwendet.

*Universal cDNA Oligo-dT Primed* (#C4234565) BioChain (USA)

## 2.6 Enzyme

### 2.6.1 Polymerasen

<i>REDTaq™ ReadyMix™</i>	(#R2523)	0,06U/μl	Sigma-Aldrich
<i>AccuTaq™ LA DNA Polymerase</i>	(#D8045)	5,00U/μl	Sigma-Aldrich
<i>High Fidelity Polymerase</i>	(#04738250001)	5,00U/μl	Roche
<i>Taq-Polymerase</i>	(#201223)	5,00U/μl	Qiagen

Die Polymerasen wurden jeweils mit entsprechenden Puffern und ggf. weiteren Reagenzien wie dNTPs und MgCl<sub>2</sub> geliefert.

### 2.6.2 Restriktionsenzyme

<i>Hpy188III</i>	(#R0622S)	5,00U/μl	NEB
<i>XbaI</i>	(#R0145S)	20,00U/μl	NEB
<i>ExonucleaseI</i>	(#M0293S)	20,00U/μl	NEB

Restriktionsenzyme wurden bis auf wenige Ausnahmen von NEB bezogen. Exemplarisch sind einige der häufig verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt. Das Enzym *Hpy188III* wurde beispielsweise für den Restriktionsverdau zum Nachweis der E475G-Mutation in *PNPT1* eingesetzt.

### 2.6.3 Weitere Enzyme

<i>DNase I, RNase-free</i>	(#EN0521)	1,00U/μl	Fermentas
<i>Gateway® BP Clonase® II</i>	(#11789-020)		Invitrogen
<i>Gateway® LR Clonase® II</i>	(#11791-020)		Invitrogen
Thermosensitive Alkaline Phosphatase	(#M9910)	1MBU/μl	Promega

## 2.7 Substanzen für die Agarose-Gel-Elektrophorese

### 1x Tris Acetat-EDTA Puffer (TAE)

500ml TAE (10x)	(#T4038)		Sigma Aldrich
ad 5l H <sub>2</sub> O			

Agarose *for routine use* (#A9539) Sigma-Aldrich

### Gelladepuffer (10x)

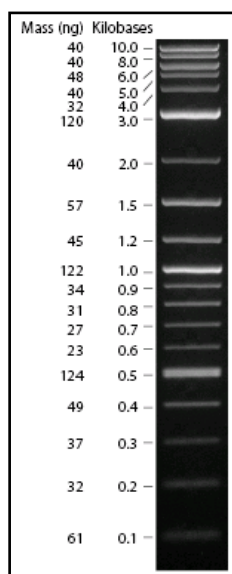
10ml Formamid (#A2156) Applichem  
 10mg Xylencyanol (#A4976) Applichem  
 10mg Bromophenolblau (#A2331) Applichem  
 0,5M EDTA (#A1104) Applichem

### Ethidiumbromidlösung

10mg/ml Lagerung bei 4°C (#A1152) Applichem  
 circa 6µl auf 300ml Agarosegel

### DNA-Längenstandard (0.1–10.0 kb)

2-Log DNA *ladder* (#N3200S) NEB  
 50µl 2-Log DNA *ladder* [1000µg/ml]  
 850µl TAE (1x)  
 100µl Gelladepuffer (10x)



**Abbildung 2.1 DNA-Längenstandard**

Die angegebenen DNA-Mengen gelten bei Einsatz von 20µl des Markers. Visualisierung durch Ethidiumbromid auf einem 2%igen Agarose-Gel.

## 2.8 Reagenzien und Zubehör für die *Real-time PCR*

Alle hier aufgeführten Produkte wurden von *Applied biosystems* (Darmstadt) bezogen:

*TaqMan*® *MicroRNA Reverse Transcription Kit* (#PN4366596)  
*TaqMan*® *Universal PCR Master Mix, No AmpErase*® (#4364341)  
*Optical Adhesive Covers* (#4360954)  
*Adhesive Seal Applicator Kit* (#4333183)  
*MicroAmp*® *Fast Optical 96-well Reaction Plate* (#4346906)

**2.8.1 Taqman Assays**

<i>TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-221</i>	(#4427975, Assay ID 000524)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-184</i>	(#4427975, Assay ID 000485)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay mmu-miR-96</i>	(#4427975, Assay ID 000186)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay snoRNA202</i>	(#4427975, Assay ID 001232)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-183</i>	(#4427975, Assay ID 002269)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay mmu-miR182</i>	(#4427975, Assay ID 002599)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay mmu-miR763</i>	(#4427975, Assay ID 002033)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay mmu-miR202</i>	(#4427975, Assay ID 001195)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay mmu-miR763</i>	(#4427975, Assay ID 002033)
<i>TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR21</i>	(#4427975, Assay ID 000397)
<i>TaqMan® Gene Expression Assay ND3</i>	(#4331182, Assay ID Mm04225292_g1)

**2.9 Medien zur Kultivierung und Selektionierung von Bakterien**SOC-Medium

2,0% Bacto™ Trypton	(#211705)	BD biosciences
0,5% Bacto™ Hefe-Extrakt	(#212750)	BD biosciences
10mM NaCl	(#A2942)	Applichem
2,5mMKCl	(#A2939)	Applichem
10mM MgCl <sub>2</sub>	(#TA914333116)	Merck
10mM MgSO <sub>4</sub>	(#230391)	Sigma-Aldrich
20mM Glukose	(#3730)	Applichem

LB-Medium

1,0% Bacto™ Trypton	(#211705)	BD biosciences
0,5% Bacto™ Hefe-Extrakt	(#212750)	BD biosciences
1,0% NaCl	(#A2942)	Applichem

in H<sub>2</sub>O

20 min bei 121°C autoklavieren

Agar-Platten

1,0%	Bacto™ Trypton	(#211705)	BD biosciences
0,5%	Bacto™ Hefe-Extrakt	(#212750)	BD biosciences
1,0%	NaCl	(#A2942)	Applichem
1,5%	Agar	(#214530)	BD biosciences

in H<sub>2</sub>O

20 min bei 121°C autoklavieren. Nach Abkühlung auf 55°C wurde das je nach Versuchsansatz erforderliche Antibiotikum hinzugegeben und das Medium anschließend in 10cm-Kulturschalen gegossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Ampicillin-Stammlösung (100mg/ml)

100mg	Ampicillin	(#A9393)	Sigma-Aldrich
-------	------------	----------	---------------

ad 1ml H<sub>2</sub>O

steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

Ampicillin-Arbeitslösung

1µl Ampicillin-Stammlösung auf 1ml LB-Medium (entspricht 100µg/ml)

Kanamycin-Stammlösung (100mg/ml)

100mg	Kanamycin	(#K1876)	Sigma-Aldrich
-------	-----------	----------	---------------

ad 1ml H<sub>2</sub>O

steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

Kanamycin-Arbeitslösung

3µl Kanamycin-Stammlösung auf 1ml LB-Medium (entspricht ~333µg/ml)

Expressionsinduktion durch L-Arabinose

Sterile 0,0002% L-Arabinose (#A3256, Sigma-Aldrich) wurde nach dem Autoklavieren zu LB-Medium bzw. zu LB-Agar-Platten hinzugefügt.

## 2.10 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: Bakterienstamm für die Vermehrung von Plasmiden

Bakterium	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	OneShot® TOP 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

Tabelle 2.3: Bakterienstamm für die Vermehrung von Plasmiden nach einer *in vitro* Mutagenese

Bakterium	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	XL10- Gold® Ultrakomp etent	TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Agilent

Tabelle 2.4: Δpnp Stamm aus der KEIO Collection

Bakterium	Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i>	Stamm Nr.: JW5851 Stamm Name: Δpnp	Dieser Stamm basiert auf dem Genotyp des <i>E. coli</i> Stamms BW25113. Das bakterielle pnp Gen ist in diesem Stamm jedoch deletiert und durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt.	KEIO collection / National BioResource Project (NIG, Japan): <i>E. coli</i>

Tabelle 2.5: *E. coli* K12 Wildtyp-Stamm BW25113

Bakterium	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	BW25113	Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), lambda <sup>-</sup> , rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	Prof. Dr. Schnetz, Köln

## 2.11 Klonierungsvektoren

Zum Klonieren von kodierenden Sequenzen wurden zwei unterschiedliche Technologien verwendet. Zum einen die TOPO-TA-Klonierung (Invitrogen) basierend auf einzelsträngigen A-Überhängen am PCR-Produkt und T-Überhängen an den Vektorenden. Zum anderen die Gateway Technologie (Invitrogen) in der PCR-Produkte mit spezifischen Rekombinationsstellen in einer enzymatischen Reaktion mit entsprechenden Gateway-Vektoren zu einem neuen Konstrukt rekombiniert werden können. Die Vektorkarten sind im Anhang (siehe Kapitel 12.1) aufgeführt.

Tabelle 2.6 TOPO-TA-Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Größe	Selektion	Quelle
pcDNA3.1 V5/His-TOPO	Expressionsvektor zur Expression von rekombinanten Proteinen in Säugetierzelllinien	5523 bp	Ampicillin	Invitrogen

Tabelle 2.7 Gateway-Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Größe	Selektion	Quelle
pDONR™221	<i>EntryClone</i> für Gateway-Klonierungstechnologie	4762 bp	Kanamycin	Invitrogen
Gateway® pcDNA™-DEST40 Vector	Gateway-Expressionsvektor zur Expression von rekombinanten Proteinen in Säugetierzelllinien	7143 bp	Ampicillin	Invitrogen
pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	Gateway-Expressionsvektor zur Expression von rekombinanten Proteinen in Bakterien, Promotor induzierbar durch L-Arabinose	6160 bp	Ampicillin	Invitrogen

Tabelle 2.8 Plasmide mit *Insert*

Vektor	Beschreibung des <i>Inserts</i>	Größe	Selektion
pDONR™221	Humanes <i>PNPT1</i> -Wildtyp- ohne Stoppcodon	4911 bp	Kanamycin
pDONR™221	Humanes <i>PNPT1</i> -E475G- ohne Stoppcodon	4911 bp	Kanamycin
pDONR™221	Humanes <i>PNPT1</i> -Wildtyp- ohne Stoppcodon und ohne mitochondriale Zielsequenz (die ersten 37 c-terminalen Aminosäuren fehlen)	4806 bp	Kanamycin
pDONR™221	Humanes <i>PNPT1</i> -E475G- ohne Stoppcodon und ohne mitochondriale targeting sequence (die ersten 37 c-terminalen Aminosäuren fehlen)	4806 bp	Kanamycin
pDONR™221	<i>PNPT1</i> (Zebrafisch) -Wildtyp- ohne Stoppcodon	4890 bp	Kanamycin
pDONR™221	pnp gene ( <i>E. Coli</i> ) -Wildtyp- ohne Stoppcodon	4695 bp	Kanamycin
pDONR™221	pnp gene ( <i>E. Coli</i> ) -E430G- ohne Stoppcodon	4695 bp	Kanamycin
pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Humanes <i>PNPT1</i> -Wildtyp- <i>in frame</i> mit V5-His	7906 bp	Ampicillin
pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Humanes <i>PNPT1</i> -E475G- <i>in frame</i> mit V5-His	7906 bp	Ampicillin
pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Humanes <i>PNPT1</i> -E475D- <i>in frame</i> mit V5-His	7906 bp	Ampicillin
pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Humanes <i>PNPT1</i> -D135G- <i>in frame</i> mit V5-His	7906 bp	Ampicillin
pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Humanes <i>PNPT1</i> -D135E- <i>in frame</i> mit V5-His	7906 bp	Ampicillin
Gateway® pcDNA™-DEST40 Vector	Humanes <i>PNPT1</i> -Wildtyp- <i>in frame</i> mit V5-His	7855 bp	Ampicillin
Gateway® pcDNA™-DEST40 Vector	Humanes <i>PNPT1</i> -E475G- <i>in frame</i> mit V5-His	7855 bp	Ampicillin
Gateway® pcDNA™-DEST40 Vector	<i>PNPT1</i> (Zebrafisch) -Wildtyp- <i>in frame</i> mit V5-His	7835 bp	Ampicillin



pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	Humanes <i>PNPT1</i> -Wildtyp- <i>in frame</i> mit V5-His	6872 bp	Ampicillin
pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	Humanes <i>PNPT1</i> -E475G- <i>in frame</i> mit V5-His	6872 bp	Ampicillin
pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	Humanes <i>PNPT1</i> -Wildtyp- ohne mitochondriale Zielsequenz (die ersten 37 c-terminalen Aminosäuren fehlen) <i>in frame</i> mit V5-His	6764 bp	Ampicillin
pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	Humanes <i>PNPT1</i> -E475G- ohne mitochondriale targeting sequence (die ersten 37 c-terminalen Aminosäuren fehlen) <i>in frame</i> mit V5-His	6764 bp	Ampicillin
pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	<i>pnp</i> gene ( <i>E. Coli</i> ) -Wildtyp- <i>in frame</i> mit V5-His	6872 bp	Ampicillin
pBAD-DEST49 Gateway® Destination Vector	<i>pnp</i> gene ( <i>E. Coli</i> ) -E430G- <i>in frame</i> mit V5-His	6872 bp	Ampicillin
pKAK7 (Donovan & Kushner, 1986)	<i>pnp</i> gene ( <i>E. Coli</i> ) -Wildtyp- in pBR322	~10,5 kb	Ampicillin
pDsRed-Mito	Kommerzieller Vektor zur Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien (Clontech), Red fluorescent protein ist gekoppelt an die mitochondriale targeting Sequenz der Untereinheit VIII der humanen Cytochrom c-Oxidase	4,7 kb	Kanamycin
ImaGenes Clone EE702826	EST Clone mit 935bp <i>PNPT1</i> Sequenz (Zebrafisch), verwendet für <i>in vitro</i> Translation zur Sondengenerierung	unbek.	Ampicillin

## 2.12 Zellkultur

### 2.12.1 Zelllinien

COS7 Nierenfibroblasten des Afrikanischen Grünaffen

MEF *Mouse embryonic fibroblasts*

Hek293T *Human embryonic kidney cells*

### 2.12.2 Medium zur Kultivierung von Säugetierzellen

#### Standard-Kultivierungsmedium

500ml	DMEM	(#BE12-604F)	Lonza
50ml	Fetales Kälberserum	(#10500-064)	Invitrogen
5ml	Penicillin / Streptomycin	(#P4333)	Sigma-Aldrich
5ml	Amphotericin B	(#A2942)	Sigma-Aldrich

**2.12.3 Einfriermedium für Säugetierzellen**

90%	Fetales Kälberserum	(#10500-064)	Invitrogen
10%	DMSO	(#A3006)	Applichem

**2.12.4 Transfektionsreagenz**

FuGENE HD <i>transfection reagent</i>	(#04709691001)	Roche
---------------------------------------	----------------	-------

**2.12.5 Material für die Zellernte**

RIPA-Puffer	(#R0278)	Sigma-Aldrich
-------------	----------	---------------

**2.13 Chemikalien zur Auslösung von Zellstress**

Rotenone	(#R8875)	Sigma-Aldrich
Antimycin A	(#A8674)	Sigma-Aldrich
Phenazine methosulfate (PMS)	(#P9625)	Sigma-Aldrich
Oligomycin	(#O4876)	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid	(#H3410)	Sigma-Aldrich

**2.14 Materialien für die Western-Blot-Analyse**

<i>Hybond™-P</i> PVDF Membran	(#RPN303F)	GE Healthcare
<i>NuPAGE™</i> 4-12% Bis-Tris Gel	(#NP0321BOX)	Invitrogen
<i>NuPAGE®</i> LDS Sample Buffer (4X)	(#NP0008)	Invitrogen
<i>Novex®</i> Sharp Pre-stained Protein Standard	(LC5800)	Invitrogen
<i>NuPAGE</i> Antioxidant	(#NP0005)	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	(#A4338)	Applichem

**2x Protein-Ladepuffer**

1000µl	<i>NuPAGE®</i> LDS Sample Buffer (4X)
200µl	β-Mercaptoethanol
800µl	H <sub>2</sub> O

**1x PBS-T-Lösung**

2ml	Tween®20
<i>ad</i> 1l PBS	

**PBS-Blockierlösung (5%)**

5g	Milchpulver
<i>ad</i> 100ml 1xPBS	

PBS-T-Blockierlösung (2,5%)

2,5g Milchpulver

ad 100ml 1x PBS-T

Laufpuffer A

40ml NuPAGE-MOPS-Puffer (20x)

ad 800ml H<sub>2</sub>OLaufpuffer B

200ml Laufpuffer A

500µl NuPAGE Antioxidant

Transferpuffer

30ml Transferpuffer (20x)

60ml Methanol absolut

600µl NuPAGE Antioxidant

ad 600ml H<sub>2</sub>OMembranaktivierung

50ml Methanol absolut

Chemilumineszenzlösung750µl Super Signal® West Dura  
Luminol/Enhancer Solution750µl Super Signal® West Dura  
Stable Peroxide Buffer

beides von Thermo Scientific (#34076)

Chemilumineszenz-Film

Amersham Hyperfilm ECL

(#28906837)

GE Healthcare

**2.15 Substanzen für die Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen**Fixierlösung

Methanol absolut, eiskalt

Blockier- und Permeabilisierlösung

10% Pferde-Serum in PBS mit 0,2% Triton® X-100

Antikörper-Inkubationslösung

10% Pferde-Serum in PBS

Hydrophober Stift

<i>ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen</i>	(#H-4000)	Vector laboratories
--	-----------	---------------------

**2.16 Immunfluoreszenzmarkierung von Organellen****2.16.1 Zellkernmarkierung**

<i>ProLong® Gold antifade reagent with DAPI</i>	(#P36935)	Invitrogen
---	-----------	------------

**2.16.2 Mitochondrienmarkierung**

<i>pDsRed1-Mito</i>	(#6928-1)	Clontech
<i>Mitotracker® Red CMXRos</i>	(#M7512)	Invitrogen

**2.17 Materialien für die Präparation des murinen Innenohrs**Präparierbesteck

<i>Dumont Forceps #5</i>	(#91150-20)	Fine Science Tools
<i>Iris Scissors</i>	(#91460-11)	Fine Science Tools
<i>Vannas Spring Scissors</i>	(#91500-09)	Fine Science Tools

Präparationsmedium

100ml 10x <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>	(#14065)	Invitrogen
5ml 1M HEPES	(#15630)	Invitrogen
895ml H <sub>2</sub> O		

Lösung steril filtrieren und auf einen pH-Wert zwischen 7.2-7.3 einstellen.

Fixierlösung

Methanol absolut, eiskalt

**2.18 Eindeckelmedien**

<i>Dako Fluorescence Mounting Medium</i>	(#S3023)	DAKO
<i>ProLong® Gold antifade reagent with DAPI</i>	(#P36935)	Invitrogen

## 2.19 Antikörper

### 2.19.1 Primärantikörper

$\alpha$ -V5	mouse ( <i>IgG2a</i> )	(#R960-CUS)	Invitrogen
$\alpha$ -PNPase	rabbit (polyclonal)	(#14487-1-AP)	Proteintech
$\alpha$ -AIF	goat (polyclonal)	(#sc-9416)	Santa Cruz
$\alpha$ -Hsp60	goat (polyclonal)	(#ab82520)	abcam

### 2.19.2 HRP-konjugierte Sekundärantikörper

<i>goat</i> - $\alpha$ - <i>mouse</i> -HRP		(#sc-2005)	Santa Cruz
<i>goat</i> - $\alpha$ - <i>rabbit</i> -HRP		(#sc2004)	Santa Cruz
<i>donkey</i> - $\alpha$ - <i>goat</i> -HRP		(#sc-2020)	Santa Cruz

### 2.19.3 Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 <i>rabbit anti mouse</i>		(#A11059)	Invitrogen
Alexa Fluor 488 <i>chicken anti rabbit</i>		(#A21441)	Invitrogen
Alexa Fluor 594 <i>donkey anti goat</i>		(#A11058)	Invitrogen

## 2.20 Morpholinos

Morpholinos wurden von GeneTools ([www.gene-tools.com](http://www.gene-tools.com)) bezogen. Die Sequenzen für einen ATG-, einen *Splice*- und einen *Mismatch*-Morpholino sind im Anhang (siehe Kapitel 12.2) aufgeführt.

## 2.21 Sanger-Sequenzierungen

Sequenzierungen von PCR-Produkten und Plasmiden wurden vom *Cologne Center for Genomics* (CCG) durchgeführt.

## 2.22 Kommerzielle Reagenziensysteme („Kits“)

Tabelle 2.9 Übersicht über verwendete kommerzielle „Kits“

Bezeichnung	Verwendung	Katalognummer	Hersteller
<i>GeneElute™HP Plasmid Miniprep Kit</i>	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	#NA0150	Sigma-Aldrich
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	PCR-Produkt Aufreinigung aus Agarose-Gelen	#A9280	Promega
<i>Expand High Fidelity PCR System, dNTPack</i>	PCR-Amplifikation von zu klonierenden Fragmenten	#04738250001	Roche
<i>QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	<i>in vitro</i> Mutagenese	#200521	Stratagene / Agilent

<i>BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden	#4337452	Applied Biosystems
<i>pcDNA™3.1W5-His TOPO® TA Expression Kit</i>	TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen in einen Expressionsvektor	#K4800-40	Invitrogen
<i>miRNeasy Mini Kit</i>	Isolierung von RNA incl. kleiner RNAs aus Gewebe	#217004	Qiagen
<i>QIAshredder</i>	Säulen zum Aufschließen von Geweben, verwendet in Kombination mit <i>miRNeasy Mini Kit</i>	#79654	Qiagen
<i>OneStep RT-PCR Kit</i>	Reverse Transkription mit direkt folgender PCR	#210210	Qiagen
<i>5'/3' RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation</i>	zur Amplifikation von langen unbekanntem 5' und 3' Enden einer mRNA	#03353621001	Roche
<i>TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System</i>	<i>in vitro</i> Translation von Proteinen	#L4610	Promega
<i>MagZ™ Protein Purification System</i>	Aufreinigung von Proteinen mit His-tag	#TB336	Promega
<i>DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)</i>	zur Markierung von RNA mit Digoxigenin-UTP durch <i>in vitro</i> Transkription mit einer SP6 oder T7 RNA Polymerase	#11175025910	Roche
<i>RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	<i>First strand</i> cDNA Synthese	#K1622	Fermentas
<i>Mitochondria Isolation Kit for Tissue (with Dounce Homogenizer)</i>	Isolation von Mitochondrien ( <i>crude extract</i> ) aus Geweben	#MS851	Mitosciences
<i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i>	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	#23225	Thermo Scientific
<i>SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate</i>	Chemilumineszenzreagenzien für die Visualisierung von Proteinen im <i>Western Blot</i>	#34076	Thermo Scientific
<i>Taq PCR Core Kit</i>	Amplifikation mittels PCR	#201223	Qiagen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	# 28704	Qiagen

## 2.23 Geräte

Tabelle 2.10 Verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec V-150	Systec
Brutschrank	Hera Cell 150	Thermo Electron
Gel-Dokumentationssystem	Chemidoc	Bio-Rad
Heiz-/ Rührplatte	RCT basic	IKA
Inkubationsschüttler	Series 25	New Brunswick Scientific
Nukleinsäure-Photometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific

pH-Messgerät	HI 207	HANNA
Pipettierhilfen	Research variabel	Eppendorf
Spannungsgerät	PowerPac Basic Power Supply	Bio -Rad
Spannungsgerät	Power Ease500	Invitrogen
Sterile Werkbank	Hera Safe	Kendro
Thermocycler	iCycler	Bio-Rad
Thermocycler	Labcyler Gradient	Sensoquest
Thermomixer	Compact	Eppendorf
Tischschüttler	KS 260 basic	IKA
Transfermodul	X-Cell II <i>Blot</i> -Modul	Invitrogen
Wasserbad	WB22	Memmert
Zellzählautomat	Multisizer™ 3 COULTER COUNTER®	Beckmann Coulter
<i>Real-time</i> PCR Gerät	7900 HT Fast Real Time PCR System	Applied biosystems
Plattenlesegerät u. a. zur Bestimmung von DNA und RNA Konzentrationen	Epoch Microplate Spectrophotometer	Biotek
Gewebehomogenisator	TissueRuptor	Qiagen
Präpariermikroskop	M80	Leica
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	Leica
Kryostat	CM 1900	Leica
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2 mit Apotome	Zeiss
Laser Scanning Mikroskop	LSM 710	Zeiss
Gel Elektrophorese Kammer	Sub-Cell GT Cell	Biorad
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Gefriersystem -80°C	Forma -86C ULT Freezer	Thermo S cientific
Photometer	BioPhotometer Plus	Eppendorf
Horizontalschüttler	Rocker PMR-30	VWR
Mini-Zentrifuge	VWR Galaxy MiniStar	VWR
Rollenmischer	Roller Mixer SRT6	Stuart
Dispenser	HandyStep electronic	Brand
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3	Thermo Scientific
Ultraschallbad	USC 100	VWR
Vortexer	Test tube shaker	VWR
Laborwaage	ALC	Acculab
Gas-Sicherheitsbrenner	Gas-Sicherheitsbrenner	schuett-biotec
Plattenlesegerät	Safire 2	Tecan

## 2.24 Datenbanken und Internetseiten

<i>Ensembl Genome Browser</i>	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
<i>UCSC Genome Browser</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
<i>Hereditary Hearing loss HP</i>	<a href="http://hereditaryhearingloss.org/">http://hereditaryhearingloss.org/</a>
<i>NCBI Genome Browser</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<i>Nebcutter 2.0</i>	<a href="http://tools.neb.com/Nebcutter2/index.php">http://tools.neb.com/Nebcutter2/index.php</a>
<i>Nucleic Acid Sequence Massager</i>	<a href="http://www.attotron.com/cybertory-&lt;br/&gt;/analysis/seqMassager.htm">http://www.attotron.com/cybertory- /analysis/seqMassager.htm</a>
<i>Vector designer</i>	<a href="https://vectordesigner.invitrogen.com">https://vectordesigner.invitrogen.com</a>
<i>Primer3</i>	<a href="http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi">http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi</a>
<i>Mitoprot</i>	<a href="http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html">http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html</a>
<i>PeptideMass calculator</i>	<a href="http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html">http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html</a>
<i>ClustalW2 alignment tool</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>

## 2.25 Software

Tabelle 2.11 Software und ihre Verwendung

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Chromas Lite	Anzeigen von Elektropherogrammen	Conor McCarthy
SeqMan	<i>Alignments</i>	DNASTAR, USA
AxioVision 4.8	Bildaufnahme und -bearbeitungssoftware in Kombination mit Zeiss Axioplan 2	Zeiss
Zen 2009 LE	Bildbearbeitungssoftware für LSM-Dateien	Zeiss
GIMP 2	Bildbearbeitung	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam
GeneSoft	Geldokumentationssoftware	VWR
Gen5	Software zur Benutzung des EPOCHs	Biotek



## 3 Methoden

### 3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

DNA hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm, RNA bei 230nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen proportional zur Absorption bei 260nm und die Konzentration von RNA in wässrigen Lösungen proportional zur Absorption bei 230nm.

Der Quotient aus der Absorption bei 260nm und 280nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure. DNA-Proben, für die sich ein Quotient zwischen 1,7 und 1,9 errechnet, können als rein angesehen werden. Ein niedrigerer Quotient weist hingegen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

Für diese Arbeit wurden DNA- und RNA-Konzentrationen mit einem NanoDrop® ND-1000 gemessen. Dabei handelt es sich um ein Vollspektrum-Photometer, das die Messung ohne vorherige Verdünnung der Probe erlaubt. Des Weiteren wurde ein *Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System* der Firma Biotek verwendet. Ausgestattet mit einer *Take3 micro volume* Platte können u. a. DNA- und RNA-Konzentrationen in kleinen Volumina gemessen werden.

### 3.2 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

#### 3.2.1 Funktionsweise und Komponenten der PCR

Die PCR ermöglicht die exponentielle Amplifikation eines definierten Nukleinsäureabschnitts. Die Synthese selbst wird durch thermostabile DNA-Polymerasen bewerkstelligt, die aus thermophilen Bakterien gewonnen werden. Dazu gehören u. a. die *Taq*-Polymerase aus *thermus aquaticus* und die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Die *Taq*-Polymerase hat ein Temperaturoptimum von 72°C und eine Polymerisierungsrate von circa 1000 Nukleotiden pro Minute. Die *Pfu*-Polymerase hat bei gleichem Temperaturoptimum eine Polymerisierungsrate von circa 600 Nukleotiden, ist aber im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase mit einer Korrekturlese-Funktion in Form einer 3'-5'-Exonuklease ausgestattet.

Grundlegende Voraussetzung für die PCR ist, dass die Sequenz der flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden Abschnitts bekannt ist. Mit dieser Kenntnis können kurze Oligonukleotide (Primer) aus i. d. R. 20-28 Nukleotiden synthetisiert werden, die den Start- und Endpunkt der Amplifikation festlegen. Die Primer müssen so gewählt werden, dass sie komplementär zum *sense*-Strang am Anfang und komplementär zum *antisense*-Strang am Ende des zu amplifizierenden Abschnitts sind.

Die oben genannten Polymerasen können die Synthese an doppelsträngigen DNA-Molekülen nicht beginnen; sie benötigen dazu ein freies 3'-OH-Ende. Dieses freie 3'-OH-Ende wird von den Primern bereitgestellt und garantiert so den spezifischen Synthesestartpunkt.

Als weitere Komponenten für die PCR werden dNTPs benötigt, die von der Polymerase in die neusynthetisierte DNA eingebaut werden.

Für die optimale Effizienz der jeweiligen Polymerase müssen optimale Ionenkonzentrationen eingestellt werden. In der Regel werden vom Hersteller dazu Standardpuffer und ggf. weitere Reagenzien wie  $MgCl_2$  oder  $KCl$  zur Optimierung mitgeliefert.

### 3.2.2 Phasen der PCR

Die PCR läuft in drei Phasen ab, die durch die jeweilige Temperatur definiert sind.

In der Denaturierungsphase trennt sich die doppelsträngige DNA-Vorlage (*template*) bei einer Temperatur von 90-98°C auf. Durch die hohe Temperatur lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Bereiche, die reich an Basenpaarungen aus Adenin (A) und Thymin (T) sind, denaturieren aufgrund der nur zwei vorhandenen Wasserstoffbrücken zuerst. Die Basen Guanin (G) und Cytosin (C) sind über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden und sind somit stabiler. Die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA-Doppelstränge denaturiert vorliegt, wird als Schmelztemperatur ( $T_m$ ) bezeichnet. Sie ist abhängig von dem GC-Gehalt der DNA und den Ionenkonzentrationen.

In der Anlagerungsphase (*Annealing*) binden die Primer spezifisch an die komplementären Bereiche der DNA-Einzelstränge. Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und liegt zwischen 55 und 65°C.

Das Erhöhen der Anlagerungstemperatur kann die Spezifität der PCR einerseits erhöhen, da unspezifische Basenpaarungen unterdrückt werden, andererseits senkt es aber gleichzeitig die Effizienz. Niedrige *Annealing*-Temperaturen erzielen eine höhere Ausbeute, können aber auch unspezifische Basenpaarungen und damit unerwünschte PCR-Produkte erzeugen.

In der Elongationsphase lagert sich die Polymerase an das freie 3'-OH-Gruppe des Primers an und synthetisiert den komplementären Strang durch den Einbau von zum Matrizenstrang komplementären Nukleotiden. Die Temperatur der Elongationsphase (*Extension*) hängt von der verwendeten Polymerase und deren Temperaturoptimum ab.

Denaturierung, Anlagerung und Elongation laufen in Zyklen mehrfach hintereinander ab, was eine exponentielle Amplifikation zur Folge hat. Die Anzahl der Zyklen liegt gewöhnlich zwischen 25 und 40.

Um die DNA-Matrize vor Beginn der Zyklen vollständig zu denaturieren, wird mit einer initialen Denaturierung von 3-10 min begonnen.

Nach Ablauf der Zyklenphase folgt eine verlängerte Elongationsphase, in der die Polymerase nicht vollständig amplifizierte Produkte fertigstellen kann.

### 3.2.3 Design von Oligonukleotiden (Primern)

Um ein möglichst spezifisches PCR-Produkt zu erhalten, müssen Primer nach stringenten Kriterien ausgewählt werden. Mit Hilfe der *Online*-Datenbank *UCSC Genome Browser* wurden die Exon-Intron-Grenzen der Kandidatengene ermittelt und die Primer so gewählt, dass sie die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Primer wurden mithilfe des *online* verfügbaren Primerdesign-Programms *Primer3* mit folgenden Voreinstellungen *designt*:

- Primerlänge: 20-27bp mit möglichst gleichmäßiger Verteilung aller vier Basen
- GC-Gehalt: 40-60%
- maximal drei aufeinander folgende gleiche Basen
- am 3'-Ende sollte mindestens die letzte Position (besser die letzten beiden Positionen) aus einem Guanin oder Cytosin bestehen
- Um unspezifische Bindungen aufgrund von repetitiven Elementen zu vermeiden, wurde unter der Funktion *mispriming library* der entsprechende Organismus ausgewählt. Der Primer wird dann gegen das entsprechende Genom *geblastet* und so auf seine Spezifität hin geprüft.

Nicht immer ist es möglich die oben genannten Kriterien konsequent einzuhalten. Häufig lässt es sich nicht vermeiden, Primer in sehr GC-reiche Regionen zu legen, was in der PCR in Form von unspezifischen Produkten zu Problemen führen kann. In diesem Fall müssen mehrere Primerpaare und deren Kombinationen getestet werden, um ein spezifisches Produkt zu erhalten.

Die für diese Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

### 3.2.4 PCR-Reaktionsansätze

In dieser Arbeit wurden die in den Tabellen 3.1 bis 3.3 aufgeführten Polymerasen und PCR-Reaktionsansätze verwendet. Um etwaige Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen, wurde für jeden PCR-Ansatz eine Negativ-Kontrolle mit H<sub>2</sub>O angesetzt. PCR-Ansätze wurden immer auf Eis pipettiert, um unspezifische Enzymaktivitäten zu vermeiden.

**Tabelle 3.1 PCR-Reaktionsansatz mit REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix von Sigma**

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix	0,06U/μl Taq-Polymerase	12,5μl	0,75U Taq-Polymerase
Vorwärts-Primer	10pmol/μl	1,0μl	0,4pmol/μl
Rückwärts-Primer	10pmol/μl	1,0μl	0,4pmol/μl
DNA	10ng/μl	5,0μl	50ng
H <sub>2</sub> O	-	5,5μl	-
		Σ 25,0μl	

**Tabelle 3.2 PCR-Reaktionsansatz mit *AccuTaq*<sup>TM</sup> LA DNA Polymerase von Sigma**

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
<i>accuTaq</i> Polymerase	5U/ $\mu$ l	0,25 $\mu$ l	1,75U
Puffer	10x	2,5 $\mu$ l	1x
dNTPs	10mM	1,0 $\mu$ l	0,4mM
Vorwärts-Primer	10pmol/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	0,4pmol/ $\mu$ l
Rückwärts-Primer	10pmol/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	0,4pmol/ $\mu$ l
DNA	10ng/ $\mu$ l	5,0 $\mu$ l	50ng
H <sub>2</sub> O	-	14,25 $\mu$ l	-
		$\Sigma$ 25,0 $\mu$ l	

**Tabelle 3.3 PCR-Reaktionsansatz mit *Expand High Fidelity*<sup>PLUS</sup> PCR System von Roche**

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
<i>High Fidelity</i> Polymerase	5U/ $\mu$ l	0,25 $\mu$ l	1,75U
Puffer	5x	5,0 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,0 $\mu$ l	1mM
dNTPs	10mM	1,0 $\mu$ l	0,4mM
Vorwärts-Primer	10pmol/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	0,4pmol/ $\mu$ l
Rückwärts-Primer	10pmol/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	0,4pmol/ $\mu$ l
DNA	10ng/ $\mu$ l	5,0 $\mu$ l	50ng
H <sub>2</sub> O	-	10,75 $\mu$ l	-
		$\Sigma$ 25,0 $\mu$ l	

### 3.2.5 PCR-Temperaturprofile zur Amplifikation von DNA und cDNA

Alle PCRs wurden in Thermocyclern durchgeführt, die das schnelle Heizen und Abkühlen der Reaktionsansätze gewährleisten.

Die Anlagerungstemperaturen hängen von der Schmelztemperatur der Primer ab. Als Annäherung zur Berechnung der Schmelztemperatur lässt sich folgende Formel verwenden:

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

Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und von der Prozessivität der verwendeten Polymerase. In den nachfolgenden Protokollen sind jeweils beispielhaft eine Anlagerungstemperatur und eine Elongationszeit angegeben. Die Denaturierungstemperatur wurde teilweise auf bis zu 98°C erhöht. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn sich die DNA-Doppelstränge aufgrund eines sehr GC-reichen Bereichs bei niedrigeren Denaturierungstemperaturen nicht vollständig trennen lassen.

### 3.2.5.1 Standard-PCR

In dem Temperatur-Profil der Standard-PCR (Tabelle 3.4) wird nur eine Anlagerungstemperatur verwendet.

**Tabelle 3.4 Temperatur-Profil einer Standard-PCR**

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	95	5,0	1x
Denaturierung	95	0,5	35x
Anlagerung	60	0,5	
Elongation	72	1,0	
Finale Elongation	72	7,0	1x
Reaktionsende	4	∞	

### 3.2.5.2 Two-Step-PCR

Bei der *Two-Step-PCR* (Zwei-Schritt-PCR) erfolgt die Primeranlagerung bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (Tabelle 3.5). Zunächst wird eine etwas höhere Temperatur gewählt, wodurch eine erhöhte Spezifität in den ersten Zyklen gewährleistet wird. Durch die um 2°C niedrigere Anlagerungstemperatur in den nächsten 20 Zyklen erreicht man eine quantitativ gute Ausbeute des PCR-Produkts.

**Tabelle 3.5 Temperatur-Profil einer Two-Step-PCR**

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	95	5,0	1x
Denaturierung	95	0,5	15x
Anlagerung	62	0,5	
Elongation	72	1,0	
Denaturierung	95	0,5	20x
Anlagerung	60	0,5	
Elongation	72	1,0	
Finale Elongation	72	7,0	1x
Reaktionsende	4	∞	

### 3.2.5.3 Touchdown-PCR

Bei einer *Touchdown-PCR* wird die Anlagerungstemperatur in jedem Zyklus um 1-2°C gesenkt. Jeder Primer hat so für einige Zyklen die richtige Anlagerungstemperatur. Das in Tabelle 3.6 aufgezeigte Protokoll wurde z.B. für die Amplifikation von Mikrosatellitenmarkern verwendet. Die *Touchdown-PCR* ist in diesem Fall besonders geeignet, da hier keine hohe Quantität erzielt werden muss, sondern ein sehr spezifisches Produkt gewünscht ist.

Tabelle 3.6 Temperatur-Profil einer *Touchdown-PCR*

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	95	5,0	1x
Denaturierung	95	0,5	20x
Anlagerung	65-55*	0,5	
Elongation	72	0,5	
Denaturierung	95	0,5	20x
Anlagerung	54	0,5	
Elongation	72	0,5	
Finale Elongation	72	7,0	1x
Reaktionsende	4	∞	

\*In den ersten 20 Zyklen wird die Temperatur alle zwei Zyklen um 1°C gesenkt. Die nächsten 20 Zyklen erfolgen bei einer konstanten Anlagerungstemperatur von 54°C.

### 3.3 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Bei der RT-PCR wird zunächst einsträngige RNA mithilfe einer reversen Transkriptase in sog. *first-strand* cDNA umgeschrieben. Dabei handelt es sich um ein doppelsträngiges DNA/RNA-Hybrid-Molekül. Die *first-strand* cDNA kann im Anschluss unmittelbar als Matrize für eine herkömmliche PCR-Reaktion verwendet werden.

Über die RT-PCR kann man beispielsweise die Expression eines bestimmten Gens auf Transkriptionslevel in unterschiedlichen Geweben nachweisen und semi-quantitativ vergleichen. In dieser Arbeit wurde mit einem *OneStep RT-PCR Kit* von Qiagen gearbeitet. Die Reverse Transkription (RT) der RNA und die anschließende PCR können im selben Reaktionsgefäß unmittelbar nacheinander stattfinden. Die eigentliche PCR-Reaktion wird nach der RT durch das Aktivieren der Polymerase in einem Aktivierungsschritt bei 95°C in Gang gesetzt.

### 3.4 Real-time PCR

#### 3.4.1 Funktionsweise der Real-time PCR

Bei der *Real-time* PCR handelt es sich im Prinzip um eine herkömmliche PCR, die jedoch die Möglichkeit bietet, die Amplifikation in Echtzeit zu verfolgen und die Produkte zu quantifizieren. Eine typische Anwendung ist daher beispielsweise die quantitative Bestimmung des Expressionslevels eines bestimmten Gens in unterschiedlichen Geweben oder Zelllinien.

Die Quantifizierung basiert dabei auf einer Fluoreszenz-Messung. Reporter-Farbstoffe wie beispielsweise SYBR-Green lagern sich an die neu synthetisierte doppelsträngige DNA an. Das Fluoreszenz-Signal ist dabei proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts. Zur Durchführung benötigt man ein entsprechendes *Real-time* PCR-Gerät, das die emittierte Fluoreszenz messen kann.

### 3.4.2 Quantitativer Nachweis von miRNAs mit *Taqman* Sonden

Neben Reporter-Farbstoffen wie SYBR-Green, die an die gesamte doppelsträngige DNA in einer Reaktion binden (also ggf. auch an unspezifische Produkte), werden von diversen Firmen auch genspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden angeboten.

In dieser Arbeit wurde die Expression von miRNAs untersucht. Entsprechende miRNA-spezifische Sonden wurden von Applied Biosystems bezogen.

Aufgrund ihrer geringen Größe von nur ~ 22 Nukleotiden ist für die initiale Reverse Transkription (RT) ein für jede miRNA spezifischer-*Looped* RT Primer notwendig. Der *Looped* RT Primer bindet an die miRNA und eine Reverse Transkriptase synthetisiert den komplementären Strang.

Die eigentliche *Real-time* PCR-Reaktion enthält neben der cDNA aus der RT, zwei genspezifische Primer für die PCR-Amplifikation und eine für die zu detektierende miRNA spezifische Sonde. Die Sonde ist am 5'-Ende mit FAM (6-Carboxyfluorescein) fluoreszenzmarkiert. Am 3'-Ende befindet sich ein sog. *Quencher*. Solange die Sonde intakt ist und sich der Reporterfarbstoff in direkter Nähe zum *Quencher* befindet, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch den *Quencher* unterdrückt. Im Verlauf der PCR hybridisiert die Sonde an die Erkennungssequenz im entstehenden PCR-Produkt. Im darauffolgenden Zyklus wird die Sonde von der DNA-Polymerase geschnitten, sodass der Reporterfarbstoff vom *Quencher* getrennt wird. Der *Quencher* kann nun die Fluoreszenz nicht weiter unterdrücken und es kommt zur Emission. Da nur Sonden geschnitten werden, die spezifisch an ihre Zielsequenz gebunden waren, ist die detektierte Fluoreszenz proportional zur Menge der amplifizierten miRNA.

Alle verwendeten miRNA-Assays sind unter Punkt 2.8.1 aufgeführt. Weitere Informationen zu der Durchführung und den Versuchsbedingungen können dem Handbuch *Taqman MicroRNA Assays* von Applied Biosystems entnommen werden.

## 3.5 RACE-PCR

Obwohl mittlerweile die Genome einer Vielzahl von Organismen vollständig sequenziert sind und in *Online*-Datenbanken zur Verfügung stehen, kommt es doch vor, dass ganze Bereiche fehlen oder Gene nicht korrekt bzw. nur unvollständig annotiert sind.

Die *RACE-PCR* (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) bietet die Möglichkeit das 3'- und 5'-Ende einer mRNA zu ermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *5'/3' RACE kit -2nd Generation-* von Roche verwendet um die 5'-und 3'-Bereiche des bis dato nicht annotierten *PNPT1*-Gens im Zebrafisch zu bestimmen. Sowohl für die 5'-*RACE* als auch für die 3'-*RACE* sind Sequenzinformationen erforderlich, um sequenzspezifische Primer erstellen zu können. Eine Möglichkeit, um an entsprechende Sequenzinformationen zu gelangen, ist es, in EST-Datenbanken (*expressed sequence tags*) nach homologen *ESTs* des bereits bekannten Gens zu suchen. Im konkreten

Fall wurde die Aminosäuresequenz der bereits annotierten humanen PNPase gegen eine Datenbank (NCBI) mit Zebrafisch-ESTs *geblastet*. Aufgrund der sehr hohen Homologie konnten sowohl ESTs für den 5'- als auch den 3'-Bereich identifiziert werden.

Für die 5'-RACE wird zunächst ein sequenzspezifischer Rückwärts-Primer (SP1) benötigt, um die mRNA in cDNA umzuschreiben. Anschließend wird die verbleibende RNA mit RNase H abgebaut. In einer weiteren Reaktion wird mithilfe einer Terminalen Transferase und dATPs an die nun einzelsträngige cDNA ein Poly-A-Schwanz angefügt. Mit einem weiteren sequenzspezifischem Primer (SP2) und einem *Oligo-dT-anchor* Primer kann das 5'-Ende mittels PCR amplifiziert werden. Um eine bessere Spezifität bzw. eine höhere Ausbeute zu erzielen, kann es gegebenenfalls sinnvoll sein mit weiteren Primern (SP3, SP4) eine *nested-PCR* durchzuführen.

Bei der 3'-RACE kann die cDNA-Synthese aufgrund des Poly-A-Schwanzes von mRNAs auf direktem Wege mit *Oligo-dT-anchor* Primern durchgeführt werden. Auch hier wird anschließend die verbliebene RNA mit RNase H abgebaut. Mit einem sequenzspezifischen Vorwärts-Primer (SP5) und einem *PCR-anchor* Primer wird dann das 3'-Ende mittels PCR amplifiziert.

Die eigentlichen Sequenzen der beiden Enden wurden im Anschluss über direkte Sanger-Sequenzierungen bestimmt. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. Weitere Detailinformationen können der Anleitung des *Kits* (Roche) entnommen werden.

### 3.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Diese Auftrennung erfolgt aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen im Phosphat-Rückgrat der DNA. Kleine Fragmente bewegen sich dabei schneller durch die netzartige Struktur des Agarose-Gels in Richtung Anode als große Fragmente.

Die Wandergeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist dabei auch von der Konformation der DNA abhängig. Superspiralisierte zirkuläre DNA wandert wegen ihrer kompakten Struktur schneller durch das Gel als entspannte zirkuläre DNA-Moleküle (z.B. Plasmide).

Für Fragmente mit einer Größe von 0,1 kb bis 2,0 kb wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 2% verwendet, für größere Fragmente wie z.B. Plasmide wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 1,5% verwendet.

Die Visualisierung erfolgt durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel. Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren aufgrund ihrer planaren Struktur mit der helikalen Struktur der DNA. Dadurch kommt es zu einem veränderten Verhalten bei der Anregung durch UV-Licht. Die Fluoreszenz ist im Gegensatz zu freien Ethidiumbromid-Molekülen stark erhöht, sodass die DNA im UV-Licht fluoresziert.



Zur Größen- und Massenbestimmung dient ein DNA-Standard, der aus einem Gemisch von DNA-Strängen bekannter Länge und Masse besteht. Für diese Arbeit wurde der DNA-Standard *2-log-ladder* von NEB verwendet.

Zur Längenbestimmung wird die Probe in einem Verhältnis von 1:10 mit Gelladepuffer versetzt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei 160V in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente für circa 20-45 min.

### 3.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nach der Amplifikation mittels PCR ist eine Aufreinigung des PCR-Produkts notwendig. Überschüssige Primer, dNTPs, Puffer und Enzyme müssen entfernt werden, da sie sonst nachfolgende Reaktionen, wie zum Beispiel eine Sequenzierreaktion, stören würden. Für diese Arbeit wurden je nach Anwendung zwei verschiedenen Aufreinigungsmethoden verwendet.

#### 3.7.1 Aufreinigung eines PCR-Produktes mit „*ExoTSAP*“

Die *ExoTSAP*-Aufreinigungsmethode wurde eingesetzt, wenn ein PCR-Produkt nach der Amplifikation direkt sequenziert werden sollte. Sofern ein spezifisches Produkt vorliegt, ist es nicht notwendig, das PCR-Produkt aus dem Gel auszuschneiden; der PCR-Ansatz kann direkt zur Aufreinigung verwendet werden. Dabei nutzt man die Eigenschaften zweier Enzyme, der *Exonuclease I* (*ExoI*, NEB) aus *E. coli* und der Thermosensitiven Alkalinen Phosphatase. (*TSAP*, Promega). Die *Exonuclease I* baut Nukleotide von einzelsträngiger DNA in 3'-5'- Richtung ab. Die Thermosensitive Alkaline Phosphatase degradiert dNTPs. Zusammen können die beiden Enzyme so den PCR-Ansatz von Primern und Nukleotiden befreien. Tabelle 3.7 zeigt die Zusammensetzung für eine *ExoTSAP*-Aufreinigung.

**Tabelle 3.7 Aufreinigung mit *ExoTSAP***

Komponente	Konzentration	Volumen	Einheiten (total)
<i>Exonuclease I</i> (NEB)	20U/ $\mu$ l	0,075 $\mu$ l	1,5
Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Promega)	1U/ $\mu$ l	0,1 $\mu$ l	0,1
H <sub>2</sub> O	-	1,825 $\mu$ l	-
PCR-Produkt	-	8,0 $\mu$ l	-
		$\Sigma$ 10,0 $\mu$ l	

Die einzelnen Komponenten werden auf Eis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und dann im Thermocycler für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgen 20 min bei 72°C, um die Enzyme zu inaktivieren.

### 3.7.2 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Soll das PCR-Produkt für andere Anwendungen verwendet werden, wie z.B. für die Klonierung in ein Plasmid, muss das PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

Das aufzureinigende PCR-Produkt wurde mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte über das Säulenaufreinigungs-Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System* der Firma Promega. Die Funktionsweise des Kits beruht auf einer Reinigungssäule mit einer Silica-Gel-Membran, die die selektive DNA-Adsorption und die Trennung von Fremdstoffen ermöglicht. Zunächst wird das Agarose-Gel-Stück in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß mit 200µl-400µl (je nach Gewicht des Stücks) der *Membrane Binding Solution* versetzt und dann auf einem Thermomixer bei 50-65°C inkubiert und mehrmals *gevortext*, bis sich das Agarose-Gel-Stück vollständig gelöst hat. Die Lösung wird in eine Reinigungssäule überführt und 1 min bei 12.000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend folgen zwei Waschschrte zwischen denen jeweils zentrifugiert wird. Um die Reinigungssäule zu trocknen wird nochmals 1 min zentrifugiert. Die Reinigungssäule kann nun in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Die DNA wird in H<sub>2</sub>O durch Zentrifugieren eluiert.

## 3.8 Sanger-Sequenzierung

### 3.8.1 Theoretischer Hintergrund

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen gehen auf die von F. Sanger entwickelte enzymatische Kettenabbruchsynthese zurück (Sanger *et al.*, 1977). Diese erfolgt mit Hilfe einer enzymatischen DNA-Synthese in Gegenwart von dNTPs und fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonucleinsäuren (ddNTPs), die einen Kettenabbruch bewirken. Unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung wird ein ddNTP an ein Nukleotid in der wachsenden Kette angehängt. Da den ddNTPs am C3-Atom im Gegensatz zu den dNTPs eine Hydroxylgruppe fehlt, kann an dem C3-Atom keine Phosphodiesterbindung ausgebildet werden und es kommt zum Kettenabbruch. Eine DNA-Polymerase synthetisiert den zu sequenzierenden DNA-Strang mit einem spezifischen Primer als Startpunkt. Aufgrund der mengenmäßigen Verhältnisse zwischen dNTPs und ddNTPs (die Konzentration an dNTPs ist um ein Vielfaches höher) und deren Konkurrenz zueinander, entstehen Fragmente verschiedener Längen.

Die Auftrennung der Fragmente erfolgt über dünne Glaskapillaren in einem Sequenziergerät. Mittels eines Laserstrahls werden die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs zur Abgabe von Licht spezifischer Wellenlänge angeregt, das von dem Sequenziergerät detektiert werden kann. Die Messung erfolgt elektronisch und wird in Form eines Elektropherogramms ausgegeben und gespeichert. Das Elektropherogramm zeigt dabei die abgeleitete Sequenz und ermöglicht die weitere Analyse.

### 3.8.2 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden

In dieser Arbeit wurden alle per PCR amplifizierte DNA-Abschnitte sowie Plasmide nach dem oben beschriebenen Prinzip sequenziert. Nach erfolgter Amplifikation der gewünschten Zielsequenz wurden die PCR-Produkte über eine Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft und anschließend (i.d.R. mit der *ExoTSAP*-Methode) aufgereinigt.

Für die Sequenzierreaktion wurde ein Reagenziensystem der Firma ABI eingesetzt, das alle notwendigen Komponenten (dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Polymerase und Puffer) enthält. Tabelle 3.8 zeigt die Zusammensetzung einer Sequenzierreaktion.

**Tabelle 3.8 Pipettierschema einer Sequenzierreaktion**

Komponente	Menge
<i>BigDye</i> V1.1	0,5µl
5x <i>Sequencing buffer</i>	2,0µl
Primer	0,25µl [10pmol/µl]
PCR-Produkt	1,3µl
H <sub>2</sub> O	5,95µl
	Σ 10µl

Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden pro Reaktion 100 bis 200ng des Plasmids eingesetzt. Das Temperatur-Profil für die Sequenzierreaktion ist in Tabelle 3.9 dargestellt.

**Tabelle 3.9 Temperaturprofil einer Sequenzierreaktion**

	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96	10s	31x
Anlagerung	55	5s	
Elongation	60	4min	
Reaktionsende	4	∞	

Die Aufreinigung der Sequenzierproben und die Sequenzierung selbst wurden vom Sequenzierservice des *Cologne Center for Genomics* durchgeführt. Die Ergebnisse in Form von Elektropherogrammen wurden per Datenfernübertragung zur Verfügung gestellt.

## 3.9 Klonierung

Bei der Klonierung werden beliebige DNA-Fragmente in Vektoren integriert und anschließend zur Vermehrung in Bakterien transformiert. Es sind verschiedenste Vektoren kommerziell erhältlich. Sie beinhalten meist multiple Klonierungsstellen (*multiple cloning sites*) und ein Antibiotika-Resistenz-Gen. Die Antibiotikaresistenz ermöglicht die Selektion von Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen und so die entsprechende Resistenz erworben haben. Sie können in antibiotikahaltigen Medien kultiviert werden.

Die zirkulären Vektoren verdrillen sich und bilden sog. *coiled-coiled*-Strukturen aus. Diese Strukturen sind wesentlich kompakter als linearisierte DNA und werden von Bakterien wie *Escherichia coli* leichter aufgenommen und als eigenständige Einheit bei der Zellteilung

weitervererbt. Das Plasmid wird beim Wachstum der transformierten Bakterien ebenfalls vervielfältigt und kann anschließend für Funktionsanalysen isoliert werden.

### 3.9.1 TA-Klonierung mit dem *pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit*

Das *pcDNA3.1/V5-His©TOPO® TA Expression Kit* (Invitrogen) dient der schnellen Klonierung von PCR-Produkten. Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft im Zuge der PCR an die beiden 3'-Enden eines PCR-Produktes unspezifisch ein einzelnes Adenin-Nukleotid (A) anzuhängen. Basierend auf dieser Eigenschaft sind die für die TA-Klonierung verwendeten Vektoren so modifiziert, dass sie an den 3'-Enden ein einzelnes Thymin-Nukleotid (T) tragen. Das Klonierungsprinzip basiert darauf, dass ein DNA-Insert durch komplementäre Basenpaarung zwischen A und T direkt in den linearisierten Vektor ligiert werden kann. Ergänzt wird dieses System durch die Typ-I-Topoisomerase des *Vaccinia*-Virus, die kovalent an die 3'-Enden des Vektors gebunden ist. Nach komplementärer Basenpaarung zwischen dem A-Überhang des Inserts und dem T-Überhang des Vektors ligiert die Typ-I-Topoisomerase beide miteinander. Dabei löst sich die Topoisomerase ab und das zirkularisierte rekombinante Plasmid wird frei.

In welcher Orientierung das *Insert* dabei eingefügt wird, ist zufällig und muss im Anschluss durch einen aussagekräftigen Restriktionsverdau bestimmt werden.

Zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien enthält der *pcDNA3.1/V5-His©TOPO®*-Vektor ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Nur transformierte Bakterien mit erworbener Ampicillin-Resistenz können auf ampicillinhaltigen Agarplatten wachsen und auf diese Weise selektiert werden.

#### 3.9.1.1 Proteinmarkierung durch Anhängen des V5-Epitops

Der *pcDNA3.1/V5-His©TOPO®*-Vektor trägt C-terminal ein V5-Epitop. Diese Sequenz kodiert für ein kurzes artifizielles Peptid. Durch die Deletion des natürlichen Stopcodons des zu klonierenden Gens hat man die Möglichkeit, die Sequenz für das V5-Epitop an die Sequenz des Gens anzuhängen. Das offene Leseraster kodiert dann für ein rekombinantes Protein mit C-terminalem V5-Epitop. Gegen dieses Epitop kann ein spezifischer Antikörper zur Detektion eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde auf diese Weise vorgegangen, um das rekombinante Protein markieren und mit Hilfe der Immunfluoreszenz sichtbar machen zu können.

#### 3.9.1.2 Generierung von A-Überhängen für die TA-Klonierung

Für die Klonierung wurde zunächst das zu klonierende Fragment mittels PCR amplifiziert, in der Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Für die PCR wurde eine *High Fidelity* Polymerase (Roche) verwendet, die im Gegensatz zu der Taq-Polymerase mit einer Korrekturlesefunktion ausgestattet ist. Sie ist für diese Art der Anwendung vorzuziehen, da ihre Fehlerrate deutlich niedriger ist als bei einer konventionellen

*Taq*-Polymerase. Da die *High Fidelity* Polymerase jedoch keine A-Überhänge generiert, muss dieser Schritt mit einer *Taq*-Polymerase nachgeholt werden.

Tabelle 3.10 zeigt den entsprechenden Reaktionsansatz, der für 30 min bei 72°C im Thermocycler inkubiert wurde.

**Tabelle 3.10 Reaktionsansatz zum Generieren von A-Überhängen**

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
<i>Taq</i> -Polymerase	5U/μl	0,25μl	1,25U
dATPs	10pmol/μl	1,0μl	0,34pmol/μl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,6μl	1,67mM
<i>Taq</i> Puffer	10x	3μl	1x
PCR-Produkt	-	15μl	-
H <sub>2</sub> O	-	1,15μl	-
		Σ 30,0μl	

### 3.9.1.3 Ligationsreaktion für die TA-Klonierung

Für die Ligationsreaktion wurden im Anschluss 4μl des PCR-Ansatzes (siehe Tabelle 3.10) mit 1μl Salzlösung und 1μl des linearisierten Vektors auf Eis pipettiert, durch Rühren gemischt und dann 30 min bei RT inkubiert.

### 3.9.2 Das Gateway Klonierungssystem

Bei dem *Gateway* Klonierungssystem handelt es sich um eine universelle Klonierungsmethode basierend auf einer gerichteten Rekombination an spezifischen Rekombinationsstellen. Ein Vorteil im Vergleich zu anderen Klonierungsmethoden besteht darin, dass das zu klonierende Fragment aufgrund der spezifischen Rekombinationsstellen automatisch in der richtigen Orientierung eingebaut wird. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das *Insert* für unterschiedlichste Analysen zuverlässig und zeitsparend in beliebige andere *Gateway*-Vektoren eingefügt werden kann.

In dieser Arbeit wurde als *entry clone* der Vektor pDONR221 verwendet. Er ist mit sogenannten *attP2* Rekombinationsstellen ausgestattet. Um beispielsweise die kodierende Sequenz des humanen *PNPT1*-Gens zu klonieren, müssen entsprechende Primer gewählt werden, die das zu amplifizierende Fragment beidseitig mit *attB recombination sites* versehen. Das *attB*-PCR-Produkt wird in der so genannten *BP* Reaktion mithilfe eines Enzyms, der BP Clonase II (Invitrogen), mit dem Vektor pDONR221 zu einem neuen Konstrukt rekombiniert. Dabei wird das *Insert* (das *ccdB*-Gen) im Vektor pDONR221 ausgeschnitten und das PCR-Produkt eingefügt. Es entsteht der Vektor pDONR221-h*PNPT1*, also ein *entry clone* mit der humanen Sequenz des *PNPT1*-Gens. Der Vektor pDONR221-h*PNPT1* wird genau wie andere konventionelle Vektoren in kompetente Bakterien transformiert und durch Kontrollverdau und Sequenzierung analysiert. Der pDONR221-Vektor ist allerdings mit keinen Eigenschaften ausgestattet, die weitere funktionelle Untersuchungen zulassen. In einer weiteren Reaktion, der *LR* Reaktion, kann das *Insert* aus dem Vektor pDONR221-h*PNPT1* in eine Vielzahl von anderen sogenannten

*destination vectors* überführt werden. Dies geschieht durch eine Rekombinations-Reaktion mithilfe des Enzyms LR Clonase II (Invitrogen). Da das neu entstandene Konstrukt für eine andere Resistenz kodiert als die des Vektors pDONR221-h*PNPT1*, ist eine Selektion mit entsprechenden Antibiotika möglich. In dieser Arbeit wurden beispielsweise die Gateway-Expressionsvektoren DEST40 zur Expression in Säugetierzellen und pBAD-DEST49 zur induzierbaren Expression in Bakterien verwendet. Vektorkarten für *entry clones* und *destination vectors* sind im Anhang dargestellt.

### 3.10 Kompetente Bakterien

Bakterien eignen sich aufgrund ihrer kurzen Generationszeit von 20 bis 60 min und ihrer einfachen Handhabung besonders gut für molekularbiologische Arbeiten.

Unter kompetenten Bakterien versteht man Bakterien, die chemisch auf die Aufnahme von fremden DNA-Molekülen vorbereitet worden sind. Für diese Arbeit wurden chemisch kompetente Zellen (*One Shot® TOP10-Zellen*, Invitrogen) verwendet.

### 3.11 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien

Chemisch kompetente *One Shot® TOP10-Zellen* (Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 2µl des zu transformierenden Plasmids gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis, die die Anlagerung der Fremd-DNA an die Bakterienzellmembran ermöglicht, wurden die Zellen für 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Der Hitzeschock dient der Destabilisierung der Membran, sodass die Plasmid-DNA in die Wirtszelle aufgenommen werden kann. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wurden die Zellen bei 37°C und 200rpm für eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit können sich die Zellen regenerieren und die durch das aufgenommene Plasmid kodierte Resistenz ausbilden.

Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf entsprechenden Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.12 Bakterien-Übernachtskulturen

Zur weiteren Untersuchung und Vermehrung der Plasmide wurden von Einzelkolonien Übernachtskulturen angeimpft.

In einem sterilen 14ml-Röhrchen wurden 5ml antibiotikahaltiges LB-Medium vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie gepickt und in ein vorbereitetes Röhrchen überführt. Eine Einzelkolonie ist durch die Vermehrung von einem einzigen Bakterium entstanden. Es handelt sich bei den Zellen einer Kolonie daher um identische Klone, die alle das gleiche Plasmid tragen. Die angeimpften Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert.

### 3.13 Glycerolstocks zur Konservierung transformierter Bakterien

Zur langfristigen Konservierung von transformierten Bakterien wurden Glycerolstocks angelegt, die bei -20°C und -70°C aufbewahrt werden. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass Bakterien (inklusive ihrer Plasmide) auch noch nach Jahren rekultiviert werden können. Für die Lagerung bei -20°C wurden 500µl einer Bakterien-Übernachtskultur mit 500µl Glycerin (87%ig) in einem Röhrchen eingefroren. Die Konservierung bei -70°C erfordert 250µl Glycerin (87%ig) und 1000µl einer Bakterien-Übernachtskultur.

### 3.14 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (MiniPrep)

Um Plasmide für weitere molekularbiologische Arbeiten verwenden zu können, müssen sie zunächst aus den Bakterienkulturen isoliert werden. Isolierte Plasmide können anschließend durch einen aussagekräftigen Restriktionsverdau und durch Sequenzierung auf ihre Größe und Fehlerfreiheit untersucht werden, bevor sie z.B. für die Transfektion in Säugerzellen verwendet werden.

Zur Isolierung von Plasmiden aus Übernachtskulturen wurde das *GenElute™HP Plasmid Miniprep Kit* von Sigma benutzt.

Von der Bakterienkultur wurden 2ml in einem 2,0ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugieren pelletiert und der flüssige Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200µl RNase-haltigem Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 200µl Lysepuffer und mehrmaligem Invertieren wurden die Zellen 5 min bei RT lysiert. Die Lyse wurde durch 350µl Neutralisationspuffer beendet. Nach erneutem Invertieren wurde der Ansatz für 10 min in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um die Plasmide an die Säulen-Matrix zu binden, wurde der klare Überstand auf die mit einer Präparationslösung vorbereiteten Aufreinigungssäulen gegeben und 1 min zentrifugiert. Salze und Proteinüberreste wurden in zwei Waschschritten mit ethanolhaltigen Puffern durch Zentrifugation entfernt. Die Aufreinigungssäule wurde in ein neues steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Eluierung erfolgte durch das Zentrifugieren mit 50-100µl H<sub>2</sub>O.

### 3.15 Mutagenese mit dem *QuikChange® II Site-directed Mutagenesis Kit*

Um die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Mutation im *PNPT1*-Gen und weitere Punktmutationen in ein Plasmid einzubauen, wurde ein Mutagenese-Kit von Agilent verwendet.

Zunächst müssen ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer *designt* werden, die die gewünschte Veränderung enthalten und abgesehen davon aber komplementär zum Ausgangsplasmid sind. Dabei sollte die Veränderung möglichst mittig in den Primern positioniert sein. Die Primer-Anlagerungstemperatur muss mindestens 78°C betragen, was durch eine Primergröße zwischen 30 und 45 Basen erzielt werden kann. Mit dem

Ausgangsplasmid als Matrize und den Mutagenese-Primern entstehen in einer PCR mit 18 Zyklen die veränderten Plasmide mit Mutation. Aufgrund ihrer hohen Komplementarität können die Primer trotz einer Basenfehlpaarung (durch die zu erzielende Veränderung) an das DNA-Plasmid binden und wie bei einer Standard-PCR als Startpunkte für die Elongation dienen. So entsteht im Idealfall eine große Anzahl von Plasmiden mit der gewünschten Veränderung.

Da das Ausgangsplasmid in *E.coli*-Bakterien synthetisiert worden ist, ist das Plasmid methyliert und hemimethyliert. Diese Tatsache wird sich hier zunutze gemacht, indem ein Enzym eingesetzt wird (*DpnI*), das selektiv methylierte und hemimethylierte DNA abbaut. Das veränderte Plasmid, das mittels PCR amplifiziert worden ist, ist von diesem Abbau nicht betroffen. Die so entstandenen veränderten Plasmide wurden in *XL10-Gold* ultrakompetente Zellen transformiert. Anschließend wurden einzelne Klone gepickt, die Plasmide mittels Miniprep isoliert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert.

### 3.15.1 Mutagenese-PCR und Transformation

Die Mutagenese-Reaktion wird auf Eis pipettiert und enthält die in Tabelle 3.11 aufgeführten Komponenten:

**Tabelle 3.11 Zusammensetzung der Mutagenese-Reaktion**

Komponente	Volumen/Menge
Puffer (10x)	5µl
dNTP-Mix	1µl
Plasmid-DNA	10-50ng
<i>QuikSolution</i>	3µl
Mutagenese-Primer-F	125ng
Mutagenese-Primer-R	125ng
<i>PfuUltra HF</i> Polymerase	1µl
H <sub>2</sub> O	ad 50µl

Das entsprechende Temperaturprofil zeigt Tabelle 3.12:

**Tabelle 3.12 PCR-Temperaturprofil für die Mutagenese-Reaktion**

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	1	18x
Anlagerung	60	1	
Elongation	68	8	
Finale Elongation	68	16	1x

Die Elongationszeit ist dabei von der Größe des Plasmids abhängig. Die *PfuUltra HF* Polymerase kann circa 1kb/min synthetisieren.

Im Anschluss an die PCR wird 1µl *DpnI*-Restriktionsenzym (10U/µl) in das Reaktionsgefäß gegeben, kurz gemischt und dann bei 37°C für 1 h im Thermocycler inkubiert.

Die Transformation der Plasmide in *XL10-Gold* ultrakompetente Zellen verläuft wie in Kapitel 3.11 beschrieben. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde zu den Zellen 2µl



$\beta$ -Mercaptoethanol gegeben. Nach Inkubation auf Eis wurden 2  $\mu$ l der *DpnI*-behandelten Plasmide zu den Zellen gegeben. Es folgten ein Hitzeschock bei 42° und anschließend die Zugabe von 250  $\mu$ l vorgewärmtem SOC-Medium. Die Zellen wurden bei 37°C und 225rpm für 1 h inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.16 Restriktionsenzyme

Bakterien schützen sich mit Restriktionsenzymen vor fremder DNA, z.B. nach einer Infektion durch Bakteriophagen. Dabei erkennt das Restriktionsenzym die Fremd-DNA und zerschneidet sie; die eigene DNA bleibt unversehrt. Restriktionsenzyme weisen meist spezifische Erkennungssequenzen aus vier, sechs oder acht palindromisch angeordneten Basen auf. Der Abbau der DNA erfolgt durch enzymatische Spaltung von Phosphodiesterbindungen im DNA-Rückgrat. Dabei entstehen entweder sog. klebrige Enden („*sticky ends*“) mit einem einzelsträngigen Überhang oder glatte Enden („*blunt ends*“) ohne Überhang.

Schnittstellen einer DNA-Sequenz können mit Hilfe von *online* verfügbaren Computerprogrammen (z.B. *Nebcutter*) ermittelt werden. Durch die Eingabe der zu schneidenden Sequenz kann eine virtuelle Restriktionskarte erstellt werden, die alle theoretischen Schnittstellen von Restriktionsenzymen anzeigt.

#### 3.16.1 Kontrollverdau isolierter Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Überprüfung der korrekten Orientierung des eingefügten DNA-Fragments in einem Plasmid wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Zur Ermittlung geeigneter Restriktionsenzyme und -schnittstellen wurde das *online* Computerprogramm *Nebcutter* von NEB verwendet. Ziel war es, ein Restriktionsenzym zu identifizieren, das es erlaubt, das Plasmid so zu schneiden, dass Fragmente entstehen, die es aufgrund ihrer Größe ermöglichen die Orientierung des *Inserts* zu beurteilen.

Tabelle 3.13 zeigt beispielhaft einen Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *XbaI* (NEB). Abbildung 3.1 zeigt die spezifische Erkennungssequenz des Enzyms:



**Abbildung 3.1 Erkennungssequenz von *XbaI***

Die schwarzen Dreiecke zeigen die spezifischen Schnittstellen an.

**Tabelle 3.13 Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau mit dem Enzym *XbaI***

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
<i>XbaI</i> Restriktionsenzym	20U/μl	0,25μl	5U
NEB2 Puffer	10x	3,0μl	1x
BSA	100x	0,3μl	1x
DNA	100ng/μl	4,0μl	400ng (total)
H <sub>2</sub> O	-	22,45μl	-
		Σ 30,0μl	

Die Inkubation erfolgte in der Regel über Nacht bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz mit Gelladepuffer versetzt und auf einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetrennt, um die Fragmentgrößen bestimmen zu können.

### 3.16.2 Verdau von PCR-Produkten

Wie Plasmide können auch PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme verdaut werden. Durch Mutationen können Schnittstellen entstehen oder verloren gehen und durch das Schneiden mit einem geeigneten Restriktionsenzym nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beispielsweise das Enzym *Hpy188III* eingesetzt. Es schneidet ein PCR-Produkt spezifisch an einem Basenaustausch (Mutante), das Wildtyp-PCR-Produkt wird nicht geschnitten.

## 3.17 Zellkultur und Transfektion

### 3.17.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Aufgrund der allgemein hohen Anfälligkeit von Säugerzellen in Kultur für Kontaminationen durch Bakterien und Pilze, wurde immer unter einer Sterilbank gearbeitet. Es kamen nur sterile Lösungen, Kulturschalen und Geräte zum Einsatz.

Die Zellen (Hek293T, COS7 und MEFs) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) kultiviert. Dieses Medium enthält neben Vitaminen, Aminosäuren, Salzen und Glukose auch einen pH-Indikator. Dem Medium wurden 10% fötales Kälberserum (FKS) und die Antibiotika bzw. Antimykotika Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B zugefügt. Die Zellen wurden in 10cm-Kulturschalen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.17.2 Subkultivierung von Säugetierzellen

Um ein Überwachsen der Zellen und somit ihr Absterben zu verhindern, müssen Zellen regelmäßig *gesplittet* und mit frischem Medium versorgt werden.

Zeigten die Zellen eine nahezu vollständige Konfluenz, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (1x) gewaschen. Anschließend wurde 1ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und für 5 min im Brutschrank unter den o.a. Bedingungen inkubiert. Durch das Trypsin werden Arginin- und Lysinreste der Adhärenzmoleküle gespalten, die für den festen Kontakt zwischen Zellen und Kulturschale verantwortlich sind. EDTA bindet dabei die in der Lösung enthaltenen und für die Stabilisierung zellbindender Membranproteine

notwendigen zweiwertigen Kationen (u.a.  $Mg^{2+}$ ). Die Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung wird durch die Zugabe von 9ml frischem DMEM inaktiviert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Zellgemisch homogenisiert. Um eine Verdünnung von 1:10 zu erreichen, wurde 1ml der Zellsuspension mit 9ml frischem DMEM in eine neue sterile Kulturschale gegeben.

### 3.17.3 Transfektion von Säugetierzellen mit Expressionsvektoren

Für die Transfektion mit Expressionsvektoren wurden Säugetierzellen am Vortag so ausplattiert, dass sie am folgenden Tag eine Konfluenz von 50-70% erreichen.

Beispielhaft wird eine Transfektion von MEFs mit dem pcDNA3.1-*PNPT1*-WT-V5-His-Konstrukt beschrieben: Unter einer Sterilbank werden 250µl Optimem (RT) in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. 5µg Plasmid-DNA werden hinzugegeben und gemischt. 10µl FuGENE HD Transfektionsreagenz werden direkt in das Gemisch hinein pipettiert und kurz *gevortext*. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wird das Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Das Medium wird dabei vorher nicht gewechselt.

## 3.18 Western-Blot-Analyse

### 3.18.1 Vorbereitung von Proteinproben

Um Proteine aus Zellen bzw. aus Geweben auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel auftrennen und anschließend detektieren zu können, müssen die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurden Proteine aus Säugetierzellen, aus Geweben und Bakterien gewonnen. Gewebe wurde zunächst mechanisch homogenisiert. Dies geschah entweder mit einem Homogenisator (*TissueRuptor*, Qiagen) oder mit einem Mörser und Stößel. Adhärenente Zellen wurden 2x mit kaltem PBS gewaschen und dann mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst. Alle Proben wurden in RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) aufgenommen und durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Zum Aufbrechen der Zellen wurden die Proben eingefroren, auf Eis wieder aufgetaut und in einem Ultraschallbad 3x 30 sec behandelt. Nach 30 min auf Eis wurde das Zelllysate in einer Tischzentrifuge für 8 min bei 4°C und 12.000rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die Zellproteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proteinproben wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit 2x SDS-Gelladepuffer versetzt und im Thermoblock 5 min bei 95°C denaturiert. Der SDS-Gelladepuffer enthält zusätzlich einen Protease-Inhibitor, um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu hemmen. Das β-Mercaptoethanol dient zum Auftrennen von Disulfidbrücken. Die so vorbereiteten Proben können mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

### 3.18.2 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE

Proteine können mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Obwohl die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine bei der PAGE sowohl von ihrer Ladung als auch von ihrer Größe abhängig ist, kann

die Ladung der Proteine hier vernachlässigt werden. Das anionische Detergenz SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine, wodurch die eigentliche Ladung der Proteine maskiert wird. Die Wandergeschwindigkeit der aufzutrennenden Proteine hängt demnach im Wesentlichen von dem Molekulargewicht der SDS-Protein-Komplexe ab.

Die Grundsubstanz für die *SDS-PAGE* ist das Polyacrylamid. Durch die Polymerisation von Acrylamid (AA) und der Vernetzung mit Bis-Acrylamid (BIS) entsteht das Polyacrylamid-Gel. Dabei wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) die Polymerisation initiiert; TEMED (Tetramethylethyldiamin) fungiert hierbei als Starter der Radikalkettenreaktion. APS bildet mit H<sub>2</sub>O freie SO<sub>4</sub>-Radikale, die mit AA zu Acrylamidradikalen reagieren und mit weiteren Radikalen lange Ketten bilden. BIS ist dabei für die Ausbildung von Netzstrukturen mit dem AA verantwortlich. Die Porengröße eines Gels kann durch die AA-Konzentration variiert werden.

In dieser Arbeit wurden *NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gele* von Invitrogen verwendet. Mit einem AA-Anteil von 4% sind die Poren im oberen Bereich des Gels relativ groß. Die Porengröße nimmt mit der kontinuierlichen Zunahme des AA-Anteils bis auf 12% im unteren Bereich des Gels ab. Die *SDS-PAGE* und der anschließende Proteintransfer auf eine PVDF-Membran wurden in einer *XCell SureLock™-Minizelle* (Invitrogen) durchgeführt. Ein *NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel* wurde in die Minizelle eingesetzt und die Kammern mit MOPS-Laufpuffer gefüllt. In jede Geltasche wurden 20µl der denaturierten Proteinprobe bzw. 8µl des Protein-Standards *Novex Sharp Standard* (Invitrogen) gefüllt. Der Lauf erfolgte für 55 min bei 200V und 120mA.

### 3.18.3 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Membran transferiert. Dabei wurden die negativ geladenen Proteine durch ein angelegtes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) *geblottet*. Die Membran wurde zuvor zum Aktivieren 30 sec in Methanol inkubiert. Nach kurzem Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O schloss sich eine Äquillibrierungsphase von 15 min in Transferpuffer an. Die für das *Blotten* benötigten Schwämme und Filterpapiere wurden in Transferpuffer eingeweicht. Die *Blotkammer* wurde mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte für 75 min bei 32V und 210mA.

### 3.18.4 Inkubation mit Antikörpern und Chemilumineszenz-Detektion

Das Prinzip des Proteinnachweises über den *Western Blot* basiert auf dem Einsatz von primären und sekundären Antikörpern. Der primäre AK bindet an das Protein bzw. Epitop für das er spezifisch ist. Der sekundäre AK ist artspezifisch. Er erkennt den primären Antikörper und bindet an ihn. Der sekundäre Antikörper ist dabei mit einer Meerrettisch-Peroxidase (*horseradish-peroxidase*, *HRP*) gekoppelt, die letztlich die Detektion durch Chemilumineszenz ermöglicht.

Ein Beispiel: Der proteinspezifische primäre PNPase-Antikörper (ptglab) wurde in Kaninchen produziert und erkennt die humane PNPase. Um sie zu detektieren, wurde ein sekundärer Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit einer HRP gekoppelt ist, verwendet.

Die für die Chemilumineszenz verantwortliche HRP katalysiert eine Reaktion, bei der Luminol in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oxidiert wird. Die freiwerdende Energie wird dabei in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 400 bis 700nm abgegeben. Das emittierte Licht kann durch Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert werden. Je stärker die Oxidation, desto intensiver ist als Signal eine Schwarzfärbung auf dem entwickelten Film zu erkennen. Die zur Detektion verschiedener Proteine verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Abschnitt 2.19 aufgeführt.

### 3.18.5 Praktische Durchführung

Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 5 min in PBS-T-Lösung gewaschen. Anschließend wurde 2 h lang in 5%iger PBS-Milch-Lösung bei RT geblockt.

In 50ml-Falcon-Röhrchen wurden pro Ansatz 6ml 2,5%ige PBS-T-Milch-Lösung vorgelegt und der entsprechende Antikörper zugegeben. Die Membran wurde dann mit der Proteinseite nach innen in das entsprechende 50ml-Falcon-Röhrchen überführt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehgerät inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 4x für 5 min mit einer PBS-T-Lösung gewaschen. Die Membran wurde in eine Schale mit 2,5%iger PBS-T-Milch-Lösung mit entsprechenden Sekundärantikörpern überführt und eine Stunde auf einem Plattenschüttler bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde die Membran dreimal für 5 min in der PBS-T-Lösung gewaschen. Während des letzten Waschschriffs wurde die Chemilumineszenzreaktion (*Pierce® BCA Protein Assay Kit*) vorbereitet. Die Membran wurde an Zellstoff abgetropft und mit der Proteinseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt. Die vorbereitete Chemilumineszenzlösung wurde anschließend so auf die Membran gegeben, dass diese vollständig bedeckt war. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Membran erneut abgetropft und zwischen zwei Folien in einer Filmkassette fixiert. Zur Visualisierung wurde ein Film (*Amersham Hyperfilm ECL*) aufgelegt und für unterschiedliche Zeiträume exponiert und anschließend entwickelt.

## 3.19 Indirekte Immunfluoreszenz-Markierung von Zellen

Die Immunfluoreszenz-Markierung ermöglicht die Lokalisierung eines zu untersuchenden Proteins innerhalb der Zelle. Dafür werden Primärantikörper verwendet, die entweder ein endogenes oder ein rekombinantes exogenes Protein (beispielsweise ein Protein mit V5-Markierung) erkennen.

Im Folgenden wird beispielhaft die Immunfluoreszenz-Markierung von MEFs, die mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1-hPNPT1-WT-V5-His transfiziert wurden, beschrieben. Weitere

Fluoreszenz-Markierungen von Zellen in dieser Arbeit wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt.

### 3.19.1 Transfizieren von MEFs mit pcDNA3.1-*hPNPT1*-WT-V5-His-Konstrukten

MEFs wurden wie unter dem Abschnitt *Zellkultur und Transfektion* beschrieben (siehe Kapitel 3.17) mit dem pcDNA3.1-*hPNPT1*-WT-V5-His-Konstrukt transfiziert.

### 3.19.2 Splitten auf Deckgläschen

Nach 24 h werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert und in frischem Medium resuspendiert. In eine *six-well*-Platte werden sterile Deckgläschen gelegt, auf die die Zellen *gesplittet* werden.

### 3.19.3 Fixierung mit Methanol

Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank werden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1ml eiskaltem Methanol (Verhältnis 1:1) fixiert (5 min auf Eis).

### 3.19.4 Blocken und Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Nach dem Waschen mit PBS werden die Deckgläschen in 10% *Horse*-Serum-PBS (*Blocking*-Lösung) zum Absättigen von unspezifischen Proteinbindungsstellen auf einem Plattenschüttler für 1 h bei RT inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörper(n), hier *mouse* anti-V5 (1:250), findet über Nacht bei 4°C in *Blocking*-Lösung statt. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper, ein *rabbit*-anti-*mouse*-Alexa488 (Invitrogen), wird für 1 h bei RT in *Blocking*-Lösung inkubiert. Anschließend wird 3x vorsichtig mit PBS gewaschen.

### 3.19.5 Zellkernfärbung und Eindeckeln

Um die Zellen mikroskopieren zu können, wurde ein Tropfen des Eindeckel-Mediums *ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI* (Invitrogen) auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit den Zellen darauf gelegt. Das Eindeckel-Medium erhält die Fluoreszenz für mehrere Wochen. Des Weiteren enthält es *DAPI*, einen Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch DNA und somit den Zellkern anfärbt. Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

## 3.20 Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien

### 3.20.1 Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien durch *pDsRed1-Mito*

Das *DsRed1-Mito*-Plasmid (Clontech) wurde zur Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien eingesetzt. Es kodiert für ein rot fluoreszierendes Protein aus *Discosoma* sp. Dieses Protein ist mit einer mitochondrialen Lokalisierungssequenz der humanen Untereinheit VIII der Cytochrom-c-Oxidase rekombiniert worden. Wird dieses rekombinante Protein in Zellen

exprimiert, reichert es sich in den Mitochondrien der Zellen an und kann bei Anregung durch Licht der entsprechenden Wellenlänge (Emissionsmaximum bei 558nm) im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden.

### 3.20.2 Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien mit *MitoTracker*<sup>®</sup>

In einem anderen Ansatz wurden Mitochondrien mit dem *Mitotracker*<sup>®</sup> *Red CMXRos* (Invitrogen) fluoreszenzmarkiert. Dafür wurden Säugetierzellen vor der Fixierung mit *Mitotracker* (Endkonzentration 250nM) in normalem DMEM Vollmedium für 45 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Der *Mitotracker*<sup>®</sup> *Red CMXRos* fluoresziert erst, wenn er in den Mitochondrien einer lebenden Zelle oxidiert wird.

## 3.21 Innenohr-Präparation

### 3.21.1 Präparation und Fixierung des murinen Innenohrs

CD-1 Mäuse im Alter von 1 bis 6 Tagen wurden für die Entnahme des Innenohrs verwendet. Das Mittel- und Innenohr ist mit einem Knochen des Schädels, dem Schläfenbein, fest verbunden. Nach der Dekapitation der Maus wird das Schläfenbein mitsamt dem Innenohr grob präpariert und umgehend in ein Präparationsmedium (HBSS-Hepes) überführt. Unter einem Präparations-Stereo-Mikroskop wird dann mit feinen Pinzetten das Innenohr, also die Cochlea (Schnecke) und das Labyrinth (Gleichgewichtsorgan), präpariert und von Gewebe, Knorpel und Knochen befreit. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sowohl das runde als auch das ovale Fenster geöffnet wird, damit die Fixierlösung gut in die Cochlea eindringen kann. Zur Fixierung wird eiskaltes Methanol verwendet in dem die Präparate für 20 min auf Eis inkubiert werden. Es folgen drei Waschschrte mit PBS. Über Nacht werden die Cochleae in 30% Sucrose-PBS bei 4°C aufbewahrt und können anschließend eingebettet werden.

### 3.21.2 Einbettung und Herstellung von Gefrierschnitten

Zum Einbetten wird ein Einbettmedium aus 1% *low melting* Agarose (Sigma-Aldrich) und 18% Sucrose in PBS hergestellt. Das Einbettmedium wird durch Erwärmen auf 70°C verflüssigt, anschließend auf Körpertemperatur abgekühlt und dann in kleine Petrischalen gefüllt. Die Cochleae werden unter dem Präparations-Stereo-Mikroskop so in dem Medium positioniert, dass das runde und ovale Fenster nach oben zeigen.

Nach dem Aushärten der *low melting* Agarose werden die Präparate herausgeschnitten. Ein Tropfen *TissueTek* wird auf einen Objekthalter für Gefriermikrotome gegeben und der Agaroseblock mit der Cochlea darin so ausgerichtet, dass das runde und ovale Fenster nach unten zeigen. Mit Kryospray wird das *TissueTek* und der Agaroseblock schockgefroren und in den bei -35°C vorgekühlten Cryostaten gegeben. Um Temperaturunterschiede auszugleichen, sollten die Proben mindestens 30 min bei -35°C im Cryostaten ruhen bevor

sie geschnitten werden. Die Cochleae werden zunächst in 50µm Schritten grob getrimmt, bis die gewünschten Strukturen der Cochlea sichtbar werden. Dann werden Schnitte von 10-14µm angefertigt und auf Superfrost Objektträger aufgebracht. Eine Inkubation der Proben für 3 h bei 37°C bewirkt das die Schnitte gut an den Objektträgern haften bleiben. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

### 3.21.3 Immunhistochemie auf Cochlea-Gefrierschnitten

Die Cochlea-Schnitte werden mit einem hydrophoben Wachsstift (*ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen*) umrandet und für eine Stunde bei RT in *Blocking-Lösung* (10% Horse-Serum in PBS und 0,2% Triton X-100) inkubiert. Die Primärantikörper werden in der gleichen *Blocking-Lösung* (jedoch ohne Triton X-100) verdünnt und auf die Präparate gegeben. Um das Austrocknen über Nacht zu verhindern, werden die Objekte in einer Feuchtkbox aufbewahrt. Nach drei Waschschritten mit PBS-T werden am nächsten Tag die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper in *Blocking-Lösung* verdünnt und für 1 h bei RT auf den Schnitten belassen. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-T werden die Schnitte in Fluoreszenz-Einbettmedium (*fluorescence mounting medium*) eingedeckelt und können nach einer Trocknungsphase von 12 h unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

## 3.22 *In situ* Hybridisierung im Zebrafisch

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht es, RNA u.a. in Zebrafischembryonen sichtbar zu machen. Dabei wird eine Sonde generiert, die komplementär zu der zu untersuchenden mRNA ist und an diese hybridisiert. Die Sonde ist dabei z. B. mit Digoxigenin (DIG) markiert. In einer enzymatischen Reaktion setzt die an einen DIG-Antikörper gebundene Peroxidase einen Farbstoff um. Zellen, in denen das entsprechende Gen aktiv und die zugehörige mRNA vorhanden ist, können auf diese Weise markiert werden.

### 3.22.1 Generierung einer DIG-markierten RNA-Sonde für die *in situ* Hybridisierung

Ein Zebrafisch EST-Klon (GenBank: EE702826), der circa 900 bp des Zebrafisch *PNPT1*-Gens beinhaltet, wurde von der Firma imaGenes (heute: Source BioScience LifeSciences, Nottingham, UK) bezogen. Der Klon wurde mit *EcoRI* oder *NotI* linearisiert, um als Matrize für eine *sense*- bzw. *antisense*-Sonde zu dienen. Die *in vitro* Transkription und die damit verbundene DIG-Markierung wurde mit dem *DIG RNA Labeling kit* (Roche) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Sonden wurden anschließend mit *DNase I* behandelt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in RNase freiem Wasser und Formamid gelöst. Bis zur Verwendung wurde die Sonde bei -80°C gelagert.



### 3.22.2 *In situ* Hybridisierung (Labor Prof. Dr. Hammerschmidt, Köln)

Die *in situ* Hybridisierung wurde mit DIG-markierten RNA-Sonden in verschiedenen Entwicklungsstadien des Zebrafischs im Labor von Prof. Dr. Mathias Hammerschmidt von Dr. Hans-Martin Pogoda durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise ist in Hammerschmidt *et al.* 1996 beschrieben.

### 3.23 Morpholino-Knockdown von *PNPT1* im Zebrafisch

Bei Morpholinos handelt es sich um *antisense* Oligos die zur Herunterregulierung der Expression einzelner Gene *in vivo* verwendet werden. Sie finden vor allem in der Entwicklungsbiologie Anwendung. Morpholinos bestehen aus kurzen Ketten mit circa 25 Morpholino-Einheiten. Jede Einheit besteht aus einer Nukleinsäure-Base, wobei die Basen über einen heterozyklischen Morpholinring verbunden sind (Heasman, 2002)

Funktionell wird zwischen zwei Arten von Morpholinos unterschieden:

Ein ATG-Morpholino ist gegen das Startcodon einer mRNA gerichtet. Er hybridisiert an seine Zielsequenz und verhindert durch eine feste Bindung die Translation durch die Ribosomen. Ein *Splice*-Morpholino ist gegen eine Spleiß-Seite im primären Transkript gerichtet. Die durch den Morpholino blockierte Spleiß-Stelle kann von der *Splicing*-Maschinerie nicht erkannt werden und es kommt zu einem Exon-*Skipping*. Idealerweise sollte das „zu *skippende*“ Exon so gewählt werden, dass das *Skipping* zu einer Leserasterverschiebung und dadurch zu einem frühzeitigen Stoppcodon führt (www.geneTools.com). Beide Morpholino-Arten führen im Gegensatz zu siRNA nicht zu einer Degradation des RNA-Zielmoleküls, sondern zu einer räumlichen Behinderung der Translationsinitiation bzw. des Spleißens.

Der Zebrafisch wurde bereits häufig als Modellorganismus für die Erforschung des Hörens herangezogen (Whitfield, 2002). Um die Bedeutung der PNPase auf das Hören im Zebrafischmodell zu untersuchen, wurden ein ATG-Morpholino und ein *Splice*-Morpholino angewendet. Als Negativkontrolle für den *Splice*-Morpholino diente ein *Mismatch*-Morpholino, bei dem im Vergleich zum Original-Morpholino jeweils 5 Basen ausgetauscht worden sind, sodass er nicht mehr sequenzspezifisch binden kann.

Die Morpholinos wurden unmittelbar nach der Befruchtung in Zebrafisch-Eier injiziert. Fünf Tage nach den Injektionen wurden die Embryonen auf ihr Hörvermögen und ihre Morphologie hin untersucht.

#### 3.23.1 Morpholino-Design

Da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit weder die vollständige Sequenz noch die genomische Struktur des Zebrafisch-*PNPT1*-Gens in Datenbanken annotiert waren, wurde für eine Morpholino-Auswahl zunächst die Genstruktur partiell aufgeklärt werden. Die mRNA-Sequenz wurde über *RACE* und RT-PCR ermittelt (siehe Abschnitte 3.5 und 3.3). Die entsprechende Proteinsequenz wurde mit der *Blat*-Suche von UCSC gegen das Zebrafisch-Genom *geblastet*, sodass einige Exon-Intron-Grenzen identifiziert werden

konnten. Sequenzbereiche mit Startcodon bzw. mit Exon-Intron-Grenzen wurden an *GeneTools* übermittelt und das Morpholino- und *Mismatch-Morpholino-Design* dort durchgeführt. Die Morpholino-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

### 3.23.2 Morphologische Untersuchungen

Fünf Tage nach der Befruchtung ist das Ohr des Zebrafisches soweit ausgebildet, dass der Fisch akustische Reize wahrnehmen kann (Nicolson, 2005). Mit Morpholinos injizierte Fische wurden unter dem Stereomikroskop auf morphologische Auffälligkeiten, insbesondere des Ohres, und auf ihre Vitalität hin untersucht.

### 3.23.3 Hör-Tests

Auf ein plötzliches Geräusch reagieren Zebrafische mit einer reflexartigen schnellen Bewegung, der *startle response* (Nicolson *et al.*, 1998). Die *startle response* und damit das Hörvermögen von mit Morpholinos behandelten Zebrafischen wurden mit einer selbst konstruierten Apparatur getestet. Ein Plastikstab fällt dabei aus einer definierten Höhe auf den Rand einer Petrischale, in der sich der zu testende Fisch befindet. Jeder Fisch wird auf diese Weise dreimal getestet. Zwischen jeder Testung lag eine Pause von circa 20 sec.

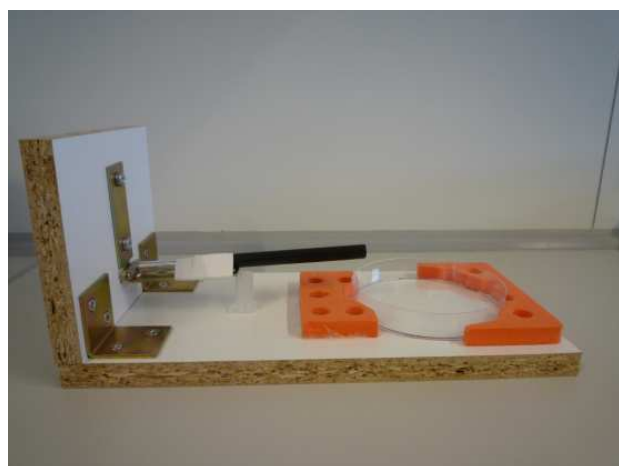


Abbildung 3.2 Apparatur zur Testung der *startle response* im Zebrafisch

## 3.24 Komplementationsversuche in *E. coli*

Der *Knockout* der *pnpase* in *E. coli* führt unter oxidativem Stress zu einem starken Wachstumsdefizit (Wu *et al.*, 2009). Ein vollständiger *pnpase Knockout*-Stamm (JW5851) wurde über das National BioResource Project (Japan) bezogen und mit PNPase-Konstrukten (WT bzw. Mutante) transformiert. Die Expression der Konstrukte wurde mit L-Arabinose induziert und über *Western Blots* kontrolliert. Der *E. coli*-Stamm BW25113 wurde als Wildtyp-Referenz verwendet. Unter Stresskonditionen - ausgelöst durch Wasserstoffperoxid - wurde die Komplementationsfähigkeit von Wildtyp- bzw. mutierter PNPase in *Spot Tests* und in Flüssigkulturen untersucht.

### 3.24.1 Spot Tests

Die verschiedenen *E. coli*-Stämme (Wildtyp, *Knockout*, *Knockout* + WT und *Knockout* + Mutante) wurden über Nacht in LB-Medium bei 37°C geschüttelt und am nächsten Tag erneut angeimpft. Die exponentiell wachsenden Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt und dann in einer Verdünnungsreihe 1:5 weiter verdünnt. Je 3,5µl der verdünnten Kulturen wurden auf LB-Agarplatten mit 0,0002% L-Arabinose und 0,6mM Wasserstoffperoxid getropft. Nach circa 15 h bei 37°C wurde das Zellwachstum begutachtet und mithilfe digitaler Aufnahmen dokumentiert.

### 3.24.2 Flüssigkulturen

Um die Vitalität der *E. coli* Stämme unter oxidativem Stress in Flüssigkulturen zu untersuchen, wurden exponentiell wachsende Kulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt. Wasserstoffperoxid wurde in Konzentrationen von 0; 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0mM hinzugegeben. Die Expression der Konstrukte wurde durch Zugabe von 0,0002% L-Arabinose ausgelöst. Anschließend wurden die Kulturen unmittelbar in 96-well-Platten dispensiert und für 4 h in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die OD<sub>600</sub> wurde in einem Tecan Safire 2 Plattenlesegerät bestimmt.

## 3.25 Nicht-denaturierende Gel-Elektrophorese (Teitell und Koehler)

Unter physiologischen Bedingungen bilden drei PNPase-Moleküle ein Homotrimer (Portnoy *et al.*, 2008). Um die Fähigkeit der PNPase-Mutante zur Homotrimerbildung zu untersuchen, wurden Mitochondrien aus transformierten Hefen bzw. transfizierten MEFs isoliert und die Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit den Laboren von Prof. Mike Teitell und Prof. Carla Koehler von der *University of California*, Los Angeles, durchgeführt. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Wang *et al.*, 2010, beschrieben.

## 3.26 *In vitro* RNA-Import-Versuche (Teitell und Koehler)

In *in vitro* RNA-Import-Versuchen konnte sowohl in der Hefe als auch in MEFs gezeigt werden, dass die PNPase kleine RNAs, wie z.B. die RNA Komponente der RNase P, in Mitochondrien importiert (Wang *et al.*, 2010). In Kooperation mit den Laboren von Prof. Mike Teitell und Prof. Carla Koehler wurde in RNA-Import-Versuchen untersucht, ob die PNPase-Mutante ein Defizit im RNA-Import in Mitochondrien aufweist. Die Versuchsbedingungen sind beschrieben in Wang *et al.*, 2010.

## 3.27 miRNA Degradationsversuch

Um eine mögliche Funktion der PNPase bei der Degradation von bestimmten microRNAs (Das *et al.*, 2009) zu untersuchen, wurde *in vitro* translatierte PNPase mit RNA/miRNA

inkubiert, die RNA anschließend re-isoliert und dann die quantitativen Veränderungen über *Real-time* PCR bestimmt.

### 3.27.1 Gewinnung von RNA inkl. miRNAs aus murinen Geweben

Cochlea, Leber, Lunge und weitere Gewebe wurden nach der Entnahme in *RNAlater* überführt, um sie vor RNasen zu schützen. In RNase-freien Reaktionsgefäßen wurde das Gewebe in *QIAzol* mithilfe eines Homogenisators homogenisiert. Anschließend wurden *QiaShredder*-Säulen angewendet, um einen gleichmäßig hohen Grad an Homogenisierung und Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

Die Isolation von RNA und miRNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *miRNeasy Mini Kit* inklusive optionalem DNase-Verdau durchgeführt.

### 3.27.2 *In vitro* Translation von rekombinanten PNPase-Proteinen

Ausgehend von den pcDNA3.1-*PNPT1*-V5-His-Konstrukten (WT und E475G-Mutante) wurde eine *in vitro* Translation mit dem *TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System* durchgeführt. Dazu wurde 1µg Plasmid-DNA mit Reticulocyten-Lysat, Reaktionspuffer, Aminosäuren und T7 RNA-Polymerase nach Herstellerangaben bei 30°C für 90 min inkubiert. Das *in vitro* translatierte rekombinante Protein wurde mit dem *MagZ Protein Purification System* aufgereinigt.

### 3.27.3 Inkubation von RNA/miRNA mit rekombinanter PNPase

5µg der isolierten RNA/miRNA wurden mit 5µl *in vitro* translatiertem und affinitätsaufgereinigtem Protein für 0, 90 und 180 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die RNA/miRNA erneut mit dem *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert.

Die quantitativen Auswirkungen wurden über *Real-time* PCR mit entsprechenden miRNA *Taqman* Sonden ermittelt (siehe auch Kapitel 2.8 und 3.4).

## 3.28 Expressionsanalyse von microRNAs in unterschiedlichen Geweben

MiR-96 und weitere microRNAs sind in den sensorischen Haarzellen des Innenohrs stark exprimiert (Mencia *et al.*, 2009). Für den miRNA-Degradationsversuch waren relativ große Mengen an RNA notwendig, die jedoch aus Cochleagewebe in dem Umfang nicht zu gewinnen waren. Um ein alternatives Gewebe mit relativ hoher Expression an miR-96 zu identifizieren, wurde RNA/miRNA aus Niere, Leber, Lunge, Milz, Gehirn und Herz von sechs Tage alten CD-1 Wildtypmäusen gewonnen (siehe auch Kapitel 3.27.1). Mittels *Real-time* PCR wurde die relative Expression von miR-96 in den genannten Geweben bestimmt.

## 3.29 Isolierung von Mitochondrien aus Gewebe

Um RNA aus Mitochondrien zu gewinnen, wurden dies aus dem Lungengewebe von vier Tage alten CD-1 Wildtypmäusen mithilfe eines Mitochondrien-Isolations-Kits

(*Mitochondria Isolation Kit for Tissue, Mitosciences*) angereichert. Das Gewebe wurde in Isolationspuffer in einem Glas-Homogenisator (*Dounce Homogenizer*, im Lieferumfang enthalten) homogenisiert und anschließend bei 1000g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet bestehend aus Zellwänden, Zellkernen etc. wurde verworfen und der Überstand mit den angereicherten Mitochondrien wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 12000g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in QIAzol resuspendiert und mit dem *TissueRuptor* homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte wie bereits unter 3.27.1 beschrieben.

Bei dieser Isolationsmethode wird lediglich eine Anreicherung von Mitochondrien erzielt. Es können somit auch geringe Bestandteile des endoplasmatischen Reticulums in der Isolation enthalten sein.

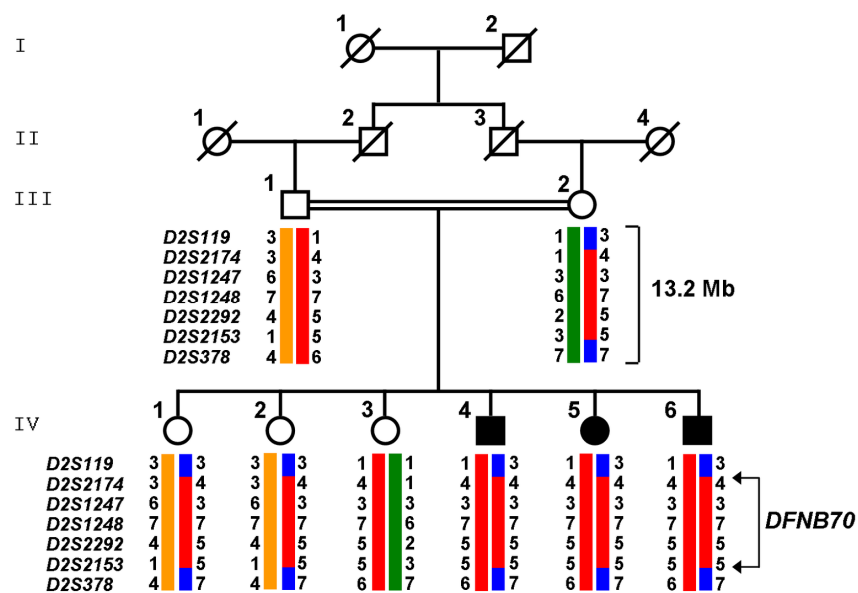
## 4 Eigene Vorarbeiten

Diese Dissertation beruht auf den Ergebnissen meiner Diplomarbeit mit dem Titel *Positionelle Klonierung eines neuen Taubheitsgens auf dem kurzen Arm von Chromosom 2* (Mai 2007 bis März 2008). Es folgt daher einleitend eine kurze Zusammenfassung über den Stand des Projektes zu Beginn der Durchführung dieser Dissertation.

Untersucht wurde eine konsanguine marokkanische Familie (Abbildung 4.1), in der drei Geschwister von Geburt an unter einer nicht-syndromalen autosomal-rezessiven Schwerhörigkeit leiden (siehe auch *Audiogramme*, Anhang, 12.3). Die Eltern und drei weitere Geschwister sind nicht betroffen.

Mutationen in dem *GJB2*-Gen, die mit bis zu 50 % die häufigste Ursache für erbliche nicht-syndromale Taubheit sind (Kenneson *et al.*, 2002), konnten mittels PCR und Sequenzierung ausgeschlossen werden.

Eine genomweite Kopplungsanalyse (siehe *GenomeScan*, Anhang, 12.4) mit allen acht Familienmitgliedern ergab zwei putativ gekoppelte Loci; einen auf Chromosom 2 und einen weiteren auf Chromosom 12 mit *LOD*-Scores von 2,7 bzw. 1,5. Der Locus mit dem niedrigeren *LOD*-Score auf Chromosom 12 konnte durch die Analyse von zusätzlichen Mikrosatellitenmarkern ausgeschlossen werden (siehe *Ausschluss von Chromosom 12*, Anhang, Kapitel 12.5), wohingegen der Locus auf Chromosom 2 bestätigt werden konnte (Abbildung 4.1).



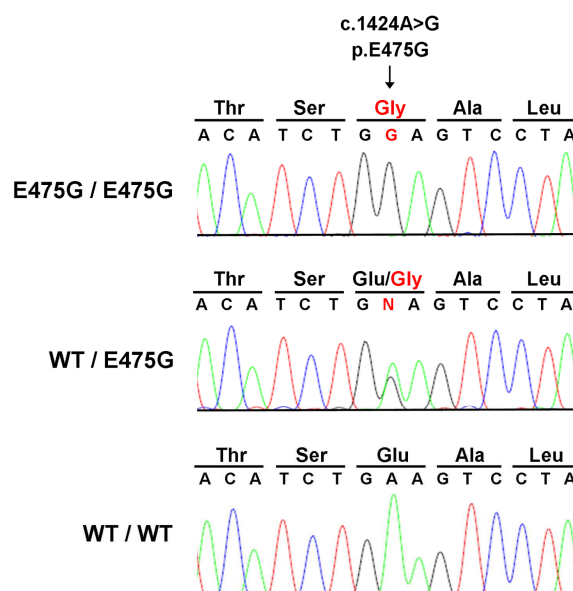
**Abbildung 4.1 Stammbaum und Haplotyp-Rekonstruktion der untersuchten marokkanischen Familie**

Der Stammbaum zeigt betroffene (schwarze Symbole) und nicht-betroffene (weiße Symbole) Familienmitglieder. Die Rekonstruktion der Haplotypen ergab, dass Betroffene im Intervall zwischen den Markern *D2S119* und *D2S378* homozygot sind (rote Balken, *DFNB70*-Locus). Die ursächliche Mutation befindet sich mit großer Wahrscheinlichkeit innerhalb dieser kritischen Region.

Die gekoppelte Region auf Chromosom 2 wird begrenzt durch die beiden Mikrosatellitenmarker *D2S119* und *D2S378* und umfasst 13,2 Megabasen (Abbildung 4.1) mit 49 annotierten Genen (siehe auch Anhang 12.6 und 12.7). Der Locus wurde entsprechend der Nomenklatur für Taubheitsloci *DFNB70* benannt und ist auf der *Hereditary Hearing Loss Homepage* registriert (Van Camp, 2011).

Durch direktes Sequenzieren von circa 70% aller kodierenden Exons und ihrer angrenzenden Spleiß-Stellen innerhalb der gekoppelten Region, konnten Mutationen in der Mehrheit der Gene als ursächlich ausgeschlossen werden.

In dem Gen *PNPT1* konnte jedoch eine einzelne homozygote nicht-annotierte *Missense*-Veränderung identifiziert werden (Abbildung 4.2). An der Nukleotidposition 1424 hat ein Austausch von Adenin nach Guanin (c.1424A>G) stattgefunden, der auf Proteinebene einen Wechsel von Glutaminsäure zu Glycin (p.E475G) zur Folge hat.



**Abbildung 4.2 Elektropherogramme**

Das obere Elektropherogramm zeigt die homozygote Mutation (c.1424A>G) eines betroffenen Familienmitglieds. In der Mitte ist die Mutation eines heterozygoten Anlageträgers zu sehen und unterhalb die wildtypische Referenzsequenz.

Sowohl das *PNPT1*-Gen selbst, als auch die Position der Glutaminsäure an Position 475, sind über Speziesgrenzen hinweg stark konserviert. Dies lässt auf eine evolutionär wichtige Funktion des Gens und insbesondere der Glutaminsäure schließen.

Die Mutation kosegregiert mit dem Phänotyp innerhalb der Familie (nur Betroffene sind homozygot) und konnte in mehr als 400 Kontrollindividuen (192 deutscher, 160 marokkanischer und 57 türkischer Abstammung) nicht nachgewiesen werden. Weder in den Datenbanken von *dbSNP* noch in denen des *1000Genomes*-Projektes ist diese Veränderung verzeichnet, womit ausgeschlossen werden kann, dass es sich um einen häufigen Polymorphismus handelt.

## 5 Zielsetzung der Arbeit

In der hier untersuchten Familie wurde bei allen drei betroffenen Mitgliedern eine homozygote *Missense*-Mutation im *PNPT1*-Gen als potentiell ursächliche Veränderung für die erbliche Taubheit identifiziert.

Die Annahme, dass es sich bei dieser Veränderung tatsächlich um die kausale Mutation handelt, konnte bisher durch folgende Ergebnisse gestützt werden:

Die *Missense*-Veränderung wurde in der gekoppelten Region gefunden, kosegregiert in der Familie mit dem Phänotyp und konnte nicht in gesunden Kontrollindividuen identifiziert werden. Zudem liegt die Veränderung in betroffenen Familienmitgliedern homozygot und in nicht betroffenen Familienmitgliedern heterozygot vor.

Aktuelle Studien, vor allem ermöglicht durch moderne Hochdurchsatz *Next Generation*-Sequenzieretechniken, haben eine überraschend große genetische Variabilität zwischen individuellen Genomen zeigen können. Pro humanem Exom werden mehrere tausend zuvor nicht-annotierte, größtenteils wahrscheinlich „harmlose“ *Missense*-Varianten entdeckt (Ng *et al.*, 2011).

Das Hauptziel dieser Arbeit war es daher, die Pathogenität der identifizierten *PNPT1*-Mutation durch weitere Versuche zu belegen. Dies sollte zunächst durch den Ausschluss aller verbliebenen Kandidatengene innerhalb der gekoppelten Region geschehen. Des Weiteren sollte die Expression von *PNPT1*/PNPase auf Transkript- und Proteinebene in dem betroffenen Organ (Innenohr, Cochlea, Haarzellen) nachgewiesen werden. Der Einfluss der *PNPT1*-Mutation auf die Funktion des Proteins sollte durch *in vitro* und - wenn möglich - auch durch *in vivo* Versuche analysiert werden.

Insbesondere sollte untersucht werden, worin die essentielle Bedeutung der PNPase für die Funktion des auditorischen Systems bestehen könnte. Bisher bekannte Funktionen der PNPase umfassen sowohl den Auf- und Abbau von RNAs (Lin-Chao *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010), als auch den Import von kleinen RNAs in Mitochondrien (Wang *et al.*, 2010). In erster Linie sollte daher ein möglicher funktioneller Zusammenhang zwischen diesen PNPase-Funktionen (RNA-Metabolismus und RNA-Import) und bereits bekannten „Taubheits-RNAs“ wie der miR-96 (Mencia *et al.*, 2009) und mitochondrial kodierter RNAs (Prezant *et al.*, 1993; Sue *et al.*, 1999) analysiert werden.



## 6 Ergebnisse

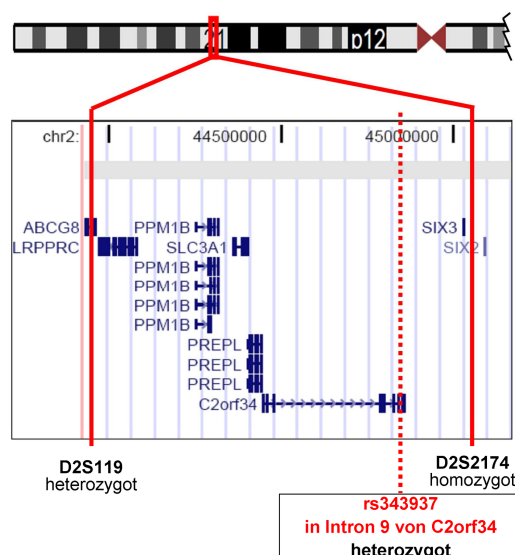
### 6.1 Ausschluss der verbliebenen Kandidatengene

Die gekoppelte Region auf Chromosom 2 beinhaltet 49 annotierte Gene (siehe auch *Übersicht der gekoppelten Region*, Anhang, 12.6). Davon konnten in den Vorarbeiten (siehe Kapitel 4) bereits 39 Gene ausgeschlossen werden, da sie keine potentiell pathogenen Veränderungen zeigten. Die kodierenden Exons und Spleiß-Stellen der verbliebenen 9 Gene (Tabelle 6.1) wurden mittels PCR amplifiziert, anschließend sequenziert und auf Veränderungen im Vergleich zum humanen Referenzgenom untersucht. Alle verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 12.2 aufgeführt.

**Tabelle 6.1 Übersicht über die verbliebenen Kandidatengene**

Gen	Anzahl kodierender Exons
<i>FSHR</i>	9
<i>LHCGR</i>	11
<i>MSH2</i>	16
<i>MSH6</i>	10
<i>PPM1B</i>	4
<i>LRPPRC</i>	39
<i>C2orf34</i>	11
<i>PREPL</i>	14
<i>SLC3A1</i>	10

In keinem der verbliebenen Gene wurden potentiell pathogene Mutationen identifiziert. Die telomerisch gelegenen Gene *LRPPRC*, *C2orf34*, *PREPL* und *SLC3A1* wiesen jedoch in betroffenen Individuen eine Vielzahl von heterozygoten annotierten SNPs auf, was bedeutet, dass die gekoppelte Region dadurch weiter eingegrenzt werden konnte. Die neu definierte telomerische Grenze bildet der SNP *rs343937* in Intron 9 des Gens *C2orf34* (Abbildung 6.1). Alle von diesem SNP telomerisch gelegenen Gene können somit, auch unabhängig von den Sequenzierungsergebnissen, als Kandidatengene ausgeschlossen werden.



**Abbildung 6.1** Der SNP *rs343937* definiert die telomerische Grenze der gekoppelten Region

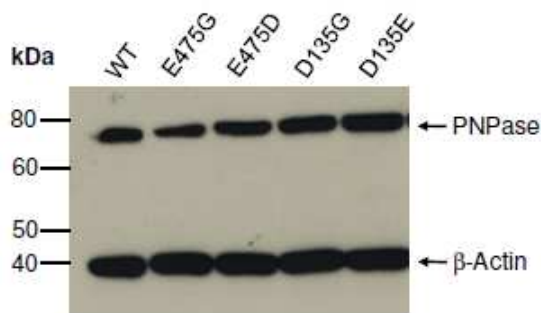
Zwischen den Markern *D2S119* (heterozygot) und *D2S2174* (homozygot) wurden heterozygote SNPs identifiziert. Der am weitesten centromerisch gelegene heterozygote SNP, *rs343937*, bildet die neu definierte telomerische Grenze der gekoppelten Region. Die telomerisch von diesem SNP gelegenen Gene können somit als Kandidatengene ausgeschlossen werden.

## 6.2 Expression von PNPase-V5-His-Konstrukten in Hek293T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die E475G-Mutante einen Phänotyp - beispielsweise ein verändertes Expressionsniveau - zeigt, wurden Hek293T-Zellen mit verschiedenen PNPase-V5-His-Konstrukten transfiziert. Neben dem Wildtyp und der E475G-Mutante wurde eine weitere Mutante, D135G, kloniert. Diese Mutation führt dazu, dass die PNPase nicht mehr trimerisieren kann (Portnoy *et al.*, 2008) und wurde in dem folgenden Versuch als Kontrolle für eine bereits bekannte funktionell relevante Veränderung der PNPase eingesetzt.

Sowohl die E475G-Mutation als auch die D135G-Mutation führen zu einem Ladungsverlust: Die negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure werden gegen das neutrale, nicht-polare Glycin ausgetauscht. Um Mutanten mit weniger schwerwiegenden Aminosäureaustauschen zum Vergleich heranziehen zu können, wurden zusätzlich die Mutanten E475D und D135E generiert.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, Proteine isoliert und per *Western Blot* analysiert (Abbildung 6.2).



**Abbildung 6.2 Expressionsanalyse von PNPase-V5-His-Konstrukten in Hek293T-Zellen**

Hek293T-Zellen wurden mit 5 verschiedenen Konstrukten transfiziert. Die Proteine wurden mittels *SDS-PAGE* aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran *geblottet*. Zur Proteindetektion wurden Antikörper gegen das V5-Epitop und gegen das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin eingesetzt.

Der *Western Blot* zeigt, dass alle 5 Konstrukte zur Expression von rekombinanten PNPase-Konstrukten führen. Das Expressionsniveau aller 4 Mutanten ist vergleichbar mit dem des Wildtyps.

Unter Standardbedingungen ist die E475G-Mutante nach transients Transfektion stabil und vergleichbar hoch exprimiert wie der Wildtyp. Ein offensichtlicher Phänotyp der Mutante konnte nicht festgestellt werden.

### 6.3 Stabilität von PNPase-Wildtyp und -Mutante unter oxidativem Stress

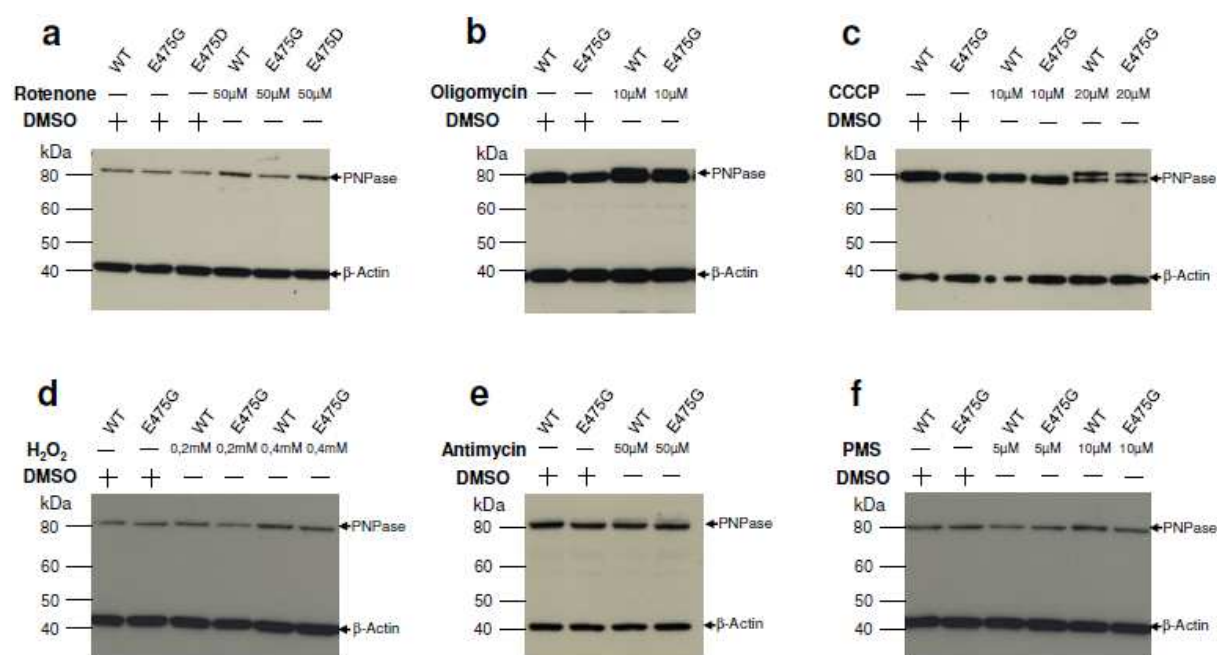
Eine Reihe von Publikationen hat die Bedeutung der PNPase im Zusammenhang mit oxidativem Stress untersucht. So wurde beispielsweise in HeLa-Zellen, die die PNPase überexprimieren, gezeigt, dass unter Behandlung mit Wasserstoffperoxid der Gehalt an oxidierten RNAs abnimmt und die Zellviabilität zunimmt. Im Gegensatz dazu nimmt die Menge an schädlichem oxigenierten Guanin (8-oxoG) zu und die Zellviabilität ab, wenn die PNPase über siRNA herunterreguliert wird (Wu & Li, 2008). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Menge an PNPase im Vergleich zu anderen Proteinen stark reduziert ist, wenn die Zellen mit Reagenzien behandelt wurden, die oxidativen Stress induzieren (Hayakawa & Sekiguchi, 2006).

Um zu untersuchen, ob die E475G-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter Stresskonditionen vulnerabler ist, was sich beispielsweise durch eine verringerte Proteinstabilität zeigen könnte, wurden transfizierte Hek293T-Zellen mit unterschiedlichen Stressoren behandelt.

Dazu wurden Substanzen ausgewählt, die an unterschiedlichen Angriffspunkten oxidativen Stress auslösen (Tabelle 6.2). Anschließend wurden die Proteine aus den transfizierten und behandelten Zellen isoliert und mittels *Western Blot* analysiert (Abbildung 6.3).

## 6.2 Verwendete Substanzen zur Induktion von oxidativem Stress

Substanz	Wirkungsweise
Rotenone	hemmt den Komplex I (NADH Oxidase) der mitochondrialen Atmungskette
Oligomycin	hemmt die membrangebundene mitochondriale ATP-Synthase
<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone</i> (CCCP)	hemmt die oxidative Phosphorylierung
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	ist ein starkes Oxidationsmittel und induziert oxidativen Stress durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen
Antimycin	hemmt den Komplex III (Cytochrom c-Reduktase) der mitochondrialen Atmungskette indem es die Übertragung von Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom c blockiert
<i>Phenazine methosulfate</i> (PMS)	hemmt NAD- und NADP-abhängige Dehydrogenasen



**Abbildung 6.3** Behandlung von transfizierten Hek293T-Zellen mit stressinduzierenden Reagenzien

Hek293T-Zellen wurden mit PNPase-V5-His-Konstrukten transfiziert und für 24 Stunden mit einer stressinduzierenden Substanz behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Proteine per *Western Blot* analysiert. Da alle Substanzen in DMSO gelöst wurden, wurde es ebenfalls bei den Kontrollen eingesetzt um unspezifische Effekte ausschließen zu können. Zur Proteindetektion wurden Antikörper gegen das V5-Epitop und gegen das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin eingesetzt.

Die Behandlung mit Rotenone (Abbildung 6.3a) zeigt im *Blot* bei konstantem Actin-Signal eine leicht erhöhte Expression der WT-PNPase und der E475D-Mutante im Vergleich zur E475-Mutante. Eine beeinträchtigte Stabilität der E475G-Mutante konnte jedoch nicht belegt werden, da Wiederholungen des Versuchs zeigten, dass die E475G-Mutante stärker

exprimiert war als der Wildtyp. Diese Schwankungen sind vermutlich auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz zurückzuführen.

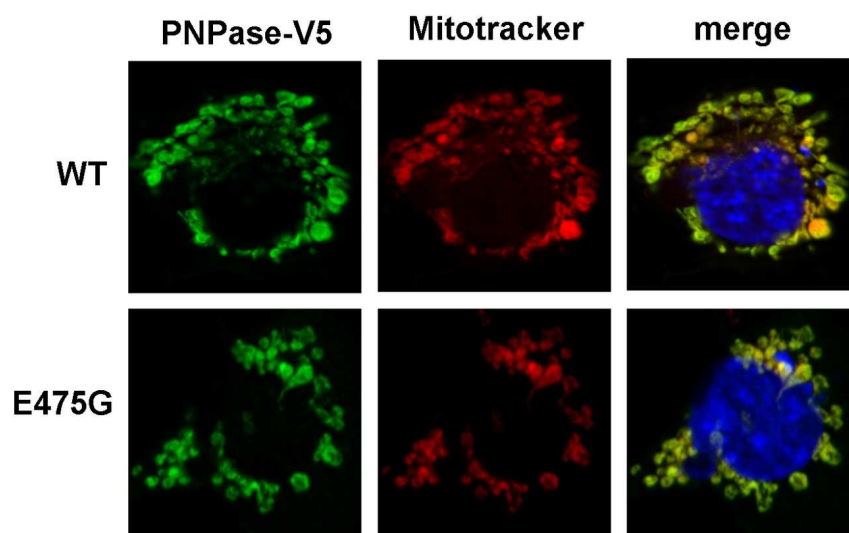
Auch unter dem Einsatz von Wasserstoffperoxid, Antimycin und PMS (Abbildung 6.3d-f) ist kein Unterschied in der Expressionsstärke zwischen PNPase-Wildtyp und PNPase-Mutanten zu erkennen.

Sowohl unter der Behandlung mit Oligomycin (10 $\mu$ M, Abbildung 6.3b) als auch mit CCCP (20 $\mu$ M, Abbildung 6.3c) zeigt sich im *Blot* eine weitere Bande oberhalb der Hauptbande. Die PNPase trägt N-terminal eine mitochondriales Zielpeptid aus 37 Aminosäuren, das beim Import in Mitochondrien von einer Protease entfernt wird (Rainey *et al.*, 2006). Vermutlich beeinträchtigen Oligomycin und CCCP diese Prozessierung, wodurch sich die Zusatzbande bestehend aus unprozessierter PNPase erklären ließe.

Zusammenfassend konnte kein signifikanter Unterschied in der Stabilität zwischen der Wildtyp-PNPase, der E475-Mutante und den weiteren untersuchten Mutanten unter dem Einfluss von oxidativem Stress festgestellt werden.

#### 6.4 Immunlokalisierung von PNPase-WT bzw. -E475G in COS7-Zellen

Die PNPase ist in Säugetieren im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Chen *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob die Mutation E475G zu einer möglichen Fehllokalisierung des mutierten Proteins führt, wurden COS7-Zellen mit PNPase-V5-His-Konstrukten (WT bzw. E475G) transfiziert. Mitochondrien wurden mit *Mitotracker* CMXRos (Invitrogen) fluoreszenzmarkiert, um die Lokalisierung der rekombinanten PNPase-Proteine beurteilen zu können (Abbildung 6.4).



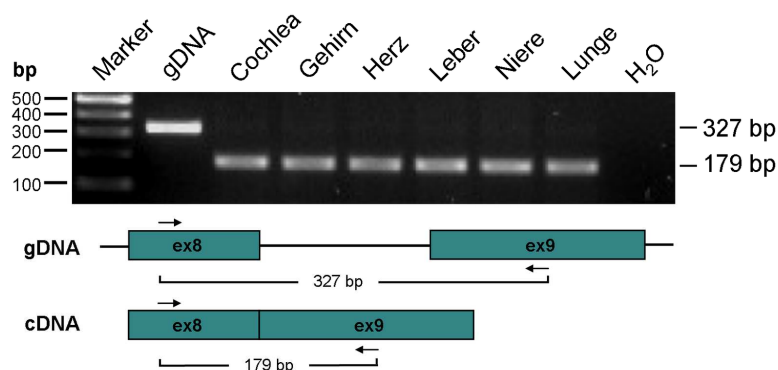
**Abbildung 6.4 Immunlokalisierung von PNPase-WT bzw. E475G-Mutante in COS7-Zellen**

Die transfizierten COS7-Zellen wurden fixiert und mit V5-Antikörper inkubiert. Als Sekundäantikörper wurde ein Alexa-Fluor-488 *chicken anti rabbit*-Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop mit Apotome aufgenommen.

Die *Mitotracker*-CMXRos-Markierung (rot) zeigt deutlich die Morphologie und Verteilung der Mitochondrien in den COS7-Zellen. PNPase-V5-His-WT und PNPase-V5-His-E475G (grün) sind beide in Mitochondrien lokalisiert, wie in der Überlagerung (*merge*) mit dem *Mitotracker* eindeutig zu erkennen ist. Die Mutation E475G hat demnach keine subzelluläre Fehllokalisierung zur Folge.

### 6.5 Expressionsnachweis des *PNPT1*-Gens in murinen Geweben

Um eine mögliche Expression des *PNPT1*-Gens im Innenohr semiquantitativ nachzuweisen, wurde RNA aus Geweben von zwei Tage alten Wildtyp-Mäusen gewonnen und mit spezifischen Primern amplifiziert (Abbildung 6.5).



**Abbildung 6.5 Expression von *PNPT1* auf Transkriptionsebene**

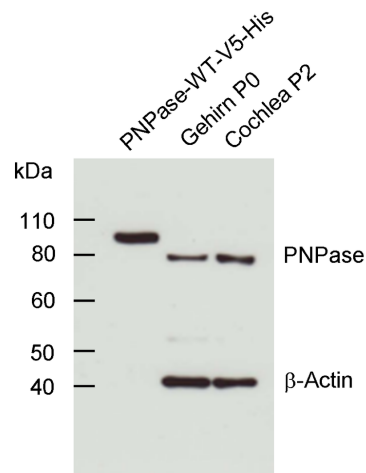
RNA aus murinen Geweben wurde isoliert, mit *DNase I* behandelt, mittels reverser Transkriptase in *first-strand* cDNA umgeschrieben und PCR-amplifiziert. Das Primer-Paar (Primer Nr. 306-307, Anhang 12.2) wurde so gewählt, dass zwischen dem Produkt von genomischer DNA (inklusive Intron) und cDNA eindeutig unterschieden werden kann. Genomische DNA (gDNA) wurde als Kontrolle verwendet und führt zu einem 327bp großem Produkt, wohingegen cDNA als Matrize zu einem Produkt mit einer Größe von 179bp führt.

Die Transkription von *PNPT1* konnte in allen sechs untersuchten Geweben, einschließlich der Cochlea, nachgewiesen werden. Obwohl die RT-PCR nur semiquantitativ ist, kann aufgrund der Signalstärke der Banden davon ausgegangen werden, dass die Expression in allen untersuchten Geweben vergleichbar stark ist.

### 6.6 Expressionsnachweis der endogenen PNPase in murinen Geweben

Um die endogene Expression des *PNPT1*-Gens im betroffenen Organ, dem Innenohr, auch auf Proteinebene nachweisen zu können, wurde ein zuverlässiger Antikörper benötigt, der ausschließlich die PNPase detektiert. Um die Spezifität belegen zu können, wurde ausgehend vom *PNPT1*-WT-V5-His-Expressionskonstrukt eine *in vitro* Translation und anschließend eine His-tag-Affinitäts-Proteinaufreinigung durchgeführt.

Es wurden Proteine aus muriner Cochlea und Gehirn isoliert und zusammen mit der *in vitro* translatierten rekombinanten PNPase mittels *Western Blotting* analysiert (Abbildung 6.6).



**Abbildung 6.6 Western Blot von murinen Proteinen und *in vitro* translatierter PNPase**

Die Proteine wurden per *SDS-PAGE* aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran *geblottet*. Der *Blot* wurde mit Primärantikörpern gegen die PNPase und gegen  $\beta$ -Actin inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden HRP-konjugierte *anti-mouse* und *anti-rabbit* Antikörper verwendet.

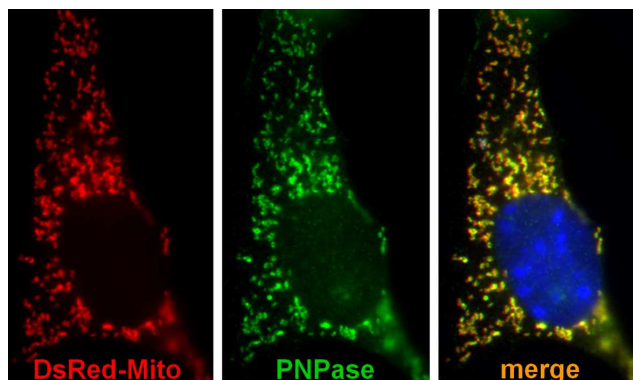
Der *Western Blot* bestätigt die Spezifität des PNPase-Antikörpers, da dass *in vitro*-translatierte Protein in einer klar definierten Bande erkannt wird.

Des Weiteren konnte die endogene PNPase in murinen Cochlea- und Gehirn-Extrakten nachgewiesen werden.

Der Größenunterschied zwischen *in vitro* translatierter rekombinanter PNPase und endogener PNPase basiert auf dem zusätzlichen V5-His-*tag* und darauf, dass das mitochondriale Zielpeptid nicht prozessiert wurde. Für die *in vitro* translatierte PNPase erwartet man ein Molekulargewicht von ~90,8 kDa und für die endogene PNPase ein Molekulargewicht von 81,7~kDa (kalkuliert mit *peptidemass*).

## 6.7 Immunlokalisierung der endogenen PNPase in MEFs

Nachdem die Spezifität des PNPase-Antikörpers im Western Blot bestätigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob er auch für die Detektion endogener PNPase in der Immunocytochemie geeignet ist. Dazu wurden *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) mit dem Plasmid *DsRed-Mito1* transfiziert und mit dem PNPase Antikörper inkubiert (Abbildung 6.7). *DsRed-Mito1* kodiert für das fluoreszierende Protein DsRed, das an eine MTS gekoppelt ist und dient zur spezifischen Markierung von Mitochondrien.



**Abbildung 6.7 PNPase Immunlokalisierung in MEFs**

*DsRed-Mito1*-transfizierte MEFs wurden fixiert und mit PNPase-Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa-Fluor-488 *chicken anti rabbit*-Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop mit Apotome aufgenommen.

Die *DsRed-Mito1*-transfizierten MEFs zeigen die typische netzwerkartige Verteilung von Mitochondrien (rot). Der PNPase-Antikörper (grün) markiert die gleichen Strukturen, was ebenfalls durch die Überlagerung der beiden Kanäle (*merge*) sichtbar wird und die Spezifität des PNPase Antikörpers bestätigt.

Die Vorversuche im *Western Blot* und in der Immunocytochemie haben gezeigt, dass der Antikörper die PNPase zuverlässig detektiert. Somit sind die Voraussetzungen gegeben, die Expression der PNPase auch in der Cochlea mittels Immunhistochemie zu untersuchen.

## 6.8 Immunhistochemie auf Cochleapräparaten

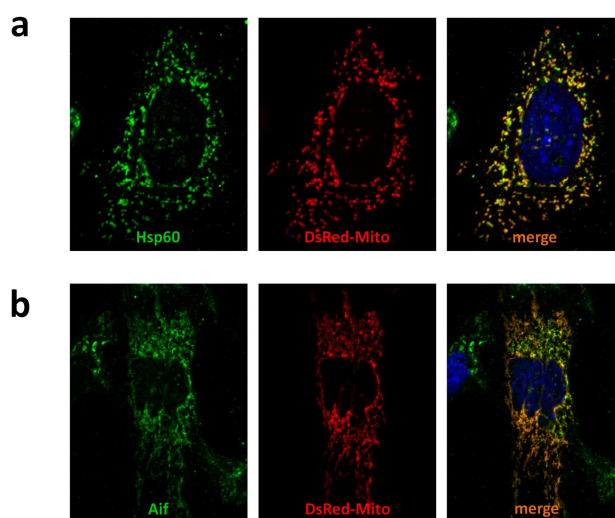
Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der PNPase im betroffenen Organ zu untersuchen. Je nachdem, wo im Innenohr die PNPase exprimiert wird, könnten sich möglicherweise Rückschlüsse darauf ziehen lassen, welche Strukturen (Haarzellen, Neuronen etc.) betroffen sind und in der untersuchten Familie die Taubheit bedingen.

### 6.8.1 Antikörper-Validierung für mitochondriale Marker

Um die mitochondriale Lokalisierung der PNPase auch in der Immunhistochemie auf Cochleapräparaten beurteilen zu können, wurden Antikörper gegen bekanntermaßen mitochondrial lokalisierte Proteine ausgewählt und zunächst in Immunfluoreszenz-Versuchen auf MEFs getestet. Eingesetzt wurde ein Antikörper gegen das *heat-shock-protein 60*



(Hsp60, Abbildung 6.8a) und ein weiterer gegen den *apoptosis inducing factor* (Aif, Abbildung 6.8b). Beide werden ubiquitär exprimiert und sind, wie die PNPase, im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert. Zur Markierung von Mitochondrien wurden MEFs mit dem *DsRed-Mito1*-Plasmid transfiziert.



#### Abbildung 6.8 Validierung der mitochondrialen Marker Hsp60 und Aif in der Immunfluoreszenz

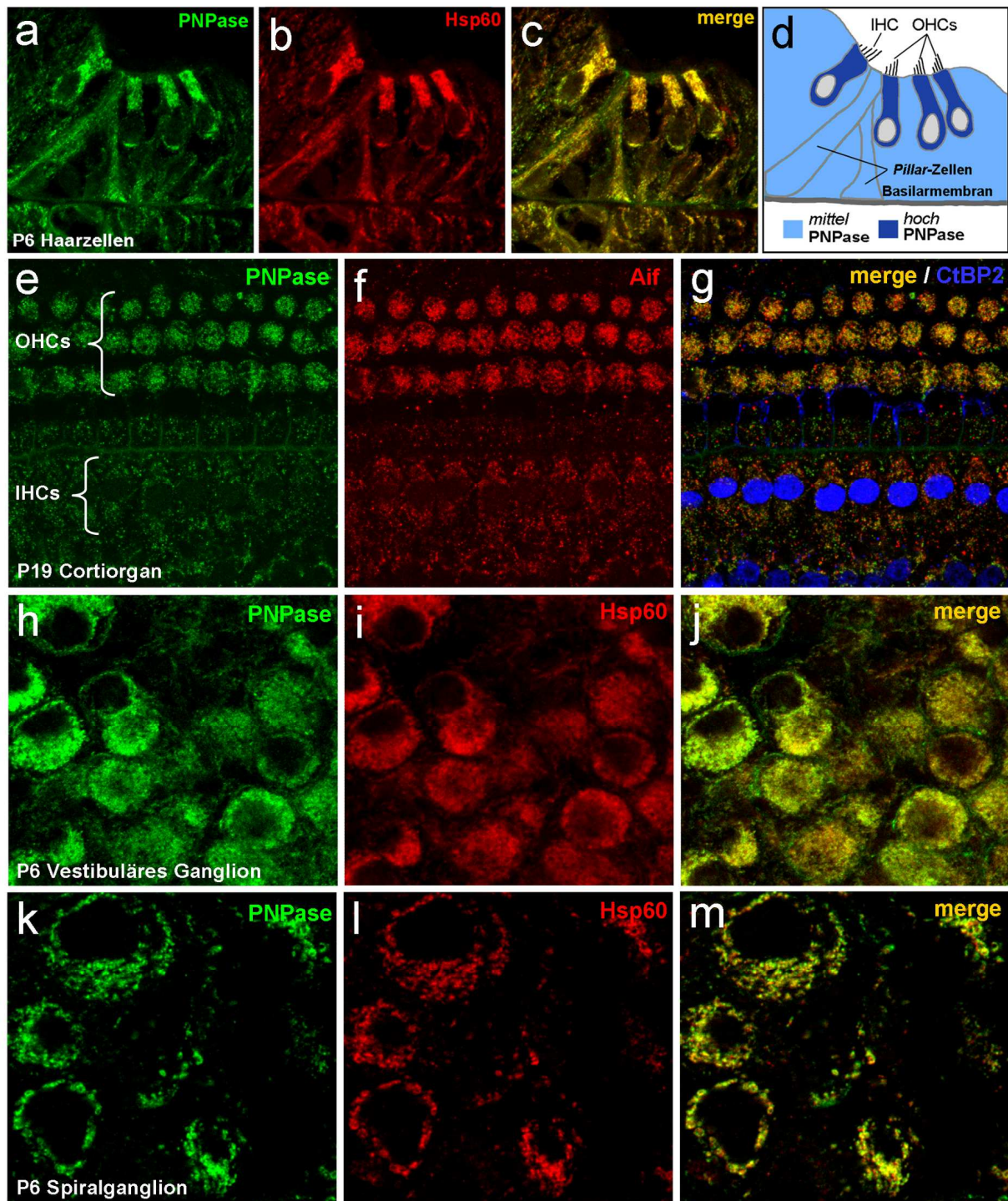
*DsRed-Mito1*-transfizierte MEFs wurden fixiert und mit (a) Hsp60-Antikörper bzw. (b) Aif-Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde in beiden Fällen ein Alexa-Fluor-488 *donkey anti goat*-Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop mit Apotome aufgenommen.

Wie an den Überlagerungsbildern (*merge*) zu sehen ist, kolokalisieren sowohl Hsp60 als auch Aif mit dem mitochondrialen Marker *DsRed-Mito1*. Beide Antikörper wurden im folgenden Abschnitt als mitochondriale Marker in der Immunhistochemie eingesetzt.

#### 6.8.2 Expression der PNPase in der murinen Cochlea

Die Cochlea ist mit dem so genannten Schläfenbein, einem der Schädelknochen, verbunden. Sie besteht bei neugeborenen Mäusen zunächst noch aus Knorpel. Ab Tag 5 nach der Geburt beginnt die Verknöcherung der Cochlea.

Zur Analyse der Expression der PNPase in der murinen Cochlea wurden hier zwei unterschiedliche Cochlea-Präparationen vorgenommen. Zum einen wurden ganze Cochleae von 6 Tage alten CD-1 Wildtyp-Mäusen (P6) entnommen, fixiert und eingebettet. Anschließend wurden mit einem Kryostaten Gefrierschnitte von 12µm Stärke angefertigt, die dann für die Immunhistochemie verwendet wurden (Abbildung 6.9a-c, h-m). Zum anderen wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Tobias Moser, Göttingen, das Corti-Organ von 19 Tage alten Mäusen (P19) präpariert. Dazu wurde apikal das Innere der Cochlea vom Knochen befreit und die apikale Cochlea-Windung entnommen. Die *stria vascularis* und die Tektorialmembran wurden vorsichtig entfernt um eine sogenannte *whole mount*-Präparation, bei der das Corti-Organ mit den äußeren und inneren Haarzellen freiliegt, zu erhalten (Khimich *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2009). Die Präparate wurden als Ganzes fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 6.9e-g).



**Abbildung 6.9 Immunhistochemie auf Cochlea-Präparationen**

(a-c) Querschnitt durch das Corti-Organ mit innerer und äußeren Haarzelle(n). (a) Die PNPase ist im gesamten Corti-Organ exprimiert. Besonders intensiv ist das Signal apikal und basal in der inneren und den äußeren Haarzelle(n) sowie in den *Pillar*-Zellen. (b) zeigt die Expression des mitochondrialen Markers Hsp60. In der Überlagerung (c) zeigt sich der hohe Grad an Kolo-kalisierung von PNPase und Hsp60. Die Skizze in (d) verdeutlicht die Anordnung der Zellen im Corti-Organ. Die PNPase-Expression in Haarzellen ist absolut gesehen stärker als in umliegenden Zellen. Aufgrund der hohen Mitochondrien-Dichte in Haarzellen (Takumi *et al.*, 1999), kann man aber nicht davon ausgehen, dass die PNPase-Expression pro Mitochondrium in Haarzellen prinzipiell stärker ist als in beispielsweise *Pillar*-Zellen. Die Abbildungen (e-g) zeigen *whole mount*-Präparationen. Die optische Schnittebene verläuft oberhalb der Nuclei der äußeren Haarzellen (OHCs) und durch die Kernebene der inneren Haarzellen (IHCs). Als mitochondrialer Marker wurde hier Aif (f) verwendet. In der Überlagerung (g) wurden zur besseren Orientierung im Präparat die synaptischen Vesikel und Nuclei durch Färbung von CtBP2/Ribeye (blau) markiert. Des Weiteren ist die PNPase sowohl im Vestibulär- als auch im Spiralganglion deutlich exprimiert (h+k). Auch in den neuronalen Zellen kolo-kalisiert die PNPase mit Hsp60 (j+m). Die Aufnahmen wurden mit konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopen gemacht: In a-c und h-m mit einem Zeiss LSM710 und in e-g mit einem Leica SP5.

Die PNPase konnte immunhistochemisch in Cochlea-Präparaten nachgewiesen werden. In inneren und äußeren Haarzellen, sowie in umgebenden Zellen des Corti-Organ ist die PNPase exprimiert und kolokalisiert mit Mitochondrien. Das Expressionslevel pro Mitochondrium ist dabei in den unterschiedlichen Zelltypen ähnlich hoch. Das besonders starke Signal in den Haarzellen ist vermutlich auf die hohe Mitochondrien-Dichte in diesem Zelltyp zurückzuführen (Takumi *et al.*, 1999), was durch das ebenfalls starke Signal der mitochondrialen Marker bestätigt wird. Des Weiteren ist die PNPase in Neuronen der Spiral- und Vestibularganglien exprimiert und kolokalisiert auch hier mit den Mitochondrien.

## 6.9 *PNPT1* im Modellorganismus *Danio rerio*

Aufgrund seiner relativ schnellen Embryonalentwicklung eignet sich der Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*) sehr gut für Studien der frühen Entwicklungsstadien. Der Embryo entwickelt sich *ex utero* und ist zudem weitestgehend transparent, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, die Entwicklung kontinuierlich zu beobachten.

Bei dem Ohr des Zebrafisches und dem Ohr des Menschen handelt es sich um homologe Organe, was den Zebrafisch zu einem geeigneten System macht, um die Entwicklung und Funktion des Innenohrs zu untersuchen (Whitfield *et al.*, 2002). So konnten bereits Mutationen in einigen Genen, wie beispielsweise dem *Myosin VIIa*-Gen, identifiziert werden, die sowohl beim Menschen als auch beim Zebrafisch zu Defekten des Innenohrs führen (Whitfield, 2002). Zudem besteht durch die Anwendung von Morpholinos die Möglichkeit *in vivo* die Expression einzelner Gene gezielt herunter zu regulieren (siehe auch Kapitel 3.23).

### 6.9.1 Aufklärung des *PNPT1*-Gens im Zebrafisch

In genomischen Datenbanken wie *UCSC*, *Ensembl* und *NCBI* ist das *PNPT1*-Gen des Zebrafisches (*zfPNPT1*) bisher nicht annotiert. Über eine *Blast*-Suche gegen eine Datenbank mit Zebrafisch-*ESTs* (*expressed sequence tags*) mit der Aminosäuresequenz der humanen PNPase als Referenz konnten jedoch eine Reihe von *ESTs* mit einer hohen Homologie zum humanen Protein identifiziert werden.

Um die kodierende Sequenz des *zfPNPT1*-Gens aufklären zu können, wurde ein *EST* am putativen 5'-Ende (*GenBank accession number*: EE694402.1) und einer am putativen 3'-Ende (*GenBank accession number*: CT592833.2) ausgewählt. Beide *ESTs* konnten über eine erneute *Blast*-Suche gegen das Zebrafisch-Genom eindeutig Chromosom 13 zugeordnet werden.

Mittels *RACE-PCR* (siehe auch Kapitel 3.5) mit genspezifischen Primern (Primer Nr. 296-301, siehe auch Tabelle 12.5) sollten das 5'- und 3'-Ende von *zfPNPT1* amplifiziert werden, wobei RNA aus 2 Tage alten Zebrafischembryonen als Matrize diente. Der Bereich zwischen 5'- und 3'-Ende wurde über eine *One-Step-RT-PCR* (Primer Nr. 302-303, siehe auch Tabelle 12.6) amplifiziert. Die Produkte wurden vollständig

sequenziert (Primer Nr. 277-295, siehe auch Tabelle 12.4) und mithilfe der Software *Seqman* (Lasergene, DNASTar) assembliert.

Es zeigte sich, dass das offene Leseraster von *zIPNPT1* 2328bp groß ist und für 776 Aminosäuren kodiert. Das Protein ist damit etwas kürzer als die humane PNPase mit 783 Aminosäuren. Die cDNA-Sequenz und die Aminosäuresequenz sind unter der *GenBank accession* Nummer JN381023 veröffentlicht worden (siehe auch Anhang 12.8).

*Blastet* man die so ermittelte Aminosäuresequenz der gesamten Zebrafisch-PNPase gegen das Zebrafisch-Genom, erhält man als Ergebnisse mit höchster Übereinstimmung wieder *EST*-Einträge auf Chromosom 13. Es gibt keine Hinweise, dass es ein alternatives paraloges *PNPT1*-Gen im Zebrafisch geben könnte.

### 6.9.2 Alignment von hPNPase und zfPNPase

Um die Homologie zwischen humaner und Zebrafisch-PNPase zu bestimmen, wurde mithilfe des Programms *ClustalW* ein *Alignment* von beiden Proteinen erstellt (Abbildung 6.10).

```

human      MAACRYCCSCLRLRPLSDGPFLLPRRDRALTQLQVRALWSSAGSRVAVDLGNRKLEISS 60
zebrafish  ---MNVCV CERLRMMKSVRMMKMMMKTRLWCWARVCAVRG-IQQHSATVTLGDRKLEIST 55
          * * *** :. .  : :      . *  : * : .  . : : * ** : * * * * :

human      GKLARFADGS AVVQSGDTAVMVTAVSKTKPSPSQFMPLVVDYRQKAAAAGRIPNYLRRE 120
zebrafish  GKLARFSDGC AVVKSGETSVMVTAVSKSRPAAAQFMPLVVDYRQKAAAAGRIPNHLRRE 115
          * * * * * : * . * * * : * * : * * * * * * * * * * * : * : . : * * * * * * * * * * * : * * * *

human      IGTSDKEILTSRIIDRSIRPLFPAGYFYDTQVLCNLLAVDGVNEPDVLAINGASVALSLS 180
zebrafish  LGTTDTEILTSRIIDRSIRPLFPAGYFYDTQVMCNILAADGVNDPDVLAINGASAALTLS 175
          : * * : * . * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * : * * : * . * * * * * * * * * * * * * * *

human      DIPWNGPVGAVRIGIIDGEYVVPTRKEMSSSTLNLVVAGAPKSQIVMLEASAENILQQD 240
zebrafish  DIPWNGPIGAVRVGLLDGEFLINPSRSEMTRSLSLNLVIAAAPSSHVVMMIEAAAENILQQD 235
          * * * * * : * * * * * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

human      FCHAIKVGVKYTOQIIQGIQQLVKETGVTKRTPQKLFTPSPEIVKYTHKLAMERLYAVFT 300
zebrafish  FCHAVKLGVKHTQQIIQSLQQISRDMKISKRS-SRLYTAADMQEHTRLLASDRIYAVFT 294
          * * * * * : * : * * * * * * * * * * * : * : * : * * : * : * * : * : * : * : * * : * : * * * *

human      DYEHDKVS RDEAVNKIRLDT EEQLKEKFP EADPYEIIIESFNVVAKEVFRSIVLNEYKRCD 360
zebrafish  DFTHDKISRDEAINKIRLEAEEKIREKFPHAEPFEVMEAFNSVSKEIFRKLVLQEYRRCD 354
          * : * * * : * * * * * : * * * * * : * : * * * * * : * : * : * * * : * : * * * . * : * * * * : * : * * * *

human      GRDLTSLRNVSCEVDMFKTLHGSA LFQRGQTQVLC TVTFDSLESGIKSDQVITAINGIKD 420
zebrafish  GRDLTALRNISCEVDVFKPLHGSA LFQRGQTQVLC SVTFDSLESSLKT D VITSALSGVKD 414
          * * * * * : * * * * * : * * * * * : * . * * * * * * * * * * * : * * * * : * : * . * * *

human      KNFMLHYEFPYPATNEIGKVTGLNRRRELGHGALAEKALYPVIPRDFPFPTIRVTSVLESN 480
zebrafish  KNFLLHYEFPYPATNEIGRTGCANRRRELGHGALAEKALRPVIPSSFPPTIRVTSVLESN 474
          * * * : * * * * * * * * * * * : . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

human      GSSSMASACGSLALMDSGVPISSAVAGVAIGLVTKTDPEK-GEIEDYRLLTDILGIEDY 539
zebrafish  GSSSMASVCGSLALMDAGVPISSPVAGVAIGLISEAHPDRPSEIESYRLLTDILGIEDY 534
          * * * * * . * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * : : : . * : : . * * * . * * * * * * * * * * *

human      NGDMDFKIAGTNKGITALQADIKLPGIPIKIVMEAIQQASVAKKEILQIMNKTI SKPRAS 599
zebrafish  NGDMDFKMAGSSKGITALQADV KIPGLPLKIVMEAIQHATVAKREILGIMGQCISRPRS 594
          * * * * * : * * : * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * *

human      RKENGPV VETVQVPLSKRAKFVGP GGYNLK K LQAETGVTISQVDEETF SVFAPTPSAMHE 659
zebrafish  RNENGPVVENITVPLSRRALF IGPGGINLRRLQAETGVTISQVDEQTF SVFAPTPAAMSE 654
          * : * * * * * . : * * * * * : * * * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * : * * * * *

human      ARDFITEICKDDQEQQLEFGAVYTATITEIRDTGVMVKLYPNMTAVLLHNTQLDQRKIKH 719
zebrafish  AQEIIKDTCRDDQEQQLEFGAIY TATITEIRDV GVMVKLYPNMSPVLLHNSQLDHKRIQH 714
          * : : : * . : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

human      PTALGLEVGQEIQVKYFGRDPADGRMRLSRKVLQSPATTVVRTLNDRSSIVMGEPISQSS 779
zebrafish  PSALGLYVGQQIQVKYFGRDPTDGKMRLSRKVL LSPTATLAKSLSERHSISVGSS---- 769
          * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

human      SNSQ 783
zebrafish  ----

```

**Abbildung 6.10 Alignment von hPNPase und zfPNPase**

Das *Alignment* verdeutlicht die hohe Homologie zwischen der humanen PNPase und der Zebrafisch-PNPase. Die in der untersuchten Familie mutierte Glutaminsäure an Position 475 befindet sich in der Zebrafisch-PNPase an Position 469 (rot markiert). „\*“ markieren voll konservierte Aminosäuren, „:“ markieren Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften und „.“ markieren Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

Die Zebrafisch-PNPase weist mit 70% identischen Aminosäuren eine sehr hohe Homologie zur humanen PNPase auf. Die Glutaminsäure, die in der untersuchten marokkanischen Familie zu Glycin mutiert ist, ist im Zebrafisch ebenfalls konserviert. Es kann also mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem identifiziertem Gen bzw. Protein um das Ortholog des humanen *PNPT1*-Gens bzw. -Proteins im Zebrafisch handelt.

### 6.9.3 Bioinformatische Analyse des mitochondrialen Zielpeptids

Das offene Leseraster der Zebrafisch *PNPT1* cDNA kodiert im 5'-Bereich für acht Methionin-Aminosäuren. Daher kann nicht eindeutig geklärt werden, bei welchem dieser für Methionin kodierenden Kodons es sich um den tatsächlichen Translationsstart handelt.

Um jedoch einschätzen zu können, ob auch die Zebrafisch-PNPase wie die humane PNPase ein N-terminales mitochondriales Zielpeptid trägt, wurde mithilfe des Prädiktionsprogramms *Mitoprot* eine bioinformatische Kalkulation durchgeführt: Das Programm berechnet für jedes ATG mit welcher Wahrscheinlichkeit es sich um den Start für ein mitochondriales Zielpeptid handelt (Tabelle 6.3).

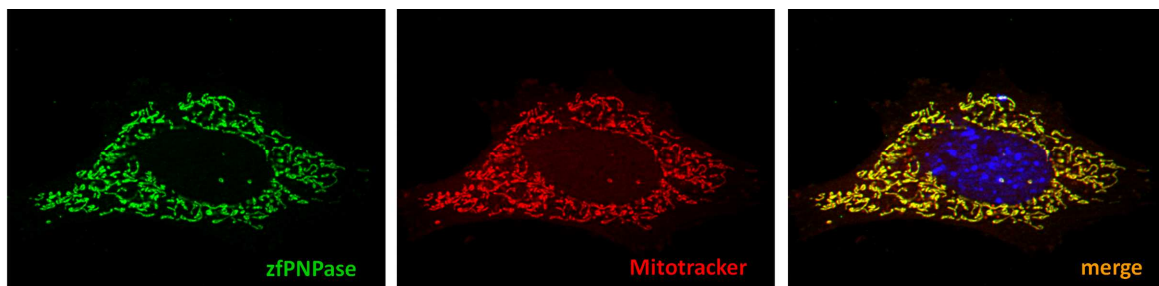
### 6.3 *Mitoprot*-Kalkulation des mitochondrialen Zielpeptids der zfPNPase

ATG-Startcodon	Wahrscheinlichkeit, dass der N-Terminus für eine mitochondriales Zielpeptid kodiert
1. ATG	77%
2. ATG	92%
3. ATG	92%
4. ATG	84%
5. ATG	88%
6. ATG	84%
7. ATG	79%
8. ATG	79%

Wie Tabelle 6.3 zu entnehmen ist, liegen die Wahrscheinlichkeiten, dass es sich bei dem N-Terminus der zfPNPase um ein mitochondriales Zielpeptid handelt, laut *Mitoprot* je nach gewähltem Startcodon zwischen 77 und 92%. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die zfPNPase in Mitochondrien lokalisiert ist.

#### 6.9.4 Immunlokalisierung rekombinanter zfPNPase in MEFs

In einem *in vitro* Versuch sollte die subzelluläre Lokalisierung der zfPNPase untersucht werden. Dazu wurde das gesamte offene Leseraster inklusive aller potentiellen Startcodons in einen Expressionsvektor mit V5-His-Markierung kloniert (Primer Nr. 249-250, siehe auch Anhang 12.2). Da es keine Zebrafischzelllinien in Kultur gibt, wurden alternativ MEFs mit dem Konstrukt transfiziert. Über eine Immunfluoreszenzmarkierung des rekombinanten Proteins und Ko-Markierung von Mitochondrien mittels *Mitotracker* wurde die subzelluläre Lokalisierung untersucht (Abbildung 6.11).



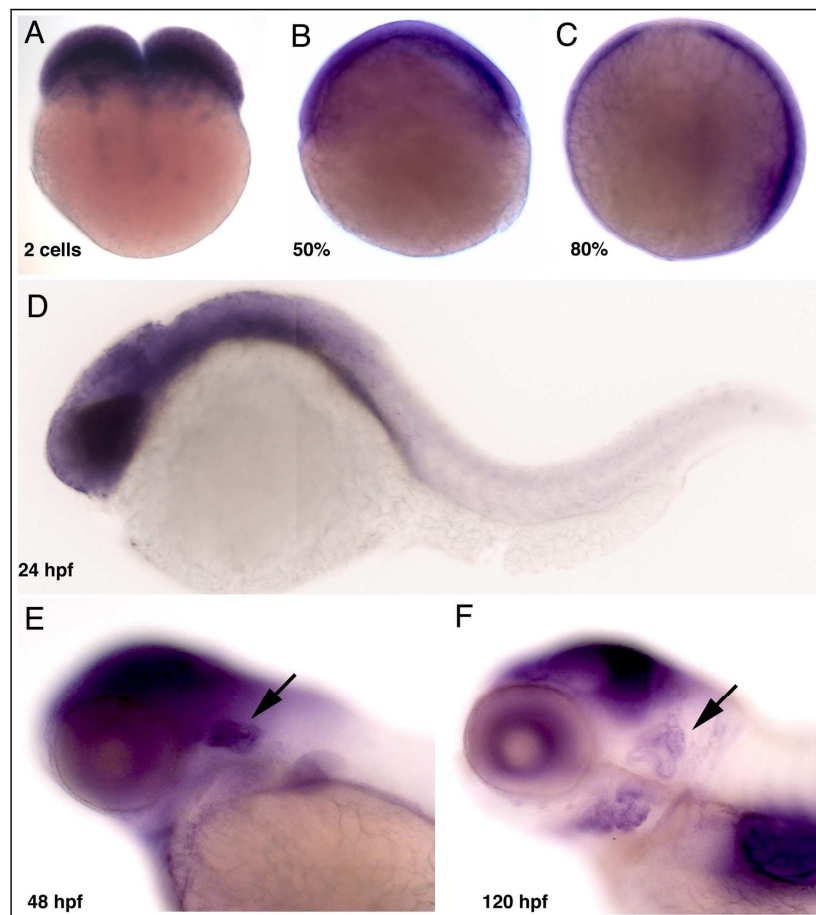
**Abbildung 6.11 Immunfluoreszenzmarkierung der zfPNPase in MEFs**

MEFs wurden mit *zfPNPT1*-V5-His-Expressionsvektor transfiziert. Mitochondrien wurden durch *Mitotracker* CMXRos fluoreszenzmarkiert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit einem V5-Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa-Fluor-488 *chicken anti rabbit*-Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop mit Apotome aufgenommen.

Die Überlagerung von zfPNPase und *Mitotracker* bestätigt eindeutig die mitochondriale Lokalisierung der rekombinanten zfPNPase in Säugetierzellen. Auch wenn die mitochondriale Lokalisierung nicht direkt im Zebrafisch nachgewiesen werden konnte, so lässt sich aufgrund der bioinformatischen Prädiktion und der Immunlokalisierung in MEFs dennoch mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, dass es sich auch bei der zfPNPase um ein mitochondrial lokalisiertes Protein handelt.

#### 6.9.5 *In situ* Hybridisierung in Zebrafisch-Embryonen

Die *in situ* Hybridisierung wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Mathias Hammerschmidt, Köln, durchgeführt. Für nachfolgende Morpholino-*Knockdown* Versuche (siehe auch Kapitel 3.23) wurde zunächst das Expressionsmuster von *zfPNPT1* in frühen Entwicklungsstadien des Zebrafischs bestimmt (Abbildung 6.12). Dazu wurden DIG-markierte Sonden, *sense* und *antisense*, generiert. Der dafür verwendete *EST*-Klon (ImaGenes Clone EE702826) enthält 935 bp des *zfPNPT1*-Transkripts.



**Abbildung 6.12** *In situ* Hybridisierung des *zfPNPT1*-Gens in Zebrafischembryonen

(A) zeigt die Expression des *zfPNPT1*-Gens im Zweizell-Stadium (maternale Expression). (B-D) zeigen die Expression mit fortschreitender Entwicklung bei 50% und 80% Epibolie bzw. 24 hpf. (E+F) veranschaulichen die Expression in späteren Entwicklungsstadien (48 hpf und 120 hpf). Die schwarzen Pfeile zeigen auf das Ohr. Bei den deutlich gefärbten Strukturen handelt es sich um das Tektum bzw. um die Kiemenbögen.

Die Expression von *zfPNPT1* konnte in allen untersuchten Entwicklungsstadien des Zebrafisches nachgewiesen werden. Das *zfPNPT1*-Gen ist schon im Zweizell-Stadium exprimiert. Bei dieser Expression muss es sich um maternale Transkripte handeln, die bereits während der Oogenese im Ei hinterlegt wurden, was auf eine essentielle Bedeutung des *zfPNPT1*-Gens bereits ganz zu Beginn der Embryonalentwicklung hindeutet. Mit fortschreitender Entwicklung (50% und 80% Epibolie) ist *zfPNPT1*-mRNA im gesamten Embryo nachweisbar. 24 Stunden nach der Fertilisation (hpf) ist zu erkennen, dass die Expressionsstärke vom Kopf in Richtung der Schwanzspitze abnimmt. Ab 48 hpf wird die Expression spezifischer und beschränkt sich auf das Ohr, das Tektum und die Kiemenbögen. Die *sense*-Sonde, die als Negativ-Kontrolle verwendet wurde, ergab kein Signal in der *in situ* Hybridisierung (Daten nicht dargestellt).



## 6.10 Morpholino-Knockdown des *PNPT1*-Gens im Zebrafisch

Die Anwendung von Morpholinos ermöglicht das spezifische Herunterregulieren eines bestimmten Gens *in vivo*. Um die potentielle Bedeutung des *zfPNPT1*-Gens für das Hörvermögen des Zebrafisches zu untersuchen, sollte das Gen auf diese Weise herunterreguliert werden. Dafür wurden zum einen ein ATG-Morpholino, der den Translationsstart blockiert und zum anderen ein *Splice*-Morpholino, der den Spleißvorgang des primären Transkripts stört, eingesetzt.

### 6.10.1 Morpholino-Design

Das *Design* der Morpholinos wurde von dem Hersteller GeneTools durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Sequenzbereiche für einen ATG-Morpholino und für einen *Splice*-Morpholino übermittelt.

#### 6.10.1.1 Morpholino gegen den Translationsstart (ATG-Morpholino)

Da das *zfPNPT1*-Gen mehrere potentielle Startcodons aufweist (siehe Kapitel 6.9.3), wurde der Morpholino so gewählt, dass er bereits das erste potentielle Startcodon blockiert. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Translation auch inhibiert wird, falls das eigentliche Startcodon erst eines der darauffolgenden ist. Die Sequenz des ATG-Morpholinos ist im Anhang in Tabelle 12.10 aufgeführt.

#### 6.10.1.2 *Splice*-Morpholino

Die vollständige genomische Struktur des *zfPNPT1*-Gens ist bisher nicht annotiert. Um einen *Splice*-Morpholino *designen* zu können, musste dafür, zumindest teilweise, die Exon-Intron-Struktur von *zfPNPT1* aufgeklärt werden (Abbildung 6.13). Dazu wurde die Aminosäuresequenz der Zebrafisch-PNPase gegen das Zebrafisch-Genom *geblastet*. Im C-terminalen Bereich des Gens konnten kodierende Exons mitsamt ihrer Spleißstellen identifiziert werden. Ein *Splice*-Morpholino hat im Idealfall das *Skipping*, also den Ausschluss des gesamten ausgewählten Exons, zur Folge. Das auszuschließende Exon sollte deshalb so gewählt werden, dass es durch dessen Ausschluss zu einer Leserasterverschiebung in darauffolgenden Exons und dadurch zu einem frühzeitigen Stoppcodon kommt. Die Verschiebung des Leserasters wird erzielt, indem man ein Exon auswählt, dessen Anzahl an Nukleotiden nicht durch drei teilbar ist.

Im vorliegenden Fall trifft dies auf das erste dargestellte Exon zu (Abbildung 6.13). Die Lage des Morpholinos ist durch rot unterlegte Klammern angedeutet. Der Morpholino ist gegen eine Akzeptor-Spleiß-Stelle gerichtet. Neben dem eigentlichen *Splice*-Morpholino wurde auch ein *Mismatch*-Morpholino verwendet. Dieser unterscheidet sich in fünf Basen von dem Original Morpholino und wurde als Negativ-Kontrolle eingesetzt, um unspezifische

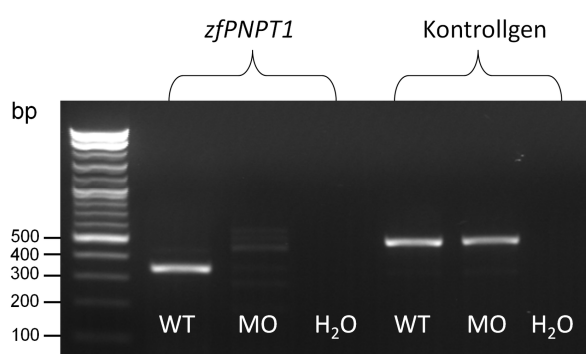


des Spleißens der embryonalen primären *PNPT1*-Transkripte sollte untersucht werden, ob ein spezifischer Phänotyp insbesondere auf das Ohr beobachtet werden kann.

In drei unabhängigen Versuchsreihen wurden der *Splice*-Morpholino und der *Mismatch*-Morpholino mit drei verschiedenen Konzentrationen in befruchtete Zebrafischeier injiziert. Nach fünf Tagen wurden die Embryonen morphologisch und auf ihr Hörvermögen hin untersucht.

### 6.10.3.1 Nachweis der Wirkung des *Splice*-Morpholinos durch RT-PCR

Um die Wirkung des *Splice*-Morpholinos auf das Spleißen zu untersuchen, wurde RNA aus unbehandelten und aus Morpholino-injizierten Zebrafischembryonen gewonnen. Mit Primern (Primer Nr. 304-305, siehe Tabelle 12.7), die das zu *skippende* Exon flankieren, wurde eine RT-PCR durchgeführt (Abbildung 6.14). Um eine mögliche RNA-Degradierung ausschließen zu können, wurde parallel ein Kontrollgen amplifiziert.



**Abbildung 6.14 RT-PCR zur Validierung des *Splice*-Morpholinos gegen *zfPNPT1***

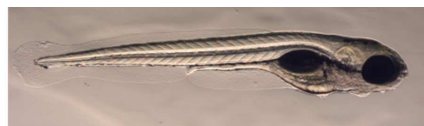
RNA wurde 24 hpf aus Zebrafischembryonen gewonnen. Für die *zfPNPT1*-Transkript-spezifische RT-PCR wurden die Primer 304 und 305 (Anhang, Tabelle 12.7) verwendet. Für RNA aus uninjizierten Embryonen wird eine Bande von 319 bp erwartet. Führt der *Splice*-Morpholino zum vollständigen Ausschluss des Exons, würde dies zu einer Bande von 252 bp führen. (WT = nicht injiziert, MO = injiziert mit *Splice*-Morpholino, H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle).

Die Amplifikation des Kontrollgens zeigt, dass die RNA in keiner der beiden Proben degradiert war. Das *zfPNPT1*-spezifische Produkt führt bei RNA aus uninjizierten Embryonen zu dem erwarteten Produkt mit einer Größe von 319 bp. Der *Splice*-Morpholino führt nicht zum erwarteten Exon-Skipping. Vielmehr führt der Morpholino zu einer Reihe von Spleißfehlern, was an den schwachen Produkten unterschiedlicher Größe zu erkennen ist. Des Weiteren ist es möglich, dass die falsch gespleißten RNAs teilweise durch *RNA nonsense mediated decay* abgebaut wurden, was auch das schwache Signal der falsch gespleißten Produkte erklären könnte.

Da das Wildtyp-Produkt des *zfPNPT1*-Transkripts in RNA aus Morpholino-injizierten Zebrafischembryonen nicht mehr nachweisbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Anwendung des *Splice*-Morpholinos den gewünschten spezifischen *Knockdown* zur Folge hat.

### 6.10.3.2 Morphologische Untersuchung

Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen des *Splice*-Morpholinos injiziert (0,5 und 0,8 Einheiten), wobei unter Einheiten die Tropfengröße des injizierten Morpholinos bei einer definierten Vergrößerung unter dem Injektions-Mikroskop zu verstehen ist. Fünf Tage nach der Morpholino-Injektion wurden zunächst alle toten Fische aussortiert. Anschließend wurden Fische von jeder Gruppe in *low melting* Agarose eingebettet und lichtmikroskopisch auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht (Abbildung 6.15).



**unbehandelt**  
normale Entwicklung



**0,5 Einheiten *Splice*-Morpholino**  
beeinträchtigte Entwicklung, kleiner Herzödem  
normale *startle response*



**0,8 Einheiten *Splice*-Morpholino**  
schwer fehlgebildet  
Herzödem, Schwimmblase fehlt  
insgesamt sehr reaktionsarm

#### Abbildung 6.15 Morphologische Auffälligkeiten von *Splice*-Morpholino injizierten Zebrafischen

Die Abbildung zeigt exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen eines unbehandelten, eines mit 0,5 und eines mit 0,8 Einheiten des *Splice*-Morpholinos behandelten Zebrafisches. Der Pfeil zeigt auf das Herzödem, die fehlende Schwimmblase ist durch einen gestrichelten Kreis markiert

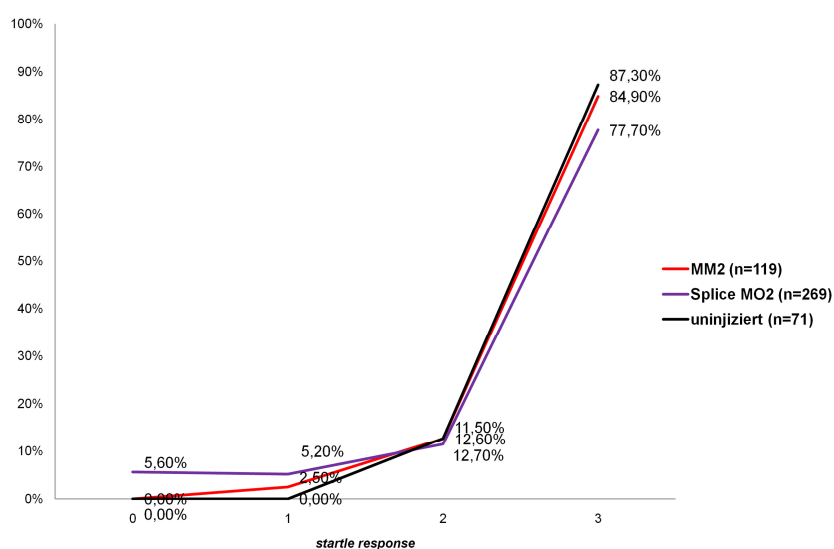
Der *Splice*-Morpholino führt in Abhängigkeit der injizierten Menge zu leichten bis schweren morphologischen Entwicklungsstörungen. Fische, die mit einer mittleren Dosis von 0,5 Einheiten des *Splice*-Morpholinos behandelt wurden, sind insgesamt deutlich kleiner als unbehandelte Fische. Des Weiteren zeigen >90% ein ausgeprägtes Herzödem. Ihr Gehör scheint jedoch nicht beeinträchtigt zu sein, da sie auf Klopfgeräusche mit einem fluchtartigen Reflex, der sogenannten *startle response*, reagieren (siehe auch Hör-Tests 6.10.3.3). Eine höhere Dosis von 0,8 Einheiten führt zu schweren Fehlbildungen. Die Fische haben ebenfalls Herzödeme und bilden keine Schwimmblase aus. Daher wurden sie auch nicht zu weiteren Untersuchungen herangezogen. *Mismatch*-Morpholino injizierte Fische sahen morphologisch aus wie unbehandelte Fische.

### 6.10.3.3 Hör-Tests

Das Hörvermögen von Zebrafischen kann über einen einfachen Klopfest untersucht werden, durch den die so genannte *startle response* getestet wird. Bei der *startle response* handelt es sich um einen fluchtartigen Reflex, mit dem der Fisch auf ein plötzliches Geräusch reagiert (Whitfield, 2002; Nicolson, 2005). Für den Test wird jeder Fisch einzeln in eine Petrischale mit Embryomedium gegeben. Durch das Klopfen an den Rand der Schale wird ein Geräusch erzeugt anhand dessen die Reaktion des Fisches überprüft werden kann. Zeigt der Fisch eine deutliche *startle response*, ist sein Gehör funktionsfähig. Um diesen Test unter möglichst standardisierten Bedingungen durchführen zu können, wurde eine Apparatur angefertigt, bei der ein Plastikstab aus einer definierten Höhe auf den Rand der Petrischale

fällt (siehe auch Kapitel 3.23.3). Jeder Fisch wurde dreimal im Abstand von mindestens 20 Sekunden getestet.

In drei unabhängigen Versuchsreihen wurden *Splice*-Morpholino injizierte, *Mismatch*-Morpholino injizierte und unbehandelte Zebrafische getestet. Es wurden jeweils 0,5 Einheiten Morpholino injiziert. Fische, die bedingt durch die Morpholino-Behandlung deutliche morphologische Fehlbildungen zeigten, wurden zuvor aussortiert. Die Ergebnisse der drei unabhängigen Versuche sind in Abbildung 6.16 zusammengefasst.



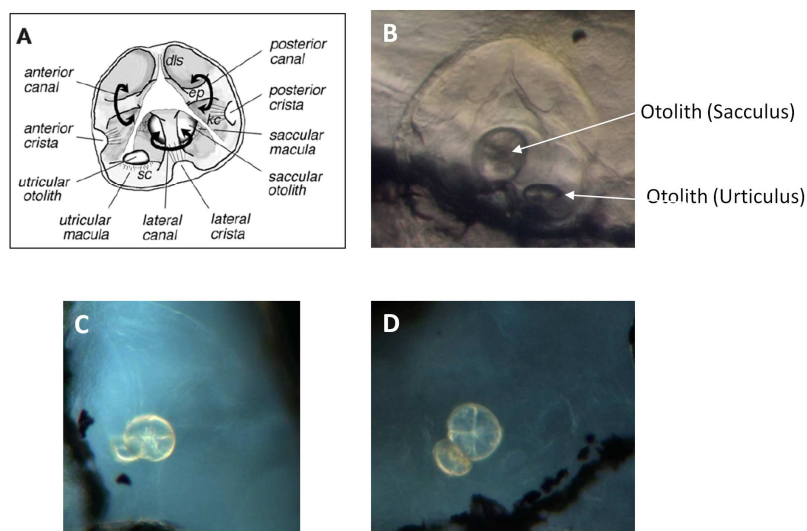
**Abbildung 6.16 Auswertung der Hör-Tests**

Befruchtete Zebrafischeier wurden mit 0,5 Einheiten Morpholino (*Splice* bzw. *Mismatch*) injiziert. Fünf Tage nach der Injektion wurden die Fische auf ihr Hörvermögen getestet. Das Diagramm zeigt, wie viel Prozent der Fische wie oft eine *startle response* gezeigt haben. (MM2 = *Mismatch*-Morpholino, *Splice* MO2 = *Splice*-Morpholino).

Die Auswertung des Hör-Tests zeigt, dass mindestens 90% der getesteten Fische aller drei Versuchsgruppen zwei- oder dreimal mit einer *startle response* reagiert haben. Das Hörvermögen ist damit unabhängig von dem injizierten Morpholino mit dem Hörvermögen von unbehandelten Zebrafischen vergleichbar. Marginale Unterschiede zeigen sich bei den Fischen, die keinmal oder nur einmal auf ein Klopfgeräusch reagiert haben: 5,6% der Fische, die mit dem *Splice*-Morpholino injiziert wurden, zeigten in allen drei Testungen keine *startle response*, wohingegen *Mismatch*-injizierte bzw. unbehandelte Zebrafische immer mindestens einmal von drei Testungen eine *startle response* zeigten.

#### 6.10.3.4 Lichtmikroskopische Untersuchungen des Zebrafisch-Ohrs

Ohrsteine, so genannte Otolithen, liegen auf den sensorischen Epithelien der beiden Maculaorgane (Sacculus und Utriculus). Die Maculaorgane sind beim Menschen Bestandteil des Gleichgewichtsorgans (siehe Kapitel 1.1.1). Beim Zebrafisch und vielen anderen Fischen bilden Sacculus und Utriculus hingegen die Sinnesorgane des Hörsinns (Whitfield, 2002). Im Lichtmikroskop wurde die Morphologie des Ohrs von unbehandelten und Morpholino-injizierten Zebrafischen untersucht (Abbildung 6.17).



**Abbildung 6.17 Fusionierte Otolithen in Morpholino-injizierten Zebrafischen**

(A) zeigt eine Übersicht des Zebrafisch-Ohrs aus Whitfield et al, 2002. In (B) ist das Ohr eines unbehandelten Zebrafisches dargestellt. In (C) und (D) sind die Ohren von Zebrafischen gezeigt, die mit 0,5 Einheiten *Splice*-Morpholino injiziert wurden.

Unbehandelte Zebrafische zeigen zwei deutlich voneinander getrennte Otolithen (Abbildung 6.17B). In circa 10% der untersuchten Zebrafische, die mit 0,5 Einheiten *Splice*-Morpholino injiziert wurden, waren die beiden Otolithen ganz oder teilweise fusioniert (Abbildung 6.17C+D). Die veränderte Morphologie der Otolithen hatte aber keinen Einfluss auf das Hörvermögen der Zebrafische, da sie auf Klopfgeräusche mit der typischen *startle response* reagierten (siehe auch Kapitel 6.10.3.3). Dass es sich bei den fusionierten Otolithen um einen spezifischen Phänotyp des Ohrs aufgrund des *PNPT1-Knockdowns* handelt, ist jedoch als eher unwahrscheinlich anzusehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass es aufgrund der allgemein verzögerten Entwicklung durch den *PNPT1-Knockdown* auch zu einer verzögerten und beeinträchtigten Entwicklung des Ohrs kommt.

## 6.11 Komplementationsversuche in *E.coli*

Die PNPase ist mit wenigen Ausnahmen (Hefe, Trypanosomen und Archaeobakterien) in allen Lebewesen zu finden und zudem hochkonserviert (Chen et al., 2007). In *E. coli* schützt die PNPase das Bakterium vor oxidativem Stress. Ein PNPase-*Knockout* Stamm zeigt ein deutliches Wachstumsdefizit unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid (Wu et al., 2009).

In Komplementationsversuchen sollte untersucht werden, ob das Wachstumsdefizit durch die Expression der Wildtyp-PNPase gerettet werden kann. Des Weiteren sollte im Vergleich dazu untersucht werden, ob und inwieweit die PNPase-Mutante in der Lage ist, das Wachstumsdefizit bei oxidativem Stress auszugleichen.

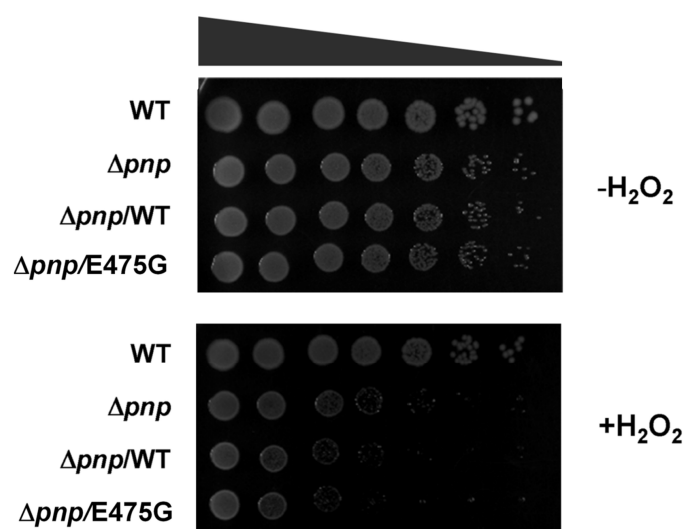
### 6.11.1 Komplementation durch die humane PNPase

Ein PNPase-*Knockout*-Stamm ( $\Delta pnp$ ) wurde von der KEIO collection (National BioResource Project, NIG, Japan) bezogen und zur Expression der hPNPase mit dem bakteriellen Vektor pBAD-DEST49 transformiert. Die Expression der humanen WT-PNPase und der

E475G-Mutante ist dabei über einen Arabinose-induzierbaren Promotor reguliert. Die Expression kann somit durch die Zugabe von Arabinose zum Medium induziert werden. Zudem kodiert der Vektor für eine C-terminale V5-His-Markierung, die den Nachweis des rekombinanten Proteins über einen V5-Antikörper im *Western Blot* ermöglicht. Als Kontrolle für normales Wachstum wurde der *E. coli* K12 Wildtyp-Stamm BW25113 eingesetzt.

#### 6.11.1.1 Komplementation mit humaner *full length* PNPase

Der  $\Delta pnp$ -Stamm wurde mit bakteriellen Expressionsvektoren transformiert, die die humane PNPase (WT bzw. E475G-Mutante) in voller Länge exprimieren. Auf LB-Agar-Platten mit 0,0002 % L-Arabinose zur Expressionsinduktion und mit oder ohne Zusatz von 0,6 mM Wasserstoffperoxid wurden die Stämme auf ihre Fähigkeit zur Komplementation des Wachstumsdefizits getestet (Abbildung 6.18).



**Abbildung 6.18 Komplementationsversuch mit der humanen *full length* PNPase**

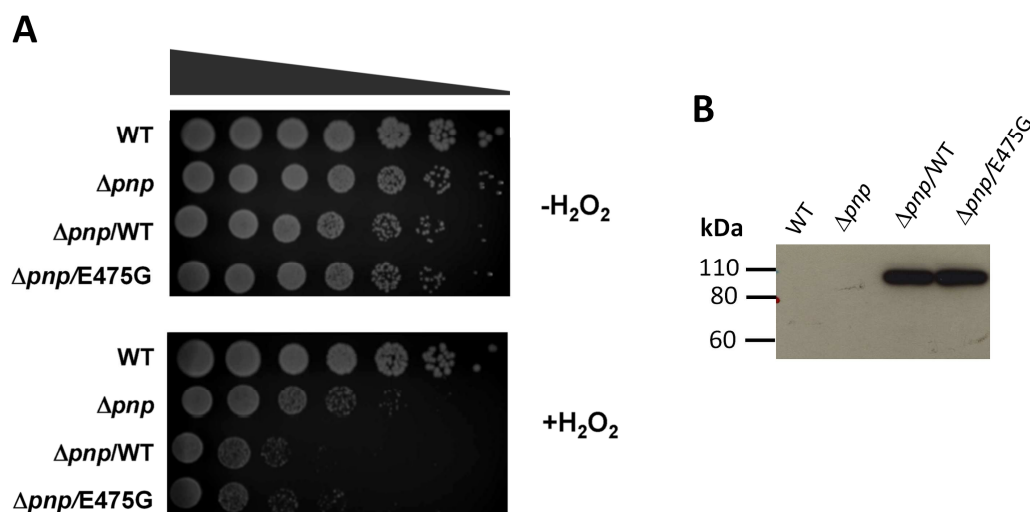
Die *E. coli*-Stämme wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt, dann seriell 1:5 verdünnt und auf LB-Agar-Platten ohne bzw. mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid getropft. Die Expression der Konstrukte wurde durch Zugabe von 0,0002% L-Arabinose induziert. Die Platten wurden für 15 h bei 37°C inkubiert.

Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde, ist der PNPase-*Knockout*-Stamm ( $\Delta pnp$ ) sensibler gegenüber oxidativem Stress, der z.B. durch Wasserstoffperoxid induziert wurde (Wu *et al.*, 2009). Dieser Phänotyp konnte in diesem Experiment reproduziert werden: Der  $\Delta pnp$ -Stamm wächst unter oxidativen Stressbedingungen deutlich schlechter als der Wildtyp. Allerdings konnte weder durch die Expression der humanen WT-PNPase ( $\Delta pnp/WT$ ) noch durch die Expression der humanen E475G-Mutante ( $\Delta pnp/E475G$ ) eine Komplementation des Phänotyps erzielt werden. Beide Stämme sind genauso empfindlich gegenüber Wasserstoffperoxid wie der  $\Delta pnp$ -Stamm.

#### 6.11.1.2 Komplementation mit humaner PNPase ohne mitochondriales Zielpeptid

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die humane *full length* PNPase nicht in der Lage ist das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms auszugleichen, wurde der  $\Delta pnp$ -Stamm mit bakteriellen

Expressionsvektoren transformiert, die die humane PNPase (WT bzw. E475G-Mutante) jedoch ohne mitochondriales Zielpeptid (-37 Aminosäuren) exprimieren. Da die endogene *E. coli*-PNPase kein mitochondriales Zielpeptid besitzt, ist diese möglicherweise für die Funktion des Proteins in *E. coli* störend. Auf LB-Agar-Platten mit 0,0002 % L-Arabinose zur Expressionsinduktion und mit oder ohne 0,6mM Wasserstoffperoxid wurden die Stämme auf die Komplementation des Wachstumsdefizits getestet (Abbildung 6.19A).



**Abbildung 6.19 Komplementationsversuch mit der humanen PNPase ohne mitochondriales Zielpeptid**  
 (A) Die *E. coli*-Stämme wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt, dann seriell 1:5 verdünnt und auf LB-Agar-Platten ohne bzw. mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid getropft. Die Expression der Konstrukte wurde durch Zugabe von 0,0002% L-Arabinose induziert. Nach circa 15 h bei 37°C wurden die Platten ausgewertet. (B) Mittels *Western Blot* wurde die Expression der rekombinanten Proteine (WT bzw. E475G) mithilfe eines V5-Antikörpers bestätigt.

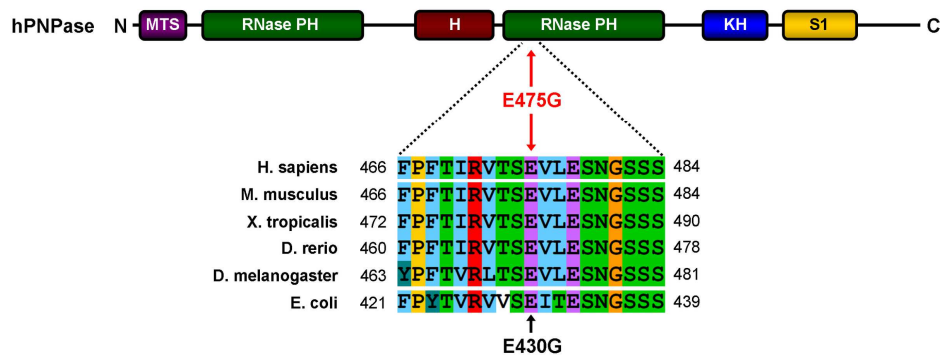
Auch ohne mitochondriales Zielpeptid kann die humane PNPase das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms nicht ausgleichen. Die Expression der rekombinanten humanen PNPase ohne MTS (WT und E475G) konnte im *Western Blot* nachgewiesen werden (Abbildung 6.19B). Sowohl die rekombinante WT-PNPase als auch die E475G-Mutante werden also von der Zelle korrekt synthetisiert.

### 6.11.2 Komplementation durch die bakterielle PNPase von *E. coli*

Da das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms durch die Expression der humanen WT-PNPase nicht ausgeglichen werden konnte und somit auch nicht überprüft werden konnte, ob die E475G-Mutante die Funktion der PNPase beeinträchtigt, wurde der Komplementationsversuch nachfolgend mit der *E. coli*-PNPase durchgeführt.

Die Glutaminsäure an Position 475 der humanen PNPase ist auch in der bakteriellen PNPase konserviert. In *E. coli* befindet sich die entsprechende Aminosäure an Position 430 (Abbildung 6.20). Um den Komplementationsversuch mit der bakteriellen PNPase durchführen zu können, wurde das bakterielle *PNPT1*-Gen kloniert. Der Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Glycin wurde durch *in vitro* Mutagenese generiert.

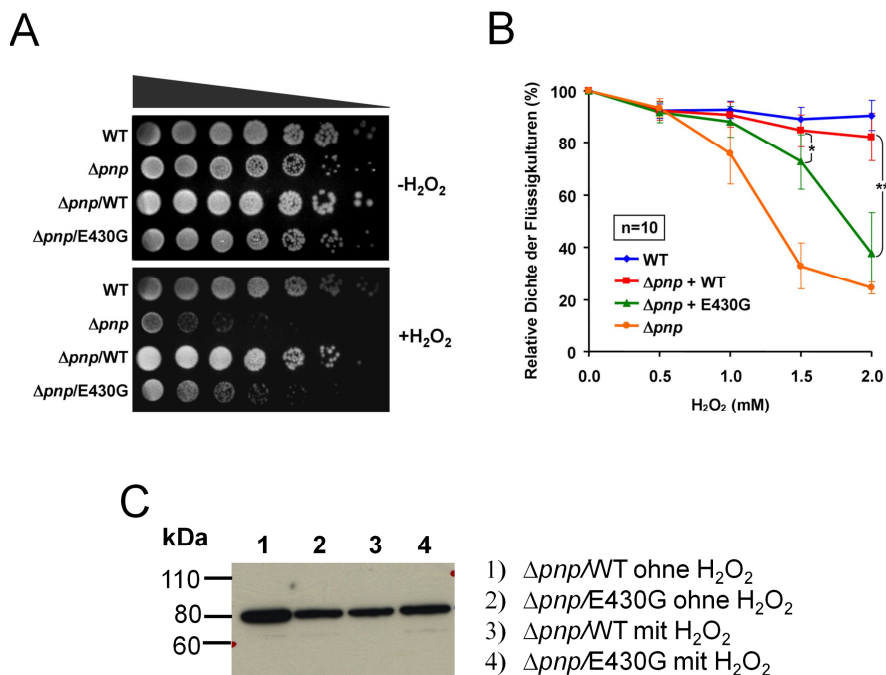




**Abbildung 6.20 Domänen der PNPase und die Konservierung der Glutaminsäure**

Die Abbildung illustriert die Lage der E475G-Mutation in der zweiten RNase PH Domäne der humanen PNPase. Die Glutaminsäure ist in allen dargestellten Spezies konserviert. In *E. coli* ist die korrespondierende Aminosäure an Position 430 zu finden.

Für die Komplementationsversuche wurde der  $\Delta pnp$ -Stamm mit pBAD-DEST49-Expressionsvektoren transformiert, die für die bakterielle PNPase (WT bzw. E430G-Mutante) kodieren. Neben Versuchen auf LB-Agar-Platten (Abbildung 6.21A) wurden auch Versuche in Flüssigkulturen (Abbildung 6.21B) durchgeführt. Dazu wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid versetzt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Kulturen bei einer Wellenlänge von 600nm ( $OD_{600}$ ) gemessen und als Maß für das Wachstum genommen. Zudem wurde die Expression der beiden Proteine anhand eines *Western Blots* untersucht (Abbildung 6.21C).



**Abbildung 6.21 Komplementationsversuche mit der bakteriellen PNPase**

(A) Die *E. coli*-Stämme wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt, dann seriell 1:5 verdünnt und auf LB-Agar-Platten ohne bzw. mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid getropft. Die Expression der Konstrukte wurde durch Zugabe von 0,0002% L-Arabinose induziert. Nach circa 15 h bei 37°C wurden die Platten ausgewertet. (B) Flüssigkulturen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,02 verdünnt, mit Wasserstoffperoxid versetzt und in Mikrotiterplatten aliquotiert. Nach 4 h bei 37°C wurde die  $OD_{600}$  gemessen und die relative Dichte der Kulturen berechnet, wobei das Wachstum der Kulturen ohne Wasserstoffperoxid gleich 100% gesetzt wurde. Es wurden 10 unabhängige Experimente durchgeführt. Signifikanzen wurden mit dem *Student's t-Test (two-tailed)* berechnet ( $*p=7.06 \times 10^{-3}$ ,  $**p=2.56 \times 10^{-6}$ ). (C) Mittels *Western Blot* wurde die Expression der rekombinanten Proteine (WT bzw. E475G) mit und ohne Wasserstoffperoxid mithilfe eines V5-Antikörpers bestätigt.

Der Komplementationstest auf LB-Agar-Platten zeigt, dass die exogen exprimierte bakterielle WT-PNPase ( $\Delta pnp/WT$ ) das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms fast vollständig ausgleichen kann. Die exogen exprimierte bakterielle PNPase mit der E430G-Mutation kann den Phänotyp dagegen nicht komplementieren ( $\Delta pnp/E430G$ ) und wächst deutlich schlechter als der  $\Delta pnp/WT$ -Stamm, jedoch besser als der  $\Delta pnp$ -Stamm. Die E430G-Mutante scheint, da sie einen milderen Phänotyp als der  $\Delta pnp$ -Stamm zeigt, eine Restfunktion zu haben. Vergleichbare Ergebnisse liefert auch der Komplementationsversuch in Flüssigkulturen: Unter oxidativem Stress - ausgelöst durch Wasserstoffperoxid - kann der  $\Delta pnp/WT$ -Stamm das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms fast vollständig ausgleichen, der  $\Delta pnp/E430G$ -Stamm hingegen kann das Wachstumsdefizit nur sehr eingeschränkt kompensieren. Die statistische Auswertung mithilfe des *Student's t-Test* ergab bei Konzentrationen von 1,5 und 2,0 mM Wasserstoffperoxid ein signifikant besseres Wachstum des  $\Delta pnp/WT$ -Stamms im Vergleich zum  $\Delta pnp/E430G$ -Stamm ( $p^{1,5\text{mM H}_2\text{O}_2} = 7.06 \times 10^{-3}$ ,  $p^{2,0\text{mM H}_2\text{O}_2} = 2.56 \times 10^{-6}$ ). Auch in den Komplementationsversuchen in Flüssigkulturen zeigte sich somit, dass die E430G-Mutante besser wächst als der  $\Delta pnp$ -Stamm, was darauf schließen lässt, dass die E430G-Mutation ein hypofunktionelles Allel darstellt. Anhand eines *Western Blots* konnte belegt werden, dass die rekombinanten Proteine von den Bakterienstämmen synthetisiert worden sind (Abbildung 6.21C).

## 6.12 Versuchsergebnisse von Kollaborationspartnern

Die in diesem Kapitel unter 6.12.1 und 6.12.2 dargestellten Versuche wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Kollaboration von Mitarbeitern aus den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. M. Teitell und von Frau Prof. C. Koehler an der *University of California*, Los Angeles, durchgeführt. In funktionellen *in vitro* Versuchen wurden von den o.g. Arbeitsgruppen die Auswirkungen der E475G-Mutation auf die Funktion der PNPase in dort bereits etablierten Experimenten untersucht. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen geben Aufschluss über die Auswirkungen der E475G-Mutation und des Weiteren bauen weitere eigene Versuche teilweise auf diesen Versuchsergebnissen auf. In Absprache mit Herrn Prof. M. Teitell und Frau Prof. C. Koehler werden diese externen Ergebnisse der Vollständigkeit halber und für ein besseres Verständnis in dieser Dissertation dargestellt.

### 6.12.1 *Blue Native* Gelelektrophorese

Unter nativen Bedingungen bildet die PNPase einen trimeren Komplex aus drei PNPase-Monomeren. Dadurch entsteht eine ringförmige Struktur mit einem zentralen Kanal (Shi 2008). Für eine artifizielle Mutante (D135G) wurde bereits beschrieben, dass diese nicht mehr zur Trimerisierung in der Lage ist (Portnoy *et al.*, 2008). Auch die E475G-Mutante sollte mithilfe der *Blue Native* Gelelektrophorese auf ihre Fähigkeit zur Trimerisierung getestet werden.



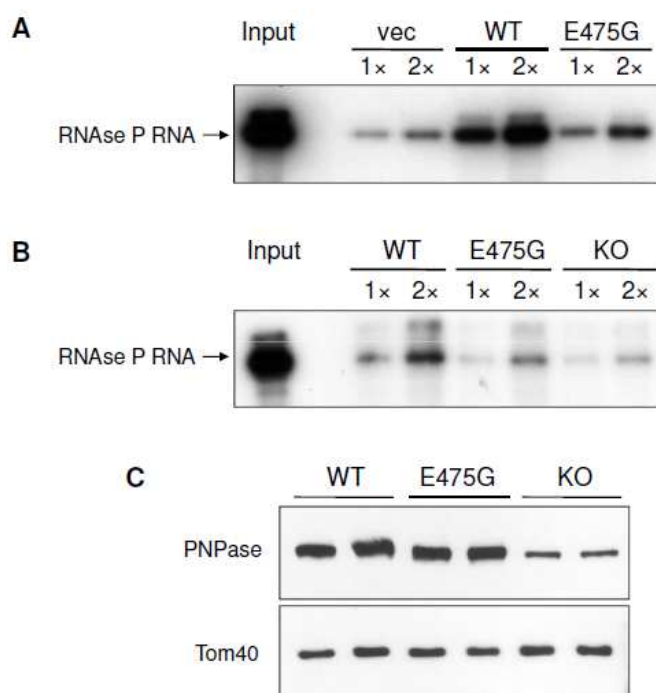
detektiert, was dem Molekulargewicht von PNPase-Monomeren entspricht (Abbildung 6.22B).

Sowohl im Hefe- als auch im Säugetierzellmodell konnte somit gezeigt werden, dass die E475G-Mutante in ihrer Fähigkeit, funktionelle Trimere zu bilden, stark beeinträchtigt ist.

### 6.12.2 RNA-Import-Versuche

Von Wang *et al.* konnte im Mausmodell erstmalig gezeigt werden, dass die PNPase für den Import von bestimmten kleinen RNAs in Mitochondrien verantwortlich ist. Dieser RNA-Import ist für die korrekte Replikation, Transkription und Translation des mitochondrialen Genoms essentiell. Unter anderem konnte der Import der RNA Komponente der RNase P (RNase P RNA) nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2010). Die RNase P mit ihrer RNA-Komponente ist neben weiteren Enzymen an der Prozessierung von polycistronischen mitochondrialen Transkripten beteiligt. In den Untersuchungen von Wang *et al.* wurde nachgewiesen, dass es durch die Herunterregulierung der PNPase zu einem stark reduzierten Import der RNase P RNA kommt. Als Folge war die Prozessierung von polycistronischen mitochondrialen Transkripten beeinträchtigt und es kam zu deren Akkumulation in der mitochondrialen Matrix.

In RNA-Import-Versuchen, durchgeführt von den Arbeitsgruppen von M. Teitell und C. Koehler, wurde der Einfluss der E475G-Mutation auf den Import der RNase P RNA in Mitochondrien untersucht (Abbildung 6.23). Dazu wurden Mitochondrien aus der Hefe und aus MEFs isoliert und mit *in vitro* translaterter RNase P RNA inkubiert. Anschließend wurde mittels Nukleasen nicht-importierte RNA abgebaut. Im *Northern Blot* wurde das Ausmaß des Imports von RNase P RNA in Mitochondrien analysiert.



#### Abbildung 6.23 RNA-Import-Versuche

(A) *In vitro* translatierte RNase P RNA wurde mit Mitochondrien inkubiert, die aus Hefe-Stämmen isoliert wurden, die mit PNPase-WT, PNPase-E475G bzw. mit einem Leervektor (vec) transformiert worden sind. Nicht-importierte RNA wurde mit Nukleasen verdaut. Der Import wurde mit der einfachen (1x) bzw. mit der doppelten (2x) Menge an RNase P RNA durchgeführt. Nach der RNA-Isolation und -Auftrennung auf einem Urea-Acrylamid-Gel wurde die radioaktiv markierte RNase P RNA im *Northern Blot* nachgewiesen. (B) Mitochondrien wurden aus folgenden MEF-Linien isoliert: (a) MEFs, transfiziert mit PNPase-WT-Konstrukt (WT), in denen die endogene PNPase durch Behandlung mit Cre-Rekombinase herunterreguliert wurde (partieller *Knockout*). (b) MEFs, transfiziert mit PNPase-E475G-Konstrukt (E475G), in denen die endogene PNPase durch Behandlung mit Cre-Rekombinase herunterreguliert wurde (partieller *Knockout*) und (c) MEFs mit partiellem PNPase-*Knockout* (KO). Die Mitochondrien wurden mit radioaktiv markierter RNase P RNA inkubiert. Nicht-importierte RNA wurde mit Nukleasen verdaut. Der Import wurde mit der einfachen (1x) bzw. mit der doppelten (2x) Menge an RNase P RNA durchgeführt. Nach der RNA-Isolation und -Auftrennung auf einem Urea-Acrylamid-Gel wurde die radioaktiv markierte RNase P RNA im *Northern Blot* nachgewiesen. (C) Der *Western Blot* bestätigt die Expression der PNPase-Konstrukte im MEF-RNA-Import-Versuch und den partiellen *Knockout* (KO) mit einer verringerten PNPase-Expression um circa 75%. Ein vollständiger *Knockout* ist nicht möglich, da kultivierte Zellen ohne PNPase nicht lebensfähig sind (Wang *et al.*, 2010). Das mitochondriale Protein Tom40 wurde als Referenz für die eingesetzte Proteinmenge nachgewiesen.

Erwartungsgemäß ist der Import von RNase P RNA in WT-PNPase exprimierenden Hefe-Mitochondrien gegenüber Hefe-Mitochondrien ohne PNPase-Expression (Leervektor) deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu, ist die Menge an RNase P RNA in Mitochondrien, die E475G-PNPase exprimieren circa doppelt so hoch wie in Hefe-Mitochondrien ohne PNPase-Expression (Leervektor). Im Vergleich zu WT-PNPase exprimierenden Mitochondrien beträgt die RNase P RNA Menge in E475G-PNPase exprimierenden Mitochondrien nur etwa ein Viertel. Die RNA-Import-Kapazität der E475G-Mutante ist somit stark reduziert (Abbildung 6.23A).

Die Import-Versuche in MEFs zeigen ein vergleichbares Ergebnis. Die Importmenge von RNase P RNA in PNPase-WT exprimierenden MEFs ist in etwa doppelt so hoch wie in PNPase-E475G-exprimierenden MEFs (Abbildung 6.21B).

### 6.13 MicroRNA Degradationsversuche

MicroRNAs sind kleine nicht kodierende RNAs bestehend aus 21-23 Nukleotiden. Sie binden in der Regel in der 3'-untranslatierten Region ihrer Ziel-mRNA und inhibieren spezifisch die Translation (Perron & Provost, 2009). Dieser gut untersuchte Regulationsprozess findet im Cytosol statt.

Das *et al.* berichten, dass die PNPase spezifisch die microRNA-221 degradiert, wohingegen andere getestete microRNAs (miRNAs) nicht von einem Abbau durch die PNPase betroffen sind (Das *et al.*, 2009). Diese Funktion der PNPase in Bezug auf die spezifische Degradierung oder Regulierung von miRNAs sollte im Zusammenhang mit einer für das Hören bekanntermaßen bedeutenden miRNA untersucht werden. Die miRNA-96 wurde 2009 als erste „Taubheits-miRNA“ identifiziert. Mutationen in der *seed region* der miRNA-96 führen zu einer dominanten Form erblicher Hörstörung. Zudem konnte gezeigt werden, dass die miRNA-96 vermutlich eine regulatorische Funktion in Bezug auf das Expressionsprofil in Haarzellen ausübt (Mencia *et al.*, 2009).

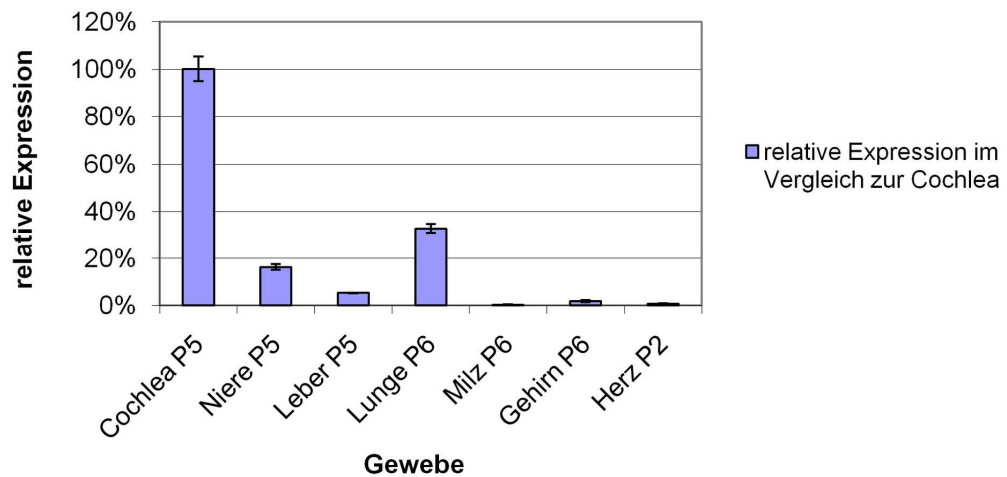
In microRNA Degradationsversuchen wie von Das *et al.* beschrieben sollte untersucht werden, ob die PNPase einen Einfluss auf die Stabilität der miRNA-96 hat. Die Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen miRNA-96 und der PNPase könnte helfen, die Ursache für die Taubheit in der hier untersuchten Familie besser zu verstehen.

Neben der miRNA-221 als Positivkontrolle für die Degradation durch die PNPase und der miRNA-96 wurden noch weitere miRNAs untersucht. Darunter miRNA-182 und miRNA-183, die in einem *Cluster* mit miRNA-96 transkribiert werden und in Haarzellen ebenfalls stark exprimiert sind (Weston *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde die miRNA-184 untersucht, die in den Versuchen von Das *et al.* von einer Degradation durch die PNPase nicht betroffen war. Als Kontrolle für eine nicht-miRNA, wurde die Expression der *small nucleolar RNA 202* (snoRNA202) analysiert. Bei der snoRNA202 handelt es sich um eine kleine kernlokalisierte RNA, die ubiquitär exprimiert ist, und daher als Referenzgen für die Expressionsanalyse von miRNAs verwendet werden kann (Petriv *et al.*, 2010).

Die gesamte RNA inklusive miRNAs wurde aus murinen Geweben isoliert. Die auf diese Weise isolierte RNA/miRNA wurde mit *in vitro* translaterter PNPase (WT bzw. E475G) inkubiert. Anschließend wurde die RNA/miRNA erneut isoliert und die miRNAs mittels spezifischer *Taqman*-Sonden und *Real-time*-PCR quantifiziert.

#### 6.13.1 Expressionsprofil von miR-96 in unterschiedlichen murinen Geweben

Für die Versuchsdurchführung waren große Mengen an RNA nötig, die in diesem Umfang nicht ausreichend aus Cochleae gewonnen werden konnten. Um ein alternatives Gewebe mit vergleichsweise hoher miRNA-96-Expression identifizieren zu können, wurde zunächst das relative Expressionsniveau der miRNA-96 in unterschiedlichen Geweben im Vergleich zu der Expression in der Cochlea untersucht (Abbildung 6.24).



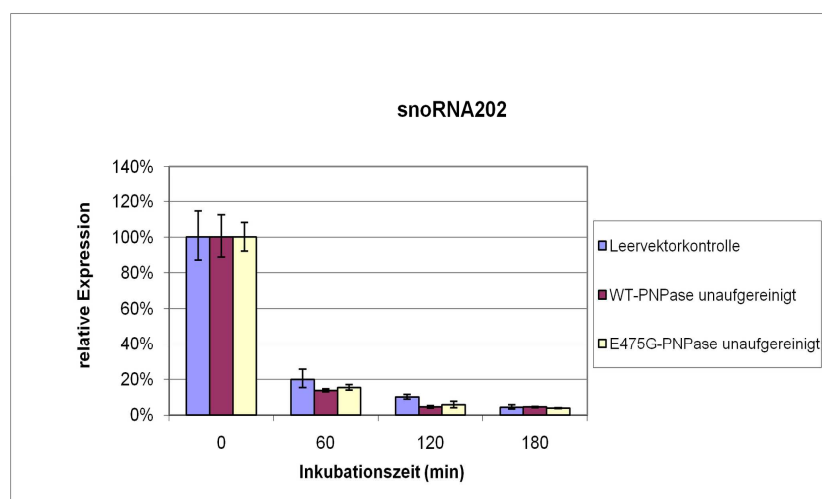
**Abbildung 6.24 Expressionsvergleich von miRNA-96 in unterschiedlichen Geweben**

RNA inklusive miRNAs wurde aus Cochlea, Niere, Leber, Lunge, Milz, Gehirn und Herz gewonnen. Das Alter der verwendeten Wildtyp-Mäuse ist im Diagramm angegeben. Mit miRNA-96 spezifischen RT-Primern (siehe auch Kapitel 2.8.1) wurde die miRNA-96 in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine *Real-time-PCR* mit miRNA-96 spezifischen *Real-time-PCR* Primern und einer fluoreszenzmarkierten Sonde durchgeführt. Das relative Expressionsniveau in den unterschiedlichen Geweben ist prozentual zum Expressionsniveau in der Cochlea dargestellt (Expression in der Cochlea = 100 %). Die Standardabweichungen beziehen sich auf den Mittelwert aus 4 Einzelmessungen.

Die Ergebnisse der *Real-time-PCR* zeigen erwartungsgemäß, dass die Expression von miRNA-96 in der Cochlea im Vergleich zu den anderen Geweben am höchsten ist. In der Lunge ist die miRNA-96 mit 33% vom Expressionsniveau der Cochlea von den getesteten Geweben am zweihöchsten exprimiert. Daher wurde für die folgenden Degradationsversuche RNA/miRNA aus der Lunge verwendet.

### 6.13.2 Vorversuch mit unaufgereinigter PNPase

In einem Vorversuch wurde RNA/miRNA mit *in vitro* translaterter PNPase-WT, PNPase-E475G bzw. mit der Leervektorkontrolle für 0, 60, 90 und 180 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Menge an snoRNA202 mittels *Real-time* PCR analysiert. Wie sich zeigte, wurde die snoRNA202 in allen drei Versuchsansätzen sehr stark degradiert (Abbildung 6.25).



### 6.25 Degradation der snoRNA202 durch unaufgereinigte PNPase

Dargestellt ist die relative Expression der snoRNA202. Jeder Messwert und die zugehörigen Standardabweichungen ergeben sich aus dem Mittelwert von 4 Einzelmessungen. 5µg RNA/miRNA (isoliert aus Lungengewebe) wurden mit 10µl *in vitro* translaterter unaufgereinigter WT-PNPase, E475G-PNPase bzw. der Leervektorkontrolle inkubiert.

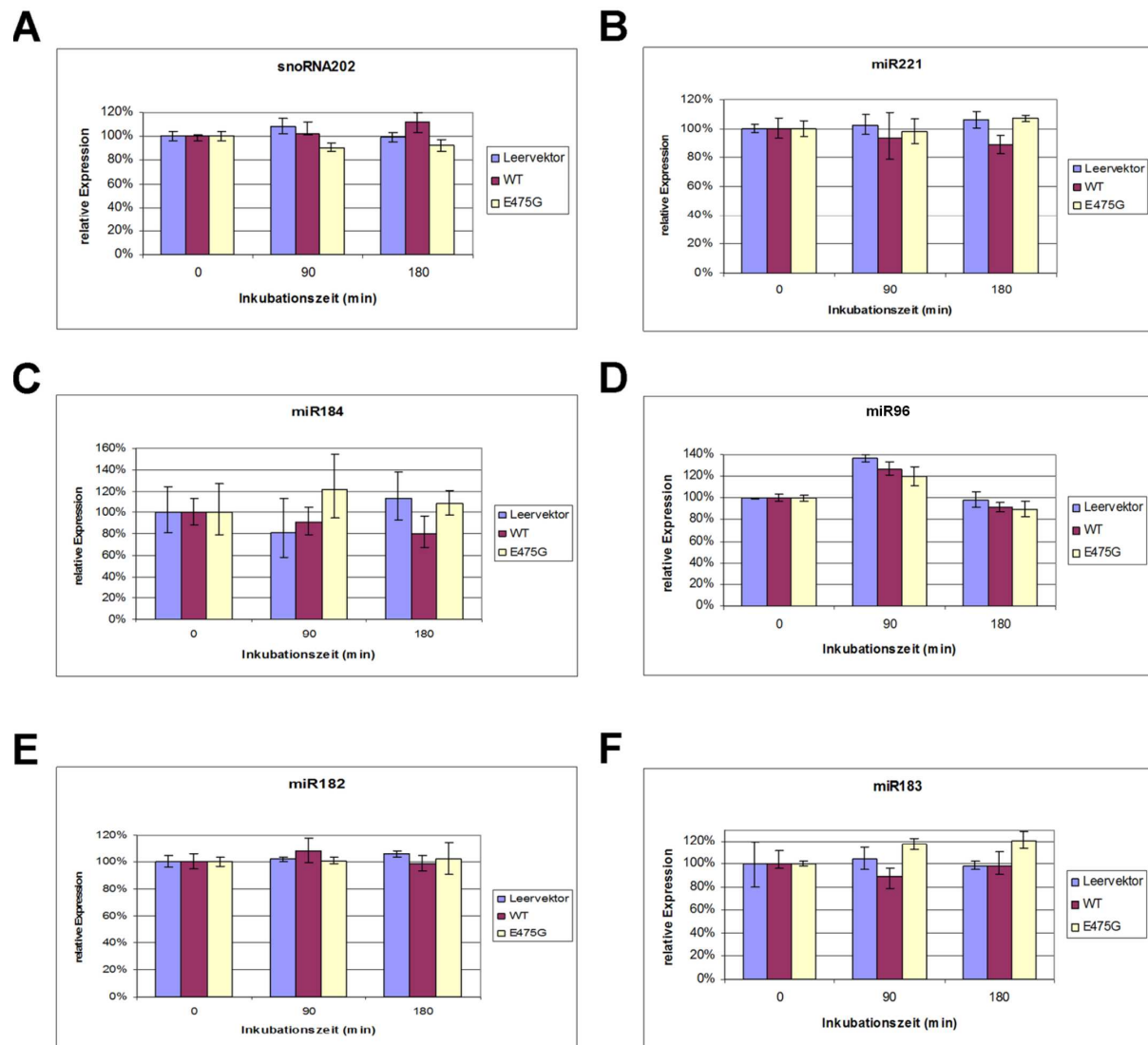
Die Degradation der snoRNA202 in diesem Versuch kann nicht durch die PNPase bedingt sein, da es auch unter Behandlung mit der Leervektorkontrolle zu einer ebenfalls starken Degradation der snoRNA202 kam. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass RNasen aus dem Reticulozytenlysat, welches für die *in vitro* Translation verwendet wurde, für die Degradation verantwortlich waren. In den folgenden microRNA Degradationsversuchen wurde, um derart unspezifische Effekte zu vermeiden, daher His-tag-affinitätsaufgereinigte PNPase verwendet.

### 6.13.3 MicroRNA Degradation mit aufgereinigter PNPase

*In vitro* translaterter PNPase (WT bzw. E475G) wurde mittels His-Affinitätsaufreinigung gewonnen. Um unspezifische nicht durch die PNPase bedingte Effekte ausschließen zu können, wurde als Kontrolle die *in vitro* Translation mit einem Leervektor durchgeführt und parallel mit RNA/miRNA inkubiert. RNA/miRNA, die aus Lungengewebe von sechs Tage alten Mäusen gewonnen wurde, wurde mit *in vitro* translaterter PNPase-WT, PNPase-E475G bzw. mit der Leervektorkontrolle für 0, 90 bzw. 180 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA/miRNA erneut isoliert. Mittels *Real-time* PCR und spezifischen *Taqman*-Sonden wurde für jede miRNA zu den unterschiedlichen Zeitpunkten die absolute Expression ( $C_t$ -Wert) bestimmt. Die Expression zu Beginn des Versuchs (Zeitpunkt Null)



wurde gleich 100% gesetzt. Die relative Expression zu den Zeitpunkten 90 und 180 min wurde in Abhängigkeit zu der Expression zum Zeitpunkt Null ermittelt (Abbildung 6.26).



**Abbildung 6.26 Relative Expression ausgewählter miRNAs nach Inkubation mit rekombinanter PNPase**

Jeder Messwert und die zugehörigen Standardabweichungen ergeben sich aus dem Mittelwert von 4 Einzelmessungen. 5µg RNA/miRNA (isoliert aus Lungengewebe) wurden mit 10µl *in vitro* translaterter WT-PNPase, E475G-PNPase bzw. der Leervektorkontrolle inkubiert. (A) Expression der snoRNA202, einer kleinen kernlokalisierten Kontroll-RNA. (B) Expression der miR221, Positivkontrolle für die Degradation durch die PNPase. (C) Expression der miR184, Negativkontrolle für die Degradation durch die PNPase. (D) Expression von miR96, einer mit erblicher Taubheit assoziierten miRNA. (E-F) Expression von miR182 bzw. miR183, die beide zusammen mit miR96 in einem *Cluster* exprimiert werden.

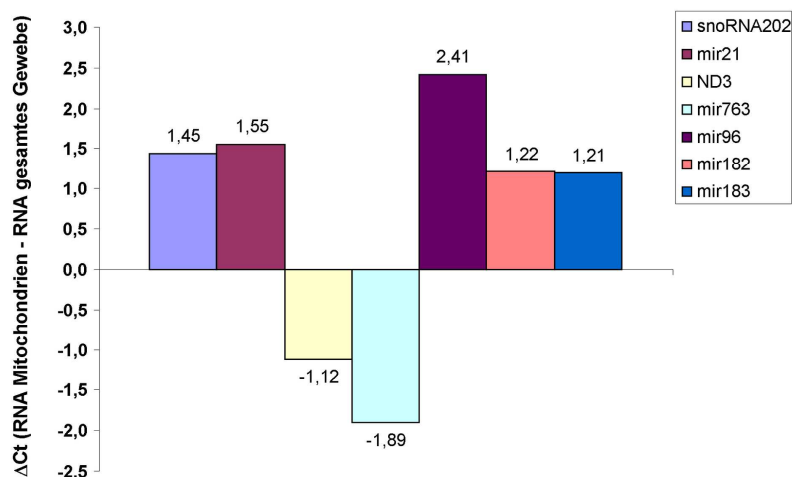
Das relative Expressionsniveau der snoRNA202 bleibt sowohl nach 90 min als auch nach 180 min Inkubation mit *in vitro* translaterter PNPase konstant. Sie wird also weder durch die WT-PNPase noch durch die E475G-Mutante degradiert (Abbildung 6.25A). Auch die miR221 wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht degradiert (Abbildung 6.25B). Die Ergebnisse von Das *et al.* konnten somit nicht reproduziert werden. Auch die Stabilität der miR184 ist trotz leichter Schwankungen als relativ konstant anzusehen (Abbildung 6.25C). Die in einem gemeinsamen Cluster exprimierten miRNAs miRNA-96, -182 und -183 zeigen ebenfalls keine signifikante Änderung nach einer Inkubation mit *in vitro* translaterter PNPase

(Abbildung 6.25D-E). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen weder die WT-PNPase noch die E475G-Mutante die Eigenschaft haben, die untersuchten miRNAs zu degradieren.

#### 6.14 Subzelluläre Lokalisierung von miRNA-96, -182 und -183

Die Regulation der posttranskriptionellen Genexpression durch microRNAs findet im Cytosol statt (Perron & Provost, 2009). Kren *et al.* konnten in ihrer Publikation von 2008 jedoch nachweisen, dass einige miRNAs auch in Mitochondrien vorkommen. Die identifizierten miRNAs sind weder komplementär zu mitochondrial kodierten Genen, noch zu kernkodierten Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren. Vielmehr schließen die Autoren aus ihren Untersuchungen, dass die mitochondrial-lokalisierten miRNAs die Expression von Genen regulieren, die in Apoptose, Zellproliferation und Differenzierung involviert sind, und dass die Mitochondrien als Reservoir für diese miRNAs dienen (Kren *et al.*, 2009).

Es wäre durchaus denkbar, dass die PNPase, neben dem bereits bekannten Import von kleinen RNAs in die Mitochondrien (Wang *et al.*, 2010), auch für den Import von miRNAs in die Mitochondrien verantwortlich sein könnte. Daher sollte untersucht werden, ob die in Haarzellen hochexprimierten miRNAs ebenfalls in Mitochondrien angereichert sind. Analysiert wurde die Expression von miRNA-96, -182 und -183. Dazu wurde RNA/miRNA aus murinem Lungengewebe bzw. aus angereicherten Mitochondrien aus murinem Lungengewebe isoliert. Mittels *Real time* PCR wurde das Verhältnis der relativen Expression der miRNAs aus Mitochondrien im Vergleich zur gesamten Zelle bestimmt (Abbildung 6.27). Als Positivkontrolle für eine Anreicherung in Mitochondrien wurden die miRNA-763, die in hoher Kopienzahl in Mitochondrien zu finden ist (Kren *et al.*, 2009), sowie das mitochondrial kodierte Gen *ND3*, dessen Transkription in Mitochondrien stattfindet, eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die kernlokalisierte snoRNA202 und die miRNA-21, welche nicht in Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Kren *et al.*, 2009), verwendet.



**Abbildung 6.27 miRNA-Expressionsvergleich zwischen Mitochondrien und Gesamtgewebe**

Für jede untersuchte miRNA bzw. RNA wurde mittels *Real time* PCR der  $C_t$ -Wert bestimmt. Dazu wurde miRNA/RNA aus isolierten Mitochondrien bzw. miRNA/RNA aus dem Gesamtgewebe eingesetzt. Um das Verhältnis der Expression vergleichen zu können, wurde der  $\Delta C_t$ -Wert bestimmt. Ein positiver  $\Delta C_t$ -Wert bedeutet, dass die untersuchte miRNA/RNA im Gesamtgewebe in höherer Kopienzahl vorhanden ist, als in isolierten Mitochondrien. Ein negativer  $\Delta C_t$ -Wert hingegen deutet darauf hin, dass die miRNA/RNA in Mitochondrien angereichert ist. Ein  $\Delta C_t$ -Wert von 1 besagt eine 2x höhere Expression im Gesamtgewebe im Vergleich zur Expression in Mitochondrien, ein  $\Delta C_t$ -Wert von 2 eine 4x erhöhte Expression im Gesamtgewebe im Vergleich zur Expression in Mitochondrien usw.

Das miRNA-Expressionsprofil bestätigt die Ergebnisse von Kren *et al.* insofern, dass die miRNA-763 im Vergleich zum Gesamtgewebe in Mitochondrien fast 4x so stark exprimiert ist. Ebenfalls sind Transkripte des mitochondrial kodierten Gens *ND3* in höherer Kopienzahl in Mitochondrien nachweisbar als im Gesamtgewebe. Sowohl die miRNA-21 als auch die snoRNA202, die als Negativkontrolle für eine Anreicherung in Mitochondrien eingesetzt wurden, sind im Gesamtgewebe circa 3x so stark exprimiert wie in Mitochondrien. Die Positivkontrollen (miRNA-763 und *ND3*) und die Negativkontrollen (miRNA-21 und snoRNA202) für eine miRNA/RNA-Anreicherung in Mitochondrien entsprechen somit den Erwartungen. Die Expression des miRNA-Clusters aus miRNA-96, -182 und -183 ist für alle drei miRNAs höher im Gesamtgewebe. MiRNA-96 ist ~5,3x, miRNA-182 ~2,3x und miRNA-183 ebenfalls ~2,3x so hoch im Gesamtgewebe exprimiert wie in angereicherten Mitochondrien.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Hypothese, dass die untersuchten microRNAs möglicherweise aufgrund eines PNPase abhängigen Imports in Mitochondrien angereichert sein könnten, nicht bestätigt werden.

## 7 Diskussion

### 7.1 Eine *Missense*-Mutation in *PNPT1* führt zu erblicher Taubheit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine konsanguine marokkanische Familie untersucht, in der drei von sechs Kindern von Geburt an unter nicht-syndromaler Taubheit, die einem autosomal-rezessiven Vererbungsmuster folgt, leiden. Der Umstand, dass die Eltern ein Verwandtschaftsverhältnis 1. Grades zueinander haben (Konsanguinität), ist für die Identifikation des Gendefekts von besonderer Bedeutung gewesen. Die zugrundeliegende Hypothese ist, dass die Eltern heterozygote Anlageträger der gleichen Mutation sind, die sie jeweils von einem gemeinsamen Vorfahren, z.B. der gemeinsamen Großmutter, geerbt haben. Mithilfe einer genomweiten Analyse von SNPs konnte eine homozygote Region auf Chromosom 2 identifiziert werden, die gemeinsam mit dem Phänotyp Taubheit vererbt wird, also gekoppelt vorliegt. Durch direkte Sequenzierung aller Gene innerhalb der gekoppelten Region konnte eine *Missense*-Mutation in dem Gen *PNPT1* identifiziert werden, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Glycin (p.E475G) führt. Jedoch muss nicht jede *Missense*-Veränderung zwangsläufig einen pathogenen Effekt zur Folge haben. Im *PNPT1*-Gen gibt es einige annotierte SNPs, die einen Aminosäureaustausch bedingen, aber aufgrund ihrer Häufigkeit nicht als pathogen einzustufen sind. Der SNP rs7594497 z.B. führt an der Position 590 der PNPase zu einer Aminosäuresubstitution von Asparagin zu Asparaginsäure. Mit einer Heterozygotenfrequenz von mehr als 20% (Quelle: *Exome Variant Server*) kann jedoch für diesen SNP mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass er keine pathogene Veränderung darstellt. Genetische und funktionelle Analysen im Rahmen dieser Arbeit können jedoch bestätigen, dass es sich bei dem identifizierten Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Glycin an Position 475 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um die ursächliche Mutation für die erbliche Taubheit in der untersuchten Familie handelt. Dafür spricht zum einen, dass alle anderen Gene in der gekoppelten Region als Ursache weitestgehend ausgeschlossen werden konnten, da keine potentiell pathogenen Veränderungen nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 6.1). Zum anderen handelt es sich bei der Mutation auch nicht um einen häufigen Polymorphismus, da sie weder in mehr als 400 gesunden Kontroll-Individuen unterschiedlicher ethnischer Herkunft zu finden war, noch in Datenbanken wie *dbSNP* aufgeführt ist. In einer weiteren Datenbank, dem *Exome Variant Server*, in der die Daten von Exomsequenzierungen von derzeit circa 2500 Individuen zusammengefasst sind, ist ebenfalls keine Veränderung an der Position 475 der PNase verzeichnet. Es kann also mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei der E475G-Mutation um einen häufigen Polymorphismus handelt. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Mutation innerhalb der Familie mit dem Phänotyp Taubheit (siehe Abbildung 4.1)

kosegregiert. Die auf der Konsanguinität beruhende Annahme, dass nur betroffene Kinder für die Mutation homozygot sind, konnte durch die Kosegregationsanalyse bestätigt werden. Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei der Aminosäuresubstitution um die ursächliche Veränderung handelt, ist auch die hohe Konservierung der Glutaminsäure an Position 475. Diese ist bis hin zu *E. coli* konserviert (siehe Abbildung 6.20), was darauf hinweist, dass die Glutaminsäure an dieser Position für die Funktion des Proteins über Artgrenzen hinweg wichtig ist, und dass eine Veränderung vermutlich eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion zur Folge hätte. Größere homozygote Deletionen können ebenfalls als Ursache für die Taubheit in der hier untersuchten Familie ausgeschlossen werden, da diese über die genomweite Kopplungsanalyse mittels *GenomeScan* identifiziert worden wären.

Nicht gänzlich als Ursache für die Taubheit ausgeschlossen werden können Mutationen in nicht-kodierenden Genabschnitten, da diese Bereiche nicht vollständig sequenziert worden sind. Zwar gibt es Beispiele für Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen, die ursächlich für monogene Erkrankungen, auch für Taubheit (Schultz *et al.*, 2009), sein können, diese sind aber äußerst selten. Und da alle bisher aufgeführten Argumente dafür sprechen, dass es sich bei der *Missense*-Veränderung in der gekoppelten Region um die ursächliche Mutation handelt, ist es als sehr unwahrscheinlich anzusehen, dass eine weitere Mutation in nicht-kodierenden Abschnitten ursächlich sein könnte.

Des Weiteren konnte, wie noch eingehender diskutiert werden wird, in funktionellen *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass die E475G-Mutation zu einem hypofunktionellen Protein führt, was ein weiteres Argument für die Ursächlichkeit der Mutation darstellt. Bedenkt man nämlich, dass der *PNPT1-Knockout* in der Maus embryonal letal ist, und dass der *PNPT1-Knockdown* im Zebrafisch zu schweren Fehlentwicklungen führt (siehe Kapitel 3.23.2), kann davon ausgegangen werden, dass ein totaler Funktionsverlust der PNPase auch beim Menschen schwerwiegende wenn nicht letale Folgen hätte. Aufgrund dieser Annahme, würde man z.B. nicht davon ausgehen, in *PNPT1* eine homozygote Stoppmutation zu finden, sondern würde vielmehr erwarten, eine Mutation wie die E475G-Mutation zu finden, die lediglich eine beeinträchtigte Funktion, jedoch nicht einen totalen Funktionsverlust des Proteins, zur Folge hätte.

Aus genetischer Sicht wäre ein weiterer überzeugender Beweis für die Ursächlichkeit der E475G-Mutation die Identifikation einer weiteren Mutation (oder derselben Mutation) im *PNPT1*-Gen in einer unabhängigen Familie, die ebenfalls von einer erblichen Taubheit betroffen ist. Eine zweite Taubheitsfamilie mit *PNPT1*-Mutationen konnte jedoch bisher durch genomweite Kopplungsanalysen nicht identifiziert werden. Dies ist für diese außergewöhnlich heterogene Erkrankung jedoch keine Ausnahme, da bereits mehrere Loci beschrieben worden sind, auf die bis dato lediglich eine einzelne Familie kartiert werden konnte.

Da bisher in der Literatur keine Mutationen im humanen *PNPT1*-Gen beschrieben worden sind, ist die in dieser Arbeit identifizierte Mutation die erste Veränderung im *PNPT1*-Gen, die mit einem klinischen Phänotyp beim Menschen in Verbindung gebracht werden kann.

## 7.2 Die E475G-Mutation beeinträchtigt weder die Proteinstabilität noch die subzelluläre Lokalisierung der PNPase

Der mutationsbedingte Aminosäureaustausch von Glutaminsäure nach Glycin an der Position 475 bedeutet für das Protein einen Ladungsverlust, was möglicherweise zu einer fehlerhaften Sekundärstruktur der E475G-PNPase führen könnte. Fehlerhafte Proteine können von der Zelle erkannt und durch das Proteasom oder durch andere Proteasen abgebaut werden. Diese Art der Qualitätskontrolle verhindert z.B. die Aggregation falschgefalteter Proteine und dient somit dem Schutz der Zellen (Leandro *et al.*, 2011). Um den Einfluss der E475G-Mutation auf die Proteinstabilität zu untersuchen, wurden Hek293T-Zellen mit WT- bzw. E475G-PNPase-Expressionsvektoren transfiziert. Des Weiteren wurde, da die Proteinmenge an WT-PNPase in HeLa-Zellen unter oxidativem Stress bekanntermaßen abnimmt (Hayakawa & Sekiguchi, 2006), auch der Einfluss von oxidativem Stress auf die Stabilität der E475G-PNPase untersucht. Weder unter Standardwachstumsbedingungen noch unter oxidativem Stress wurde ein Unterschied in der Proteinstabilität zwischen transient transfizierter WT-PNPase und E475G-PNPase festgestellt (siehe Kapitel 6.2 und 6.3). Die exogen exprimierte rekombinante E475G-PNPase wird demnach vermutlich von der zellulären Proteinqualitätskontrolle nicht als fehlerhaftes Protein erkannt und somit auch nicht dem Abbau zugeführt. Ferner lässt sich daraus schließen, dass die Pathogenität der E475G-Mutation höchstwahrscheinlich nicht auf einer beeinträchtigten Proteinstabilität beruht. Da es sich bei der transienten Transfektion jedoch um ein artifizielles System handelt, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Proteinstabilität der E475G-PNPase *in vivo* beeinträchtigt ist.

*Missense*-Mutationen können zu einer subzellulären Fehllokalisierung führen. Mutationen in *ATP13A2*, die zu einem parkinsonähnlichen Syndrom führen, können z.B. eine Fehllokalisierung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum zur Folge haben, das jedoch normalerweise in Lysosomen lokalisiert ist (Ramirez *et al.*, 2006). Die Wildtyp-PNPase ist im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert (Chen *et al.*, 2006). Ähnlich wie durch Mutationen in *ATP13A2* könnte auch die E475G-Mutation in der PNPase zu einer Fehllokalisierung führen. Um den Einfluss der E475G-Mutation auf die subzelluläre Lokalisierung zu untersuchen, wurden COS7-Zellen mit WT- bzw. E475G-PNPase-Expressionsvektoren transient transfiziert und mittels Immunfluoreszenzmarkierung analysiert. Sowohl N-terminal mit einem V5-His-tag markierte WT-PNPase als auch E475G-PNPase sind mitochondrial lokalisiert (siehe Kapitel 6.4). Die E475G-Mutation scheint somit keinen Einfluss auf die Lokalisierung bzw. den Import von rekombinanter

PNPase in Mitochondrien zu haben. Aufgrund der artifiziellen exogenen Expression kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die E475G-Mutation *in vivo* auf die Lokalisierung der PNPase anders auswirkt.

Zusammenfassend haben die Versuche gezeigt, dass die postulierte Hypofunktionalität der E475G-PNPase wahrscheinlich weder auf einer verringerten Proteinstabilität noch auf einer veränderten subzellulären Lokalisierung beruht.

### 7.3 Die PNPase ist in essentiellen Strukturen der Cochlea exprimiert

Um Aufschluss darüber zu bekommen, welche Strukturen des Innenohrs möglicherweise durch eine eingeschränkte Funktion der PNPase primär betroffen sein könnten, wurde die Expression der murinen PNPase in verschiedenen Geweben sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene untersucht.

Auf Transkriptionsebene konnte das murine *PNPT1*-Gen in allen sechs analysierten murinen Geweben nachgewiesen werden (siehe Kapitel 6.5). Dieser Befund stimmt auch mit humanen *EST*-Einträgen in der Expressionsdatenbank *UniGene* überein, die die *PNPT1*-Transkription in mehr als 40 untersuchten Geweben belegen.

Um die Expression der murinen PNPase auf Proteinebene untersuchen zu können, wurde zunächst die Spezifität des verwendeten PNPase-Antiköpers validiert. Der PNPase-Antikörper erkennt zum einen spezifisch *in vitro* translatierte rekombinante PNPase im *Western Blot* (siehe Kapitel 6.6). Zum anderen zeigt die Immunfluoreszenzmarkierung endogener PNPase erwartungsgemäß eine mitochondriale Lokalisierung (siehe Kapitel 6.7). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der Antikörper zur spezifischen Detektion der PNPase sowohl im *Western Blot* als auch für die Immunfluoreszenzmarkierung geeignet ist. Ein noch besserer Nachweis der Antikörperspezifität wäre dessen Testung auf Proteinlysate aus Zellen einer *PNPT1-Knockout*-Maus gewesen. Da jedoch auch *PNPT1-Knockout*-Zellen (vollständiger Verlust der PNPase) nicht lebensfähig sind (Wang *et al.*, 2010), konnte eine Validierung auf diese Weise nicht durchgeführt werden.

Die Expression der PNPase konnte mittels *Western Blot* in der murinen Cochlea und im murinen Gehirn belegt werden (siehe Kapitel 6.6). Des Weiteren konnte die PNPase mittels Immunhistochemie in Strukturen der Cochlea, die für das Hören von essentieller Bedeutung sind, darunter insbesondere in den inneren und äußeren Haarzellen und in Neuronen des Spiralganglions, nachgewiesen werden (siehe Kapitel 6.8.2).

Die ubiquitäre Expression des *PNPT1*-Gens und der embryonal letale Phänotyp der *PNPT1-Knockout*-Maus (Wang *et al.*, 2010) lassen auf eine essentielle Funktion der PNPase für den Organismus schließen. Da sich, trotz ubiquitärer Expression, die E475G-Mutation nur auf die Funktion des Innenohrs auswirkt und nicht auf den Gesamtorganismus, wird des Weiteren die Hypothese gestützt, dass die E475G-Mutation ein hypofunktionelles Allel darstellt. Vermutlich ist die Funktionsfähigkeit des Innenohrs in besonderem Maße von der

PNPase abhängig, sodass die identifizierte PNPase-Mutante lediglich im Innenohr zu einer Funktionsstörung führt.

Die Koloalisierung der PNPase in der Cochlea mit mitochondrialen Markern führt zu der Hypothese, dass die Taubheit in der untersuchten Familie auf einer mitochondrialen Dysfunktion beruhen könnte. Diese Hypothese wird gestützt durch bereits beschriebene Mutationen in mitochondrial kodierten Genen, darunter einige tRNAs und die 12S rRNA (Goto *et al.*, 1990; Hao *et al.*, 1995; Estivill *et al.*, 1998; Hutchin *et al.*, 2000) die zu nicht-syndromalen und syndromalen Taubheitsformen aufgrund von mitochondrialer Dysfunktion führen können (siehe auch Kapitel 1.5).

Darüber, welche Strukturen der Cochlea primär betroffen sind und die Taubheit zur Folge haben, lässt sich anhand der immunhistochemischen Daten nur spekulieren. Insbesondere die Haarzellen könnten von einer mitochondrialen Dysfunktion betroffen sein. Zum einen sind die Haarzellen besonders energieabhängig (McKenzie *et al.*, 2004), was sich auch in der hohen Anzahl an Mitochondrien widerspiegelt (Tao *et al.*, 1987), zum anderen sind auch die Taubheitsformen bedingt durch Mutationen im mitochondrialen Genom primär auf eine Dysfunktion der Mitochondrien in Haarzellen zurückzuführen (Xing *et al.*, 2000; Bravo *et al.*, 2006).

Neben den Haarzellen könnten aber auch andere Strukturen, z.B. die Neuronen des Spiralganglions, betroffen sein. In diesem Fall wäre davon auszugehen, dass die mitochondriale Dysfunktion zu einer Beeinträchtigung der Signalweiterleitung führt.

## 7.4 Die PNPase des Zebrafisches

### 7.4.1 Das Zebrafisch-Genom kodiert für ein orthologes *PNPT1*-Gen

Das *PNPT1*-Gen des Zebrafisches (*zfPNPT1*) ist in genomischen Datenbanken wie *UCSC*, *Ensembl* und *NCBI* bisher nicht annotiert. Dies könnte daran liegen, dass es im Zebrafisch kein orthologes Gen gibt oder aber daran, dass Teile des Genoms noch nicht vollständig sequenziert werden konnten bzw. nicht korrekt assembliert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die vollständige kodierende Sequenz des orthologen Zebrafisch-Gens identifiziert (siehe Kapitel 6.9.1). Die Aminosäuresequenz zwischen humaner PNPase und Zebrafisch-PNPase ist zu 70% identisch. Diese hohe Konservierung deutet darauf hin, dass die PNPase auch im Zebrafisch eine essentielle Funktion hat. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass auch die Zebrafisch-PNPase wie die Säugetier-PNPase wahrscheinlich mitochondrial lokalisiert ist. Zum einen kodiert das *zfPNPT1*-Gen für ein N-terminales mitochondriales Zielpeptid und zum anderen ist exogen in MEFs exprimierte Zebrafisch-PNPase in Mitochondrien lokalisiert (siehe Kapitel 6.9.3 und 6.9.4). Die hohe Konservierung und die gleiche subzelluläre Lokalisierung der Säugetier-PNPase und der Zebrafisch-PNPase legen die Vermutung nahe, dass die PNPase in Säugetieren und in Fischen eine vergleichbare Funktion ausübt.



Im Verlauf der Evolution kam es vor circa 350 Millionen Jahren zu einer Fisch-spezifischen Genomduplikation (Christoffels *et al.*, 2004). Diese Genomduplikation ist der Grund dafür, dass Fischgenome häufig zwei oder mehr paraloge Gene aufweisen. Aufgrund der hohen Homologie zwischen paralogen Genen, können u.U. orthologe Gene nicht eindeutig dem entsprechenden Zebrafisch-Gen zugeordnet werden. *Blast*-Suchen sowohl mit der Aminosäuresequenz der zfPNPase als auch mit der cDNA-Sequenz des *zfPNPT1*-Gens gegen das Zebrafischgenom und gegen *EST*-Datenbanken ergaben jedoch keine Hinweise auf ein paraloges *zfPNPT1*-Gen. Durch eine stetige Veränderung wurden viele paraloge Gene entweder funktionslos oder übernahmen eine andere Funktion (Ohno, 1999). Falls es ein paraloges *zfPNPT1*-Gen gegeben haben sollte, ist dieses möglicherweise im Verlauf der Evolution des Zebrafisches wieder verloren gegangen. Oder aber es wurde durch Mutationen derart verändert, dass es keine große Ähnlichkeit mit *zfPNPT1* mehr aufweist und somit nicht über eine *Blast*-Suche identifiziert werden konnte.

#### 7.4.2 Die Zebrafisch-PNPase ist bereits maternal exprimiert

Nach der Identifizierung des *zfPNPT1*-Gens konnte dessen Expression im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Mittels *in situ* Hybridisierungen konnte die Expression des *zfPNPT1*-Gens in frühen Entwicklungsstadien des Zebrafisches gezeigt werden (siehe Kapitel 6.9.5). Das *zfPNPT1*-Gen ist bereits im Zwei-Zell-Stadium, also noch bevor die embryonale Expression beginnt, deutlich exprimiert. Die nachgewiesenen *zfPNPT1*-Transkripte müssen somit maternal, also schon während der Oogenese, im Ei hinterlegt worden sein (Lindeman & Pelegri, 2010). In den ersten 24 Stunden der Embryonalentwicklung ist das *zfPNPT1*-Gen im gesamten Embryo nachweisbar. Dieses Expressionsmuster des *zfPNPT1*-Gens lässt darauf schließen, dass die PNPase vor allem für die frühe Zebrafischentwicklung von großer Bedeutung ist (siehe auch Kapitel 7.4.3).

48 bzw. 120 Stunden nach der Befruchtung beschränkt sich die Expression hauptsächlich auf das Ohr, das Gehirn und die Kiemenbögen (siehe Abbildung 6.12). Daraus lässt sich ableiten, dass nach Abschluss der Embryonalentwicklung die zfPNPase bevorzugt in Geweben exprimiert wird, in denen sie dauerhaft benötigt wird.

#### 7.4.3 Der *Knockdown* des *zfPNPT1*-Gens führt zu schweren Entwicklungsstörungen

Im Modellorganismus Zebrafisch wurde untersucht, ob sich durch eine Verringerung der *zfPNPT1*-Expression die Auswirkungen der E475G-Mutation auf das Hörvermögen nachempfinden lassen. Dazu wurde das *zfPNPT1*-Gen mithilfe von Morpholinos herunterreguliert und das Hörvermögen des Zebrafisches analysiert (siehe Kapitel 6.10). Die zugrundeliegende Hypothese für diese Versuche war dabei, dass, wie in der untersuchten Familie, die Funktion des Innenohrs des Zebrafisches ebenfalls in besonderem Maße von der PNPase abhängig sein könnte, und dass ein *Knockdown* der zfPNPase, ähnlich wie beim Menschen, zu Taubheit führen könnte.

Die Anwendung eines ATG-Morpholinos, der die Translationsinitiation durch Blockierung des Startcodons inhibiert, haben nach fünf Tagen nur circa 10% der behandelten Embryonen überlebt. Die verbliebenen Fische waren zudem schwer fehlgebildet. Weitere Untersuchungen in Bezug auf das Hörvermögen waren nicht sinnvoll, da der Gesamtorganismus der Embryonen zu stark beeinträchtigt war (siehe Kapitel 6.10.2). Wie die *in situ* Hybridisierung gezeigt hat, sind *zfpNPT1*-Transkripte bereits maternal im Ei hinterlegt. Da der ATG-Morpholino sowohl die Translation dieser maternalen Transkripte als auch die der neugebildeten Transkripte blockiert, kann eher von einem *Knockout* als von einem *Knockdown* des *zfpNPT1*-Gens ausgegangen werden. Aus den Ergebnissen des *Knockouts* des *zfpNPT1*-Gens lässt sich schließen, dass die PNPase für die frühe Embryonalentwicklung des Zebrafisches von essentieller Bedeutung ist. Wie bereits für die *PNPT1-Knockout*-Maus gezeigt werden konnte (Wang *et al.*, 2010), wird auch im Zebrafisch ein vollständiger *Knockout* der PNPase nicht toleriert. Ein spezifischer Phänotyp auf das Hörvermögen des Zebrafisches konnte durch die Anwendung eines ATG-Morpholinos somit nicht erzielt werden.

Im Gegensatz zum ATG-Morpholino blockiert ein *Splice*-Morpholino die Translation maternaler Transkripte nicht, da er nur die Translation primärer, also noch ungespleißter, Transkripte inhibiert. Die Anwendung eines *Splice*-Morpholinos sollte somit gewährleisten, dass nur die Translation embryonal exprimierter *zfpNPT1*-Transkripte blockiert wurde, wohingegen die frühe Embryonalentwicklung aufgrund der Translation maternaler Transkripte idealerweise nicht beeinträchtigt sein sollte. Die Anwendung des *Splice*-Morpholinos führte in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration zu leichten bis hin zu schweren Fehlbildungen (siehe Kapitel 6.10.3). Der *Knockdown* durch den *Splice*-Morpholino wurde jedoch, da er nicht die Translation der maternalen Transkripte blockiert, deutlich besser toleriert als der *Knockout* durch den ATG-Morpholino.

Die hohe Konzentration von 0,8 Einheiten des *Splice*-Morpholinos führte zu vergleichbar schweren Entwicklungsstörungen wie durch die Anwendung des ATG-Morpholinos. Die frühe Embryonalentwicklung ist somit nicht ausschließlich von maternalen Transkripten abhängig, sondern zumindest teilweise auch von der embryonalen Transkription des *zfpNPT1*-Gens.

Embryonen, die mit einer mittleren Konzentration von 0,5 Einheiten *Splice*-Morpholino behandelt wurden, zeigten nur verhältnismäßig leichte Entwicklungsstörungen (siehe Kapitel 6.10.3.2) und wurden eingehender analysiert. Morphologische Untersuchungen des Zebrafisch-Ohrs ergaben, dass in circa 10% der behandelten Embryonen die Otolithen teilweise oder ganz miteinander fusioniert waren (siehe Kapitel 6.10.3.3). Bei den fusionierten Otolithen könnte es sich um einen spezifischen Effekt des *zfpNPT1-Knockdowns* handeln, der die Ursache für eine Beeinträchtigung des Hörvermögens sein könnte. Fusionierte Otolithen sind bereits in früheren Publikationen im Zusammenhang mit syndromaler Taubheit beschrieben worden. Das Temtamy-Preaxial-

Brachydaktylie-Syndrom (TBPS), welches durch Fehlbildungen der Extremitäten, eine geringe Körpergröße und Taubheit charakterisiert ist, wird ausgelöst durch Mutationen in der Chondritin Synthase 1 (*CHSY1*). Der *Knockdown* von *CHSY1* im Zebrafisch führte u.a. zu einer Fusion der Otolithen und einer beeinträchtigten Bildung der Bogengänge. Nicht betroffen waren hingegen die Haarzellen der sensorischen Epithelien der Bogengänge und der Maculaorgane. Die Autoren spekulierten, dass die Taubheit der TBPS-Patienten, bedingt durch Mutationen in *CHSY1*, vermutlich eher auf eine gestörte Morphogenese der Cochlea als auf eine Störung der Haarzellen selber zurückzuführen sein könnte (Li *et al.*, 2010a). Ähnliche Schlussfolgerungen lassen sich auch aus den *PNPT1-Knockdown*-Versuchen im Zebrafisch ziehen. Die Testung des Hörvermögens von Zebrafischen, die fusionierte Otolithen aufwiesen, ergab, dass das Hörvermögen der Zebrafischembryonen nicht beeinträchtigt war (siehe Kapitel 6.10.3.4). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Haarzellen trotz fusionierter Otolithen intakt sind. Bei den fusionierten Otolithen handelt es sich vermutlich um einen sekundären Effekt, der auf die allgemeine Entwicklungsverzögerung bedingt durch den *zfpNPT1-Knockdown* zurückzuführen ist. Weitere Hör-Tests, bei denen die *startle response* von mehr als 250 behandelten Zebrafischembryonen untersucht wurde, zeigten im Vergleich zu unbehandelten bzw. *Mismatch*-Morpholino behandelten Zebrafischembryonen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (siehe Kapitel 6.10.3.3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Morpholino-*Knockdown*-Experimente die essentielle Bedeutung der PNPase für die frühe Zebrafischentwicklung und auch darüber hinaus zeigen konnten. Der *Splice*-Morpholino-*Knockdown* des *zfpNPT1*-Gens beeinträchtigt konzentrationsabhängig den gesamten Organismus. Ein spezifischer Phänotyp des Innenohrs, der möglicherweise Rückschlüsse auf die Ursache der Taubheit in der untersuchten Familie zugelassen hätte, konnte nicht erzielt werden. Die Ergebnisse der Morpholino-*Knockdown*-Experimente bestärken des Weiteren die Hypothese, dass die in der untersuchten Familie identifizierte *Missense*-Mutation höchstwahrscheinlich die Bildung eines hypofunktionellen Proteins zur Folge hat. Aufgrund der Erkenntnisse aus *Knockdown*-Experimenten im Zebrafisch und der *Knockout*-Maus (Wang *et al.*, 2010) ist es sehr wahrscheinlich, dass die PNPase auch für den Menschen essentiell ist. Ein vollständiger Funktionsverlust der PNPase aufgrund der E475G-Missense-Mutation wäre daher sehr unwahrscheinlich. Die Hypofunktionalität der PNPase bedingt durch die E475G-Mutation lässt sich durch den *Knockdown* des *zfpNPT1*-Gens im Zebrafisch nicht nachempfinden.

Eine Möglichkeit den Zebrafisch dennoch als Modellsystem für PNPase-bedingte Taubheit zu verwenden, wäre es, den *Splice*-Morpholino gemeinsam mit *zfpNPT1*-RNA, die die *Missense*-Mutation trägt, zu injizieren. Problematisch wären allerdings zum einen die korrekte Dosierung und zum anderen die geringe Halbwertszeit der injizierten RNA. Die RNA

müsste mindestens bis zum fünften Tag der Embryonalentwicklung die Translation der zfPNPase gewährleisten. Bisher waren derartige Versuchsansätze allerdings nur bis maximal zwei Tage nach der Befruchtung erfolgreich. Daher scheint ein entsprechender Ansatz für die zfPNPase nicht aussichtsreich zu sein (interne Beratung mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Hammerschmidt, Köln).

### 7.5 Die E430G-Substitution führt zu einer Hypofunktion der *E. coli*-PNPase

Die PNPase kommt in Tieren, Pflanzen und Bakterien vor, und ihre Aminosäuresequenz ist zudem über die Artgrenzen hinweg hochkonserviert. Auch die Glutaminsäure an Position 475 der humanen PNPase, die in der untersuchten Taubheitsfamilie zu Glycin verändert ist, ist bis hin zu *E. coli* konserviert. Um Rückschlüsse über die Auswirkungen der E475G-Mutation auf die humane PNPase ziehen zu können, erschien es aufgrund dieser hohen Konservierung sinnvoll, die Auswirkungen der E475G-Mutation in PNPase-defizienten *E. coli*-Stämmen ( $\Delta pnp$ ) zu analysieren. Im Gegensatz zur Maus und zum Zebrafisch ist ein *Knockout* der PNPase in *E. coli* nicht letal, sondern hat lediglich ein Wachstumsdefizit unter oxidativen Stressbedingungen zur Folge. Dieses Wachstumsdefizit wird darauf zurückgeführt, dass die bakterielle PNPase das Bakterium vor oxidativem Stress schützt, indem sie oxigenierte, also geschädigte, RNA abbaut (siehe Kapitel 1.4.1). In  $\Delta pnp$  *E. coli*-Kulturen, die oxidativem Stress induziert durch Wasserstoffperoxid ausgesetzt waren, akkumulierten derart geschädigte RNAs (Wu *et al.*, 2009).

In Komplementationsversuchen wurde untersucht, inwieweit die PNPase-Mutante dazu fähig ist, das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$  *E. coli*-Stamms auszugleichen. Die Komplementationsversuche mit der humanen PNPase ergaben, dass weder die humane *full length* PNPase noch eine humane PNPase ohne mitochondriales Zielseptid in der Lage waren, dieses Wachstumsdefizit auszugleichen, wenn sie im  $\Delta pnp$ -Stamm exprimiert wurden (siehe Kapitel 6.11.1.1 und 6.11.1.2). Die Ergebnisse der Komplementationsversuche mit der humanen PNPase legen nahe, dass trotz der hohen Konservierung zwischen humaner und bakterieller PNPase, die humane PNPase die Funktion der bakteriellen PNPase nicht übernehmen kann. Ferner kann angenommen werden, dass die Funktion der humanen PNPase nicht in dem Abbau von oxigenierten RNAs besteht. Bedenkt man die subzelluläre Lokalisierung der humanen PNPase im Intermembranraum von Mitochondrien, der nach bisherigen Erkenntnissen frei von RNAs ist (Chen *et al.*, 2007), deuten die Ergebnisse vielmehr darauf hin, dass die humane PNPase im Laufe der Evolution eine Funktionsänderung erfahren haben muss, die zu einer spezialisierteren Aufgabe im Intermembranraum von Mitochondrien führte.

Da die humane WT-PNPase das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms, ausgelöst durch oxidativen Stress, nicht kompensieren konnte, wurde getestet, ob die *E. coli*-WT-PNPase

das Wachstumsdefizit ausgleichen kann. Um des Weiteren die Auswirkung der E475G-Mutation auf die Komplementationsfähigkeit der PNPase testen zu können, wurde ein Plasmid mit der Aminosäureveränderung an entsprechender Stelle (E430G, siehe Abbildung 6.20) der *E. coli*-PNPase generiert und ebenfalls getestet. Im Gegensatz zu der humanen WT-PNPase konnte die Expression der *E. coli*-WT-PNPase das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms, ausgelöst durch oxidativen Stress, sowohl in *Spot*-Tests als auch in Flüssigkulturen nahezu vollständig ausgleichen (siehe Kapitel 6.11.2). Im Gegensatz dazu war die *E. coli*-PNPase mit der korrespondierenden *Missense*-Veränderung E430G (siehe Abbildung 6.20) nur sehr eingeschränkt in der Lage, das Wachstumsdefizit des  $\Delta pnp$ -Stamms auszugleichen. Auch in Flüssigkulturen wuchs der  $\Delta pnp$ /E430G-Stamm signifikant schlechter als der  $\Delta pnp$ /WT-Stamm (siehe Abbildung 6.21B). Sowohl in *Spot*-Tests als auch in Flüssigkulturen war jedoch das Wachstum des  $\Delta pnp$ /E430G-Stamms besser als im PNPase-defizienten  $\Delta pnp$ -Stamm. Die Substitution der Glutaminsäure an Position 430 der *E. coli*-PNPase führt somit zu einer beeinträchtigten Funktion der PNPase, jedoch nicht zu einem totalen Funktionsverlust. Dieser Befund und die hohe Konservierung zwischen humaner und bakterieller PNPase stützen die Hypothese, dass auch die humane E475G-Substitution höchstwahrscheinlich ein hypofunktionelles Allel darstellt. Die bakterielle PNPase und die humane PNPase haben höchstwahrscheinlich keine identische Funktion. Da eine Veränderung der Glutaminsäure an Position 475 der humanen PNPase bzw. an Position 430 der bakteriellen PNPase im Laufe der Evolution offensichtlich nicht toleriert worden ist, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die hochkonservierte Glutaminsäure in beiden Organismen für die Funktion des Proteins von großer Bedeutung ist.

### **7.6 *In vitro* werden die microRNAs miR-96, -182 und -183 durch die PNPase nicht degradiert**

Die miR-96 sowie die mit ihr in einem *Cluster* exprimierten microRNAs miR-182 und miR-183 sind in Haarzellen hochexprimiert und an der Steuerung der Entwicklung der Cochlea maßgeblich beteiligt (Soukup, 2009). Mutationen in der *seed region* der miR-96 führen zu einer dominanten Form von Hörstörung (Mencia *et al.*, 2009). In microRNA-Degradationsversuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen diesen microRNAs, der PNPase und der in dieser Arbeit untersuchten Hörstörung bestehen könnte. Denkbar wäre z.B., dass die WT-PNPase das Expressionslevel dieser microRNAs posttranskriptionell durch Degradation reguliert und dass die E475G-Mutation eine Störung dieser Regulation zur Folge hätte, die ursächlich für die Taubheit sein könnte. *In vitro* konnte die Degradation einer anderen microRNA, der miR-221, durch die PNPase bereits gezeigt werden (Das *et al.*, 2009).

Der Befund von Das *et al.*, dass die miR-221 spezifisch durch *in vitro* translatierte PNPase degradiert wird, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Dies liegt vermutlich an teilweise abweichenden Versuchsbedingungen. Zum einen wurde RNA aus Lungengewebe verwendet und nicht wie von Das *et al.* aus einer Melanomzelllinie. Zum anderen wurde *in vitro* translatierte PNPase (WT bzw. E475G) verwendet, die, im Gegensatz zu den Versuchen von Das *et al.*, über den His-tag zuvor affinitätsaufgereinigt wurde. In eigenen Vorversuchen zeigte sich, dass eine kleine Kontroll-RNA, die snoRNA202, stark degradiert wurde, wenn sie mit unaufgereinigter PNPase (WT bzw. E475G) oder mit der Leervektorkontrolle inkubiert wurde. Bei der Degradation in diesem Versuch konnte es sich nicht um einen PNPase-spezifischen Effekt handeln, da auch die Leervektorkontrolle ohne PNPase zu einer gleich starken Degradation der snoRNA202 geführt hatte (siehe Kapitel 6.13.2). Wahrscheinlicher ist, dass die Degradation der snoRNA202 im Vorversuch auf RNAsen im Reticulozytenlysat zurückzuführen ist, in dem die *in vitro* Translation durchgeführt wurde. Um diesen unspezifischen durch das Reticulozytenlysat bedingten Degradationseffekt ausschließen zu können, wurde in darauffolgenden Versuchen nur His-tag-affinitätsaufgereinigte PNPase verwendet.

Die mit aufgereinigter PNPase durchgeführten *in vitro* microRNA-Degradationsversuche ergaben weder Hinweise darauf, dass die WT-PNPase noch dass die E475G-PNPase für eine mögliche Degradation der im Innenohr hochexprimierten microRNAs miR-96, -182 und -183 verantwortlich sein könnten. Die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Taubheit und der Degradation der o.g. microRNAs durch die PNPase bestehen könnte, konnte somit nicht bestätigt werden. Durch *Microarray*-Analysen wurden kürzlich neben dem microRNA-Cluster bestehend aus microRNA-96, -182 und -183 noch weitere microRNAs, darunter z.B. die miR-15a, -18a, -30b, 99a und 199a, identifiziert, die in der Cochlea stark exprimiert sind und wahrscheinlich ebenfalls an der Steuerung der Innenohrentwicklung beteiligt sind (Friedman *et al.*, 2009). Diese microRNAs könnten ebenfalls potentielle Kandidaten für eine Degradation durch die PNPase sein. Da jedoch auch die bereits in der Literatur beschriebene Degradation der miR-221 durch die PNPase nicht reproduziert werden konnte, bleibt fraglich, ob es überhaupt eine Funktion der PNPase ist, microRNAs zu degradieren. Des Weiteren bleibt offen, wie eine Interaktion von PNPase und microRNAs *in vivo* stattfinden könnte, da microRNAs primär im Cytosol lokalisiert sind, die PNPase jedoch abgeschirmt vom Cytosol im Intermembranraum der Mitochondrien zu finden ist.

Die microRNA-Degradationsversuche ergaben, dass weder die Inkubation von RNA mit der WT-PNPase noch mit der E475G-PNPase zu einer Degradation der untersuchten microRNAs führt (siehe Kapitel 6.13.3).

## 7.7 Haarzellspezifisch exprimierte microRNAs sind nicht in Mitochondrien aus Lungengewebe angereichert

Die am besten aufgeklärte Funktion von microRNAs ist die Suppression der Translation durch das Binden an ihre Ziel-mRNA (Perron & Provost, 2009). Dieser Mechanismus findet im Cytosol statt. Es wurden jedoch auch microRNAs in Mitochondrien nachgewiesen (Kren *et al.*, 2009), deren dortige Funktion allerdings noch nicht eindeutig aufgeklärt werden konnte (siehe auch Kapitel 6.14). Für drei kleine RNAs konnte bereits gezeigt werden, dass deren Import in die Mitochondrien über die PNPase vermittelt wird (Wang *et al.*, 2010). Die PNPase könnte möglicherweise auch den Import von einer oder gar mehreren dieser in Haarzellen hochexprimierten microRNAs vermitteln, der aufgrund von Mutationen in *PNPT1* gestört sein und somit die Taubheit verursachen könnte. Voraussetzung für diese Hypothese wäre, dass die microRNAs in Mitochondrien angereichert sind. Durch den Vergleich der Expressionsstärke der microRNAs in Mitochondrien mit der Expressionsstärke im Gesamtgewebe sollte hier überprüft werden, ob haarzellspezifisch exprimierte microRNAs in Mitochondrien angereichert sind.

Die Expressionsanalyse der Positivkontrollen (ND3 und miR-796) zeigte erwartungsgemäß eine eindeutige Anreicherung von Transkripten in Mitochondrien im Vergleich zum Gesamtgewebe. Das Ergebnis von Kren *et al.*, dass die miR-796 verstärkt in Mitochondrien vorkommt, konnte somit reproduziert werden. Die zu untersuchenden microRNAs miR-96, -182 und -183, welche in Haarzellen hochexprimiert sind, konnten zwar in Mitochondrienextrakt nachgewiesen werden, waren aber im Gesamtgewebe deutlich stärker vorhanden (siehe Kapitel 6.14). Der Befund, dass die microRNAs miR-96, -182 und -183 in Mitochondrienextrakt überhaupt nachgewiesen werden konnten, ist höchstwahrscheinlich auf die Isolationsmethode der Mitochondrien zurückzuführen. Für die Isolation wurde ein *Kit* verwendet, mit dem lediglich eine Anreicherung von Mitochondrien erzielt werden kann, jedoch geringe Mengen des Cytosols und des endoplasmatischen Retikulums im Mitochondrienextrakt nicht ausgeschlossen werden können (siehe Kapitel 3.29).

Eine potentielle Anreicherung der microRNAs miR-96, -182 und -183 in Mitochondrien konnte also nicht bestätigt werden. Somit geben die Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass die PNPase den Import dieser microRNAs in Mitochondrien vermitteln könnte. Vielmehr spricht die räumliche Trennung von PNPase und der untersuchten microRNAs in unterschiedlichen Zellkompartimenten gegen einen funktionellen Zusammenhang. Da die RNA für diese vergleichenden Expressionsanalysen jedoch aus murinem Lungengewebe gewonnen wurde, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass es in Haarzellen, in denen die microRNAs miR-96, -182 und -183 stärker exprimiert sind, zu einer Anreicherung dieser microRNAs durch die PNPase kommen könnte. Ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann, dass die PNPase für den Import anderer microRNAs oder anderer kleiner

RNAs, die für die Funktion des Innenohrs relevant sind, verantwortlich sein könnte (siehe auch Kapitel 7.6).

### **7.8 Die E475G-Mutation beeinträchtigt die Trimerisierung der PNPase**

Die PNPase bildet unter nativen Bedingungen ein Trimer aus drei PNPase-Monomeren, wodurch ein ringförmiger Komplex mit einem zentralen Kanal entsteht (Symmons *et al.*, 2000; Portnoy *et al.*, 2008). In *E. coli* konnten Untersuchungen zeigen, dass der zentrale Kanal, bestehend aus den RNA-bindenden Domänen KH und S1, das katalytische Zentrum des Proteinkomplexes darstellt (Shi *et al.*, 2008).

Ob die E475G-Mutation die Trimerisierung der PNPase beeinträchtigt, wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels *Blue Native* Gelelektrophorese untersucht. Die Versuche wurden in den Arbeitsgruppen von M. Teitell und C. Koehler an der *University of California* in Los Angeles durchgeführt. Exogen in Hefestämmen exprimierte E475G-PNPase war in ihrer Fähigkeit zu trimerisieren deutlich beeinträchtigt, was sich durch eine Verschiebung der Intensität der Trimer-Bande zu Gunsten der Intensität der Monomer-Bande zeigte. Dieser Effekt ist in PNPase defizienten MEFs, die die E475G-PNPase exogen exprimieren, noch deutlicher ausgeprägt. Die E475G-Mutante wird hier ausschließlich bei circa 80 kDa detektiert, was dem Molekulargewicht von PNPase-Monomeren entspricht (siehe Kapitel 6.12).

Die E475G-Mutation, die sich in der zweiten RNase PH Domäne befindet, führt somit dazu, dass die PNPase keinen bzw. nur eingeschränkt einen trimeren Komplex bilden kann. Eine bereits beschriebene artifiziell generierte Mutante mit einer Mutation in der ersten RNase PH Domäne, die D135G-Mutante, ist ebenfalls in ihrer Fähigkeit Trimere zu bilden beeinträchtigt (Portnoy *et al.*, 2008). Beide RNase PH Domänen scheinen somit für die Ausbildung funktioneller trimerer PNPase-Komplexe notwendig zu sein. *E. coli*-PNPase, der die KH und S1 Domäne fehlt, ist in ihrer Fähigkeit RNA zu binden und zu degradieren stark beeinträchtigt (Shi 2008). Aufgrund der gestörten Trimerisierung durch die E475G-Mutation, ist zwangsläufig auch die Ausbildung des katalytischen Zentrums durch die KH und die S1 Domäne gestört. Dies könnte eine verringerte katalytische Aktivität der PNPase zur Folge haben und den der Taubheit zugrundeliegenden Pathomechanismus darstellen.

### **7.9 Die E475G-Mutation führt zu einem reduzierten mitochondrialen RNA-Import**

Mitochondrien sind diejenigen Zellorganellen, die über die oxidative Phosphorylierung jede eukaryotische Zelle mit Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) versorgen. Es wird angenommen, dass es sich bei Mitochondrien ursprünglich um eubakterielle Endosymbionten handelte, die im Verlauf der Evolution einen Großteil ihrer Gene in das Kerngenom transferiert haben (Gray, 1992; Lang *et al.*, 1999). Das humane mitochondriale



Genom kodiert selbst nur noch für 13 Proteine, die alle Bestandteil der Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung sind, sowie für zwei rRNAs und 22 tRNAs (Anderson *et al.*, 1981). Zusammen mit circa 60 kernkodierten Proteinen bilden die 13 mitochondrial kodierten Proteine die fünf Komplexe der oxidativen Phosphorylierung, die durch ATP-Synthese die Energieversorgung der Zelle gewährleisten (Wallace, 1999). Die Funktion der Mitochondrien ist somit u.a. von dem Import kernkodierter Proteine abhängig. Die Mechanismen und Komponenten des mitochondrialen Proteinimports sind intensiv erforscht worden. Translokase-Komplexe in der äußeren (TOM) und in der inneren (TIM) Mitochondrienmembran konnten als essentielle Faktoren für den mitochondrialen Proteinimport identifiziert werden (Koehler, 2000; Lithgow, 2000). Störungen dieses Imports können zu einer Beeinträchtigung der Atmungskette führen, was eine verringerte Energieversorgung der Zelle zur Folge hat. Betroffen sind davon vor allem Organe, die, wie z.B. das Gehirn, das Herz und das Innenohr, einen besonders hohen Energieverbrauch haben. Mutationen im *TIMM8A*-Gen, das für eine Komponente eines Translokase Komplexes (TIM23) der inneren Mitochondrienmembran kodiert, führen z.B. zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS), das auch unter dem Namen *Deafness Dystonia* Syndrom bekannt ist (Tranebjaerg *et al.*, 1995). Das MTS ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung, die u.a. durch Taubheit, Blindheit und Dystonie gekennzeichnet ist. Der zugrundeliegende Pathomechanismus des MTS ist vermutlich auf eine mitochondriale Dysfunktion aufgrund einer gestörten Biogenese des TIM23-Komplexes zurückzuführen.

Im Gegensatz zum Protein-Import ist über den mitochondrialen RNA-Import-Mechanismus, der für die Replikation, die Transkription und die Translation des mitochondrialen Genoms ebenfalls wichtig ist, bisher nur wenig bekannt. Die PNPase ist das bisher einzige bekannte Protein, das den Import von bestimmten RNAs in Mitochondrien vermittelt. Analog zu Störungen des mitochondrialen Proteinimports könnte auch ein gestörter RNA-Import eine mitochondriale Dysfunktion zur Folge haben.

In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die murine PNPase *in vivo* u.a. den Import der RNA-Komponente der RNase P vermittelt (Wang *et al.*, 2010). Mittels RNA-Import-Versuchen wurde untersucht, ob die E475G-Mutation möglicherweise Auswirkungen auf den PNPase-abhängigen mitochondrialen RNA-Import hat. Durchgeführt wurden die Versuche von Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von M. Teitell und C. Koehler an der *University of California* in Los Angeles. Die Versuche ergaben, dass sowohl in Hefe-Zellen als auch in PNPase-defizienten MEFs, die die E475G-PNPase exogen exprimieren, der Import der RNase P RNA, im Vergleich zu Zellen, die WT-PNPase exogen exprimieren, deutlich reduziert ist (siehe Kapitel 6.12.2). Im Zusammenhang mit den Daten aus der *Blue Native* Gelelektrophorese kann somit geschlussfolgert werden, dass der reduzierte mitochondriale RNA-Import durch die beeinträchtigte Trimerisierung der

E475G-PNPase bedingt ist. Die Erkenntnis, dass die E475G-Mutation einen reduzierten, aber keinen Totalausfall des RNA-Imports zur Folge hat, spricht des Weiteren dafür, dass die E475G-Mutation für ein hypofunktionelles Allel kodiert. Der verbleibende RNA-Import durch die E475G-PNPase könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Fähigkeit der E475G-PNPase zur Trimerisierung zwar reduziert, aber nicht vollkommen verloren gegangen ist, oder aber darauf, dass eine Restfunktionalität der E475G-PNPase-Monomere bestehen bleibt, die in verringertem Maße zum mitochondrialen RNA-Import befähigt sind.

### **7.10 Die Akkumulation unprozessierter mitochondrialer Transkripte könnte ursächlich für die Taubheit sein**

Die RNase P zusammen mit ihrer RNA-Komponente, der RNase P RNA, ist für die Prozessierung von mitochondrialen polycistronischen Transkripten verantwortlich. Dabei werden tRNA-Transkripte von Transkripten, die für Komponenten der oxidativen Phosphorylierung kodieren, voneinander getrennt. PNPase defiziente Zellen, die weniger RNase P RNA importieren, akkumulieren unprozessierte Transkripte, die u.a. die tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> und die tRNA<sup>Lys</sup> enthalten. Des Weiteren ist die Menge an prozessierter 12S rRNA in PNPase-Knockdown-Zellen stark reduziert (Wang *et al.*, 2010). Mutationen in der tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, der tRNA<sup>Lys</sup> und der 12S rRNA können sowohl zu syndromalen als auch zu nicht-syndromalen Taubheitsformen führen (Goto *et al.*, 1990; Hao *et al.*, 1995; Estivill *et al.*, 1998; Hutchin *et al.*, 2000).

Aufgrund des reduzierten Imports der RNase P RNA durch die E475G-PNPase, kann, wie für PNPase defiziente Zellen gezeigt werden konnte (Wang *et al.*, 2010), davon ausgegangen werden, dass die RNase P ohne ihre RNA-Komponente nicht voll funktionsfähig ist. Die E475G-Mutation hat somit vermutlich ebenfalls eine Akkumulation unprozessierter mitochondrialer Transkripte zur Folge. Diese Akkumulation unprozessierter mitochondrialer Transkripte führt wahrscheinlich zu einer geringeren Verfügbarkeit u.a. der tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, der tRNA<sup>Lys</sup> und der 12S rRNA (Wang *et al.*, 2010). Diese reduzierte Verfügbarkeit könnte, vergleichbar mit Mutationen in diesen mitochondrialen Genen, für die Taubheit in der hier untersuchten Familie verantwortlich sein.

### **7.11 Die Taubheit im *DFNB70*-Locus basiert vermutlich auf einer mitochondrialen Dysfunktion**

Mutationen in mitochondrialen Genen, die zu syndromalen oder auch zu nicht-syndromalen Taubheitsformen führen können (siehe Kapitel 1.5), beeinträchtigen die mitochondriale Translation und somit auch die Proteinbiosynthese essentieller Komponenten der Atmungskette. Für die T7445C-Mutation in der tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, die sowohl für syndromale als auch nicht-syndromale Taubheit ursächlich sein kann, konnte z.B. gezeigt werden, dass die Mutation eine um 70% verringerte Verfügbarkeit der tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> und eine um 45% reduzierte mitochondriale Proteinbiosynthese zur Folge hatte (Guan *et al.*, 1998). Taubheitsformen, die

auf Mutationen in mitochondrialen Genen zurückzuführen sind, führen höchstwahrscheinlich zu einer mitochondrialen Dysfunktion und können somit als mitochondriale Erkrankungen angesehen werden.

Sowohl die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen als auch die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse über die PNPase führen zu der Hypothese, dass der zugrundeliegende Pathomechanismus der hier untersuchten erblichen Taubheitsform höchstwahrscheinlich ebenfalls auf einer mitochondrialen Dysfunktion beruht. Dafür sprechen u.a. die eindeutige Lokalisierung der PNPase in Mitochondrien sowie die beeinträchtigte mitochondriale Morphologie und Homöostase in PNPase defizienten Zellen (Chen *et al.*, 2006). Wie die RNA-Importversuche der Arbeitsgruppen von M. Teitell und C. Koehler zeigen konnten (siehe Kapitel 6.12.2 und 7.9), führt die E475G-Mutation zu einem reduzierten Import der RNase P RNA. Als Folge dessen ist anzunehmen, dass die Prozessierung mitochondrialer Transkripte beeinträchtigt ist und es zu einer Akkumulation unprozessierter Transkripte kommt. Diese unprozessierten Transkripte würden u.a. auch die tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, die tRNA<sup>Lys</sup> und die 12S rRNA beinhalten, mit der Konsequenz, dass die Verfügbarkeit dieser RNAs reduziert wäre. Der Zusammenhang zwischen der E475G-Mutation und der Akkumulation von unprozessierten mitochondrialen Transkripten führt zu der Hypothese, dass die Taubheit im *DFNB70*-Locus womöglich auf der verringerten Verfügbarkeit einer oder mehrerer dieser RNAs beruht. Ferner kann angenommen werden, dass die verringerte Verfügbarkeit einer oder mehrerer dieser RNAs zu einer beeinträchtigten mitochondrialen Proteinbiosynthese, als Folge dessen die oxidative Phosphorylierung verringert ist, führt. Wie bereits für Mutationen in mitochondrialen Genen gezeigt wurde, ist die dem *DFNB70*-Locus zugrundeliegende Taubheit vermutlich auf eine Unterversorgung mit Energie in Form von ATP aufgrund einer beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen.

### **7.12 Trotz ubiquitärer Expression und essentieller Funktion führt die E475G-Mutation zu einem gewebespezifischen Phänotyp**

Die humane PNPase ist ubiquitär exprimiert und, wie u.a. aufgrund der nahen Verwandtschaft von Mensch und Maus aus den *Knockout*-Experimenten in der Maus geschlossen werden kann, höchstwahrscheinlich auch für den Menschen von essentieller Bedeutung (Wang *et al.*, 2010). Da ein vollständiger Funktionsverlust der PNPase mit großer Wahrscheinlichkeit auch vom menschlichen Organismus nicht toleriert werden würde, kann davon ausgegangen werden, dass die E475G-Mutation nicht zu einer kompletten Fehlfunktion der PNPase führt, sondern eher eine Hypofunktion bedingt. Warum sich die Mutation ausschließlich auf die Funktion des Innenohrs, nicht aber auf andere Organsysteme auswirkt, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig klären. Ein möglicher Erklärungsversuch besteht darin, dass das Innenohr als Organ mit einem sehr hohen

Energiebedarf, von einer reduzierten Energieversorgung aufgrund einer beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung, in besonderem Maße betroffen wäre. Neben dem Innenohr besitzen aber auch weitere Organe, wie z.B. die Muskulatur und das Gehirn, einen besonders hohen Energiebedarf. Diese sind aber von der E475G-Mutation nicht betroffen. Im Umkehrschluss müssten sich Mutationen, die eine beeinträchtigte oxidative Phosphorylierung zur Folge haben, immer auch im Innenohr manifestieren, dies ist aber nicht der Fall (Kokotas *et al.*, 2007). Ein weiterer Erklärungsversuch, warum sich die E475G-Mutation nur im Innenohr manifestiert, wäre, dass die PNPase neben ihrer generellen Funktion für den Gesamtorganismus eine ausschließlich innenohrspezifische Funktion hat. Theoretisch könnte die PNPase z.B. für den mitochondrialen Import einer bisher nicht identifizierten RNA, die in nur in Haarzellen exprimiert ist, verantwortlich sein. Wenn auch rein spekulativ, könnte die E475G-Mutation unter diesen Umständen einen Einfluss nur auf die Haarzellen jedoch nicht auf den Gesamtorganismus haben.

Neben der PNPase gibt es weitere Gene, die ubiquitär exprimiert sind, in denen aber Mutationen ebenfalls zu einem spezifischen Phänotyp in Form nicht-syndromaler Taubheit führen können. Mutationen z.B. im *HGF*-Gen, das für einen Hepatozyten-Wachstumsfaktor kodiert, resultieren in nicht-syndromaler Taubheit. Das *HGF*-Gen ist bekanntermaßen an Signalkaskaden in unterschiedlichen Geweben beteiligt. Dennoch führen die bisher identifizierten intronischen und stillen Mutationen zu einem spezifischen Phänotyp des Innenohrs (Schultz *et al.*, 2009), dessen Pathomechanismus jedoch noch nicht aufgeklärt werden konnte. Für Gene, die ubiquitär exprimiert werden und in denen Mutationen zu nicht-syndromaler Taubheit führen, gibt es zahlreiche Beispiele. Dazu zählen u. a. die Gene *ESRRB*, *ACTG1* und *TPRN* (van Wijk *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003; Collin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010b; Rehman *et al.*, 2010). Die PNPase ist somit nicht als Ausnahme, sondern vielmehr als ein weiteres Beispiel für ein ubiquitär exprimiertes Gen zu sehen, das, wenn es Mutationen trägt, einen gewebespezifischen Phänotyp zur Folge haben kann.

### **7.13 Mutationen in kernkodierten Genen können durch mitochondriale Dysfunktion zu einer Hörstörung führen**

Mutationen in mitochondrialen Genen können zu syndromalen Erkrankungen führen, bei denen Taubheit häufig eines der beobachteten Symptome ist. Zu diesen syndromalen Erkrankungen gehören u.a. das MELAS-Syndrom [Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktat-Azidose und schlaganfallähnlichen Episoden (Goto *et al.*, 1990)], das MERRF-Syndrom [(*myoclonic epilepsy with ragged-red fiber disease*) (Shoffner *et al.*, 1990)] und das MIDD-Syndrom [(*maternally inherited diabetes mellitus and deafness*) (Hao *et al.*, 1995; Rigoli *et al.*, 2001)]. Zu nicht-syndromaler Taubheit können z.B. Mutationen in der mitochondrialen tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> und der mitochondrialen 12S rRNA führen (Estivill *et al.*, 1998; Sue *et al.*, 1999; Hutchin *et al.*, 2000). Gemeinsam ist sowohl den

syndromalen als auch den nicht-syndromalen Taubheitsformen, die durch Mutationen in mitochondrialen Genen ausgelöst werden, dass sie auf eine Dysfunktion der Mitochondrien, die mit einer beeinträchtigten Energieversorgung der Zelle einhergeht, zurückzuführen sind. Auch kernkodierte Proteine können, wenn sie Mutationen tragen, zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen und als Folge dessen syndromale oder nicht-syndromale Taubheit auslösen. Wie bereits kurz angesprochen, führen Mutationen im *TIMM8A*-Gen (auch DDP für *Deafness Dystonia peptide* genannt) zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS), das auch unter dem Namen *Deafness Dystonia* Syndrom bekannt ist (Tranebjaerg *et al.*, 1995). Taubheit ist neben Blindheit und Dystonie eines der Symptome des MTS. Untersuchungen über die Funktion von Tim8p, dem Hefe-Homolog des humanen TIMM8A-Proteins, ergaben, dass Tim8p eine Komponente der mitochondrialen Proteinimport-Maschinerie darstellt. Das MTS ist somit höchstwahrscheinlich eine mitochondriale Erkrankung, die auf einen gestörten mitochondrialen Proteinimport zurückzuführen ist (Koehler *et al.*, 1999). Wenn auch rein spekulativ, wäre es denkbar, dass TIMM8A auch an dem Import der PNPase beteiligt ist. In diesem Szenario könnte die Taubheit im MTS darauf beruhen, dass der PNPase-Import in Mitochondrien beeinträchtigt wäre. Der mitochondriale Import der PNPase konnte am Hefemodell bereits teilweise aufgeklärt werden. Die mitochondriale i-AAA Protease Yme1 konnte dabei als essentielle Komponente für den PNPase-Import in Hefemitochondrien identifiziert werden. In Yme1-defizienten Hefezellen kam es zu einer Akkumulation exogen exprimierter PNPase im Cytosol (Rainey *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob in Tim8p-defizienten Hefezellen der Import von exogen exprimierter PNPase möglicherweise, wie in Yme1-defizienten Hefezellen, ebenfalls zu einer Fehllokalisierung im Cytosol führt. Wenn sich dies zeigen ließe, wäre das ein möglicher Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Taubheit im MTS und der PNPase-bedingten Taubheit in der hier untersuchten Familie.

Neben kernkodierten Genen, die durch mitochondriale Dysfunktion zu einer syndromalen Taubheit führen, ist bereits ein kernkodiertes Gen bekannt, welches zu einer nicht-syndromalen Taubheit führt, die wahrscheinlich auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen ist. Mutationen im *MSRB3*-Gen, das für die Methionin-Sulfoxid-Reduktase 3 kodiert, sind ursächlich für die autosomal-rezessive nicht-syndromale Taubheit im *DFNB74*-Locus (Ahmed *et al.*, 2011). Das Gen wird in vier unterschiedlichen Isoformen exprimiert, von denen die Isoformen B, C und D für ein N-terminales mitochondriales Zielpolypeptid kodieren. Isoform A kodiert für ein Zielpolypeptid, das vermutlich zu einer Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum führt. Da eine der identifizierten Mutationen ausschließlich die mitochondrialen Isoformen B, C und D, nicht jedoch Isoform A, betrifft, schlussfolgerten die Autoren, dass mindestens eine der drei mitochondrial lokalisierten Isoformen für die Funktion des Innenohr essentiell sein muss. Methionin-Sulfoxid-Reduktasen katalysieren die Reparatur von Methioninen, die durch freie Sauerstoffradikale geschädigt worden sind. Die

Autoren argumentieren ferner, dass die mitochondriale Dysfunktion womöglich auf der Akkumulation oxidativ-geschädigter Proteine beruht. Der Grund, warum es zu einer Dysfunktion der Mitochondrien kommt, ist wahrscheinlich zwischen PNPase- und *MSRB3*-bedingter Taubheit unterschiedlich. In beiden Fällen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation unprozessierter mitochondrialer Transkripte im Fall der PNPase, bzw. die Akkumulation von geschädigten Proteinen im Fall von *MSRB3*, zu einer Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit der Atmungskette führen. Die PNPase ist somit das zweite Beispiel für ein kernkodiertes Protein, das, wenn es mutiert ist, aufgrund einer mitochondrialen Dysfunktion zu einer nicht-syndromalen Taubheit führen kann.

### **7.14 *PNPT1*-Mutationen könnten zu unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen führen**

Verschiedene Mutationen in ein und demselben Gen können zu einer unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung führen. Ein Beispiel, in dem die Grundlagen für die unterschiedliche phänotypische Ausprägung aufgeklärt werden konnten, ist das erbliche Long-QT-Syndrom (LQTS). Patienten mit diesem Syndrom zeigen im Elektrokardiogramm ein verlängertes QT-Intervall (gesamte Zeitspanne der intraventrikulären Erregungsdauer) und leiden unter Herzarrhythmien. Die häufigste Ursache für das LQTS sind Mutationen im *KCNQ1*-Gen, das für einen Kaliumionenkanal kodiert. Mutationen in *KCNQ1* können sowohl zum Romano-Ward-Syndrom [RWS, (Ward, 1964)] als auch zum Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom [JLNS, (Jervell & Lange-Nielsen, 1957)] führen, wobei letzteres neben den Herzarrhythmien zusätzlich durch eine erbliche Taubheit charakterisiert ist. In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass das RWS durch Mutationen mit einem dominant-negativen Effekt ausgelöst wird. Dieser lässt sich dadurch erklären, dass vier *KCNQ1*-Einheiten einen Kaliumionenkanal bilden, dessen Assemblierung durch die Mutation gestört ist, was einen ~80%igen Funktionsverlust des Ionenkanals zur Folge hatte (Wollnik *et al.*, 1997). In dem rezessiven JLNS hingegen wurden Leseraster-Mutationen in *KCNQ1* identifiziert, die zu einem vollständigen Funktionsverlust des Kaliumkanals führten. Aus diesen Erkenntnissen konnte geschlossen werden, dass die Funktion des Innenohrs erst durch einen Totalausfall des *KCNQ1*-Kaliumionenkanals betroffen ist, wohingegen die Herzarrhythmien schon bei einem Funktionsverlust um ~80% auftreten (Wollnik *et al.*, 1997).

In Abhängigkeit von der Mutationsart wäre es auch für die PNPase vorstellbar, dass verschiedene Mutationen zu einer unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung führen könnten. Der heterozygote *PNPT1-Knockout* bei der Maus zeigte keine offensichtlichen Symptome (Wang *et al.*, 2010). Eine mit einer Reduktion der PNPase-Proteinmenge um 50% einhergehenden Haploinsuffizienz hätte somit vermutlich auch beim Menschen keine Auswirkungen.

Die Trimerisierungsversuche ergaben für die E475G-PNPase eine Beeinträchtigung um ~70% bei der Hefe (~70% Monomere) und um bis zu 95% in MEFs (~95% Monomere). Der mitochondriale Import der RNase P RNA war durch die E475G-Mutation in der Hefe um ~75% und in MEFs um ~50% reduziert (vermutlich ist der RNA-Import in PNPase-*Knockdown*-MEFs, die die E475G-PNPase exogen exprimieren, sogar noch deutlich stärker beeinträchtigt, da ein Teil des RNA-Imports auf Restmengen der endogenen WT-PNPase zurückzuführen ist). Anhand dieser Ergebnisse kann eine grobe Eingrenzung vorgenommen werden, wie groß der prozentuale Funktionsverlust der PNPase sein muss, damit sich dieser in Form von Taubheit im Innenohr manifestiert. Bezieht man sich primär auf die Daten aus den RNA-Importversuchen, so liegt diese Schwelle vermutlich bei einem Funktionsverlust der PNPase zwischen 50 und 75%. Da die PNPase homotrimere Komplexe bildet, wäre es denkbar, dass ähnlich wie beim RWS, Mutationen auch einen dominant-negativen Effekt haben könnten. Angenommen, ein mutiertes PNPase-Monomer wäre bereits ausreichend, um die Trimerbildung mit zwei weiteren WT-PNPase-Monomeren zu stören, dann würde dies zu einem Funktionsverlust der PNPase von mindestens 75% führen (dies würde jedoch nur unter der Annahme gelten, dass PNPase-Monomere allein nicht funktionsfähig sind). Möglicherweise würde ein derartiger Funktionsverlust von über 75% zu Beeinträchtigungen anderer Organe, die ebenfalls einen hohen Energiebedarf haben, darunter z.B. das Gehirn oder die Muskulatur, führen.

Dass jemals homozygote Null-Mutationen im humanen *PNPT1*-Gen identifiziert werden, ist als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen, da aufgrund der embryonalen Letalität der *PNPT1*-*Knockout*-Maus (Wang *et al.*, 2010) davon ausgegangen werden kann, dass ein totaler Funktionsverlust der PNPase auch für den Menschen letale Folgen hätte.

### 7.15 *PNPT1* als Kandidatengen für altersbedingte Schwerhörigkeit

Altersbedingte Schwerhörigkeit, auch Presbyakusis genannt, ist die häufigste sensorische Störung bei älteren Menschen (Gates & Mills, 2005). Groben Schätzungen zufolge leiden 30% der Männer und 20% der Frauen im Alter von 70 Jahren unter einem Hörverlust von 30 oder mehr dB. In einem Alter von 80 Jahren sind sogar 55% der Männer und 45% der Frauen betroffen (Roth *et al.*, 2011). Bei der altersbedingten Schwerhörigkeit handelt es sich um eine komplexe (multifaktorielle) Erkrankung, für die sowohl umweltbedingte als auch genetische Faktoren verantwortlich gemacht werden. Bezogen auf die genetischen Faktoren, kann davon ausgegangen werden, dass nicht Mutationen in einem Gen, sondern vielmehr eine Kombination von unterschiedlichen Varianten in Genen, die Risikofaktoren darstellen, zu der Entstehung von altersbedingter Schwerhörigkeit führen können. In letzter Zeit zeigten sich Hinweise darauf, dass somatische Mutationen im mitochondrialen Genom einen Anteil an der Entstehung von altersbedingter Schwerhörigkeit haben könnten. Bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien entstehen freie Sauerstoffradikale, die zu einer

sukzessiven Schädigung der mitochondrialen DNA führen. Die auf diese Weise entstanden somatischen Mutationen im mitochondrialen Genom sind vermutlich die Ursache für die Synthese funktionell beeinträchtigter Bestandteile der Atmungskette und könnten deren eingeschränkte Funktion erklären (Yamasoba *et al.*, 2007). Die Theorie, dass mitochondriale Mutationen zu der Entstehung von altersbedingter Schwerhörigkeit beitragen, wird durch die Ergebnisse aus Versuchen mit einer *Knock-in*-Maus gestützt. Die sogenannte *mtDNA mutator mouse* trägt eine homozygote Mutation in einem Gen, welches für eine katalytische Untereinheit der mitochondrialen DNA Polymerase (POLGA) kodiert. Die Mutation führt dazu, dass die POLGA keine Korrekturlese-Funktion mehr hat, weshalb Fehler bei der Replikation der mitochondrialen DNA nicht repariert werden können. Ähnlich wie durch Sauerstoffradikale, kam es auch bei der *mtDNA mutator mouse* zu einer sukzessiven Anreicherung von somatischen mitochondrialen Mutationen. Die *mtDNA mutator mouse* zeigt eine Reihe von Phänotypen der frühzeitigen Alterung, darunter eine verkürzte Lebensdauer, Haarausfall und progressiven Hörverlust u.a. aufgrund der Degeneration von Neuronen des auditorischen Systems (Trifunovic *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 2007). Es konnte somit am Mausmodell gezeigt werden, dass altersbedingte Schwerhörigkeit auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen ist.

Sowohl für die durch die E475G-Mutation im humanen *PNPT1*-Gen verursachte nicht-syndromale Taubheit als auch für altersbedingte Schwerhörigkeit konnte ein Zusammenhang mit einer mitochondrialen Dysfunktion gezeigt werden. Aufgrund dieses Zusammenhangs kann *PNPT1* durchaus als ein attraktives Kandidatengen für altersbedingte Schwerhörigkeit betrachtet werden. Es wäre vorstellbar, dass zukünftig *PNPT1*-Varianten identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko für altersbedingte Schwerhörigkeit einhergehen. In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnte auf Chromosom 8 bereits ein Locus identifiziert werden, der eine genomweite signifikante Assoziation mit altersbedingter Schwerhörigkeit zeigt (Huyghe *et al.*, 2008; Van Laer *et al.*, 2010). Im Rahmen einer kandidatengenbasierten Assoziationsstudie, könnte zukünftig auch für *PNPT1* untersucht werden, ob eine Assoziation mit altersbedingter Schwerhörigkeit vorliegt.

### **7.16 Die Häufigkeit von *PNPT1*-Varianten ist sehr gering**

Mutationen in dem *GJB2*-Gen sind mit bis zu 50% die häufigste Ursache für erbliche nicht-syndromale Taubheit (Kenneson *et al.*, 2002). Im Vergleich dazu kann davon ausgegangen werden, dass die Prävalenz bedingt durch Mutationen in *PNPT1* sehr niedrig ist. Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (Mai 2007 bis März 2008) wurden 80 Indexpatienten konsanguiner Familien, die unter erblicher Taubheit leiden und bei denen Mutationen in *GJB2* bereits ausgeschlossen werden konnten, untersucht. Für 22 Indexpatienten konnte eine potentielle Kopplung mit dem *DFNB70*-Locus nicht ausgeschlossen werden. In 58 Familien konnten andererseits, aufgrund fehlender Kopplung



mit dem *DFNB70*-Locus, ursächliche Mutationen in *PNPT1* mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die 22 Indexpatienten, die eine potentielle Kopplung im *DFNB70*-Locus zeigten, wurden auf Mutationen in *PNPT1* untersucht. Es wurden keine potentiell pathogenen Veränderungen gefunden. Auch wenn die Fallzahl mit 80 untersuchten Indexpatienten eher gering ist, sprechen die Ergebnisse der Kopplungs- bzw. der *PNPT1*-Sequenzanalyse dafür, dass *PNPT1*-Mutationen als Ursache für erbliche Taubheit vermutlich eher selten sind. Dafür, dass pathogene *PNPT1*-Mutationen selten sind, spricht auch, dass in der Literatur bisher kein einziger Fall beschrieben ist, der von *PNPT1*-Mutationen in Zusammenhang mit einem klinischen Phänotyp beim Menschen berichtet. Weiteren Aufschluss über die Häufigkeit von Varianten im *PNPT1*-Gen gibt der *Exome Variant Server*, in dem zum aktuellen Zeitpunkt (Stand: September 2011) Daten aus Exomsequenzierungen von circa 2500 Individuen zusammengefasst sind. Über die gesamte kodierende Sequenz von *PNPT1* verteilen sich 32 SNPs, die eine Missense-Veränderung zur Folge haben. Von diesen 32 SNPs wurden in durchschnittlich 2500 Individuen 21 SNPs nur genau einmal identifiziert. Diese Daten verdeutlichen zum einen, dass, vermutlich aufgrund der essentiellen Funktion der PNPase, im Verlauf der Evolution Veränderungen in *PNPT1* kaum toleriert wurden. Zum anderen lassen die Daten erkennen, dass das Auftreten einer homozygoten *Missense*-Veränderung bzw. das Auftreten von zwei heterozygoten *Missense*-Veränderungen in einem Individuum sehr selten ist. Somit ist es ebenfalls eher unwahrscheinlich, dass zukünftig viele weitere Familien mit *PNPT1*-Mutationen gefunden werden. Durchaus denkbar hingegen ist, dass in weiteren konsanguinen Familien mit nicht-syndromaler Taubheit homozygote *PNPT1*-Mutationen oder im Rahmen von Assoziationsstudien mit altersbedingter Schwerhörigkeit assoziierte heterozygote *PNPT1*-Varianten identifiziert werden (siehe auch Kapitel 7.15).

### 7.17 Ausblick

Die Erkenntnisse aus den genetischen und den funktionellen Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die identifizierte *Missense*-Mutation in *PNPT1* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich für die erbliche Taubheit in der untersuchten Familie ist. Die Identifikation einer weiteren unabhängigen Taubheitsfamilie mit Mutationen in *PNPT1*, würde die Ursächlichkeit der *PNPT1*-Mutation für die Taubheit endgültig bestätigen. Möglicherweise wird die Veröffentlichung dieser Arbeit zu der Identifikation von weiteren *PNPT1*-Mutationen in Taubheitsfamilien aus Kollektiven anderer Arbeitsgruppen führen.

Die Ergebnisse aus *in vitro* Analysen der Arbeitsgruppen von M. Teitell und C. Koehler über die Auswirkungen der E475G-Mutation auf die Funktionstüchtigkeit der PNPase konnten zeigen, dass die E475G-Mutation einen gestörten mitochondrialen Import der RNase P RNA zur Folge hat (siehe Kapitel 6.12.2). Wie von Wang *et al.* gezeigt wurde, führt ein gestörter mitochondrialer Import der RNase P RNA zu einer beeinträchtigten Prozessierung

mitochondrialer Transkripte, mit der Folge, dass diese in unprozessierter Form akkumulieren (Wang *et al.*, 2010). Somit liegt die Vermutung nahe, dass es auch durch die E475G-Mutation, aufgrund des reduzierten RNase P RNA Imports, zu einer Akkumulation unprozessierter Transkripte kommt. Dies konnte jedoch bisher in den betroffenen Patienten nicht untersucht werden. Es ist jedoch geplant, die RNA aus Blut von betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern zu isolieren und mittels RT-PCR auf die Akkumulation unprozessierter Transkripte zu testen. Da die PNPase ubiquitär exprimiert ist, müsste die Prozessierung polycistronischer mitochondrialer Transkripte auch in den Blutzellen von betroffenen Familienmitgliedern beeinträchtigt sein. Dieser Nachweis von akkumulierten unprozessierten Transkripten in betroffenen Familienmitgliedern konnte bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht erbracht werden, da es bisher leider nicht möglich war, RNA-Proben der Patienten zu erhalten.

Ein vollständiger *Knockout* des *Pnpt1*-Gens führt in der Maus zu einem embryonal letalen Phänotyp, ein leberspezifischer *Knockout* hingegen wird vom Organismus toleriert und führt zu lebensfähigen Tieren. Um die Auswirkungen eines innenohrspezifischen Ausfalls der PNPase zu untersuchen, könnte die konditionale *Pnpt1-Knockout*-Maus (*Pnpt1*<sup>neo-flox</sup>) mit einer *Cre*-Maus gekreuzt werden, die die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines innenohrspezifischen Promotors exprimiert (siehe auch Kapitel 1.4.2.4). Eignen würde sich zum Beispiel die *Pax2-Cre*-Maus, die die *Cre*-Rekombinase bereits ab E8.5 (*embryonic day* 8.5) in den Anlagen des Innenohrs exprimiert (Soukup *et al.*, 2009). Für den Fall, dass diese Maus lebensfähig ist, könnte untersucht werden, ob und wenn ja welche Strukturen des murinen Innenohrs durch das Fehlen der PNPase gestört sind. Da die E475G-Mutation jedoch keinen vollständigen Funktionsverlust der PNPase zur Folge hat, würde ein innenohrspezifischer *Knockout* des *Pnpt1*-Gens die durch die E475G-Mutation bedingte *in vivo* Situation vermutlich nur eingeschränkt widerspiegeln. Um die Auswirkungen der E475G-Mutation auf die Funktion der PNPase im Innenohr in einem *in vivo* Modell untersuchen zu können, wäre die Generierung eines *Knock-in*-Mausmodells ideal. Anhand einer solchen *Knock-in*-Maus, die für die E475G-Mutation homozygot sein müsste, könnte der der Mutation zugrundeliegende Pathomechanismus umfangreich erforscht werden. Untersucht werden könnten z.B. die Auswirkungen der E475G-Mutation auf den mitochondrialen RNA-Import, auf die Prozessierung mitochondrialer Transkripte und insbesondere auf die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung. Des Weiteren könnte histologisch analysiert werden, welche Strukturen des Innenohrs primär betroffen sind und letztendlich zum Hörverlust führen.

## 8 Zusammenfassung

Hörstörungen sind beim Menschen mit einer Prävalenz von 1 bis 2 auf 1000 Neugeborene die häufigste Erkrankung der Sinnesorgane. Kongenitale Hörstörungen können sowohl genetische als auch umweltbedingte Ursachen haben, wobei in Industrieländern mindestens 50-60% der Fälle frühkindlicher Taubheit auf eine genetische Ursache zurückzuführen sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der ursächliche Gendefekt identifiziert werden, der in einer konsanguinen marokkanischen Familie für eine nicht-syndromale Form autosomal-rezessiver Hörstörung verantwortlich ist.

In der untersuchten Familie sind drei Kinder von Geburt an taub, die Eltern und drei weitere Kinder sind nicht betroffen. Nachdem Mutationen in *GJB2*, dem häufigsten Taubheitsgen, ausgeschlossen werden konnten, wurde anhand der acht Familienmitglieder eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Diese ergab einen putativ gekoppelten Locus mit einem *LOD-Score* von 2,7 auf Chromosom 2 und einen weiteren mit einem *LOD-Score* von 1,5 auf Chromosom 12. Durch die Analyse von zusätzlichen Mikrosatellitenmarkern konnte, da betroffene Individuen nicht den gleichen Haplotypen aufwiesen, der Locus auf Chromosom 12 ausgeschlossen werden. Die Kopplung des Locus auf Chromosom 2 hingegen konnte bestätigt werden. Diese Kandidatengenregion, die durch die Mikrosatellitenmarker *D2S119* und *D2S378* begrenzt wird, wurde entsprechend der Nomenklatur für autosomal-rezessive Taubheitsloci *DFNB70* benannt und ist auf der *Hereditary Hearing Loss Homepage* registriert. Der *DFNB70*-Locus umfasst 13,2 Megabasen mit 49 annotierten Genen. Durch direktes Sequenzieren der kodierenden Exons und angrenzenden Spleiß-Stellen aller Gene innerhalb der gekoppelten Region wurde bei betroffenen Individuen eine einzelne homozygote nicht-annotierte *Missense*-Veränderung in dem Gen *PNPT1* identifiziert. Der Austausch von Adenin nach Guanin an der Nukleotidposition 1424 (c.1424A>G) in *PNPT1* hat auf Proteinebene eine Substitution von Glutaminsäure zu Glycin (p.E475G) zur Folge. Weder in mehr als 400 gesunden Kontrollindividuen unterschiedlicher ethnischer Herkunft noch in Datenbanken wie *dbSNP* oder dem *Exome Variant Server* konnte diese Mutation gefunden werden, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um einen häufigen Polymorphismus handelt. Die Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), die von *PNPT1* kodiert wird, ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein, das in Bakterien am RNA-Metabolismus beteiligt ist. Bei Säugetieren ist die PNPase im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert und stellt das bisher einzig bekannte Protein dar, das den Import von RNAs in Mitochondrien vermittelt. Dieser Prozess ist sowohl für die Replikation als auch für die Transkription des mitochondrialen Genoms notwendig.

Die kodierende Sequenz des *PNPT1*-Orthologs im Zebrafisch, welches bis dato nicht annotiert gewesen ist, konnte vollständig identifiziert und kloniert werden. Mittels *in situ* Hybridisierung konnte die Expression von *PNPT1* in frühen Entwicklungsstadien des Zebrafisches aufgeklärt werden. Vergleichbar mit der embryonalen Letalität der bereits beschriebenen *PNPT1-Knockout*-Maus führte ein Morpholino-*Knockdown* des *PNPT1*-Gens zu schweren Störungen der frühen Zebrafischentwicklung. Sowohl für die Maus als auch für den Zebrafisch scheint die Funktion der PNPase von essentieller Bedeutung zu sein.

Der immunhistochemische Nachweis der PNPase in der murinen Cochlea konnte deren Expression in dem betroffenen Organ, darunter insbesondere in den Haarzellen und in den Neuronen der Spiral- bzw. Vestibularganglien, belegen.

*In vitro* Analysen in Bakterien, in der Hefe und in Säugetierzellen ergaben, dass die E475G-Mutation ein hypofunktionelles Allel darstellt. In Komplementationsversuchen konnte z.B. gezeigt werden, dass exogen exprimierte bakterielle Wildtyp-PNPase das Wachstumsdefizit eines PNPase defizienten *E. coli*-Stämms signifikant besser ausgleichen konnte, als die entsprechende PNPase-Mutante. Sowohl in der Hefe als auch in Säugetierzellen sind die Trimerisierung der PNPase und der mitochondriale RNA-Import der RNase P RNA durch die E475G-Mutation beeinträchtigt. Der verringerte Import der RNase P RNA hat vermutlich zur Folge, dass die Prozessierung mitochondrialer Transkripte durch die RNase P gestört ist, wodurch es zu einer Akkumulation von unprozessierten Transkripten in der mitochondrialen Matrix kommen würde. Ähnlich wie durch Mutationen in mitochondrialen Genen, die bekanntermaßen zu Hörstörungen führen können, könnte die Akkumulation dieser Transkripte eine Erklärung für die Taubheit in der untersuchten Familie sein.

Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine beeinträchtigte Funktion der PNPase mit wahrscheinlich reduziertem mitochondrialen RNA-Import zu einer erblichen Hörstörung beim Menschen führen kann.

## 9 Abstract

Hearing loss is the most frequent disorder of the sensory organs in humans, affecting 1 to 2 out of 1,000 newborns. Congenital deafness may be due to environmental or genetic factors with genetic factors being the cause of at least 50 - 60% of the prelingual cases in developed countries. The aim of this study was to identify the causative genetic defect leading to autosomal-recessive hearing loss in a consanguineous Moroccan family.

In the investigated family three children were deaf from birth, whereas the parents and three other children are unaffected. After the exclusion of mutations in the most frequent deafness gene *GJB2*, a genome-wide linkage analysis was performed in the eight family members. Two putative linked regions were discovered, i.e. one on chromosome 2 and another on chromosome 12 with LOD scores of 2.7 and 1.5, respectively. The locus on chromosome 12 could be excluded by the analysis of additional microsatellite markers, which showed that affected individuals did not share the same haplotype. In contrast, linkage could be confirmed for the locus on chromosome 2. According to the nomenclature for deafness loci the linked region on chromosome 2, which is flanked by the microsatellite markers *D2S119* and *D2S378*, was named *DFNB70* and has been registered at the *Hereditary Hearing Loss Homepage*. The *DFNB70* locus covers 13.2 megabases and contains 49 annotated genes. Direct sequencing of coding exons and adjacent splice sites of all genes within the linked region identified a homozygous, not yet annotated missense variation in the *PNPT1* gene in the affected individuals. The substitution of guanine for adenine at nucleotide position 1424 (c.1424A>G) in *PNPT1* led to an amino acid change from glutamic acid to glycine (p.E475G). This alteration could be found neither in 400 healthy control individuals nor in the database *dbSNP* nor in the *Exome Variant Server*, making it unlikely that it represents a common polymorphism.

Polynucleotide phosphorylase (PNPase), encoded by *PNPT1*, is an evolutionarily highly conserved protein, which is known to be involved in RNA turnover in bacteria. In mammals, PNPase localizes to the mitochondrial intermembrane space and is so far the only known protein that mediates the import of RNAs into mitochondria - a process that is required for the replication and the transcription of the mitochondrial genome.

The coding sequence of the *PNPT1* ortholog in zebrafish, which to date is not annotated, was identified and cloned completely. Using *in situ* hybridization the expression of *PNPT1* in early developmental stages of the zebrafish could be determined. Similar to the embryonic lethality of the already described *PNPT1*-knockout-mouse, morpholino-mediated knockdown of *PNPT1* in zebrafish led to severe malformations in early zebrafish development, showing that PNPase function is essential for both mouse and zebrafish.

Immunohistochemistry of PNPase in the murine cochlea revealed PNPase expression in the affected organ including hair cells, as well as spiral and vestibular ganglion neurons.

*In vitro* analysis in bacteria, yeast and mammalian cells illustrated that the E475G mutation represents a hypofunctional allele. Complementation studies in *E. coli* demonstrated that PNPase-deficient *E. coli* strains expressing bacterial PNPase with the corresponding amino acid substitution show significantly poorer growth under oxidative stress conditions than PNPase-deficient *E. coli* strains expressing bacterial wildtype-PNPase. Furthermore, in yeast and in mammalian cells the trimerization of PNPase as well as the mitochondrial RNA import of RNase P RNA is impaired by the E475G mutation. The impaired RNase P RNA import probably leads to a compromised processing of mitochondrial transcripts by RNase P and may thus result in an accumulation of these transcripts in the mitochondrial matrix. Similar to mutations in mitochondrial genes known to cause hearing loss, the accumulation of such transcripts might be a possible explanation for the deafness in the family investigated here.

In summary, it was shown for the first time that an impaired function of PNPase probably reducing mitochondrial RNA import leads to hereditary hearing loss in humans.

## 10 Publikationen

### 10.1 Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Laue K, Pogoda HM, Daniel PB, van Haeringen A, Alanay Y, **von Ameln S**, Rachwalski M, Morgan T, Gray MJ, Breuning MH, Sawyer GM, Sutherland-Smith AJ, Nikkels PG, Kubisch C, Bloch W, Wollnik B, Hammerschmidt M, Robertson SP: ***Craniosynostosis and multiple skeletal anomalies in humans and zebrafish result from a defect in the localized degradation of retinoic acid.*** Am J Hum Genet. 2011, Accepted

Borck G, Ur Rehman A, Lee K, Pogoda HM, Kakar N, **von Ameln S**, Grillet N, Hildebrand MS, Ahmed ZM, Nürnberg G, Ansar M, Basit S, Javed Q, Morell RJ, Nasreen N, Shearer AE, Ahmad A, Kahrizi K, Shaikh RS, Ali RA, Khan SN, Goebel I, Meyer NC, Kimberling WJ, Webster JA, Stephan DA, Schiller MR, Bahlo M, Najmabadi H, Gillespie PG, Nürnberg P, Wollnik B, Riazuddin S, Smith RJ, Ahmad W, Müller U, Hammerschmidt M, Friedman TB, Riazuddin S, Leal SM, Ahmad J, Kubisch C: ***Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42.*** Am J Hum Genet. 2011, 88(2):127-37.

Li Y, Pohl E, Boulouiz R, Schraders M, Nürnberg G, Charif M, Admiraal RJ, **von Ameln S**, Baessmann I, Kandil M, Veltman JA, Nürnberg P, Kubisch C, Barakat A, Kremer H, Wollnik B: ***Mutations in TPRN cause a progressive form of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss.*** Am J Hum Genet. 2010, 86(3):479-84.

## 11 Literaturverzeichnis

- Ahmed, Z.M., Yousaf, R., Lee, B.C., Khan, S.N., Lee, S., Lee, K., Husnain, T., Rehman, A.U., Bonneux, S., Ansar, M., Ahmad, W., Leal, S.M., Gladyshev, V.N., Belyantseva, I.A., Van Camp, G., Riazuddin, S. & Friedman, T.B. (2011) Functional null mutations of MSRFB3 encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFNB74. *Am J Hum Genet*, **88**, 19-29.
- Alberts, B. (2002) *Molecular Biology of the Cell*.
- Alfonzo, J.D. & Soll, D. (2009) Mitochondrial tRNA import--the challenge to understand has just begun. *Biological chemistry*, **390**, 717-722.
- Altshuler, D., Daly, M.J. & Lander, E.S. (2008) Genetic mapping in human disease. *Science*, **322**, 881-888.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. & Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- Bonawitz, N.D., Clayton, D.A. & Shadel, G.S. (2006) Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Molecular cell*, **24**, 813-825.
- Bravo, O., Ballana, E. & Estivill, X. (2006) Cochlear alterations in deaf and unaffected subjects carrying the deafness-associated A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **344**, 511-516.
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C. & Krisch, H.M. (1994) Copurification of E. coli RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*, **76**, 889-900.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. & Pfanner, N. (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, **138**, 628-644.
- Chang, D.D. & Clayton, D.A. (1987) A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science*, **235**, 1178-1184.
- Chen, H.W., Koehler, C.M. & Teitell, M.A. (2007) Human polynucleotide phosphorylase: location matters. *Trends Cell Biol*, **17**, 600-608.
- Chen, H.W., Rainey, R.N., Balatoni, C.E., Dawson, D.W., Troke, J.J., Wasiak, S., Hong, J.S., McBride, H.M., Koehler, C.M., Teitell, M.A. & French, S.W. (2006) Mammalian polynucleotide phosphorylase is an intermembrane space RNase that maintains mitochondrial homeostasis. *Mol Cell Biol*, **26**, 8475-8487.
- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N.C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H. & Smith, R.J. (2005) Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *Journal of medical genetics*, **42**, e61.
- Christoffels, A., Koh, E.G., Chia, J.M., Brenner, S., Aparicio, S. & Venkatesh, B. (2004) Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Molecular biology and evolution*, **21**, 1146-1151.



- Collin, R.W., Kalay, E., Tariq, M., Peters, T., van der Zwaag, B., Venselaar, H., Oostrik, J., Lee, K., Ahmed, Z.M., Caylan, R., Li, Y., Spierenburg, H.A., Eyupoglu, E., Heister, A., Riazuddin, S., Bahat, E., Ansar, M., Arslan, S., Wollnik, B., Brunner, H.G., Cremers, C.W., Karaguzel, A., Ahmad, W., Cremers, F.P., Vriend, G., Friedman, T.B., Leal, S.M. & Kremer, H. (2008) Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *Am J Hum Genet*, **82**, 125-138.
- Corti, A. (1851) Recherches sur l'organe de Corti de l'ouïe des mammifères. *Z wiss Zool*, **3**, 1-106.
- Das, S.K., Bhutia, S.K., Sokhi, U.K., Dash, R., Azab, B., Sarkar, D. & Fisher, P.B. (2010) Human polynucleotide phosphorylase (hPNPase(old-35)): an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of RNA degradation functions. *Oncogene*, **30**, 1733-1743.
- Das, S.K., Sokhi, U.K., Bhutia, S.K., Azab, B., Su, Z.Z., Sarkar, D. & Fisher, P.B. (2009) Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 11948-11953.
- de Kok, Y.J., Merckx, G.F., van der Maarel, S.M., Huber, I., Malcolm, S., Ropers, H.H. & Cremers, F.P. (1995) A duplication/paracentric inversion associated with familial X-linked deafness (DFN3) suggests the presence of a regulatory element more than 400 kb upstream of the POU3F4 gene. *Human molecular genetics*, **4**, 2145-2150.
- Doersen, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. & Attardi, G. (1985) Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *The Journal of biological chemistry*, **260**, 5942-5949.
- Donovan, W.P. & Kushner, S.R. (1986) Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 120-124.
- Dror, A.A. & Avraham, K.B. (2010) Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron*, **68**, 293-308.
- Duchene, A.M., Pujol, C. & Marechal-Drouard, L. (2009) Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Current genetics*, **55**, 1-18.
- Endo, T., Yamano, K. & Yoshihisa, T. (2010) Mitochondrial matrix reloaded with RNA. *Cell*, **142**, 362-363.
- Estivill, X., Govea, N., Barcelo, E., Badenas, C., Romero, E., Moral, L., Scozzri, R., D'Urbano, L., Zeviani, M. & Torroni, A. (1998) Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet*, **62**, 27-35.
- Friedman, L.M., Dror, A.A., Mor, E., Tenne, T., Toren, G., Satoh, T., Biesemeier, D.J., Shomron, N., Fekete, D.M., Hornstein, E. & Avraham, K.B. (2009) MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 7915-7920.
- Fukuhara, N., Tagawa, H., Kameoka, Y., Kasugai, Y., Karnan, S., Kameoka, J., Sasaki, T., Morishima, Y., Nakamura, S. & Seto, M. (2006) Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer science*, **97**, 499-504.

- Gagliardi, D., Stepien, P.P., Temperley, R.J., Lightowers, R.N. & Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2004) Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends in genetics : TIG*, **20**, 260-267.
- Gates, G.A. & Mills, J.H. (2005) Presbycusis. *Lancet*, **366**, 1111-1120.
- Goto, Y., Nonaka, I. & Horai, S. (1990) A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, **348**, 651-653.
- Gray, M.W. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *International review of cytology*, **141**, 233-357.
- Grunberg-Manago, M., Ortiz, P.J. & Ochoa, S. (1956) Enzymic synthesis of polynucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of azotobacter vinelandii. *Biochimica et biophysica acta*, **20**, 269-285.
- Guan, M.X., Enriquez, J.A., Fischel-Ghodsian, N., Puranam, R.S., Lin, C.P., Maw, M.A. & Attardi, G. (1998) The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol*, **18**, 5868-5879.
- Hajnsdorf, E., Braun, F., Haugel-Nielsen, J. & Regnier, P. (1995) Polyadenylation destabilizes the rpsO mRNA of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3973-3977.
- Hao, H., Bonilla, E., Manfredi, G., DiMauro, S. & Moraes, C.T. (1995) Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet*, **56**, 1017-1025.
- Hayakawa, H., Kuwano, M. & Sekiguchi, M. (2001) Specific binding of 8-oxoguanine-containing RNA to polynucleotide phosphorylase protein. *Biochemistry*, **40**, 9977-9982.
- Hayakawa, H. & Sekiguchi, M. (2006) Human polynucleotide phosphorylase protein in response to oxidative stress. *Biochemistry*, **45**, 6749-6755.
- Heasman, J. (2002) Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol*, **243**, 209-214.
- Hutchin, T.P., Parker, M.J., Young, I.D., Davis, A.C., Pulleyn, L.J., Deeble, J., Lench, N.J., Markham, A.F. & Mueller, R.F. (2000) A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *Journal of medical genetics*, **37**, 692-694.
- Huyghe, J.R., Van Laer, L., Hendrickx, J.J., Fransen, E., Demeester, K., Topsakal, V., Kunst, S., Manninen, M., Jensen, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Baur, M., Hannula, S., Maki-Torkko, E., Espeso, A., Van Eyken, E., Flaquer, A., Becker, C., Stephens, D., Sorri, M., Orzan, E., Bille, M., Parving, A., Pyykko, I., Cremers, C.W., Kremer, H., Van de Heyning, P.H., Wienker, T.F., Nurnberg, P., Pfister, M. & Van Camp, G. (2008) Genome-wide SNP-based linkage scan identifies a locus on 8q24 for an age-related hearing impairment trait. *Am J Hum Genet*, **83**, 401-407.
- Jervell, A. & Lange-Nielsen, F. (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *American heart journal*, **54**, 59-68.

- Kao, C.Y. & Read, L.K. (2005) Opposing effects of polyadenylation on the stability of edited and unedited mitochondrial RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **25**, 1634-1644.
- Kenneson, A., Van Naarden Braun, K. & Boyle, C. (2002) GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med*, **4**, 258-274.
- Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E.D. & Moser, T. (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature*, **434**, 889-894.
- Kirschner, L.S., Taymans, S.E., Pack, S., Pak, E., Pike, B.L., Chandrasekharappa, S.C., Zhuang, Z. & Stratakis, C.A. (1999) Genomic mapping of chromosomal region 2p15-p21 (D2S378-D2S391): integration of Genemap'98 within a framework of yeast and bacterial artificial chromosomes. *Genomics*, **62**, 21-33.
- Koehler, C.M. (2000) Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS letters*, **476**, 27-31.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. & Schatz, G. (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2141-2146.
- Kokotas, H., Petersen, M.B. & Willems, P.J. (2007) Mitochondrial deafness. *Clinical genetics*, **71**, 379-391.
- Kren, B.T., Wong, P.Y., Sarver, A., Zhang, X., Zeng, Y. & Steer, C.J. (2009) MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA biology*, **6**, 65-72.
- Lang, B.F., Gray, M.W. & Burger, G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **33**, 351-397.
- Leandro, J., Simonsen, N., Saraste, J., Leandro, P. & Flatmark, T. (2011) Phenylketonuria as a protein misfolding disease: The mutation pG46S in phenylalanine hydroxylase promotes self-association and fibril formation. *Biochimica et biophysica acta*, **1812**, 106-120.
- Leszczyniecka, M., DeSalle, R., Kang, D.C. & Fisher, P.B. (2004) The origin of polynucleotide phosphorylase domains. *Molecular phylogenetics and evolution*, **31**, 123-130.
- Leszczyniecka, M., Kang, D.C., Sarkar, D., Su, Z.Z., Holmes, M., Valerie, K. & Fisher, P.B. (2002) Identification and cloning of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase old-35, in the context of terminal differentiation and cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16636-16641.
- Leszczyniecka, M., Su, Z.Z., Kang, D.C., Sarkar, D. & Fisher, P.B. (2003) Expression regulation and genomic organization of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase(old-35), a Type I interferon inducible early response gene. *Gene*, **316**, 143-156.
- Leykin, I., Hao, K., Cheng, J., Meyer, N., Pollak, M.R., Smith, R.J., Wong, W.H., Rosenow, C. & Li, C. (2005) Comparative linkage analysis and visualization of high-density oligonucleotide SNP array data. *BMC genetics*, **6**, 7.

- Li, Y., Laue, K., Temtamy, S., Aglan, M., Kotan, L.D., Yigit, G., Canan, H., Pawlik, B., Nurnberg, G., Wakeling, E.L., Quarrell, O.W., Baessmann, I., Lanktree, M.B., Yilmaz, M., Hegele, R.A., Amr, K., May, K.W., Nurnberg, P., Topaloglu, A.K., Hammerschmidt, M. & Wollnik, B. (2010a) Temtamy preaxial brachydactyly syndrome is caused by loss-of-function mutations in chondroitin synthase 1, a potential target of BMP signaling. *Am J Hum Genet*, **87**, 757-767.
- Li, Y., Pohl, E., Boulouiz, R., Schraders, M., Nurnberg, G., Charif, M., Admiraal, R.J., von Ameln, S., Baessmann, I., Kandil, M., Veltman, J.A., Nurnberg, P., Kubisch, C., Barakat, A., Kremer, H. & Wollnik, B. (2010b) Mutations in TPRN cause a progressive form of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, **86**, 479-484.
- Lin-Chao, S., Chiou, N.T. & Schuster, G. (2007) The PNPase, exosome and RNA helicases as the building components of evolutionarily-conserved RNA degradation machines. *J Biomed Sci*, **14**, 523-532.
- Lin, P.H. & Lin-Chao, S. (2005) RhIB helicase rather than enolase is the beta-subunit of the Escherichia coli polynucleotide phosphorylase (PNPase)-exoribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16590-16595.
- Lindeman, R.E. & Pelegri, F. (2010) Vertebrate maternal-effect genes: Insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. *Molecular reproduction and development*, **77**, 299-313.
- Liou, G.G., Chang, H.Y., Lin, C.S. & Lin-Chao, S. (2002) DEAD box RhIB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 41157-41162.
- Lithgow, T. (2000) Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS letters*, **476**, 22-26.
- Liu, Q., Greimann, J.C. & Lima, C.D. (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, **127**, 1223-1237.
- McKenzie, M., Liolitsa, D. & Hanna, M.G. (2004) Mitochondrial disease: mutations and mechanisms. *Neurochemical research*, **29**, 589-600.
- Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Redshaw, N., Morin, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, L.A., del Castillo, I., Steel, K.P., Dalmay, T., Moreno, F. & Moreno-Pelayo, M.A. (2009) Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet*, **41**, 609-613.
- Mercer, T.R., Neph, S., Dinger, M.E., Crawford, J., Smith, M.A., Shearwood, A.M., Haugen, E., Bracken, C.P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J.A., Filipovska, A. & Mattick, J.S. (2011) The human mitochondrial transcriptome. *Cell*, **146**, 645-658.
- Meyer, A.C., Frank, T., Khimich, D., Hoch, G., Riedel, D., Chapochnikov, N.M., Yarin, Y.M., Harke, B., Hell, S.W., Egner, A. & Moser, T. (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci*, **12**, 444-453.
- Miczak, A., Kabardin, V.R., Wei, C.L. & Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3865-3869.

- Mohanty, B.K. & Kushner, S.R. (1999) Residual polyadenylation in poly(A) polymerase I (pcnB) mutants of *Escherichia coli* does not result from the activity encoded by the f310 gene. *Molecular microbiology*, **34**, 1109-1119.
- Mohanty, B.K. & Kushner, S.R. (2000) Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11966-11971.
- Morton, C.C. & Nance, W.E. (2006) Newborn hearing screening--a silent revolution. *The New England journal of medicine*, **354**, 2151-2164.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J.S., Loiselet, J. & Petit, C. (1999) An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Human molecular genetics*, **8**, 409-412.
- Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., Hannibal, M.C., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., Beck, A.E., Tabor, H.K., Cooper, G.M., Mefford, H.C., Lee, C., Turner, E.H., Smith, J.D., Rieder, M.J., Yoshiura, K., Matsumoto, N., Ohta, T., Niikawa, N., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J. & Shendure, J. (2011) Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet*, **42**, 790-793.
- Nicolson, T. (2005) The genetics of hearing and balance in zebrafish. *Annu Rev Genet*, **39**, 9-22.
- Nicolson, T., Rusch, A., Friedrich, R.W., Granato, M., Ruppertsberg, J.P. & Nusslein-Volhard, C. (1998) Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation: the zebrafish circler mutants. *Neuron*, **20**, 271-283.
- Niu, X., Trifunovic, A., Larsson, N.G. & Canlon, B. (2007) Somatic mtDNA mutations cause progressive hearing loss in the mouse. *Experimental cell research*, **313**, 3924-3934.
- Ohno, S. (1999) Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Seminars in cell & developmental biology*, **10**, 517-522.
- Ott, J. & Hoh, J. (2000) Statistical approaches to gene mapping. *Am J Hum Genet*, **67**, 289-294.
- Perron, M.P. & Provost, P. (2009) Protein components of the microRNA pathway and human diseases. *Methods Mol Biol*, **487**, 369-385.
- Petit, C., Levilliers, J. & Hardelin, J.P. (2001) Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet*, **35**, 589-646.
- Petriv, O.I., Kuchenbauer, F., Delaney, A.D., Lecault, V., White, A., Kent, D., Marmolejo, L., Heuser, M., Berg, T., Copley, M., Ruschmann, J., Sekulovic, S., Benz, C., Kuroda, E., Ho, V., Antignano, F., Halim, T., Giambra, V., Krystal, G., Takei, C.J., Weng, A.P., Piret, J., Eaves, C., Marra, M.A., Humphries, R.K. & Hansen, C.L. (2010) Comprehensive microRNA expression profiling of the hematopoietic hierarchy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 15443-15448.
- Piwowarski, J., Grzechnik, P., Dziembowski, A., Dmochowska, A., Minczuk, M. & Stepień, P.P. (2003) Human polynucleotide phosphorylase, hPNPase, is localized in mitochondria. *J Mol Biol*, **329**, 853-857.
- Portnoy, V., Palnizky, G., Yehudai-Resheff, S., Glaser, F. & Schuster, G. (2008) Analysis of the human polynucleotide phosphorylase (PNPase) reveals differences in RNA

- binding and response to phosphate compared to its bacterial and chloroplast counterparts. *Rna*, **14**, 297-309.
- Prezant, T.R., Agapian, J.V., Bohlman, M.C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W.Q., Arnos, K.S., Cortopassi, G.A., Jaber, L., Rotter, J.I. & et al. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*, **4**, 289-294.
- Rainey, R.N., Glavin, J.D., Chen, H.W., French, S.W., Teitell, M.A. & Koehler, C.M. (2006) A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space. *Mol Cell Biol*, **26**, 8488-8497.
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I. & Kubisch, C. (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, **38**, 1184-1191.
- Rehman, A.U., Morell, R.J., Belyantseva, I.A., Khan, S.Y., Boger, E.T., Shahzad, M., Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Khan, S.N. & Friedman, T.B. (2010) Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *Am J Hum Genet*, **86**, 378-388.
- Rigoli, L., Prisco, F., Caruso, R.A., Iafusco, D., Ursomanno, G., Zuccarello, D., Ingenito, N., Rigoli, M. & Barberi, I. (2001) Association of the T14709C mutation of mitochondrial DNA with maternally inherited diabetes mellitus and/or deafness in an Italian family. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **18**, 334-336.
- Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N., Eavey, R.D., McKenna, M., Nadol, J.B., Jr., Miyamoto, R.T., Linthicum, F.H., Jr., Lubianca Neto, J.F., Hudspeth, A.J., Seidman, C.E., Morton, C.C. & Seidman, J.G. (1998) Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet*, **20**, 299-303.
- Roth, T.N., Hanebuth, D. & Probst, R. (2011) Prevalence of age-related hearing loss in Europe: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **268**, 1101-1107.
- Rubio, M.A., Rinehart, J.J., Krett, B., Duvezin-Caubet, S., Reichert, A.S., Soll, D. & Alfonzo, J.D. (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 9186-9191.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sarkar, D. & Fisher, P.B. (2006a) Human polynucleotide phosphorylase (hPNPase old-35): an RNA degradation enzyme with pleiotropic biological effects. *Cell Cycle*, **5**, 1080-1084.
- Sarkar, D. & Fisher, P.B. (2006b) Polynucleotide phosphorylase: an evolutionary conserved gene with an expanding repertoire of functions. *Pharmacology & therapeutics*, **112**, 243-263.
- Sarkar, D., Leszczyniecka, M., Kang, D.C., Lebedeva, I.V., Valerie, K., Dhar, S., Pandita, T.K. & Fisher, P.B. (2003) Down-regulation of Myc as a potential target for growth arrest induced by human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35) in human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 24542-24551.

- Sarkar, D., Park, E.S., Emdad, L., Randolph, A., Valerie, K. & Fisher, P.B. (2005) Defining the domains of human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseOLD-35) mediating cellular senescence. *Mol Cell Biol*, **25**, 7333-7343.
- Schultz, J.M., Khan, S.N., Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Waryah, A.M., Chhatre, D., Starost, M.F., Ploplis, B., Buckley, S., Velasquez, D., Kabra, M., Lee, K., Hassan, M.J., Ali, G., Ansar, M., Ghosh, M., Wilcox, E.R., Ahmad, W., Merlino, G., Leal, S.M., Friedman, T.B. & Morell, R.J. (2009) Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *Am J Hum Genet*, **85**, 25-39.
- Shi, W.-Z.Y., Sue Lin-Chao (2008) Crystal structure of Escherichia coli PNPase: Central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA*.
- Shi, Z., Yang, W.Z., Lin-Chao, S., Chak, K.F. & Yuan, H.S. (2008) Crystal structure of Escherichia coli PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *Rna*, **14**, 2361-2371.
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W. & Wallace, D.C. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, **61**, 931-937.
- Soukup, G.A. (2009) Little but loud: small RNAs have a resounding affect on ear development. *Brain research*, **1277**, 104-114.
- Soukup, G.A., Fritsch, B., Pierce, M.L., Weston, M.D., Jahan, I., McManus, M.T. & Harfe, B.D. (2009) Residual microRNA expression dictates the extent of inner ear development in conditional Dicer knockout mice. *Dev Biol*, **328**, 328-341.
- Strachan (2005) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Verlag.
- Sue, C.M., Tanji, K., Hadjigeorgiou, G., Andreu, A.L., Nishino, I., Krishna, S., Bruno, C., Hirano, M., Shanske, S., Bonilla, E., Fischel-Ghodsian, N., DiMauro, S. & Friedman, R. (1999) Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology*, **52**, 1905-1908.
- Symmons, M.F., Jones, G.H. & Luisi, B.F. (2000) A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure*, **8**, 1215-1226.
- Takumi, Y., Matsubara, A., Laake, J.H., Ramirez-Leon, V., Roberg, B., Torgner, I., Kvamme, E., Usami, S. & Ottersen, O.P. (1999) Phosphate activated glutaminase is concentrated in mitochondria of sensory hair cells in rat inner ear: a high resolution immunogold study. *Journal of neurocytology*, **28**, 223-237.
- Tao, Z.Z., Yamashita, T. & Chou, J.T. (1987) Succinate dehydrogenase and mitochondria in the hair cells in the organ of Corti of mature and old shaker-1 mice. *The Journal of laryngology and otology*, **101**, 643-651.
- Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R.E., May, M., Arena, F., Barker, D. & et al. (1995) A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *Journal of medical genetics*, **32**, 257-263.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T. & Larsson,

- N.G. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**, 417-423.
- Vahava, O., Morell, R., Lynch, E.D., Weiss, S., Kagan, M.E., Ahituv, N., Morrow, J.E., Lee, M.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T.B., King, M.C. & Avraham, K.B. (1998) Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science*, **279**, 1950-1954.
- Van Camp, G. (2011) Hereditary hearing loss homepage.
- Van Laer, L., Huyghe, J.R., Hannula, S., Van Eyken, E., Stephan, D.A., Maki-Torkko, E., Aikio, P., Fransen, E., Lysholm-Bernacchi, A., Sorri, M., Huentelman, M.J. & Van Camp, G. (2010) A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *European journal of human genetics : EJHG*, **18**, 685-693.
- van Wijk, E., Krieger, E., Kemperman, M.H., De Leenheer, E.M., Huygen, P.L., Cremers, C.W., Cremers, F.P. & Kremer, H. (2003) A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *Journal of medical genetics*, **40**, 879-884.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.
- Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M., Lightowlers, R.N., Morse, H.C., 3rd, Koehler, C.M. & Teitell, M.A. (2010) PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell*, **142**, 456-467.
- Ward, O.C. (1964) A New Familial Cardiac Syndrome in Children. *Journal of the Irish Medical Association*, **54**, 103-106.
- Weston, M.D., Pierce, M.L., Jensen-Smith, H.C., Fritsch, B., Rocha-Sanchez, S., Beisel, K.W. & Soukup, G.A. (2011) MicroRNA-183 family expression in hair cell development and requirement of microRNAs for hair cell maintenance and survival. *Dev Dyn*, **240**, 808-819.
- Whitfield, T.T. (2002) Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol*, **53**, 157-171.
- Whitfield, T.T., Riley, B.B., Chiang, M.Y. & Phillips, B. (2002) Development of the zebrafish inner ear. *Dev Dyn*, **223**, 427-458.
- Wollnik, B., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Esperer, H.D., Wieacker, P. & Jentsch, T.J. (1997) Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Human molecular genetics*, **6**, 1943-1949.
- Wu, J., Jiang, Z., Liu, M., Gong, X., Wu, S., Burns, C.M. & Li, Z. (2009) Polynucleotide phosphorylase protects *Escherichia coli* against oxidative stress. *Biochemistry*, **48**, 2012-2020.
- Wu, J. & Li, Z. (2008) Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, **372**, 288-292.

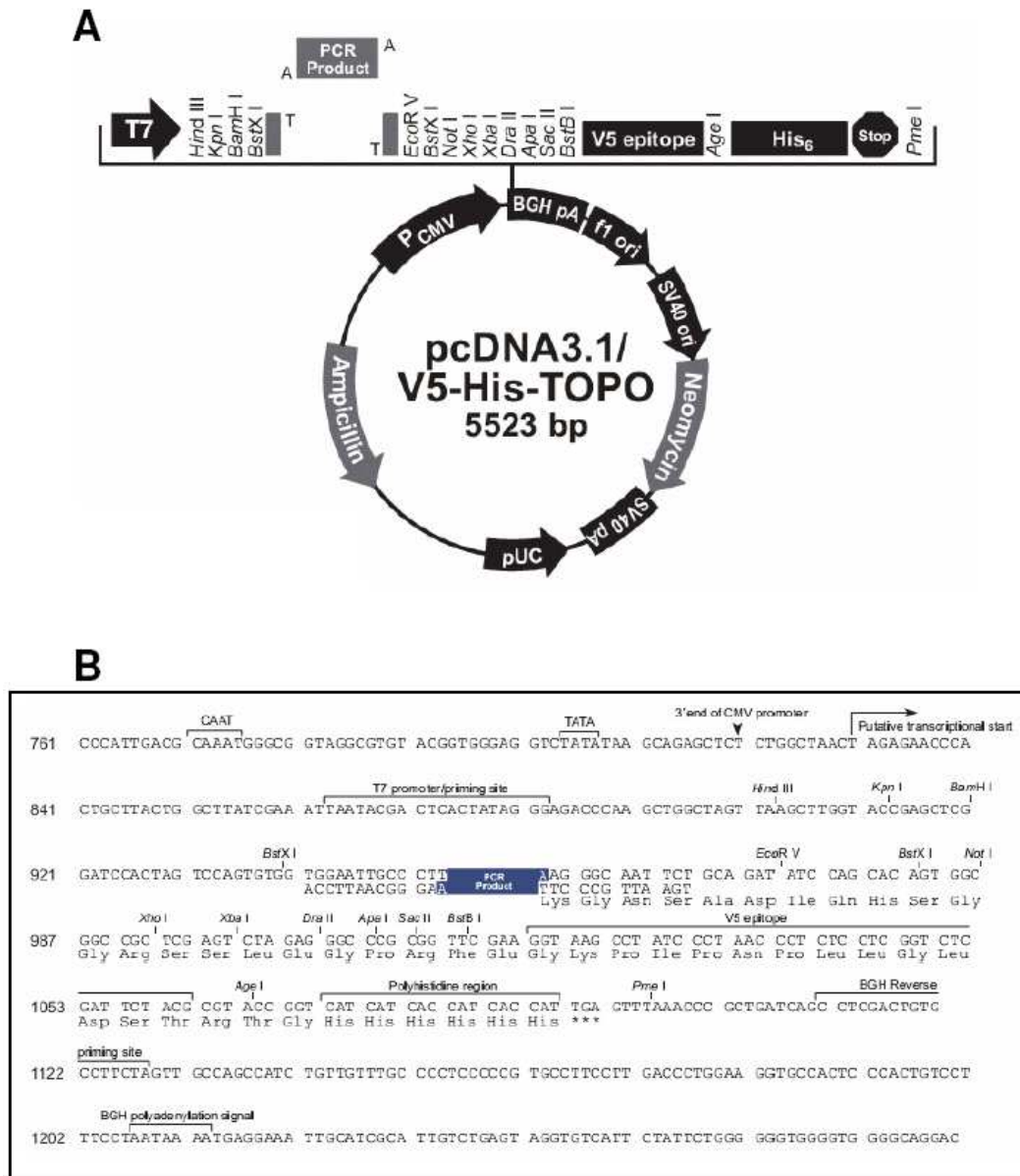


- Xing, G., Bu, X., Yan, M., Lu, L. & Yang, S. (2000) [Audiological findings and mitochondrial DNA mutation in a large family with matrilineal sensorineural hearing loss]. *Zhonghua er bi yan hou ke za zhi*, **35**, 98-101.
- Yamasoba, T., Someya, S., Yamada, C., Weindruch, R., Prolla, T.A. & Tanokura, M. (2007) Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hearing research*, **226**, 185-193.
- Yehudai-Resheff, S., Portnoy, V., Yogev, S., Adir, N. & Schuster, G. (2003) Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology with exosome proteins. *The Plant cell*, **15**, 2003-2019.
- Yue, G.H., Zhu, Z.Y., Wang, C.M. & Xia, J.H. (2009) A simple and efficient method for isolating polymorphic microsatellites from cDNA. *BMC genomics*, **10**, 125.
- Zhu, M., Yang, T., Wei, S., DeWan, A.T., Morell, R.J., Effenbein, J.L., Fisher, R.A., Leal, S.M., Smith, R.J. & Friderici, K.H. (2003) Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet*, **73**, 1082-1091.

## 12 Anhang

### 12.1 Vektorkarten

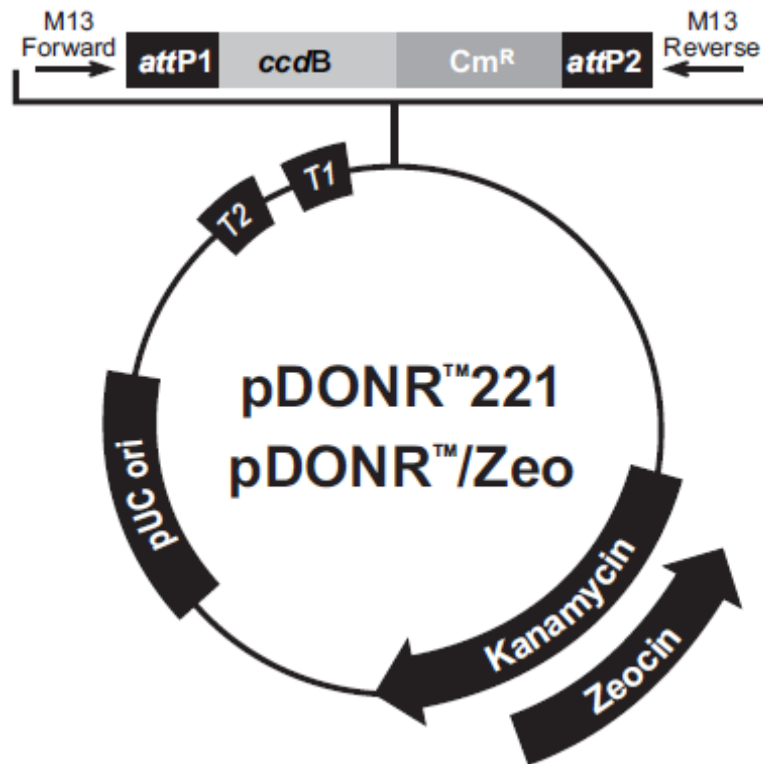
#### 12.1.1 TOPO-TA-Vektor (Invitrogen)



**Abbildung 12.1 Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His<sup>6</sup>TOPO<sup>®</sup>-Vektor**

(A) zeigt den Aufbau und die funktionellen Einheiten des Vektors. Er kodiert u.a. für eine Ampicillin-Resistenz. In (B) ist die detaillierte Sequenz der *Multiple Cloning Site* mit der Insertionsstelle für das PCR-Produkt dargestellt.

## 12.1.2 Gateway-Vektoren (Invitrogen)



M13 Forward (-20) priming site

531 GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATAATGATT TTATTTTGAC  
AGCCCGGGGT TTATTACTAA AATAAAACTG

591 TGATAGTGAC CTGTTCGTTG CAACACATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATG CCA ACT  
ACTATCACTG GACAAGCAAC GTTGTGTAAC TACTCGTTAC GAAAAAATAT TAC GGT TGA

attL1

651 TIG TAC AAA AAA GCA GGC TNN --- --- NAC CCA GCT TIC TTG TAC AAA  
AAC ATG TTT TTT CGT CCG ANN --- Gene --- NTG GGT CGA AAG AAC ATG TTT

2906 GTT GGC ATT ATAAGAAAGC ATTGCTTATC AATTTGTTGC AACGAACAGG TCACTATCAG  
CAA CCG TAA TATTCCTTCG TAACGAATAG TAAACAACG TTGCTTGTC CAGTATAGTC

attL2

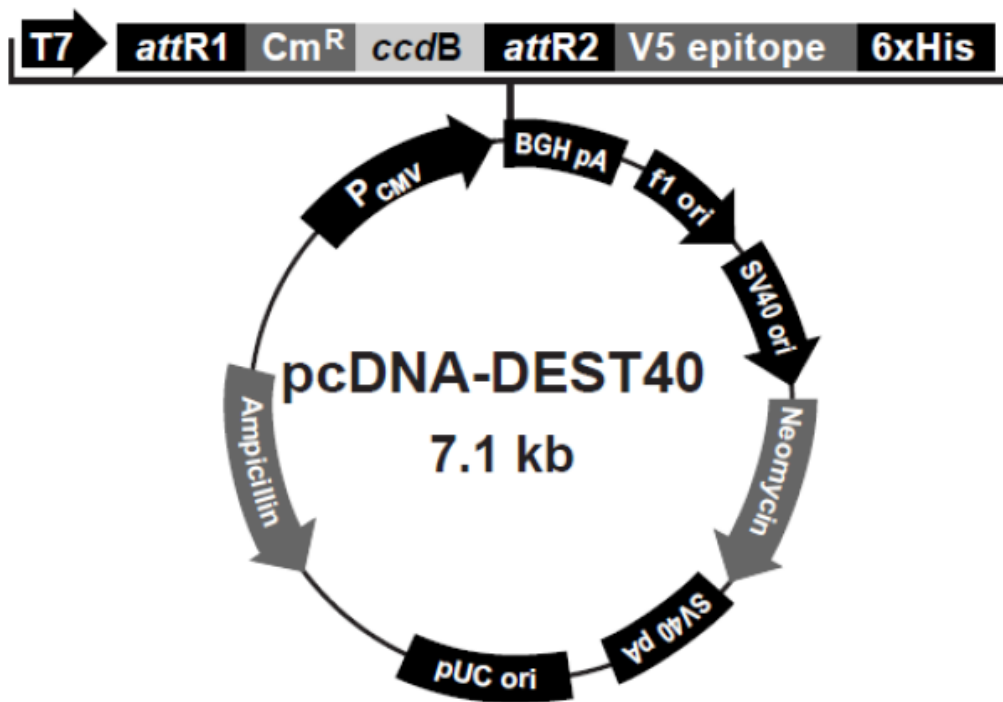
2965 TCAAAATAAA ATCATTATTT GCCATCCAGC TGATATCCCC TATAGTGAGT CGTATTACAT  
AGTTTTATTT TAGTAATAAA CGGTAGGTCG

M13 Reverse priming site

3025 GGTTCATAGCT GTTTCCTGGC AGCTCTGGCC CGTGTCTCAA AATCTCTGAT GTTACATTGC

Abbildung 12.2 Entry-Vektor pDONR221

Die Vektorkarte zeigt den Aufbau und die funktionellen Einheiten des Vektors. Er kodiert u.a. für eine Kanamycin-Resistenz. Der Sequenzausschnitt zeigt die *att recombination sites* an denen das PCR-Produkt über eine BP-Rekombinase-Reaktion eingefügt wurde.

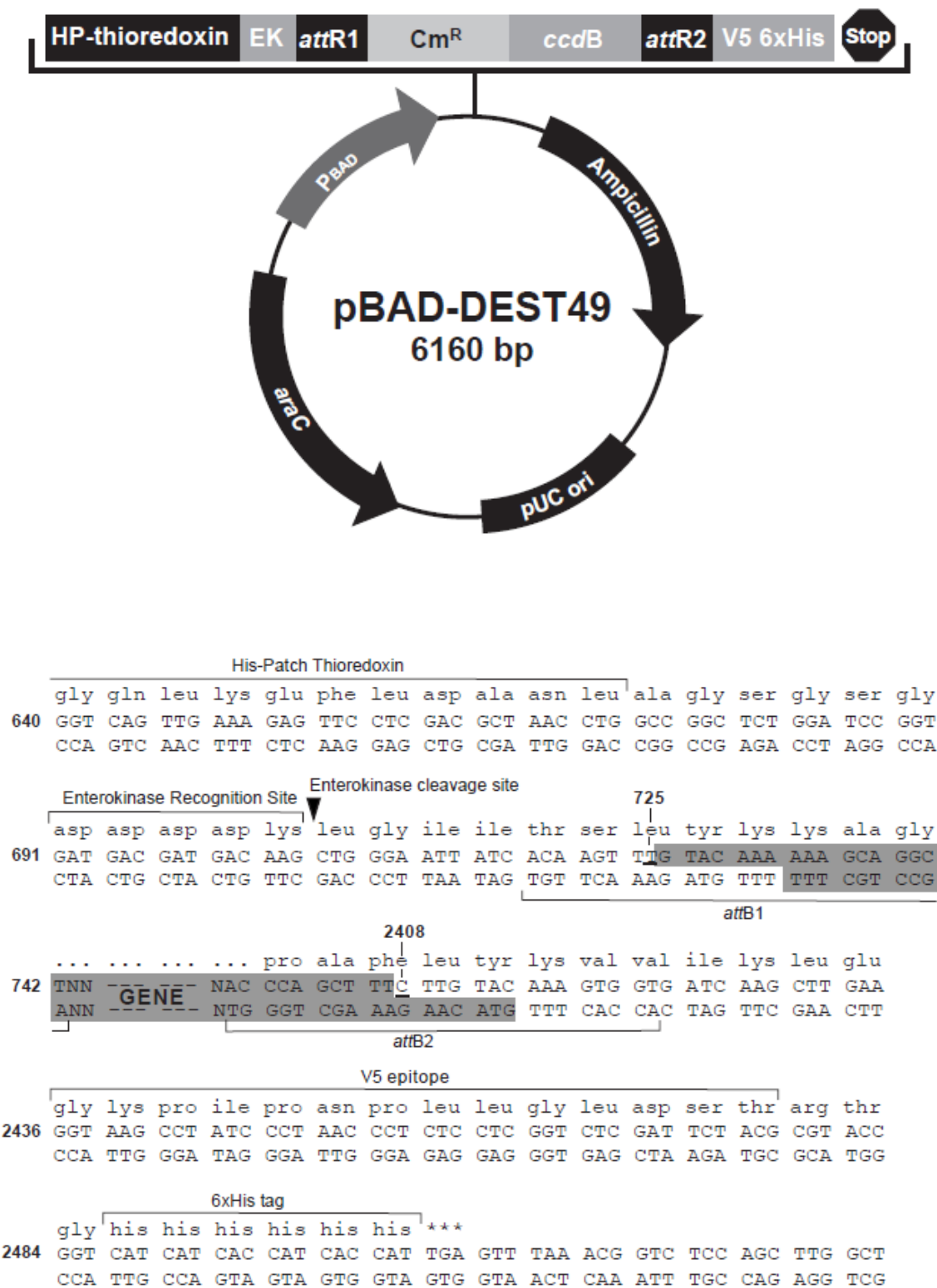


```

851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT TAAGCTATCA
    CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCA ATTCGATAGT
      918                                     2601
911 ACAAGTTTGT ACAAAAAAGC AGGCTN----- NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT
    TGTTCAAACA TGTTTTTTCG TCCGAN-- GENE -- NTG GGT CGA AAG AAC ATG TTT CAC CAA
      attB1                                     attB2
                                     V5 epitope
Asp Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly
2617 GAT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT
    CTA GAT CTC CCG GGC GCC AAG CTT CCA TTC GGA TAG GGA TTG GGA GAG GAG CCA
                                     6xHis tag
Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His ***
2671 CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTAAAC
    GAG CTA AGA TGC GCA TGG CCA GTA GTA GTG GTA GTG GTA ACT CAAATTTG
  
```

**Abbildung 12.3 Destination-Vektor pcDNA-DEST40 zur Expression in Säugerzellen**

Die Vektorkarte zeigt den Aufbau und die funktionellen Einheiten des Vektors. Er kodiert u.a. für eine Ampicillin-Resistenz. Der Sequenzausschnitt zeigt die *att recombination sites* an denen das Gen durch eine LR-Rekombinase-Reaktion aus einem *Entry*-Vektor eingefügt wurde.



**Abbildung 12.4 Destination-Vektor pBAD-DEST49 zur Proteinexpression in Bakterien**

Die Vektorkarte zeigt den Aufbau und die funktionellen Einheiten des Vektors. Er kodiert u.a. für eine Ampicillin-Resistenz. Der Sequenzausschnitt zeigt die *att recombination sites* an denen das Gen durch eine LR-Rekombinase-Reaktion aus einem *Entry*-Vektor eingefügt wurde. Es handelt sich um einen induzierbaren Vektor: Die Expression wird durch die Zugabe von L-Arabinose ausgelöst.

## 12.2 Primertabellen

**Tabelle 12.1** Tabellarische Auflistung der Primer die zur genomischen PCR-Amplifikation der verbliebenen Kandidatengene verwendet wurden. Angegeben sind der Gename nach HUGO (*Gene Nomenclature Committee*), die Primerorientierung (F=Vorwärts, R=Rückwärts), das/die flankierte(n) Exon(s), die Sequenz und die erwartete Fragmentgröße. Primer für alle weiteren Gene in der gekoppelten Region sind bereits in meiner Diplomarbeit, Köln, 2008, aufgeführt worden.

Nr.	Gename	Exon(s)	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Größe des PCR-Produkts in bp
1	<i>FSHR</i>	1	F	TGC TGT GTG CCT TAG GTC AG	515
2	<i>FSHR</i>	1	R	ATT CAG GAC TTC GGT CAA GG	
3	<i>FSHR</i>	2	F	CGG TAG TGG GAA CAA GCA AG	495
4	<i>FSHR</i>	2	R	GAT GCA GAA AGT TTG GCT GAC	
5	<i>FSHR</i>	3	F	TCT TCC TTC CTG GAC CTC AC	524
6	<i>FSHR</i>	3	R	GTC CCT GGG TCA CCA GAT AG	
7	<i>FSHR</i>	4	F	AAT AGA TGG GTG GAT GAG TGG	335
8	<i>FSHR</i>	4	R	ATC TCT CCA CCT CCA CTT CTG	
9	<i>FSHR</i>	5	F	TTA AGA CCG TGG AAC GAA CC	372
10	<i>FSHR</i>	5	R	CCC AGA GCA ATA CAT TTG GAG	
11	<i>FSHR</i>	6	F	CTG GGA GGT TGA GGC TAC AG	511
12	<i>FSHR</i>	6	R	GGA GAA ATG CCA AAG TTA CCC	
13	<i>FSHR</i>	7	F	TGC TCA GTG CTT CCA ATT ATG	336
14	<i>FSHR</i>	7	R	CAG AAT GAC TGG TCC AGA GG	
15	<i>FSHR</i>	8	F	AAC TGT GCA TTC AAT GGA ACC	389
16	<i>FSHR</i>	8	R	CCG TGG ATA AGC CTT AAA TTG	
17	<i>FSHR</i>	9/1	F	TAG CCT CAA GGG CAG GTA TG	700
18	<i>FSHR</i>	9/1	R	GGT ATG CCA TCT TTC CAA GG	
19	<i>FSHR</i>	9/2	F	TAC CTG CTG CTC ATT GCA TC	595
20	<i>FSHR</i>	9/2	R	CCA GCA GAA TCT TTG CTT TG	
21	<i>FSHR</i>	9/3	F	TGC TCA TCT TCA CTG ACT TCC	446
22	<i>FSHR</i>	9/3	R	AGC ACT GTC AGC TCT TTG TGA C	
23	<i>LHCGR</i>	1	F	AGG GAA GGG TGT GTG GAA G	403
24	<i>LHCGR</i>	1	R	GGA AAT TTG ATA GGG CAA AGC	
25	<i>LHCGR</i>	2	F	CCT CAG CCT GAA TCC AGT TC	442
26	<i>LHCGR</i>	2	R	GCA TTC AGT CAT TTG AAG CAA G	
27	<i>LHCGR</i>	3	F	CCA GTT GTT GGG TCA CAC AC	269
28	<i>LHCGR</i>	3	R	GGA TTC CTA GCA GTG GAT GC	
29	<i>LHCGR</i>	4	F	AGC CAG CAA CTT CTG GTG AC	296
30	<i>LHCGR</i>	4	R	GCT GAA GAG GAA CAT GCA AAT AG	
31	<i>LHCGR</i>	5	F	CAT CTT CTC CCA CAG CAT GAG	421
32	<i>LHCGR</i>	5	R	AAA GCA TTT CCT GGT ATG GTG	
33	<i>LHCGR</i>	6	F	CAG GCA TCA GAA AGT TTC CAG	334
34	<i>LHCGR</i>	6	R	CCA GTG AGT GAG GAA TGT GG	
35	<i>LHCGR</i>	7	F	GAG GGT TAG GCT TCT TGT CG	488
36	<i>LHCGR</i>	7	R	GTT TCT AGC CAG CCA GTT GC	
37	<i>LHCGR</i>	8	F	CAT CAT GCA CAT AGC TTG GTC	362
38	<i>LHCGR</i>	8	R	GTC TAA GCC TCT CGG TTT GG	
39	<i>LHCGR</i>	9	F	TCA GAA GAT CGA CAC CAT CC	632
40	<i>LHCGR</i>	9	R	TTG GTA GCA GTT TCC ACA AGG	
41	<i>LHCGR</i>	10	F	CAA TGG TGC AGA ACG AGA TG	322
42	<i>LHCGR</i>	10	R	GCA ACA GCT CCG TAA CCA AG	
43	<i>LHCGR</i>	11/1	F	GCT GAG GCT ATT ATG GCT TTG	552
44	<i>LHCGR</i>	11/1	R	TGA TGA CGG TGA GGG TGT AG	
45	<i>LHCGR</i>	11/2	F	AGT TGA TTC CCA AAC CAA GG	608
46	<i>LHCGR</i>	11/2	R	GAT TGG CAC AAG AAT TGA TGG	
47	<i>LHCGR</i>	11/3	F	CTC ATC TTC ACC GAT TTC ACC	519
48	<i>LHCGR</i>	11/3	R	AGG TAG AGG TCT CTT GCC TAA TG	

Nr.	Genname	Exon(s)	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Größe des PCR-Produkts in bp
49	<i>MSH2</i>	1	F	GAA GCT GAT TGG GTG TGG TC	593
50	<i>MSH2</i>	1	R	CTG GCA CGA CGT AAA CAC TC	
51	<i>MSH2</i>	2	F	ATC AGC AGC ATG AAG TCC AG	357
52	<i>MSH2</i>	2	R	AAG TGT CTC AAA CCA TTC TAC TAT CAC	
53	<i>MSH2</i>	3	F	GAG TTG AGA TCG CAC CAT TG	808
54	<i>MSH2</i>	3	R	AAC AGG CTA AAG TTC CAC TCG	
55	<i>MSH2</i>	4	F	AAA ATC TAG CCA AGC ATG GTG	740
56	<i>MSH2</i>	4	R	TGG GCA ACA AAA GTG AAA CTC	
57	<i>MSH2</i>	5	F	CCA AGG AAA ATG AGG GAC TTC	495
58	<i>MSH2</i>	5	R	TGG CCT AGG GAA CAA GTG AG	
59	<i>MSH2</i>	6	F	TGA AAG TTG GTC TTA GGA AGA GG	551
60	<i>MSH2</i>	6	R	GAG TAA TTT ACC CAC GAT TAC ACA C	
61	<i>MSH2</i>	7	F	TGA GCT GAT TTA GTT GAG ACT TAC G	446
62	<i>MSH2</i>	7	R	CAA CGG AGC AAG ACT CCT TC	
63	<i>MSH2</i>	8	F	TTT GGA GAC CTG CTG TAC TAT TTG	359
64	<i>MSH2</i>	8	R	ATC CAC TGT CCA CAA AGG TG	
65	<i>MSH2</i>	9	F	TTC TAA GGT AGA TCC TTG GTT TGG	619
66	<i>MSH2</i>	9	R	GTC ATC ATC TTG GGG ACA GG	
67	<i>MSH2</i>	10	F	CAG GTG CTC ATG GTA ATT GG	599
68	<i>MSH2</i>	10	R	TGC TCT ATG GAA GAA AGC TTG AC	
69	<i>MSH2</i>	11	F	TTG TCC CTA AGG AGT TGT TCG	521
70	<i>MSH2</i>	11	R	GGC CCT AGT GTT TCC TTT CC	
71	<i>MSH2</i>	12	F	GGG TTT TGA ATT CCC AAA TG	462
72	<i>MSH2</i>	12	R	AGA ACT GGG AAT TTT CTC CAT C	
73	<i>MSH2</i>	13	F	AAC CTA CGC GAT TAA TCA TCA G	494
74	<i>MSH2</i>	13	R	CCG TAG CTA CCA TCA ATC ACT C	
75	<i>MSH2</i>	14	F	GTG GCA TAT CCT TCC CAA TG	487
76	<i>MSH2</i>	14	R	GTG AAT TAA GGG GTA AAT GGG TTC	
77	<i>MSH2</i>	15	F	ACA GCA CTG TGT GCC AAG TC	602
78	<i>MSH2</i>	15	R	CTC CTA CTT TGG TAC TTG AAA TCG	
79	<i>MSH2</i>	16	F	TGT GGG AGG AGT TTG AGA CC	468
80	<i>MSH2</i>	16	R	CAT GGG CAC TGA CAG TTA ACA C	
81	<i>MSH6</i>	1	F	GAA GGG GAG CTC AGC AGT TC	724
82	<i>MSH6</i>	1	R	CTC ATT CAA GCC AAC TCT GC	
83	<i>MSH6</i>	2	F	TGC CAG AAG ACT TGG AAT TG	445
84	<i>MSH6</i>	2	R	GCC AGA AGC TTT CAC AAC TG	
85	<i>MSH6</i>	3	F	AAG TAG TCC GCC CAC CTA AG	592
86	<i>MSH6</i>	3	R	TTA CCC TGC CAG TAG GCT TG	
87	<i>MSH6</i>	4/1	F	TGC ACG GGT ACC ATT ATA AAG TC	799
88	<i>MSH6</i>	4/1	R	GAG CAT CCA TGT GGT ACA GC	
89	<i>MSH6</i>	4/2	F	CAC TCT ATG TGC CTG AGG ATT TC	691
90	<i>MSH6</i>	4/2	R	GAG CCG GGT ATC AGA CCT TC	
91	<i>MSH6</i>	4/3	F	TCA GAT GAT CGC CAT TGT TC	692
92	<i>MSH6</i>	4/3	R	TTG TCA GGC ACA ACC ATG AG	
93	<i>MSH6</i>	4/4	F	TTG GTA AGC GGC TCC TAA AG	520
94	<i>MSH6</i>	4/4	R	GCA AGA GCT TGG TCA TAA TCA G	
95	<i>MSH6</i>	4/5	F	GGG ATC ATG GAA GAA GTT GC	759
96	<i>MSH6</i>	4/5	R	AAG AAA GGC CAA AGG GCT AC	
97	<i>MSH6</i>	5	F	TTC CCT TGG CAC TTC TAT GG	588
98	<i>MSH6</i>	5	R	CAG GGA GTA ATT TCC CTT TGC	
99	<i>MSH6</i>	6	F	GAA CCA ACG TAC ATG TGA TTG TG	445
100	<i>MSH6</i>	6	R	GGC AAC AAG AGG GAA ACT CC	
101	<i>MSH6</i>	7	F	CCC GGC CAA TAA TTG CAT AG	383
102	<i>MSH6</i>	7	R	TAT CGG TCT GTG CCA CAA TG	

Nr.	Genname	Exon(s)	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Größe des PCR-Produkts in bp
103	<i>MSH6</i>	8	F	TGG ATG TAC TAA CCG ATG TTG C	485
104	<i>MSH6</i>	8	R	CCT CTG GGA GAT TAG CAA GC	
105	<i>MSH6</i>	9	F	ATT TGA TGG GAC GGC AAT AG	517
106	<i>MSH6</i>	9	R	CAT AGT GCA TCA TCC CTT CC	
107	<i>MSH6</i>	10	F	GCT TGC TAA TCT CCC AGA GG	557
108	<i>MSH6</i>	10	R	CCC ATT TAT GTG TAT TGG TGA CAG	
109	<i>PPM1B</i>	1	F	CAC CTT GTT TCT TCA AGT TGT G	395
110	<i>PPM1B</i>	1	R	TGA GAC AGA GCC TTG GTG TG	
111	<i>PPM1B</i>	2	F	GCA TAG CAA TGT TTC AGT CAA TAA G	417
112	<i>PPM1B</i>	2	R	GAA ACA CTA ACC CAT TTC ACC TC	
113	<i>PPM1B</i>	3	F	TCC TTG CTA AGG AGT ACA AAT GG	471
114	<i>PPM1B</i>	3	R	GAT GCC CAG AAA GTG ACA AC	
115	<i>PPM1B</i>	4	F	AGG AAA TGC TTG TGT TGC TG	851
116	<i>PPM1B</i>	4	R	GCC TAA TTT CTG GCA TAC AAT G	
117	<i>LRPPRC</i>	1+2	F	GGT TAC TCT CAG TTT GAG CCA GAA G	552
118	<i>LRPPRC</i>	1+2	R	TTC GAA CAA ATG GAA CTG CTC	
119	<i>LRPPRC</i>	3+4	F	TGG ATG GGT GAA ATG CTA AAG	726
120	<i>LRPPRC</i>	3+4	R	CAG CTT AAA TGG TTA AGA ACA TTT CC	
121	<i>LRPPRC</i>	5	F	GGG ATC AAA GGG ATT AGT TCT TTC	569
122	<i>LRPPRC</i>	5	R	TGA TCT GCC CAC CTC AGC	
123	<i>LRPPRC</i>	6-9	F	CAT CAT AAT TCC AAA TGG TAC TTA GC	896
124	<i>LRPPRC</i>	6-9	R	TCA AAT CAT CCC CAT GTG TTC	
125	<i>LRPPRC</i>	10-12	F	ATG GGG ATG ATT TGA TTT GC	1180
126	<i>LRPPRC</i>	10-12	R	AAG GTA GAC AAT CTG ATT TCA AAC AC	
127	<i>LRPPRC</i>	13	F	TTG GGC ACA TTG CTT AAT TG	565
128	<i>LRPPRC</i>	13	R	TGG GCA ATG AGA GAG AAA CTC	
129	<i>LRPPRC</i>	14	F	AGG CCC TCT AAA GGC ATC AG	555
130	<i>LRPPRC</i>	14	R	GTC TCC AGG TCC AGC CTT C	
131	<i>LRPPRC</i>	15	F	CAG TGT GTG TAC CAG GCT GAC	596
132	<i>LRPPRC</i>	15	R	TTA CCA AAC CTG TGT GCA TTT C	
133	<i>LRPPRC</i>	16	F	TTG AGG TGG GTG AGT GTC AG	406
134	<i>LRPPRC</i>	16	R	CCC TCC TCC CAT TGG ATT C	
135	<i>LRPPRC</i>	17	F	TCA CAA AAC ATT GCA GTT TTC C	416
136	<i>LRPPRC</i>	17	R	AAC CAA ATG TTT TCA AAT TCC AC	
137	<i>LRPPRC</i>	18+19	F	GTG ATC ATT GTT GCC ATT TCA G	665
138	<i>LRPPRC</i>	18+19	R	AAG CTT CGT TTT AAT GGC TGT C	
139	<i>LRPPRC</i>	20+21	F	TGA CAG CCA TTA AAA CGA AGC	925
140	<i>LRPPRC</i>	20+21	R	TGC CAT TCA AGG TGT AGC TG	
141	<i>LRPPRC</i>	22	F	TAT CAA GGG GCA GAG TCA GG	579
142	<i>LRPPRC</i>	22	R	TCA AGC CTC TTA AAA CAG TTA CCA C	
143	<i>LRPPRC</i>	23	F	ACT GAA GCG TAG AGG CCA AC	431
144	<i>LRPPRC</i>	23	R	AGC ACT GAG CTG TGC AAA TG	
145	<i>LRPPRC</i>	24	F	AGT CAA AGT TGC AGG GAA ATG	526
146	<i>LRPPRC</i>	24	R	AAA TGA CCT CCA AGG CTT CC	
147	<i>LRPPRC</i>	25+26	F	CCC ATT TTA GCT TTG TGG TTT TC	968
148	<i>LRPPRC</i>	25+26	R	CCC CAA CAT TAC TGG GAT TG	
149	<i>LRPPRC</i>	27	F	TGG AAA TTA TCG GCG TCT TC	466
150	<i>LRPPRC</i>	27	R	CTT CCA CAA TGC CCT GTC TC	
151	<i>LRPPRC</i>	28	F	TGC TCA GCC CAT TAA CTT TTG	366
152	<i>LRPPRC</i>	28	R	CCT CTA CCT GAG CCT CTG TTG	
153	<i>LRPPRC</i>	29+30	F	GGG TCA CGG TCA CTT TTG G	663
154	<i>LRPPRC</i>	29+30	R	ATG GAA GGG GAC AAG AAA TAT G	
155	<i>LRPPRC</i>	31	F	TCA GGC ACC ATC CAT TCA G	787
156	<i>LRPPRC</i>	31	R	GTA GCT GAG GCC AAT CAA GC	
157	<i>LRPPRC</i>	32	F	TGC TCA TTT CCA ACT TTG TCA TC	538
158	<i>LRPPRC</i>	32	R	GTG TTA AAT GGA ATG GAA ACT GG	



Nr.	Genname	Exon(s)	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Größe des PCR-Produkts in bp
159	<i>LRPPRC</i>	33	F	CCC TAA ATG GAA CTC ATA TTG TCG	609
160	<i>LRPPRC</i>	33	R	GCA ACT AGC ATC AAC ATT TCC TC	
161	<i>LRPPRC</i>	34+35	F	CAG GGT TTC AGT TGC CTA GTG	668
162	<i>LRPPRC</i>	34+35	R	GCT AGC TGC ACA CCA CAC TG	
163	<i>LRPPRC</i>	36	F	ATT CAC CAA AGC TTG GCA TAG	501
164	<i>LRPPRC</i>	36	R	GGG CTC TCA ATG CAT ACC TG	
165	<i>LRPPRC</i>	37	F	TGG AAT TGC ATT AAC CTG TGG	591
166	<i>LRPPRC</i>	37	R	CCA GGA GCC TGG GAT TCT AC	
167	<i>LRPPRC</i>	38	F	ATG CCG AAT GAG GGA TGT AG	478
168	<i>LRPPRC</i>	38	R	TCA GTC CCT CAA GCC ATC C	
169	<i>LRPPRC</i>	39	F	ATG GGC CTG GCA GTC TTA G	462
170	<i>LRPPRC</i>	39	R	TGA AAC AGA GCA GGG AAA CC	
171	<i>C2orf34</i>	1	F	AGA TGC GAG TAC CGG AAA TG	484
172	<i>C2orf34</i>	1	R	TGA TTC CTC CTC TTG GAT GG	
173	<i>C2orf34</i>	2	F	GAG GCT GCG TGA CAA AGT AAG	764
174	<i>C2orf34</i>	2	R	TTG CCT CAG AAC AAA CAT GG	
175	<i>C2orf34</i>	3	F	TGT GGT TCT GGA AGG TGA TG	808
176	<i>C2orf34</i>	3	R	CCG AAA CAA AGC AAA GAA GG	
177	<i>C2orf34</i>	4	F	TGA TTT TGG TTG TTA CTG TTT TGG	486
178	<i>C2orf34</i>	4	R	TTT CCC CTC TTT CTG TTT TCC	
179	<i>C2orf34</i>	5	F	GCC GTT CTT ACT GCA GAT GG	509
180	<i>C2orf34</i>	5	R	TGG TGC TCC AAC TGT GAT TC	
181	<i>C2orf34</i>	6	F	AAT ACC ATC ATC CGC TGT CAC	503
182	<i>C2orf34</i>	6	R	CCT ACG GAG TTG TAT GCA AGG	
183	<i>C2orf34</i>	7	F	GTG GTG GCT CAT GCC TTT AG	554
184	<i>C2orf34</i>	7	R	AAT CAT CCC CAA CCC AGT G	
185	<i>C2orf34</i>	8	F	TTG TGT TCC AGT CAA ATG TGG	534
186	<i>C2orf34</i>	8	R	TGA CTT TGC TTA GCC GTC AG	
187	<i>C2orf34</i>	9	F	TTA ACA CAT GGC CCA GTC AC	514
188	<i>C2orf34</i>	9	R	CAG AAG GCC AAG GGT AAG AAG	
189	<i>C2orf34</i>	10	F	GCC ATT TGG ATG TGA AAT CG	471
190	<i>C2orf34</i>	10	R	CAA ATA GCT GTT CAG AAG CAA CAC	
191	<i>C2orf34</i>	11	F	AGC TCT GCC TTC TGT CAA GTG	505
192	<i>C2orf34</i>	11	R	GAC AGG TGG AGT CCA TAG CC	
193	<i>PREPL</i>	1	F	GAG AAC CCA CTA CTC TGT AAT CAT ACC	715
194	<i>PREPL</i>	1	R	TCA GAC AGA GTC TCC CTG TCA C	
195	<i>PREPL</i>	2	F	AAT TTT CCC CAT AGT ATT TCT GAA C	554
196	<i>PREPL</i>	2	R	TTA AAG GCC AAA AGC AGT ATA ATC	
197	<i>PREPL</i>	3	F	AGC AGA AGT GGT TTG TAC AGT TG	547
198	<i>PREPL</i>	3	R	CCT GCC AAA GCT TCT GAG TC	
199	<i>PREPL</i>	4	F	GCC ATC ATT GTT GAA AGA AGC	447
200	<i>PREPL</i>	4	R	TGA ATC AGG CAT TCA CCT TC	
201	<i>PREPL</i>	5	F	TTT CCA GGG ATA AAC TTG CAC	562
202	<i>PREPL</i>	5	R	CAG TCT GTT CAC AAT CTA GCA GTT C	
203	<i>PREPL</i>	6	F	TGA CCA CCT CTG AGA TAC TGT CC	424
204	<i>PREPL</i>	6	R	GGT TAT ACA TAG GAA GGT GGC ATC	

Nr.	Genname	Exon	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Größe des PCR-Produkts in bp
205	<i>PREPL</i>	7	F	GAT TGC ATC TCT GGA TGC TG	415
206	<i>PREPL</i>	7	R	CCC TCC TAA ACC CAA GAG TG	
207	<i>PREPL</i>	8	F	AAT GAG GCA TGA CGT GGT AAC	412
208	<i>PREPL</i>	8	R	GTA ACT CCA ACA ACT GCA TGG	
209	<i>PREPL</i>	9	F	GGA CAG CAA GGT AGC TGA AAC	515
210	<i>PREPL</i>	9	R	TTC ACC AGT GCT GGT TTA GG	
211	<i>PREPL</i>	10	F	CAG GCC TCC AGG TGT AGT TC	430
212	<i>PREPL</i>	10	R	CTC AGT TTC CCG AAG TGC TG	
213	<i>PREPL</i>	11	F	AAT TAC AGG CCC TGG TTA AGG	463
214	<i>PREPL</i>	11	R	CAT GAG CAG AGA TGG TGC TG	
215	<i>PREPL</i>	12	F	GGC GCT CTC AAG ATA GCA AG	365
216	<i>PREPL</i>	12	R	GGC AGA TGA TTT GGC TAC AG	
217	<i>PREPL</i>	13	F	GGA ATG GGT CTC GAT CTT CC	398
218	<i>PREPL</i>	13	R	TTC GAG AGA GAG GCA GAA GG	
219	<i>PREPL</i>	14	F	TTG CTG ACT TCA CGG TTA GG	404
220	<i>PREPL</i>	14	R	TCC TAG GTT AAT GGG CAT GTG	
221	<i>SLC3A1</i>	1	F	AAG CAT TCA GCA AGC CAC TC	593
222	<i>SLC3A1</i>	1	R	ACA ACC CAG GCA TAA TTT GG	
223	<i>SLC3A1</i>	2	F	ACA GGC GTG AAC CAC TAC AC	781
224	<i>SLC3A1</i>	2	R	CAA TAC ACT GGG AGG CTA AGG	
225	<i>SLC3A1</i>	3	F	GGT TAC AGG CGT TAG CCA TTA C	416
226	<i>SLC3A1</i>	3	R	CCT GAG TAA ATA ACA ACT GGA AAC C	
227	<i>SLC3A1</i>	4	F	GGA GGG CAA TGA TCT TTA TTT G	378
228	<i>SLC3A1</i>	4	R	CAG GCT TGA TTA TTG CCT ACA C	
229	<i>SLC3A1</i>	5	F	GGT GTG GGA GTC GCT AAA TG	568
230	<i>SLC3A1</i>	5	R	CAG AAC CCT TGT CAC TGA AGG	
231	<i>SLC3A1</i>	6	F	ATG TTT GAG TGT GCG TCT CG	396
232	<i>SLC3A1</i>	6	R	GCC CTG GTA CAA CCA AAC TG	
233	<i>SLC3A1</i>	7	F	TGC AAG ATA AGC AGC TGT GG	394
234	<i>SLC3A1</i>	7	R	TCA CCA AAT AAG GCA GAG GTG	
235	<i>SLC3A1</i>	8	F	CAA GTC CAG GCT TGC TAG TAC C	534
236	<i>SLC3A1</i>	8	R	AAA TGC CCT ACC CAA GAA AC	
237	<i>SLC3A1</i>	9	F	GGT TTA TGT ACC GAA AGT TGA GG	542
238	<i>SLC3A1</i>	9	R	AAG GCC TTA GTA AAG GTC ATT GC	
239	<i>SLC3A1</i>	10	F	CAG AGC ACT GTG CGT ACT TAT TG	923
240	<i>SLC3A1</i>	10	R	TGT TCT GGT CAT CCC TGA TTG	

**Tabelle 12.2** Primer die zur Klonierung von *PNPT1* (human, *E. coli*, Zebrafisch) verwendet wurden.

Nr.	Gen	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Größe in bp	Bemerkungen
241	Humanes <i>PNPT1</i> ohne Stopp	F	AGG GCA CAG CCT GCG TTG	2383	für die TOPO-Klonierung in pcDNA3.1
242		R	CTG AGA ATT AGA TGA TGA CTG		
243	Humanes <i>PNPT1</i> ohne Stopp	F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGA AGG AGA TAG AAC CAT GGC GGC CTG CAG GTA CTG C	2425	Für die Gateway-Klonierung in pDONR221
244		R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTG AGA ATT AGA TGA TGA CTG		
245	Humanes <i>PNPT1</i> ohne Stopp und ohne mitochondriale targeting Sequenz	F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGA AGG AGA TAG AAC CAT GCT ATG GAG TAG CGC AGG GTC	2317	für die Gateway-Klonierung in pDONR221
246		R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTG AGA ATT AGA TGA TGA CTG		
247	Bakterielles ( <i>E. coli</i> ) <i>PNPT1</i> ohne Stopp	F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGA AGG AGA TAG AAC CTT GCT TAA TCC GAT CGT TCG	2209	für die Gateway-Klonierung in pDONR221
248		R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTC GCC CTG TTC AGC AGC CGG		
249	Zebrafisch <i>PNPT1</i> ohne Stopp	F	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGA AGG AGA TAG AAC C ATG AAT GTG TGT GTA TGT GAG AGG	2404	für die Gateway-Klonierung in pDONR221
250		R	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CGG GTC GGC GGG GTT CTG GC		

Tabelle 12.3 Mutageneseprimer

Nr.	Gen	Mutation	F/R	Mutageneseprimer in 5'-3'-Richtung
251	Humanes <i>PNPT1</i>	E475G	F	CAC CAT AAG AGT TAC ATC TGG AGT CCT AGA GTC AAA TGG
252			R	CCA TTT GAC TCT AGG ACT CCA GAT GTA ACT CTT ATG GTG
253	Humanes <i>PNPT1</i>	D135G	F	CTA ACA AGT CGA ATA ATA GGT CGT TCA ATT AGA CCG C
254			R	GCG GTC TAA TTG AAC GAC CTA TTA TTC GAC TTG TTA G
255	Humanes <i>PNPT1</i>	E475D	F	CAC CAT AAG AGT TAC ATC TGA CGT CCT AGA GTC AAA TGG
256			R	CCA TTT GAC TCT AGG ACG TCA GAT GTA ACT CTT ATG GTG
257	Humanes <i>PNPT1</i>	D135E	F	CTA ACA AGT CGA ATA ATA GAA CGT TCA ATT AGA CCG C
258			R	GCG GTC TAA TTG AAC GTT CTA TTA TTC GAC TTG TTA G
259	<i>E. coli</i> <i>PNPT1</i>	E430G	F	GTA CAC CGT ACG TGT TGT GTC TGG AAT CAC TGA ATC CAA C
260			R	GTT GGA TTC AGT GAT TCC AGA CAC AAC ACG TAC GGT GTA C

Tabelle 12.4 Interne Primer zur Sequenzierung von cDNA

Nr.	Genname	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung
261	hPNPT1	R	CCA ACA GGT CCA TTC CAA G
262	hPNPT1	F	TCA ATT AGA CCG CTC TTT CCA G
263	hPNPT1	R	GAA GTC AAA TCC CGA CCA TC
264	hPNPT1	F	CGA GCA TGA CAA AGT TTC CAG
265	hPNPT1	R	TAT TGC TAC GCC TGC AAC AG
266	hPNPT1	F	AAG AGA ACT TGG GCA TGG TG
267	hPNPT1	R	GCT CCT GAT CAT CCT TGC AG
268	hPNPT1	F	GAG CAA AAT TTG TTG GAC CTG
269	<i>E. coli</i> PNPT1	F	GGC TAC TGC CGC TGT TAT GG
270	<i>E. coli</i> PNPT1	F	GAT ATC GTC GCG ATG ATT GG
271	<i>E. coli</i> PNPT1	F	GTA AAC CGC GTT GGG ACT GG
272	<i>E. coli</i> PNPT1	F	GGT CTG GAT GTG CGT ACT GG
273	<i>E. coli</i> PNPT1	F	TGT TGT GTC TGA AAT CAC TG
274	<i>E. coli</i> PNPT1	F	GCT AAA GGT GCG CGT CTG C
275	<i>E. coli</i> PNPT1	F	TGG TAA AGT GAC CCG TAT CG
276	<i>E. coli</i> PNPT1	R	CGT AGG TAC GCT CCT GAT AG
277	zfPNPT1	F	GTG TGT ATG TGA GAG GCT GAG G
278	zfPNPT1	R	GCC GGT CTG CTC TTA CTG AC
279	zfPNPT1	F	TCA GTT CAT GCC GCT TGT GG
280	zfPNPT1	F	CAC CTC AGA AGT GCT GGA GTC
281	zfPNPT1	R	GAC TCC AGC ACT TCT GAG GTG
282	zfPNPT1	F	CCT CTG AAG ATC GTG ATG GAG
283	zfPNPT1	R	TGA TCG TCT CTG CAG GTG TC
284	zfPNPT1	F	GTG ACC ATC AGT CAG GTA GAC G
285	zfPNPT1	F	GTC TCT CGC TCA GAC TCT TGG
286	zfPNPT1	F	TAC ACA GCC ACC ATC ACT GAG
287	zfPNPT1	F	GTC CCG CTC TGA GAT GAA CC
288	zfPNPT1	F	GCT CCC TGA ACC TCG TGA TC
289	zfPNPT1	F	CAA GAT TTC TAG AGA CGA GG
290	zfPNPT1	F	AAG ATC CGT CTG GAG GCC GAG
291	zfPNPT1	F	TGA AGA TCA GCA AGA GGA GC
292	zfPNPT1	F	GAG AAG ATC AGA GAG AAG
293	zfPNPT1	F	AAG GAG ATC TTC AGG AAG C
294	zfPNPT1	F	CCA GTT TGA AGA CAG ACG TG
295	zfPNPT1	F	ACC TCA GCG CTC AGT GGA G

**Tabelle 12.5** RACE-Primer für die Aufklärung des 3'-und 5'-Endes von *PNPT1* im Zebrafisch

Nr.	Primername	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung
296	SP1_R_cDNA-zf- <i>PNPT1</i>	R	TTC TCT GCT GCT GCC TCT ATC
297	SP2_R_cDNA-zf- <i>PNPT1</i>	R	GCC ATT CCA GGG AAT ATC AG
298	SP3_R_cDNA-zf- <i>PNPT1</i>	R	CAT CAG CCG CCA GTA TGT TAC
299	SP4_R_cDNA-zf- <i>PNPT1</i>	R	TCT CGT CTC AGA TGG TTA GTG G
300	SP5_F_cDNA-zf- <i>PNPT1</i>	F	CAT CAA AGA CAC CTG CAG AGA C
301	SP6_F_cDNA-zf- <i>PNPT1</i>	F	TAC ACA GCC ACC ATC ACT GAG

**Tabelle 12.6** RT-PCR Primer für die Aufklärung von *PNPT1* im Zebrafisch

Nr.	Primername	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung
302	zf- <i>PNPT1</i> -F_für_RT	F	GAT GAT GAA GAC TCG CCT CTG
303	zf- <i>PNPT1</i> -R_für_RT	R	AGG ATC CCA CAG AGA TGC TG

**Tabelle 12.7** RT-PCR Primerpaar für den Nachweis, dass der *Splice*-Morpholino zu Exon-Skipping führt

Nr.	Primername	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung
304	zf <i>PNPT1</i> _F16	F	TCC AGT TTG AAG ACA GAC GTG
305	zf <i>PNPT1</i> _R16	R	GGA TGA GCC TCA GAG ATC AGG

**Tabelle 12.8** RT-PCR Primerpaar zum Nachweis der Expression von *PNPT1* in murinen Geweben

Nr.	Primername	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung
306	m <i>PNPT1</i> _ex8-9_F	F	TGT CGT TAA CCC AAC AAG GAG
307	m <i>PNPT1</i> _ex8-9_R	R	GGA TGC CCT GAA TTA TCT GC

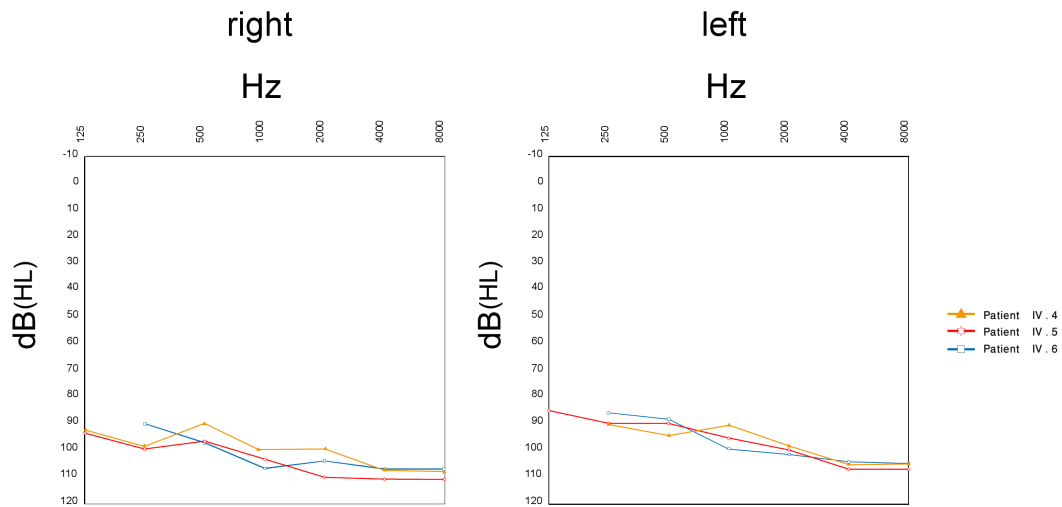
**Tabelle 12.9** Primerpaar zu Verifizierung des *PNPT1*-Knockouts im *E. coli*  $\Delta$ pnp Stamm JW5851

Nr.	Primername	F/R	Sequenz in 5'-3'-Richtung
308	pnp_k12_F2	F	ACC GAT ACC TTC CTG TTC CAC
309	pnp_k12_R2	R	ACC TGC ATG ATC TCT TTG GTG

**Tabelle 12.10** Morpholino-Sequenzen (Kleinbuchstaben geben die *Mismatch*positionen an)

Nr.	Morpholino-Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung
310	zf <i>PNPT1</i> -ATG-MO	GCC TCT CAC ATA CAC ACA CAT TCA T
311	zf <i>PNPT1</i> - <i>Splice</i> -MO	GGA GGA AAC TGT GGA ACA CAC ACT A
312	zf <i>PNPT1</i> - <i>Splice</i> -MO- <i>Mismatch</i>	GGt GcA AAC TcT GcA ACA gAC ACT A

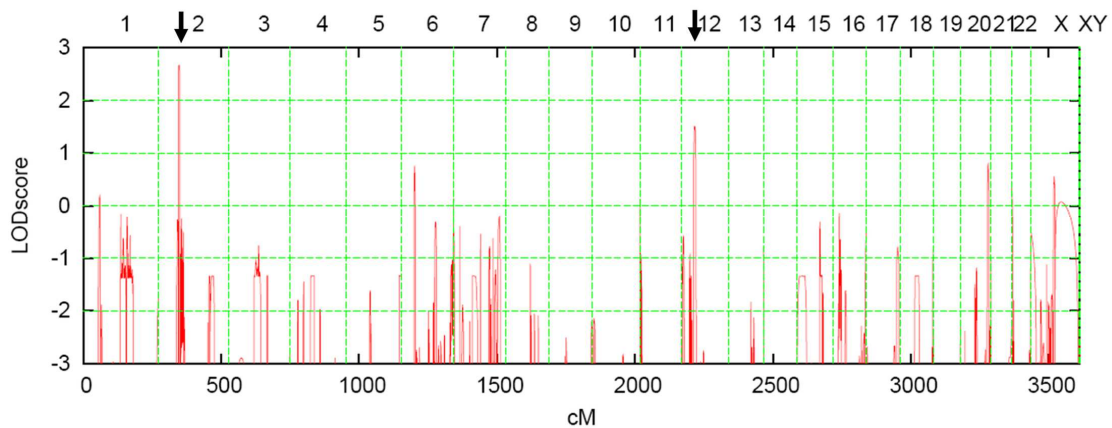
## 12.3 Audiogramme



**Abbildung 12.5 Audiogramme**

Tonaudiogramme von drei betroffenen Familienmitgliedern zeigen schwere Hörstörungen bei allen drei betroffenen Individuen. Untersuchungen wurden durchgeführt in Marokko und organisiert von Kooperationspartnern am Pasteur-Institut in Casablanca.

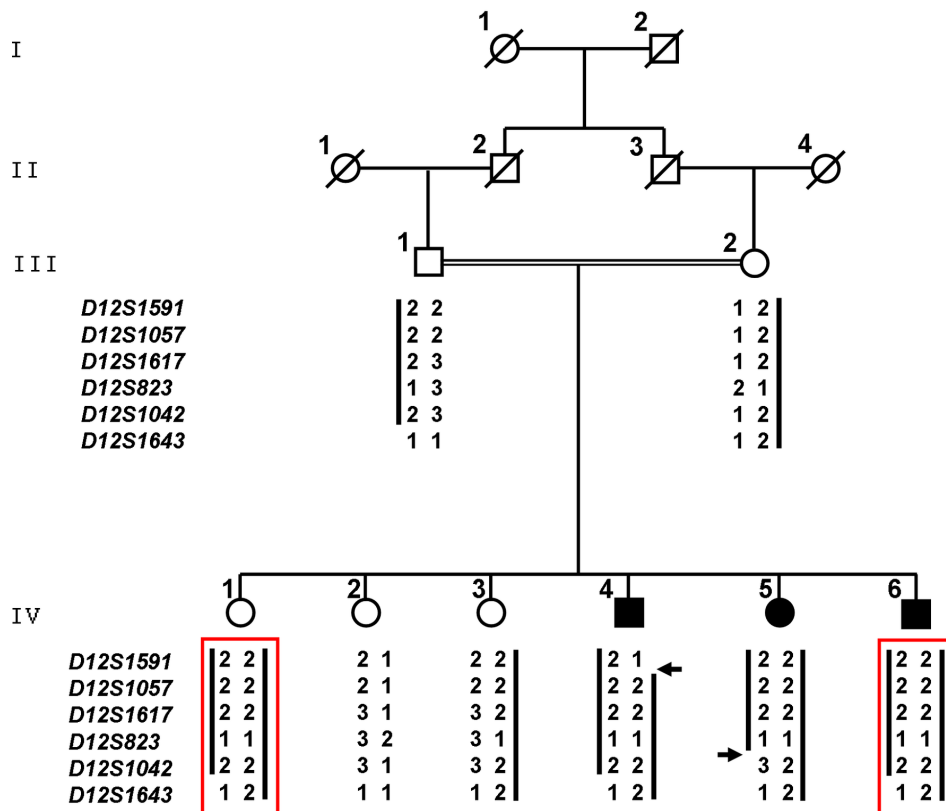
## 12.4 GenomeScan



**Abbildung 12.6 Genome-wide homozygosity mapping**

Für die genomweite Kopplungsanalyse wurden ein *GeneChip Human Mapping 10K array* und ein *GeneChip Scanner System* (beide von Affymetrix) eingesetzt. Genomische DNA von allen acht Familienmitgliedern wurde verwendet. Die Daten wurden mit der Affymetrix Software GDAS3.0 ausgewertet und ergaben zwei putative Loci (schwarze Pfeile) auf Chromosom 2 und 12 mit LOD-Scores von 2,7 bzw. 1,5.

## 12.5 Ausschluss der Region auf Chromosom 12

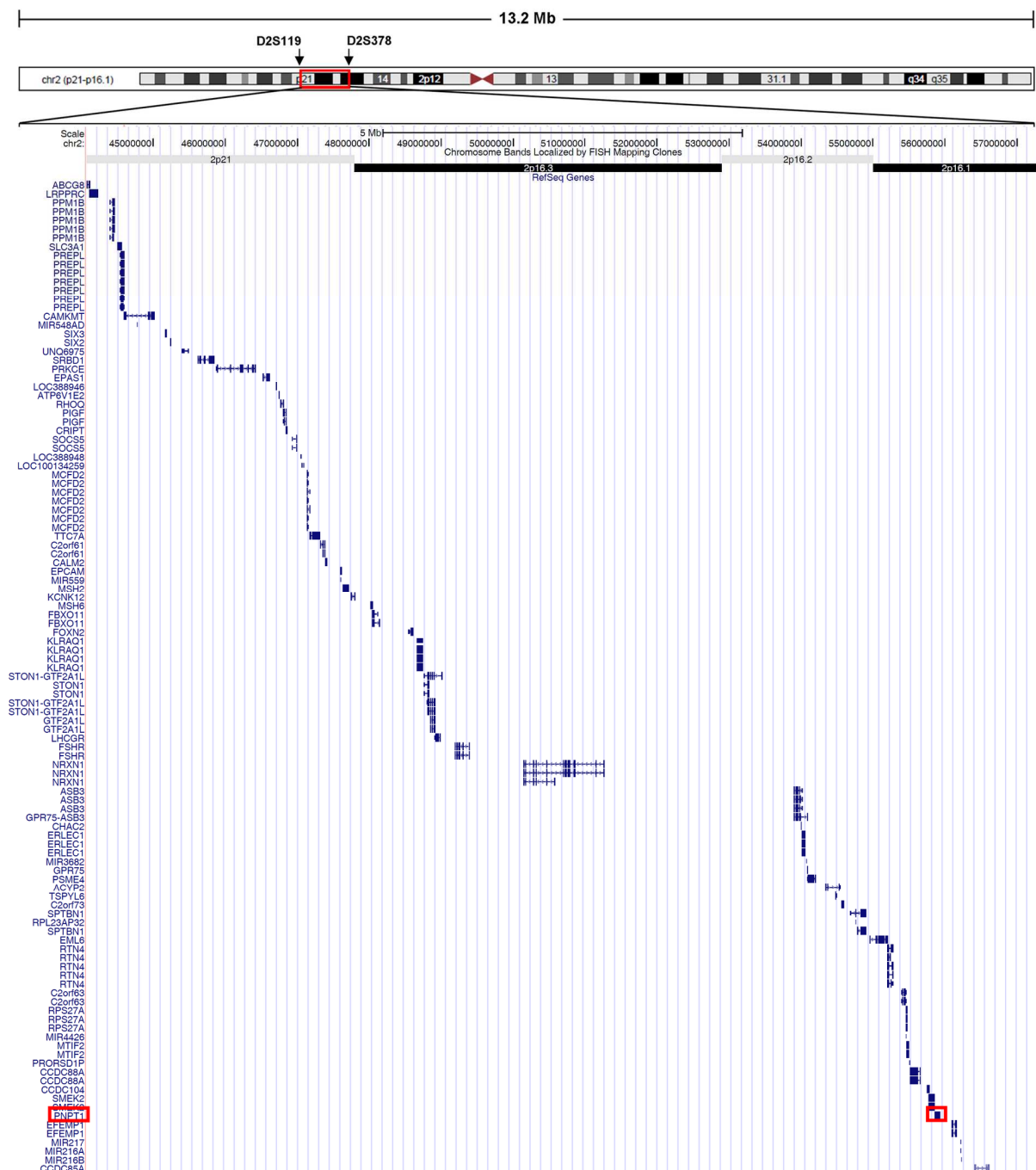


**Abbildung 12.7 Mikrosatelliten Analyse des putativ gekoppelten Locus auf Chromosom 12**

Ausgewählte Mikrosatellitenmarker, die den putativ gekoppelten Locus auf Chromosom 12 abdecken, wurden untersucht. Die Haplotyp-Rekonstruktion ergab, dass das unbetroffene Familienmitglied IV-1 und das betroffene Familienmitglied IV-6 einen identischen Haplotyp (rote Rahmen) haben. Damit konnte diese potentielle Region ausgeschlossen werden.



## 12.6 Übersicht über die gekoppelte Region auf Chromosom 2



**Abbildung 12.8 Übersicht über die gekoppelte Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 2**

Die gekoppelte Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 ist begrenzt durch die Mikrosatellitenmarker *D2S119* (telomerische Grenze) und *D2S378* (centromerische Grenze) und umfasst circa 13,2 Mb. *PNPT1* liegt nahe der centromerischen Grenze (rote Rahmen) der gekoppelten Region. Die Übersicht wurde dem *UCSC Genome Browser* (Version Februar 2009) entnommen.

## 12.7 Gene in der gekoppelten Region auf Chromosom 2

**Tabelle 12.11** Die Tabelle listet alle proteinkodierenden Gene innerhalb der gekoppelten Region auf Chromosom 2 auf, die zwischen den begrenzenden Markern *D2S119* und *D2S378* liegen. Die Informationen wurden über den *UCSC Genome Browser* basierend auf der *Genome Reference Consortium release h37* (Februar 2009) bezogen.

Gen	Anzahl proteincodierender Exons	Position auf chromosome 2
<i>LRPPRC</i>	38	44,113,363-44,223,144
<i>PPM1B</i>	5	44,396,000-44,461,741
<i>SLC3A1</i>	10	44,502,597-44,547,959
<i>PREPL</i>	13	44,545,903-44,586,889
<i>C2orf34</i>	11	44,589,043-44,999,729
<i>SIX3</i>	2	45,169,037-45,172,390
<i>SIX2</i>	2	45,232,325-45,236,542
<i>SRBD1</i>	20	45,615,820-45,838,433
<i>PRKCE</i>	15	45,879,043-46,415,128
<i>EPAS1</i>	16	46,524,563-46,613,835
<i>ATP6V1E2</i>	1	46,738,988-46,747,096
<i>RHOQ</i>	5	46,769,867-46,811,825
<i>PIGF</i>	5	46,808,414-46,844,251
<i>CRIP1</i>	5	46,844,325-46,852,880
<i>SOCS5</i>	1	46,926,099-46,989,926
<i>MCFD2</i>	3	47,129,017-47,142,949
<i>TTC7A</i>	20	47,168,313-47,303,274
<i>CALM2</i>	6	47,387,221-47,403,740
<i>EPCAM</i>	9	47,596,287-47,614,165
<i>MSH2</i>	16	47,630,263-47,710,360
<i>KCNK12</i>	2	47,747,917-47,797,470
<i>MSH6</i>	10	48,010,221-48,034,084
<i>FBXO11</i>	23	48,039,990-48,132,814
<i>FOXP2</i>	5	48,541,795-48,606,434
<i>KLRAQ1</i>	21	48,667,908-48,742,524
<i>STON1</i>	3	48,807,763-48,826,025
<i>GTF2A1L</i>	9	48,844,948-48,960,284
<i>LHCGR</i>	11	48,913,921-48,982,880
<i>FSHR</i>	10	49,189,653-49,381,630
<i>NRXN1</i>	21	50,145,644-51,259,674
<i>ASB3</i>	9	53,897,118-54,014,079
<i>CHAC2</i>	3	53,994,929-54,002,287
<i>ERLEC1</i>	14	54,014,068-54,046,495
<i>GPR75</i>	1	54,080,050-54,087,126
<i>PSME4</i>	46	54,091,204-54,197,977
<i>ACYP2</i>	4	54,342,410-54,532,433
<i>C2orf73</i>	5	54,558,071-54,588,714
<i>SPTBN1</i>	35	54,683,454-54,898,582
<i>EML6</i>	41	54,952,149-55,199,154
<i>RTN4</i>	9	55,199,329-55,277,734
<i>C2orf63</i>	12	55,399,687-55,459,449
<i>RPS27A</i>	5	55,459,635-55,462,748
<i>MTIF2</i>	13	55,463,758-55,496,384
<i>CCDC88A</i>	31	55,514,978-55,647,057
<i>CCDC104</i>	10	55,746,740-55,772,216
<i>SMEK2</i>	15	55,775,515-55,844,796
<i>PNPT1</i>	28	55,861,198-55,921,011
<i>EFEMP1</i>	10	56,093,103-56,150,356
<i>CCDC85A</i>	6	56,411,258-56,613,308



## **ERKLÄRUNG**

Ich versichere, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch und von Herrn Prof. Dr. Thomas Langer betreut worden.

Köln, 17. Oktober 2011

Simon von Ameln