

**Das *OPA1*-assoziierte Behr Syndrom: Ursächliche Mutationen,
Behandlungsstrategien und ein Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
und
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Tobias Bonifert
aus Stuttgart, Deutschland

Februar 2017

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2017

Dekan der Math.-Nat. Fakultät: Prof. Dr. W. Rosenstiel

Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Wissinger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ludger Schöls

Prüfungskommission: Prof. Dr. Bernd Wissinger

Prof. Dr. Ludger Schöls

Prof. Dr. Peter Ruth

PD Dr. Ulrike Zentgraf

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Das OPA1-assoziierte Behr Syndrom: Ursächliche Mutationen, Behandlungsstrategien und ein Mausmodell

selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Angabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den

Datum

.....

Unterschrift

We are not made up, as we had always supposed, of successively enriched packets of our own parts. We are shared, rented, occupied. At the interior of our cells, driving them, providing the oxidative energy that sends us out for the improvement of each shining day, are the mitochondria, and in a strict sense they are not ours.

Lewis Thomas
(1913 – 1993)

Inhalt

I.	Summary	10
II.	Zusammenfassung	14
III.	Synopsis	18
III.1	Mitochondrien	18
III.1.1	Aufbau der Mitochondrien	18
III.1.2	Glykolyse und Fettsäureabbau	20
III.1.3	Oxidative Phosphorylierung: Die Atmungskette	21
III.1.4	Apoptose	23
III.1.5	Mitochondriopathien	24
III.1.6	Fusion und Fission	25
III.1.7	Das OPA1-Protein	28
III.1.8	Das <i>OPA1</i> -Gen	30
III.2	Retinale Ganglienzellen & Autosomal Dominante Optikusatrophie (ADOA)	31
III.2.1	Aufbau der humanen Retina	31
III.2.2	Ursachen pathologischer Optikusneuropathie	33
III.2.3	Die Autosomal dominante Optikusatrophie (ADOA)	34
III.2.3.1	<i>OPA1</i> -assoziierte Optikusneuropathien	35
III.2.3.2	Das <i>OPA1</i> -assoziierte Behr Syndrom	36
III.3	Kanonisches und pathologisches molekulares Spleißen	36
III.3.1	Introns und das Spleißosom	37
III.3.2	Artikel 1: <i>Deep Intronic</i> -Mutationen und ein Intralokus <i>Modifier</i> in <i>OPA1</i> als Erklärung für isolierte und syndromale Optikusatrophien	41
III.4	Antisense Oligonukleotide: Chemische Derivate, Anwendungsgebiete und klinische Erprobungen	45
III.4.1	Artikel 2: Antisense Oligonukleotid-vermittelte Spleißkorrektur einer <i>Deep Intronic</i> -Mutation in <i>OPA1</i>	47
III.5	Gezielte Mutagenese zur Korrektur von Spleißmutationen mittels <i>Genome Editing</i>	50
III.5.1	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen: NHEJ oder HDR?	51
III.5.2	Erzeugung von DNA Doppelstrangbrüchen mit CRISPR/Cas9	52
III.5.3	Unveröffentlichte Ergebnisse: NHEJ als Strategie zur Eliminierung von <i>Deep Intronic</i> -Mutationen	53
III.6	Mausmodelle für <i>OPA1</i> -assoziierte ADOA	57
III.6.1	Artikel 3 (unveröffentlicht): Ein transgenes Mausmodell für das <i>OPA1</i> -assoziierte Behr-Syndrom	59

IV	Diskussion	64
IV.1	Identifikation von <i>Deep Intronic</i> -Mutationen in <i>OPA1</i> – ein häufiger Mechanismus?	66
IV.2	Methodische Erwägungen beim Nachweis von <i>Deep Intronic</i> -Mutationen	67
IV.3	Alu-Elemente als <i>Hot Spots</i> physiologischer und pathologischer Exonisierung	68
IV.4	Therapeutische Maßnahmen zum Ausgleich pathologischer <i>OPA1</i> -Insuffizienz	70
IV.4.1	AC AON und BP AON korrigieren das Fehlspleißen durch c.610+364G>A	70
IV.4.2	Sequenzspezifische Off-Targets und Toxizität der AONs	71
IV.4.3	Zeitverlauf der AON-vermittelten Spleißkorrektur: Implikationen für klinische Translation	72
IV.4.4	Mögliche AON-Korrektur von unproduktiven physiologischen Spleißprozessen	73
IV.4.5	Genom-Editierung der <i>Deep Intronic</i> -Mutation c.610+364G>A	75
IV.5	<i>Compound</i> -heterozygote <i>OPA1</i> -Mutationen und das Behr-Syndrom	76
IV.5.1	Der <i>Modifier</i> p.I437M als Indikator für <i>compound</i> -heterozygote Mutationen in Behr-Patienten	80
IV.5.2	Der <i>Modifier</i> p.I437M im Behr-Mausmodell	80
IV.5.2.1	Der <i>Modifier</i> p.I437M im Behr-Mausmodell: Transgenstabilität und Expression	81
IV.5.2.2	Der <i>Modifier</i> p.I437M im Behr-Mausmodell: Homozygotie für die pathogene c.1065+5G>A Mutation am <i>OPA1</i> -Lokus	81
IV.5.2.3	Der <i>Modifier</i> p.I437M im Behr-Mausmodell: Überexpression ohne Phänotyp	82
IV.6	Resümee	83
V	Danksagung	84
VI	Externe Bildquellen	86
VII	Abkürzungsverzeichnis	88
VIII	Literaturverzeichnis	90
IX	Anhang	104
IX.1	Publikationsbeiträge	104
IX.2	Artikel 1: <i>Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier</i>	106

IX.3	Artikel 2: <i>Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1</i>	128
IX.4	Artikel 3: <i>A Transgenic Mouse Model for OPA1-associated Early-onset Behr Syndrome</i>	142
IX.5	Methodisches Addendum zu Abschnitt III.5	176

I. Summary

Inherited optic neuropathies (IONs) represent a substantial cause of blindness in the European working-age population. Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is a subform of IONs that is mainly caused by mutations in *OPA1*, a nuclear gene encoding a dynamin-related large GTPase imported into mitochondria. Despite considerable technical advances in exon-based sequencing of patient DNA samples and progress in understanding the pathomechanisms underlying ADOA, still around 55 % of all clinically diagnosed cases remain unsolved in genetic testing. As for most other inherited ocular diseases, there is currently no therapy available for ADOA. Herein, a novel genetic pathomechanism is presented, namely deep intronic mutations (DIMs) in *OPA1* that might explain many so far unsolved cases of ADOA. In total four families were identified to harbor one of two distinct DIMs in intron 4b of *OPA1*. Both mutations create new splice acceptor sites that result in exonization of an intronic sequence (cryptic exon), thereby introducing a premature termination codon in the mature mRNA. Such transcripts that induce premature translational arrest are subject to nonsense-mediated mRNA decay (NMD). The sequence of events could be experimentally tracked by qualitative cDNA analyses (demonstrating cryptic exon inclusion), puromycin treatment of patient-derived fibroblasts (proving selective decay of mutant transcripts) and pyrosequencing (showing allelic imbalance on the transcript level in favor of the wildtype allele). Finally, the reduced *OPA1* transcript level correlated with a decreased amount of OPA1 protein as demonstrated by Western blot, further emphasizing haploinsufficiency being a common mode of action in *OPA1*-associated optic neuropathies. In an in vitro proof-of-principle study using patient-derived primary fibroblasts, a rescue of the DIM-induced splicing defect could be demonstrated by transfection of modified antisense oligonucleotides (AON). These were designed to bind the pre-mRNA at either the site of the cryptic splice acceptor (AC AON) or the putative cryptic branch point (BP AON), respectively. The efficacy of restoration of normal splicing of the mutant transcripts correlated with AON concentrations (showing higher efficiency with AC AON) and incubation time, yielding a maximum splice correction of 55 % after four days of treatment with 20 nmol/l of AC AON. AON treatment also elevated OPA1 protein levels and was reproducibly effective in several different patient cell lines. Hence, these experiments represent the first antisense-mediated rescue of a deep intronic mutation in a mitochondriopathy. The half-maximum effect of the splice correction was reached after approximately eight days and then faded over the course of one month. In order to establish a more sustainable therapeutic strategy, a pilot study

was performed using a minigene reporter assay to target the DIM by means of genome editing with CRISPR/Cas9. Here, it could be demonstrated that targeted double strand breaks and thereby induced non-homologous end joining (NHEJ) in the vicinity of the DIM eventually resulted in deletions that encompassed the DIM and thereby restored normal splicing between exons 4b and 5. Hence, these results provide proof-of-principle for a therapeutic approach that aims at eliminating mutated intronic sequences in *OPA1* in order to restore normal gene function.

In family OAK 587, the DIM c.610+364G>A in *OPA1* occurred in trans with an *OPA1* missense variant (p.I437M). This variant does not cause a clinical phenotype per se, neither in heterozygous nor homozygous state, however, if present in trans with a loss-of-function allele it acts as a modifier and exacerbates the clinical outcome resulting in a severe multisystemic disease now called *OPA1*-associated Behr syndrome. This disease, as observed in the three affected siblings in the family OAK 587, is characterized by early-onset optic atrophy, ataxia in the first decade of life and one or several features including peripheral external ophthalmoplegia, spasticities, cerebellar atrophy and additional facultative symptoms and caused by bi-allelic mutations that frequently involve the p.I437M modifier variant.

In order to study the p.I437M substitution at this evolutionary highly conserved residue, the homologous mutation (p.I400M) was introduced into the murine *Opa1* gene on a bacterial artificial chromosome (BAC) via BAC recombineering. This modified construct was injected in fertilized murine egg cells. Eight resulting transgenic founder animals and their offspring were studied in depth on DNA, RNA and protein level, as well as in behavioral tests and in prenatal stages. Using pyrosequencing-based allelic discrimination, the number of transgene copies was determined at the DNA- and RNA-level (1-5 copies). Western blots of whole cell lysates from transgene positive animals showed elevated levels of *OPA1* protein that correlated with the calculated fold change of functional transgene transcripts. In order to mimic the human Behr syndrome phenotype, mice expressing the equivalent of one functional BAC transgene copy were crossbred in a two-step breeding scheme with a well characterized *Opa1*-mouse line carrying a heterozygous truncating allele. Mice with the Behr mimicking genotype were viable but did not display neurological impairment at the investigated time points. Likewise, overexpression of up to six *Opa1* transgene copies did not cause neurological or behavioral impairment, even in old mice. The latter overexpression model will deserve further investigations in terms of its neuroprotective potential for other mitochondriopathies or diseases with distinct mitochondrial pathology including

Morbus Alzheimer and Morbus Parkinson that were shown to benefit from OPA1 overexpression *in vitro*.

In conclusion, this work identified deep intronic mutations as an unprecedented disease mechanism in mitochondriopathies and provided strong evidence that the OPA1-associated Behr syndrome results from bi-allelic *OPA1* mutations with a benign missense and a truncating allele in trans. Furthermore, two therapeutic proof-of-principle studies using antisense oligonucleotides and CRISPR/Cas9 targeting a deep intronic mutation in *OPA1* further emphasize the feasibility of therapeutic interventions for this particular type of mutation. Finally, the first mouse model of strong overexpression of the *Opa1* gene represents a valid model for the evaluation of protective effects of this gene on various common neurodegenerative diseases with mitochondrial pathology.

II. Zusammenfassung

Hereditäre Optikusneuropathien sind eine wichtige Ursache für die Erblindung von Europäern im erwerbsfähigen Alter. Die autosomal dominante Optikusatrophie (ADOA) ist eine Subform der erblichen Optikusneuropathien, die hauptsächlich durch Mutationen in *OPA1* entsteht, einem nukleären Gen, das eine große mitochondrial lokalisierte GTPase aus der Dynamin-Familie kodiert. Trotz bedeutender technischer Fortschritte bei der Exon-basierten Sequenzierung von Patienten-DNA und bei dem Verständnis jener Pathomechanismen die der ADOA zugrunde liegen, sind noch immer etwa 55 % aller klinisch diagnostizierten Fälle genetisch ungelöst. Wie bei den meisten erblichen Augenerkrankungen, ist derzeit keine Therapie für ADOA verfügbar. Die vorliegende Arbeit zeigt einen bislang für Mitochondriopathien nicht beschriebenen Pathomechanismus auf: *Deep Intronic*-Mutationen in *OPA1*. Dieser Mechanismus könnte zahlreiche, derzeit ungelöste Fälle von ADOA erklären. In insgesamt vier Familien konnte jeweils eine von zwei *Deep Intronic*-Mutationen in Intron 4b des *OPA1*-Gens identifiziert werden. Beide Mutationen erzeugen neue Spleißakzeptorstellen, die zu einer Exonisierung intronischer Sequenz führen (kryptisches Exon), wodurch ein vorzeitiges Stopp-Codon in der reifen mRNA entsteht. Transkripte, die einen solchen vorzeitigen Abbruch der Translation bewirken, werden durch den Mechanismus des *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD) abgebaut. Die Abfolge dieser Vorgänge konnte experimentell anhand qualitativer cDNA-Analysen (Spleißen des kryptischen Exons), der Puromycinbehandlung von Patientenfibroblasten (Induktion von NMD durch das vorzeitige Stoppcodon) und Pyrosequenzierung (selektiver Abbau mutanter Transkripte) nachgewiesen werden. Die reduzierten *OPA1*-Transkriptlevels korrelierten schließlich mit einer geringeren Menge an *OPA1* Protein (nachgewiesen mittels Westernblot), was das Modell der Haploinsuffizienz bei *OPA1*-assoziierten Erkrankungen weiter stützt. Im Rahmen einer *in vitro* Studie an Patientenfibroblasten konnte das Fehlspleißen durch Transfektion mit modifizierten Antisense Oligonukleotiden (AON) wiederhergestellt werden. Diese wurden designt, um die *OPA1* prä-mRNA gezielt an der kryptischen Akzeptorstelle (AC AON), bzw. dem vorhergesagten kryptischen Verzweigungspunkt (Branch Point, BP AON) zu binden. Hier korrelierte die Spleißkorrektur der mutanten Transkripte mit den eingesetzten Konzentrationen (bei einer höheren Effizienz des AC AON) und der Inkubationszeit, wobei der höchste gemessene Anteil von 55 % korrekt gespleißter mutanter Transkripte nach vier Tagen Inkubation und einer eingesetzten AON-Menge von 20 nmol/l lag. Die AON-Behandlung erhöhte auch das *OPA1* Protein-Level und war

vergleichbar effektiv in mehreren unterschiedlichen Patientenzelllinien. Damit repräsentieren die vorliegenden AON-Experimente die erste Antisense-basierte Spleißkorrektur einer *Deep Intronic*-Mutation in einer Mitochondriopathie. Der halbmaximale Effekt der Spleißkorrektur wurde nach etwa acht Tagen erreicht und nahm im Verlauf eines Monats weiter ab. Um eine Strategie für länger anhaltende therapeutische Effekte zu etablieren, wurde in einem Pilotversuch die *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A in einem *Minigene* Reporter-Assay durch CRISPR/Cas9-vermitteltes Genome Editing angesteuert. Es konnte gezeigt werden, dass die hierbei präzise generierten Doppelstrangbrüche in der Nähe der *Deep Intronic*-Mutation durch nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (*Non-homologous End Joining* = *NHEJ*) von der Zelle repariert werden, wobei Deletionen entstehen, die auch den kryptischen Akzeptor umfassen und dadurch das normale Spleißen zwischen den Exons 4b und Exon 5 wiederherstellen. Folglich zeigt diese Studie in einem „*Proof-of-principle*“ auf, dass die Deletion intronischer Sequenz in bestimmten Fällen zu einer Wiederherstellung der Genfunktion in *OPA1* führen könnten.

In Familie OAK 587 trat die *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A in trans zu einer *OPA1* Missense Variante (p.I437M) auf. Diese Variante ist weder homozygot noch heterozygot pathogen, wirkt jedoch, sobald sie in trans zu einer Loss-of-Function Mutation auftritt, als *Modifier* und erschwert die Erkrankung hin zu einem komplexen syndromalen Krankheitsbild, dem *OPA1*-assoziierten „Behr Syndrom“. Wie bei den erkrankten Geschwistern der Familie OAK 587 beschrieben, ist das Behr Syndrom charakterisiert durch eine frühkindlich einsetzende Optikusatrophie, Ataxie in der ersten Lebensdekade und zusätzliche fakultative Symptome wie periphere externe Ophthalmoplegie, Spastiken sowie zerebelläre Atrophie (unter anderem), ausgelöst durch bi-allelische *OPA1* Mutationen (häufig unter Beteiligung des p.I437M *Modifiers*).

Um die p.I437M-Substitution an dieser hochkonservierten Aminosäureposition zu untersuchen, wurde die homologe Mutation p.I400M in das murine *Opa1*-Gen auf einem *Bacterial Artificial Chromosome (BAC)* mittels *BAC-Recombineering* inseriert. Das modifizierte Konstrukt wurde in befruchtete murine Eizellen injiziert. Acht transgene *Founder*-Tiere und deren Nachkommen wurden auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene, sowie durch Verhaltenstest und in Pränatalstadien eingehend untersucht. Durch Anwendung eines Pyrosequenzierungs-Assays zur allelischen Diskriminierung wurde die Zahl der Transgen-Kopien auf DNA- und RNA-Ebene bestimmt (1-5 Kopien). Westernblot-Analysen mit Lysat von unterschiedlichen Geweben transgenpositiver Tiere belegen eine Korrelation zwischen erhöhten *OPA1* Proteinlevels und der jeweils entsprechend erhöhten Menge intakter mRNA-Transkripte. Um den bei Patienten

beobachteten Phänotyp des Behr Syndroms genetisch nachzuvollziehen, wurden Tiere, die das Äquivalent einer funktionellen Transgenkopie exprimierten, in einem zweistufigen Verpaarungsschema mit einer bereits gut charakterisierten *Opa1*-Mauslinie verpaart, die ein heterozygoten *Loss-of-Function* Allel trägt. Obwohl die resultierenden Mäuse mit entsprechendem Behr-Genotyp lebensfähig waren, zeigten sie zu keinem der beobachteten Zeitpunkte neurologische Beeinträchtigungen. In gleicher Weise zeigten auch Tiere mit bis zu sechs Transgenkopien keine neurologischen oder behavioralen Auffälligkeiten, selbst in hohem Alter. Letzteres Mausmodell repräsentiert damit eine wichtige Plattform für die Untersuchung von Neuroprotektion bei verschiedenen Mitochondriopathien und Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung, darunter Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, für die bereits in vorangegangenen *in vitro* Studien eine mögliche positive Wirkung durch eine OPA1 Überexpression gezeigt wurde.

Zusammenfassend identifiziert die vorliegende Arbeit erstmals *Deep Intronic*-Mutationen als Pathomechanismus in Mitochondriopathien und liefert Beweise für das Modell des *OPA1*-assoziierten Behr-Syndroms als bi-allelischer Erkrankung, bestehend aus einer benignen Missense-Mutation und einem trunkierenden Allel in trans. Darüber hinaus unterstreichen die Pilotstudien zur Ansteuerung von *Deep Intronic*-Mutationen in *OPA1* mittels Antisense Oligonukleotiden und CRISPR/Cas9 die Durchführbarkeit therapeutischer Interventionen für diese Art von Mutation. Schließlich repräsentiert das erste Mausmodell mit starker *OPA1*-Überexpression einen wichtigen Ausgangspunkt zur Untersuchung der neuroprotektiven Effekte dieses Gens auf weitere Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung.

III. Synopsis

III.1 Mitochondrien

Komplexes Leben ist untrennbar verbunden mit der korrekten Funktion von kleinen subzellulären Organellen: den Mitochondrien. Die Hauptfunktion dieser molekularen Kraftwerke besteht in der Bereitstellung chemischer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). In höheren Eukaryonten initiieren Mitochondrien zudem den programmierten Zelltod (Apoptose), sorgen u.a. für die zelluläre Calcium-Homöostase, die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern (v.a. für Enzyme der Atmungskette) und den Abbau von Fettsäuren (β -Oxidation, in tierischen Zellen). Auch der Citratzyklus sowie die Biosynthese von Aminosäuren, Pyrimidinen und Porphyrinen sind mitochondrial lokalisiert.

III.1.1 Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien stellen ein myzelartig verzweigtes, sich dynamisch veränderndes Zellorganell dar, welches durch zwei Membransysteme, der äußeren mitochondrialen Membran (*Mitochondrial Outer Membrane = MOM*) und der inneren mitochondrialen Membran (*Mitochondrial Inner Membrane = MIM*) weiter strukturiert wird (siehe Abbildung 1). Die MOM verankert u.a. Proteine für die Interaktion mit dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Cytoskelett (für die bedarfsgerechte subzelluläre Lokalisation (Siehe III.1.6)). Den größten Anteil an MOM-Proteinen bilden allerdings Porin-Komplexe (Linden et al 1984), welche die MOM für Ionen, ATP und andere kleine Metabolite permeabel machen. Größere Proteine, die nach ihrer Synthese an den cytosolischen Ribosomen für das Innere der Mitochondrien bestimmt sind, können an der MOM anhand ihrer mitochondrialen Erkennungssequenz (*Mitochondrial Targeting Sequence = MTS*) von einem Rezeptor des TIM/TOM-Komplexes (*Translocase of the Inner/Outer Membrane*) erkannt werden. Dieser Komplex besteht aus 19 Proteinen, darunter mehreren Chaperonen (u.a. HSP70 und HSP60). Letztere sind erforderlich, da native Proteine aus dem Cytosol während des mitochondrialen Imports entfaltet werden und den Intermembranraum (*Intermembrane Space = IMS*) als Polypeptidkette erreichen.

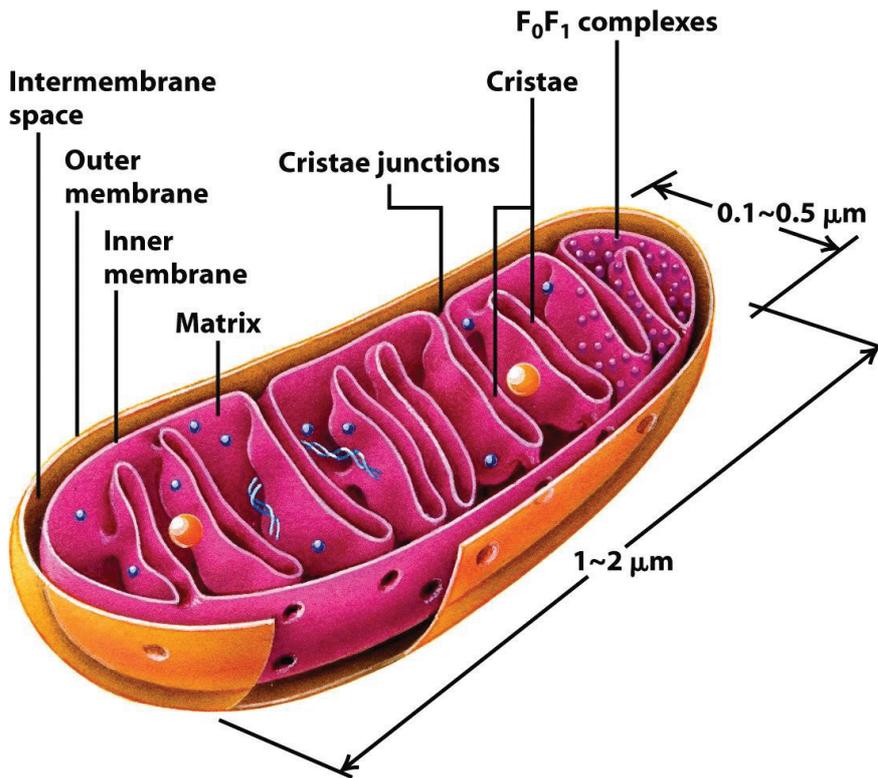


Abbildung 1 Aufbau eines Mitochondriums

Die innere und die äußere mitochondriale Membran sind durch den Intermembranraum getrennt. Die innere Membran bildet Einstülpungen (Cristae), welche durch die *Cristae Junctions* vom Intermembranraum abgegrenzt werden. Die Atmungskettenkomplexe sind in der inneren Membran verankert, die den Matrixraum begrenzt. Dieser enthält u.a. die mtDNA.

Der IMS trennt die MOM und die MIM. Letztere bildet eine komplexe Struktur mit einer teils stark gefalteten Oberfläche. Diese Invaginationen der MIM werden Cristae genannt. Die schlauchartigen Einstülpungen vergrößern die Oberfläche der MIM und bieten dadurch mehr Verankerungsfläche für die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe (siehe III.1.3). Durch die distal zum IMS gelegenen *Cristae Junctions* erfolgt zudem eine Regulation des Cytochrom C-Ausstroms im Zusammenhang mit der Aktivierung proapoptotischer Signalkaskaden (siehe III.1.4). Die MIM begrenzt nach innen die mitochondriale Matrix. Innerhalb des Matrix-Raumes befinden sich zahlreiche Enzyme, die an der β -Oxidation von Fettsäuren und der Oxidation von Pyruvat unter Bildung von Reduktionsäquivalenten (FADH^+ und NADH^+) für die Atmungskette beteiligt sind. Darüber hinaus enthält die Matrix das mitochondriale Genom (mtDNA). Dieses repräsentiert ein evolutionäres Relikt und weist auf den bakteriellen Ursprung dieses Organells hin. Laut der Endosymbiontentheorie traten vor ca. zwei Milliarden Jahren ein proto-eukaryontisches methanbildendes Archaeon und ein α -Proteobakterium in Symbiose, wobei im Laufe der Evolution zahlreiche Gene und damit biochemische Funktionen des symbiontischen α -Proteobakteriums verloren gingen, oder in den

Nukleus transferiert wurden (Moreira & Lopez-Garcia 1998). Dennoch blieben die Mitochondrien semiautonom. Sie enthalten und replizieren ein eigenes Genom (beim Menschen ein ringförmiges, 16.569 bp großes doppelsträngiges DNA-Molekül) und unterhalten einen eigenen Proteinbiosyntheseapparat. Die humane mtDNA kodiert insgesamt 37 Gene. Mutationen in diesen Genen sind Ursache für verschiedene, maternal vererbte Mitochondriopathien (siehe III.1.5). 24 dieser Gene kodieren für Komponenten der Translationsmaschinerie (22 tRNAs, 2 rRNAs); die restlichen 13 Gene kodieren für Proteine, die Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe darstellen. Alle übrigen Matrixproteine gelangen durch den Import über den TIM/TOM-Komplex an ihren Zielort.

III.1.2 Glykolyse und Fettsäureabbau

Glukose repräsentiert den universellen „Treibstoff“ für die Energiegewinnung in eukaryontischen Zellen. Im Rahmen der so genannten Glykolyse bilden insgesamt zehn Enzyme eine Kaskade, welche die Umwandlung von jeweils einem Molekül Glukose in zwei Moleküle Pyruvat katalysiert. Pyruvat gelangt anschließend über die Porinkomplexe der MOM in den IMS und von dort über den MIM-ständigen Pyruvat-Transporter (*Mitochondrial Pyruvate Carrier* = MPC), der aus den Proteinen MPC1 und MPC2 besteht, in die Matrix (Bricker et al 2012). Dort angekommen wird Pyruvat in Acetyl-CoA umgewandelt, welches als Ausgangssubstrat für den Citratzyklus dient. Einen ähnlichen Weg wie das Pyruvat gehen Fettsäuren, die in mehreren Schritten cytosolisch aufbereitet werden und anschließend mittels Antiporter durch die MIM in die Matrix geschleust werden. Hier finden weitere Umwandlungen statt, die letztendlich ebenfalls Acetyl-CoA generieren. Die nachfolgende zyklische Enzymkaskade metabolisiert Acetyl-CoA zu CO₂, wobei die intermediären Energieträger Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Guanosintriphosphat (GTP) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) gebildet werden. Eine schematische Übersicht über die Glykolyse und den Citratzyklus ist in Abbildung 2 dargestellt.

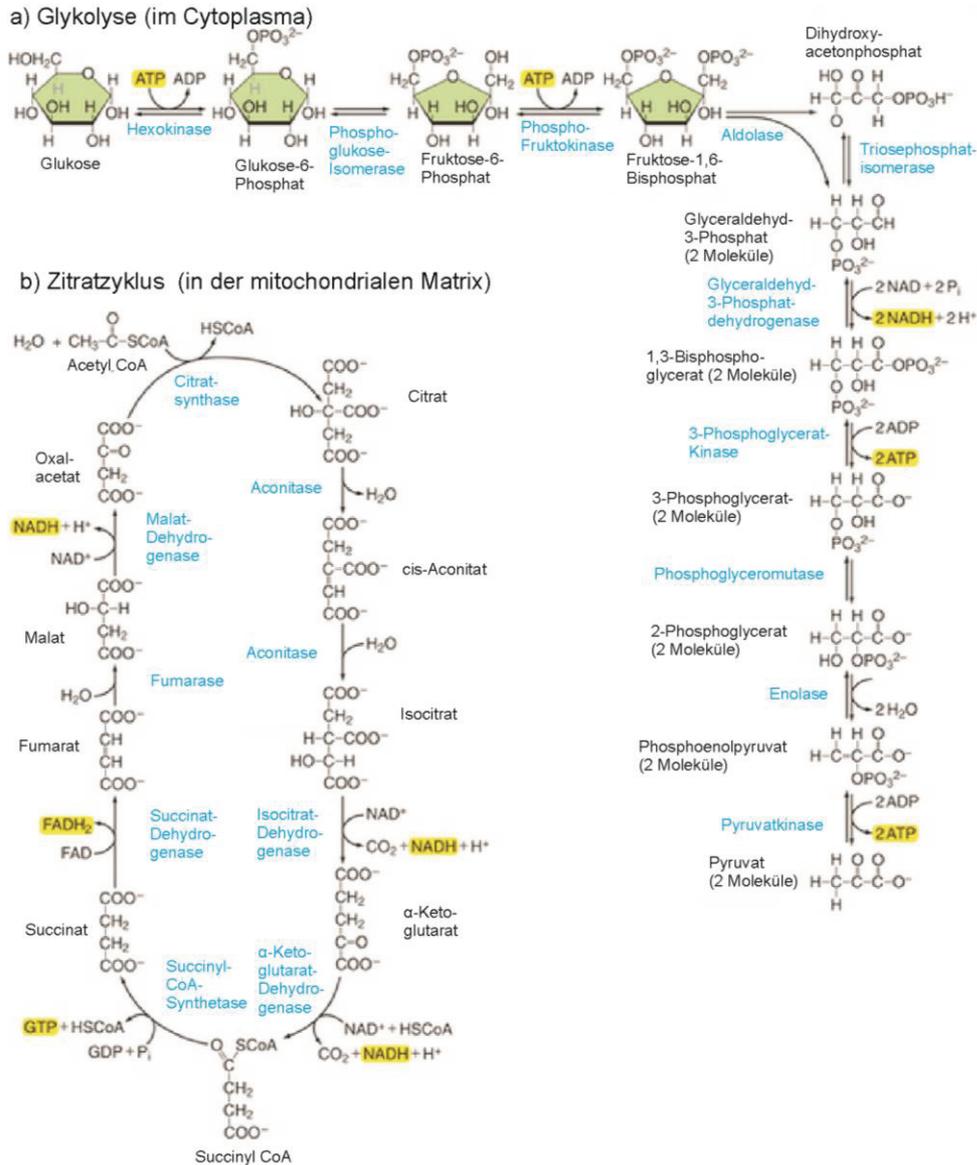


Abbildung 2 Glykolyse und Zitratzyklus

a) Glykolyse: Im Cytosol der Zelle wird Glukose durch eine Reaktionskette aus zehn Enzymen in Pyruvat umgewandelt. Dabei wird ATP und NADH freigesetzt. Pyruvat wird anschließend in die Matrix der Mitochondrien transportiert und dort in Acetyl-CoA umgewandelt. b) Zitratzyklus: metabolisiert Acetyl-CoA zu CO₂ unter Aktivierung von intermediären Energieträgern.

III.1.3 Oxidative Phosphorylierung: Die Atmungskette

Die beim Zitratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente NADH+H⁺ und FADH₂ sowie das Zwischenprodukt Succinat treiben eine Elektronentransportkette an, die aus zwei mobilen Transportern und vier großen Enzymkomplexen in der MIM besteht und die Erzeugung eines Protonengradienten über die MIM zur Aufgabe hat (siehe Abbildung 3). Insgesamt konstituieren etwa 90 Untereinheiten die vier Enzymkomplexe der humanen mitochondrialen Atmungskette (Komplex I-IV) und der ATP-Synthase (gelegentlich als Komplex V bezeichnet) wobei lediglich 13 von der mtDNA kodiert werden: ND1-ND6

und ND4L als Bestandteile von Komplex I, Cytochrom B in Komplex III, COI-COIII in Komplex IV und ATP8 sowie ATP6 in Komplex V (Larsson & Clayton 1995).

Die NADH-Coenzym-Q-Reduktase (Komplex I) oxidiert $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ , wobei vier Protonen (H^+) entgegen dem chemiosmotischen Gradienten in den IMS „gepumpt“ werden (siehe Abbildung 3). Die zugehörigen Elektronen führen über den Kofaktor FMN und ein Eisen-Schwefel-Cluster schließlich zur Reduktion von Coenzym Q ($\text{CoQ} \rightarrow \text{CoQH}_2$). Coenzym Q ist ein lipophiles Carrier-Molekül, das lateral zwischen den Komplexen I und III, bzw. II und III pendelt. Hierbei bewirken die Komplexe I und II (Succinat-CoQ-Reduktase) jeweils die Reduktion von CoQ (bei Komplex II als Folge der Umwandlung von Succinat zu Fumarat im Rahmen des Citratzyklus), während Komplex III (CoQH₂-Cytochrom-C-Reduktase) die Oxidation von CoQH₂ bewirkt.

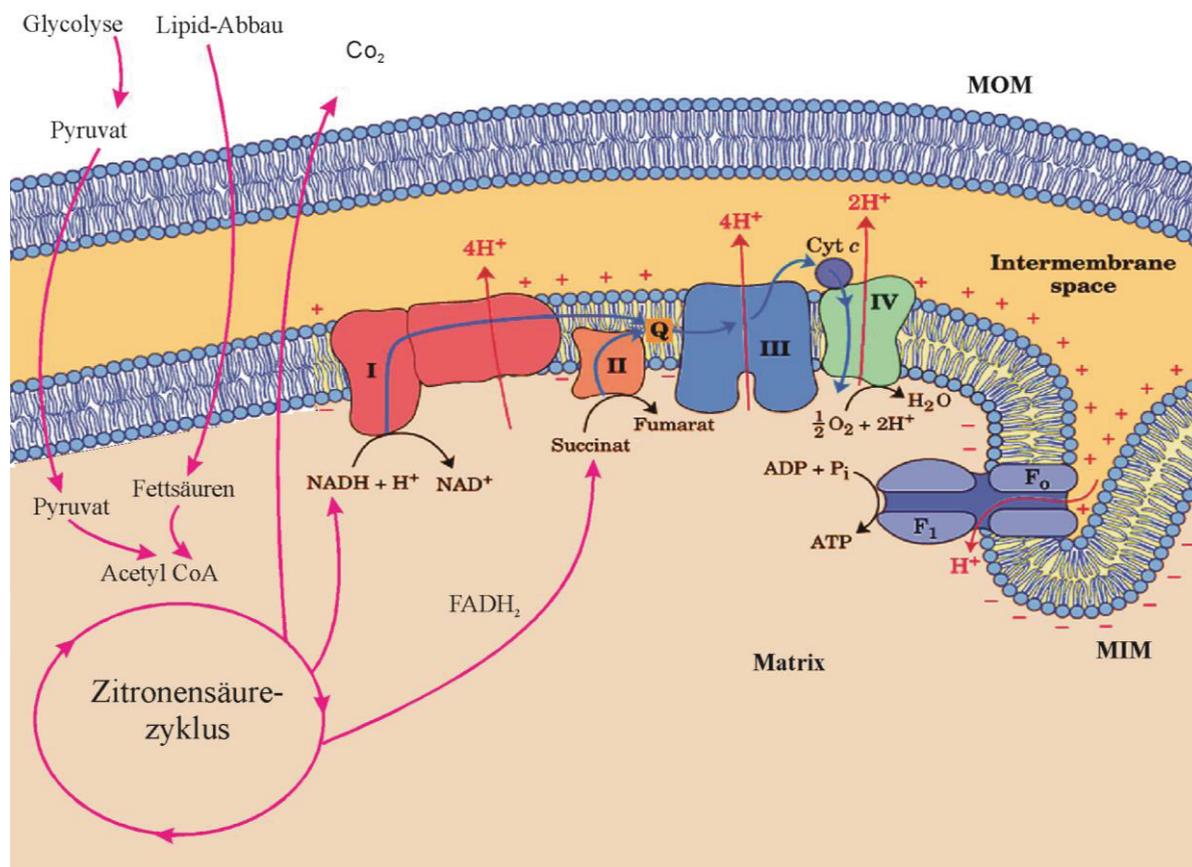


Abbildung 3 Die mitochondriale Atmungskette

Die intermediären Energieträger NADH und FADH₂ des Citratzyklus treiben den Elektronentransport der Atmungskette in der MIM an. An der oxidativen Phosphorylierung sind die Komplexe I, II, III und IV sowie die mobilen Carrier Coenzym Q (Q) und Cytochrom C (Cyt C) beteiligt. Der Protonenrückstrom durch Komplex V (die F₀F₁-ATP-Synthase), dient der Synthese von ATP.

CoQ und abgeleitete Substanzen (z.B. Idebenone (Barboni et al 2013)) werden auch für die Therapie von Mitochondriopathien, insbesondere bei Defekten der oxidativen Phosphorylierung eingesetzt (siehe Abschnitte III.1.5 und IV.4). Komplex III pumpt

insgesamt weitere vier Protonen in den IMS, wobei frei werdende Elektronen auf den wasserlöslichen, mobilen Transporter Cytochrom C übertragen werden. Cytochrom C pendelt zwischen den Komplexen III und IV (Cytochrom-C-Oxidase), wobei die Weitergabe der Elektronen an Komplex IV letztendlich zur Bildung von H₂O und der Freisetzung zweier weiterer Protonen in den IMS führt (zur Rolle von Cytochrom C in der Apoptose siehe III.1.4).

Der so generierte Protonengradient erzeugt ein Membranpotenzial zwischen IMS und Matrixraum, welches die ATP-Synthase antreibt. Dieser teilweise rotierende Enzymkomplex nutzt die Energie des Protonenrückstroms in Richtung Matrix, um aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat Adenosintriphosphat (ATP) zu synthetisieren. Der anschließende mitochondriale Export von ATP aus der mitochondrialen Matrix in Richtung Cytosol erfolgt als gekoppelter Transport/Antiport: Ein Phosphattransporter tauscht Hydroxidionen aus der Matrix gegen Hydrogenphosphat aus dem IMS. Die Hydroxidionen reagieren außerhalb der MIM mit den exportierten Protonen der Atmungskette zu H₂O. Gleichzeitig tauscht der ATP/ADP-Antiporter ADP-Moleküle des IMS gegen ATP aus der Matrix aus. Der kombinierte Transport/Antiport sorgt somit für einen kontinuierlichen ATP-Export und ADP- und Phosphat-Import durch die MIM.

III.1.4 Apoptose

Cytochrom C ist ein so genanntes *Moonlighting*-Protein, das mehrere unterschiedliche biologische Funktionen aufweist. Neben seiner Aufgabe als Elektronentransporter von Komplex III zu Komplex IV in der Atmungskette (siehe III.1.3), ist Cytochrom C auch von zentraler Bedeutung für die Vermittlung der Apoptose, da sein Ausstrom ins Cytosol Enzymkaskaden antreibt, die in den programmierten Zelltod münden.

Die Entscheidung einer Zelle zwischen Proliferation, stationärer Phase und initiiertem Zelltod unterliegt einem dynamischen Gleichgewicht von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Faktoren. Die Apoptose kann von außerhalb (extrinsisch) und von innerhalb der Zelle (intrinsisch) induziert werden. Der intrinsische Weg führt über die Aktivierung von Vertretern der *BH3-only* Familie zur Rekrutierung der Bcl-2-Proteine BAX und BAK an die MOM (Scorrano & Korsmeyer 2003). Diese oligomerisieren und ermöglichen einerseits den Einstrom von Anionen aus dem Cytosol in den IMS und führen andererseits zur Bildung von Poren in der MOM, ein Vorgang der als MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) bezeichnet wird (Green & Kroemer 2004). Der Anionen-Einstrom bewirkt eine Depolarisation der MIM, gefolgt von einer

Öffnung der *Cristae Junctions* (Siehe III.1.1) und der Freisetzung von Cytochrom C aus der MIM in den IMS. Anschließend strömt Cytochrom C mit Hilfe der MOMP aus dem IMS in das Cytosol. Dort bindet Cytochrom C den *Apoptotic Protease-Activating Factor 1* (APAF-1), welcher daraufhin zu einem ringförmigen Heptamer oligomerisiert (Apoptosom) und die Caspasen 9, 3 und 7 rekrutiert. Diese Proteasen führen zur Spaltung weiterer Zielproteine und damit letztlich zum kontrollierten Absterben/Untergang der Zelle, wobei der Zellkern aufgelöst, die DNA geschnitten, das Chromatin kondensiert, das Cytoskelett abgebaut, die Translation gestoppt sowie die Mitochondrien fragmentiert werden. Die apoptotische Zelle zerfällt zuletzt in kleine Vesikel, die *apoptotic blebs*, die überwiegend durch Phagozytose benachbarter Zellen entfernt werden (Lodish 2007).

III.1.5 Mitochondriopathien

Können Mitochondrien nicht mehr ihren Aufgaben nachkommen, so kann es zu zellulären Fehlfunktionen oder dem Absterben der betroffenen Zellen kommen. Solche mitochondrialen Funktionsstörungen können dabei extrinsisch ausgelöst werden, z. B. durch virale Infektionen, Medikamente und toxische Substanzen, oder intrinsisch im Zusammenhang mit monogenen oder komplexen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer (Coskun et al 2012), Morbus Huntington (Mochel & Haller 2011) und kardiovaskulären Erkrankungen (Rosca & Hoppel 2010).

Monogene Mitochondriopathien werden durch Mutationen in einzelnen Genen ausgelöst. Von den etwa 1700 Genen, die für mitochondrial lokalisierte Proteine kodieren (MitoProteome.org, Stand 02/2016), konnten bislang über 240 mit hereditären Mitochondriopathien in Zusammenhang gebracht werden (Koopman et al 2012). Bei den meisten der beschriebenen mitochondrialen Erkrankungen handelt es sich um syndromale Krankheitsbilder, was angesichts der ubiquitären Präsenz der Mitochondrien nicht überraschend ist. Trotz der großen phänotypischen Bandbreite der Mitochondriopathien, treten allerdings neurologische und myopathische Symptome gehäuft auf (Chinnery 2000). Bei den Mitochondriopathien muss unterschieden werden zwischen Erkrankungen, die durch Mutationen in nukleären Genen verursacht sind und entsprechend den klassischen Erbgängen (autosomal dominant, autosomal rezessiv und X-chromosomal) vererbt werden und solchen, die durch Mutationen in der mtDNA verursacht werden und deshalb strikt maternal vererbt werden. Bei Letzteren ist auch der relative Anteil mutanter mtDNA-Kopien (Homoplasmie vs. Heteroplasmie) in den verschiedenen Geweben und Organen von entscheidender Bedeutung hinsichtlich

Penetranz und klinischer Expression der Erkrankung (Ballana et al 2008, Chinnery et al 2001). Obwohl ein Großteil der neurodegenerativen Manifestationen in Mitochondriopathien letztlich als Konsequenz eines biochemischen ATP-Mangels angesehen werden können, müssen die mutationsbedingt initial betroffenen mitochondrialen Proteine nicht notwendigerweise Teil der Atmungskette sein: Während zwar bei der Leberschen hereditären Optikusneuropathie (LHON) primär Untereinheiten des Atmungsketten-Komplexes I betroffen sind (MT-ND1, MT-ND4 und MT-ND6), können Mutationen, die die mtDNA-Integrität oder -Replikation beeinträchtigen (z. B. *Polymerase Gamma* (POLG)) ebenfalls zu schweren neurologischen Syndromen führen (Milone & Massie 2010). Auch Mutationen in Genen für mitochondriale tRNAs (Goto et al 1990, Shoffner et al 1990) und Genen für molekulare Chaperone (siehe III.1.1) wurden im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben (Ogilvie et al 2005). Ein weiteres Feld mitochondrialer Proteine, deren Mutation zu teils erheblichen Beeinträchtigungen der Patienten führt, betrifft die dynamische Architektur des Organells.

III.1.6 Fusion und Fission

Mitochondrien sind wandlungsfähige Zellorganelle, die ein vielfach verzweigtes Retikulum bilden, welches sich durch Spaltungs- und Fusionsprozesse dynamisch verändert. Ein Mitochondrium kann sowohl die eigene Teilung (Fission) als auch die Verschmelzung (Fusion) mit anderen Mitochondrien der gleichen Zelle einleiten. Als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung (siehe III.1.3) entstehen kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species* = ROS), die umliegende Lipide, Proteine und DNA (v. a. mtDNA) schädigen (Balaban et al 2005). Eine zentrale Rolle der mitochondrialen Fission in postmitotischen Zellen besteht daher in der Abspaltung von irreparabel beschädigten mitochondrialen Kompartimenten, die nachfolgend mittels Mitophagie abgebaut werden. Darüber hinaus ermöglicht die gezielte mitochondriale Fission eine gleichmäßige Aufteilung des Organells auf beide Tochterzellen nach der Mitose (Taguchi et al 2007), bzw. einen bedarfsgesteuerten intrazellulären Transport an Bereiche mit hohem Energieverbrauch (z. B. an die Ranvier-Schnürringe in Neuronen) (Chiu 2011). Unkontrolliert ablaufende Fissionsprozesse würden zu einem stark fragmentierten mitochondrialen Netzwerk mit eingeschränkter Funktionalität führen. Unter physiologischen Bedingungen bilden Fissions- und Fusionsprozesse daher ein dynamisches Gleichgewicht. Die Fusion von Mitochondrien erlaubt die Vereinigung und den Austausch von Metaboliten, sowie von unbeschädigten mtDNA Kopien. Gleichzeitig

sind filamentöse Mitochondrien weniger anfällig für eine stressbedingt ansteigende Mitophagieaktivität und erzeugen ein stabileres Membranpotenzial (Twig & Shirihai 2011). Fusionsprozesse können auch als Zwischenschritt dienen, um leicht geschädigte Mitochondrien in das Netzwerk aufzunehmen, anschließend alle defekten Komponenten polar zu akkumulieren und durch asymmetrische Fission kompakt abzuschneiden (Twig & Shirihai 2011). Einen Überblick über die mitochondrialen Fusions- und Fissionsprozesse bieten Youle & van der Bliek 2012.

Die Fission in Säugetierzellen wird maßgeblich von DRP1 (*Dynamin-Related Protein 1*) gesteuert, einer großen GTPase aus der Dynamin-Familie. DRP1 ist im Cytosol lokalisiert und wird über die MOM Rezeptoren FIS1, MiD49 und MiD51 rekrutiert. Die eigentliche Fission entsteht durch Polymerisierung von DRP1 an der MOM unter Ausbildung einer Spiralstruktur, die durch GTP-Verbrauch eine Abschnürung des Mitochondriums bewirkt (zur Übersicht, siehe Elgass et al 2013). Die mitochondrialen Fusions- und Fissionsprozesse stehen in einem dynamischen Gleichgewicht: Während DRP1 an der äußeren mitochondrialen Membran notwendig und hinreichend für die Fissionsprozesse ist, bedarf es komplexerer Prozesse für die Fusion von Mitochondrien. Die Hauptkomponenten der Fusion sind Mitofusin 1 (MFN1) und Mitofusin 2 (MFN2) in der äußeren Membran, sowie *Optic Atrophy 1* (OPA1) in der inneren Membran. Alle drei Proteine gehören – wie das Pro-Fissionsprotein DRP1 – zu den großen GTPasen der Dynamin-Familie. MFN1 und MFN2 können homo- und heterotypische Kontakte zwischen den äußeren Membranen benachbarter Mitochondrien aufbauen und eine Fusion einleiten (siehe Abbildung 4). Dies erzeugt zunächst einen gemeinsamen Intermembranraum beider Organelle (Chen et al 2003). Für einen erfolgreichen Fusionsprozess ist zusätzlich auch die Interaktion zwischen MFN1 und OPA1 (Siehe III.1.7) an der MIM notwendig (Cipolat et al 2004).

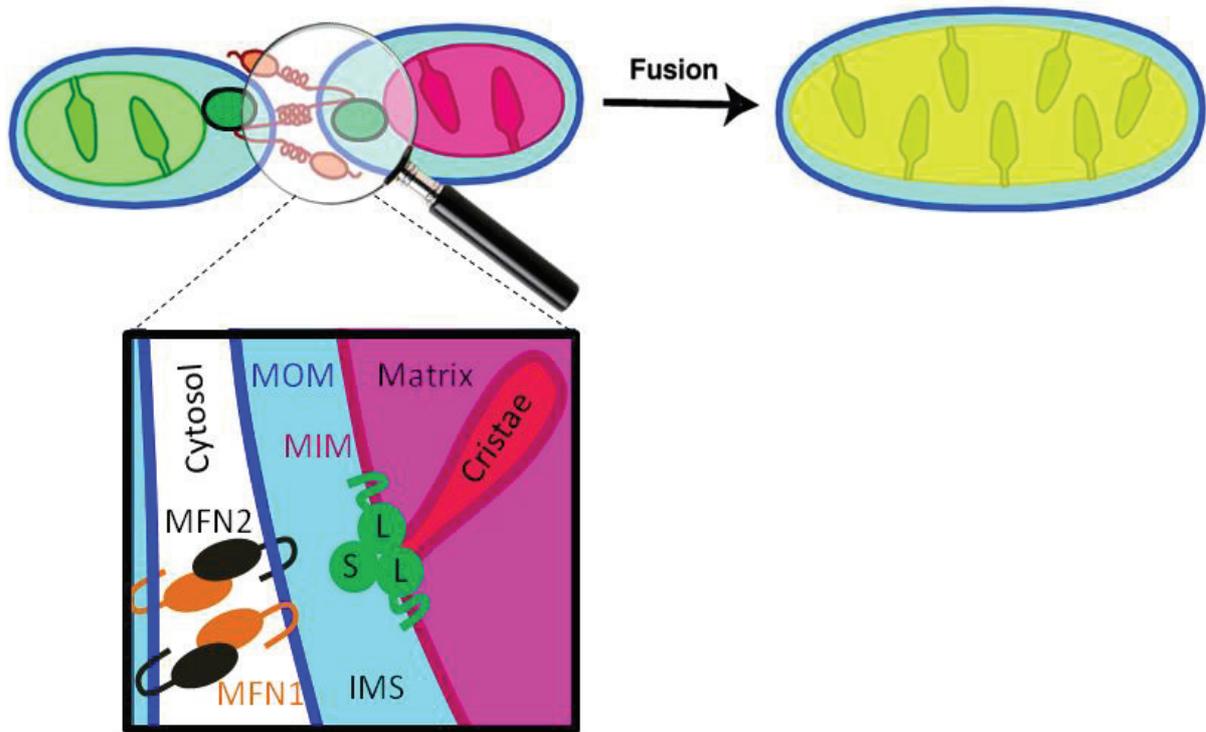


Abbildung 4 Lokalisation von OPA1, MFN1 und MFN2

Die wichtigsten Interaktionspartner der mitochondrialen Fusion: MFN1 und MFN2 in der MOM und OPA1 in der MIM. OPA1 kommt dabei als lange, membranständige Isoform vor (L-OPA1) und als prozessierte kurze Isoform im Intermembranraum (S-OPA1). Interaktionen zwischen L-OPA1 und S-OPA1 sind von Bedeutung für die Integrität der Cristae(-Junctions).

Während MFN2 eher eine akzessorische Funktion während des Fusionsprozesses zukommt, ist dieses Protein andererseits maßgeblich am axonalen Transport von Mitochondrien beteiligt (Misko et al 2010). Dabei komplexieren MFN1 und MFN2 zusätzlich mit den Linker-Proteinen MIRO1/2 und GRIF-1/OIP106, die eine Verbindung zum Kinesin-basierten Transportsystem herstellen (Fransson et al 2006). Entsprechend seiner Funktion als Pro-Fusionsprotein und seiner Rolle beim axonalen Mitochondrien-Transport führen Mutationen in *MFN2* zu einem fragmentierten mitochondrialen Netzwerk und sind als genetische Ursache peripherer axonaler Degeneration beschrieben worden. Diese äußert sich phänotypisch als periphere Neuropathie und wurde als Charcot-Marie-Tooth Syndrom Typ 2a (CMT2a) klassifiziert. (Zuchner et al 2004).

MFN1 und MFN2 sind zudem von Bedeutung für die Mitophagie: Eine Depolarisation der MIM verhindert die Spaltung von PINK1 an der MIM durch das Protein PARL. Das unprozessierte PINK1 reichert sich in der Folge an der MOM an und wird von Parkin erkannt. Letzteres ubiquitinyliert die MOM-Komponenten MFN1, MFN2 und MIRO, die daraufhin proteasomal abgebaut werden, wodurch die Fusion des geschädigten

Organells mit dem mitochondrialen Netzwerk verhindert und die Mitophagie gefördert wird (Gegg et al 2010, Jin et al 2010, Narendra et al 2008).

III.1.7 Das OPA1-Protein

Während MFN1 und MFN2 die Hauptakteure des Fusionsprozesses an der MOM sind, ist OPA1 verantwortlich für die Fusion der MIM. OPA1 gehört ebenfalls zur Klasse der Dynamine und Dynamin-verwandten GTPasen und weist typische Strukturdomänen auf, darunter die GTPase-Domäne, eine „Middle Domain“ und eine GTPase Effektor Domäne (GED) (Akepati et al 2008). Die GED enthält außerdem eine von drei *Coiled-Coil*-Domänen, CC2. Diese ist in der Lage homotypische, intermolekulare Interaktionen einzugehen. Die beiden anderen Coiled-Coil-Domänen CC0 und CC1, die zwischen der Transmembrandomäne und der GTPase-Domäne des Proteins lokalisiert sind, können hingegen intramolekular heterotypisch interagieren (siehe Abbildung 5)

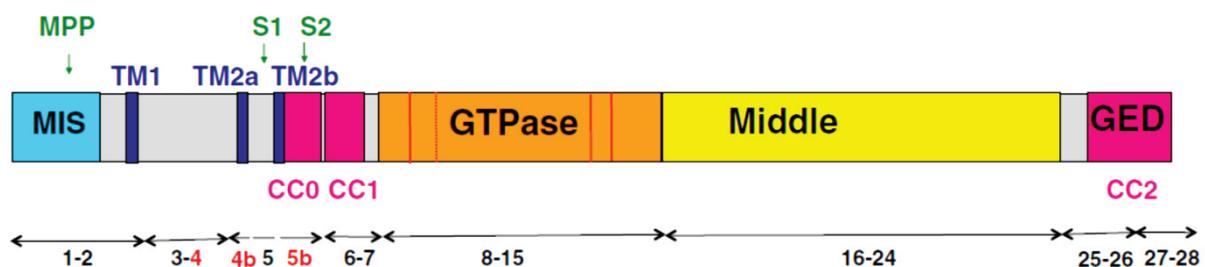


Abbildung 5 Das OPA1-Polypeptid

Schematische Darstellung der OPA1-Proteindomänen und der diese Domänen kodierenden Exons. Die Mitochondriale Importsequenz (MIS) wird von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) erkannt. Die drei Transmembrandomänen (TM1, TM2a, TM2b) werden teilweise von den alternativen Exons 4, 4b und 5b kodiert (rot). Zwei der drei *Coiled-Coil*-Domänen (CC0 und CC1) befinden sich zwischen den Transmembrandomänen und der GTPase Domäne. Diese wird gefolgt von der *Middle* Domäne und der GTPase-Effektor Domäne (GED), die CC2 enthält.

Die Transmembrandomäne 1 (TM1) ist direkt hinter der mitochondrialen Importsequenz (MIS) lokalisiert. Beim Import von OPA1 in die Mitochondrien wird die MIS durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten und die dabei entstehende lange OPA1-Isoform über die TM1 in der MIM verankert. Alle funktionellen OPA1-Domänen sind dabei dem IMS zugewandt. Zwei weitere proteolytische Spaltstellen, S1 (Exon 5 kodiert) und S2 (Exon 5b kodiert), befinden sich zwischen der TM1 und dem GTPase-Bereich (Ishihara et al 2006). Die Spaltung an S1 erfolgt durch eine m-AAA Protease bestehend aus den Matrix-Proteinen AFG3L2 und Paraplegin (SPG7) (Duvezin-Caubet et al 2007, Ishihara et al 2006). S1 wird alternativ

auch von der Metalloprotease OMA1 prozessiert, während die i-AAA Protease YME1L im IMS an S2 schneidet (Song et al 2007). Die MIM-ständigen Proteine Prohibitin 1 und 2 hingegen supprimieren die Prozessierung von OPA1, allerdings ist der Mechanismus dieser anti-apoptotischen Wirkung bislang ungeklärt (Merkwirth et al 2008, Sato et al 2011). Unter physiologischen Bedingungen führt die regulierte Prozessierung an S1 und S2 zu einem stabilen Gleichgewicht zwischen den langen, membranständigen OPA1-Isoformen (L-OPA1) und den verkürzten, solublen Isoformen im IMS (S-OPA1). Fällt das mitochondriale Membranpotenzial unter einen kritischen Wert, so führt dies zu einer aktivierenden Autoproteolyse von OMA1, welches daraufhin durch seine Endopeptidase-Aktivität an S1 alle L-OPA1-Isoformen in S-OPA1-Isoformen konvertiert (Head et al 2009, Zhang et al 2014). Während eine Interaktion von L-OPA1-Isoformen (über intermolekulare CC2:CC2-Verbindungen) ausreicht um die Fusion zweier MIM zu katalysieren, sind S-OPA1-Isoformen ohne Transmembrandomäne dazu nicht in der Lage (Anand et al 2014). Die OMA1-aktivierte Prozessierung von OPA1 verhindert somit die Re-Fusion von beschädigten und/oder depolarisierten Mitochondrien mit dem intakten Netzwerk.

Unabhängig von der stressbedingten Aktivierung der OMA1-Endopeptidase wird auch über die konstitutive Aktivität von YME1L kontinuierlich S-OPA1 generiert. Dies ist essentiell für eine weitere Funktion von OPA1: Die Aufrechterhaltung der *Cristae Junctions*. Im Zusammenwirken von L-OPA1- und S-OPA1-Isoformen bilden sich membranverankerte Oligomere, welche die zum IMS hin gelegene Öffnung der *Cristae* verschließen (Frezza et al 2006). Dieser OPA1-Komplex dient einerseits der Aufrechterhaltung der *Cristae*-Struktur und wirkt dabei andererseits anti-apoptotisch, indem der Ausstrom von Cytochrom C in den IMS blockiert wird. Wird die intrinsische Apoptosekaskade durch BAX/BAK-vermittelte MOMP induziert (siehe III.1.4), so führt dies über einen bislang ungeklärten Zwischenschritt ebenfalls zur Aktivierung von OMA1 und dadurch zur Prozessierung von OPA1 mit der Konsequenz, dass die *Cristae Junctions* instabil werden (Jiang et al 2014). Dies bewirkt einen unmittelbaren Ausstrom von Cytochrom C in den IMS, und von dort durch die BAX/BAK-Pore in das Cytosol. Neueste, bislang unbestätigte Daten, legen allerdings nahe, dass OPA1 bei der Assemblierung der *Cristae Junctions* lediglich eine regulatorische Funktion zukommt, während die *Junctions* selbst von MIC60 gebildet werden (Barrera et al 2016).

Folglich ergeben sich mehrere biochemische Signalwege, die eine Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität, des MIM-Potenzials im Netzwerk und der zellulären Homöostase ermöglichen. Wird die MIM depolarisiert, aktiviert dies gleichzeitig eine

pro-apoptotische und eine anti-apoptotische Achse über die Mitophagie: Die Depolarisation der MIM bewirkt einerseits die Akkumulation von PINK1, dadurch die Rekrutierung von Parkin und den Abbau der Pro-Fusionsproteine MFN1 und MFN2, was eine Fragmentierung der Mitochondrien bewirkt, bzw. eine Re-Fusion mit dem Netzwerk verhindert und Mitophagie ermöglicht. Andererseits bewirkt die Depolarisation der MIM oder eine intrinsische Aktivierung der Apoptose-Kaskade via Bax/Bak eine OMA1-bedingte Prozessierung von OPA1, was erstens ebenfalls Fusionsprozesse verhindert (und dadurch eine mitochondriale Fragmentierung im Sinne der Mitophagie verstärkt) und zweitens die *Cristae Junctions* öffnet, wodurch das Freisetzen von Cytochrom C in den IMS ermöglicht wird, ein zentraler Schritt bei der Exekution der Apoptose (siehe III.1.4).

Während die meisten bislang beschriebenen Funktionen und Interaktionen von OPA1 Prozesse im IMS und dem Interface zwischen IMM und IMS betreffen, wird zunehmend auch eine Beteiligung von OPA1 an Matrix-Prozessen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust von OPA1 zu einer Beeinträchtigung der Calcium-Homöostase führt (Kushnareva et al 2013) und die Präsenz von OPA1-Isoformen mit zusätzlicher Transmembrandomäne (kodiert von Exon 4b) Einfluss auf die Menge und Verteilung der mtDNA in der mitochondrialen Matrix haben (Elachouri et al 2011). Der zugrunde liegende Mechanismus und dessen biologische Funktion sind bislang ungeklärt; sie könnten allerdings im Zusammenhang stehen mit der Anreicherung von mtDNA-Deletion bei Patienten mit syndromalen Formen von *OPA1*-assoziierter Optikusneuropathie (Amati-Bonneau et al 2008, Hudson et al 2008), (siehe III.2.3.1)

III.1.8 Das *OPA1*-Gen

Das *OPA1*-Gen wurde im Jahre 2000 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beschrieben und als ursächliches Gen für den zuvor auf Chromosom 3q28-q29 kartierten Locus der autosomal-dominanten Optikusatrophie identifiziert (Alexander et al 2000, Delettre et al 2000). Das Gen umfasst einen genomischen Sequenzabschnitt von mehr als 100 kb und kodiert insgesamt 31 Exons, von denen drei, die Exons 4, 4b und 5b, alternativ gespleißt werden (Delettre et al 2001). Die Nomenklatur der Exons wurde daher in der Vergangenheit (und auch für diese Dissertation) als 1-29 + 4b und 5b festgelegt. Das Startcodon von *OPA1* befindet sich in Exon 1, während das Stopp-Codon im vorletzten Exon (Exon 28) liegt. Die Inklusion bzw. das Skipping der alternativen *OPA1* Exons erzeugt acht mRNA Spleiß-Isoformen, deren Anteil am Gesamtpool der

OPA1-Transkripte allerdings gewebsspezifisch variiert (Delettre et al 2001). Ein partieller, quantitativer oder qualitativer Funktionsverlust von *OPA1* führt zur autosomal dominanten Optikusatrophie (ADOA), zuweilen mit zusätzlichen extraokulären Symptomen (siehe III.2.3.1 und III.2.3.2). Das Spektrum der ursächlichen Mutationen umfasst dabei Basenaustausche mit Auswirkung auf die Aminosäuresequenz (*Missense*-Mutationen), proteintrunkierende Mutationen (Stopp-Mutationen, Insertionen, Deletionen, Spleißmutationen (Schimpf et al 2006) (siehe III.3.1.1) und auch größere strukturelle Genveränderungen (Deletionen, Duplikationen), die mehrere Exons oder das gesamte *OPA1*-Gen umfassen (Fuhrmann et al 2009). Die bislang als pathogen beschriebenen *OPA1* Mutationen betreffen alle Exons, mit Ausnahme der Exons 4, 4b, 5 und 29 (Ferre et al 2015).

III.2 Retinale Ganglienzellen & Autosomal Dominante Optikusatrophie (ADOA)

Mangel oder Fehlfunktion des mitochondrialen Fusionsproteins *OPA1* führt bei den meisten betroffenen Patienten zu einer isolierten progressiven Optikusatrophie (siehe 1.2.3). Dieses Krankheitsbild ist das Ergebnis einer chronisch voranschreitenden Degeneration der retinalen Ganglienzellen und deren Axone, die den Sehnerv bilden. Weshalb Mutationen im ubiquitär exprimierten *OPA1*-Gen insbesondere die retinalen Ganglienzellen beeinträchtigen, ist bislang ungeklärt.

III.2.1 Aufbau der humanen Retina

Die menschliche Retina unterscheidet fünf Klassen von Neuronen: Fotorezeptoren, die als Licht-Detektoren fungieren, Horizontal-, Bipolar- und Amakrin-Zellen, die als Interneurone dienen und retinale Ganglienzellen (RGC), deren Axone die visuelle Information in höhere Regionen des zentralen Nervensystems leiten. Die beschriebenen Klassen lassen sich in morphologische und funktionelle Zelltypen untergliedern. So verfügt die menschliche Retina über zwei Typen von Fotorezeptoren: Stäbchen und Zapfen. Die Stäbchen vermitteln monochromatisches Sehen (Absorptionsmaximum bei $\lambda \approx 500$ nm) bei geringer Lichtintensität (skotopischer Bereich), während die Sensitivität der Zapfen bei höheren Lichtintensitäten liegt (photopischer Bereich) (Kraft et al 1993). Die humanen Zapfen lassen sich auf der Basis der Expression von Fotopigmenten mit unterschiedlichem Absorptionsspektrum in drei Subtypen untergliedern: S-Zapfen ($\lambda_{\max} \approx 426$ nm = blau), M-Zapfen ($\lambda_{\max} \approx 530$ nm = grün) und L-Zapfen ($\lambda_{\max} \approx 552$ nm =

rot) (Merbs & Nathans 1992). Sie verteilen sich nicht gleichmäßig über die Retina, sondern konzentrieren sich auf den Punkt des schärfsten Sehens (Macula lutea), der keine Stäbchen (und auch keine S-Zapfen) enthält und sind 1:1:1 verschaltet zwischen Fotorezeptor, Bipolarzelle und Ganglienzelle.

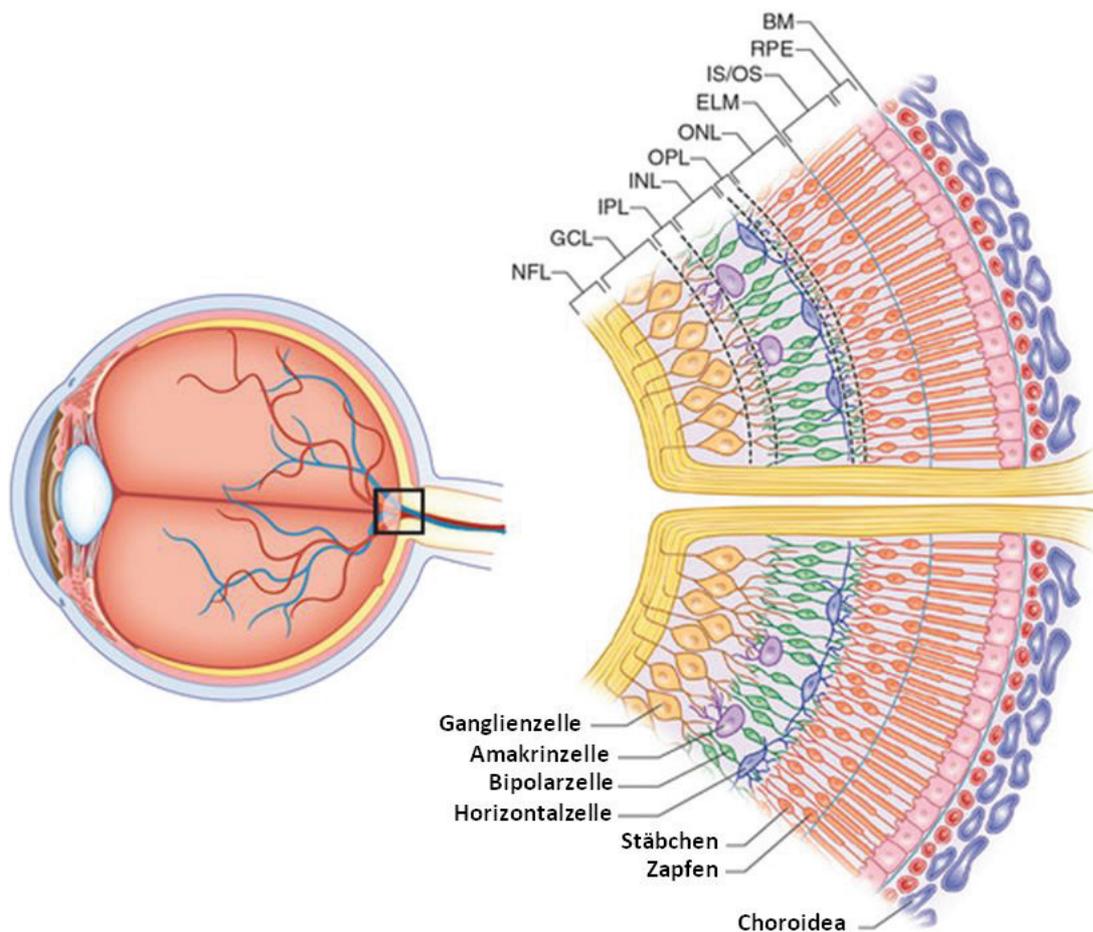


Abbildung 6 Aufbau der humanen Retina

Einfallendes Licht durchdringt alle Schichten der Retina, bevor es von den Fotorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) detektiert wird. Die durch Horizontalzellen und Amakrinzellen prozessierten Signale der Fotorezeptoren werden über Bipolarzellen an die Ganglienzellen weitergeleitet. Die Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerv und durchdringen gebündelt die gesamte Retina. NFL = *Nerve fiber layer*, GCL = *Ganglion cell layer*, IPL = *Inner plexiform layer*, INL = *Inner nuclear layer*, OPL = *Outer plexiform layer*, ONL = *Outer nuclear layer*, ELM = *External limiting membrane*, IS/OS = *Inner segments, Outer segments*, RPE = *Retinal pigment epithelium*, BM = *Basilar Membrane*

Mit zunehmender retinaler Exzentrizität nimmt die Zahl der Zapfen ab, der Grad der neuronalen Konvergenz aber stark zu. Die Signale der Fotorezeptoren werden zusätzlich durch Horizontalzellen (die präsynaptisch zu den nachgeschalteten Bipolarzellen liegen) und Amakrinzellen (die Ganglienzellen und/oder Bipolarzellen lateral verbinden) prozessiert, wodurch die visuelle Information bereits in der Retina teilweise verarbeitet wird (siehe Abbildung 6). Letztendlich konvergiert die Sehinformation von insgesamt ca.

125 Millionen Fotorezeptoren zu etwa einer Million Ganglienzellen (Bear et al 2006). An die Fotorezeptoren grenzt nach außen das retinale Pigmentepithelium an, dessen Funktion u. a. in der Absorption von Streulicht, der Wiederaufbereitung des Sehfärbstoffs und der metabolischen Unterstützung der Fotorezeptoren liegt. Die Ganglienzellschicht wird zur retinalen Seite von den Bipolarzellen flankiert und zur lichtzugewandten Seite durch die *Membrana limitans interna* vom *Corpus vitreum* getrennt. Als Papille bezeichnet man den funduskopisch scharf begrenzten Bereich am hinteren Augenpol in welchem die Nervenfasern der retinalen Ganglienzellen zusammenlaufen und als Faserbündel in die äußeren Schichten des Auges abtauchen. Dieser Bereich der Retina enthält keine weiteren Neuronen und stellt das anatomische Korrelat des „blinden Flecks“ dar. Die inverse Natur des menschlichen Auges bedingt, dass die zum Sehnerv gebündelten Axone der Ganglienzellen an der Papille die gesamte Schicht der Retina durchdringen müssen, bevor sie am hinteren Pol des Auges die Sklera überwinden. In seiner retinofugalen Projektion verlässt der Sehnerv die knöcherne Augenhöhle (Orbita) über die *Lamina cribrosa*. Erst dahinter werden die Axone der Ganglienzellen von Oligodendrocyten myelinisiert (Perry & Lund 1990), sodass erst ab hier die energieärmere, saltatorische Weiterleitung der Nervenimpulse erfolgen kann. An der *Basis cerebri* kreuzen sich die Sehnerven am sogenannten *Chiasma opticum*. Hier kommt es zu einer partiellen Dekussation, bei der die Axone des nasalen retinalen Hemifeldes sich überkreuzen und gebündelt mit den Axonen des temporalen Hemifeldes der kontralateralen Retina zum primären Ziel des Sehnervs projizieren, dem *Corpus geniculatum laterale (CGL)*. Dieser sendet seinerseits Axone zum primären visuellen Cortex, einem Teil des Occipitallappens (Bear et al 2006).

III.2.2 Ursachen pathologischer Optikusneuropathie

Die Ursachen für eine Dysfunktion oder letztlich die Degeneration retinaler Ganglienzellen können mannigfaltig sein. Neben Ischaemie und traumatischer Axotomie führen auch glaukomatöse und infektiöse Erkrankungen (z. B. Syphilis), Diabetes, Nebenwirkungen medizinischer Behandlungen (z. B. durch Ethambutol, Amiodarone oder Bestrahlung), toxische Substanzen (z. B. Methanol) und Ernährungsgewohnheiten in Kombination mit Alkohol und Tabakkonsum zu einem vorübergehenden oder dauerhaftem Funktionsausfall, letzteres häufig verbunden mit einem Absterben der Ganglienzellen (Zur Übersicht, siehe Behbehani 2007).

Zu den wichtigsten Erkrankungen, die zu einer Erblindung bei Europäern im erwerbsfähigen Alter führen, gehören auch erbliche Optikusneuropathien. Diese können

als Teilaspekt eines syndromalen Krankheitsbildes oder als isolierte Optikusneuropathien auftreten. In den allermeisten Fällen, in denen die genetische Ursache für eine isolierte oder syndromale Optikusatrophie bestimmt werden konnte, ist das zugehörige Protein mitochondrial lokalisiert und/oder es kommt in Folge der Mutation zu einer mitochondrialen Dysfunktion (siehe Abbildung 13). Zu den häufigsten Auslösern einer isolierten Optikusneuropathie gehören Mutationen im mtDNA Genom, die sich klinisch als Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON) manifestieren. 95 % aller LHON-Fälle gehen dabei auf drei verschiedene Mutationen in den Genen *ND1* (nt3460G>A), *ND4* (nt11778G>A) und *ND6* (nt14484T>C) zurück. Alle drei betroffenen Gene kodieren für Komponenten von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Aufgrund der Präsenz der LHON-Mutationen in der mtDNA wird diese Erkrankung ausschließlich maternal vererbt.

III.2.3 Die Autosomal dominante Optikusatrophie (ADOA)

Die zweithäufigste Ursache erblicher Optikusneuropathie ist die autosomal dominante Optikusatrophie (ADOA) mit einer Prävalenz von 1:50.000 weltweit (Yu-Wai-Man et al 2010). Die überwiegende Mehrzahl der untersuchten ADOA-Patienten weist dabei eine Mutation im *OPA1*-Gen auf (siehe III.1.8). In einer kleinen Zahl von Familien mit isolierter ADOA wurden auch dominante Mutationen in den Genen *OPA3* (Grau et al 2013, Reynier et al 2004), *SPG7* (Klebe et al 2012) und *WFS1* (Grenier et al 2016) nachgewiesen. Die klassische ADOA Typ Kjer ist klinisch charakterisiert durch einen schleichend einsetzenden, progredienten und bilateral weitgehend symmetrischen Visusverlust mit typischem Krankheitsbeginn innerhalb der ersten Lebensdekade (Carelli et al 2004). Die Verschlechterung des Sehvermögens verläuft dabei schmerzfrei, beidseitig symmetrisch und meist unbemerkt, entweder konstant fortschreitend oder schubweise, jedoch oftmals mit deutlichen innerfamiliären Unterschieden. Ophthalmologisch werden häufig zentrale bis coeozentrale Skotome berichtet, während die Peripherie meist intakt bleibt. Tritanopie ist ein weiteres wichtiges, jedoch nicht obligates Indiz für die ADOA Typ Kjer. Je nach Erkrankungsstadium erscheint die Papille von ADOA-Patienten funduskopisch temporal blass und insgesamt stärker exkaviert. Trotz unterschiedlicher Pathogenese überschneiden sich LHON und ADOA in ihren phänotypischen Endstadien (O'Neill et al 2011).

Seit der Erstbeschreibung von *OPA1*-Mutationen als Ursache für nicht-syndromale Optikusatrophien wurden zunehmend auch Fälle mit extraokulären Begleitsymptomen beschrieben. Diese reichen von leichter Innenohrschwerhörigkeit über komplexe

systemische Erkrankungen mit Ataxie, Ophthalmoplegie, peripherer Neuropathie und zerebellärer Atrophie, bis hin zu frühkindlich letalen Formen.

III.2.3.1 *OPA1-assoziierte Optikusneuropathien*

Bereits früh nach der Erstbeschreibung des *OPA1*-Gens als Ursache für hereditäre isolierte ADOA mussten Aussagen über Penetranz und Expressivität der Erkrankung angepasst werden. Während einerseits zunehmend intrafamiliäre Fälle von *OPA1*-assoziiierter ADOA mit reduzierter Penetranz berichtet wurden (Cohn et al 2007, Toomes et al 2001), konnten auch syndromale Optikusatrophien mit zusätzlicher extraokulärer Beteiligung auf Mutationen in *OPA1* zurückgeführt werden. Bei diesen als „ADOAplus“ bezeichneten Erkrankungen wurde als häufigste Begleitsymptomatik Innenohrschwerhörigkeit (Amati-Bonneau et al 2003) beschrieben, die jedoch oft auch mit weiteren neurologischen und neuromuskulären Symptomen wie Ataxie, peripherer Neuropathie, Myopathie, progressiver externer Ophthalmoplegie (PEO) und Ptosis einhergingen (Amati-Bonneau et al 2008, Hudson et al 2008, Payne et al 2004). In einer breit angelegten Studie aus dem Jahr 2010 konnte schließlich gezeigt werden, dass etwa 20 % aller Patienten mit *OPA1*-Mutationen unter zusätzlichen extraokulären Symptomen leiden, die bevorzugt im jungen Erwachsenenalter zeitlich verzögert zur Optikusatrophie auftreten. Eine Genotyp-Phänotyp Korrelation ergab dabei eine Häufung von Mutationen in der GTPase-Domäne und einen insgesamt signifikant erhöhten Anteil von *Missense*-Mutationen (Yu-Wai-Man et al 2010a). Dies deutet auf einen möglichen dominant-negativen Effekt des mutanten Proteins hin, im Gegensatz zur mutmaßlichen Haploinsuffizienz bei der Mehrzahl von Patienten mit *OPA1*-gekoppelter ADOA. Auf Basis dieser und weiterer Beobachtungen konnten in einer retrospektiven Studie auch bei 77 % der untersuchten Patienten mit als „isoliert“ beschriebener Optikusatrophie weitere subklinische Dysfunktionen nachgewiesen werden (Baker et al 2011). Diese phänotypische Variabilität in der Ausprägung wird weiter verkompliziert durch die Beschreibung einzelner *OPA1*-Patienten mit multisystemischen Erkrankungen, jedoch ohne Optikusatrophie (Milone et al 2009).

III.2.3.2 Das *OPA1*-assoziierte Behr Syndrom

Im Jahre 2011 wurde erstmals ein *OPA1*-assoziiertes Krankheitsbild beschrieben, welches sich in Schweregrad und genetischem Pathomechanismus von den übrigen Fällen deutlich unterschied und nach neueren Ergebnissen zum Formenkreis des *Early Onset Behr Syndroms* zu zählen ist (Schaaf et al 2011). In dieser Publikation wurde über zwei Geschwister mit frühkindlicher Optikusatrophie (<2 Jahre) und multisystemischen syndromalen Symptomen (u. a. Nystagmus, Hypotonie, Ataxie, Dysphagie und Konstipation) berichtet, bei denen *compound*-heterozygote Mutationen in *OPA1* gefunden wurden. Bei den Mutationen handelte es sich um eine proteintrunkierende Leseraster(*Frameshift*)-Mutation (c.2708_2711del, p.V903GfsX3) und eine *Missense*-Mutation in der GTPase Domäne (c.1311A>G/p.I437M). In der Folgezeit wurden zahlreiche weitere Fälle beschrieben, die diesem Muster aus *compound*-heterozygoten *OPA1*-Mutationen in Kombination mit schwerer frühkindlicher syndromaler Optikusatrophie folgen (Bonifert et al 2014, Bonneau et al 2014, Carelli et al 2015, Lee et al 2016, Liao et al 2017) (siehe auch III.3.2) und die schließlich zu einer generellen Dreiteilung der *OPA1*-assoziierten Erkrankungen führten: 1. isolierte Optikusatrophie mit heterozygoten *OPA1*-Mutationen, die mutmaßlich eine Haploinsuffizienz bedingen, 2. syndromale Optikusatrophien mit typischerweise adult manifestierender extraokulärer Symptomatik bei heterozygoten *OPA1*-Mutationen, die mutmaßlich eine dominant-negative Wirkung entfalten und 3. frühkindlich (< 2 Jahre) manifestierende syndromale Optikusatrophien mit *compound*-heterozygoten *OPA1*-Mutationen, bestehend aus je einer proteintrunkierenden (bzw. *Loss-of-Function*) und einer *Missense*-Mutation (vorwiegend in der GTPase Domäne). Letztere Konstellation wurde nachfolgend als *Early Onset Behr Syndrom* klassifiziert (Chao de la Barca et al 2016), entsprechend der Erstbeschreibung durch Carl Behr (Behr 1909).

III.3 Kanonisches und pathologisches molekulares Spleißen

Neben der im vorangehenden Abschnitt dargestellten klinischen Variabilität und der damit verbundenen Schwierigkeit zu entscheiden, ob eine genetische Untersuchung bzgl. Mutationen in *OPA1* indiziert ist, stellt sich andererseits die Problematik der (ungenügenden) Sensitivität der derzeit üblichen genetischen Testverfahren zum Nachweis pathogener *OPA1*-Mutationen. Trotz der enormen Fortschritte moderner

Sequenziermethoden wird selbst bei einer *Whole Exome* Sequenzierung (WES) lediglich in etwa 60 % aller Erkrankungsfälle (hier bezogen auf erbliche Netzhauterkrankungen) die pathogene Mutation identifiziert (Neveling et al 2013, Weisschuh et al 2016, Yu-Wai-Man et al 2010a). Die wesentlichen Gründe dafür sind: 1. die technischen Limitierungen derzeitiger WES-Ansätze: Die Abdeckung der Zielsequenz (kodierende Exone) ist ungleichmäßig und nicht vollständig, große heterozygote Deletionen/Duplikationen sind nur schwer nachzuweisen (Fuhrmann et al 2009), Inversionen und Translokationen sind praktisch nicht nachweisbar; 2. die Identifizierung von Varianten unbekannter Signifikanz (= *Variants of Unknown Significance* = VUS); 3. klinische Fehldiagnosen (z.B. Ausschlussuntersuchungen oder Phänokopien) und 4. die fehlende Abdeckung nicht-kodierender Genabschnitte, die pathogene Mutationen enthalten können (z.B. 3'- oder 5'UTRs, Introns, Promotoren und andere genregulatorische Elemente).

III.3.1 Introns und das Spleißosom

Die Mehrzahl der Gene in höheren Eukaryonten ist unterteilt in kodierende Exons und nicht-kodierende Introns. Das humane Genom enthält über 200.000 Introns mit Längen von 100 bp bis über 700.000 bp, wobei die durchschnittliche Intronlänge von 1800 bp die gemittelte Länge der Exons (123 bp) um das beinahe zehnfache übersteigt (Hoskins & Moore 2012). Bei der Transkription proteinkodierender Gene durch die RNA Polymerase II entsteht ein Primärtranskript (prä-mRNA), aus welchem im ko-transkriptionellen Spleiß-Prozess die Introns entfernt und benachbarte Exons basengenau miteinander verbunden werden. Dieser Prozess erfolgt durch eine komplexe Interaktion der prä-mRNA mit RNA-bindenden Proteinen, die spezifische Sequenzmotive entlang der prä-mRNA als intronisch oder exonisch markieren. Diese *Exon-Splice-Enhancer-* (ESE), *Exon-Splice-Silencer-* (ESS), *Intron-Splice-Enhancer-* (ISE) und *Intron-Splice-Silencer* (ISS)-Motive rekrutieren in einer hierarchischen Kaskade weitere Spleißfaktoren (darunter die zentralen U1, U2, U4, U5 und U6 Ribonukleotid-Protein-Komplexe [RNPs]) und konstituieren dadurch das sogenannte Spleißosom, das mit über 300 Polypeptiden die größte bekannte makromolekulare Funktionseinheit der Zelle darstellt (Nilsen 2003, Rappsilber et al 2002). In einem mehrstufigen Prozess katalysiert das Spleißosom präzise Schnitte an den Exon-Intron Grenzen und ligiert benachbarte Exons, wobei es exonübergreifende und intronübergreifende molekulare Interaktionen integriert, um Exongrenzen basengenau zu identifizieren (De Conti et al

2013). Die Bindung der Spleißfaktoren an die ESE-, ESS-, ISE- und ISS-Motive ist dabei dynamisch und variabel in ihrer Affinität, je nach Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz und Zugänglichkeit des Abschnitts im dreidimensional rückgefalteten prä-mRNA-Transkript. Fast sämtliche Schritte des Spleißprozesses sind reversibel, was eine Sondierung und ein kinetisches „*Proofreading*“ der Spleißreaktion erlaubt (siehe Abbildung 7) (Hopfield 1974, Hoskins & Moore 2012).

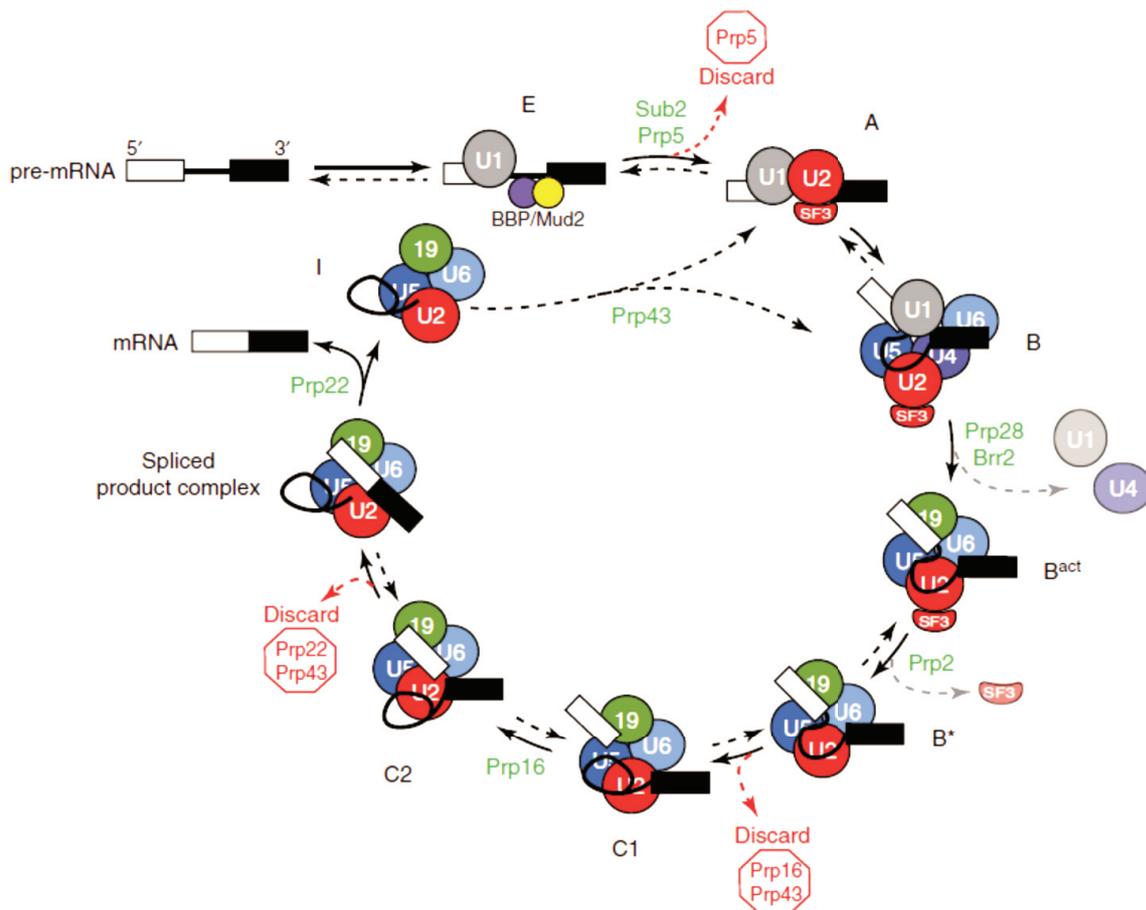


Abbildung 7 Konsekutive Bindung der Hauptfaktoren des Spleißosoms.

Der inkrementelle Aufbau des Kern-Spleißosoms beginnt mit der Bindung der Donor-Spleißstelle durch das U1snRNP und der Anlagerung von BBP2 und Mud2 an den *Branch Point*. Diese werden durch das U2snRNP verdrängt, welches den Tri-snRNP U4/U6-U5 rekrutiert. Das Hinzukommen und Verdrängen weiterer Faktoren führt schließlich zur katalytischen Spaltung an der Donor-Spleißstelle und schließlich zur Spaltung und Ligation der Akzeptorstelle mit der Donorstelle. Mit Ausnahme der zweiten katalytischen Spaltung an der Spleißakzeptorstelle sind nahezu sämtliche Schritte der Assemblierung reversibel.

Dabei werden allerdings selbst unter normalen Umständen nicht alle Exons in jedes Transkript eines Gens inseriert. Diese so genannten alternativen Exons finden sich in etwa 95 % aller Gene (Pan et al 2008) und tragen entscheidend zur großen Komplexität des Proteoms höherer Eukaryonten bei (Nilsen & Graveley 2010). Allerdings führen auch ca. 35 % der in Datenbanken annotierten alternativ gespleißten Exons zu einem

vorzeitigen Stopp Codon und damit der Zerstörung des entsprechenden mRNA-Moleküls. Diese unproduktiven Spleißereignisse können jedoch quantitativ überwiegend als biologisches „Rauschen“ angesehen werden (Lewis et al 2003, Pan et al 2006)(siehe auch IV.3 und IV.4.4).

Das Zusammenwirken zwischen prä-mRNA und Spleißosom ist noch immer nicht vollständig verstanden, was nicht zuletzt daran abzulesen ist, dass bis heute kein bioinformatischer Algorithmus in der Lage ist, mit hoher Spezifität alle Exons innerhalb einer prä-mRNA treffsicher vorherzusagen. Dies erklärt auch die Probleme bezüglich einer Pathogenitätsbewertung unbekannter intronischer Sequenzvarianten, wie sie häufig nach *Whole Genome* Sequenzierungen bei Patientenproben detektiert werden. Eine Ausnahme stellen dabei die unmittelbar an die Exons angrenzenden Sequenzen dar, die von besonderer Bedeutung für den Spleißprozess und stark konserviert sind. Ein prototypisches Intron beginnt am 5'-Ende (auf DNA-Ebene) mit einem ‚GT‘ Motiv (Donor) und endet am 3'-Ende mit ‚AG‘ (Akzeptor). Stromaufwärts des Akzeptors befindet sich eine charakteristische Pyrimidin-Folge (C/T) und der für die Katalyse der Spleißreaktion wichtige Verzweigungspunkt (*Branch Point*), meist ein Adenosinnukleotid (siehe Abbildung 8).

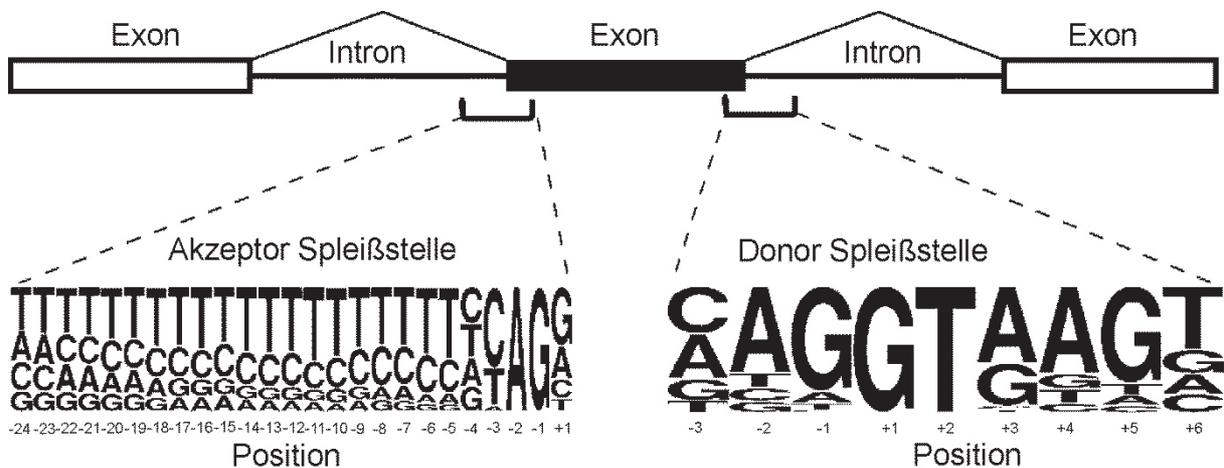


Abbildung 8 Die Konsensus-Sequenz der Spleißstellen in Genen des Menschen

Introns enden gewöhnlich mit ‚AG‘ (Akzeptorstelle) und beginnen mit ‚GT‘ (Donorstelle). Die Akzeptorstelle wird stromaufwärts von einer pyrimidinreichen Sequenz flankiert. Auch die umliegende Sequenz der Donorstelle weist eine Konsensus-Sequenz auf: CAGGTAAGT

III.3.1.1 Kanonische Spleißmutationen

Mutationen in unmittelbarer Nähe von genuinen Exon-Intron-Grenzen führen häufig zu fehlerhaftem Spleißen, wobei das betreffende Exon übersprungen (*exon skipping*), verkürzt, oder durch zusätzliche intronische Sequenz verlängert werden kann.

Fehlgespleißte Transkripte führen häufig zu einer Leserasterverschiebung (*Frameshift*) und damit zu einer vorzeitigen Termination der Translation. Solche Transkripte unterliegen jedoch dem *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD)-Mechanismus und werden abgebaut. Mutationen, die zu einem Fehlspleißen führen, sind zumeist pathogen und stellen eine eigene Klasse an ursächlichen Mutationen für fast alle beschriebenen Erbkrankheiten beim Menschen dar. Man schätzt, dass sich etwa 25 % aller krankheitsverursachenden Genmutationen als Spleißdefekt manifestieren (Sterne-Weiler et al 2011), so auch beim *OPA1*-Gen (Schimpf et al 2006). Für eine detaillierte Übersicht zum Mechanismus des Spleißens und die Auswirkungen von pathogenen intronischen und exonischen Varianten, siehe Pagani et al., 2004 (Pagani & Baralle 2004).

III.3.1.2 *Deep Intrinsic*-Mutationen

Deep Intrinsic-Mutationen stellen eine Untergruppe von Spleißmutationen dar. Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie nicht in unmittelbarer Nähe der Exon-Intron-Grenzen, sondern weit davon entfernt, im Inneren eines Introns lokalisiert sind und daher auch nicht die hochkonservierten Spleißdonorstellen bzw. Spleißakzeptorstellen der benachbarten Exons beeinträchtigen. In den meisten Fällen führen *Deep Intrinsic*-Mutationen zur Entstehung neuer Spleißmotive, die zur Aktivierung eines kryptischen Exons, d.h. der Inklusion intronischer Sequenz in die reife mRNA (*Exonization of Intrinsic Sequences*), führen. Dies resultiert in einer Leserasterverschiebung bei der Translation, dem Einbau eines Stopp-Codons oder der Insertion zusätzlicher Aminosäuren auf Proteinebene und geht daher zumeist mit Verlust oder Verminderung der Genfunktion einher. Die erste *Deep Intrinsic*-Mutation wurde bereits im Jahr 1988 für das Gen *F8* beschrieben (Yousoufian et al 1988). Seither wurden jedoch zahlreiche weitere Mutationen mit vergleichbarem Wirkmechanismus beschrieben. Die Prävalenz solcher *Deep Intrinsic*-Mutationen ist unbekannt, aber sicher deutlich höher als in der Literatur beschrieben, da in der konventionellen Gendiagnostik, die sich auf die Analyse der kodierenden Exons und der unmittelbaren Exon-Intron-Grenzen konzentriert, *Deep Intrinsic*-Mutationen üblicherweise nicht detektiert werden. Mittels ergänzender genetischer Analyseverfahren, z. B. cDNA-Analysen oder *Whole Genome* Sequenzierung können jedoch zunehmend intronische Mutationen nachgewiesen werden, die weit entfernt von natürlichen Exons liegen (siehe DBASS-Datenbank; <http://www.dbass.org.uk>).

III.3.2 **Artikel 1:** *Deep Intronic-Mutationen und ein Intralokus Modifier in OPA1 als Erklärung für isolierte und syndromale Optikusatrophien*

[Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier] (Bonifert et al., 2014)

Ein Beispiel für den komplexen Beitrag von *Deep Intronic*-Mutationen zur Ätiologie von neurodegenerativen Erkrankungen bietet der Fall einer Familie mit *OPA1*-assoziierten Behr-Syndrom, der im Rahmen dieser Dissertation im Jahr 2014 in der Zeitschrift *Brain* beschrieben wurde (Bonifert et al 2014)

Drei von sechs Geschwistern der Familie OAK 587 litten ab einem Alter von zwei Jahren an einer schweren Optikusatrophie, die mit einer progressiven Minderung des Visus einherging. Auf die frühkindliche Optikusatrophie war im Alter von vier bis sechs Jahren eine Ataxie gefolgt, die mit 10-15 Jahren zu einer Rollstuhlabhängigkeit führte. Im Rahmen ihrer klinischen Untersuchung in der Tübinger Neurologie im Jahre 2010 (Alter 46-50 Jahre) wurden neben einer zerebellären Ataxie auch eine externe Ophthalmoplegie, periphere Neuropathie, Muskelatrophie, Ptosis und spastische Lähmungen, jedoch keine Schwerhörigkeit festgestellt (siehe Diskussion, IV.5). Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben eine schwere sensorimotorische Neuropathie sowie pyramidale Schäden der oberen und unteren Extremitäten. Weder die drei nicht-betroffenen Geschwister noch die Eltern zeigten Auffälligkeiten im Rahmen einer ophthalmologischen und neurologischen Untersuchung (eine detaillierte Übersicht der klinischen Symptomatik liefert Bonifert et al., 2014, Tab. 1).

Aufgrund der syndromalen Symptomatik, des scheinbar rezessiven Erbgangs und der subzellulären Fragmentierung der Mitochondrien (nachgewiesen in einer eigens angelegten Fibroblastenkultur aus Patientenmaterial, Bonifert et al., 2014, Abb. 7A) wurden zur Aufklärung der genetischen Ursache eine Reihe von Genen untersucht, die bereits im Zusammenhang mit mehreren der vorliegenden Symptome beschrieben wurden und überwiegend für mitochondrial lokalisierte Proteine kodieren. Dies beinhaltete die Längenbestimmung der *Repeat*-Abschnitte in *FXN* und *ATXN7* sowie die vollständige Exon-Sequenzierung der Gene *PANK2*, *POLG*, *C10orf2*, *OPA3*, *OPA1* und eine Komplettssequenzierung der mitochondrialen DNA. Dabei konnten jedoch keine pathogenen Mutationen nachgewiesen werden. Allerdings lag beim Vater Homozygotie und bei allen Kindern Heterozygotie für die seltene *Missense*-Mutation p.I437M in *OPA1*

vor. Eine Segregationsanalyse mittels Mikrosatelliten ergab, dass alle drei betroffenen Kinder das gleiche mütterliche *OPA1*-Allel ererbt hatten, während bei allen nicht-betroffenen Kindern das homologe mütterliche Allel zu finden war (siehe Bonifert et al 2014, Abb. 3). Somit stellte sich die Frage, ob möglicherweise, analog zu dem von Schaaf und Mitarbeitern beschriebenen Fall (Schaaf et al 2011), auch bei der hier studierten Familie eine *compound*-Heterozygotie für zwei *OPA1*-Mutationen die Ursache für das beobachtete syndromale Krankheitsbild sein könnte.

Da bei der vorangegangenen Komplettssequenzierung aller Exons des *OPA1*-Gens keine weiteren Mutationen gefunden wurden und darüber hinaus auch strukturelle Aberrationen am *OPA1*-Lokus mittels vergleichender Genom-Hybridisierung (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* = MLPA) ausgeschlossen werden konnten, wurde zur Identifizierung von pathogenen Mutationen in nicht-kodierenden Abschnitten innerhalb und in der Nähe von *OPA1* das Mutationsscreening auf die Transkriptebene ausgeweitet. Mit dieser Strategie sollte geklärt werden, ob möglicherweise qualitative oder quantitative Abweichungen von Transkripten des von der Mutter auf die betroffenen Kinder vererbten *OPA1*-Allels vorlagen. Hierzu wurde mRNA aus kultivierten Primärfibroblasten eines Betroffenen (II:2) isoliert und revers transkribiert. Bei der qualitativen cDNA-Analyse durch Amplifikation und Sequenzierung überlappender Abschnitte konnten jedoch zunächst keine aberranten Transkripte detektiert werden, wobei cDNA-Amplikons um die alternativ gespleißten Exons 4, 4b und 5b *per se* nicht direkt sequenzierbar sind und daher hierbei nicht untersucht wurden.

Zusätzlich zur qualitativen cDNA-Analyse wurde auch eine relative Quantifizierung der allelischen *OPA1*-Transkripte durchgeführt, da Mutationen in nicht-kodierenden Genbereichen auch zu einem reduzierten *steady-state* Level von Transkripten des betreffenden Allels führen können und damit bei der qualitativen cDNA-Analyse nicht zu identifizieren sind. Für diese Untersuchung eines potenziellen allelischen Ungleichgewichts wurde ein *OPA1* cDNA-Amplikon aus revers transkribierter Fibroblasten-RNA mittels Pyrosequenzierung analysiert, wobei der heterozygote Polymorphismus rs9851685 in Exon 21 als informativer SNP zur Unterscheidung der allelischen Transkripte verwendet wurde. Dabei konnte ein allelisches Ungleichgewicht von ca. 4:1 mit erhöhtem Anteil von Transkripten des paternalen Allels aufgezeigt werden. Erklärt werden kann ein solches Ergebnis entweder durch eine Überexpression der väterlichen Genkopie, oder – wahrscheinlicher – durch eine verringerte Transkriptmenge vom mütterlichen Allel. Letzteres ist durch eine verringerte Transkription, z.B. aufgrund von Mutationen in Promotor- oder Enhancerelementen,

oder durch einen erhöhten *Turnover* bzw. Instabilität der Transkripte, z.B. durch NMD fehlgespleißter mRNA in Folge einer *Deep Intronic*-Mutation denkbar. Die Verfügbarkeit von Fibroblasten-Primärkulturen der betroffenen Patienten ermöglichte es, letztere Hypothese experimentell zu überprüfen. Die Behandlung von Zellen mit dem Translationshemmer Puromycin wirkt dem Effekt des NMD-Mechanismus entgegen und erlaubt damit die robuste RT-PCR-Amplifikation von Transkripten mit vorzeitigem Stopp-Codons. Tatsächlich konnte durch die Puromycinbehandlung der Patientenfibroblasten eine Angleichung der relativen Quantität der allelischen *OPA1*-Transkripte beobachtet werden. Dies legte nahe, dass die Transkripte des von der Mutter ererbten *OPA1*-Allels ohne Puromycin-Behandlung durch NMD abgebaut werden. Eine Wiederholung der qualitativen cDNA-Analyse über die gesamte Länge der *OPA1*-Transkripte – diesmal mit cDNA aus Puromycin-behandelten Zellen – zeigte im Vergleich mit den unbehandelten Proben keine Unterschiede bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der RT-PCR Produkte mit Ausnahme eines Amplikons des cDNA-Abschnitts zwischen Exon 2 und Exon 6, welches auch die bekannten, alternativ gespleißten *OPA1*-Transkriptisoformen umfasst (siehe Bonifert et al 2014, Abb. 4). Bei der Sequenz-Analyse einzelner dieser RT-PCR-Produkte konnten u.a. cDNA-Sequenzen mit einer Insertion eines 61 bp bzw. 93 bp langen kryptischen Exons zwischen den Exons 4b und 5 identifiziert werden. Aufgrund von Heterozygotie für den SNP rs7624750 im benachbarten Exon 4 konnte diese Insertion selektiv den Transkripten des mütterlichen *OPA1*-Allels zugeordnet werden, wobei die Insertion unabhängig von den umliegenden, genuinen Exons in allen analysierten Transkript-Isoformen enthalten war.

Durch Vergleich der inserierten Sequenz mit der Humangenom-Referenzsequenz konnte gezeigt werden, dass der 61 bp bzw. 93 bp lange Abschnitt aus Intron 4b des *OPA1*-Gens stammt, wobei aberrantes Spleißen diese Insertion verursacht und die beiden alternativen Insertionen durch die Verwendung der gleichen Akzeptorstelle, aber unterschiedlicher Donorstellen erklärt sind. Sowohl die Insertion der kurzen Variante (61 bp = Exon c) als auch der langen Variante des kryptischen Exons (93 bp = Exon c+) führt zu einem vorzeitigem Stopp-Codon. Dies erklärt den verringerten Anteil von Transkripten des von der Mutter ererbten *OPA1*-Allels am Gesamtpool der *OPA1*-Transkripte aufgrund des Abbaus der mutanten Transkripte durch NMD. Ferner konnte mittels *Western Blot*-Analyse im Fibroblasten-Gesamtzelllysat bei allen Genträgern der *Deep Intronic*-Mutation eine deutlich reduzierte Menge von OPA1 im Vergleich zu Kontrollfibroblasten nachgewiesen werden (siehe Bonifert et al 2014, Abbildung 6).

Um die Ursache des Fehlspleißens zu ermitteln, wurde die komplette DNA-Sequenz von Intron 4b bei einem der betroffenen Geschwister (Proband II:1) ermittelt. Dabei zeigte sich, dass bei diesem Proband und auch bei allen betroffenen Geschwistern und der Mutter ein heterozygoter G>A-Austausch, 364 bp stromabwärts von Exon 4b, bzw. 2 bp vor dem 5'-Ende des kryptischen Exons vorhanden ist (c.610+364G>A). Die Mutation erzeugt ein für Spleißakzeptoren typisches AG-Motiv (siehe III.3), das sich zudem am Rande eines Alu-Elements befindet – einer häufigen Position für *Deep Intronic*-Mutationen (Lev-Maor et al 2003). Während die *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A in allen betroffenen Nachkommen der Familie nachgewiesen werden konnte, waren der Vater, alle nicht-betroffenen Geschwister und selbst 241 DNA-Kontrollproben negativ. Auch in den Daten des *1000 Genomes Project* war die pathogene Variante c.610+364G>A nicht gelistet.

Um die Frequenz der *Deep Intronic*-Mutation als Ursache einer ADOA zu untersuchen und damit auch zusätzliche Evidenz für deren Pathogenität zu gewinnen, wurden insgesamt 369 DNA-Proben von ADOA-Patienten, bei denen Mutationen in der kodierenden Sequenz und den unmittelbar angrenzenden Intronabschnitten vorab ausgeschlossen worden waren, über ein PCR/RFLP-Assay analysiert. Dabei konnten neben einem weiteren unabhängigen Fall mit der gleichen Mutation (c.610+**364**G>A) zusätzlich zwei Familien mit einer G>A-Mutation 4 bp stromaufwärts von c.610+364G>A identifiziert werden. Durch nachfolgende cDNA-Analysen konnte gezeigt werden, dass diese weitere Mutation (c.610+**360**G>A) ihrerseits ein benachbartes kryptisches Akzeptormotiv generiert, jedoch die gleiche Spleißdonorstelle wie Exon c+ der ursprünglich entdeckten c.610+**364**G>A rekrutiert und ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt.

Das durch den Fall der Familie OAK 587 entwickelte Modell zur genetischen Ursache des *OPA1*-assoziierten Behr-Syndroms, ausgelöst durch bi-allelische Kombination der *OPA1*-*Modifier*-Variante p.I437M und einer heterozygoten *Loss-Of-Function* Mutation, konnte durch eine Analyse der Exom-Daten des *NHLBI Exome Sequencing Project* weiter gestärkt werden: Während die p.I437M-Variante in einer Kohorte ohne Behr-Symptomatik mit einer Frequenz von 0,077 % (5 von 6499 Personen, heterozygot) sehr gering war, konnte die Variante in 0,5 % der Familien einer Kohorte mit überlappender Symptomkonstellation (Ataxie, Spastische Paraplegie, periphere Neuropathie) identifiziert werden (3 von 618). In einem dieser Fälle (DUK 2976) konnte in der Tat zusätzlich und in *trans* zur p.I437M eine 1 bp Insertion (c.1316_1317insA, p.N440Kfs*14) im *OPA1*-Gen nachgewiesen werden). Die im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellten klinischen Daten zeigen, dass bei dem betroffenen, 13-jährigen

Patient eine kongenitale Optikusatrophie, periphere Neuropathie und frühkindliche Rumpf- und Extremitäten-Ataxie diagnostiziert wurde. Die durch p.I437M mutmaßlich ausgelösten Veränderungen in der Faltung des OPA1 Polypeptids und die damit einhergehende Fehlfunktion des OPA1-Proteins konnten bislang nicht definitiv aufgeklärt werden. Strukturbiologische Modellierungen, ausgehend von der analogen Aminosäureposition in den Dynaminen DNM1, DNM2 und DNM3, deuten allerdings auf eine lokale Destabilisierung der GTPase Domäne durch den Aminosäureaustausch hin (Oliver Daumke, persönliche Mitteilung).

Der Artikel *Pure and syndromic Optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier* unterstreicht die für OPA1 angenommene enge Korrelation zwischen quantitativen funktionellen OPA1-Mengen und der klinischen Expression. (siehe Diskussion, IV). Während exonische Punktmutationen in den meisten Genen kausaltherapeutisch nahezu unzugänglich sind und allenfalls durch additive Gentherapie behandelt werden könnten, ist die Behandlung von Spleißdefekten auf RNA-Ebene ein gangbarer Weg, auch zur Anwendung bei *Deep Intronic*-Mutationen, wie im folgenden Abschnitt beschrieben und für die in dieser Arbeit identifizierte, c.610+364G>A gezeigt werden konnte (Bonifert et al 2016) (siehe III.4.1).

III.4 Antisense Oligonukleotide: Chemische Derivate, Anwendungsgebiete und klinische Erprobungen

Antisense Oligonukleotide (AON) sind einzelsträngige RNA- oder DNA-Moleküle mit einer Länge von 8 - 50 Nukleotiden, die an homologen Sequenzabschnitten über spezifische Watson-Crick-Basenpaarungen binden. Dies unterscheidet AONs von sogenannten Aptameren (z. B. Macugen, das zur Behandlung der feuchten altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt wurde) und immunstimulatorischen RNAs, die zwar eine ähnliche Größe aufweisen, jedoch hauptsächlich über ihre dreidimensionale Sekundär- und Tertiärstruktur v.a. Proteine binden.

Je nach Lokalisation der Bindestelle und chemischer Modifikation des AON-Moleküls, hat die Bindung an die Zielsequenz unterschiedliche Auswirkungen. Hierbei kann die Ziel-RNA entweder degradiert oder stabilisiert werden, und sowohl die Rekrutierung weiterer zellulärer Faktoren (z. B. für RNA-Interferenz, RNaseH-Abbau) als auch die kompetitive Inhibition spleißosomaler bzw. ribosomaler Interaktionen bewirken. Dies

kann, je nach Bindestelle und chemischer Modifikation des AON, die Genfunktion blocken oder aktivieren.

AONs, die (kryptisches) Spleißen blockieren, müssen chemisch modifiziert werden, um diese Funktion effektiv und spezifisch erfüllen zu können. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten AONs wurden als Oligoribonukleotide mit 2'-O-Methylgruppen an jedem Ribosering, sowie Phosphorothioatgruppen (PTO) über der gesamten Länge des Phosphatrückgrates synthetisiert (2'-O-MePTO) (Siehe Abbildung 9).

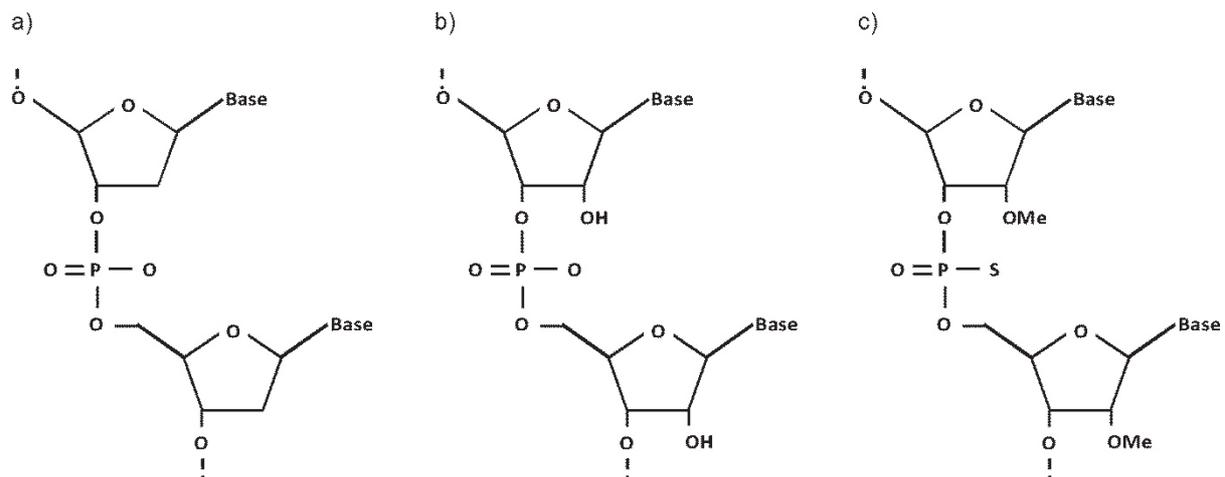


Abbildung 9 DNA, RNA und 2'-O-MePTO Rückgrat im Vergleich

a) = DNA, b) = RNA, c) = 2'-O-MePTO

Dabei dient das PTO-Rückgrat dem Schutz des AONs gegenüber der Degradation durch Exonukleasen und Endonukleasen und erleichtert *in vivo* die Gewebsverfügbarkeit, da PTO-AONs mit einer etwa zwanzigfach höheren Affinität an Plasmaproteine binden und dadurch der renalen Elimination entgehen. Diese Eigenschaft von PTO-AONs erleichtert zusätzlich auch die Interaktion mit zellulären Oberflächenrezeptoren und damit die Endocytose in die Zielzellen (Geary 2009, Pirollo et al 2003). Die Methylierung des C2-Atoms an den Riboseringen des AON dient gleichermaßen der Nuklease-Resistenz, der Erhöhung der Bindungsaffinität zu RNA, einer beschleunigten Hybridisierungskinetik und der Vermeidung eines RNaseH-, bzw. siRNA-vermittelten Abbaus von AON oder Ziel-RNA (Cummins et al 1995, Majlessi et al 1998, Zamaratski et al 2001). Einen Überblick über die chemischen Modifikationen und derzeitigen therapeutischen Anwendungen von AONs bieten Bennett & Swayze, 2010 sowie Sharma & Watts, 2015. Von allen bislang in klinischen Tests untersuchten AONs wurden von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA einzig die Präparate Fomivirsen (Vitravene) und Kynamro (Mipomersen) zugelassen (Stand 11/2016). Beide basieren auf DNA und

bewirken über den RNaseH-Mechanismus einen Abbau der gebundenen Ziel-RNA. Im Zusammenhang mit der Anwendung am Auge sollte vor allem Fomivirsen hervorgehoben werden, welches über die Hybridisierung mit der *Immediate Early* mRNA des Cytomegalovirus die virale Retinitis in erkrankten Patienten bekämpfen soll. Der Wirkstoff wird hierzu intravitreal injiziert und könnte somit methodisch als Vorbild für ähnliche retinale Antisense-basierte Therapieansätze (Siehe III.4) dienen (Anderson et al 1996). Unter den spleißmodulierenden AONs erreichten die Wirkstoffe Drisapersen und Eteplirsen jeweils die klinische Phase II ihrer Zulassung. Beide AONs bewirken ein *Skipping* von Exon 51 des *DMD*-Gens. Dieses X-chromosomale Gen ist mutiert bei der letalen Muskeldystrophie Typ Duchenne, wobei intragenische Deletionen zwischen den Exonen 47-50 zu den am häufigsten beobachteten Mutationen gehören. Diese führen zu einem *Frameshift* und damit zur Degradation der mutanten mRNA oder zu einem verkürzten Protein. Therapeutisches *Skipping* von Exon 51 kann jedoch zu einer Wiederherstellung des Leserasters führen, wobei die resultierenden *in-frame*-deletierten Dystrophin-Proteine eine Restfunktion gewährleisten und die Symptomatik bei betroffenen Patienten dadurch verbessern können. Das dabei entstehende, mildere Krankheitsbild, ist mit dem einer Muskeldystrophie Typ Becker vergleichbar (Kole & Krieg 2015). Neben der Strategie des therapeutischen *Skippings* genuiner Exons, wurden AONs auch eingesetzt, um die mutationsbedingte Inklusion kryptischer Exons zu unterdrücken. Am weitesten sind auf diesem Feld die Studien zur Spleißkorrektur einer *Deep Intronic*-Mutation in *CEP290* gediehen. Die Mutation c.2991+1655A>G generiert eine kryptische Spleißdonorstelle und induziert dadurch die Inklusion eines intronischen Abschnitts in 10–15 % aller Fälle mit *CEP290*-gekoppelter Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA). Xavier Gérard und Kollegen konnten zeigen, dass eine Behandlung mit spleißblockierenden AONs an Patienten-Fibroblasten *in vitro* zu einer Spleißkorrektur und einer deutlichen Verbesserung des subzellulären Pathophänotyps führte (Gerard et al 2012).

III.4.1 **Artikel 2:** Antisense Oligonukleotid-vermittelte Spleißkorrektur einer *Deep Intronic*-Mutation in OPA1

[*Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1*] (Bonifert et al., 2016)

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Anwendung der AON-Technologie zur Spleißkorrektur von *Deep Intronic*-Mutationen lieferten Experimente an Fibroblasten

der Familie OAK 587, die im Jahr 2016 in der Zeitschrift *Molecular Therapy – Nucleic Acids* veröffentlicht wurden (Bonifert et al 2016). Hier wurde die Strategie verfolgt durch die Blockierung der kryptischen Akzeptorstelle im Bereich der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A mittels AONs die Bindung von Spleißfaktoren zu hemmen und dadurch die Insertion der kryptischen Exons zwischen Exon 4b und Exon 5 der reifen mRNAs zu supprimieren, ohne dabei eine Degradation der mutanten mRNA zu bewirken.

Die Lokalisation der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A am Rande eines Alu-Elements erforderte beim Design potenziell effektiver AONs einen verstärkten Fokus auf die Spezifität der Zielsequenz. Hierbei wurden potenzielle AONs mit Hilfe der Software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und einem eigens adaptierten, auf der Software CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>) basierenden Skript mit der humanen Genomsequenz abgeglichen. Die hierbei ermittelten *Off-Target* Interaktionen sowie weitere bioinformatisch prädizierte thermodynamische Parameter wurden, den Empfehlungen von Aartsma-Rus und Kollegen folgend, bei der Auswahl geeigneter AONs berücksichtigt (Aartsma-Rus et al 2009). Zudem wurde versucht, AON-Kandidaten zu ermitteln, die durch Bindung der prä-mRNA im Bereich der *Deep Intronic*-Mutation möglichst viele vorhergesagte Spleißfaktorbindestellen blockieren. Diese Bindestellen, ebenso wie der mutmaßliche *Branch Point*, wurden über die Online Software *Human Splicing Finder* (HSF, <http://www.umd.be/HSF3>) bestimmt. Die vorhergesagten Spleißfaktorbindestellen und die final untersuchten AONs sind in Bonifert et al 2016, Abb. 1 dargestellt, die prädizierten *Off-Target* Effekte in der *Supplementary Table 1* aufgelistet. Auf der Basis der o.g. Maßgaben wurden zwei potenziell geeignete AONs identifiziert und anschließend als 2'-O-methyl-Phosphorothioat Antisenseoligoribonukleotide synthetisiert (Firma Metabion GmbH, Planegg, Deutschland). Diese waren komplementär zu den Abschnitten c.610+346 bis c.610+371 („AC AON“, 26 Nukleotide) bzw. c.610+317 bis c.610+343 („BP AON“, 27 Nukleotide) der *OPA1*-prä-mRNA. Während das AC AON allelspezifisch für die *Deep Intronic*-prä-mRNA designt wurde, kann das BP AON sowohl die prä-mRNA des Wildtyp-Allels als auch jene des mutanten Allels binden. Neben diesen *OPA1*-spezifischen AONs wurde auch ein publiziertes Kontroll-Oligonukleotid mit ähnlicher Länge und chemischen Modifikationen, aber ohne spezifische Bindungsstelle an humane Transkripte synthetisiert (CON AON; adaptiert von Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA).

Die AONs wurden über Polyethylenimine (PEI)-basierte Polyplexe in primäre dermale Fibroblasten der Familie OAK 587 eingeschleust. Dabei ergab die Optimierung der Transfektionseffizienz mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten CON AON einen Anteil von 54 % AON-positiver Nuklei.

Zur Validierung der Effektivität der AONs hinsichtlich der Spleißkorrektur der c.610+364G>A Mutation, wurden die Fibroblasten mit End-Konzentrationen von 250, 90, 30 und 10 nM der AONs transfiziert, anschließend für 24 h inkubiert und dann für die Analyse geerntet. Zum Nachweis und zur Quantifizierung der Spleißkorrektur mutanter Transkripte wurde eine Pyrosequenzierung von RT-PCR Produkten durchgeführt, die durch Wahl der Primerbindestellen und PCR-Bedingungen eine spezifische Amplifikation korrekt gespleißter Transkripte erlaubt (Bonifert et al 2016, Abb. 3). Unter Anwendung der AONs zeigte sich eine sequenz- und konzentrationsabhängige Spleißkorrektur von bis zu 49 % ($p < 0.001$) aller mutanten Transkripte unter Verwendung des AC AON bzw. 16 % für das BP AON (Bonifert et al 2016, Abb. 2a). Wie erwartet hatte das Kontrolloligonukleotid keinerlei Effekte auf die Spleißkorrektur der mutanten Transkripte. Auch „Cocktails“, bei denen AC AON und BP AON zu unterschiedlichen Anteilen gemischt wurden, zeigten keine zusätzlichen synergistischen Effekte. Toxische Nebenwirkungen der AONs in Form von apoptotischen und morphologisch abnormen Zellen wurden vor allem in den Ansätzen mit hoher AON-Konzentration (250 nM bzw. 90 nM, abhängig vom AON), sowie bei geringeren Konzentrationen nach längerer Inkubationszeit beobachtet. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Untersuchungen die AON-Konzentration reduziert.

Für die Bestimmung der zeitabhängigen maximalen Effektivität und der Wirksamkeit einer einmaligen Transfektion über längere Zeiträume wurden 18 Zellkulturflaschen zeitgleich mit einer Endkonzentration von 20 nM des AC AON transfiziert und in Triplikaten nach einem, zwei, vier, acht, 16 und 32 Tagen geerntet. Die Analyse der verschiedenen Ansätze mittels Pyrosequenzierung ergab eine zeitabhängige Effektivität der Wirkung, die zunächst stark anstieg (mit einer maximalen Spleißkorrektur von 55 % nach vier Tagen) und anschließend mit einer halbmaximalen Korrektur von 27,5 % nach zehn Tagen wieder abfiel. 16 Tage nach Transfektion der Zellen konnte eine Restkorrektur von ca. 7 % nachgewiesen werden. Spätestens einen Monat nach Transfektion waren keine korrekt gespleißten Transkripte des mutanten Allels mehr nachweisbar (Bonifert et al 2016, Abb. 2b). Inwiefern dies an der wiedereinsetzenden Zellteilung und dem damit einhergehenden Verdünnungseffekt der AONs, der Degradation der AONs oder beidem liegt, wurde im Rahmen dieser Studie jedoch nicht bestimmt.

Um die Reproduzierbarkeit der Spleißkorrektur zu prüfen, wurden alle sechs verfügbaren Fibroblasten-Zelllinien aus zwei Familien mit der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A mit 20 nM des AC AON behandelt und die Effektivität 48 h nach der Transfektion isoliert. Die behandelten Zellen zeigten unabhängig von Alter, Geschlecht und Familienzugehörigkeit eine deutliche und homogene Spleißkorrektur unter AON-Behandlung (Bonifert et al 2016, Abb. 2c), jedoch keine korrekt gespleißten Transkripte ohne Behandlung.

Die Analyse auf Proteinebene zeigte in AC AON behandelten Fibroblasten eine um etwa 35 % erhöhte Menge an OPA1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen der gleichen Patientenzelllinie. Hierbei handelte es sich um einen spezifischen Effekt, da eine AC AON-Behandlung von entsprechenden Kontrollfibroblasten ohne Mutation keine Erhöhung der OPA1-Menge bewirkte (Bonifert et al. 2016, Abb. 2d-f).

Der Artikel *Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1* zeigt, wie ein Spleißdefekt, verursacht durch eine *Deep Intronic*-Mutation in *OPA1*, mittels Antisense-Technologie effektiv korrigiert werden kann. Diese Studie beschreibt damit die erste Spleißkorrektur einer *Deep Intronic*-Mutation bei einer Mitochondriopathie. Aus technischer Sicht zeigen die Ergebnisse, dass die Messung von allelischem Ungleichgewicht auf Transkriptebene mittels Pyrosequenzierung von cDNA eine sehr präzise Methode darstellt, um die quantitativen Effekte der AON-Technologie bei Heterozygotie für die Mutation nachzuweisen. Wie bereits in vorausgegangenen Studien gezeigt wurde, erzielt man bei der Anwendung von AONs nur transiente Effekte, dies gilt für *in vitro*-Studien wie die hiesige, aber auch für *in vivo*-Behandlungen. Dies hat zur Folge, dass bei chronischen oder erblichen Erkrankungen wiederholt und ggf. lebenslang AONs verabreicht werden müssen, um den therapeutischen Effekt dauerhaft aufrechtzuerhalten, wobei mögliche Langzeitnebenwirkungen bislang nicht erforscht sind. Wünschenswert wäre daher eine dauerhafte Korrektur des Spleißdefekts. Bei exonischen Mutationen käme hier derzeit nur eine klassische additive Gentherapie in Frage, im Falle der *Deep Intronic*-Mutationen eröffnen allerdings neue *Gene Editing*-Technologien möglicherweise elegantere Lösungen.

III.5 Gezielte Mutagenese zur Korrektur von Spleißmutationen mittels *Genome Editing*

Genome Editing bezeichnet die gezielte, dauerhafte Veränderung eines definierten DNA-Abschnitts innerhalb des Genoms. Die derzeit etablierten Techniken zum *Genome*

Editing verwenden DNA-Nukleasen, die in einem ersten Schritt Doppelstrangbrüche in zuvor definierten Sequenzabschnitten des Genoms katalysieren. Diese DNA-Doppelstrangbrüche können anschließend durch zwei unterschiedliche zelluläre Mechanismen repariert werden (s. u.), wodurch an der Schnittstelle eine fehlerbehaftete Reparatur des Doppelstrangbruchs oder mittels Rekombination ein Austausch gegen einen spezifischen experimentell oder therapeutisch erwünschten Sequenzabschnitt erfolgt. Zu den derzeit gebräuchlichsten Methoden auf diesem Gebiet gehören die *Zinc-Finger-Nukleasen* (ZFN), Meganukleasen, *TAL-effector-Nukleasen* (TALEN) und *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated genes* (CRISPR/Cas)- Systeme (Gaj et al 2013).

III.5.1 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen: NHEJ oder HDR?

Unabhängig von der Ursache eines DNA-Doppelstrangbruchs können von der Zelle zwei unterschiedliche DNA-Reparatursysteme verwendet werden, um die chromosomale Integrität wieder herzustellen. Ist eine direkte präzise Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenz nicht möglich, so kann in der S- und G2-Phase des Zellzyklus das neusynthetisierte Schwesterchromosom als Matrize verwendet werden, um mittels homologer Rekombination den Doppelstrangbruch verlustfrei zu reparieren (*Homology Directed Repair* = HDR). Der HDR Mechanismus wird auch beim *Genome Editing* genutzt, wobei statt des natürlichen homologen Chromosoms ein artifizielles, zumindest partiell homologes, einzel- oder doppelsträngiges DNA-*Template* als Reparaturmatrize verwendet wird. Dies kann einerseits im Rahmen wissenschaftlicher Fragestellungen zur Insertion von Reportergenen und der Generierung spezifischer Punktmutationen (*Knock-in*) verwendet werden, oder andererseits für therapeutische Ansätze zur Korrektur mutierter Allele eingesetzt werden. Diese Strategien unter Ausnutzung des HDR-Mechanismus sind – zumindest derzeit – sehr ineffizient. Weitaus häufiger werden Doppelstrangbrüche über Nicht-Homologe End-zu-End Verknüpfung (*Non-homologous End-joining* = NHEJ) repariert. Bei diesem Mechanismus werden die freien DNA-Enden an der Stelle des Doppelstrangbruchs durch Exonukleasen verkürzt oder durch Deoxynucleotidyltransferasen verlängert, wodurch kurze Bereiche einzelsträngiger DNA entstehen. Durch Wiederanlagerung und anschließende Re-Ligation der Enden wird ein physikalisch intaktes DNA-Molekül wiederhergestellt. Eine derartige chromosomale Resektion und Reparatur über den NHEJ-Weg führt in nahezu allen Fällen zu genetischen Läsionen (zumeist kleineren Deletionen oder Insertionen) im Bereich der Bruchstelle. Eine NHEJ-Reparatur in kodierenden oder regulatorischen Genbereichen

hat daher zumeist einen Funktionsverlust dieser Abschnitte bzw. des davon betroffenen Gens zur Folge (für einen Überblick zur NHEJ-Reparatur, siehe Weterings et al 2008). Beim *Genome Editing* macht man sich daher den NHEJ-Weg insbesondere zum „Ausschalten“ von Genen (*Knockout*) zu Nutze.

III.5.2 Erzeugung von DNA Doppelstrangbrüchen mit CRISPR/Cas9

Zu den neuesten Entwicklungen im Bereich sequenzspezifischer DNA-Nukleasen gehört die Adaptierung eines prokaryontischen Immunabwehrmechanismus für die Erkennung und Spaltung eukaryontischer DNA. Das Typ II *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9* (CRISPR/Cas9) Abwehrprinzip besteht natürlicherweise aus einem Dreikomponentensystem: Der *CRISPR*-RNA (crRNA), der *Tracer*-RNA (tracrRNA) und der Cas9-Nuklease. Der prokaryontische Mechanismus dieser adaptiven Immunantwort funktioniert in mehreren Schritten. Gelingt es der Bakterienzelle eingedrungene Fremd-DNA durch unspezifische Abwehrmechanismen erfolgreich zu fragmentieren, so können kurze Abschnitte der fremden DNA-Sequenz als sogenannter „*Protospacer*“ in den genomischen CRISPR-Lokus der Wirtszelle integriert werden. Im dortigen *CRISPR-Array* alternieren *Protospacer*-Motive und identische Sequenzabschnitte, den sogenannten „*Repeats*“. Nach Transkription und Prozessierung entstehen crRNAs, die aus je einem *Protospacer* und einem Repeat bestehen. Der *Protospacer* hybridisiert mit der DNA-Zielsequenz (z. B. dem viralen Genom), während der *Repeat*-Bereich (ein unabhängiges RNA-Molekül) die tracrRNA, bindet. Diese wiederum rekrutiert nach Bindung an die crRNA die Cas9-Nuklease, welche an der *Protospacer*-Bindestelle einen DNA-Doppelstrangbruch erzeugt. Weitere Studien ergaben, dass crRNA und tracrRNA auch als fusionierte, sogenannte *guide*-RNA (gRNA) funktionieren (Jinek et al 2012) (siehe Abbildung 10). Darüber hinaus machten Codon-Optimierungen und Promotoranpassungen das CRISPR/Cas9-Prinzip für eukaryontische Systeme zugänglich, somit also auch für humane Zellen.

Zwischenzeitlich wurden auch sogenannte *All-in-one* Plasmide entwickelt, die gleichzeitig gRNA-Abschnitte, das *Cas9*-Gen, Resistenz- oder Markergene zur Selektion in prokaryontischen Expressionssystemen (z. B. Antibiotikaresistenzgene) und eukaryontischen Zielzellen (Resistenzgene, GFP), sowie spezifische Promotoren zur Expression im Zielorganismus/Zelltyp enthalten. Die spezifischen *Protospacer*-Sequenzen werden dabei durch DNA-Oligonukleotid-Hybridisierung und anschließende *Golden-Gate*-Ligation in diese Plasmide inkloniert (Ran et al 2013). Im Unterschied zu TALEN und *Zinc-Finger* Nukleasen lassen sich die ca. 20 bp langen *Protospacer* äußerst

Konsequenzen. *Deep Intronic*-Mutationen befinden sich per Definition in nicht-kodierenden Genabschnitten und weit entfernt von den Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen der jeweiligen genuinen Exons.

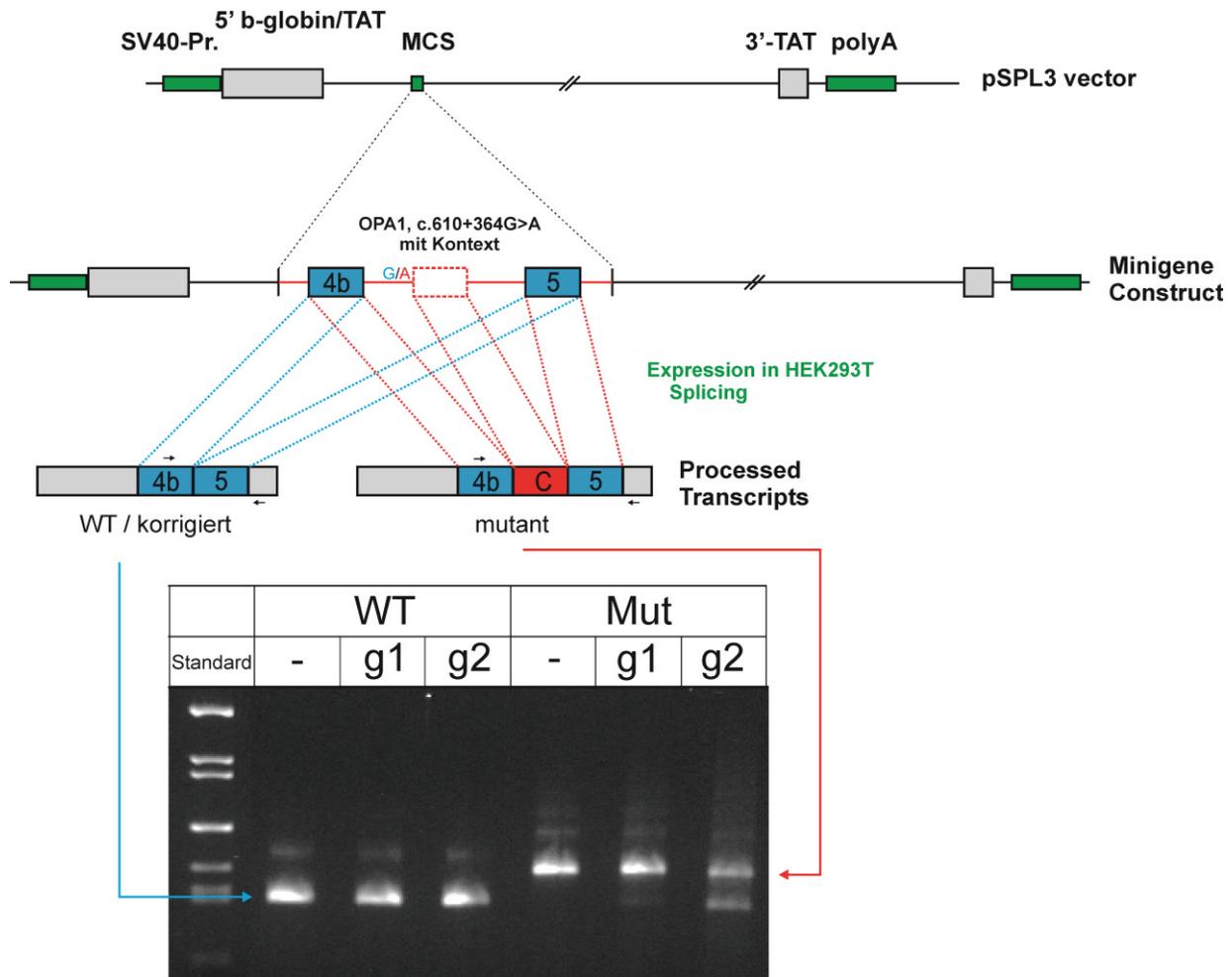


Abbildung 11 CRISPR/Cas9 induzierte Wiederherstellung des korrekten Spleißens in Minigene-Konstrukten zur Analyse der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A in OPA1 Exon 4b

Ein genomischer Abschnitt des OPA1-Gens (1,7 kb; von Intron 4 bis Intron 5), wurde in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) des Minigene-Vektors pSPL3 kloniert. Die Expression von Konstrukten mit der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A liefert fehlgespleißte Transkripte, bei denen das kryptische Exon c inseriert ist, während bei der Expression des korrespondierenden WT-Konstrukts die Transkripte korrekt gespleißt werden. Bei der Kotransfektion mit *All-in-one* CRISPR-Plasmiden mit g1 oder g2 *guide*-RNA-Sequenz ist eine partielle Korrektur des Spleißdefekts (insbesondere mit CRISPR-Plasmiden mit der g2 *guide* RNA-Sequenz) in der RT-PCR zu beobachten. Das korrekte Spleißen des WT-*Minigene*-Konstrukts wird durch die Kotransfektion mit den CRISPR-Plasmiden nicht beeinflusst (Gelspur: WT/g1 und WT/g2).

Eine durch NHEJ-vermittelte fehlerhafte Reparatur an der Stelle der *Deep Intronic*-Mutation bzw. im unmittelbar daran angrenzenden Bereich sollte in der Mehrzahl der „editierten“ DNA-Moleküle das durch die *Deep Intronic*-Mutation neu

entstandene/aktivierte Spleißerkennungsmotiv zerstören und damit das korrekte Spleißen zwischen den angrenzenden genuinen Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen wiederherstellen (siehe Abbildung 11). Eine wichtige Voraussetzung ist dabei allerdings die Präsenz eines PAM-Motivs in der Zielsequenz (siehe Abbildung 10) und eine niedrige *Off-Target*-Bindungswahrscheinlichkeit der gRNA.

In einem Pilotexperiment am Beispiel der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364g>A im *OPA1*-Gen sollte die Wirksamkeit dieser neuartigen Strategie gezeigt werden. Dazu wurden *Protospacer*-Elemente zur Expression zweier verschiedener zielsequenzspezifischer *guide* RNAs [*guide*-RNA 1 (g1), Zielsequenz: ATTTGTTTTCCGGCC~~A~~GGCG und *guide*-RNA 2 (g2), Zielsequenz: TGTTTTCCGGCC~~A~~GGCGCGG] jeweils in das Plasmid *pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458)* (Addgene, Cambridge, USA; Plasmid #48138) bzw. *pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0* (Addgene, Plasmid #62988) (Ran et al 2013) kloniert. Anschließend wurden HEK293T-Zellen über Nacht bei 37 °C mit den klonierten CRISPR-Plasmiden und einem Spleiß-Reportersystem (*OPA1-Minigene* mit flankierender genomischer Sequenz von Exon 4b bis Exon 5 in Vektor pSPL3, siehe Abbildung 11) mittels *Lipofectamine 2000* kotransfiziert. Nach zweitägiger Kultur bei niedriger Temperatur (30 °C) wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA und DNA isoliert. Die qualitative cDNA-Analyse mittels RT-PCR und Primern in Exon 4b (fw) und Tat2-Exon (rv) des pSPL3-*Minigene*-Konstrukts zeigte eine deutliche Veränderung des Bandenmusters an RT-PCR Produkten in den mit g1 und g2 transfizierten Ansätzen und die Präsenz korrekt gespleißter Transkripte (siehe Abbildung 11).

Die Einzelklonanalyse der editierten *Minigene*-Plasmide zeigte, ausgehend von den Cas9-Schnittstellen, ein breites Spektrum an Deletionen mit fehlenden Abschnitten von z.T. mehreren hundert Basen Länge. Diese unerwartet großen Deletionen erklären sich möglicherweise durch die (im Unterschied zu humanen Chromosomen) ringförmige und nukleosomal atypisch verpackte Architektur von transfizierten Plasmiden, die eine NHEJ-basierte Re-Ligation der linearisierten Abschnitte erschweren könnte (siehe Diskussion, IV.4.5).

Eine Ko-Elektroporation von CRISPR-Plasmid und *OPA1-Minigene* in primäre Fibroblasten zeigte ähnliche Ergebnisse, allerdings mit reduzierter Effizienz. Die eingebrachten Plasmide wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen isoliert und auf Deletionen hin analysiert (IPCR>RFLP>Subklonierung). Insgesamt konnten zehn unabhängige Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes isoliert und zurück in den *Minigene*-Vektor pSPL3 kloniert werden. Eine Transfektion von HEK293T- und 661W-

Zellen mit diesen intern deletierten Plasmiden ergab, dass trotz unterschiedlichen Umfangs der Deletionen (10 bp bis 697 bp) im intronischen Abschnitt von Intron 4b (zwischen c.610+111T und c.611-117G) sämtliche deletierten *Minigenes* korrekt zwischen Exon 4b und Exon 5 gespleißte Transkripte kodieren (siehe Abbildung 12). Einzige Ausnahme stellte eine 39 bp Deletion dar (c.610+364_402del), die offenbar ein neues (nicht-vollständig penetrantes) Akzeptor-Motiv erzeugte (...gttttccggcc-agGCca...), wie das resultierende Bandenmuster und die bioinformatische Vorhersage mittels *Human Splicing Finder* (HSF-Score: 92.05) nahelegen (siehe auch IV.4.5).

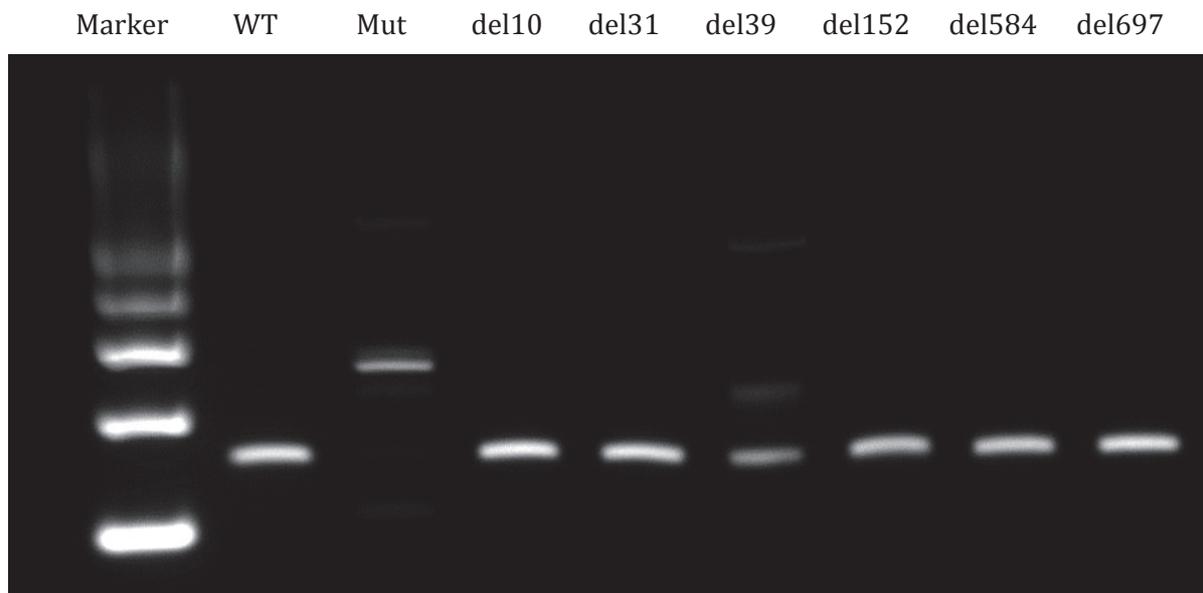


Abbildung 12 Amplikons intern deletierter transfizierter *Minigene*-Konstrukte

Die qualitative cDNA-Analyse der aus HEK293T und 661W-Zellen isolierten Transkripte von mittels CRISPR intern deletierten *Minigene*-Konstrukten zeigt die Unterschiede zwischen Spleißprodukten des Wildtyp- (WT) und mutanten (Mut) Konstrukts. Die Deletion verschieden großer Abschnitte von Intron 4b (del10 – del 697) führt bei allen deletierten Konstrukten zu einer Wiederherstellung des WT-Spleißmusters, mit Ausnahme des del39 Konstrukts, das eine neue Akzeptorstelle aktiviert.

Die Anwendung des Ansatzes für eine direkte Editierung am endogenen Genort in Patienten-Fibroblasten mit der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A wurde mittels Elektroporation (Nucleofector 2b, Lonza GmbH, Köln, Deutschland) einer GFP-kodierenden Version der g1/g2 CRISPR-Plasmide (Addgene #48138) und anschließender FACS-basierter Anreicherung erfolgreich transfizierter Zellen untersucht. Etwa 3 % der aus den FACS-angereicherten und PCR-amplifizierten *OPA1*-Abschnitte aus diesem Versuch zeigten am vorhergesagten Schnittpunkt eine 1 bp Deletion. Diese befindet sich 4 bp stromabwärts von der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A, verursacht jedoch laut HSF keine wesentliche Änderung im Score des Spleißakzeptor-Motivs für das kryptische Exon c(+). Entsprechend konnte auch mittels

Pyrosequenzierung von cDNA-Amplikons dieses Ansatzes keine Spleißkorrektur detektiert werden (für nähere technische Informationen, siehe Anhang VIII.5).

Die Ergebnisse des Pilotversuchs zur CRISPR-basierten Zerstörung eines kryptischen Spleißakzeptormotivs mittels gezielter NHEJ-basierter Fehlreparatur zeigen eine vielversprechende Spleißkorrektur an einem Plasmid-basierten *Minigene*-Konstrukt, jedoch bislang eine sehr geringe Effizienz am endogenen Genort (siehe IV.4.5). Diese Ergebnisse sollten durch weitere Experimente bestätigt werden.

Sowohl die AON-Therapie als auch die CRISPR-basierte „Gen-Korrektur“ oder auch andere pharmakologische Ansätze, zur Behebung einer OPA1-Defizienz, erfordern eingehende prä-klinische Untersuchungen, bevorzugt *in vivo* an einem Säugetiermodell (z.B. Maus). Da die derzeitig verfügbaren Mausmodelle aufgrund der langsamen Progression des visuellen Funktionsausfalls und der Degeneration der retinalen Ganglienzellen diesbezüglich recht ungeeignet erschienen, wurde in einem weiteren Projekt versucht, ein Behr-Syndrom-Mausmodell zu generieren.

III.6 Mausmodelle für *OPA1*-assoziierte ADOA

Die biologische Funktion neu-entdeckter Gene wird typischerweise nicht nur *in vitro*, sondern auch mittels reverser Genetik an Modellorganismen untersucht. Diese Herangehensweise ermöglicht es, anhand von Gen-*Knockouts* oder gezielter Mutagenese (meist über homologe Rekombination), die Funktion eines bestimmten Gens bzw. einer spezifischen Mutation in einem systemischen und entwicklungsbiologisch natürlichen Kontext zu analysieren. Bei Genen mit Bezug zur Erkrankungen beim Menschen sind diese Modelle von besonderer Bedeutung um die jeweilige Pathogenese der Erkrankung zu verstehen und potenzielle Therapieoptionen präklinisch zu testen.

Ein solcher Bedarf an geeigneten Säugetiermodellen besteht auch für die *OPA1*-assoziierten Optikusneuropathien im Kontext mit der vergleichsweise hohen Prävalenz solcher Erkrankungen und der zunehmenden Komplexität der beschriebenen Begleitsymptome.

Bislang wurden insgesamt vier *Opa1*-Mauslinien, drei davon mit einer Mutation am endogenen Genort, beschrieben. Die in unserer Arbeitsgruppe in früheren Arbeiten charakterisierte Linie OPA1^{M1BeWi} (fortan: *Opa1*^{+/-}) trägt eine mittels ENU-Mutagenese induzierte Spleißmutation (c.1065+5G>A) und bewirkt das Skipping von

Exon 10. Dies führt zum Funktionsverlust des entsprechenden Allels und hat bei heterozygoten Tieren eine Abnahme der OPA1-Gesamtproteinmenge um 50 % zur Folge (Alavi et al 2007). Ähnlich dem Phänotyp von ADOA-Patienten entwickeln heterozygote *Opa1*^{+/-} Mäuse eine schleichend progrediente Optikusatrophie mit reduzierter Penetranz und leichte extraokuläre Symptome (Alavi et al 2009), wie sie auch bei Patienten mit apparent isolierter Optikusatrophie beschrieben wurden (Baker et al 2011).

Zeitgleich mit der Tübinger *Opa1*^{+/-}-Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe von Marcela Votruba in Cardiff eine weitere *Opa1*-Linie beschrieben, die durch eine Stopp-Mutation in Exon 8 (Q285*) ebenfalls eine reduzierte *Opa1*-Gesamtproteinmenge und einen ähnlichen Phänotyp aufwies (Davies et al 2007).

Während die extraokulären Symptome der Tübinger Mauslinie eher subtiler Natur waren, wies die dritte Mauslinie der Arbeitsgruppe von Guy Lenaers in Montpellier neben einer führenden Optikusatrophie (ab ca. 5 Monaten) auch deutliche syndromale Manifestationen auf, darunter Ataxie und Schwerhörigkeit, sowie organische Veränderungen und subzelluläre Störungen mit zerebellärer Atrophie, aberranter Muskelfaserultrastrukturen und einer erhöhten Autophagierate. Die zugrunde liegende Genveränderung wurde in diesem Fall mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt und ist homolog zu einer 4 bp Deletion, die in etwa 17 % aller gelösten Fälle von isolierter ADOA vorliegt (c.2708_2711delTTAG) (Sarzi et al 2012). In keiner der drei Mauslinien wurden lebende homozygot mutante Tiere beobachtet. Embryonalstudien ergaben, dass Föten ohne funktionelles *Opa1*-Allel zwischen Tag E 8.5 und E 12.5 *in utero* versterben und resorbiert werden (Alavi et al 2007)

Die Strategie hinter der vierten *Opa1*-Mauslinie folgte einem anderen Konzept. Bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen konnte ein subzellulär fragmentiertes mitochondriales Netzwerk nachgewiesen werden, so z. B. auch bei Morbus Alzheimer (Wang et al 2009). Dieses entsteht zumeist durch erhöhte proteolytische Prozessierung und damit Solubilisierung des OPA1-Proteins im mitochondrialen Intermembranraum (Siehe III.1.7). Folglich, so die Annahme, könnte eine gentechnisch generierte Überexpression von OPA1 der Fragmentierung der Mitochondrien entgegenwirken bzw. diese verlangsamen. Tatsächlich führte eine solche Überexpression zu einer Wiederherstellung der normalen Cristae-Struktur in einem murinen Parkinson-Modell (Ramonet et al 2013). Im Jahr 2013 veröffentlichten Cogliati und Kollegen das erste *Opa1*-Mausmodell mit systemischer Überexpression von OPA1. Dieses wurde durch genomische Integration einer *Opa1*-cDNA-Isoform (Isoform 1, ohne Exons 4b und 5b) am X-chromosomalen *Hprt*-Lokus unter Kontrolle des β -ACTIN-Promotors generiert.

Nach Kreuzung dieser Linie mit zwei Mausmodellen mit hereditären neurodegenerativen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass die leichte Überexpression von OPA1 tatsächlich neuroprotektive Wirkung zeigte, jedoch auf Kosten einer erhöhten Rate von kanzerösen Veränderungen (Varanita et al 2015). Unklar blieb hierbei jedoch, welchen Anteil die artifizielle Architektur des *Opa1*-Konstrukts (ohne alternative Exons, regulatorische Bereiche und veränderte genomische Lokalisation) an den neuroprotektiven bzw. tumorigenen Effekten hatte.

Alle drei Mausmodelle mit Mutation am endogenen *Opa1*-Lokus haben den Nachteil, dass die Tiere erst im reifen Adultstadium Symptome entwickeln, und die Ausprägung und Progression dieser Symptome interindividuell stark variieren. Damit entspricht keines dieser Mausmodelle dem frühkindlichen Behr-Syndrom. Ein solches Model böte jedoch durch die sich früh und rasch progressiv entwickelnde Symptomatik ein deutlich besser geeignetes Studienobjekt zur Untersuchung der Pathogenese und Pathobiochemie von ADOA und für die der präklinischen Evaluation von potenziellen Therapeutika. Um die möglichen protektiven Effekte einer OPA1-Überexpression zu untersuchen, ist jedoch auch das transgene *Opa1*-Mausmodell von Cogliati und Kollegen nur mäßig geeignet, da in diesem Fall die natürliche quantitative Regulation der Expression am endogenen Genort und die differentielle Funktion der *Opa1*-Spleißisoformen nicht berücksichtigt ist.

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war daher die Generierung und Untersuchung eines Mausmodells mit *Opa1*-assoziiertem Behr-Syndrom und eines mit stark überexprimiertem, modifiziertem *Opa1*.

III.6.1 **Artikel 3 (unveröffentlicht): Ein transgenes Mausmodell für das OPA1-assoziierte Behr-Syndrom**

[A transgenic mouse model for OPA1-associated early-onset Behr Syndrome]
(Bonifert et al., in prep.)

Ursache der bislang beschriebenen Fälle von OPA1-assoziiertem Behr-Syndrom sind fast ausschließlich bi-allelische OPA1-Mutationen, wobei in der Mehrzahl der Fälle das *Modifier*-Allel p.I437M in trans zu einer trunkierenden Mutation auf dem homologen Chromosom vorliegt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie versucht, durch eine Kombination aus Transgenese und Verkreuzung mit der vorhandenen Tübinger *Opa1*^{+/-}-Linie einen analogen Genotyp zu erzeugen. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe des *Counter Selection BAC Modification Kit* der Firma Gene Tools (Gene Bridges

GmbH, Heidelberg, Germany) ein *Bacterial Artificial Chromosome (BAC)* mit der gesamten murinen *Opa1*-Sequenz, inklusive aller Introns, sowie ~33 kb genomischer Sequenz stromaufwärts und ~61 kb stromabwärts (insgesamt 178 kb) modifiziert. In dieses BAC wurde mittels *Recombineering* die dem p.I437M-Modifier-Allel homologe Mutation c.1200A>G/p.I400M (NM_001199177.1, NP_001186106.1) sowie zwei exonflankierende LoxP Stellen eingefügt (siehe Manuskript Bonifert et al in prep., Abb. 2). Das validierte BAC-Konstrukt wurde anschließend bei der Firma Cyagen (Cyagen Biosciences Corporation, Santa Clara, CA, USA) per Pronukleus-Injektion in murine Oozyten injiziert. Die daraus resultierenden neun F₀-Tiere (Linie *Opa1*-BAC-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -H und -I) trugen 1-5 Kopien des Transgens, wie mit Hilfe relativer Quantifizierung durch Pyrosequenzierung von p.I400M-Allelen im Vergleich zu den endogenen Wildtyp-Allelen ermittelt werden konnte. Mit Ausnahme der Linien *Opa1*-BAC-B und -BAC-C vererbten alle F₀-Tiere das Transgen an etwa 50 % ihrer Nachkommen der F₁-Generation. Das relative Verhältnis von Transgen- zu Endogenkopien blieb auch über sechs beobachtete Generationen stabil, was auf eine Tandem-Integration der Transgenkopien hindeutet. Eine Ausnahme bildete hier die Linie *Opa1*-BAC-G, deren Nachkommen eine bzw. zwei Transgenkopien aufwiesen und daher in der weiteren Zucht in die Sublinien *Opa1*-BAC-G α (1) und -BAC-G β (2) aufgespalten wurde. Bei der Pronukleus-Injektion wurde zirkuläre BAC-DNA verwendet. Die Integration in das Mausgenom erfordert daher einen Bruch des BAC-Konstruktes. Die Stelle an der ein solcher Bruch erfolgt ist dabei nicht vorhersagbar und kann dadurch zu einer Unterbrechung bzw. Reorganisation des *Opa1*-Transgens und damit zu einem Funktionsverlust führen. Daher wurde die Expression der Transgenkopien auf RNA-Ebene untersucht. Hierbei waren zwei Parameter von Interesse: 1. das relative Mengenverhältnis von Transgentranskripten zu endogenen *Opa1*-Transkripten in unterschiedlichen Geweben als Hinweis auf eine natürliche gewebsspezifische Regulation und 2. das relative Verhältnis von intakten Transkripten des *Opa1*-Transgens zu endogenen Transkripten als Hinweis auf nicht intakt integrierte Transgenkopien bzw. fehlerhafte und verkürzte *Opa1*-Transkripte. Die quantitative cDNA-Analyse mittels Pyrosequenzierung an der *Modifier*-Position c.1200A>G/p.I400M in zehn unterschiedlichen Geweben zeigte unabhängig von der Transgen-Kopienzahl ein konstantes Verhältnis zwischen endogenen und transgenen *Opa1*-Transkripten (siehe Manuskript Bonifert et al in prep. Abb. 3). Dies belegt eine intakte gewebsspezifische Regulation des Transgens. Die Anzahl intakter Transgentranskripte jeder Linie wurde mittels überlappender *Long Distance* PCRs bestimmt. Dazu wurde die *Opa1*-cDNA mit Primern in Exon 1 und Exon 15, bzw. in Exon 11 und Exon 30 amplifiziert und

anschließend jeweils in einer Re-PCR ein kleinerer Abschnitt für die quantitative Analyse über das etablierte Pyrosequenzierungs-Assay re-amplifiziert (siehe Manuskript Bonifert et al in prep. Supplementary Figure S2). Diese Analyse ergab, dass Linie *Opa1*-BAC-A kein intaktes *Opa1*-Transgen exprimiert und Linie *Opa1*-BAC-G α (1) auch nur eine einzige intakte *Opa1*-Transgenkopie. Auch in den übrigen Linien musste auf der Basis dieser Ergebnisse die relative Zahl der intakten Transgen-Transkripte nach unten korrigiert werden (siehe Manuskript Bonifert et al in prep. Tab. 1). Die ausgehend von der Analyse eines kurzen cDNA-Abschnitts abgeleiteten, ursprünglichen Mengenanteile an Transgen-Transkripten scheinen somit zum Teil auch von nicht-intakten Transkripten, die nicht oder nicht vollständig durch den NMD-Mechanismus destruiert werden, zu stammen.

Auf Proteinebene wurden die OPA1-Mengen mittels *Western Blot* in drei unterschiedlichen Geweben (Gehirn, Retina und Leber) untersucht. Die erhöhte OPA1-Menge entsprach in allen Fällen annähernd jener, die ausgehend von der quantitativen Analyse intakter *Opa1*-Transkripte zu erwarten gewesen war (siehe Manuskript Bonifert et al in prep. Abb. 4). Anders als bei der cDNA-Analyse mittels Pyrosequenzierung, welche Auskunft über den relativen Anteil der allelischen Transkripte am Gesamt *Opa1*-Transkriptpool gibt, lässt die *Western Blot*-Methode keine allelische Unterscheidung zwischen den Protein-Isoformen zu. Mittels Massenspektrometrie wurde daher die Expression des Transgens auf Proteinebene untersucht. Durch den Nachweis von OPA1-Peptiden mit entsprechendem Massen-*Shift* konnte die Präsenz der vom Transgen exprimierten Isoform mit der p.I400M-Substitution nachgewiesen werden. Mittels semiquantitativer Massenspektrometrie von Proteinlysaten des Gehirns konnte zudem gezeigt werden, dass bei den untersuchten Mauslinien *Opa1*-BAC-G α (1) und *Opa1*-BAC-D(1) ein Anteil mutanter Peptide von 37 % (in der Linie *Opa1*-BAC-G α (1)) bzw. 26 % (in der Linie *Opa1*-BAC-D(1)) vorlag. Dies entspricht annähernd jenen 33 %, die bei einem einzelnen intakten Transgen zu erwarten waren.

Somit konnte gezeigt werden, dass in der Mehrzahl der generierten Linien ein oder mehrere Kopien des BAC-Konstrukts korrekt ins Mausgenom integriert sind, stabil vererbt und gewebsspezifisch transkribiert werden und zudem zu einer Erhöhung der Gesamtmenge an OPA1-Protein führen.

Die Haltung und Zucht transgener Tiere erfordert eine Beurteilung bezüglich der Leiden, Schmerzen und Schäden, die durch die genetische Veränderung hervorgerufen werden. Eingehende Beobachtungen und Untersuchungen des Nachwuchses aller *Opa1*-BAC-Linien ergaben keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen jeglicher Art. Dies wurde

zusätzlich durch ausführliche Verhaltenstests, motorische Funktionsuntersuchungen und äußerliche Inspektion an Tieren mit sechs funktionellen Transgenkopien, hervorgegangen aus einer Kreuzung zwischen den Linien E und H, bestätigt. Insbesondere konnten keine neuromuskulären Defizite oder eine Häufung kanzeröser Veränderungen, selbst bei alten Tieren, festgestellt werden (siehe IV.5.2.3). Somit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der p.I400M-OPA1-Proteinisoform bei gleichzeitiger Präsenz der endogenen OPA1-Isoform keine gesundheitliche Beeinträchtigung der Tiere nach sich zieht.

In einer zweistufigen Verpaarungsprozedur wurden die Linien *Opa1*-BAC- $\text{G}\alpha(1)$ (eine Transgenkopie (Tg)), -BAC-D(1) (eine Transgenkopie) und I (zwei Transgenkopien) mit heterozygoten Tieren der *Opa1*^{+/-}-Linie von Alavi et al., gekreuzt. Ziel war es dabei, Tiere mit dem Genotyp *Opa1*^{-/-}/BAC-X (d.h. homozygot mutant am endogenen Locus und komplementiert durch eine oder zwei Kopien des Transgens) analog zum Genotyp der Patienten in der Familie OAK 587 (Bonifert et al. 2014) zu erzeugen und sie mit Wildtyp-Wurfgeschwistern phänotypisch zu vergleichen. Bei dem verwendeten Verkreuzungsschema waren ein Anteil von 12,5 % an Jungtieren mit dem gewünschten mutanten Genotyp zu erwarten. Während bei Verwendung der Linie *Opa1*-BAC- $\text{G}\alpha(1)$ keine Jungtiere mit dem gewünschten Genotyp geboren wurden (0/132), betrug deren Zahl bei Verwendung der Linie *Opa1*-BAC-D(1) 21/113 und bei der Linie *Opa1*-BAC-I(2) 14/58. Bei den entsprechenden Jungtieren ausgehend von der BAC-Linie-D(1) wurden bis zum finalen Beobachtungsalter von 4-5 Wochen keine augenscheinlichen Auffälligkeiten (wie z.B. Minderwuchs oder apathisches Verhalten) beobachtet. Aufgrund von Problemen bei der Genotypisierung konnten diese Tiere leider nicht weiter untersucht werden. Bei den entsprechenden Jungtieren ausgehend von der Linie *Opa1*-BAC-I(2) wurden nach eingehenden Verhaltenstests keine phänotypischen Auffälligkeiten hinsichtlich neurodegenerativer Prozesse bis zum Alter von 6 Monaten beobachtet. (siehe IV.5.2.2).

IV. Diskussion

Die Aufklärung der genetischen Ursachen erblicher Optikusatrophien ist bis heute eine große Herausforderung. Trotz enormer technischer Fortschritte nahm der Prozentsatz gelöster Fälle nicht in der Weise zu, die die Möglichkeiten der neuen Sequenzieretechniken anfangs zu versprechen schienen. Andererseits werden in klinischer und biologischer Hinsicht vier Entwicklungen immer offensichtlicher:

1. Mit der Beschreibung neuer Gene und der steigenden Anzahl beschriebener Patienten und Krankheitsbilder verschwimmt die Kategorisierung von Genen als „dominant“ oder „rezessiv“, gleichzeitig scheint der Anteil jener Fälle mit exklusiv retinalem Phänotyp zu sinken, wobei das qualitative Spektrum der syndromalen Symptome mit der Veröffentlichung neuer Fälle kontinuierlich zunimmt.
2. Die Beobachtung von protektiven Effekten einer *OPA1*-Überexpression auf der einen Seite und der Embryopathie bei *Knockout* von *OPA1* auf der anderen Seite sowie die intermediären *OPA1*-Levels bei Gesunden/asymptomatischen Carriern und Patienten mit subklinischer Symptomatik oder simpler ADOA, vereint mit stärker reduzierten *OPA1*-Mengen bei ADOAplus und Behr-Syndrom-Patienten, führen zu der Hypothese einer engen Korrelation von funktionellen *OPA1*-Levels und Expressivität/Penetranz der *OPA1*-Phänotypen.
3. Unabhängig von Ausprägung und Erbgang betrifft die überwältigende Mehrheit aller bislang beschriebenen Mutationen, die zu einer erblich isolierten oder syndromalen Optikusatrophie führen, Gene, deren Proteinprodukte in den Mitochondrien lokalisiert sind bzw. zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen (30 von 38 Genen) (siehe Abbildung 13). Viele der an Optikusatrophien beteiligten Gene kodieren für Proteine, die in Fusions- und Fissionsprozessen der Mitochondrien involviert sind (*OPA1*, *MFN2*, *DRP1*, *OPA3*, *TIMM8A*), einige sind sogar direkte Interaktionspartner von *OPA1* (*MFN2*, *AFG3L2*, *YME1L*, *SPG7*) (siehe III.1.7).
4. Die primär auf kodierende Exons zentrierte Mutationssuche weicht einer globaleren Analyse pathogener Sequenzveränderungen, wobei der Aufdeckung intronischer und exonischer pathogener Spleißvarianten auch therapeutisch eine besondere Bedeutung zukommt.

Diese prinzipiellen Beobachtungen haben auch praktische Implikationen für die genetische Diagnostik: Bei der Sequenzierung von Kandidatengenen sollte der nachweisliche oder vermutete Erbgang (dominant/rezessiv) nicht kategorisch zum Ausschluss bestimmter Gene führen. Bei der Bewertung der funktionellen

Konsequenzen mehrerer, z.B. mittels Exom/Genom-Sequenzierung gefundener, möglicherweise krankheitsverursachender Varianten, sollten jene priorisiert werden, die Gene betreffen, deren Proteinprodukte in Mitochondrien lokalisiert sind. Bei der *a priori* Suche nach neuen Kandidatengenen, deren Mutation eine hereditäre Optikusatrophie verursachen könnten, sollten gezielt Interaktionspartner von OPA1, Komponenten der Fusions-/Fissionsmaschinerie, gefolgt von allgemeinen mitochondrialen Proteinen ausgewählt werden.

Doch selbst in bekannten Kandidatengenen sind detektierte Varianten nicht immer sofort als pathogene Mutationen erkennbar. Am Übergang zwischen der *Whole Exome Sequencing*-Ära und dem *Whole Genome Sequencing*-Zeitalter verkörpert Familie OAK 587, die im Zentrum dieser Arbeit steht, die großen, teils unerwarteten Herausforderungen, welche mit der Auswertung der Daten dieser Sequenziertechnologien einhergehen: Was *Missense*-Mutationen unbekannter Signifikanz (*Variants of unknown significance, VUS*) für die *Whole Exome*-Analysen sind, das sind Punktmutationen in nicht-kodierenden Genom-Abschnitten für die *Whole Genome*-Analysen. Familie OAK 587 zeigt exemplarisch auf, welche komplexen genetischen Mechanismen beide Sequenziermethoden zu Tage fördern könn(t)en.

Während die *OPA1*-Variante p.I437M – ein *Modifier*, der nur im Zusammenwirken mit einer trunkierenden *compound*-heterozygoten Mutation krankheitsrelevant wird – auf teils subtile Wirkeffekte von *Missense*-Varianten hinweist, zeigt die *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A wie selbst Punktmutationen, die weitab von kodierenden Exons liegen, zum vollständigen Funktionsverlust eines Allels führen können. Beide Mutationen in Kombination führten zu einem Phänotyp, der aus klinischer Sicht untypisch für *OPA1*-Mutationsträger ist und damit die klinische Indikation für eine Untersuchung des *OPA1*-Gens erweitert.

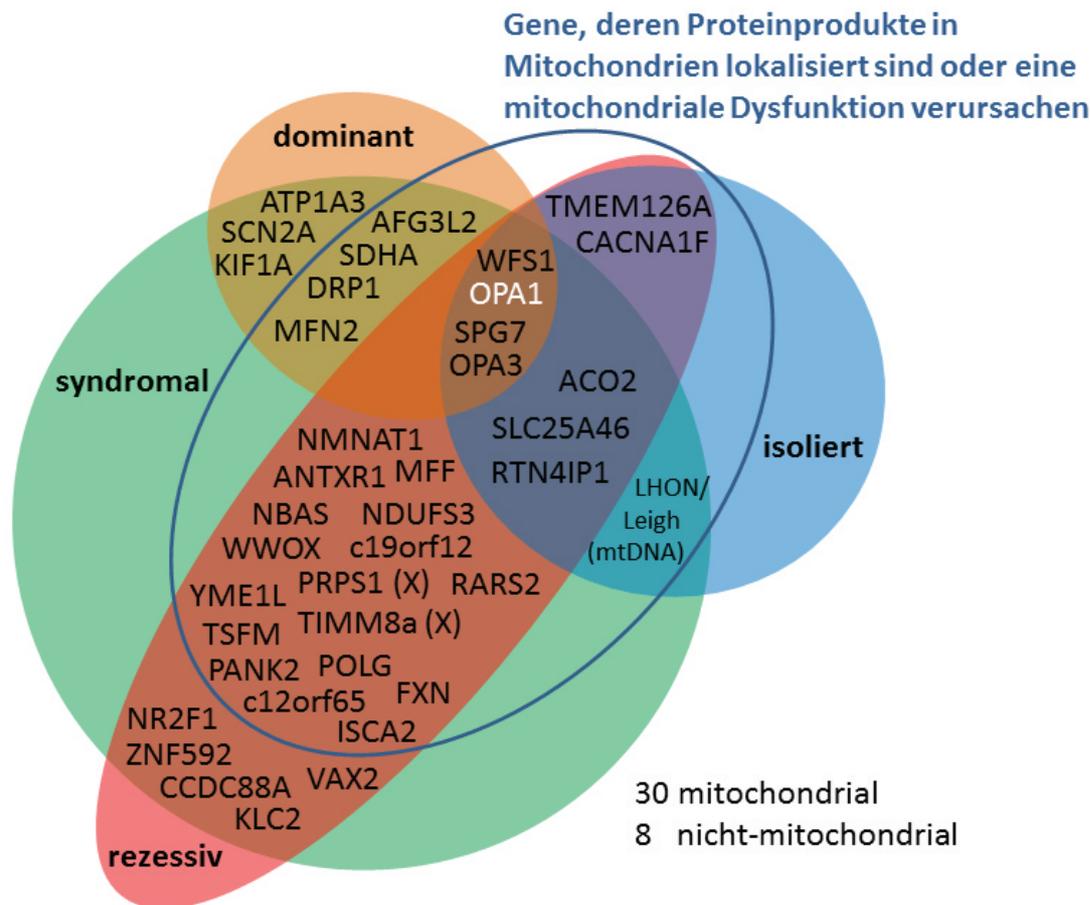


Abbildung 13 Hereditäre Optikusneuropathien: Erbgang und klinische Ausprägung

Übersicht und Kategorisierung von Genen, die mit hereditären Optikusneuropathien assoziiert sind. Die zunehmende Beschreibung von bi-allelischen OPA1-Mutationen als Ursache rezessiv vererbter syndromaler Optikusneuropathien erfordert den Einschluss dieses Gens in die Differentialdiagnostik zahlreicher weiterer Krankheitsbilder, vor allem – aber nicht ausschließlich – bei mitochondrialer Dysfunktion. Quelle: Human Gene Mutation Database (Stenson et al 2014), Stand 22.09.2016

IV.1 Identifikation von *Deep Intronic*-Mutationen in *OPA1* – ein häufiger Mechanismus?

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde mit der Mutation c.610+364G>A im *OPA1*-Gen erstmals eine *Deep Intronic*-Mutation bei einer Mitochondriopathie beschrieben. Diese Mutation aktiviert eine genuin nicht funktionelle Spleißakzeptorstelle und bewirkt die Inklusion von 61 bzw. 93 Nukleotiden an intronischer Sequenz zwischen den Exons 4b und 5. Das obligate Fehlspleißen der prä-mRNA dieser mutanten Allele führt zu vorzeitigen Stopp-Codons und dadurch zu einer NMD-vermittelten Degradation der Transkripte, wie durch Puromycin-Behandlung von Patientenfibroblasten gezeigt werden konnte. Die mutationsbedingt verringerte Menge verbleibender intakter *OPA1*-Transkripte (vom *compound*-Allel) führt zu einer

reduzierten Menge an OPA1-Protein, was eine Deregulation des *Fusion/Fission* – Gleichgewichts und damit eine Störung des mitochondrialen Netzwerks bewirkt. Die hier erstmals beschriebenen Mutationen c.610+364G>A und c.610+360G>A wurden in insgesamt vier unabhängigen Familien als Ursache einer erblichen Optikusatrophie identifiziert. Mit Hilfe der verwendeten RFLP-Methode wurde allerdings nur ein 6 bp langer Abschnitt in den Intron 4b-Amplikons von 369 Patienten mit ungelöster Optikusatrophie analysiert. Es ist zu erwarten, dass bei einer systematischen Analyse aller *OPA1*-Introns weitere krankheitsverursachende *Deep Intronic*-Mutationen gefunden würden. Eine solche erweiterte genetische Untersuchung sollte durchaus auch bei weiteren Kandidatengeneten für die ADOA oder anderen Mitochondriopathien erwogen werden. So konnten beispielsweise Lax und Kollegen im Jahr 2015 die zweite für eine mitochondriale Erkrankung verantwortliche *Deep Intronic*-Mutation im *RARS2*-Gen (ursächlich für die autosomal rezessive pontozerebelläre Hypoplasie Typ 6 (PCH6)) identifizieren (Lax et al 2015).

IV.2 Methodische Erwägungen beim Nachweis von *Deep Intronic*-Mutationen

Im Gegensatz zum gängigen Weg der Mutations-Identifizierung, der von der Analyse der Patienten-DNA ausgeht und die mutmaßliche Pathogenität einer Mutation anschließend prüft, wurde die *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A über eine quantitative und qualitative cDNA-Analyse von Puromycin-behandelten Patientenfibroblasten identifiziert. Dabei wurde das übliche Nachweisprinzip umgekehrt: Zunächst wurde ein allelisches Ungleichgewicht von *OPA1*-Transkripten mit Hilfe der Pyrosequenzierung gemessen. Mittels Puromycin-Behandlung der Patientenfibroblasten konnte eine NMD-bedingte Degradation mutierter Transkripte als Ursache für dieses Ungleichgewicht nachgewiesen werden. Anschließend wurde in der cDNA die Insertion eines Sequenzabschnitts zwischen den Exons 4b und 5 nachgewiesen, die zum Auftreten vorzeitiger Stopp-Codons im Leseraster führen und dadurch den NMD dieser Transkripte bedingt. Im letzten Analyse-Schritt, der gezielten Sequenzierung der Intronsequenz zwischen den Exons 4b und 5, konnte schließlich die verursachende *Deep Intronic*-Mutation identifiziert werden. Die hier gezeigte lokusspezifische schrittweise Eingrenzung der pathogenen Mutation mittels Pyrosequenzierung und Puromycin-induzierter NMD-Inhibition lässt sich als Fortführung der GINI-Strategie (*gene identification by NMD inhibition*) von Noensie und Dietz auffassen (Noensie & Dietz 2001). Einschränkend ist hierbei jedoch zu erwähnen, dass zwei entscheidende

Voraussetzungen für die Anwendung dieser Methode häufig nicht vorliegen: 1. Die Verfügbarkeit von primären Patientenzellen zur Behandlung mit NMD-inhibierenden Substanzen und 2. die Expression der zu untersuchenden Gene in diesen Zellen. Letzteres ist z.B. bei vielen Genen, die mit hereditären Dystrophien der äußeren Netzhaut assoziiert sind das Hauptproblem, nicht jedoch bei mitochondrialen Erkrankungen, zu denen die Optikusatrophien in der Mehrzahl zählen (Siehe IV und III.1.5). Für den Nachweis von (nicht-kodierenden) Mutationen in mutmaßlichen Mitochondriopathien lässt sich daher die Empfehlung formulieren, im Rahmen der Blutabnahme von betroffenen Patienten, auch Hautstanzen oder Muskelbiopsien zu erbitten, welche in Kultur genommen und propagiert werden können, um als Quelle von DNA, RNA und Protein dienen können. Ist dies nicht möglich, dann sollten zumindest Proben für RNA-Analysen abgenommen werden (mit z. B. *PAXgene Blood RNA Tubes*). Damit könnte der Nachweis fehlgespleißter Transkripte über klassische RT-PCR-basierte Analysen oder modernere Methoden wie RNAseq geführt werden, allerdings mit der Einschränkung, dass mutierte Transkripte, die dem NMD unterliegen, möglicherweise nicht detektierbar sind. Sind weder Zellen noch RNA verfügbar, bleibt einzig die Sequenzierung der genomischen DNA. Je nach Fragestellung bzw. Pathognomonik der Erkrankung wäre dabei eine *Whole Genome* Sequenzierung oder eine gezielte Anreicherung einzelner Gene über *Long-Distance* PCRs zur Kompletsequenzierung mittels NGS-Technologie adäquat. In beiden Fällen liefert die Sequenzierung im Falle von Varianten in nichtkodierenden Genabschnitten bestenfalls Kandidaten, die anschließend funktionell, z. B. über *Minigene-Assays* bestätigt werden müssten. Trotz des Aufwands erscheint die Lokus-Sequenzierung für Optikusatrophien attraktiver als die *Whole Genome*-Strategie, da erstere derzeit noch günstiger ist und mit *OPA1*, ein vielversprechendes Kandidatengen vorliegt. Dies gilt – gerade im Zusammenhang mit *Deep Intronic*-Mutationen – auch für sporadische Fälle oder bei Familien mit reduzierter Penetranz (Siehe IV.3)

IV.3 Alu-Elemente als *Hot Spots* physiologischer und pathologischer Exonisierung

Aktuell gibt es allenfalls sporadisch Bestrebungen, mittels Sequenzierung gezielt bestimmte exonferne Abschnitte zu untersuchen, in denen mit höherer Wahrscheinlichkeit Spleißmutationen auftreten, obwohl dies im Zusammenhang mit *Deep Intronic*-Mutationen und Alu-Elementen von Bedeutung sein könnte (Lev-Maor et al 2003). Beide für *OPA1* beschriebenen *Deep Intronic*-Mutationen befinden sich

innerhalb eines Alu-Elements. Alu-Elemente sind etwa 300 bp lange Retrotransposons, die ausschließlich in Primaten zu finden sind und in der humanen DNA eine Kopienzahl von etwa 1,4 Millionen erreicht haben, etwa 10 % des Gesamtgenoms (Lander et al 2001). Aufgrund von Überschneidungen der Alu-Sequenz mit Spleißerkennungsmotiven sind Exonisierungen durch Alu-Elemente ein häufiges Phänomen und liegen in ca. 5 % der alternativ gespleißten Exons im Humangenom vor. Umgekehrt scheinen auch beinahe sämtliche Alu-enthaltende Exons alternativ gespleißt zu werden, eine evolutionäre Voraussetzung um neue Genfunktionen zu entwickeln, ohne existierende zu zerstören (Sorek et al 2002). Diese Inklusion von Alu-Sequenzen in reife mRNAs kann überwiegend als unproduktives Spleißen betrachtet werden, da sie in den meisten Fällen zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und damit zum Abbau des Transkripts führen. Das *OPAI*-Gen beinhaltet insgesamt 32 intronische Alu-Elemente (repeatmasker.org), von denen jedoch bislang keines mit alternativen oder aberranten Spleißprozessen in Zusammenhang gebracht wurde. Allerdings könnten, bedingt durch den NMD-Mechanismus, derlei Transkripte rasch abgebaut werden und dadurch dem Nachweis entgehen. Unabhängig von der Präsenz eines Alu-Elements führt die Insertion von ca. 35 % aller natürlichen alternativen Exons zu NMD (Pan et al 2006), jedoch sind transposable Elemente, und v. a. Alu-Elemente häufig auch an aberrantem Spleißen im pathogenen Kontext beteiligt (Vorechovsky 2010). Zwischen der pathologischen, mutationsbedingten Inklusion intronischer Sequenzen und einem simplen „biologischen Rauschen“ scheint eine genspezifische Mindestmenge von korrekt gespleißten Transkripten zu liegen, die notwendig ist, um die regelrechte Gen-Funktion aufrecht zu erhalten. So erzeugen *Deep Intrinsic*-Mutationen, die eine obligate Inklusion eines kryptischen Exons bewirken, Phänotypen, die vergleichbar sind mit anderen trunkierenden Mutationen des gleichen Gens, wohingegen sogenannte „leaky“ *Deep Intrinsic*-Mutationen, die lediglich bei einem Teil der entsprechenden Transkripte ein aberrantes Spleißen verursachen, eine Restfunktion des Gens ermöglichen und häufig eine mildere Symptomatik hervorrufen (Castaman et al 2011, Costa et al 2011, Huang et al 2013, Rosenberg et al 2004). Somit können auch „leaky“ *Deep Intrinsic*-Mutationen als phänotypische *Intralokus-Modifier* betrachtet werden, wobei in diesem Fall weniger die *Missense*-bedingte Fehlfunktion eines Proteins (wie im Falle der p.I437M-Variante) als vielmehr seine quantitative Verfügbarkeit krankheitsrelevant wirkt (siehe auch IV.5.1). Analog zu diesem Modell stellt sich die Frage, ob nicht auch natürliche alternative Exons, die dem NMD unterliegen, lediglich unvollständig penetrante *Deep Intrinsic*-Spleißdefekte repräsentieren, deren Anteil aberranter Transkripte am Gesamtpool der

Transkripte des jeweiligen Gens unter der kritischen Schwelle bleibt und somit biologisch/physiologisch toleriert werden kann (siehe auch IV.4.4).

IV.4 Therapeutische Maßnahmen zum Ausgleich pathologischer OPA1-Insuffizienz

Therapeutische Ansätze, welche die funktionelle OPA1-Gesamtmenge erhöhen, sind derzeit nicht verfügbar. Klinische Studien konzentrieren sich bei der Behandlung von Optikusatrophien momentan auf die Verbesserung der sekundären mitochondrialen Atmungskettendefekte durch die Gabe von Antioxidantien oder den artifiziellen Coenzym-Q-Analoga Idebenon und EPI-743 (siehe III.1.3), jedoch mit mäßigem Erfolg (Barboni et al 2013, Sadun et al 2012). Auch eine *OPA1*-Supplementations-Gentherapie ist momentan nicht in Sicht. Für einen Überblick über die derzeitigen Behandlungsoptionen von ADOA und LHON, siehe Yu-Wai-Man et al 2014.

IV.4.1 AC AON und BP AON korrigieren das Fehlspleißen durch c.610+364G>A

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die erste *in vitro* Antisense-Therapie einer *Deep Intronic*-Mutation für eine Mitochondriopathie entwickelt. Die beiden hier verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie die kryptische Spleißakzeptor-Stelle im Bereich von c.610+364G>A (AC AON) bzw. ihren mutmaßlichen Verzweigungspunkt (BP AON) maskieren. Das AC AON bewirkte bei der Behandlung unterschiedlicher Patientenfibroblasten (insgesamt fünf Mutationsträger aus 2 Familien) und bei eingesetzten Endkonzentrationen, die innerhalb des bislang beschriebenen Spektrums anderer AONs liegen (Aartsma-Rus et al 2005, Gerard et al 2012, Singh et al 2006), eine deutlich signifikante und AON-spezifische Korrektur des Fehlspleißens. Insgesamt wies das AC AON eine höhere Effizienz als das BP AON auf. Die geringere Effizienz des BP AON kann einerseits an einer reduzierten Bindung des AON an die prä-mRNA in der Zelle liegen (z.B. aufgrund von Sekundärstrukturen der AON und/oder der Ziel-prä-mRNA), andererseits könnte auch die spleißosomale Flexibilität bei der Wahl des Verzweigungspunkts eine Rolle spielen. Für diese Hypothese sprechen Beobachtungen, die zeigen, dass für ein gegebenes Intron mehrere Verzweigungspunkte in Frage kommen (Corvelo et al 2010), die nicht zwangsläufig innerhalb der üblichen ca. 40 Nukleotide stromaufwärts des Akzeptors, sondern mehrere hundert Basen entfernt liegen können (Southby et al 1999, Wollerton et al 2004). Gegen diese Hypothese sprechen allerdings bioinformatische und experimentelle Daten, die belegen, dass zwischen Verzweigungspunkt und Spleißakzeptor eine *AG-dinucleotide exclusion Zone*

(AGez) existiert. Solche AGEzs liegen sowohl bei kanonischen proximalen Verzweigungspunkten als auch bei distalen Verzweigungspunkten vor (Gooding et al 2006, Smith et al 1993). Die AGEz vor dem kryptischen Exon c im humanen *OPA1*-Gen umfasst 52 Nukleotide und die von HSF vorhergesagten putativen Verzweigungspunkte liegen innerhalb dieses Bereichs (32 bzw. 44 Nukleotide vor dem kryptischen Exon). Stromaufwärts dieses Abschnitts findet sich wieder eine natürliche Häufung von AG-Dinukleotiden (siehe Abbildung 14).

```
AAATTGCAGACCAAATTTATAATGCTGCTTATGCTGAATTTTAAAACCCCAGAACTATATTAGGCAAACCTCATT
TCCTTTAGGTGGAAATAATAAAATAATTATTTGTGATAACACTAAAATCTTAAATATGTATGTGTATTATAAG
ATTAAGCTATTAAGAAAATTTACTTAGCAAAAATATTTCTTGAAATAGATCTAATTGTTTTGATAATTGA
AATGAAAAGTAATTTAGTTTGTCTCATCTGCCCTGTCATGGTTGACATTTAAATTTGTTTTCCGGCCAGGCG...
```

AGez = 50 Nukleotide

Abbildung 14 AG-exclusion zone vor dem kryptischen Exon c im *OPA1*-Gen

Das BP AON (hellblau) bindet innerhalb der 52 Nukleotide umfassenden AGEz stromaufwärts des kryptischen Akzeptormotivs und bedeckt die beiden von HSF vorhergesagten *Branch Points* (A, orange) für das Spleißen zwischen Exon 4b und c.

Zusammengenommen sprechen diese Daten daher eher gegen die Verwendung eines alternativen Verzweigungspunkts beim Spleißen von Exon c, allerdings könnten weitere, kotransfizierte AONs, die systematisch zusätzliche Abschnitte des Introns blockieren, hier Aufschluss geben.

IV.4.2 Sequenzspezifische Off-Targets und Toxizität der AONs

Neben einer effektiven Bindung an die Zielsequenz muss beim Design und der Anwendung der AON-Technologie auch die Bindung an potenzielle *Off-Targets* berücksichtigt werden. Vorausgehende Studien konnten zeigen, dass bereits drei Basenfehlpaarungen zwischen AON und Zielsequenz genügen, um eine stabile Hybridisierung zu verhindern (Aartsma-Rus et al 2004). Durch den Abgleich der AON-Sequenzen mit dem humanen Genom (GRCh38) mittels Burrows-Wheeler-Indexierung (Langmead et al 2009, Stemmer et al 2015) wurden – unter Berücksichtigung von maximal drei Fehlpaarungen - insgesamt zwölf *Off-Target*-Kandidaten für das AC AON, jedoch keines für das BP AON vorhergesagt. Von den AC AON-*Off-Target*-Kandidaten fanden sich bei näherer Betrachtung lediglich drei in intronischen Bereichen von prä-mRNAs: die homologe Sequenz des Wildtyp-*OPA1*-Allels, sowie in Introns von *CEP128*

und *RNU6-42P*, letztere allerdings jeweils mit drei Fehlpaarungen. Somit lieferte die bioinformatische Prädiktion keine offensichtlichen *Off-Targets* und unterstreicht die hohe Spezifität der designten AONs. Ungeklärt bleiben damit jedoch die teils deutlichen toxischen Effekte, die nicht nur konzentrationsabhängig, sondern auch zeitabhängig und AON-spezifisch beobachtet wurden. Die stärkste Toxizität wurde bei AC AON, eine mittlere Toxizität bei BP AON und keine Toxizität bei der Anwendung des *Non-Target* Kontroll-AONs beobachtet. Sämtliche vorhergesagten *Off-Targets* für das AC AON überlappen teilweise mit Grenzbereichen von Alu-Elementen. Möglicherweise führt die gleichzeitige niedrig-affine Bindung zahlreicher Alu-Elemente durch das AC AON zu einem kumulativen toxischen Effekt. Eine andere Erklärung könnte in der möglicherweise unterschiedlich effizienten Aufreinigung der AONs im Rahmen des Syntheseprozesses liegen. Die systematische Untersuchung neuer Chargen der gleichen AONs könnte zugleich Aufschlüsse über potenzielle technische Aspekte der Toxizität und über die generelle Reproduzierbarkeit der AON-Ergebnisse liefern. Auch die systematische Neusynthese und Evaluation weiterer AONs mit unterschiedlicher Länge und Zielsequenz in Bereichen innerhalb und stromaufwärts von Exon c könnte Aufschlüsse über die optimale Länge und Sequenz für eine effizientere Spleißkorrektur bei niedrigerer Toxizität geben.

IV.4.3 Zeitverlauf der AON-vermittelten Spleißkorrektur: Implikationen für klinische Translation

Die maximal detektierte Spleißkorrektur des mutanten Allels lag bei 55 % (AC AON, 20 nM, 4 Tage Inkubation) und reduzierte sich danach auf den halbmaximalen Wert nach etwa 10 Tagen. Der letzte experimentell gemessene Wert betrug 7,2 % an Tag 16, allerdings legt eine vierparametrische Weibull-Extrapolation nahe, dass ein geringer Anteil korrekt gespleißter Transkripte noch bis nach Tag 25 detektierbar sein sollte. Als Grund für die zeitabhängige Abnahme der Spleißkorrektur in der Zellkultur sind mutmaßlich zwei Effekte maßgeblich: einerseits die langsame Degradation der AONs und andererseits die einsetzende Teilung der Zellen, die zu einem zusätzlichen Verdünnungseffekt der nukleär lokalisierten AONs führt. Eine Transfektion von Zellen in stationärer Phase (physiologisch oder chemisch ausgelöst) sollte allerdings in der Lage sein, zumindest den Verdünnungseffekt zu eradizieren. Die Metabolisierung der AONs ist relevant hinsichtlich der potenziellen klinischen Verabreichungsfrequenz, da Patienten lebenslang durch intravitreale Injektionen behandelt werden müssten. Der Behandlungsplan für die CMV-verursachte Retinitis mit Fomiviren (siehe III.4) sieht

nach einer Initiierungsphase (drei Dosen à 165 µg, 1x pro Woche) eine einmalige Gabe in zweiwöchigem Rhythmus vor (à 165 µg) (Europäische Kommission für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit). Auch die *in vivo* Daten der *Exon-skipping* AONs für CEP290 und DMD legen Behandlungsabstände von mehreren Wochen nahe (Bassi et al 2012, Garanto et al 2016, Gerard et al 2015). Für eine genauere Abschätzung des zeitlichen Abstands einzelner AON-Gaben sind allerdings nicht nur ein Verständnis der AON-Metabolisierung im Zielgewebe, sondern auch eine präzisere Bestimmung des Protein-Turnovers von OPA1 und der neuroprotektiv wirksamen Mindestmenge an OPA1 erforderlich. Diese könnte, zumindest *in vitro*, annähernd durch enge Korrelationsstudien zwischen Transkriptmenge, OPA1-Gesamtprotein und der Mitomorphologie als funktionellem Parameter ermittelt werden. Während in der vorliegenden Studie eine AON-assoziierte Erhöhung der Gesamt-OPA1-Menge mittels *Western Blot* demonstriert werden konnte, lieferte die morphometrische Analyse des Mitochondrienetzwerkes bislang noch kein ausreichend sensitives Bioassay. Auch bis dato publizierte Studien geben keine präzise Auskunft über den Grad mitochondrialer Fehlfunktion bzw. über die klinisch-phänotypische Symptomausprägung in Abhängigkeit von den OPA1-Proteinlevels, obwohl dies von höchstem Interesse für das Verständnis der *OPA1*-assoziierten ADOA mit ihrer reduzierten Penetranz, variablen Expressivität und individuellen Progression der Symptome in Mutationsträgern wäre (siehe IV.5) sowie für mögliche Therapieansätze, die auf eine Erhöhung der OPA1-Menge abzielen.

IV.4.4 Mögliche AON-Korrektur von unproduktiven physiologischen Spleißprozessen

Generell könnten neben der hier vorgestellten AON-Behandlung (zur Inhibition mutationsbedingten Fehlspleißens) auch AON-basierte Therapieansätze zur Reduktion von unproduktiven physiologischen Spleißereignissen erwogen werden. Wie von Pan und Kollegen gezeigt wurde, führt das Spleißen von ca. 35 % aller natürlichen alternativen Exons zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und somit zu einem NMD-abhängigem Transkriptabbau, ohne dass dies eine biologische (z. B. regulatorische) Funktion hätte (Pan et al 2006)(siehe III.3.1 und IV.3). Obgleich dies in der Regel wohl nur einen geringen Anteil der Gesamttranskripte eines Gens betrifft, gibt es doch Beispiele mit Krankheitsbezug, bei denen dieser Mechanismus einen substantiellen Anteil der mRNAs betrifft. So führen beispielsweise Mutationen im Gen Ferrochelatase (*FECH*) zu autosomal dominanter Erythropoetischer Protoporphyrinurie mit inkompletter Penetranz. Die häufige *FECH*-Variante c.315-48T>C (*Minor Allele Frequency (MAF)*: 0.14)

liegt 48 bp vor Exon 4. Das Wildtyp-Allel c.315-48T konstituiert einen schwachen Spleißakzeptor, der in 20 % aller Transkripte zu einer Verlängerung von Exon 4 führt, einschließlich der Inklusion eines vorzeitigen Stoppcodons in diesem Abschnitt, und damit aufgrund des NMDs zum Abbau dieser aberranten mRNAs. Das seltenere c.315-48C-Allel hingegen konstituiert einen stärkeren kryptischen Spleißakzeptor, der bei 40 % aller *FECH*-Transkripte eines solches Allels verwendet wird. Liegt das c.315-48C-Allel in trans zu einem Null-Allel vor, so führt dies zum Ausbruch der Erkrankung, während beim c.315-48T -Allel in trans zur Nullmutation ausreichend korrekt gespleißte *FECH*-Transkripte gebildet werden, so dass die Genfunktion aufrecht erhalten wird (Gouya et al 2002). Die c.315-48T>C stellt somit zugleich einen phänotypischen Intralokus-*Modifier* dar (siehe IV.5.1). Oustric und Mitarbeiter konnten zeigen, dass mit eigens designten AONs, die spezifisch an das c.315-48C-Allel binden, eine Spleißkorrektur bei *in vitro*-Versuchen mit Patientenfibroblasten erzielt werden konnte, die das Level korrekt gespleißter *FECH*-Allele über den kritischen Schwellenwert anhoben (Oustric et al 2014). Auch die normaltypische Inklusion zweier alternativer Exons in *ABCC4* (ursächlich für Delta-Granula Thrombocytopathie (Jedlitschky et al 2010)) führt zu einem vorzeitigen Stopp der Translation in den betreffenden Transkripten (Lamba et al 2003). Eine NMD-Inhibition in humanen Zellen zeigte, dass dies einen Anteil von bis zu 30 % der Transkripte betrifft. Eine gezielte Blockade des alternativen Spleißens mittels AON-Cocktails könnte auch hier die Transkriptmenge erhöhen. Damit stünde *ABCC4* beispielhaft für eine Vielzahl von Krankheitsgenen, deren Pathomechanismus durch Haploinsuffizienz erklärt wird (Huang et al 2010) und bei denen eine Erhöhung der Transkriptmenge, v. a. des nicht-mutanten Allels von klinischer Relevanz wäre.

Klinisch eignen sich AON-basierte Therapien aus mehreren Gründen für die Behandlung der inneren Retina. Die retinalen Ganglienzellen sind mittels intravitrealer Injektion relativ einfach zugänglich und für die Applikation von AONs existieren bereits Erfahrungen aus der Anwendung mit Fomivirsen. AONs werden vollständig synthetisch hergestellt und ohne komplexe chemische *Carrier*-Moleküle oder virale Verpackung von neuronalen Zellen direkt und effizient aufgenommen (Zalachoras et al 2011). Darüber hinaus kann die Behandlung bei Auftreten akuter oder chronischer Nebenwirkungen jederzeit abgesetzt werden (im Gegensatz zu klassischen Gentherapeutika). Mit der derzeitigen Chemie erfordert die AON-Behandlung von hereditären oder chronischen Erkrankungen eine dauerhafte Verabreichung in mehrwöchigen Abständen (siehe IV.4.3). Obwohl dies im Falle von okulären Zielgenen wie *OPA1* durch die vorhandene Erfahrung mit Fomivirsen erleichtert wird, bleiben dabei Restrisiken der wiederholten

intravitrealen Injektion und vor allem die Problematik der Therapietreue behandelter Patienten. Auch die präklinische Evaluation im Tiermodell erwies sich in der Vergangenheit als schwierig, da *Deep Intronic*-Mutationen aufgrund von speziesspezifischen Spleißereignissen unter Umständen nicht präzise im Tiermodell nachgestellt werden können (Garanto et al 2013).

Im Gegensatz dazu würde eine Supplementations-Gentherapie mittels viraler Transduktion retinaler Ganglienzellen unter Verwendung einer intakten *OPA1*-Genkopie im Idealfall nur eine einzige Injektion erfordern, allerdings stellen die Größe und Komplexität dieses Gens (siehe III.1.8) enorme Hürden für die klinische Translation dar und potenzielle Nebenwirkungen durch eine Überexpression des Transgens sind nicht umkehrbar.

IV.4.5 Genom-Editierung der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A

Als vielversprechender Alternativansatz zur AON-vermittelten Spleißkorrektur erscheint die direkte Reparatur über das *Genome Editing*-Verfahren. Als Teil dieser Doktorarbeit konnten erste Ergebnisse für die erfolgreiche Anwendung einer „*Knockout*“-Strategie zur ortsspezifischen NHEJ-basierten Mutagenese der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A erzielt werden. In einer initialen Charakterisierung der *in vitro* Effektivität des Prinzips wurden *Minigene*-Konstrukte mit einem *All-in-one* CRISPR-Plasmid kotransfiziert. Die Ergebnisse erster Versuche mit einem *Minigene*-Reporterplasmid als Editierungssubstrat zeigten, dass die CRISPR/Cas9-vermittelte Eliminierung der kryptischen Spleißstelle zu einer Wiederherstellung des normalen Spleißmusters zwischen Exon 4b und Exon 5 führt, jedoch einhergeht mit z.T. sehr großen Deletionen auf DNA-Ebene. Derartig große CRISPR/Cas9-induzierte Deletionen in Plasmiden wurden bislang weder beschrieben, noch in jenem separaten Ansatz beobachtet, bei dem in Fibroblasten eines Patienten mit der c.610+364G>A Mutation eine NHEJ-Editierung am chromosomalen Genort mittels CRISPR/Cas9 versucht wurde. Eine mögliche Erklärung für die großen Deletionen in transfizierten Plasmiden könnte in der, gegenüber einem chromosomalen Genort, andersartigen Chromatin-Architektur episomaler DNA-Moleküle liegen, die nach einer CRISPR/Cas9-vermittelten Linearisierung nur schwer religiert werden können und daher längere Zeit Exonukleasen ausgesetzt sind (Hebbar & Archer 2008). Auch eine grundsätzlich geringe Effizienz der DNA-Reparatur in HEK293T-Zellen könnte hierfür verantwortlich sein. Im Gegensatz zu den großen Deletionen in den transfizierten Plasmiden wurden bei der Anwendung in Patientenfibroblasten am endogenen, chromosomalen Genort nur 1 bp

Deletionen detektiert. Durch die Lage des verwendeten PAM-Motivs und der dadurch vorgegebenen Lokalisation des Doppelstrangbruchs konnten diese Deletionen die kryptische Spleißakzeptorstelle nicht wirksam inaktivieren und daher auch keine nachweisbare Spleißkorrektur bewirken. Um eine effektive funktionelle Spleißkorrektur zu erzielen, sollten künftige Ansätze zur Eliminierung der *Deep Intronic*-Mutation daher eine der drei folgenden Strategien verfolgen:

1. Verwendung von Nukleasen mit alternativen PAM-Motiven: Eine veränderte Version der natürlichen Cas9-Nuklease erkennt das PAM-Motiv NGCG, das im vorliegenden Kontext unter Verwendung des CGCG-Motivs bei c.610+367_370 einen Schnitt des Zielstranges exakt vor der *Deep Intronic*-Mutation, zwischen c.610+363 und c.610+364 induzieren sollte (Kleinstiver et al 2015). Ebenso könnte das alternative Cpf1-System verwendet werden, welches versetzte Schnitte am distalen Ende der *Protospacers* katalysiert (Zetsche et al 2015). Die Wahl des PAM-Motivs TTT bei c.610+344_346 sollte hierbei Schnitte direkt stromabwärts der *Deep Intronic*-Mutation (c.610+364_365) und weitere fünf Basen stromabwärts auf dem Gegenstrang erzeugen (c.610+369_370).
2. Die Zugänglichkeit der Ziel-DNA verbessern: Eine Auflockerung des Chromatins im Zielbereich des CRISPR/Cas9 Ribonukleoproteins durch kurzzeitige Gabe chemischer Substanzen (z. B. Valproinsäure oder Natriumbutyrat (Li et al 2015, Marchion et al 2005) könnte die Effektivität der Anwendung, analog zu Experimenten mit anderen Endonukleasen (zumindest *in vitro*), erhöhen.
3. Die Erzeugung von Deletionen: Durch eine simultane Anwendung zweier gRNAs ließen sich größere Deletionen innerhalb von Intron 4b erzeugen, was eine höhere Flexibilität beim Design und der Kombination verschiedener gRNAs sowie einen einfacheren PCR-Nachweis erfolgreich editierter Allele ermöglichen würde. Hierbei müsste jedoch bereits beim Design der beiden gRNAs auf die mögliche unbeabsichtigte Generierung eines weiteren Spleißakzeptor/Donor-Motivs geachtet werden (siehe del39, Abbildung 12)

IV.5 Compound-heterozygote OPA1-Mutationen und das Behr-Syndrom

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten weltweit die zweite und dritte Familie mit schwerem frühkindlichem Behr-Syndrom und dafür ursächlichen *compound*-heterozygoten *OPA1*-Mutationen beschrieben werden. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung und der irreführende apparente Erbgang in der Familie OAK 587 zeigen, dass die mögliche Beteiligung von *OPA1*-Mutationen in der klinischen

Differentialdiagnostik weiter gefasst werden muss (siehe auch IV). Die Feststellung, dass beide Eltern der betroffenen Geschwister bis ins hohe Alter symptomfrei sind, zusammen mit der partiellen phänotypischen Kongruenz des Behr-Syndroms mit anderen, autosomal rezessiv-vererbten neurodegenerativen Erkrankungen, legte initial einen Zusammenhang mit bekannten rezessiven Syndromen nahe. Die Analyse der Kandidatengene *FXN* (Friedreich-Ataxie), *ATXN7* (Spinozerebelläre Ataxie 7), *C10orf2* (Mitochondrial DNA depletion syndrome 7, Perrault-Syndrom 5), *POLG* (Alpers-Syndrom), *PANK2* (Hallervorden-Spatz-Syndrom) und *OPA3* (Costeff-Syndrom, Optikusatrophie mit Katarakt) blieb allerdings ergebnislos. Erst die Identifizierung der p.I437M-Variante in *OPA1* und eine nachfolgende cDNA-Analyse führte zur Identifikation der *compound*-heterozygoten *Deep Intronic*-Mutation in *OPA1* und damit der Lösung des Falls. Der scheinbar rezessive Erbgang und v. a. der Status der Mutter (symptomfrei, aber Trägerin der *Deep Intronic*-Mutation c.610+364G>A) erklärt sich durch die bei heterozygoten *OPA1*-Mutationen häufig zu beobachtende reduzierte Penetranz (Cohn et al 2007). Doch auch im klinischen Vergleich mit anderen Fällen von *OPA1*-assoziierter syndromaler Optikusatrophie stellt Familie OAK 587 eine Besonderheit dar: Während in den meisten bis dato beschriebenen syndromalen Fällen von ADOA (ADOAplus), das Vorliegen einer Hypakusis ein zentraler Bestandteil der syndromalen Manifestationen darstellt (Li et al 2005, Yu-Wai-Man et al 2010a), konnten in keinem der betroffenen Mitglieder der Familie OAK 587 Hinweise dafür gefunden werden. Ebenso scheinen die schweren Ataxie-Symptome der Patienten in der Familie OAK 587 ähnlich zur Friedreich'schen Ataxie hauptsächlich von einer spinalen Atrophie und weniger von der nur mild ausgeprägten zerebellären Atrophie herzurühren. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte das *OPA1*-Gen, das ursprünglich als ursächlich für die nicht-syndromale, dominante Optikusatrophie identifiziert wurde, in Zukunft auch in Fällen mit syndromalen, apparent rezessiv vererbten neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen die Optikusatrophie selbst nur als Randerscheinung oder gar nicht auftritt (Milone et al 2009), analysiert werden. Kann dabei nur eine heterozygote *Missense*-Variante unklarer Signifikanz nachgewiesen werden (insbesondere die mittlerweile als *Modifier* bezeichnete p.I437M-Variante), so empfiehlt sich auch die Untersuchung nicht-kodierender *OPA1*-Abschnitte mittels Sequenzierung oder auf Transkriptebene mittels cDNA-Analyse.

Zwischen der Veröffentlichung des Artikels *Pure and syndromic Optic atrophy explained by Deep Intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier* im Jahre 2014 und der Fertigstellung dieser Dissertation wurden zahlreiche weitere Fälle mit Behr-Syndrom, verursacht durch bi-allelische *OPA1*-Mutationen, beschrieben (siehe Tabelle 1). Dabei

wurden in der großen Mehrzahl der Fälle *compound*-Situationen, mit einer *Missense*-Variante in Kombination mit einer trunkierenden Mutation (vorzeitiger Stopp der Translation) beschrieben. Bei den allermeisten dieser Patienten wurde eine Optikusatrophie bereits vor dem zweiten Lebensjahr diagnostiziert. Während bei dem Indexpatient der Familie DUK 2976 eine schwere Ataxie erst im Alter von 13 Jahren festgestellt wurde, zeigten sich bei allen anderen Behr-Patienten erste Ataxie-Symptome bereits in der ersten Lebensdekade. Schwerhörigkeit wurde nur in zwei von zehn Patienten mit *OPA1*-assoziertem Behr-Syndrom beobachtet. Zusammengefasst erscheint daher die neue, von Chao de la Barca und Kollegen vorgeschlagene Dreiteilung *OPA1*-assoziierter Erkrankungen in ADOA, ADOAplus und Behr-Syndrom als sinnvoll (Chao de la Barca et al 2016) (siehe III.2.3.2). Diese Einteilung muss ggf. noch durch eine weitere Kategorie ergänzt werden, wie ein jüngst beschriebener Fall nahelegt. Spiegel und Kollegen beschrieben zwei Schwestern mit einer homozygoten *Missense*-Mutation in der Nähe der katalytischen GTPase-Domäne des *OPA1*-Gens. Beide Schwestern litten u. a. an frühkindlicher globaler Enzephalopathie und progressiver hypertropher Kardiomyopathie und verstarben innerhalb ihres ersten Lebensjahres (Spiegel et al 2016).

Tabelle 1 Veröffentlichte Fälle mit bi-allelischen *OPA1*-Mutationen und zugehörigem Phänotyp (Stand: 12/2016)

Quelle	1. Mutation	Art der Mutation	Domäne	2. Mutation	Art der Mutation	Domäne	Phänotyp	Beginn Optikusatrophie	Ataxie in 1. Dekade?	Behr/ADOA (plus)
Bonneau 2014 (case 2)	c.1369G>A/ p.Val457Met	missense	GTPase	c.2873_2876delTTAG/ p.Val903Glyfs*	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, periphere Neuropathie, zerebelläre Atrophie	12 Monate	✓	Behr
Yu-Wai-Man 2010 (DE-1)	c.1807G>A/ p.Val603Ile	missense	dynamamin	c.800_801del(AA) / p.Lys267Argfs*	trunkierend		Optikusatrophie, Innenohrschwerhörigkeit	n.a.	X	ADOA'plus'
Lee 2016 (index)	c.2879G>A/ p.Arg960Gln	missense	GED	c.2022-2023delinsT/ Leu675Phefs*	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, sensorimotorische Polyneuropathie, kongenitale Katarakt	Kongenital (Katarakt) Erblindung: 6 Jahre	✓	Behr + Katarakt
Schaaf 2011 (index)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.2873_2876delTTAG/ p.Val903Glyfs*	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, Dysphagie, Erbrechen, intestinale Dysmobilität, chronische Konstipation, milde periventrikuläre Leukomalazie	12/6 Monate (Geschwister)	✓	Behr
Bonifert 2014 (DUK2976)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.1316_1317insA/ p.Asn440Lysfs*	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, periphere Neuropathie	kongenital	(✓) strong @ 13	Behr
Bonifert 2014 (OAK587)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.610+364G>A/ Splice defect	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, zerebelläre Atrophie, externe Ophthalmoplegie, Spastiken	24 Monate	✓	Behr
Carelli 2014 (index)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.1705 + 1G>T/ Splice defect	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, spastische Paraparese, zerebelläre Dysfunktion, kongenitaler Nystagmus	12 Monate	✓	Behr
Bonneau 2014 (case 1)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.2635C>T/ p.Arg879*	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, periphere Neuropathie, zerebelläre Atrophie, Innenohrschwerhörigkeit	18 Monate	✓	Behr
Bonneau 2014 (case 3)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.2068C>T/ p.Arg612*	trunkierend		Optikusatrophie, Ataxie, periphere Neuropathie, chronische Konstipation	14 Monate	✓	Behr
Liao 2016 (Family 1)	c.826G>A/ p.Glu276Iys	missense	Coiled coil	c.2873_2876delTTAG/ p.Val903Glyfs*	trunkierend		Optikusatrophie, Parästhesie d. Extremitäten, sensorische Neuropathie, Epilepsie Dysphagie, Erbrechen	14 Monate	✓	Behr
Liao 2016 (Family 2)	c.3034C>T / p.His1012Tyr	missense	GED	c.2518delC / p.Gln840Serfs*	trunkierend		Optikusatrophie, reduzierte Sehnenreflexe. Pes cavus	< 36 Monate	X	ADOA'plus'
Bonneau 2014 (case 4)	c.1311A>G/ p.Ile437Met	missense	GTPase	c.1634G>A/ p.Glu542Iys	missense	GTPase	Optikusatrophie, Ataxie, periphere Neuropathie, Vermis-Atrophie	36 Monate	✓	Behr
Yu-Wai-Man 2010 (NO-1)	c.854A>G / p.Gln285Arg	missense	GTPase	c.768C>G/ p.Ser256Arg	missense	Coiled coil	Optikusatrophie, Ataxie, Neuropathie, Myopathie, Spastiken	n.a.	?	Behr oder ADOA'plus'
Pesch 2001 (OAK86)	c.1207G>A/ p.Glu325Iys	missense	GTPase	c.1033C>T / Arg345Trn	missense	GTPase	Milde isolierte Optikusatrophie	Kindheit	X	ADOA
Spiegel 2016 (index)	c.1766T>G/ p.Leu589Arg	missense	GTPase	c.1766T>G/ p.Leu589Arg	missense	GTPase	Optikusatrophie, frühkindlich fatale hypertrophe Kardiomyopathie, Innenohrschwerhörigkeit, Hypotonie	kongenital	✓	Behr plus?

IV.5.1 Der Modifier p.I437M als Indikator für compound-heterozygote Mutationen in Behr-Patienten

Ein weiterer interessanter Aspekt der Behr-Syndrom Patienten mit bi-allelischen *OPA1*-Mutationen ist die Prävalenz der *Missense*-Mutation p.I437M. Das hypomorphe p.I437M-Allel scheint die *OPA1*-Funktion in einer Weise zu beeinträchtigen, die eine signifikante Restfunktion des resultierenden Proteins zulässt. Daher sind heterozygote und homozygote Träger dieser Variante symptomfrei, wie im Rahmen dieser Dissertation und weiteren Studien gezeigt werden konnte (Bonifert et al 2014, Bonneau et al 2014, Schaaf et al 2011). Erst eine zusätzliche Beeinträchtigung der *OPA1*-Funktion durch Nebeneffekte mitotoxischer Substanzen (Guillet et al 2010) oder eine Abnahme der in der Zelle verfügbaren Menge an funktionellem *OPA1* durch ein *compound*-heterozygotes Null-Allel führt zum Ausbruch der Erkrankung. Welche funktionelle Bedeutung der Isoleucin-Rest an Position 437 des gefalteten *OPA1*-Polypeptids hat, ist bislang nicht bekannt. Die evolutionäre Konservierung von I437 reicht bis *Saccharomyces cerevisiae* und die Populationsfrequenz der Variante ist relativ niedrig (5/6500 Exomen, *Exome Variant Server* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)), ein Umstand, der die Relevanz der Position unterstreicht. Strukturbiologische Simulationen legen nahe, dass die p.I437M-Veränderung eine lokale Destabilisierung der GTPase-Domäne bewirkt und dadurch deren Nukleotid-abhängige enzymatische Aktivität stört (Bonifert et al 2014). Experimentelle Untersuchungen stehen hierzu allerdings noch aus. Weitere Beispiele für intragene *Missense*-Varianten, die als *Modifier* von Krankheitsbildern wirken, sind nach bestem Wissen des Autors nicht in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Am ehesten vergleichbar dazu ist die c.315-48T>C - Variante im *FECH*-Gen, welche - wie der p.I437M-*Modifier* - nur in *compound*-heterozygoter Konstellation mit einer Null-Mutation auf dem homologen Allel zum Ausbruch der Erkrankung (autosomal dominant vererbte Erythropoetische Protoporphyrurie) führt, jedoch in trans zu einem Wildtyp-Allel oder einem c.315-48T>C keinen klinischen Phänotyp verursacht (siehe IV.4.4).

IV.5.2 Der Modifier p.I437M im Behr-Mausmodell

Aufgrund der Bedeutung der p.I437M im Zusammenhang mit dem *OPA1*-assoziierten Behr-Syndrom sollte ein entsprechendes Mausmodell generiert werden, um das Behr-Syndrom mit seiner retinalen, als auch extraokulären Pathologie am Tiermodell studieren zu können (murin: p.I400M). Ferner sollte durch die in diesem Fall mutmaßlich rascheren und homogeneren neurodegenerativen Prozesse ein

verbessertes Modell zur Entwicklung und Validierung potenzieller Therapeutika – auch für die nicht-syndromale ADOA – bereitstehen.

IV.5.2.1 *Der Modifier p.I437M im Behr-Mausmodell: Transgenstabilität und Expression*

Im Auftrag unserer Arbeitsgruppe wurden dazu von der Firma Cyagen Biosciences modifizierte *Opa1-I400M*-BAC Konstrukte in befruchtete murine Oozyten injiziert. Die resultierenden transgen-positiven F₀-Tiere trugen unterschiedliche Kopienzahlen des (meist) *in tandem* integrierten Transgens. Auch wenn die tatsächliche genomische Integrationsstelle nicht bestimmt wurde, lässt sich ausgehend von der eingehenden phänotypischen Untersuchung der F₀-Tiere und nachfolgender Generationen schließen, dass zumindest keine – im heterozygoten Zustand - essentiellen Gene bzw. regulatorischen Bereiche durch die Integration der BAC-Konstrukte unterbrochen oder zerstört wurden. Die relative Quantifizierung der Transgen-Transkripte im Vergleich zur auf genomischer Ebene bestimmten Transgen-Kopienzahl ergab, dass nicht alle integrierten BAC-Kopien auch tatsächlich intakte *Opa1*-mRNAs exprimieren und solche trunkierten Transkripte nicht notwendigerweise vollständig durch zelluläre *Surveillance*-Mechanismen abgebaut werden. Eine naheliegende Erklärung hierfür könnte die Integration von an intragenischer Position gebrochenen BAC-Konstrukten oder die partielle Herunterregulierung (*Silencing*) einzelner Transgenkopien sein. Der Nachweis multipler Insertionsereignisse und die Präsenz trunkierter Transkripte wurden mittels Long Distance PCRs und relativer Quantifizierung über Pyrosequenzierung ermittelt. Ein Verfahren, das auch für andere transgene Mausmodelle empfohlen werden sollte, sofern die quantitative Expression intakter Transgens von Relevanz ist. Der relative Anteil intakter Transgen-Transkripte führte zu einer entsprechenden Erhöhung der Proteinmenge in verschiedenen untersuchten Geweben. Dies bestätigt die Ergebnisse auf Transkriptebene, die zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression des Transgens in zwölf unterschiedlichen Geweben vorlagen.

IV.5.2.2 *Der Modifier p.I437M im Behr-Mausmodell: Homozygotie für die pathogene c.1065+5G>A Mutation am Opa1-Lokus*

Homozygotie für die c.1065+5G>A Mutation am *Opa1*-Lokus führt zu embryonaler Letalität (Alavi et al 2007). Die Generierung von *Opa1*^{-/-BAC-X} -Tieren führte mit der Linie

Opa1-BAC-D(1) (eine funktionelle BAC-Kopie) als Donorlinie für das Transgen jedoch zu lebensfähigen Nachkommen (allerdings nicht mit der Linie BAC-Gα(1), die auf der Basis der umfänglichen Charakterisierung auf mRNA- und Proteinebene ebenfalls eine funktionelle BAC-Kopie trägt). Diese Tiere zeigten bis zum Alter von etwa drei Wochen keine augenscheinlichen Auffälligkeiten im Habitus oder im Verhalten (wie z.B. Minderwuchs oder Apathie). Dies belegt, dass das Transgen bei Linie *Opa1*-BAC-D(1) in allen kritischen Geweben und allen Entwicklungsstadien korrekt exprimiert wird und den Genotyp *Opa1*^{-/-} am endogenen Genort trotz des erhöhten murinen Energiestoffwechsels vollständig kompensieren kann. Entsprechende Tiere aus einem analogen Kreuzungsansatz mit Linie I (zwei funktionelle BAC-Kopien) als Transgen-Donorlinie zeigten bis zum Alter von 6 Monaten ebenfalls keine Auffälligkeiten hinsichtlich Entwicklung, Habitus, Verhalten und motorischer Funktion, was jedoch nicht unbedingt überrascht, da zwei *OPA1*-Genkopien des p.I437M-Allels auch beim Menschen nicht pathogen sind (siehe Angehöriger I:1 in OAK 587). Eine genauere Charakterisierung des dem humanen Genotyp *OPA1*^{-/I437M} entsprechenden murinen Genotyps scheint daher angebracht, möglicherweise durch gezielte Generierung eines *Knock-in*-Allels unter Zuhilfenahme neuer CRISPR/Cas9-Plattformen, die im Vergleich zu früheren Methoden eine effizientere Erzeugung des Genotyps *Opa1*^{-/I400M} versprechen (Yang et al 2013). Eine solche Linie wäre zugleich ein authentischeres Modell für das humane Behr-Syndrom.

IV.5.2.3 *Der Modifier p.I437M im Behr-Mausmodell: Überexpression ohne Phänotyp*

Die morphologischen Untersuchungen und Verhaltenstests von transgenen Tieren mit bis zu acht funktionellen Kopien zeigten keine Auffälligkeiten. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass es sich bei der p.I437M-Variante, trotz ihrer Beteiligung an syndromalen *OPA1*-Erkrankungen und ihrer Lokalisation in der GTPase-Domäne, nicht um eine dominant-negative Mutation handelt. Wie Civiletto und Kollegen zeigen konnten, führt die Überexpression von *OPA1* zu protektiven Effekten im Kontext verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen (Civiletto et al 2015), jedoch auf Kosten einer erhöhten Rate von Krebserkrankungen bei älteren Tieren (Varanita et al 2015). Dies erklärt sich durch den mutmaßlich verstärkten anti-apoptotischen Effekt von *OPA1* (siehe III.1.7), könnte aber auch mit dem artifiziellen Hintergrund des in jener Studie verwendeten Transgens zusammenhängen (siehe III.5). Im Fall der vorliegenden Studie konnten selbst bei 18 Monate alten Tieren keine Hinweise auf eine erhöhte Rate von kanzerösen Erkrankungen beobachtet werden, was einerseits an der reduzierten

OPA1-Funktion liegen könnte (p.I400M) oder an der Tatsache, dass durch die Verwendung des BAC-Konstrukts eine sehr natürliche und gewebsspezifische Regulation von Transkription und Spleißisoformen (siehe III.1.8) ermöglicht wird. Die Apathogenität starker OPA1-Überexpression erlaubt daher nun die Verwendung dieser Linien zur eingehenderen Untersuchung von protektiven Effekten erhöhter OPA1-Levels auf verschiedene neurodegenerative Mitochondriopathien, aber auch auf komplexere Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung wie dem Glaukom, Kardiomyopathien und selbst auf allgemeine Alterungsprozesse.

IV.6 Resümee

Zusammenfassend trägt die hier vorgestellte Arbeit zu einer weiteren klinischen Diversifizierung der *OPA1*-assoziierten Symptomatik bei und unterstreicht die wichtige Rolle des genetischen Intralokus-*Modifiers* p.I437M bei der Pathogenese des Behr-Syndroms. Was das klinische Spektrum betrifft, so konnte auch die Bandbreite der genetischen Ursachen für ADOA und Behr durch die Charakterisierung der ersten *Deep Intrinsic*-Mutation in *OPA1* erweitert werden. Dies sollte nicht nur Konsequenzen haben für die Differentialdiagnostik neurodegenerativer Erkrankungen sondern auch für die molekulargenetische Identifizierung von ursächlichen Mutationen innerhalb des *OPA1*-Gens. Die Identifizierung von *Deep Intrinsic*-Mutationen im *OPA1*-Gen hat aber auch hohe Relevanz für die Therapieentwicklung für *OPA1*-assoziierte Optikusneuropathien, wie die erfolgreichen Pilotstudien zur ursächlichen Behandlung mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden und CRISPR/Cas9 zeigen konnten. Diese Studien sollten damit auch Impulse zur eingehenderen Analyse weiterer intronischer Bereiche in *OPA1* und anderen mitochondrialen Genen setzen. Alle drei Studien unterstreichen klinisch, *in vitro* und im Mausmodell den engen Zusammenhang zwischen der quantitativen funktionellen OPA1-Menge und dem subzellulären und klinischen Grad der neurodegenerativen Symptomatik. Systematische Untersuchungen der Korrelation zwischen einzelnen *OPA1*-Varianten, deren Konsequenz auf Transkript- und Proteinmenge, Mitomorphologie sowie letztlich auf die phänotypische Expression und Krankheitsprogression in Patienten werden künftig konkrete Antworten auf die drängenden Fragen nach den quantitativen Schwellenwerten pathogener und protektiver OPA1-Levels liefern. Mit diesem Wissen werden es Antisense-Technologien und Genomeditierung erlauben, die funktionellen Mengen von OPA1 gezielt zu erhöhen und mit Hilfe moderner Mausmodelle für translationale Studien zu evaluieren.

V. Danksagung

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt. (Sir Isaac Newton 1643 - 1727)

Bei der Erkundung des Unbekannten hatte ich das Glück, die Zeit und die Mittel, um zahlreiche Kiesel umdrehen, aufheben und zurücklegen zu können. All dies wäre nicht ohne den Rat und die tatkräftige Unterstützung zahlloser Kollegen und Freunde möglich gewesen, von denen an dieser Stelle nur einigen gedankt werden kann.

Kinder brauchen Spielwiesen. Der größte Dank gilt meinem Doktorvater **Bernd Wissinger**, der mich großzügig und geduldig, mit Weitblick, Expertise und Inspiration bei meinem wissenschaftlichen Spieltrieb unterstützte und motivierte. Vielen Dank, dass ich hier sein durfte.

Meinen Kollegen am Molekulargenetischen Labor danke ich für ihre Freundschaft, Geduld und Kompetenz, aber auch für die reibungslose, harmonische und humorvolle Organisation des Laboralltags. Meinen Mitstreitern aus dem Team *Optic Atrophy* **Irene Gonzalez Menendez**, **Simone Schimpf-Linzenbold** und **Jennifer Staller** danke ich für tatkräftige experimentelle, statistische und organisatorische Unterstützung und dafür, dass uns nie (lange) das Lachen verging. **Nicole Weisschuh** danke ich für unsere geistreichen Gespräche und für ihr strahlendes Vorbild in Sachen Disziplin, klaren Ansagen, wissenschaftlichem Überblick und feinsinnigem Humor. **Peggy Reuter** verlor auch bei der Konfrontation mit äußerst obskuren Gedankenexperimenten nicht die Contenance und kennt Lösungen für alle Eventualitäten. **Sukirthini Balendran** und **Alexandra Sauer** danke ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung und für ihre anhaltende Freundschaft. **Susanne Kohl** danke ich für viele gute Gespräche und ihren inspirierenden Arbeitsethos. **Anja-Kathrin Mayer**, **Elena Buena Atienza** und **Pablo Llavona Juez** sorgten für eine stets harmonische Atmosphäre in Labor und Büro und viele anregende Gespräche. ¡Muchas Gracias! **Julia Stolz** behielt den Überblick in der Zellkultur und wusste Rat bei neurobiologischen Fragestellungen. Eine muss den Laden zusammenhalten: Vielen Dank **Britta Baumann**, für dein Gedächtnis, Organisationstalent und den reibungslosen Umzug! **Eva Weber**, vielen Dank für die zuverlässige Aufarbeitung der DNA-Proben und die Backkünste! **Barbara Huth** danke

ich für den unkomplizierten Bestellvorgang selbst abstrusester Dinge. Schreib eine Biografie! **Christian Beuter** danke ich für seine professionelle Unterstützung bei IT-Fragen.

Die Sektion Klinische Neurogenetik des Hertie-Instituts verfügt nicht nur über eine hervorragende technische Ausstattung und das nötige Know-how, sondern auch über eine Hilfsbereitschaft, die Ihresgleichen sucht. Vielen Dank, **Ludger Schöls**, für die Betreuung im Rahmen des Advisory Boards, die großzügige wissenschaftliche Unterstützung und deine Begeisterung! **Matthis Synofzik** danke ich für sein großes Engagement, seine Hilfe beim Verfassen der Manuskripte und seine Neugier. **Stefan Hauser** und **Yvonne Theurer** danke ich für ihre Hilfe bei der Fibroblastenkultur, der Elektroporation und für die Mitomorphometrie.

Von der Arbeitsgruppe Molekularbiologie degenerativer Netzhauterkrankungen danke ich **Marius Ueffing** für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Augenheilkunde zu absolvieren. **Karsten Boldt** und **Yasmin Wissinger** danke ich für die massenspektrometrischen Untersuchungen unserer transgenen Mäuse. **Tina Beyer** danke ich für Hilfe und Austausch zum Thema CRISPR und Zellkultur. Ebenso danke ich **Jasmin Haderspeck** vom anatomischen Institut des UKT für die Vernetzung zu selbigem Thema und die Fortführung der Experimente.

Ich danke **Kai Erik Witte** und seinen Kollegen (Flow Cytometry Core Facility) für das FACSen der Fibroblasten, **Claire Angebault** (INM Montpellier) für die Einführung in die Künste der Purifikation retinaler Ganglienzellen, **Florian Battke** (CeGaT) für die Implementierung von Burrows-Wheeler Indexing bei der AON *Off-Target*-Suche und **Jörg Widmaier** für viele gute Mittagessen und die Formatierungshilfe.

Die vorliegende Doktorarbeit wäre nicht denkbar gewesen ohne ausführliche medizinische Untersuchungen, Befragungen und Spenden von Blut und Biopsiematerial etlicher Patienten und deren Angehörigen. Ein großer Dank geht daher an alle beteiligten Familien und Ärzte.

Mein größter Dank geht an meine Familie. **Loni, Donat, Flo, Marianne, Anni, Georg, Moni** und natürlich **Tobi**, der am meisten abbekam. Danke für eure Geduld, Unterstützung, Ablenkung und gelegentliche Tritte in den Allerwertesten! Ohne euch stünde hier nichts von alledem!

VI. Externe Bildquellen

Abbildung 1 Aufbau eines Mitochondriums

Lodish et al 2007, Kapitel 12, Abbildung 6a

Abbildung 2 Glykolyse und Citratzyklus

Angepasst nach: http://clinicalgate.com/wp-content/uploads/2015/02/B9781416022558500292_gr4.jpg

Abbildung 3 Die mitochondriale Atmungskette

Angepasst nach: <http://www.robertyfurler.com/wp-content/uploads/2012/10/electron-transport.png>

Abbildung 4 Lokalisation von OPA1, MFN1 und MFN2

Angepasst nach Wasilewski & Scorrano 2009 und Chen & Chan 2005

Abbildung 5 Das OPA1-Polypeptid

Belenguer & Pellegrini 2013

Abbildung 6 Aufbau der humanen Retina

Angepasst nach: <http://www.retinareference.com/anatomy/>

Abbildung 7 Konsekutive Bindung der Hauptfaktoren des Spleißosoms.

Hoskins & Moore 2012

Abbildung 8 Die Konsensus-Sequenz der Spleißstellen in Genen des Menschen

Angepasst nach Denisov et al 2014

Abbildung 9 DNA, RNA und 2'-O-MePTO Rückgrat im Vergleich

Lee & Yokota 2013

Abbildung 10 CRISPR/Cas9 induzierter Doppelstrangbruch im Bereich der c.610+364G>A Mutation im OPA1 Intron 4b;

Angepasst nach Ran et al 2013

VII. Abkürzungsverzeichnis

ION	<i>Inherited Optic Neuropathies</i>
ADOA	<i>Autosomal Dominante Optikusatrophie</i>
AON	<i>Antisense Oligonucleotide</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BP	Branch Point
CoQ	<i>Coenzyme Q</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated genes 9</i>
DIM	<i>Deep Intronic-Mutation</i>
DMD	<i>Duchenne Muscle Dystrophy</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
HSF	<i>Human Splicing Finder</i>
kb	Kilobasenpaare
LHON	<i>Lebersche Hereditäre Optikusneuropathie</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MFN1/2	<i>Mitofusin 1/2</i>
MIM	<i>Mitochondrial Inner Membrane</i>
MIS	<i>Mitochondrial Import Sequence</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MOM	<i>Mitochondrial Outer Membrane</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>
NHEJ	<i>Non-homologous End-Joining</i>
nM	nanomolar
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>
OPA1	<i>Optic Atrophy 1, Protein murin/human</i>
<i>OPA1</i>	<i>Optic Atrophy 1, Gen und Transkript, human</i>
<i>Opa1</i>	<i>Optic Atrophy 1, Gen und Transkript, murin</i>
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>

PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PTO	<i>Phosphorothioate</i>
RGC	<i>Retinal Ganglion Cell</i>
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TALEN	<i>Transcription Activator-like Effector Nuclease</i>
TIM/TOM	<i>Translocase of the Inner/Outer Membrane</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VUS	<i>Variant of Unknown Significance</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
ZNF	<i>Zinc-Finger nuclease</i>

VIII. Literaturverzeichnis

- Aartsma-Rus A, De Winter CL, Janson AA, Kaman WE, Van Ommen GJ, et al. 2005. Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 15: 284-97
- Aartsma-Rus A, Kaman WE, Bremmer-Bout M, Janson AA, den Dunnen JT, et al. 2004. Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther* 11: 1391-8
- Aartsma-Rus A, van Vliet L, Hirschi M, Janson AA, Heemskerk H, et al. 2009. Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 17: 548-53
- Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C. 2008. Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* 106: 372-83
- Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, et al. 2007. A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130: 1029-42
- Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, et al. 2009. Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy. *Exp Neurol* 220: 404-9
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, et al. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26: 211-5
- Amati-Bonneau P, Odent S, Derrien C, Pasquier L, Malthiery Y, et al. 2003. The association of autosomal dominant optic atrophy and moderate deafness may be due to the R445H mutation in the OPA1 gene. *Am J Ophthalmol* 136: 1170-1
- Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, et al. 2008. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131: 338-51
- Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, et al. 2014. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* 204: 919-29
- Anderson KP, Fox MC, Brown-Driver V, Martin MJ, Azad RF. 1996. Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2004-11

- Baker MR, Fisher KM, Whittaker RG, Griffiths PG, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. 2011. Subclinical multisystem neurologic disease in "pure" OPA1 autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 77: 1309-12
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-95
- Ballana E, Govea N, de Cid R, Garcia C, Arribas C, et al. 2008. Detection of unrecognized low-level mtDNA heteroplasmy may explain the variable phenotypic expressivity of apparently homoplasmic mtDNA mutations. *Hum Mutat* 29: 248-57
- Barboni P, Valentino ML, La Morgia C, Carbonelli M, Savini G, et al. 2013. Idebenone treatment in patients with OPA1-mutant dominant optic atrophy. *Brain* 136: e231
- Barrera M, Koob S, Dikov D, Vogel F, Reichert AS. 2016. OPA1 functionally interacts with MIC60 but is dispensable for crista junction formation. *FEBS Lett* 590: 3309-22
- Bassi E, Falzarano S, Fabris M, Gualandi F, Merlini L, et al. 2012. Persistent dystrophin protein restoration 90 days after a course of intraperitoneally administered naked 2'OMePS AON and ZM2 NP-AON complexes in mdx mice. *J Biomed Biotechnol* 2012: 897076
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 2006. Neuroscience. Exploring the Brain. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 289-306
- Behbehani R. 2007. Clinical approach to optic neuropathies. *Clin Ophthalmol* 1: 233-46
- Behr C. 1909. Die komplizierte, hereditär-familiäre Optikusatrophie des Kindesalters. Ein bisher nicht beschriebener Symptomkomplex. *Klin. Mbl. Augenheilkunde* 47: 138-160
- Belenguer P, Pellegrini L. 2013. The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochim Biophys Acta* 1833: 176-83
- Bennett CF, Swayze EE. 2010. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 259-93
- Bonifert T, Gonzalez Menendez I, Battke F, Theurer Y, Synofzik M, et al. 2016. Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1. *Mol Ther Nucleic Acids* 5: e390
- Bonifert T, Karle KN, Tonagel F, Batra M, Wilhelm C, et al. 2014. Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier. *Brain* 137: 2164-77
- Bonneau D, Colin E, Oca F, Ferre M, Chevrollier A, et al. 2014. Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1. *Brain* 137: e301

- Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, et al. 2012. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* 337: 96-100
- Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. 2004. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 23: 53-89
- Carelli V, Sabatelli M, Carrozzo R, Rizza T, Schimpf S, et al. 2014. 'Behr syndrome' with OPA1 compound heterozygote mutations. *Brain* 138: e321
- Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, et al. 2011. Deep intronic variations may cause mild hemophilia A. *J Thromb Haemost* 9: 1541-8
- Chao de la Barca JM, Prunier-Mirebeau D, Amati-Bonneau P, Ferre M, Sarzi E, et al. 2016. OPA1-related disorders: Diversity of clinical expression, modes of inheritance and pathophysiology. *Neurobiol Dis* 90: 20-6
- Chen H, Chan DC. 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: R283-9
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160: 189-200
- Chinnery PF (2000 [Updated 2014 Aug 14]): Mitochondrial Disorders Overview. GeneReviews® [Internet]. Seattle. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/> (01.11.16)
- Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell NN. 2001. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *Am J Med Genet* 98: 235-43
- Chiu SY. 2011. Matching mitochondria to metabolic needs at nodes of Ranvier. *Neuroscientist* 17: 343-50
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15927-32
- Civiletto G, Varanita T, Cerutti R, Gorletta T, Barbaro S, et al. 2015. Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Metab* 21: 845-54
- Cohn AC, Toomes C, Potter C, Towns KV, Hewitt AW, et al. 2007. Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. *Am J Ophthalmol* 143: 656-62
- Corvelo A, Hallegger M, Smith CW, Eyraas E. 2010. Genome-wide association between branch point properties and alternative splicing. *PLoS Comput Biol* 6: e1001016

- Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, Chen HW, Marciniack C, et al. 2012. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta* 1820: 553-64
- Costa C, Pruliere-Escabasse V, de Becdelievre A, Gameiro C, Golmard L, et al. 2011. A recurrent deep-intronic splicing CF mutation emphasizes the importance of mRNA studies in clinical practice. *J Cyst Fibros* 10: 479-82
- Cummins LL, Owens SR, Risen LM, Lesnik EA, Freier SM, et al. 1995. Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res* 23: 2019-24
- Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, et al. 2007. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 16: 1307-18
- De Conti L, Baralle M, Buratti E. 2013. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4: 49-60
- Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, et al. 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 109: 584-91
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, et al. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207-10
- Denisov SV, Bazykin GA, Sutormin R, Favorov AV, Mironov AA, et al. 2014. Weak negative and positive selection and the drift load at splice sites. *Genome Biol Evol* 6: 1437-47
- Doyon Y, Choi VM, Xia DF, Vo TD, Gregory PD, Holmes MC. 2010. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat Methods* 7: 459-60
- Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, et al. 2007. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* 18: 3582-90
- Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, et al. 2011. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* 21: 12-20
- Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS. 2013. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 150-61
- Ferre M, Caignard A, Milea D, Leruez S, Cassereau J, et al. 2015. Improved locus-specific database for OPA1 mutations allows inclusion of advanced clinical data. *Hum Mutat* 36: 20-5

- Fransson S, Ruusala A, Aspenstrom P. 2006. The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 500-10
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, et al. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126: 177-89
- Fuhrmann N, Alavi MV, Bitoun P, Woernle S, Auburger G, et al. 2009. Genomic rearrangements in OPA1 are frequent in patients with autosomal dominant optic atrophy. *J Med Genet* 46: 136-44
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31: 397-405
- Garanto A, Chung DC, Duijkers L, Corral-Serrano JC, Messchaert M, et al. 2016. In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Hum Mol Genet* 25: 2552-63
- Garanto A, van Beersum SE, Peters TA, Roepman R, Cremers FP, Collin RW. 2013. Unexpected CEP290 mRNA splicing in a humanized knock-in mouse model for Leber congenital amaurosis. *PLoS One* 8: e79369
- Geary RS. 2009. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5: 381-91
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. 2010. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 19: 4861-70
- Gerard X, Perrault I, Hanein S, Silva E, Bigot K, et al. 2012. AON-mediated Exon Skipping Restores Ciliation in Fibroblasts Harboring the Common Leber Congenital Amaurosis CEP290 Mutation. *Mol Ther Nucleic Acids* 1: e29
- Gerard X, Perrault I, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. 2015. Intravitreal Injection of Splice-switching Oligonucleotides to Manipulate Splicing in Retinal Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e250
- Gooding C, Clark F, Wollerton MC, Grellscheid SN, Groom H, Smith CW. 2006. A class of human exons with predicted distant branch points revealed by analysis of AG dinucleotide exclusion zones. *Genome Biol* 7: R1
- 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: 651-3
- Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, et al. 2002. The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet* 30: 27-8

- Grau T, Burbulla LF, Engl G, Delettre C, Delprat B, et al. 2013. A novel heterozygous OPA3 mutation located in the mitochondrial target sequence results in altered steady-state levels and fragmented mitochondrial network. *J Med Genet* 50: 848-58
- Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-9
- Grenier J, Meunier I, Daien V, Baudoin C, Halloy F, et al. 2016. WFS1 in Optic Neuropathies: Mutation Findings in Nonsyndromic Optic Atrophy and Assessment of Clinical Severity. *Ophthalmology* 123: 1989-98
- Guillet V, Chevrollier A, Cassereau J, Letournel F, Gueguen N, et al. 2010. Ethambutol-induced optic neuropathy linked to OPA1 mutation and mitochondrial toxicity. *Mitochondrion* 10: 115-24
- Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. 2009. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* 187: 959-66
- Hebbar PB, Archer TK. 2008. Altered histone H1 stoichiometry and an absence of nucleosome positioning on transfected DNA. *J Biol Chem* 283: 4595-601
- Hopfield JJ. 1974. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 4135-9
- Hoskins AA, Moore MJ. 2012. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci* 37: 179-88
- Huang H, Zhao P, Arimatsu K, Tabeta K, Yamazaki K, et al. 2013. A deep intronic mutation in the ankyrin-1 gene causes diminished protein expression resulting in hemolytic anemia in mice. *G3 (Bethesda)* 3: 1687-95
- Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME. 2010. Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genet* 6: e1001154
- Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, et al. 2008. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131: 329-37
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25: 2966-77
- Jedlitschky G, Cattaneo M, Lubenow LE, Roskopf D, Lecchi A, et al. 2010. Role of MRP4 (ABCC4) in platelet adenine nucleotide-storage: evidence from patients with delta-storage pool deficiencies. *Am J Pathol* 176: 1097-103

- Jiang X, Jiang H, Shen Z, Wang X. 2014. Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 14782-7
- Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ. 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191: 933-42
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-21
- Klebe S, Depienne C, Gerber S, Challe G, Anheim M, et al. 2012. Spastic paraplegia gene 7 in patients with spasticity and/or optic neuropathy. *Brain* 135: 2980-93
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, et al. 2015. Broadening the targeting range of Staphylococcus aureus CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol* 33: 1293-98
- Kole R, Krieg AM. 2015. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv Drug Deliv Rev* 87: 104-7
- Koopman WJ, Willems PH, Smeitink JA. 2012. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med* 366: 1132-41
- Kraft TW, Schneeweis DM, Schnapf JL. 1993. Visual transduction in human rod photoreceptors. *J Physiol* 464: 747-65
- Kushnareva YE, Gerencser AA, Bossy B, Ju WK, White AD, et al. 2013. Loss of OPA1 disturbs cellular calcium homeostasis and sensitizes for excitotoxicity. *Cell Death Differ* 20: 353-65
- Lamba JK, Adachi M, Sun D, Tammur J, Schuetz EG, et al. 2003. Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons. *Hum Mol Genet* 12: 99-109
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25
- Larsson NG, Clayton DA. 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet* 29: 151-78
- Lax NZ, Alston CL, Schon K, Park SM, Krishnakumar D, et al. 2015. Neuropathologic Characterization of Pontocerebellar Hypoplasia Type 6 Associated With Cardiomyopathy and Hydrops Fetalis and Severe Multisystem Respiratory Chain Deficiency due to Novel RARS2 Mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 74: 688-703

- Lee J, Jung SC, Hong YB, Yoo JH, Koo H, et al. 2016. Recessive optic atrophy, sensorimotor neuropathy and cataract associated with novel compound heterozygous mutations in OPA1. *Mol Med Rep* 14: 33-40
- Lee JJ, Yokota T. 2013. Antisense therapy in neurology. *J Pers Med* 3: 144-76
- Lev-Maor G, Sorek R, Shomron N, Ast G. 2003. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* 300: 1288-91
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 189-92
- Li C, Kosmorsky G, Zhang K, Katz BJ, Ge J, Traboulsi EI. 2005. Optic atrophy and sensorineural hearing loss in a family caused by an R445H OPA1 mutation. *Am J Med Genet A* 138A: 208-11
- Li L, Sun Y, Liu J, Wu X, Chen L, et al. 2015. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate suppresses DNA double strand break repair induced by etoposide more effectively in MCF-7 cells than in HEK293 cells. *BMC Biochem* 16: 2
- Liao C, Ashley N, Diot A, Morten K, Phadwal K, et al. 2016. Dysregulated mitophagy and mitochondrial organization in optic atrophy due to OPA1 mutations. *Neurology* 88: 131-42
- Linden M, Andersson G, Gellerfors P, Nelson BD. 1984. Subcellular distribution of rat liver porin. *Biochim Biophys Acta* 770: 93-6
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. 2007. Molecular Cell Biology. 6th Edition. W.H. Freeman & Company, New York, 936-44
- Majlessi M, Nelson NC, Becker MM. 1998. Advantages of 2'-O-methyl oligoribonucleotide probes for detecting RNA targets. *Nucleic Acids Res* 26: 2224-9
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. 2005. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65: 3815-22
- Merbs SL, Nathans J. 1992. Absorption spectra of human cone pigments. *Nature* 356: 433-5
- Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Lower B, et al. 2008. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* 22: 476-88
- Milone M, Massie R. 2010. Polymerase gamma 1 mutations: clinical correlations. *Neurologist* 16: 84-91
- Milone M, Younge BR, Wang J, Zhang S, Wong LJ. 2009. Mitochondrial disorder with OPA1 mutation lacking optic atrophy. *Mitochondrion* 9: 279-81

- Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH. 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30: 4232-40
- Mochel F, Haller RG. 2011. Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J Clin Invest* 121: 493-9
- Moreira D, Lopez-Garcia P. 1998. Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol* 47: 517-30
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183: 795-803
- Neveling K, Feenstra I, Gilissen C, Hoefsloot LH, Kamsteeg EJ, et al. 2013. A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat* 34: 1721-6
- Nilsen TW. 2003. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* 25: 1147-9
- Nilsen TW, Graveley BR. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457-63
- Noensie EN, Dietz HC. 2001. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol* 19: 434-9
- O'Neill EC, Danesh-Meyer HV, Kong GX, Hewitt AW, Coote MA, et al. 2011. Optic disc evaluation in optic neuropathies: the optic disc assessment project. *Ophthalmology* 118: 964-70
- Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA. 2005. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* 115: 2784-92
- Oustric V, Manceau H, Ducamp S, Soaid R, Karim Z, et al. 2014. Antisense oligonucleotide-based therapy in human erythropoietic protoporphyria. *Am J Hum Genet* 94: 611-7
- Pagani F, Baralle FE. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nature reviews. Genetics* 5: 389-96
- Pan Q, Saltzman AL, Kim YK, Misquitta C, Shai O, et al. 2006. Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* 20: 153-8

- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40: 1413-5
- Payne M, Yang Z, Katz BJ, Warner JE, Weight CJ, et al. 2004. Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in OPA1. *Am J Ophthalmol* 138: 749-55
- Perry VH, Lund RD. 1990. Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol* 19: 265-72
- Pesch UE, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklies B, Kellner U, et al. 2001. OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Hum Mol Genet* 10: 1359-68
- Pirollo KF, Rait A, Slier LS, Chang EH. 2003. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol Ther* 99: 55-77
- Ramonet D, Perier C, Recasens A, Dehay B, Bove J, et al. 2013. Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex I deficiency. *Cell Death Differ* 20: 77-85
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8: 2281-308
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M. 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12: 1231-45
- Reynier P, Amati-Bonneau P, Verny C, Olichon A, Simard G, et al. 2004. OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. *Journal of Medical Genetics* 41: e110
- Rosca MG, Hoppel CL. 2010. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res* 88: 40-50
- Rosenberg T, Baumann B, Kohl S, Zrenner E, Jorgensen AL, Wissinger B. 2004. Variant phenotypes of incomplete achromatopsia in two cousins with GNAT2 gene mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 4256-62
- Sadun AA, Chicani CF, Ross-Cisneros FN, Barboni P, Thoolen M, et al. 2012. Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Arch Neurol* 69: 331-8
- Sarzi E, Angebault C, Seveno M, Gueguen N, Chaix B, et al. 2012. The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain* 135: 3599-613
- Sato S, Murata A, Orihara T, Shirakawa T, Suenaga K, et al. 2011. Marine natural product aurilide activates the OPA1-mediated apoptosis by binding to prohibitin. *Chem Biol* 18: 131-9

- Schaaf CP, Blazo M, Lewis RA, Tonini RE, Takei H, et al. 2011. Early-onset severe neuromuscular phenotype associated with compound heterozygosity for OPA1 mutations. *Mol Genet Metab* 103: 383-7
- Schimpf S, Schaich S, Wissinger B. 2006. Activation of cryptic splice sites is a frequent splicing defect mechanism caused by mutations in exon and intron sequences of the OPA1 gene. *Hum Genet* 118: 767-71
- Scorrano L, Korsmeyer SJ. 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 437-44
- Sharma VK, Watts JK. 2015. Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med Chem* 7: 2221-42
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. 1990. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61: 931-7
- Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN. 2006. Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 26: 1333-46
- Smith CW, Chu TT, Nadal-Ginard B. 1993. Scanning and competition between AGs are involved in 3' splice site selection in mammalian introns. *Mol Cell Biol* 13: 4939-52
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178: 749-55
- Sorek R, Ast G, Graur D. 2002. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res* 12: 1060-7
- Southby J, Gooding C, Smith CW. 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol* 19: 2699-711
- Spiegel R, Saada A, Flannery PJ, Burte F, Soiferman D, et al. 2016. Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous OPA1 mutation. *J Med Genet* 53: 127-31
- Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. 2015. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* 10: e0124633
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. 2014. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* 133: 1-9

- Sterne-Weiler T, Howard J, Mort M, Cooper DN, Sanford JR. 2011. Loss of exon identity is a common mechanism of human inherited disease. *Genome Res* 21: 1563-71
- Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282: 11521-9
- Toomes C, Marchbank NJ, Mackey DA, Craig JE, Newbury-Ecob RA, et al. 2001. Spectrum, frequency and penetrance of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *Hum Mol Genet* 10: 1369-78
- Twig G, Shirihai OS. 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14: 1939-51
- Varanita T, Soriano ME, Romanello V, Zaglia T, Quintana-Cabrera R, et al. 2015. The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. *Cell Metab* 21: 834-44
- Vorechovsky I. 2010. Transposable elements in disease-associated cryptic exons. *Hum Genet* 127: 135-54
- Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, et al. 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29: 9090-103
- Wasilewski M, Scorrano L. 2009. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol Metab* 20: 287-94
- Weisschuh N, Mayer AK, Strom TM, Kohl S, Glockle N, et al. 2016. Mutation Detection in Patients with Retinal Dystrophies Using Targeted Next Generation Sequencing. *PLoS One* 11: e0145951
- Weterings E, Chen DJ. 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18: 114-24
- Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ, Garcia-Blanco MA, Smith CW. 2004. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13: 91-100
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 154: 1370-9
- Youle RJ, van der Blik AM. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337: 1062-5
- Youssoufian H, Kazazian HH, Jr., Patel A, Aronis S, Tsiftis G, et al. 1988. Mild hemophilia A associated with a cryptic donor splice site mutation in intron 4 of the factor VIII gene. *Genomics* 2: 32-6

- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Burke A, Sellar PW, Clarke MP, et al. 2010a. The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Ophthalmology* 117: 1538-46, 46 e1
- Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, et al. 2010b. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* 133: 771-86
- Yu-Wai-Man P, Votruba M, Moore AT, Chinnery PF. 2014. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. *Eye (Lond)* 28: 521-37
- Zalachoras I, Evers MM, van Roon-Mom WM, Aartsma-Rus AM, Meijer OC. 2011. Antisense-mediated RNA targeting: versatile and expedient genetic manipulation in the brain. *Front Mol Neurosci* 4: 1-12
- Zamaratski E, Pradeepkumar PI, Chattopadhyaya J. 2001. A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods* 48: 189-208
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, et al. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163: 759-71
- Zhang K, Li H, Song Z. 2014. Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Rep* 15: 576-85
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, et al. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36: 449-51

IX. Anhang

IX.1 Publikationsbeiträge

Artikel 1: *Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier*

Tobias Bonifert

Planung, Durchführung und Auswertung der Re-Sequenzierung der *OPA1*-Exons, Segregationsanalyse von Familie OAK587, Mikrosatelliten-Mapping der beteiligten Familien, Puromycin-Behandlung der Patienten-Fibroblasten und (nachfolgende) cDNA-Analysen, Pyrosequenzierungen, *Westernblots*, RFLP Screenings in Kontrollproben und Patienten-Kohorte, Auswertung der NimbleGene-CGH Analyse, Verfassen und Revision des Manuskripts.

Die Koautoren

Klinische, neurologische und ophthalmologische Untersuchungen der Patienten aus Familie OAK 587, Erstellung der Funduskopiebilder und OCT, Durchführung und Auswertung der Magnetresonanztomographie, Entnahme von Hautgewebe, Gewinnung der Patienten/Kontrollfibroblastenkulturen, bzw. Bereitstellung von Fibroblasten mit erwiesenem *OPA1* NMD-Allel, Etablierung und Expansion der Zellkulturen, Morphometrische Analyse und Auswertung von Mitochondrien in Patienten-Fibroblasten mittels *Life-Cell Imaging*, Initiale *Panel*-basierte Analyse der Kandidatengene, Analyse und Interpretation der *OPA1* Varianten in der Exom-Pipeline *Gem.app/GENESIS*, Identifikation Rekrutierung und Untersuchung der Familie DUK2976, Planung und Supervision der Studie, Verfassen und Redigieren des Manuskripts.

Artikel 2: *Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1*

Tobias Bonifert

Planung des Projekts, *in silico* Design der Oligonukleotide, Transfektion der Fibroblasten, Pyrosequenzierungen, Durchführung der *Westernblots*, Verfassen des Manuskripts

Die Koautoren

Biometrische Planung der Versuche und statistische Auswertung der Ergebnisse, Bioinformatische Adaptierung der CCTop Plattform für die Suche nach AON-*Off-Targets*, Durchführung von in vitro Mitomorphometrie behandelter und unbehandelter Fibroblasten (nicht enthalten), Supervision der molekulargenetischen Analysen, Redigieren des Manuskripts,

Artikel 3 (unveröffentlicht): *A transgenic mouse model for OPA1-associated early-onset Behr Syndrome*

Tobias Bonifert

Klonierung des BAC Transgens, Haltung und Organisation der Mauskolonie, Genotypisierungen, Design, Etablierung und Anwendung der Pyrosequenzierungsprotokolle, Durchführung der *Westernblots*, Durchführung und Auswertung der Verhaltenstests, Assistenz bei Nekropsien und Pränatalstudie, Verfassen des Manuskripts

Die Koautoren

Planung und Supervision der Studie, Identifikation und allelische Unterscheidung der *Opa1*-Polypeptide mittels Massenspektrometrie, Organisation der Mauskolonie, Verpaarung, Ohrmarkierung und Pflege der Tiere, Supervision und Assistenz bei Verhaltenstests, statistische Auswertung der Westernblots, Biometrische Planung der Verhaltenstests und deren statistische Auswertung, Nekropsien und Pränataluntersuchungen, Redigieren des Manuskripts

IX.2 Artikel 1: Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier

Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic *OPA1* mutations and an intralocus modifier

Tobias Bonifert,^{1,2} Kathrin N. Karle,^{3,4} Felix Tonagel,⁵ Marion Batra,⁶ Christian Wilhelm,⁷ Yvonne Theurer,^{3,4} Caroline Schoenfeld,^{3,4} Torsten Kluba,⁸ York Kamenisch,⁹ Valerio Carelli,^{10,11} Julia Wolf,^{3,4} Michael A. Gonzalez,¹² Fiorella Speziani,¹² Rebecca Schüle,^{3,4,12} Stephan Züchner,¹² Ludger Schöls,^{3,4} Bernd Wissinger¹ and Matthis Synofzik^{3,4}

1 Molecular Genetics Laboratory, Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Röntgenweg 11, 72076 Tübingen, Germany

2 Graduate School of Cellular and Molecular Neuroscience, University of Tübingen, Österbergstrasse 3, 72074 Tübingen, Germany

3 Department of Neurodegenerative Diseases, Hertie-Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 3, 72076 Tübingen, Germany

4 Centre for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Helmholtz Association of German Research Centers, Otfried-Müller-Straße 27, 72076 Tübingen, Germany

5 University Eye Hospital, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Schleichstrasse 12, 72076 Tübingen, Germany

6 Department of Neuroradiology, University of Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 3, 72076 Tübingen, Germany

7 CeGaT GmbH, Centre for Genomics and Transcriptomics, Paul-Ehrlich-Str. 17, 72076 Tübingen, Germany

8 Department of Orthopaedic Surgery, University Hospital Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 3, 72076 Tübingen, Germany

9 Department of Dermatology, University Hospital Tübingen, Röntgenweg 13/1, 72076 Tübingen, Germany

10 IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Bellaria Hospital, Via Altura 3, 40139 Bologna, Italy

11 Neurology Unit, Department of Biomedical and Neuromotor Sciences (DIBINEM), University of Bologna, Via Altura 3, 40139 Bologna, Italy

12 Dr John T. Macdonald Foundation Department of Human Genetics and John P. Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, 1501 NW 10 Ave, Miami, FL 33136, USA

Correspondence to: Prof. Dr. Bernd Wissinger,
 Molecular Genetics Laboratory,
 Institute for Ophthalmic Research,
 Centre for Ophthalmology,
 University of Tübingen,
 Röntgenweg 11,
 72076 Tübingen,
 Germany
 E-mail: wissinger@uni-tuebingen.de

The genetic diagnosis in inherited optic neuropathies often remains challenging, and the emergence of complex neurological phenotypes that involve optic neuropathy is puzzling. Here we unravel two novel principles of genetic mechanisms in optic neuropathies: deep intronic *OPA1* mutations, which explain the disease in several so far unsolved cases; and an intralocus *OPA1* modifier, which explains the emergence of syndromic 'optic atrophy plus' phenotypes in several families. First, we unravelled a deep intronic mutation 364 base pairs 3' of exon 4b in *OPA1* by in-depth investigation of a family with severe optic atrophy plus syndrome in which conventional *OPA1* diagnostics including gene dosage analyses were normal. The mutation creates a new splice acceptor site resulting in aberrant *OPA1* transcripts with retained intronic sequence and subsequent translational frameshift as shown by complementary DNA analysis. In patient fibroblasts we demonstrate nonsense mediated messenger RNA decay, reduced levels of *OPA1* protein, and impairment of mitochondrial dynamics. Subsequent site-specific screening of > 360

Received March 7, 2014. Revised April 17, 2014. Accepted May 6, 2014. Advance Access publication June 25, 2014

© The Author (2014). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

subjects with unexplained inherited optic neuropathy revealed three additional families carrying this deep intronic mutation and a base exchange four nucleotides upstream, respectively, thus confirming the clinical significance of this mutational mechanism. Second, in all severely affected patients of the index family, the deep intronic mutation occurred in compound heterozygous state with an exonic *OPA1* missense variant (p.I382M; NM_015560.2). The variant alone did not cause a phenotype, even in homozygous state indicating that this long debated *OPA1* variant is not pathogenic *per se*, but acts as a phenotypic modifier if it encounters *in trans* with an *OPA1* mutation. Subsequent screening of whole exomes from >600 index patients identified a second family with severe optic atrophy plus syndrome due to compound heterozygous p.I382M, thus confirming this mechanism. In summary, we provide genetic and functional evidence that deep intronic mutations in *OPA1* can cause optic atrophy and explain disease in a substantial share of families with unsolved inherited optic neuropathies. Moreover, we show that an *OPA1* modifier variant explains the emergence of optic atrophy plus phenotypes if combined *in trans* with another *OPA1* mutation. Both mutational mechanisms identified in this study—deep intronic mutations and intragenic modifiers—might represent more generalizable mechanisms that could be found also in a wide range of other neurodegenerative and optic neuropathy diseases.

Keywords: mitochondrial network; ataxia; genetic modifier; deep intronic mutation; cryptic exon

Abbreviations: SNP = single nucleotide polymorphism

Introduction

Optic neuropathies are a substantial cause for blindness in European populations (Munier *et al.*, 1998). The most frequent cause of inherited optic neuropathies are dominant mutations in *OPA1*, a nuclear encoded mitochondrial dynamin-like protein (OMIM: #165500) (Yu-Wai-Man *et al.*, 2010a). However, the genetic cause of inherited optic neuropathies still remains unsolved in ~55% of patients, including absence of *OPA1* mutations by routine diagnostics (Ferre *et al.*, 2009).

Here we addressed the question to what extent and by what mode of action hidden mutations contribute to the share of unsolved cases with inherited optic neuropathy. Moreover, we aimed to elucidate a genetic mechanism why some patients with inherited optic neuropathies develop a complex 'optic atrophy plus' syndrome, which includes extraocular features such as deafness, ataxia and peripheral neuropathy (OMIM: #125250). Although this severe phenotype has been acknowledged in ~20% of all *OPA1* cases (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Yu-Wai-Man *et al.*, 2010b), mechanisms explaining the emergence of this phenotype remain to be elucidated.

We here report for the first time the presence of disease-causing deep intronic mutations in *OPA1*, thus introducing a new mutational mechanism for inherited optic neuropathies. Their consequences have been studied by in-depth clinical, genetic and functional investigation of a family with early-onset optic atrophy plus syndrome. The significance of this new type of mutation is emphasized by the identification of other, independent families with inherited optic neuropathy through screening of a large cohort of so far unexplained patients with inherited optic neuropathy. Secondly, we provide evidence for a modifier effect of a certain *OPA1* variant (c.1311A>G/p.I437M, NM_130837.1; = c.1146A>G/p.I382M on transcript NM_015560), which causes optic atrophy plus phenotypes by a combined mutational effect. This is exemplified in several families with optic atrophy plus who carry the modifier variant *in trans* with a pathogenic (exonic or

deep intronic) *OPA1* mutation. The modifying effect of p.I437M is emphasized by the finding that the variant does not lead to disease even in a homozygous state.

Materials and methods

Phenotypic characterization of the first index family

All available members of Family OAK 587—including the elderly parents (at age 70 and 75 years, respectively)—were systematically phenotyped clinically by a neurologist (M.S.) and an ophthalmologist (F.T.), including funduscopy and optical coherence tomography (for detailed methods, see Supplementary material; for pedigree, see Fig. 3). In addition, all affected members were investigated by nerve conduction studies, motor evoked potentials, MRI, and blood testing for creatine kinase and lactate. Subjects' consent was obtained according to the Declaration of Helsinki and the study was approved by the ethical committee of the University of Tübingen (Az 598/2011BO1).

Genomic screening of candidate genes in Family OAK 587

Exonic mutations in *OPA1*, *OPA3*, *PANK2*, *POLG*, *C10orf2* and in the complete mitochondrial genome (16,569 bp encoding 37 genes and the control region, NC_012920.1) as well as repeat expansions in *FXN* (Friedreich's ataxia) and *ATXN7* (spinocerebellar ataxia 7) were excluded. Gene rearrangements, including deletions and duplications at the *OPA1* locus were excluded by multiplex ligation-dependent probe amplification in two affected subjects and the father (SALSA MLPA KIT P229-B1 *OPA1*, MRC-Holland). Larger chromosomal rearrangements were excluded by comparative genome hybridization applying a Nimblegen chromosome 3 specific 385K probe array (processed by ImaGenes) in one of the affected patients. The transcript NM_130837.1 is the most complete of the currently 12 protein coding *OPA1* transcripts listed in Ensembl release 74, coding for a protein of 1015 amino acids and it is recommended by the *OPA1* nomenclature

working group of Mitodyn.org. The known *OPA1* variant c.1146A>G, p.I382M (NM_015560.2) (Schaaf *et al.*, 2011) corresponds to c.1311A>G, p.I437M based on transcript NM_130837.1. The nomenclature of all following variants refers to transcript NM_130837.1.

Molecular genetic investigation of *OPA1* transcripts from patient-derived primary fibroblasts

For standard cell culture conditions of primary fibroblasts from pedigree members of Family OAK 587 as well as Puromycin treatment for detection of nonsense mediated messenger RNA decay, see the online Supplementary material. After complementary DNA synthesis of RNA from puromycin-treated fibroblasts, screening for mutations on the *OPA1* transcript level was performed with primer pairs that amplify eight overlapping fragments covering the entire coding sequence of transcript NM_130837 (Supplementary material). Average fragment length was ~500bp. Primer pairs that flank the alternative exons 4, 4b and 5b amplify multiple complementary DNA fragments of different lengths. These fragments were separated on an agarose gel, excised and cloned for mutation analysis as well as for verification of intact exon–exon boundaries.

Pyrosequencing assays were designed to discriminate between the *OPA1* alleles and perform quantitative analysis of allelic expression for the common single nucleotide polymorphisms (SNP) rs7624750 in exon 4 and rs9851685 in exon 21. For primer sequences see the Supplementary material. The primers have been designed using the PyroMark Assay Design 2.0 software (Qiagen). Pyrosequencing was performed using the PyroMark Q96 ID instrument, the sample preparation and the data analysis according to the manufacturer's instructions.

Western blot and assessment of mitochondrial morphology

Semi-quantitative analysis of *OPA1* protein bands was performed from primary fibroblast cell lines of patients and a control (for details, see Supplementary material). Mitochondrial morphology was assessed in fibroblasts of all affected subjects of Family OAK 587 and their two parents as well as an age- and gender-matched control for each individual of this family. Their fibroblasts were cultivated and analysed in parallel (Supplementary material).

Screening for the deep intronic *OPA1* mutation in large patient and control cohorts

Three hundred and sixty-nine patients with unexplained bilateral optic atrophy negative for exonic *OPA1* mutations and 241 normal controls were screened for the c.610+364G>A by amplification of a 1166bp fragment containing the entire intron 4b and a subsequent restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay (Supplementary material).

Screening for the *OPA1* p.I437M variant (rs143319805) in a large exome data set of additional cohorts

The frequency of the proposed phenotypic modifier variant c.1311A>G/p.I437M (rs143319805) was analysed in 6499 whole

exome sequencing data sets from the normal population (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project) (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (December 2013). Moreover, we analysed the frequency in 743 exomes from 618 families presenting with at least one of the central neurological features of syndromic *OPA1* disease, namely ataxia, pure or complicated hereditary spastic paraplegia or peripheral neuropathy. These exomes were collected in the Genomes Management Application (GEM.app) (Gonzalez *et al.*, 2013).

Results

A family with severe early-onset 'optic atrophy plus' syndrome and asymptomatic parents

In Family OAK 587 three of six children from an Italian father and a German mother presented with a relatively uniform phenotype of an early-onset multisystemic neurodegeneration (Subjects II:1, II:2 and II:3; for pedigree see Fig. 3; for video illustrating the marked severity of the phenotype and for clinical examination, see the Supplementary material). This consisted of optic atrophy (onset at age 2 years) with thinning of the peripapillary retinal nerve fibre layer (Fig. 1A), near-blind vision reduced to light perception (20/1000), cerebellar ataxia [onset between age 4 to 6 years, leading to wheelchair-dependency within 10–15 years of age and high ataxia scores (Scale for the Rating and Assessment of Ataxia > 29/40 points) at the current age of 46 to 50 years; Table 1], external ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, muscle atrophy, ptosis and spasticity (Table 1). None of the subjects showed evidence of hypacusis. Electrophysiological studies revealed severe axonal sensorimotor neuropathy as well as pyramidal tract damage to both upper and lower extremities. MRI demonstrated mild to moderate cerebellar atrophy and thinning of the cervical spinal cord (Fig. 2). Neither the other three siblings nor the two parents showed any abnormalities on neurological and ophthalmological examination. In particular, neither of the two parents revealed evidence for even subclinical optic atrophy on funduscopy or optical coherence tomography (Fig. 1B).

Exon sequencing of candidate genes reveals a rare missense variant in *OPA1*

No exonic mutation was detected in *OPA1*, *PANK2*, *POLG*, *C10orf2*, *OPA3*, mitochondrial DNA and no repeat expansion in *FXN* and *ATXN7*, except for a known rare missense variant c.1311A>G/p.I437M in *OPA1*. The unaffected father in our family was homozygous for p.I437M, whereas the mother was negative for the variant. Correspondingly, the three affected subjects, as well as their unaffected siblings, were heterozygous for c.1311A>G/p.I437M (henceforth p.I437M), which indicates that this variant *per se* is not pathogenic, neither in heterozygous nor in homozygous state (Fig. 3). Analogous to a previously described family with the p.I437M variant in a compound heterozygous

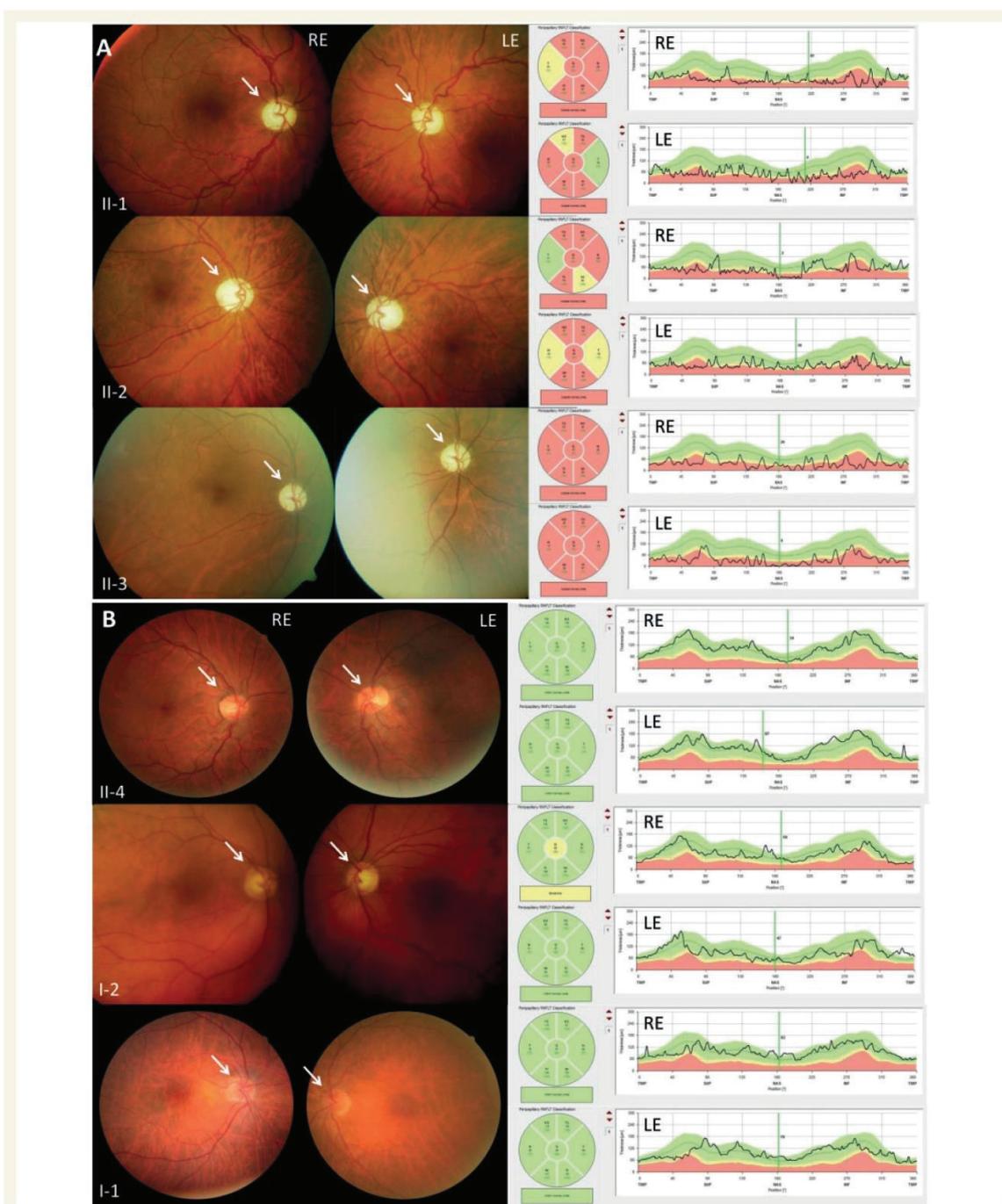


Figure 1 Funduscopy and optical coherence tomography (OCT) in affected and non-affected members of Family OAK 587. (A) Affected family members (Subjects II:1, II:2 and II:3): paleness of the optic nerve heads (white arrow) indicating atrophy of the optic nerve (*left* column), the optical coherence tomography scan demonstrates a thinning of the peripapillary retinal nerve fibre layer (*right* column). Both findings are most severe in the subject with the longest disease duration (Subject II:3). LE = left eye; RE = right eye. (B) Family members without clinical manifestation (Subjects II:4, I:2 and I:1): optic nerve heads showing the normal orange-pink appearance, thickness of the peripapillary retinal nerve fibre layer within normal limits.

Table 1 Clinical and electrophysiological characteristics of affected members of the OPA1 index Families OAK587 and DUK2976

Subject	Family OAK 587			Family DUK2976 III:2
	II:3	II:2	II:1	
Age	50	48	46	13
Clinics				
Age of onset				
Optic atrophy	2	2	2	1
Cerebellar ataxia	6	6	4	2
Wheel chair bound	10	15	14	n.a.
External ophthalmoplegia	+	+	+	-
Vibration sense	Severely reduced	Reduced	Reduced	Reduced
Reflexes				
ATR	-	-	-	-
PTR	+++	+++	+++	-
BTR	+	+	+	.
Spasticity				
Upper extremity	+	-	-	-
Lower extremity	+	+	+	-
Babinski sign	+ / +	+ / +	+ / +	- / -
SARA score	34/40	30/40	29/40	n.d.
Muscle atrophy extremities	+	+	+	+
Bilateral ptosis	+	+	+	-
Hypacusis	-	-	-	-
Blood testing				
Lactate	Normal (<2.2 mmol/l)	Normal (<2.2 mmol/l)	Normal (<2.2 mmol/l)	Normal
Creatine kinase	Normal (<170 U/l)	Normal (<170 U/l)	Normal (<170 U/l)	Normal
Electrophysiology				
Sensory nerve conduction				
Sural nerve	No SNAP	No SNAP	No SNAP	No SNAP
Ulnar nerve	No SNAP	No SNAP	No SNAP	No SNAP
Medianus nerve	No SNAP	No SNAP	No SNAP	No SNAP
Motor nerve conduction				
Peroneal nerve	No CMAP	No CMAP	No CMAP	
Motor evoked potentials	Not evoked UE +LE	Not evoked UE, prolonged LE	Not evoked UE +LE	

ATR = Achilles tendon reflex; PTR = Patellar tendon reflex; BTR = biceps tendon reflex; SARA = Scale for Assessment and Rating of Ataxia; SNAP = sensory nerve action potential; CMAP = compound muscle action potential; UE = upper extremity; LE = lower extremity; + present; - absent. Reference values for nerve conduction studies are given in brackets. Age and age of onset is given in years.

state and a complex early onset inherited optic neuropathy phenotype (Schaaf *et al.*, 2011), we hypothesized that there is a second OPA1 mutation (in *trans*) in our family that—in concert with p.I437M—leads to the severe multisystemic neurodegenerative phenotype seen in the affected family members. Supporting this hypothesis we found by microsatellite marker-based haplotype reconstruction that all affected family members inherited the same maternal OPA1 allele, whereas the three unaffected siblings inherited the opposite maternal OPA1 allele (data not shown).

Allelic imbalance of OPA1 transcripts in patient fibroblasts

We therefore extended OPA1 mutation screening to the transcript level. RNA isolated from Patient II:2 fibroblasts was used for reverse transcriptase PCR of overlapping complementary DNA

fragments. A first round of qualitative complementary DNA analysis did not reveal point mutations or aberrant splice products. We then performed relative quantification of allelic expression of OPA1 transcripts applying pyrosequencing technology. This assay revealed a strong allelic imbalance with a ratio of ~4:1 in favour of the paternally-derived transcripts, whereas equal allele ratios were found at the genomic DNA level (Table 2), indicating reduced steady-state levels of the maternally-derived OPA1 transcripts. These might be caused by reduced transcript stability due to nonsense-mediated messenger RNA decay of transcripts with premature termination codons. To suppress nonsense-mediated messenger RNA decay-dependent allelic decay we used puromycin treatment in patient derived fibroblasts. After this treatment, allelic balance on RNA level could be nearly restored back to normal, as proven by pyrosequencing. Control fibroblasts of healthy donors showed no allelic imbalance and no effect upon puromycin treatment (Table 2).

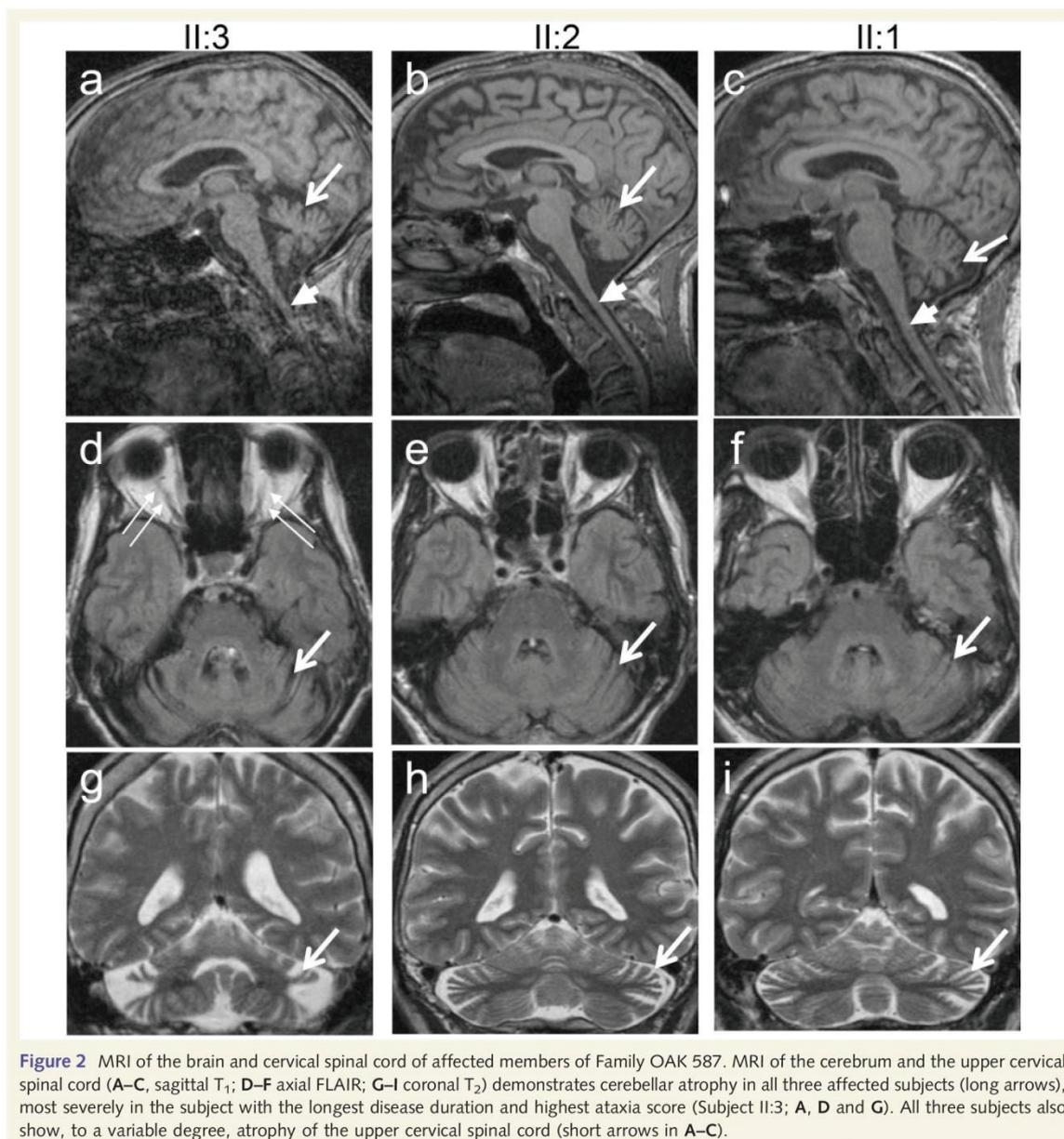


Figure 2 MRI of the brain and cervical spinal cord of affected members of Family OAK 587. MRI of the cerebrum and the upper cervical spinal cord (A–C, sagittal T₁; D–F axial FLAIR; G–I coronal T₂) demonstrates cerebellar atrophy in all three affected subjects (long arrows), most severely in the subject with the longest disease duration and highest ataxia score (Subject II:3; A, D and G). All three subjects also show, to a variable degree, atrophy of the upper cervical spinal cord (short arrows in A–C).

Identification of a deep intronic mutation that activates a cryptic exon

We therefore repeated qualitative transcript analysis with complementary DNA (cDNA) from puromycin-treated patient fibroblasts. Gel electrophoretic analysis of one of these complementary DNA amplicons yielded several additional products (Fig. 4). Gel extraction and analysis of these bands showed insertion of additional

sequences between exons 4b and 5 (Fig. 5). These additional sequences derived from the intron between exon 4b and 5 and thus constitute a cryptic exon activated in these aberrant transcripts. Two forms of aberrant cDNA products were found: the larger product contained a 93 bp sequence (exon C+; corresponding to c.610+366 to c.610+458; NM_130837.2) that introduces a UAG stop codon after 87 bp into the open reading frame (Supplementary material), whereas the smaller aberrant cDNA

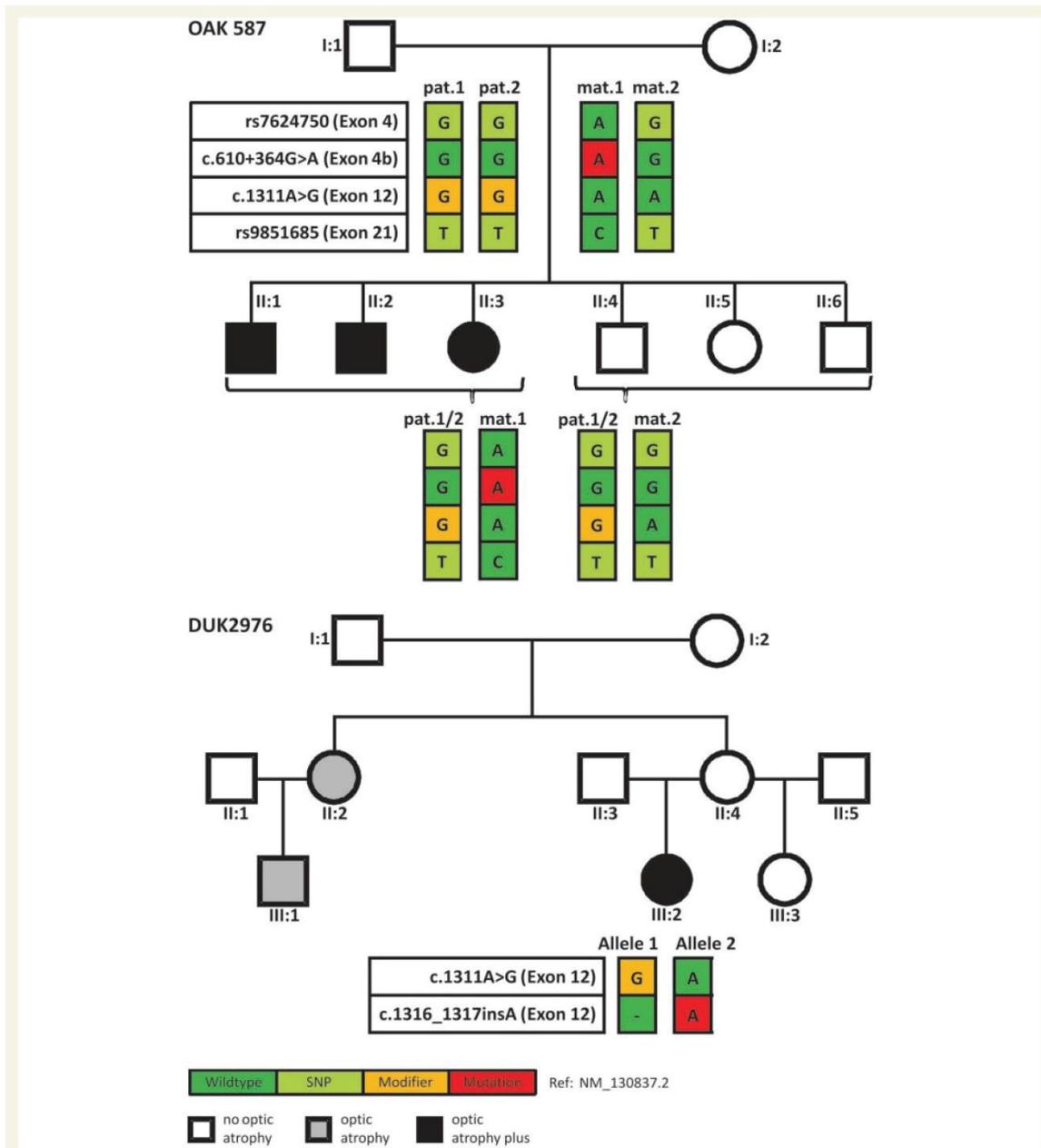
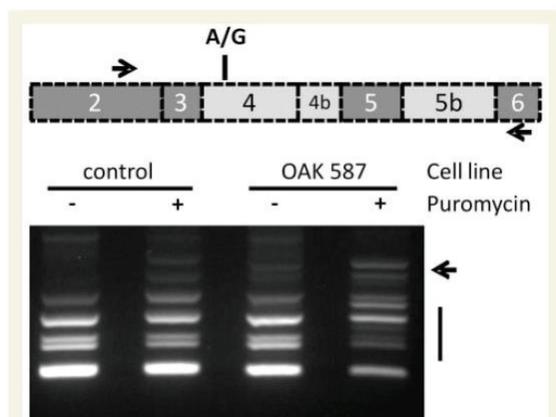


Figure 3 Pedigrees of the Families OAK 587 and DUK2976 including the segregation of *OPA1* mutations and coding SNPs. *Upper pedigree:* All affected siblings of Family OAK 587 inherited the same maternal *OPA1* allele (mat.1), comprising the c.610 + 364G > A deep intronic mutation (red square), whereas all unaffected children inherited the non-mutant maternal *OPA1* allele (mat.2). The father, Subject I:1, is homozygous for p.I437M (yellow square), therefore all children are heterozygous for this variant. Note that Subject I:1 is homozygous for all analysed variants in *OPA1*, most likely due to identity-by-descent. Coding SNPs in exon 4 and exon 21 were used to perform pyrosequencing for discrimination of allelic representation on complementary DNA level. Affected family members are indicated by black symbols and healthy family members by white symbols. *Lower pedigree:* In Family DUK2976 Subject III:2 is compound heterozygous for p.I437M and c.1316_1317insA/p.N440Kfs*14, and presents with a severe optic atrophy plus phenotype. In contrast, her parents—likely heterozygous for only one of the two *OPA1* variants—present only with mild visual disturbances and no symptoms at all, respectively. However, the sister II:2 of the unaffected mother II:4 as well as her daughter III:1 present with non-syndromic optic atrophy (grey).

Table 2 Allelic imbalance of *OPA1* transcripts in patient-derived fibroblasts can be rescued by puromycin treatment

rs9851685, exon 21, all subjects, heterozygous (C/T)		Proportion of allele C (%)	
		Control subject	Patient OAK 587, II:1
DNA	Genomic	48.5	50.6
cDNA	Puromycin –	48.8	17.8
	Puromycin +	47.8	43.5

**Figure 4** Unmasking of aberrant *OPA1* transcripts in puromycin treated patient fibroblasts. Deep intronic mutations in *OPA1* reverse transcriptase PCR amplification with primers located in exons 2 and 6 result in multiple cDNA products due to the alternation of constitutively (dark grey in scheme) and facultatively spliced exons (light grey) in this part of the *OPA1* gene. The presence of a heterozygous coding SNP in exon 4 (rs7624750; depicted as A/G in the scheme) enabled to differentiate between maternal and paternal-allele derived transcripts in the analysed patient (see text). The pattern of reverse transcriptase PCR products obtained with RNA from untreated fibroblasts of Subject II:1 and the control is virtually identical. However treatment of the patient's fibroblasts with puromycin before RNA isolation resulted in a drastically altered pattern with additional bands (arrow) and reduced amounts of regular fragments.

contained a shorter variant of the cryptic exon (exon C) that comprises 61 bp (corresponding to c.610+366 to c.610+426; NM_130837.2). The latter starts at exactly the same nucleotide as exon C+ but lacks its last 32 nucleotides. Insertion of exon C into the transcript induces a frameshift and results in a premature termination codon another 84 bp downstream in exon 5. In both cases translation of the maternal allele is aborted before or within exon 5 supporting the hypothesis that nonsense-mediated messenger RNA decay is the cause for the observed allelic imbalance and that haplo-insufficiency contributes to the molecular pathogenesis in this family.

Using the heterozygous coding SNP rs7624750 in pyrosequencing as a marker to differentiate between paternal and maternal

allele-derived transcripts we found that all maternal allele-derived transcripts were mis-spliced.

Sequencing of the intron between exons 4b and 5 in DNA samples of the affected patients unveiled a single nucleotide exchange G>A at a position 364 bp downstream of exon 4b and adjacent to cryptic exon C (chr3:193335990G>A). The mother and all of the affected siblings were heterozygous for this intronic mutation, whereas the father and the unaffected siblings did not carry the mutation (Fig. 3).

The bioinformatic tool Human Splicing Finder (Desmet *et al.*, 2009) predicts that the deep intronic mutation, henceforth c.610+364G>A (reference: NM_130837.2), creates a novel splice acceptor site with a score of 92.2. The mutation c.610+364G>A was neither observed in 241 healthy Caucasian control samples nor in the 1092 genomes of the 1000 Genome Project (Genomes Project Consortium *et al.*, 2012).

Additional identification of deep intronic mutations in patients with optic atrophy

To further confirm the pathogenicity of the c.610+364G>A *OPA1* mutation as well as to determine its frequency in patients with unexplained optic atrophy, we investigated 369 index cases in which conventional *OPA1* screening failed to detect the disease-causing mutation. Our RFLP analysis in intron 4b revealed three further index cases (OAK 302, OAK 38 and OAK 344), one carrying the same mutation c.610+364G>A as found in the original family and two other index patients with a G-to-A exchange 4 bp upstream (c.610+360G>A reference: NM_130837.2) (Fig. 5). Subsequent cDNA analysis with blood samples from two of these patients confirmed that both mutations result in aberrant splicing of *OPA1* transcripts with pseudoexon activation between exons 4b and 5. Yet in the patients with the c.610+360G>A mutation, the 5' acceptor site is shifted by 4 nucleotides further upstream whereas the alternative 3' donor sites of the cryptic exon are conserved for both deep intronic mutations (as seen for exon C+; Supplementary material). Neither of the two newly identified deep intronic mutations were observed in the 1092 genomes of the 1000 Genomes Project Consortium (Genomes Project Consortium *et al.*, 2012), demonstrating that they are not simply frequent SNPs. Each of the three additional deep intronic mutation carriers showed a classic, slowly progressing optic atrophy and no signs of extraocular neurodegenerative impairment.

Reduced *OPA1* protein level in affected mutation carriers

We further investigated whether deep intronic mutations result in lower *OPA1* protein levels, or whether compensatory mechanisms counteract the genetic defect. Western blot analysis with whole-cell lysates of primary fibroblasts from several members of the OAK 587 and OAK 302 families revealed a reduction of *OPA1* protein normalized for ACTB (Fig. 6). This reduction caused by the deep intronic mutation was in the same range as in a patient

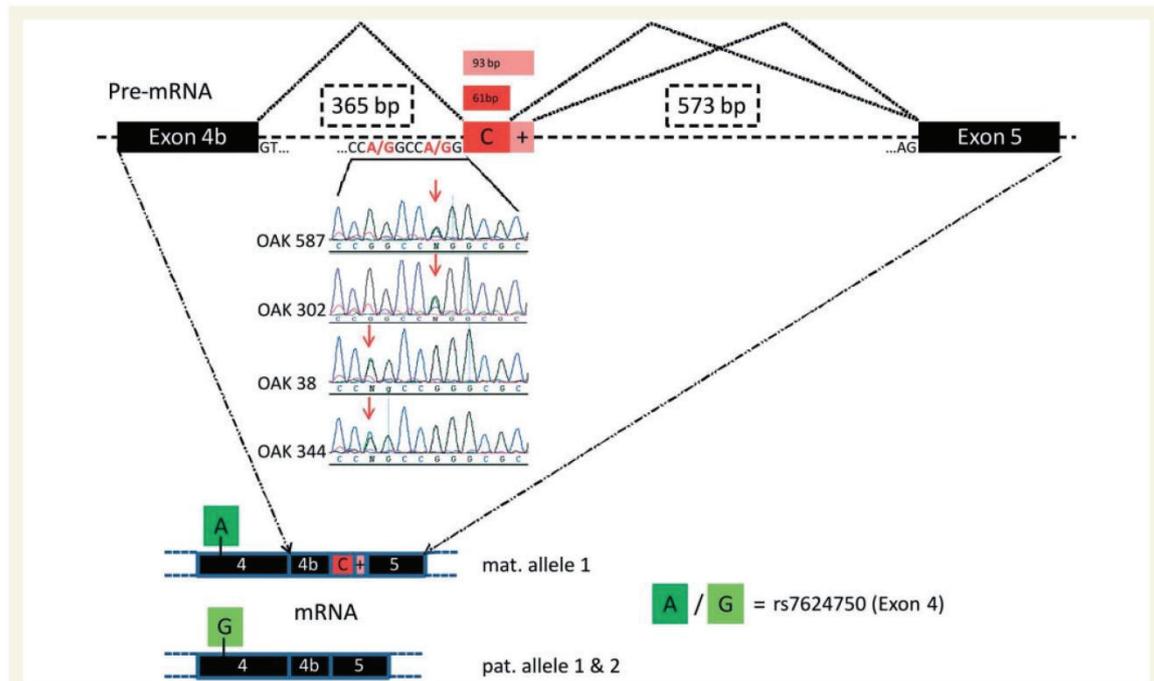


Figure 5 Novel splicing acceptor sites in intron 4b of *OPA1* and resulting cryptic exon inclusion. Base transitions of G > A at positions 360 bp or 364 bp downstream of exon 4b create novel splice acceptor sites that exonize downstream sequences of 65 bp / 97 bp or 61 bp/93 bp. *Top*: Family OAK 587 (index) and Family OAK 302 share the c.610+364G > A mutation, whereas Families OAK 38 and OAK 344 share the mutation c.610+360G > A (*centre*). The cryptic exon is exclusively found in transcripts of the maternal allele (Family OAK 587) which can be determined e.g. by an SNP in exon 4 (rs7624750, *bottom* panel). Black bars = exons; dashed lines = introns; red bars = cryptic exons.

with a well characterized stop mutation in exon 7 (c.868C > T/p.Arg290stop) (Puomila *et al.*, 2005). We also observed a slight reduction of OPA1 protein in fibroblasts of the unaffected father in OAK 587 (homozygous carrier of p.I437M), suggesting some impairment of this modifier variant on OPA1 protein stability. Comparative immunoblotting with an antibody against the mitochondrial outer membrane protein TOMM40 revealed no significant difference in protein levels compared with the control indicating that reduced amounts of OPA1 do not by large affect mitochondrial mass in fibroblasts (Fig. 6).

Increased mitochondrial fragmentation in mutation carriers

To assess the functional consequences of the two *OPA1* variants reported here (c.610+364G > A; and p.I437M), we assessed the morphological characteristics of the mitochondrial network in fibroblasts of the three affected siblings and both parents in Family OAK 587. Compared to age-matched controls, surface ($P < 0.05$), aspect ratio ($P < 0.001$), and form factor ($P < 0.001$) of the mitochondria were significantly reduced in the three affected subjects (Fig. 7A and B). This finding is in line with the well-established effect of *OPA1* mutations that lead to reduced

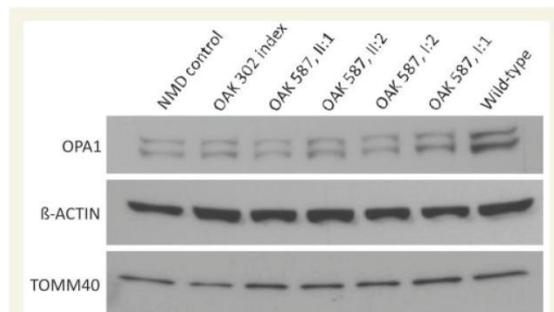


Figure 6 Reduced OPA1 protein amount in patients with deep intronic mutation. Semi-quantitative western blot immunodetection with antibodies against OPA1 (*top*), ACTB (*centre*) and TOMM40 (*bottom*) in whole fibroblast cell lysates from a patient with autosomal dominant optic atrophy with heterozygous c.868C > T/p.Arg290stop in *OPA1* (nonsense-mediated messenger RNA decay control), the affected index patient of Family OAK 302, two affected patients (Subjects II:1 and II:2) as well as the parents of Family OAK 587, and a healthy control (wild-type) (from *left to right*). A clear reduction in OPA1 protein amount can be observed in all samples except the control and the unaffected father (only slight reduction).

mitochondrial fusion and increased mitochondrial fragmentation, respectively (Amati-Bonneau *et al.*, 2005, 2008; Olichon *et al.*, 2007; Zanna *et al.*, 2008). Although clinically asymptomatic, the mother of the affected siblings (Subject I:2) also showed a significantly reduced surface ($P < 0.01$), aspect ratio ($P < 0.05$), and form factor ($P < 0.01$) of the mitochondria (Fig. 7), indicating that even the deep intronic mutation c.610+364G>A *per se* leads to *OPA1*-characteristic dysregulation of mitochondrial dynamics. Mitochondria of the father (Subject I:1) were reduced in aspect ratio ($P < 0.001$) and form factor ($P < 0.001$), but not in surface ($P > 0.05$) and volume ($P > 0.05$) (Fig. 7), compatible with a moderate effect of the homozygous p.I437M modifier variant on mitochondrial dynamics.

Screening for the *OPA1* p.I437M variant in additional cohorts

Although the missense variant I437M does not necessarily lead to a clinical manifestation of optic atrophy when present *per se* at a heterozygous or homozygous state (Family OAK 587), it causes a severe optic atrophy plus syndrome in conjunction with an additional truncating *OPA1* mutation, as observed in our Family OAK 587 as well as in a previously published family (Schaaf *et al.*, 2011). To further elucidate the phenotypic effects of the I437M variant we analysed the presence of this variant in two additional cohorts. In the NHLBI Exome Sequencing Project (public data available at data Exome Variant Server), the p.I437M was present at heterozygous state in 5 of 6499 subjects (minor allele frequency 0.077%). In the disease cohort presenting with at least one of the main neurological features of syndromic *OPA1* disease (ataxia, spastic paraplegia or peripheral neuropathy), the heterozygous I437M variant was observed three times among 618 families (0.5%).

Among the three carriers of the I437M variant in the disease cohort, only a single index case had an additional compound heterozygous exonic variant in the *OPA1* gene, the insertion c.1316_1317insA, p.N440Kfs*14 (Supplementary material).

This 13-year-old patient of US-American origin (Family DUK2976, III:2) presented with a severe optic atrophy plus phenotype consisting of connate bilateral optic atrophy, sensory predominant peripheral neuropathy and truncal as well as limb ataxia with a symptom onset in early childhood (Table 1). The mother of the patient had high arches of her feet at age 31, but was otherwise neurologically asymptomatic. Family history for optic atrophy without further accompanying signs or symptoms was positive on the maternal side (optic atrophy in the maternal aunt and one maternal cousin (Fig. 3, lower pedigree). The father of the index case had myopia, but no further ocular or neurological symptoms in his 30s.

Discussion

Pathogenic deep intronic mutations cause *OPA1* disease

Here we report for the first time deep intronic mutations as a novel genetic mechanism for *OPA1*-associated neurodegenerative

disease. We have identified two deep intronic mutations in intron 4b of the *OPA1* gene in a total of four families with optic atrophy. Both deep intronic mutations are novel and absent in healthy controls. They activate a cryptic splice site, leading to exonization of parts of intron 4b and a consecutive shift of the reading frame. We could demonstrate that the mutant transcripts of the deep intronic mutations are subject to nonsense mediated decay and that *OPA1* protein levels in fibroblasts of mutation carriers are significantly reduced, leading to mitochondrial fragmentation typical for *OPA1*-associated disease.

The deep intronic mutations occur at the 5' end of an Alu repetitive element. Genomic insertion of Alu-sequences into coding regions can cause mis-splicing. This has also been observed for *OPA1*, where *de novo* insertion of an Alu-element into intron 7 of *OPA1* was shown to cause autosomal dominant optic atrophy by skipping of exon 8 (Gallus *et al.*, 2010). However, this is the first case that shows a point mutation within a pre-existing Alu element to induce mis-splicing in *OPA1*, although generally, point mutations in Alu elements are a relatively common (though mostly undetected) cause of exonization (Lev-Maor *et al.*, 2003). Considering that we have only targeted a 6 bp sequence in intron 4b by RFLP-based screening, but not systematically screened all *OPA1* introns, deep intronic mutations might in fact be a relatively frequent mechanism in *OPA1*-associated disease. To unravel additional *OPA1* deep intronic mutations in hereditary and maybe even apparently sporadic inherited optic neuropathies patients, future studies might use targeted *OPA1* genomic sequencing and subsequent functional analysis of the identified intronic variants.

The p.I437M variant acts as a phenotypic modifier to reinforce the pathogenic effect of loss of function mutations

Mechanisms determining severe plus phenotypes rather than pure optic atrophy have been vague so far. Putative dominant negative effects of missense mutations in the GTPase domain, exerting a gain-of-function effect, are frequently associated with a severe phenotype (Amati-Bonneau *et al.*, 2008; Yu-Wai-Man *et al.*, 2010b). An additional mechanism might be a combined mutational effect from a biallelic *OPA1* state of two *OPA1* variants (which, for example, jointly lower the amount of functional *OPA1* protein below a certain critical threshold). For example, it has been shown that, like in Family OAK 587, the I437M variant in compound heterozygous state with another *OPA1* mutation (c.2873_2876del/p.V958Gfs*3) presents with a severe optic atrophy plus phenotype (Schaaf *et al.*, 2011). Our findings corroborate and, at the same time, significantly extend this notion. We show that the later scenario does not follow a simple recessive mode of inheritance but rather that the I437M variant acts as an intralocus modifier. This hypomorphic allele causes a severe optic atrophy plus phenotype when combined with a compound heterozygous *OPA1* null mutation. That second *OPA1* mutation might be either exonic (Family DUK2976) or intronic (Family OAK 587).

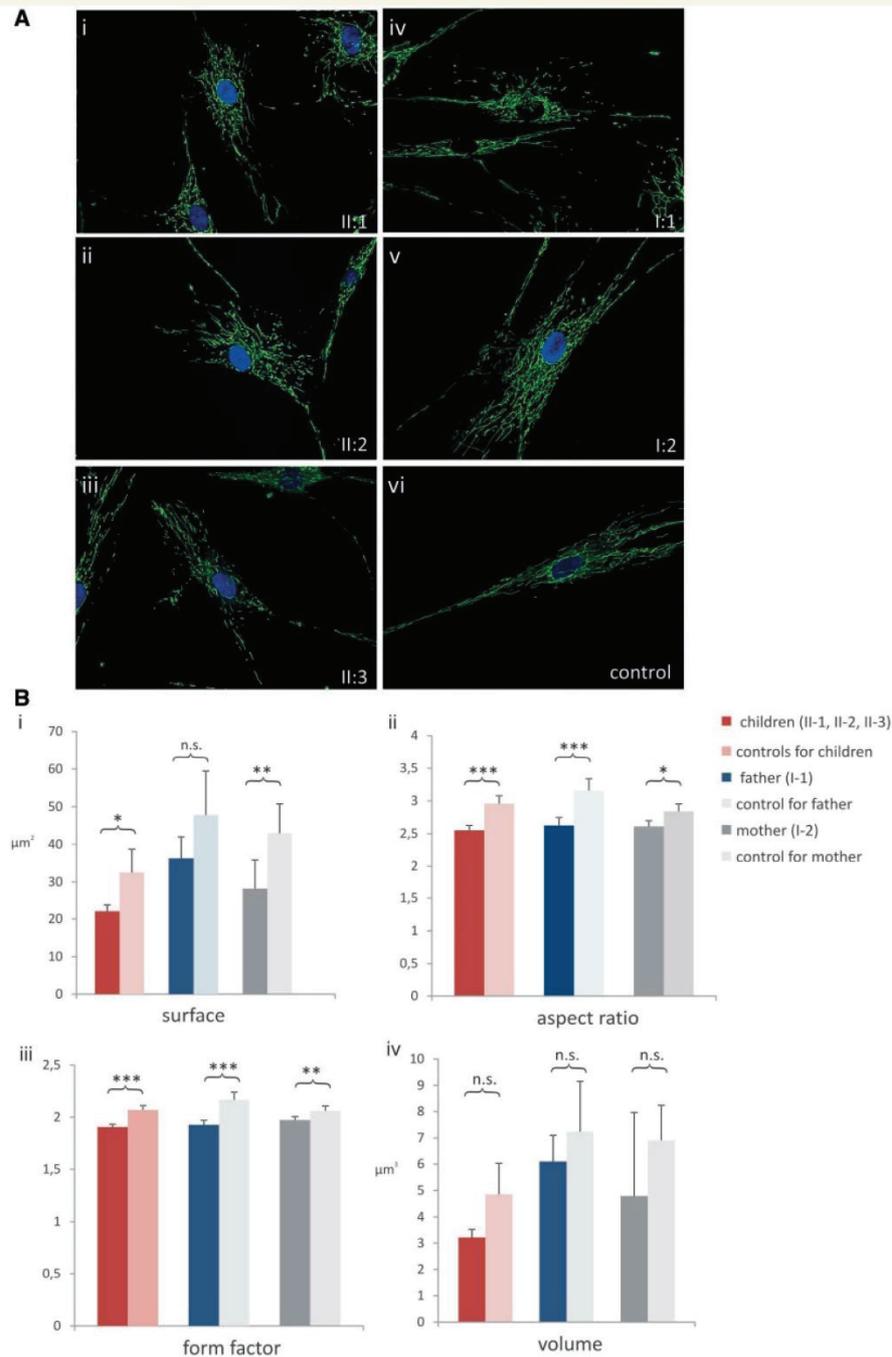


Figure 7 Mitochondrial morphometry. (A) Mitochondrial network stained with MitoTracker Green FM(R) and visualized with a fluorescence microscope. Compared to an exemplary control (i), where mitochondria build a network of lengthly and closely connected mitochondrial alignments, the mitochondrial network is fragmented in all three affected siblings (ii–iv). Similarly, also mitochondria of the mother (vi, Subject I:2) show signs of fragmentation and, to a lesser extent, mitochondria of the father as well (v, Subject I:1). (B) Statistical analysis of mitochondrial morphometry in fibroblasts of the three affected siblings (dark red), the father (dark blue) and the mother (dark grey) of Family OAK 587 compared to age-matched controls. Four aspects of morphology were analysed: (i) surface; (ii) aspect ratio (major axis/minor axis); (iii) form factor ($\text{surface}^2/4 \pi \text{ volume}$); and (iv) volume. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. = not significant.

The notion of I437M acting as an intralocus modifier is based on the finding that in all three families [OAK 587, DUK2976 and the family described by Schaaf *et al.* (2011)] the p.I437M variant is associated with a severe 'optic atrophy plus' phenotype if occurring with another *OPA1* mutation. In contrast, these three truncating *OPA1* mutations alone cause a pure optic atrophy phenotype. Compared to the compound heterozygous null mutations, the I437M variant alone does not cause disease *per se*, neither in heterozygous nor in homozygous state as observed in Family OAK 587. In fact, the homozygous father Subject I:1 is still healthy at the age of 76 years, without evidence for subclinical optic atrophy. In addition to our clinical observation in three independent families, several other lines of evidence also support an adverse effect of the p.I437M on *OPA1* function.

First, amino acid sequence alignment of *OPA1* and its homologues in diverse species shows that the isoleucine at position 437 (Ile437) localizes to the GTPase domain of *OPA1* and is fully conserved in vertebrates, invertebrates (*Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*) as well as in yeast (Supplementary material).

Second, the p.I437M variant is very rare (5/~6500 exomes) in the Exome variant server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), thus demonstrating that it is not simply a frequent SNP.

Finally, Ile437 in *OPA1* corresponds to the conserved Ile120 in the dynamin proteins DNM1, DNM2 and DNM3 and is part of a dynamin superfamily-specific β -strand (β 2b). This β -strand directly follows the 'cis-stabilizing loop' that stabilizes nucleotide-dependent dimerization of the GTPase domains (Chappie *et al.*, 2010). Furthermore, Ile120 points into the hydrophobic core of the GTPase domain and interacts, for example, with Ile101 of the preceding α -helix (Supplementary material). A substitution of Ile120(dynamin)/Ile437(*OPA1*) to methionine might locally destabilize the GTPase domain and thus partially interfere with its nucleotide-dependent function (Oliver Daumke, personal communication).

OPA1 plus: an autosomal-recessive ataxia mimic with cervical cord atrophy

The clinical presentation of the affected patients in Families OAK 587 and DUK2976—namely, early-onset, multisystemic neurodegenerative disease—mimics a picture well known from a variety of autosomal-recessive neurodegenerative diseases, such as autosomal-recessive ataxias, hereditary spastic paraplegias or lysosomal storage disorders, which might likewise include optic atrophy, spasticity and polyneuropathy [e.g. Friedreich's ataxia, spastic paraplegia type 7, Gaucher's disease or SPOAN (spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy) (Macedo-Souza *et al.*, 2009)]. In addition, also the frequently observed reduced penetrance in *OPA1* [as seen in Subject I:2 of Family OAK 587 and as described in the literature (Cohn *et al.*, 2007)] might mislead towards an apparently recessive disease in these subjects. Thus, *OPA1* mutations should be taken into the differential diagnosis of patients presenting with such seemingly recessive disease, and intronic mutations should be searched for if exonic *OPA1* sequencing remains inconclusive.

Although most features of the affected siblings of our index family fit well with the reported phenotype of optic atrophy plus syndromes (Yu-Wai-Man *et al.*, 2010b), our clinical findings modify and extend this phenotypic spectrum. Unlike most patients with optic atrophy plus (Amati-Bonneau *et al.*, 2005; Yu-Wai-Man *et al.*, 2010b; Schaaf *et al.*, 2011), none of our patients was suffering from hearing impairment, demonstrating that this feature is not an obligatory part of the *OPA1*-plus cluster. Moreover, our MRI results demonstrate that atrophy of the cervical spinal cord can be part of the disease spectrum, whereas cerebellar atrophy might be only mild, despite severe ataxia [SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia) scores ≥ 29 points]. This resembles findings in patients with Friedreich's ataxia, where atrophy of the spinal cord is also common, whereas cerebellar atrophy is mild even in late disease stages. This parallel might indicate that, as in Friedreich's ataxia, also *OPA1*-ataxia might result largely from a spinal degeneration and only to a smaller extent from cerebellar degeneration.

Identification of more generalizable mutational mechanisms?

The mutational mechanisms identified in this study—deep intronic mutations and intragenic modifiers—might also be of relevance beyond the field of *OPA1* genetics. This notion is corroborated by the previous identification of deep intronic mutations in another hereditary neurodegenerative disease (ataxia telangiectasia; deep intronic mutation in *ATM*; Cavalieri *et al.*, 2013) as well as in a retinal degeneration (Leber's congenital amaurosis, deep intronic mutation in *CEP290*; den Hollander *et al.*, 2006). Taken together with our findings from *OPA1*, these observations make it highly likely that deep intronic mutations can be found also in a wide range of other neurodegenerative and optic neuropathy diseases where deep intronic mutations are not yet known and where the relative share of genetically unexplained patients is still high. This is important to acknowledge as these mutations will be missed even if using the current state-of-the-art whole-exome approaches.

The presence and action of genetic modifiers in neurodegenerative disease is frequently postulated, however, genetic mapping of such loci or even the identification of such factors has been rarely achieved. In Leber's hereditary optic neuropathy, the other major form of inherited optic neuropathy, there is strong evidence that certain mitochondrial haplogroups govern clinical expression in subjects with principle mitochondrial DNA mutations at m.11778 (Hudson *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2008). Moreover, a modifier that may explain the pronounced gender difference in penetrance in this disease has been mapped on Xp21-q21 (Hudson *et al.*, 2005) and Xq25-27.2 (Shankar *et al.*, 2008), respectively, though their identity is still unknown.

Reports on intragenic modifiers that modulate phenotype severity and disease penetrance (as the p.I437M *OPA1* variant in this paper) are still limited (Gouya *et al.*, 2002). Nonetheless we suggest that such a mechanism represents an attractive explanation for expression variability of traits that rely on dose-sensitive or threshold dependent functions. As variability in disease severity

and disease phenotype within families as well as between subjects carrying the same mutation have been described in a large number of genetic diseases [e.g. for *SOD1* mutations in amyotrophic lateral sclerosis (Synofzik *et al.*, 2010) or *PRNP* mutations in hereditary prion disease (Synofzik *et al.*, 2009)], it is likely that such intragenic modifiers exist also for other neurological/ophthalmological diseases.

Conclusions

We show that deep intronic mutations in *OPA1* are a cause of optic atrophy and might be responsible for inherited optic neuropathies in a substantial group of so far unsolved inherited optic neuropathy patients. Furthermore, we demonstrate by example of the I437M variant that certain *OPA1* sequence alterations can act as intralocus disease-modifiers. If occurring in a compound-heterozygous state, such a modifier can cause optic atrophy plus disease, following the model of a combined mutational effect. Taken together, we suggest that whole gene sequencing of *OPA1* and/or expansion of diagnostics to the transcript level are important tools to solve unexplained cases of optic atrophy and optic atrophy plus syndromes. The mutational mechanisms identified in this study—deep intronic mutations and intragenic modifiers—could represent more generalizable mechanisms that might also be found in a wide range of other neurodegenerative and optic neuropathy diseases.

Acknowledgements

We thank the patients and their family members for participating in our study, Doron Rapaport (Tübingen) for the anti-TOMM40 antibody, Beate Leo-Kottler and Bernhard Jurklics for ophthalmological examinations and recruitment of patients with Autosomal Dominant Optic Atrophy, and in particular Oliver Daumke (Berlin) for the modelling of the 3D structures of the *OPA1* GTPase domain and his support in evaluating the putative function of I437M.

Funding

This work was supported by the German Ministry of Education for the E-RARE projects ERMION (to V.C., 01GM1006 to B.W.) and EUROSCAR (01GM1206 to L.S.); by grants of the Fondazione Telethon (GGP06233, GGP1118 and GPP10005 to V.C.); an FP7 grant for NeurOmics (2012-305121 to L.S.), 'HSP/CMT genetics' (PIOF-GA-2012-326681 to R.S.); NIH 5R01NS075764 and MDA (to S.Z.) and mitoNET (01GM1113E to L.S.) and the Interdisciplinary Center for Clinical Research IZKF Tübingen (2191-0-0 to MS and 1970-0-0 to R.S.).

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A, Chevrollier A, Viala F, Miot S, *et al.* OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* 2005; 58: 958–63.
- Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, *et al.* OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 2008; 131: 338–51.
- Cavaliere S, Pozzi E, Gatti RA, Brusco A. Deep-intronic ATM mutation detected by genomic resequencing and corrected *in vitro* by antisense morpholino oligonucleotide (AMO). *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 774–8.
- Chappie JS, Acharya S, Leonard M, Schmid SL, Dyda F. G domain dimerization controls dyminin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 2010; 465: 435–40.
- Cohn AC, Toomes C, Potter C, Towns KV, Hewitt AW, Inglehearn CF, *et al.* Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 656–62.
- den Hollander AI, Koeneke RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voeseke KE, *et al.* Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 556–61.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e67.
- Ferre M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H, *et al.* Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. *Hum Mutat* 2009; 30: 692–705.
- Gallus GN, Cardaioli E, Rufa A, Da Pozzo P, Bianchi S, D'Eramo C, *et al.* Alu-element insertion in an OPA1 intron sequence associated with autosomal dominant optic atrophy. *Mol Vis* 2010; 16: 178–83.
- Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491: 56–65.
- Gonzalez MA, Lebrigio RF, Van Booven D, Ulloa RH, Powell E, Speziani F, *et al.* GENomes Management Application (GEM.app): a new software tool for large-scale collaborative genome analysis. *Hum Mutat* 2013; 34: 842–6.
- Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, *et al.* The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet* 2002; 30: 27–8.
- Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, *et al.* Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 228–33.
- Hudson G, Keers S, Yu Wai Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, *et al.* Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 1086–91.
- Ji Y, Zhang AM, Jia X, Zhang YP, Xiao X, Li S, *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m.11778G->a mutation. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 760–8.
- Lev-Maor G, Sorek R, Shomron N, Ast G. The birth of an alternatively spliced exon: 3' splice-site selection in Alu exons. *Science* 2003; 300: 1288–91.
- Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, Licinio L, Lezirovitz K, Cavacana N, *et al.* Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy: new observations, locus refinement, and exclusion of candidate genes. *Ann Hum Genet* 2009; 73: 382–7.
- Munier A, Gunning T, Kenny D, O'Keefe M. Causes of blindness in the adult population of the Republic of Ireland. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 630–3.

Supplement 1

Supplementary tables, material and methods

Antibodies used for Westernblot

Target	Host species	Target species	Company	Dilution
OPA1	Mouse	Human	BD Transduction Laboratories™	1:500
B-ACTIN, clone C4	Mouse	Human	Millipore	1:4000
TOMM40	Rabbit	Human	Kind donation of Doron Rapaport	1:1000
2nd-Mouse	Donkey	Rabbit	GE Healthcare	1:10000
2nd-rabbit	Goat	Mouse	Calbiochem	1:10000

Antibodies were diluted in 5 % skimmed milk (TBS-T) and incubated overnight at 4 °C (1st antibody) or 1 h at room temperature (2nd antibody). Washing steps were carried out at room temperature with 1x TBS for 3 x 10 min. Before applying ECL solution, membranes were washed twice in PBS (PAA Laboratories, Cölbe, Germany)

Funduscopy and optical coherence tomography

Fundus photographs have been generated using the Carl-Zeiss Meditec AG CCD-Kamera JC-12 and the Nidek non mydriatic fundus camera AFC-230.

SD-OCT imaging was done as previously described (Kernstock *et al.*, 2012).

Patients were subjected to SD-OCT using the commercially available Spectralis® HRA+OCT device (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). For acquisition of circular scans, if possible a mean of 16 images was calculated with automated alignment of iterative recordings using the automated real-time mode, thereby increasing the signal-to-noise ratio by a factor of four (Wolf-Schnurrbusch *et al.*, 2008).

For quantification of retinal thickness, we used the proprietary software package version 3.1 from Heidelberg Engineering. The software divided the ring scan into six segments, of which four include 45° (nasal superior, temporal superior, nasal inferior and temporal inferior segments) and two include 90° (nasal and temporal segments). Average thickness was calculated by the software for each segment and the total ring scan.

Cell culture, puromycin treatment and RNA isolation from patient-derived primary fibroblasts

Primary fibroblasts from pedigree members of OAK587 were cultivated in RPMI 1640 with L-Glutamine + 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) + 1 % Penicilin/Streptomycin (PAA

Laboratories, Cölbe, Germany) + 1 % Sodium Pyruvate (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany). The cells were grown until ~90 % confluency in a T175 cell culture flask. Upon puromycin treatment, medium was removed and replaced by 10 ml supplemented RPMI medium (see above) + 15 % FBS + 1000 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) in order to prove Nonsense mediated mRNA decay (NMD). The cells were incubated at 37 °C and 5 % CO₂ for 10 h before RNA isolation (Noensie and Dietz, 2001). After puromycin treatment, cells were trypsinized and whole RNA was extracted using the RNeasy plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was treated with DNase 1 (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) in order to remove contamination by genomic DNA prior to reverse transcription. Synthesis of cDNA was carried out with the High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Primer sequences of the eight overlapping fragments A1-F for OPA1 cDNA analysis

Fragment	Forward Primer	Reverse Primer	Included exons
A1	CTCCCGCGTGGCCGTCT	CACAATGTCAGGCACAATCC	Ex1-Ex3
A2	GGCCAGCAAGATTAGCTACG	CCTGAA GTTGGTCAATTTTCTCTTTG	Ex2-Ex6
B	CGTTTAGAGCAACAGATCGT GGA	CAGATGATCTTGCGTATTATA ACTGG	Ex5-Ex8
C	GATGTTCTCTCTGATTATGAT GCC	TTCATATTCTCTTATAGCTTCA ATGC	Ex8- Ex16
D	GGAAAGCTCTTCCCAATGAA	CGCAGCTGGAAGGTAGATGT	Ex14- Ex20
E1	CCTTGAAACTGAATGGAAGA AT	CTGTCCTCCGCAAAGTCATT	Ex18- Ex21
E2	TGGATATCAAGCTTAAACAG TGGA	TGGGTGCTCCTCATTACATT	Es20- Ex24
F	CCAGACTGGAAAAAGAGGTG GTTA	AAAGAGGCTGGACAAAAGAC GTTG	Ex23- 3'UTR

Pyrosequencing Assays for allelic discrimination of the heterozygous SNPs rs7624750 (Exon 4) and rs9851685 (Exon 21) on DNA and cDNA level

Primers for both SNP Assays:

Assay	Forward Primer 5' to 3'	Reverse Primer 5' to 3' (biotinylated)	Sequencing Primer 5' to 3'
rs7624750	TGGATTGTGCCTGACATTGT	[BTN]CCGTTTCTTCCGGAGAACCTAA	TTAGAAAAGCCCTTCCT
rs9851685	AGAATTTTCCCGCTTTATGACAG	[BTN]CGCAAAGTCATTCCACTTGTGT	TTTGATAAACTTA AAGAGGC

Western Blot

Primary fibroblast cell lines of patients and a control were cultivated in DMEM, supplemented with 10 % FCS and 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA). Confluent monolayers were harvested at passages P7 to P18 and lysed with modified RIPA buffer (composition upon request). Protein concentration was determined spectrophotometrically using Bradford reagent (BioRad, München, Germany). 20 µg of total protein were separated on 8 % polyacrylamide gels and blotted into nitrocellulose membrane (BioRad, München, Germany). The origin and dilutions of the primary and secondary antibodies is provided in Supplementary Table 3. Immunodetection was performed applying an ECL kit (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) and emitted signals were detected with Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Dornstadt, Germany). Semi-quantitative analysis of protein bands was conducted on densitometric scans using ImageJ software.

Assessment of mitochondrial morphology

Fibroblasts of all affected subjects of the index family and their two parents as well as an age- and gender-matched control for each individual of the index family were cultivated and analyzed in parallel. All fibroblasts were cultivated at least 13 days in DMEM + 10 % FCS + 10 mM galactose + 2 mM sodium pyruvate + 10 mM HEPES + 2 mM L-glutamine. Mitochondria were stained with mitotracker green FM (invitrogen™, 1:10.000) nuclei with Hoechst 33258 (invitrogen™, 1:10.000) for 30 minutes. After replacement of the medium, mitochondria were visualized with a fluorescence microscope (Axio Observer Z1, AxioCam MRm, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) with incubation chamber for stable atmosphere (37 °C, 5 % CO₂). Z-stacks of ten fibroblasts were acquired using a 40x objective. Using Imaris software 7.1.1 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) a 3D reconstruction of the mitochondrial morphology was built. The parameters surface, volume, aspect ratio (major axis / minor axis), and form factor ($\text{surface}^2 / 4 \pi \text{ volume}$) were calculated. For each parameter > 750 mitochondria were included. Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Bonferroni correction (IBM SPSS Statistics 20.0, IBM). Mean and double standard error of mean (SEM) are given.

RFLP Screening for two neighboring DIMs in Intron 4b of OPA1

We used two primers OPA1-In4b-L1 (5'- CCCCTTTTGCTGATTTTCA-3', upstream of Exon 4b) and OPA1-In4b-R2 (5'- TGCTTGTCACCTTCAGATCCA-3', within Exon 5) to amplify a 1166bp fragment containing the entire intron 4b. Wildtype sequence of this fragment contains a single recognition site for the restriction enzyme EagI (C'GGCCG). Digestion of the wildtype amplicon thus results in two fragments of 436 bp and 730 bp, respectively. Cleavage of the mutant allele, however, is prevented by the mutation c.610+364G>A (-->CGGCCA) and by the second mutation c.610+360G>A (-->CAGCCG). Therefore, electrophoretic separation of digestion products shows three distinct bands in

samples of heterozygous mutation carriers: one arising from the undigested mutant allele and two resulting from cleavage of the wildtype allele. Samples that appeared positive for a mutation in RFLP screening were verified by standard Sanger sequencing.

References

Kernstock C, Dietzsch J, Januschowski K, Schiefer U, Fischer MD. Optical coherence tomography shows progressive local nerve fiber loss after disc hemorrhages in glaucoma patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250: 583-7.

Noensie EN, Dietz HC. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nature Biotechnol* 2001; 19: 434-9.

Wolf-Schnurrbusch UE, Enzmann V, Brinkmann CK, Wolf S. Morphologic changes in patients with geographic atrophy assessed with a novel spectral OCT-SLO combination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3095-9.

Supplement 2

Variant C (c.610+364G>A)

_____ **Exon 4b** _____

```

GT CAC AAA TTG GTT AGT GAA GTC ATA GGA GCT TCT GAC CTA CTT CTC TTG
TTA GGC GCG GTG GCT CAT GCC TGT AAT CCC AGC ATT TTG GGA GGC CAA GGC
AGG CGG ATC ATG AGG TTC TCC GGA AGA AAC GGC GTT TAG AGC AAC AGA TCG
TGG ATC TGA AAG TGA CAA GCA TTT TAG AAA G

```

_____ **Exon 5** _____

Variant C+ (c.610+364G>A)

```

GT CAC AAA TTG GTT AGT GAA GTC ATA GGA GCT TCT GAC CTA CTT CTC TTG
TTA GGC GCG GTG GCT CAT GCC TGT AAT CCC AGC ATT TTG GGA GGC CAA GGC
AGG CGG ATC ATG AGG TCA GGA GAT CGA GAC CAT CCT GGC TAA CAC GGT TCT
CCG GAA GAA ACG GCG TTT AGA GCA ACA GAT CGT GGA TCT GAA AGT GAC AAG
CAT TTT AGA AAG

```

Variant C* (c.610+360G>A)

```

GT CAC AAA TTG GTT AGT GAA GTC ATA GGA GCT TCT GAC CTA CTT CTC TTG
TTA GGC GCG CGC GGT GGC TCA TGC CTG TAA TCC CAG CAT TTT GGG AGG CCA
AGG CAG GCG GAT CAT GAG GTT CTC CGG AAG AAA CGG CGT TTA GAG CAA CAG
ATC GTG GAT CTG AAA GTG ACA AGC ATT TTA GAA AG

```

Variant C+* (c.610+360G>A)

```

GT CAC AAA TTG GTT AGT GAA GTC ATA GGA GCT TCT GAC CTA CTT CTC TTG
TTA GGC GCG CGC GGT GGC TCA TGC CTG TAA TCC CAG CAT TTT GGG AGG CCA
AGG CAG GCG GAT CAT GAG GTC AGG AGA TCG AGA CCA TCC TGG CTA ACA CGG
TTC TCC GGA AGA AAC GGC GTT TAG AGC AAC AGA TCG TGG ATC TGA AAG TGA
CAA GCA TTT TAG AAA G

```

cDNA sequences of aberrant *OPAI* splice products contain cryptic exons and premature termination codons

Sequences of the two aberrant splice variants (variant C and C+) as induced by the c.610+364G > A DIM as well as the sequence of the two aberrant splice variants (variant C* and variant C+*) as induced by the second DIM c.610+364G > A are shown in the context of the flanking exon 4b and exon 5 sequences (in grey). The inserted cryptic exon sequences are shown as yellow bars. Premature termination codons present within the inserted cryptic exon sequences or in the downstream exon 5 sequence (due to an alteration of the reading frame) are indicated in bold red letters.

Supplement 3

```

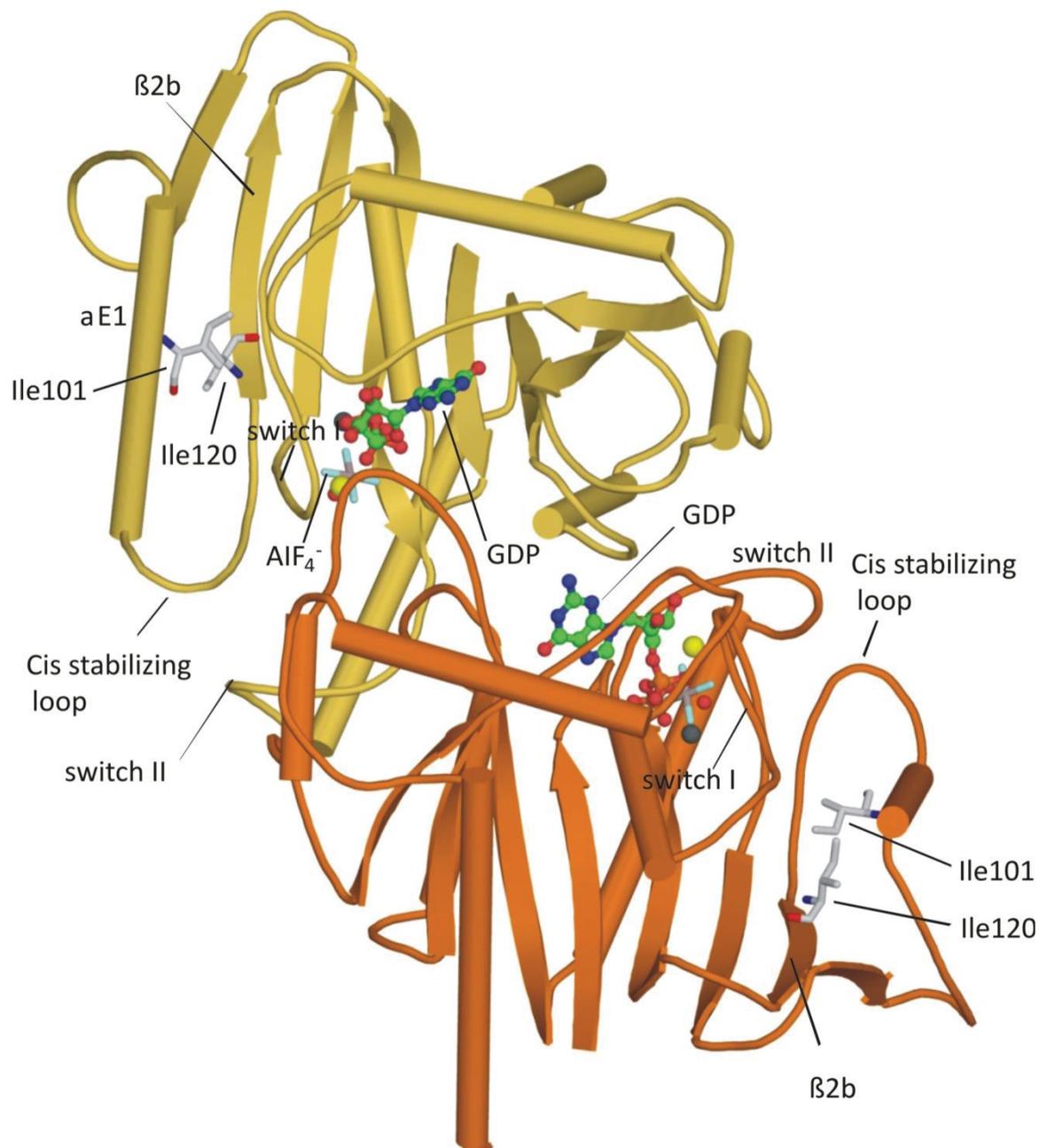
Homo_sapiens_(OPA1)          REFDLTKEEDLAALRHEIELRMRKNVKEGCTVSPETISLNVKGPGLQRMVLV
Mus_musculus_(OPA1)         REFDLTKEEDLAALRHEIELRMRKNVKEGCTVSPETISLNVKGPGLQRMVLV
Canis_familiaris_(OPA1)    REFDLTKEEDLAALRHEIELRMRKNVKEGCTVSPETISLNVKGPGLQRMVLV
Gallus_gallus_(OPA1)       REFDLTKEEDLAALRNEIEIRMRNSVKEGCTVSTETISLSVKGPGLQRMVLV
Xenopus_laevis_(OPA1)      REFDLTKETDLAALRNEIEVRMRKSVKNGQTVSPETISLSVKGPGIQRMLV
Takifugu_rubripes_(OPA1)   REFDLTKEDDLAALRREIELRMRKSVKEGQTVSSETISLNVKGPPIPRMLV
Drosophila_melanogaster_(OPA1-like) REYDLTKESDLQDLRRDVEFRMKASVRGGKTVSNEVIAMTVKGPGLQRMVLV
Caenorhabditis_elegans_(Eat-3) REFDLTKETDLQQLRNETEVRMRNSVRDGKTVSNEVISLTVKGNLPRMLV
Schizosaccharomyces_pombe_(msp1)  SGVQLGKITDFSKIQH-ILTDLNMAVPSSQGVDNPIRLTIYASHIPNLSLI
Saccharomyces_cerevisiae_(mgm1)  PSMRLYNIKDFKEVKKR-MLMELNMAVPTSEAVSEEPILTIKSSRVPDLSLV
      * : * : ::      :. * . * . : * : : . : : * :

```

Evolutionary conservation of p.I437 in OPA1

The isoleucine at position 437 of OPA1 is highly conserved in the animal kingdom (black arrow), including homologs in mouse, *C. elegans* and yeast. Alignment by Clustal omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)

Supplement 4



Mapping the I437M mutation on the highly conserved GTPase domain dimer of Dynamin 1

Ribbon type presentation of the Dynamin 1 GTPase domain dimer (pdb 2x2e) (21) in the presence of GDP and AIF_4^- . A catalytic sodium ion is shown as yellow sphere, Mg^{2+} is shown as grey sphere, the GDP molecule is shown in ball-and-stick representation. Ile120 in $\beta 2b$ and an interacting residue, Ile101, in the preceding helix $\alpha E1$ are shown in ball-and-stick representation. These residues are close to the "cis-stabilizing loop" which stabilizes the position of switch II required for GTPase domain dimerization (21). Consequently, a local destabilization of this region by the I120M(Dynamin 1)/I437M(OPA1) mutation might partially interfere with dimerization and, therefore, GTPase activation.

Supplement 5



Sequencing Reads of the index patient of family DUK297.

Sequencing reads were inspected manually using the BamView tool v1.2.10. The patient is heterozygous for two mutations in the *OPA1* gene that are located only 5 bp apart: the missense change chr3:193361167A > G (p.I437M) and the insertion chr3: 193361172_193361173insA (c.1316_1317insA, p.N440Kfs*14). As the screenshot clearly demonstrates, each of the sequencing reads carries only one of the mutations, either the missense change (labelled by a green box), or the insertion (labelled by a vertical red line). This distribution strongly suggests that the two mutations are located on different alleles and therefore compound heterozygous.

IX.3 Artikel 2: Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1

Antisense Oligonucleotide Mediated Splice Correction of a Deep Intronic Mutation in OPA1

Tobias Bonifert^{1,2}, Irene Gonzalez Menendez¹, Florian Battke³, Yvonne Theurer^{4,5}, Matthis Synofzik^{4,5}, Ludger Sch Is^{4,5} and Bernd Wissinger¹

Inherited optic neuropathies (ION) present an important cause of blindness in the European working-age population. Recently we reported the discovery of four independent families with deep intronic mutations in the main inherited optic neuropathies gene *OPA1*. These deep intronic mutations cause mis-splicing of the *OPA1* pre-messenger-RNA transcripts by creating cryptic acceptor splice sites. As a rescue strategy we sought to prevent mis-splicing of the mutant pre-messenger-RNA by applying 2'-O-methyl-antisense oligonucleotides (AONs) with a full-length phosphorothioate backbone that target the cryptic acceptor splice sites and the predicted novel branch point created by the deep intronic mutations, respectively. Transfection of patient-derived primary fibroblasts with these AONs induced correct splicing of the mutant pre-messenger-RNA in a time and concentration dependent mode of action, as detected by pyrosequencing of informative heterozygous variants. The treatment showed strong rescue effects (~55%) using the cryptic acceptor splice sites targeting AON and moderate rescue (~16%) using the branch point targeting AON. The highest efficacy of Splice correction could be observed 4 days after treatment however, significant effects were still seen 14 days post-transfection. Western blot analysis revealed increased amounts of OPA1 protein with maximum amounts at ~3 days post-treatment. In summary, we provide the first mutation-specific *in vitro* rescue strategy for OPA1 deficiency using synthetic AONs.

Molecular Therapy—Nucleic Acids (2016) 5, e390; doi:10.1038/mtna.2016.93; published online 22 November 2016

Subject Category: Antisense oligonucleotides and Therapeutic proof-of-concept

Introduction

Inherited optic neuropathies (ION) are a major cause of hereditary blindness in infants of Western populations with currently no causative treatment available. Apart from mutations in the mitochondrial genome causing Leber's hereditary optic neuropathy, in total six nuclear genes have been identified to cause nonsyndromic optic neuropathies: *OPA1* (refs. 1,2), *OPA3*(ref. 3), *OPA7* (*TMEM126*),⁴ *ACO2*(ref. 5), *WFS1*(refs. 6,7), and *RTN4IP1*(ref. 8). The large GTPase OPA1 is anchored to the inner mitochondrial membrane and has been ascribed to participate in various functions, including mitochondrial DNA maintenance,⁹ tethering of the cristae junctions¹⁰ and most importantly: fusion of the inner mitochondrial membrane.¹¹ Molecular analyses of patients with heterozygous *OPA1* mutations suggest haploinsufficiency as the most predominant pathomechanism underlying *OPA1* associated retinal ganglion cell loss in affected subjects.¹² Although *OPA1* accounts for more than 60% of all cases in dominant optic atrophies,¹³ the remaining share of cases is not necessarily explained by mutations in novel genes. We could recently show that some of these unresolved IONs result from deep intronic point mutations (DIMs) in *OPA1* (ref. 14). The mutations c.610+360G>A and c.610+364G>A (nucleotide positions referring to transcript NM_130837.1) found in four independent families are located within intron 4b

of *OPA1* and each activate a cryptic splice acceptor site and one of two pre-existing splice donor sites (Figure 1) causing the inclusion of intronic sequences between exons 4b and 5 of the mutant mRNA. By allelic discrimination on the transcript level we could demonstrate that mis-splicing is constitutive for the mutant alleles while correctly spliced *OPA1* transcripts exclusively derive from the alternate alleles. Both DIMs induce premature termination codons (see Supplementary Figure S1) and we have demonstrated by puromycin treatment of patient-derived fibroblasts that these stop codons induce nonsense-mediated mRNA decay. Furthermore, we could show reduced steady-state levels of the mutant transcript in fibroblasts of patients with the c.610+364G>A along with a marked reduction of OPA1 protein levels compared with controls (In the following we refer to c.610+364G>A as: DIM 364).

Antisense oligonucleotides (AON) are single stranded 8-50mer DNA or RNA molecules that engage in Watson-Crick basepairing with (pre-)mRNA or DNA and have attracted attention as target-specific drugs. Depending on target site and backbone chemistry, these AONs either induce RNaseH dependent degradation of the bound transcript or prevent ribosomal/spliceosomal recognition of the binding site, causing translational block and exon skipping, respectively. For a comprehensive review on AON chemistry, mechanisms and medical relevance see Sharma and Watts (2015) (ref. 15).

¹Molecular Genetics Laboratory, Institute for Ophthalmic Research, Center for Ophthalmology, University of Tübingen, Tübingen, Germany; ²Graduate School of Cellular and Molecular Neuroscience, University of Tübingen, Tübingen, Germany; ³CeGaT GmbH, Tübingen, Germany; ⁴Department of Neurodegenerative Diseases and Hertie-Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen, Germany; ⁵German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Tübingen, Germany. Correspondence: Bernd Wissinger, Molecular Genetics Laboratory, Institute for Ophthalmic Research, Center for Ophthalmology, University of Tübingen, Röntgenweg 11, 72076 Tübingen, Germany. E-mail: wissinger@uni-tuebingen.de

Keywords: antisense oligonucleotides; deep intronic mutation; OPA1; optic neuropathies; splice correction

Received 13 June 2016; accepted 13 September 2016; published online 22 November 2016. doi:10.1038/mtna.2016.93

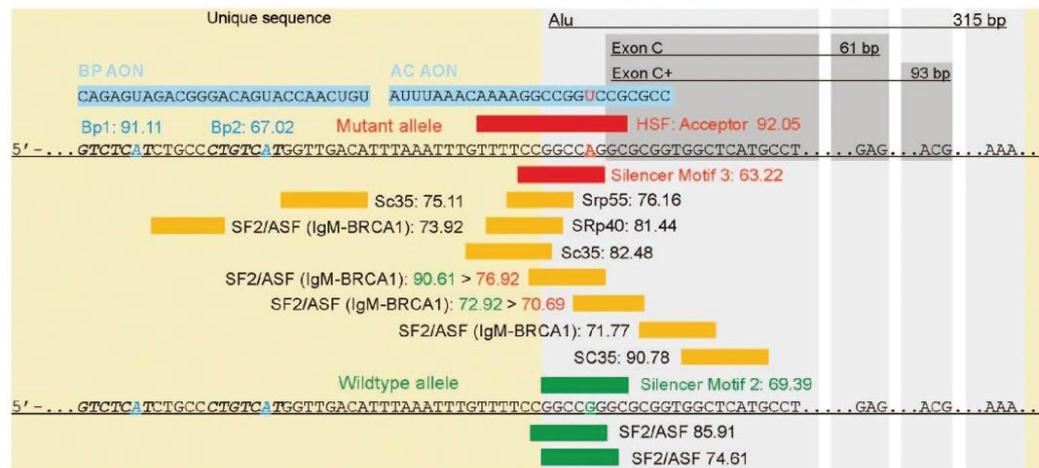


Figure 1 Binding sites for AONs and predicted SF binding sites on the c.610+364G>A mutant allele and the corresponding wildtype allele. The sequence of the c.610+364G>A mutant allele is shown on top in comparison with the corresponding wildtype allele (bottom) as present in the patient fibroblasts. The mutation (red A) is located 5 bp downstream of the 5' terminus of an Alu element (315 bp, highlighted in light gray) and two nucleotides upstream of exon c (61/93 bp, dark gray box). HSF predicted two branch points (blue adenosines) and 13 Exon Splice Enhancer motives (yellow boxes), two of them with higher affinity to the wildtype allele and two SF2/ASF motives that are specific for the WT allele (green boxes). One silencer motif was slightly weakened by the DIM. Indicated numbers represent HSF predicted scores for SF affinity at the respective binding sites. AC AON and BP AON are highlighted in blue. AON, antisense oligonucleotides; BP, branch point; DIM, deep intronic mutation; HSF, human splicing finder; SF, splice factor; WT, wild type.

Currently, only two antisense-based therapeutics have been approved by the FDA, both of which function via an RNaseH mediated mechanism.^{16,17} Concerning splice-switching AONs, Drisapersen and Eteplirsen, chemically modified AONs that induce skipping of mutant exon 51 in the Duchenne Muscular Dystrophy (*DMD*) gene have reached clinical trials for the treatment of DMD.^{18,19} Furthermore, splice-switching AONs may be used to suppress inclusion of cryptic exons activated by DIMs. This approach has been proven efficient in earlier *in vitro* studies targeting retinal disease mutations *e.g.*, the DIM c.2991+1655A>G in *CEP290*, a common mutation associated with Leber congenital amaurosis.^{20,21}

In this study, we designed and evaluated two AONs that efficiently prevent mis-splicing of *OPA1* DIM-transcripts in patient-derived primary fibroblasts, resulting in increased levels of correctly spliced transcripts and an elevated amount of *OPA1* protein. In the context of haploinsufficiency being the most common pathomechanism in *OPA1*-associated optic atrophy, our study provides proof of concept for AON technology to facilitate increasing *OPA1* protein levels in DIM carriers, which is expected to have therapeutic effects.

Results

Design of antisense oligonucleotides

In order to overcome mis-splicing induced by DIM 364, we designed two different AONs: The AC AON (5'-CCGCGCC UGGCCGAAAACAAUUUA-3') targets the cryptic acceptor site in the vicinity of DIM 364, whereas the BP AON (5'-UGUC AACCAUGACAGGCAGAUAGAGAC-3') was meant to cover two putative branch point adenosines located 30 base pairs (bp) and 42 bp upstream of DIM 364 (Figure 1). As the mutation is located 5 bp downstream of the 5' end of a

highly abundant Alu element, we refrained from targeting pseudoexon-internal sequences or the two alternative cryptic donor sites, both of which are located deeply within this Alu element. The off-target search listed the following features: binding of +strand or -strand, name of involved gene, position of binding site relative to gene (intergenic, intronic, and exonic), distance to nearest exon, number of mismatches and genomic position. Apart from the unmutated compound allele of *OPA1* (1 mismatch (MM) for AC AON, no MM for BP AON) the search did not uncover any off-targets for BP AON, however, it listed 11 further off-target binding sites for AC AON (see **Supplementary Table S1**). Six off-targets are on the antisense strand (with respect to the gene locus), the remaining six off-targets were: *OPA1* (intronic, 1 MM), *CEP128*, *RNU6-42P* (both intronic, 3 MM), *SCGB1D1*, *FAM21FP* and *SNORA51* (all three intergenic, 3 MM). All sense-strand binding sites are located far from adjacent exons (*CEP128*: 33172 bp, *RNU6-42P*: 4667 bp, *SCGB1D1*: 5696 bp, *FAM21FP*: 1122 bp, *SNORA51*: 7546 bp) but overlap with the 5' ends of Alu elements. To discriminate between specific and unspecific effects of the AON transfection we performed parallel experiments with a nontarget control AON (CON AON: 5'-CCUCUUACCUCAGUUACAUUUU-3'). Transfection efficiencies were determined using labeled AONs and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Nuclear colocalization was observed in an average of ~54% of the cells (data not shown).

AC and BP AONs restore correct splicing of mutant allele

We transfected confluent patient-derived primary dermal fibroblasts (family OAK 587, patient II:2 carrying DIM 364 in heterozygous state) using the AC AON, BP AON and CON

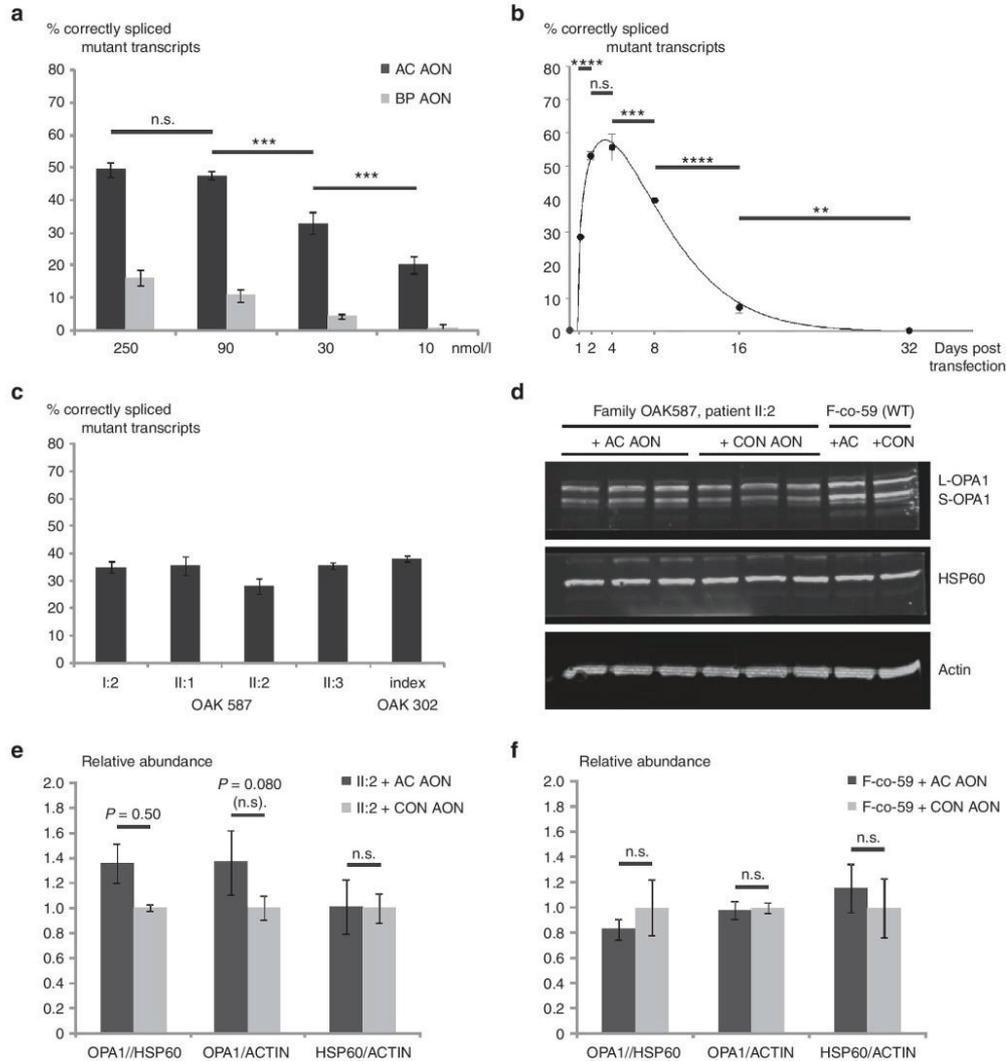


Figure 2 Efficiency of AON-mediated splice correction on RNA and protein level. (a) Patient fibroblasts were transfected with either AC AON, BP AON or CON AON at concentrations of 250, 90, 30, and 10 nmol/l. Cells were lysed 24 hours post-transfection. Pyrosequencing of RT products revealed rescue of the splicing defect and dose dependent splice correction in AC AON and to a lesser extent in BP AON transfected cells (Factorial ANOVA test, $P < 0.001$; AC AON ANOVA test, $P < 0.001$). No splice correction could be detected (0%) upon treatment with the CON AON. (b) Time course of the AON-mediated splice correction in fibroblasts treated with 20 nmol/l of AC AON at day 0. The effect peaked at day 4 and slowly decreased to ~7% at day 16 (ANOVA test $P < 0.001$; Scheffe post hoc day 0 versus day 4, $P < 0.001$; Scheffe post hoc day 4 versus day 8, $P < 0.001$; Scheffe post hoc day 8 versus day 16, $P < 0.000$). No remaining splice correction was visible at day 32 (Scheffe post hoc day 0 versus day 32, $P > 0.05$). Curve fitting by Sigma plot postulates peak efficacy of 57% at day 3.5 (four-parametric Weibull function) (c) Comparison of AON-mediated splice correction in fibroblasts from different mutation carriers (two independent families: OAK 587 and OAK 302). All cell cultures were transfected with 20 nmol/l of AC AON and cultured for 2 days. No correctly spliced transcripts from the mutant allele were detectable in untreated samples and splice correction was observed in all fibroblast lines. (d) Western blot analysis of 20 μ g protein from whole cell lysates of patient and control fibroblast cultures transfected with 20 nmol/l of either AC AON or CON AON and harvested 4 days post-transfection. Immunodetection was performed with primary antibodies against OPA1 (detecting long and short OPA1 isoforms (L-OPA1 and S-OPA1), the mitochondrial marker HSP60 and the cytosolic BETA-ACTIN. OPA1 bands were stronger when treated with AC AON compared with CON AON. (e) Quantitative analysis of Western blots revealed significantly elevated OPA1:HSP60 ratios between patient-derived fibroblasts transfected with the AC AON and those treated with the CON AON (*U*-Mann-Whitney test, $P < 0.05$), whereas OPA1:BETA-ACTIN ratios showed a trend toward increased levels of OPA1 (student's *t*-test, $P = 0.08$). No significant change could be observed in HSP60/BETA-ACTIN ratios of the treated cells. (f) AON treatment of matched control fibroblasts without DIM 364 had no effect on OPA1/HSP60 or OPA1/BETA-ACTIN ratios. All error bars shown as mean+SD. ANOVA, analysis of variance; AON, antisense oligonucleotides; BP, branch point; DIM, deep intronic mutation.

AON, at different final concentrations (250, 90, 30, and 10 nmol/l). RNA extraction after 24 hours, followed by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and pyrosequencing revealed an AON-sequence, dose-dependent suppression of the mis-splicing, and rise of correctly spliced transcripts derived from the mutant allele with highest efficiencies of 49% for the AC AON ($P < 0.001$) and 16% for the BP AON, respectively (Figure 2a). Treatments with 250 and 90 nmol/l of AONs showed the highest efficiency with no significant difference in the two groups ($P > 0.05$), however, inducing high cell death rates with 250 nmol/l and moderate toxic effects with 90 nmol/l (data not shown). Treatment with 30 and 10 nmol/l had less pronounced effects on splice correction though cell viability in short-term culture was comparable to untreated cells. Transfection with the CON AON had no effect on *OPA1* transcript splicing. Using cocktail formulations with different absolute and relative molar quantities of BP/AC AONs in combination did not further enhance splice correction efficiencies (data not shown).

Correctly spliced mutant allele-derived transcripts can be detected for more than 14 days after AON transfection

We further refined concentration dependent toxic effects of AON treatment and accordingly transfected patient fibroblasts with AC AON at 20 nmol/l end concentration for long term investigation. Cells were transfected on day 0 and triplicate cultures were harvested at day 1, 2, 4, 8, 16, and 32 post-transfection. The splice correction over time has been extrapolated using a four-parameter Weibull function^{22,23} (Figure 2b). The initial slope reflects the rapid AON-uptake and intracellular delivery. The strongest rescue effect was measured after 4 days with ~55% of splice-corrected transcripts ($P < 0.001$). The effect slightly declined by day 8. The half-maximum efficiency level of 27.5% is reached ~10 days post-transfection and decreases to as low as 7% after 16 days. By 1 month after treatment, at the latest, the effect of the AONs has faded, which can be considered as the combined consequences of AON degradation and cell division of transfected and nontransfected cells.

AC AON suppresses mis-splicing in different mutation carriers

To further prove the efficacy and reliability of this approach and to evaluate possible confounding effects due to differences in the genetic background, we assessed and compared splice correction in fibroblast cultures of a total of five individual subjects harboring the same DIM but of different age and gender, namely, the three affected siblings of family OAK 587 (II:1, II:2, and II:3) as well as their unaffected mother (I:2) and another male patient of the unrelated family OAK 302. All cell lines were also heterozygous for rs7624750 in *OPA1* exon 4. Upon transfection with AC AON (20 nmol/l and 48 hours culturing), all fibroblast lines responded with relatively uniform splice correction efficiencies (Figure 2c).

Increased OPA1 protein levels upon AC AON treatment

We wondered whether rescuing the splicing defect of mutant allele-derived transcripts likewise results in a higher *OPA1* protein abundance. Indeed, semiquantitative Western blot (Figure 2d) revealed an increase of 35% for *OPA1* protein

normalized to the mitochondrial matrix protein HSP60 ($P = 0.050$) and a 36% increase normalized to cytoplasmic BETA-ACTIN ($P = 0.080$). *OPA1* protein ratios showed similar increases when compared with HSP60 and BETA-ACTIN but without significance in the second comparison. This might be explained by the variability observed between the samples. Treatment was compared with cultures transfected with the nontarget CON AON (Figure 2e). Treatment of age, gender, and passage matched control fibroblasts showed no alteration in *OPA1* levels with either AON (Figure 2f).

Discussion

In this study, we could demonstrate functional rescue of a deep intronic point mutation in the human *OPA1* gene by *in vitro* transfection of patient-derived fibroblasts with antisense oligonucleotides. This represents the first AON-based splice correction of a DIM in a mitochondriopathy. Two different AONs, designed to cover either the cryptic splice acceptor site or the predicted cryptic branch point, efficiently suppressed DIM 364-induced mis-splicing and restored normal splicing between exon 4b and exon 5 of *OPA1*. The relative amounts of wildtype versus mutant transcripts were measured using pyrosequencing-based allelic discrimination at a common SNP. This approach represents a novel and efficient way to precisely quantify the efficacy of AON-mediated splice correction.

The efficiency of splice correction was concentration- and time dependent and significantly higher with the AC AON compared with the BP AON. The applied concentrations perfectly fall within the range of previously reported functional AONs.^{21,24,25} The highest amount of corrected mutant transcripts was at around 55% (20 nmol/l, 4 days post-transfection). Considering that a fully functional allele contributes ~50% to the gene's overall transcripts, a 55% restoration of the mutant allele corresponds to 27.5% of total transcripts, indicating a shift from 50% (only WT allele) to 77.5% (WT allele + corrected transcripts from mutant allele) of correctly spliced *OPA1* mRNAs (Figure 3). This amount is probably sufficient to overcome threshold levels of *OPA1* that are associated with disease manifestation. A nontarget control AON had no detectable effect. AON-mediated splice correction could be proven in fibroblasts of mutation carriers of different ages and gender with similar efficiency, an important prerequisite for therapeutic strategies based on AON technologies.

Correctly spliced transcripts from the mutant allele were most abundant between days 2–4 post-transfection and decreased by a factor of ~8 until day 16. We cannot exclude that this decrease in corrected transcripts is partly caused by dilution effects due to ongoing cell division during extended culturing periods. Therefore, we reason that AON-mediated rescue might be more long-lasting in nondividing cells like retinal ganglion cells, the primary target cell population for therapy in *OPA1*-associated optic atrophy. Although patients would be required to receive therapeutic AONs repeatedly during their entire lifetime, the time intervals between repeated administrations of full-length phosphorothioate AONs might be weeks or months as indicated by experiments with exon-skipping AONs applied for *DMD*²⁶ and for *CEP290* (refs. 27,28).

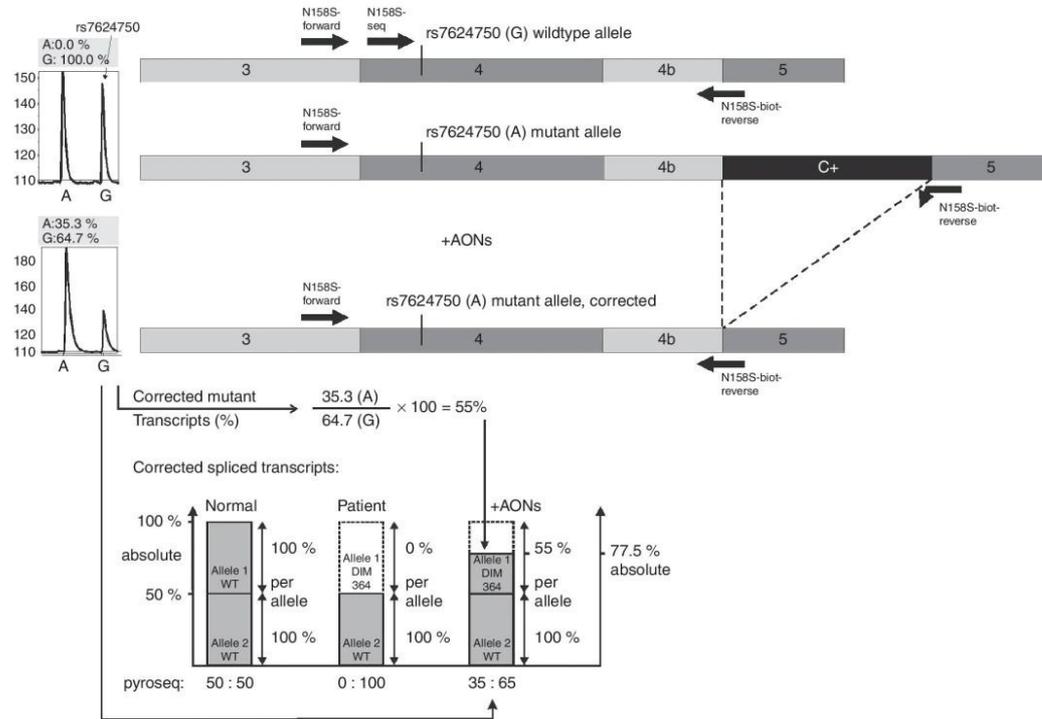


Figure 3 Pyrosequencing assay for detection of correctly spliced transcript in fibroblasts of patients with the c.610+364G>A mutation. The N158S-forward primer binds in exon 3, the N158S-biot-reverse primer at the junction of exon 4b and exon 5. This primer setting exclusively amplifies cDNA of correctly spliced *OPA1* transcripts (top bar, wildtype allele) but no transcripts with retained cryptic exon c between exons 4b/5 (middle bar, mutant allele, and upper pyrosequencing scheme). The sequencing primer (N158S-seq) binds two bases upstream of the heterozygous SNP rs7624750 in exon 4. The A allele of rs7624750 cosegregates with the mutation and cannot be detected in cDNA from mutant untreated cells using this assay. Upon AON treatment, cryptic exon c is skipped and the mutant transcript can be amplified (lower bar) and hence its allelic contribution can be measured via pyrosequencing (lower left scheme). A relative ratio of 35.3% versus 64.7% (A-allele versus G-allele) corresponds to a rescue of 55% of all mutant alleles in the cDNA of treated fibroblasts (example), which corresponds to a shift of total correctly spliced *OPA1* mRNA of 77.5% (lower graph) For further graphical illustration of the principle compare **Supplementary Figure S2**. AON, antisense oligonucleotides; cDNA, complementary DNA.

We observed strong cytotoxicity with high AON doses of 250 nmol/l and mild toxicity with 90 nmol/l. Some toxic effects at lower doses appeared only upon longer culturing periods, whereas the nontarget CON AON caused less toxicity at the same doses. Although AON-blocking of intronic long-distance interactions has been reported to interfere with canonical splicing²⁹, none of the predicted off-target genes was reported in context with cytotoxicity or human disease and the number of mismatches render off-target binding unlikely. The mechanism of toxicity therefore remains elusive. Partial low-affinity interactions of the AON with many independent Alu off-targets might still cause toxicity in a cumulative manner. However, in order to assess the actual biochemical cause for cytotoxicity, further investigations need to be undertaken.

The observed increase of functional *OPA1* transcripts upon AON treatment could be confirmed on the protein level using Western blotting. Relative quantification of *OPA1* demonstrated an increase of *OPA1* levels of around 35%.

In summary, we could show an AON-mediated rescue of a deep intronic point mutation that essentially rescues a fully penetrant splice defect and results in a prominent increase in correctly spliced *OPA1* mRNA and protein in patient-derived fibroblasts. AONs as therapeutic drugs have several clear advantages such as easy production and full chemical synthesis devoid of any sources of biological contaminations. Moreover, AONs are small molecules that easily penetrate into tissues and are taken up by neurons without complex chemical formulations or packaging vehicles.³⁰ For its application to treat optic atrophy and thus targeting retinal ganglion cells an administration through intravitreal injection can be envisaged. Another advantage of AON over classical gene therapy approaches is the possibility to discontinue treatment at any time, in case of side-effects which may occur. However, an indispensable prerequisite for a translation into clinical use is a further investigation of the subcellular effects of AON treatment on mitochondrial fragmentation, Cristae remodeling and susceptibility to proapoptotic stimuli, followed

by biochemical assessment of toxicity and off-target interactions. Additionally, preclinical testing in animal models with homologous mutations is needed to uncover efficacy and toxicity. Yet recent studies showed that recognition of cryptic exons is not necessarily conserved even among mammalian species.³¹ A major limitation of the AON-based exon skipping technology is given through its narrow spectrum of mutations that are targeted. This specificity for a defined sequence context reduces the number of treatable patients to a few individuals, unless a certain DIM is highly prevalent in the patient population due to a founder effect, as e.g., in *CEP290*-associated Leber congenital amaurosis.

This proof of concept study therefore, further highlights the importance of molecular genetic intron analyses in patient cohorts, as it provides not only the potential to uncover pathogenic mutations in unsolved ADOA families but inherently opens up possible therapeutic strategies.

Materials and methods

Antisense oligonucleotide design and composition. AONs were designed following recommendations of Aartsma-Rus and colleagues,³² including bioinformatic tools to estimate the efficiency of potential splice-blocking AONs. We computed AON secondary structure (software: mfold³³), free energy values of AON, target, as well as AON–AON and AON–target complexes (RNAfold server at Vienna RNA Web Services³⁴), coverage of splice factor binding sites and Branch point prediction (Human Splicing Finder³⁵) and averaged single strand counts across the AON binding site (ss-count, mfold-software). In order to find and score potential off target sites of AC AON and BP AON, we used a customized script that aligned the AON sequences against the human genome (GRCh38) using Burrows-Wheeler indexing, implemented in Bowtie³⁶ and the standalone version of CCTop³⁷ without filtering for Protospacer adjacent motif (PAM) motifs, conserved core sequences or sequence length restrictions. As Aartsma-Rus and colleagues have shown for AONs with 2′-O-methyl-phosphorothioate backbone, three single-base mismatches prevent successful AON–target interactions.³⁸ Therefore we allowed three mismatches in our off-target search (Source code and instructions upon request). The AONs were synthesized by Metabion International AG (Planegg, Germany). As experimental control, we used a control oligonucleotide (CON AON) with the same chemical modifications and similar length (adapted from Gene Tools’ “standard control oligo”) (Gene Tools LLC, Philomath, OR). All AONs were oligoribonucleotides containing 2′-O-methyl groups and a full-length phosphorothioate backbone for nuclease protection. For estimation of overall transfection efficiency, we used fluorescence-labeled versions of the CON AON with an Atto-550 dye group attached to the 5′ end during synthesis but keeping all other chemical modifications as for the nonlabeled oligonucleotides. AONs were diluted in 5 mmol/l Tris-HCl pH 7 and applied in different concentrations with polyethylenimine for transfection.

Cell culture, transfection, and RNA isolation. Primary dermal fibroblasts from patients and controls were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM), with 10%

fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin (Pen-Strep) (10,000 U/ml). The cells from patients OAK 302-index and OAK 587-I:2 were heterozygous for DIM 364, whereas the cells from patients II:1, II:2, and II:3 of the same family were compound heterozygous for DIM 364 and the variant c.1311A>G/p.I437M, NM_130837.1. One day before transfection, three confluent T175 cell culture flasks were trypsinized, the harvested cells pooled (~27 ml) and 1 ml of the cell suspension seeded in 5 ml of DMEM/FCS/Pen-Strep in T25 flasks. Bright field microscopy images were taken at 50× magnification prior to transfection and directly before lysis at three different areas of each flask, in order to verify equal cell density across and between the flasks as well as to document potential toxic effects upon AON treatment. Transfection was carried out using Polyethylenimine (PEI, Linear, MW 25,000; Polysciences, Hirschberg, Germany), 100 mg/l in 0.1 mmol/l NaCl, pH 7.8. 412.5 µl of PEI was mixed with different concentrations of the AONs. Polyplexes formed during 10 minutes at room temperature and were later dispersed into the cell culture flasks to a final volume of 7.5 ml per T25 flask. For the PEI-based transfections, the cells were incubated with the oligonucleotide/polyplexes for 6 hours in DMEM supplemented with 10% FCS (DMEM/FCS). After 6 hours the transfection medium was replaced by fresh DMEM/FCS/Pen-Strep medium. Cells were harvested at different time points, using the Peq Gold total RNA kit (Peqlab, Erlangen, Germany), followed by complementary DNA (cDNA) synthesis with the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany).

RT-PCR and pyrosequencing. cDNA from AON-treated biological triplicates was PCR-amplified using a set of primers that specifically amplifies correctly spliced exon 4b–exon 5 junctions. For relative quantification of paternal and maternal (mutant) allele-derived transcripts we performed pyrosequencing of a common heterozygous SNP in exon 4 (rs7624750) on RT-PCR products (**Figure 3** and **Supplementary Figure S2**). Pyrosequencing assay primers were created using the PyroMark Assay Design 2.0 software (Qiagen, Hilden, Germany): N158S-forward (5′-TGGATTGTGCTGACATTGT-3′), N158S-biot-reverse (5′-(BTN)CCGTTTCTCCGGAGAACCTAA-3′), and N158S-seq (5′-TTAGAAAAGCCCTTCCT-3′). Pyrosequencing was carried out using the PyroMark Q96 ID instrument (Qiagen), while the sample preparation and the data analysis were performed according to the manufacturer’s instruction.

Western blot. For semiquantitative determination of the amount of OPA1 protein, we performed Western blotting experiments with whole cell lysates using antibodies against OPA1 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany, Cat.: 612607), HSP60 (Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany, Cat.: ADI-SPA-806-D), and BETA-ACTIN (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany, Cat.: MAB1501). A fluorescent-labeled antimouse antibody (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany, Cat. 926–32210) was used for signal detection and quantification on an Odyssey Sa instrument (LI-COR Biosciences).

Statistical analysis. Statistical software (SPSS 15; SPSS, Chicago, IL) was used for all the statistical analyses. The Kolmogorov–Smirnov test was used to confirm the normality of the data. The homogeneity of the variances was assessed with Levene's test. To determine concentration dependent AON-effects, factorial analysis of variance tests were performed. One-way analysis of variance tests were used to analyze the AON effect through time. To detect differences between specific time points, post hoc tests were performed. Student's *t*-tests (normal distribution and homoscedasticity of the data) or *U*-Mann–Whitney test (normal distribution and no homoscedasticity of the data) were used when comparing two groups. All data are presented as mean \pm SD. $P < 0.05$ was considered statistically significant ($P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), $P < 0.0001$ (****)). Graphs were calculated using Sigma-Plot 13 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany).

Supplementary material

Figure S1. Frameshifting by inclusion of cryptic exon c and c+.

Figure S2. Pyrosequencing assay for rs7624750.

Table S1. Off-targets for AC AON and BP AON.

Acknowledgments We thank the patients and their family members for donating fibroblasts for our study, the Tübingen Dermatology department for technological support, especially Christina Braunsdorf for introduction and advice to the Li-Cor Odyssey instrument. We are grateful to Caroline Schönfeld for skillful technical support in cell culture experiments. Special thanks to Juan Luis Mateo Cerdan, Center for Organismal Studies, Heidelberg, for customizing the off-target search using CCTop. This work was funded, in part, by the BMBF (ERARE JTC “PREPARE”, Kz. 01GM1607, to M.S.) and the mitoNET grant (01GM1113E to L.S.). The authors report that there are no conflicts of interest.

- Alexander, C, Votruba, M, Pesch, UE, Thiselton, DL, Mayer, S, Moore, A et al. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26: 211–215.
- Delettre, C, Lenaers, G, Griffon, JM, Gigarel, N, Lorenzo, C, Belenguer, P et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207–210.
- Anikster, Y, Kleta, R, Shaag, A, Gahl, WA and Elpeleg, O (2001). Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or Costeff optic atrophy syndrome): identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. *Am J Hum Genet* 69: 1218–1224.
- Hanein, S, Perrault, I, Roche, O, Gerber, S, Khadom, N, Rio, M et al. (2009). TMEM126A, encoding a mitochondrial protein, is mutated in autosomal-recessive nonsyndromic optic atrophy. *Am J Hum Genet* 84: 493–498.
- Metodieva, MD, Gerber, S, Hubert, L, Delahodde, A, Chretien, D, G rard, X et al. (2014). Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy. *J Med Genet* 51: 834–838.
- Inoue, H, Tanizawa, Y, Wasson, J, Behn, P, Kalidas, K, Bernal-Mizrachi, E et al. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20: 143–148.
- Chaussonot, A, Rouzier, C, Quere, M, Plutino, M, Ait-El-Mkadem, S, Bannwarth, S et al. (2015). Mutation update and uncommon phenotypes in a French cohort of 96 patients with WFS1-related disorders. *Clin Genet* 87: 430–439.
- Angebault, C, Guichet, PO, Talmat-Amar, Y, Charif, M, Gerber, S, Fares-Taie, L et al. (2015). Recessive mutations in RTN4IP1 cause isolated and syndromic optic neuropathies. *Am J Hum Genet* 97: 754–760.
- Elachouri, G, Vidoni, S, Zanna, C, Pattyn, A, Boukhaddaoui, H, Gaget, K et al. (2011). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res* 21: 12–20.
- Frezza, C, Cipolat, S, Martins de Brito, O, Micaroni, M, Beznoussenko, GV, Rudka, T et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126: 177–189.
- Cipolat, S, Martins de Brito, O, Dal Zilio, B and Scorrano, L (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15927–15932.
- Marchbank, NJ, Craig, JE, Leek, JP, Toohay, M, Churchill, AJ, Markham, AF et al. (2002). Deletion of the OPA1 gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *J Med Genet* 39: e47.
- Yu-Wai-Man, P, Griffiths, PG, Burke, A, Sellar, PW, Clarke, MP, Gnanaraj, L et al. (2010). The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Ophthalmology* 117: 1538–46, 1546.e1.
- Bonifert, T, Karle, KN, Tonagel, F, Batra, M, Wilhelm, C, Theurer, Y et al. (2014). Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier. *Brain* 137(Pt 8): 2164–2177.
- Sharma, VK and Watts, JK (2015). Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med Chem* 7: 2221–2242.
- Anderson, KP, Fox, MC, Brown-Driver, V, Martin, MJ and Azad, RF (1996). Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2004–2011.
- Crooke, RM, Graham, MJ, Lemonidis, KM, Whipple, CP, Koo, S and Perera, RJ (2005). An apolipoprotein B antisense oligonucleotide lowers LDL cholesterol in hyperlipidemic mice without causing hepatic steatosis. *J Lipid Res* 46: 872–884.
- Voit, T, Topaloglu, H, Straub, V, Muntoni, F, Deconinck, N, Campion, G et al. (2014). Safety and efficacy of disapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol* 13: 987–996.
- Mendell, JR, Goemans, N, Lowes, LP, Alfano, LN, Berry, K, Shao, J et al.; Eteplirsen Study Group and Telethon Foundation DMD Italian Network. (2016). Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 79: 257–271.
- Collin, RW, den Hollander, AI, van der Velde-Visser, SD, Bencicelli, J, Bennett, J and Cremers, FP (2012). Antisense oligonucleotide (AON)-based therapy for Leber congenital amaurosis caused by a frequent mutation in CEP290. *Mol Ther Nucleic Acids* 1: e14.
- Gerard, X, Perrault, I, Hanein, S, Silva, E, Bigot, K, Defoort-Delhemmes, S et al. (2012). AON-mediated exon skipping restores ciliation in fibroblasts harboring the common Leber congenital amaurosis CEP290 mutation. *Mol Ther Nucleic Acids* 1: e29.
- Piotrovskii, VK (1987). Pharmacokinetic stochastic model with Weibull-distributed residence times of drug molecules in the body. *Eur J Clin Pharmacol* 32: 515–523.
- Carrasco, RA, Stamm, NB, Marcussone, E, Sandusky, G, Iversen, P and Patel, BK (2011). Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic. *Mol Cancer Ther* 10: 221–232.
- Aartsma-Rus, A, De Winter, CL, Janson, AA, Kaman, WE, Van Ommen, GJ, Den Dunnen, JT et al. (2005). Functional analysis of 114 exon-intronic AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 15: 284–297.
- Singh, NK, Singh, NN, Androphy, EJ and Singh, RN (2006). Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 26: 1333–1346.
- Bassi, E, Falzarano, S, Fabris, M, Gualandi, F, Merlini, L, Vatterli, G et al. (2012). Persistent dystrophin protein restoration 90 days after a course of intraperitoneally administered naked 2'OMePS AON and ZM2 NP-AON complexes in mdx mice. *J Biomed Biotechnol* 2012: 897076.
- G rard, X, Perrault, I, Munnich, A, Kaplan, J and Rozet, JM (2015). Intravitreal injection of splice-switching oligonucleotides to manipulate splicing in retinal cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e250.
- Garanto, A, Chung, DC, Duijkers, L, Corral-Serrano, JC, Messchaert, M, Xiao, R et al. (2016). *In vitro* and *in vivo* rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Hum Mol Genet* (epub ahead of print).
- Singh, NN, Lee, BM and Singh, RN (2015). Splicing regulation in spinal muscular atrophy by an RNA structure formed by long-distance interactions. *Ann NY Acad Sci* 1341: 176–187.
- Zalachoras, I, Evers, MM, van Roon-Mom, WM, Aartsma-Rus, AM and Meijer, OC (2011). Antisense-mediated RNA targeting: versatile and expedient genetic manipulation in the brain. *Front Mol Neurosci* 4: 10.
- Garanto, A, van Beersum, SE, Peters, TA, Roepman, R, Cremers, FP and Collin, RW (2013). Unexpected CEP290 mRNA splicing in a humanized knock-in mouse model for Leber congenital amaurosis. *PLoS One* 8: e79369.
- Aartsma-Rus, A, van Vliet, L, Hirschi, M, Janson, AA, Heemskerk, H, de Winter, CL et al. (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 17: 548–553.
- Zuker, M (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406–3415.
- Hofacker, IL (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 31: 3429–3431.

35. Desmet, FO, Hamroun, D, Lalande, M, Collod-Broud, G, Claustres, M and Broud, C (2009). Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37: e67.
36. Langmead, B, Trapnell, C, Pop, M and Salzberg, SL (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25.
37. Stemmer, M, Thumberger, T, Del Sol Keyer, M, Wittbrodt, J and Mateo, JL (2015). CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One* 10: e0124633.
38. Aartsma-Rus, A, Kaman, WE, Bremmer-Bout, M, Janson, AA, den Dunnen, JT, van Ommen, GJ et al. (2004). Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther* 11: 1391–1398.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) (2016)

Supplementary Information accompanies this paper on the Molecular Therapy–Nucleic Acids website (<http://www.nature.com/mtna>)

Deep Intronic Mutation c.610+364 G>A; Frame shifting by inclusion of **cryptic exon c+**

WT Exon 4b Exon 5

Nuc. GTCACAAATTGGTTAGTGAAGTCATAGGAGCTTCTGACCTACTTCTCTTGTAGGTTCTCCGGAAGAAACGGCGTTTAGAGCAACAGAT

AS G--H--K--L--V--S--E--V--I--G--A--S--D--L--L--L--L--L--G--S--P--E--E--T--A--F--R--A--T--D--
 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

AS G--H--K--L--V--S--E--V--I--G--A--S--D--L--L--L--L--L--G--A--V--A--H--A--C--N--E--S--E--L--
 Nuc. GTCACAAATTGGTTAGTGAAGTCATAGGAGCTTCTGACCTACTTCTCTTGTAGGCGCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCATTTTG

Mut Exon 4b cryptic exon c+

WT Exon 5 Exon 6

Nuc. CGTGGATCTGAAAGTGACAAGCATTTTAGAAAAGGGTCTGCTTGGTGAGCTCATTCTCTTACAACAACAAATTCAAGAGCAT...

AS -R--G--S--E--S--D--K--H--F--R--K--G--L--L--G--E--L--I--L--L--Q--Q--Q--I--Q--E--H--...
 |

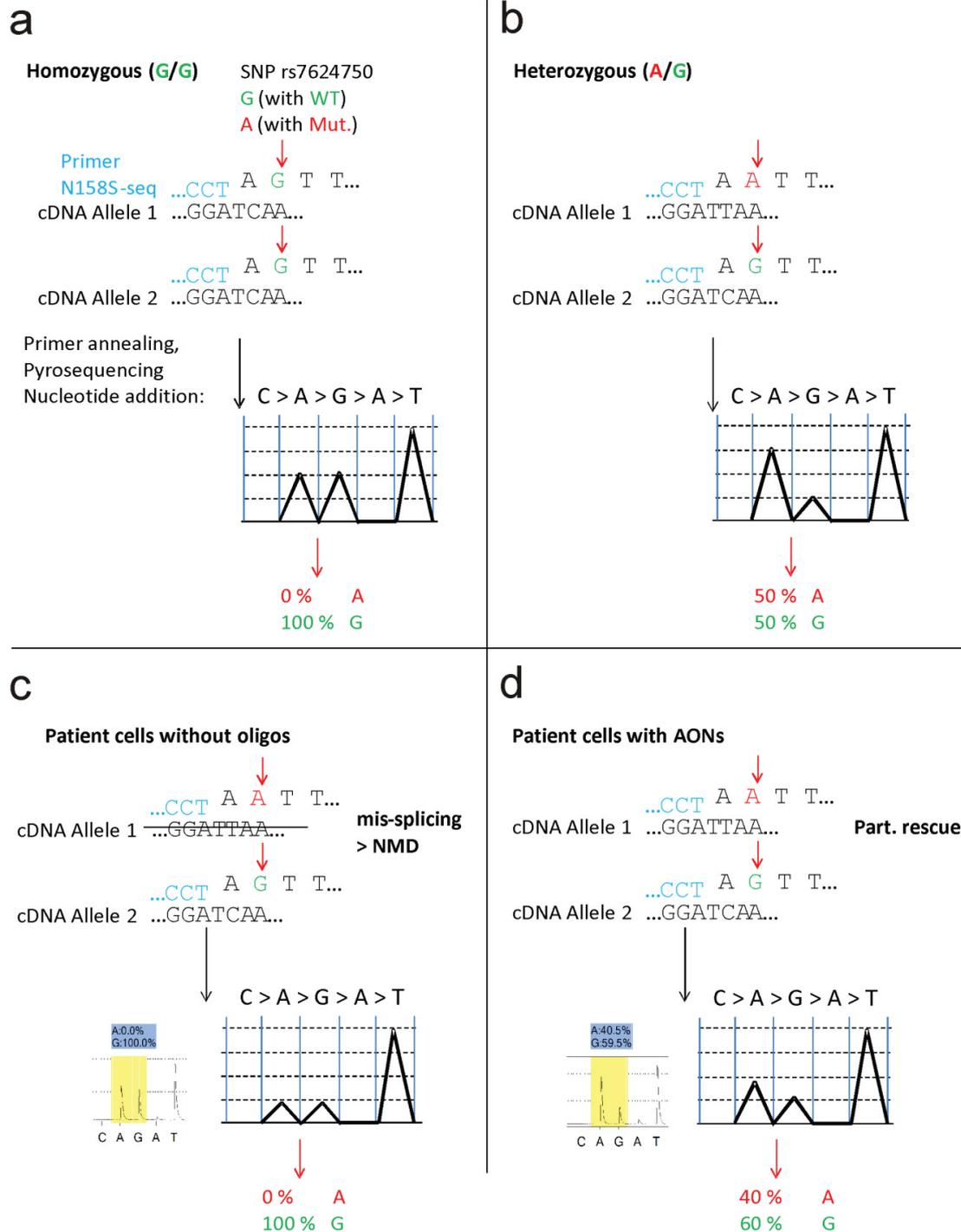
AS -C--C--Q--C--R--R--I--M--R--S--C--N--R--N--H--E--C--*--H--G--S--P--E--E--T--A--F--...
 Nuc. GGAGGCCAAGGCAGGCGGATCATGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCTGGCTAAACACGGTTCTCCGGAAGAAACGGCGTTT...

Mut cryptic exon c+ Exon 5

Supplementary Figure S1: Frameshifting by inclusion of cryptic exon c and c+

Inclusion of cryptic exon c (61 bp, highlighted in yellow) between exon 4b and exon 5 of the mutant transcripts induces frameshifting and incorporation of 27 aberrant amino acids (20 of which are encoded by exon c and seven by frameshifted exon 5) before a TAG codon terminates translation. Splicing of cryptic exon c+ (93 bp, highlighted in yellow) does not cause frameshifting, however, it induces aberrant translation of 38 amino acids before a TAA codon terminates translation. Depicted aberrant peptides are hypothetical, as the mutant mRNA transcripts harboring premature termination codons are degraded by NMD.

Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2: Pyrosequencing Assay for rs7624750

After annealing of the sequencing primer N158S-seq (3' end indicated in blue) the sequential addition of nucleotides C, A, G, A, T results in light emission corresponding to the number of incorporated nucleotides. **(a)** Due to the adjacent A upstream of rs7624750 on all cDNA templates, addition of the first round of Adenosinetriphosphate will induce incorporation of two (homozygous G/G) or (b) three nucleotides (heterozygous A/G) simultaneously, as in cDNA templates from individuals known to be heterozygous. **(c)** Similar peak heights after addition of adenosinetriphosphate and subsequent guanosinetriphosphate on amplicons of DIM364 patient-derived cDNA templates indicates loss of the A-harboring allele (A: 0 % vs. G: 100 %). **(d)** Partial rescue of mis-splicing by AON treatment rescues this imbalance (A: 40.5 % vs. G:59.5 %).

Supplementary Figure S3 – Off-targets for AC AON and BP AON

Off-targets for
AC AON:

Input: TAAATTTGTTTTCCGGCCAGGCGCGG
Total MM: 3

Chromosome	start	end	strand	MM	target seq	alignment	distance	position	gene name	gene id
chr3	193618183	193618208	+	1	TAAATTTGTTTTCCGGCCAGGCGCGG	-----	346	Intronic	OPA1	ENSG00000
chr11	32324742	32324767	+	2	TAAATGTTGTTTTCCGGCCAGGCGCGG	- - -----	18521	Intronic	THEM7P	ENSG00000
chr14	80613597	80613622	-	3	TAAAATGTTCTCCGGCCAGGCGCGG	--- --- -----	33172	Intronic	CEP128	ENSG00000
chr7	158797560	158797585	+	3	AAAATGTTGTTTTCCGGCCAGGCGCGG	- --- --- --- -----	357	Intronic	ESYT2	ENSG00000
chrX	135994395	135994420	-	3	GAAATGTTGTTTTCTGGCCAGGCGCGG	- --- --- --- -----	366	Intronic	SLC9A6	ENSG00000
chr7	86594971	86594996	-	3	TAAATATTTTTTCCGGCCAGGCGCGG	- - --- --- -----	48918	Intergenic	GRM3	ENSG00000
chr12	113188495	113188520	-	3	TAAATTTGTGTTGTGGCCAGGCGCGG	--- --- --- -----	1191	Intronic	RITA1	ENSG00000
chr3	196789753	196789778	-	3	AAAATTTGTTTTCCGGCCAGGCACGG	- --- --- --- --- -----	4667	Intronic	RNU6-42P	ENSG00000
chr11	62184495	62184520	+	3	CAAAATGTTTTTTCCGGCCAGGCACGG	- --- --- --- --- -----	5696	Intergenic	SCGB1D1	ENSG00000
chr14	20589075	20589100	-	3	TAAATTTATTTTCTGGCCAGGCGTGG	--- --- --- --- -----	714	Intronic	RP11-14J7.6	ENSG00000
chr10	45705284	45705309	-	3	TAAATTTTTTTTCTAGGCCAGGCGCAG	--- --- --- --- -----	1122	Intergenic	FAM21FP	ENSG00000
chr2	10288476	10288501	-	3	TAAATTTTTTTTCCGGCCAGGTGCAG	--- --- --- --- -----	7546	Intergenic	SNORA51	ENSG00000

Alu
mismatches to DIM 364 OPA1 transcript

Off-targets for
BP AON

Input: GTCTCATCTGCCCTGTCATGGTTGACA
Total MM: 3

Chromosome	start	end	strand	MM	target seq	alignment	distance	position	gene name	gene id
chr3	193618154	193618180	+	0	GTCTCATCTGCCCTGTCATGGTTGACA	-----	317	Intronic	OPA1	ENSG00000

IX.4 Artikel 3: A Transgenic Mouse Model for OPA1-associated Early-onset Behr Syndrome

A Transgenic Mouse Model for *OPA1*-associated Early-onset Behr Syndrome

Tobias Bonifert¹, Yasmin Wissinger², Karsten Boldt², Jenny Staller¹,
Bernd Wissinger¹, Irene Gonzalez Menendez¹

¹Molecular Genetics Laboratory and ²Division for Molecular Biology of Retinal Degenerations,
Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Elfriede-
Aulhorn-Str. 5-7, 72076 Tübingen, Germany.

***Correspondence to:**

Prof. Dr. Bernd Wissinger
wissinger@uni-tuebingen.de
Molecular Genetics Laboratory
Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology
University of Tübingen, Elfriede-Aulhorn-Str. 5-7, 72076 Tübingen
Germany

ABSTRACT

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is an important cause for inherited blindness and mainly caused by mutations in the nuclear-encoded mitochondrial GTPase OPA1. Although the majority of patients suffer from nonsyndromic optic atrophy, explained by OPA1 haploinsufficiency, around 20 % of mutation carriers develop extraocular symptoms. These mostly include adult onset deafness, ataxia and/or peripheral external ophthalmoplegia and were subsequently coined as “ADOAplus” syndrome. Recently, an emerging number of patients with even more severe early-onset optic atrophy and childhood-onset ataxia were described with bi-allelic *OPA1* mutations thus establishing a novel entity termed *OPA1*-associated Behr syndrome resembling a complex of symptoms first described by Carl Julius Peter Behr (Behr, 1909). Whereas Behr syndrome is due to severe OPA1 deficiency, the contrary situation (i.e. overexpression of OPA1) was shown to be protective in several murine disease models. In order to investigate the pathogenesis of Behr syndrome as well as the putative protective effects of OPA1 overexpression, a BAC transgenic mouse model, harboring the murine homolog of the main Behr syndrome mutation p.I437M (murine: p.I400M) was created and characterized in depth on DNA, RNA and protein level. Animals with corresponding Behr syndrome genotype were viable but did not display neurological impairment at the investigated time points. Likewise, overexpression of up to six *Opa1* transgene copies did not cause neurological or behavioral impairment and cancer rates were not elevated compared to wildtype littermates, even at 18 months of age. This finding paves the way for investigations on OPA1-mediated neuroprotection in various murine disease models.

KEYWORDS

Behr syndrome, OPA1, BAC transgenesis, neuroprotection

INTRODUCTION

Autosomal dominant optic atrophy (ADOA) is the most common form of optic neuropathy with an estimated prevalence of 1:16,000 - 1:50,000. Mutations in the gene *Optic Atrophy 1 (OPA1)* are the major cause for ADOA [1]. The gene is located on chromosome 3q28 and contains 31 exons (30 coding, 3 alternatively spliced: Exons 4, 4b and 5b), covering a genomic region of around 105 kb [2-4]. Tissue specific alternative splicing of the *OPA1* pre-mRNA gives rise to eight different in-frame mRNA isoforms [4], all of which encode a large dynamin-related GTPase, located at the inner mitochondrial membrane (IMM). In total three post-translational cleavage sites have been described: Cleavage site L, downstream of the mitochondrial targeting sequence (Phe88_Trp89, Exon 2); cleavage site S1, downstream of transmembrane domain 1 (Ala195_Thr196, Exon 5) and cleavage site S2, encoded by the alternatively spliced Exon 5b. Such cleavages of the OPA1 protein result in multiple isoforms, anchored to the IMM or soluble in the intermembrane space (IMS)[5]. Various mitochondrial features have been attributed to OPA1 function, the most prominent being fusion of the mitochondrial inner membrane, control of cristae shape and of apoptotic cytochrome C release [6] as well as mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance (involving alternative exon 4b)[7].

In order to investigate the function of OPA1, several mouse models have been described to mimic the *OPA1*-associated phenotypes in human patients. Alavi and colleagues described an ENU mutagenesis-induced murine model harboring a c.1065+5G>A splice site mutation (*OPA1*^{M1BeWi}, henceforth: *Opa1*^{+/-}) [8]. The mutation induces skipping of Exon 10 and represents a null allele with a 50 % reduction of the normal level of OPA1 protein. Analogous to the human situation, *Opa1*^{+/-} mice showed a slowly progressing and variable degeneration of the retinal ganglion cell layer and subtle extraocular features [9] as similarly observed recently in apparent non-syndromic ADOA patients upon closer inspection [10]. A similar mouse model for ADOA was reported in the same year by Davies and colleagues [11]. This second mouse line carries a heterozygous Stop mutation (p.Q285Stop) in exon 8 of *Opa1* which likewise causes reduction of total OPA1 protein levels and foremost corresponds to the previous model concerning phenotypic features. In 2012, Sarzi and colleagues reported the first mouse model with pronounced extraocular manifestations (resembling the 'optic atrophy plus' phenotype in human patients), starting at around five months of age and including RGC loss, deafness, ataxic features and associated with histopathological and cellular aberrations like altered muscle fiber ultrastructure, cerebellar atrophy and increased autophagy in different tissues [12]. This mouse mutant was created by targeted homologous recombination in embryonic stem cells, introducing a c.2708_2711delTTAG frameshift mutation in Exon 27, homologous to a well known mutation in the human *OPA1* which accounts for about 17 % of all non-syndromic ADOA patients [13].

The 'optic atrophy plus' phenotype of this mouse model has been previously observed in around 20 % of all *ADOA* patients [14]. The symptoms include optic atrophy and one or several additional features including deafness, ataxia, myopathy, neuropathy and peripheral external ophthalmoplegia. Typically, patients present with optic atrophy in their first decade of life, followed by deafness and movement disorders within the second and third decade, respectively. While nonsyndromic *ADOA* cases tend to be explainable by a haploinsufficiency model, syndromic *ADOAplus* patients often harbor missense mutations, implying a dominant negative mode of pathogenesis [14].

Apart from nonsyndromic optic atrophy and *ADOAplus*, a more severe phenotype associated with *OPA1* mutations has been repeatedly described since 2011 and was subsequently termed Behr or Behr-like syndrome (for review see Chao de la Barca et. al.[15]). This phenotype is characterized by a childhood onset optic atrophy (age 1-3 years) with multiple severe extraocular symptoms and ataxia mostly within the first decade of life [16-19]. Most of the described patients show a biallelic inheritance pattern, involving a pathogenic (mostly truncating) *OPA1* mutation and a particular missense variant in the GTPase domain of the corresponding allele: c.1311A>G/p.I437M (NM_130837.1, NP_570850.2). This variant was shown to be benign in heterozygous, as well as homozygous state. However, when present in trans to a pathogenic *OPA1* mutation on the corresponding allele, the variant has a deteriorating effect on the patients' phenotype, inducing a severe Behr-like syndrome. Although genetic evidence clearly constitutes the p.I437M as a modifier allele, the molecular alterations induced by the p.I437M substitution remained enigmatic so far. Molecular modeling postulated that this amino acid exchange might locally destabilize the GTPase domain and interfere with its nucleotide dependent function [16]. Whereas Behr syndrome is due to severe *OPA1* deficiency, the contrary situation (i.e. overexpression of *OPA1*) has been studied in a transgenic mouse model that expresses a singular *Opa1* isoform lacking exons 4b and 5b and revealed protective effects in two inborn neurodegenerative diseases [20] as well as in a number of tissue insults with mitochondrial involvement, albeit at the expense of an increased rate of cancer in these animals [21]. The mouse model used for the respective study harbors the murine *Opa1* coding sequence corresponding to human transcript variant 1, inserted via homologous recombination at the x-chromosomal *Hprt* locus and expressed under control of the human *beta-Actin* promoter. Although this *Opa1* transgene does not provide tissue-specific flexibility of alternative splicing and lacks the functions conferred by exon 4b (e.g. mtDNA maintenance [7]) and exon 5b (cleavage site S2 [22]), it still emphasizes the importance of in-depth investigations concerning the effects of (strong) native *OPA1* overexpression and putative protective effects of it, which might also be important for further diseases.

In this study we present a new transgenic *Opa1* mouse model, which might serve as a platform to study the Behr-like syndromic *OPA1* disease, as well as the effects of a strong systemic *OPA1* overexpression.

MATERIAL AND METHODS

Construction of a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) with modified *Opa1* gene and generation of transgenic mice

The BAC clone RP24-230P9 containing the entire mouse *Opa1* gene with 33 kb and 61 kb of upstream and downstream sequences, respectively, was obtained from the BACPAC Resources Center at the Children's Hospital Oakland Research Institute. Introduction of the c.1200A>G/p.I400M (NM_001199177.1, NP_001186106.1) substitution (corresponding to the c.1311A>G/p.I437M in the human *OPA1*) and three further silent substitutions (enabling differentiation between the wildtype and the mutant by RFLP) and loxP sites in introns 13 and 15 of *Opa1* into the BAC was done using the Counter-Selection BAC modification Kit by Red[®] / ET[®] recombination (Gene Bridges, Heidelberg, Germany), following the manufacturers protocols.

BAC DNA was isolated according to the method of Birnboim & Doly [22] or - for highly pure preparation - using the *Nucleobond BAC 100 Kit* (MACHEY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Integrity of the BAC constructs was verified by high resolution RFLP assays using different restriction enzymes (BamHI, Psp1406I, NotI; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); EcoRI, Ascl (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) and separation by field inversion gel electrophoresis (PC750 Pulse Controller, Hoefer Scientific instruments, San Francisco, California) or pulsed field gel electrophoresis (CHEF-DR[®] III system, Bio-Rad, München, Germany). We furthermore validated the BAC clones through direct comparison of the sizes of all genuine exons amplified from the final BAC construct versus the initial BAC clone and from wildtype C57Bl6 DNA. Transcriptional functionality of the BACs was confirmed by transfection of HEK293 cells with purified BAC DNA using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturers protocol, followed by RT PCR (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Life Sciences, Mannheim, Germany) and Sanger sequencing. Pronucleus injections of the final circular construct were carried out by Cyagen Biosciences Corporation (Santa Clara, CA, USA) using the FVB/NCrIvR mouse strain.

Animal housing and breeding

Male and female mice were used in this study. Animals were fed with standard food and water *ad libitum*, and maintained under constant temperature conditions (22°C ± 2°C) and daily cycles of 12h light/ 12h darkness. All experiments were performed in accordance to the Tuebingen Institutional Animal Care and Use Committee and have been approved by the local authorities. The weight of the animals was checked weekly. FVB/NCrIvR albino founder mice were outcrossed to C3H/He (devoid of

the rd1 allele, kindly provided by Dr. Francois Paquet-Durand, University of Tuebingen) matching with the *Opa1*^{+/-} line [8]. The characterization of the *Opa1*-BAC mouse model was performed with animals obtained by crossbreeding the *Opa1*-BAC animals with the wildtype litter mates of the *Opa1*^{+/-} mouse line. To obtain mice with the *Opa1*^{-/-}/BAC-X-(N) genotype we employed a two-step breeding scheme (see figure 1a) that should yield 12.5 % of pups with the proper genotype. The overexpression mouse model was generated by crossbreeding the lines *Opa1*-BAC-E and *Opa1*-BAC-H, assuming different loci of BAC insertion, with an expected fraction of 25 % for animals carrying both transgene insertions. Positive animals were identified by allelic quantification on a pyrosequencing instrument (Pyromark Q96, Qiagen, Hilden Germany).

Genotyping and detection of insert numbers

The number of integrated BAC construct copies was determined by allelic discrimination using a pyrosequencing assay with genomic DNA isolated from ear stamps. PCR and sequencing primers for the pyrosequencing assay were designed applying the PyroMark Assay Design 2.0 software (Qiagen). This assay indiscriminately amplifies a fragment of 155 bp of the murine *Opa1* exon 14 from both the endogenous locus and the transgene. Pyrosequencing of this amplicon specifically determines the relative incorporation of dATP and dGTP at nucleotide position c.1200A/G which discriminates between alleles and transcripts of the endogenous vs. the transgenic *Opa1* copies. For a detailed sequence context, see supplementary figure S1.

Expression and transcript analysis of BAC alleles

In order to determine the expression of the *Opa1* transgene, we harvested tissue from various organs (retina, optic nerve, brain, spinal cord, liver, kidney, heart (cardiac muscle), skeletal muscle, duodenum (smooth muscle), fat and tail tip). RNA was extracted using the PeqGOLD total RNA kit (Peqlab, Erlangen, Germany) after mechanical decomposition of the tissue using a Precellys 24 instrument (Bertin Technologies, Rockville, Washington D.C., USA). For a detailed homogenization protocol see supplementary material. cDNA was synthesized using the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) with random hexamer primers and subsequently used for PCR amplification and pyrosequencing. The amplification strategies applied for cDNA pyrosequencing are outlined in supplementary figure S1. In order to determine the fraction of intact full-length *Opa1* transgene transcripts we amplified the entire coding portion of the cDNA in two overlapping long distance PCRs. The resulting RT-PCR products were used as templates for a nested PCR that was subsequently pyrosequenced. If the ratio between endogene-derived and transgene-derived cDNAs differed significantly for the 5' and 3' cDNA portions, we deduced truncation of one or several of the inserted BAC copies with a proportion of the respective truncated transcripts escaping NMD-

mediated RNA degradation. For primer sequences see supplementary material, for amplification strategy see supplementary figure S2.

Western blot and Mass spectrometry

Proteins were extracted from four different tissues (retina, liver, brain and skeletal muscle) using a modified RIPA-buffer (composition and procedure, see supplementary material) following disintegration and homogenization of the tissue with a Precellys 24 instrument (Bertin Technologies). 20µg of protein lysates were analyzed by semi quantitative Western blot analysis with antibodies against OPA1 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany, Cat.: 612607), BETA-ACTIN (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany, Cat.: MAB1501) and HSP60 (Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany, Cat.: ADI-SPA-806-D). A fluorescent-labeled anti-mouse secondary antibody (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany, Cat. 926-32210) was used for signal detection and quantification on an Odyssey Sa instrument (LI-COR Biosciences).

Expression of the transgene-derived p.I400M OPA1 isoform was verified on the protein level by targeted mass spectrometry using parallel reaction monitoring on a Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Additionally, the proportion of p.I400M OPA1 protein levels in brain homogenates was specified by determination of the non-mutated peptide in relation to the total amount of OPA1 abundance using targeted and quantitative mass spectrometry (for detailed information see supplementary data).

Phenotypic assessment of *Opa1*-BAC overexpression mice

Phenotypic differences between OPA1 overexpressing mutant and wildtype littermates were assessed by using a modified Shirpa test [23] including observational and behavioral parameters for investigation of ataxia, coordination, strength, fitness, affectability, motility, reflexes, hearing, geotaxis and autonomous function at 3 different ages: 6 weeks, 12 weeks and 6 months (see supplementary material).

RESULTS

Generation and validation of the modified *Opa1* BAC construct

We used RP24-230P9, a 178 kb BAC clone containing the entire *Opa1* gene and 33 kb of upstream and 61 kb of downstream sequence to introduce the c.1200A>G/I400M substitution (corresponding to the c.1311A>G/p.I437M in the human *OPA1*) and three adjacent silent substitutions (to introduce recognition sites for NlaIII and MaeII) in exon 14. Furthermore we inserted two LoxP sites, 143 bp upstream of exon 14 and 387 bp downstream of exon 15 of the modified BAC construct (see figure 2).

Illegitimate intramolecular recombination was observed in some clones during our experiments. Therefore we thoroughly validated the final modified BAC clone by a set of restriction enzyme digestions and gel separation via pulsed field gel electrophoresis (PFGE) or field inversion gel electrophoresis (FIGE), by amplification and sequencing of all *Opa1* exons (in direct comparison with PCRs using murine genomic DNA as template) and finally transfection of HEK293 cells to prove transcription of *Opa1* from the BAC construct (data not shown).

Molecular investigation of founder mice and offspring

DNA-level: Multiple in-tandem insertions of the BAC construct are stably transmitted to offspring

Pronucleus injection of the circular modified BAC construct yielded nine positive Founder animals, six of which were used for the subsequent study (FVB/NCrIvR-TgN(p.I400M)X-BeWi, with N = 1 / 2 / 3 functional transgene copies; X = D / E / G α / G β / H / I; henceforth: *Opa1*-BAC-D(1), *Opa1*-BAC-E(3), *Opa1*-BAC-G α (1), *Opa1*-BAC-G β (2), *Opa1*-BAC-H(3) and *Opa1*-BAC-I(2). Relative allele quantification using pyrosequencing at position c.1200A/G (that differentiates between the endogenous *Opa1* gene (c.1200A) and the *Opa1* transgene (c.1200G)) revealed endogene:transgene ratios and thereof calculated transgene copy numbers that ranged between one and five in the different founder animals (see Table 1). All founders transmitted the BAC transgene to their offspring, except for founders B and C, which had no transgene-positive pups (founder B: 0/18; founder C: 0/28), and founder F, which died for unknown reasons soon after receipt. We observed a stable transmission of the transgene copy number over at least six generations except for founder G which transmitted either 1 or 2 copies of the transgene to the progeny and was therefore subdivided into the sublines G α (1) and G β (2).

RNA-level: Cross tissue expression and natural regulation of BAC transgenes

In order to test the cross tissue expression and proper regulation of the transgene copies, we used F1 animals of all *Opa1*-BAC lines and analyzed in total 11 tissues from different embryonic origin for *Opa1* expression and the relative proportions of endogene vs. transgene derived *Opa1* transcripts. Using pyrosequencing based allelic discrimination, we could observe stable ratios of transgene to endogene-derived *Opa1* transcripts in the different analyzed tissues indicating a tight co-regulation of expression from the endogenous locus and the transgenic locus (see figure 3). For identification of non-intact BAC copies that may still express truncated *Opa1* transcript, we amplified the entire *Opa1* cDNA in two overlapping long distance RT-PCRs and determined the endogene to transgene-derived transcript ratio for both cDNA segments by independent pyrosequencing (see suppl. figure S2). This more refined BAC insert quantification revealed no intact transgene copy for line A and only a single intact transgene copy in line G α (see Table 1).

Protein level:

BAC inserts increase OPA1 protein levels

Western blots with protein lysates from liver, brain and retina prepared from F2 animals showed elevated OPA1 levels compared to wildtype littermates for lines *Opa1*-BAC-G α (1), -G β (2), -D(1), -E(3), -H(3) and -I(2). The ratio of OPA1 vs. β -ACTIN was clearly increased and by large approximated values as expected from the number of intact transgenes in the respective line (see table 1). For an exemplary comparison of retinal tissues in lines *Opa1*-BAC-D(1) and *Opa1*-BAC-H(3), see figure 4.

Mass-spectrometry: Elevated OPA1 protein levels are caused by BAC inserts

In order to verify qualitatively whether the observed increase in OPA1 abundance is caused by expression from the integrated BAC transgene rather than by an upregulation at the endogenous locus, we performed targeted mass spectrometry on trypsin-digested whole brain protein lysates. In fact we were able to detect the signature OPA1 peptide isoforms EGCTVSPETI/MSLNVK with the expected mass shift. To determine the proportions of wildtype and transgene-derived mutant OPA1 protein, we performed relative quantification of wildtype peptide EGCTVSPETISLNVK versus the five most intense fragment ions of five proteotypic peptides for the murine OPA1 (common in the wildtype and mutant OPA1 protein) in BAC transgenic animals and wildtype littermate controls (five biological replicates (*Opa1*-BAC-G α (1)) or three biological replicates (*Opa1*-BAC-D(1)) and three technical replicates each). By subtracting the fraction of non-mutated peptide EGCTVSPETISLNVK from total OPA1, the relative abundance of the mutant peptide (EGCTVSPETMSLNVK) and thereby the mutant OPA1 was determined. For the signature peptide (spanning the mutant site), the five most intense fragment ions were used for quantification. Both analyzed BAC transgenic lines showed

an increased amount of total OPA1, of which approximately one third accounted for the p.I400M mutant OPA1. This fraction differs slightly between both lines tested. The line Opa1-BAC-Gα(1) showed a lower expression of mutant OPA1 (26 % of total OPA1) whereas the proportion of the mutant OPA1 was higher in line Opa1-BAC-D(1) (37 % of the total OPA1 protein; see figure 5). These differences were, however, not significant ($P = 0.30$, ANOVA).

Phenotypic characterization of Founder animals and offspring

BAC transgenic mice were without obvious health impairment

In order to determine a potentially deleterious effect of the *Opa1* p.I400M transgene, a detailed study including litter size, postnatal death rate, genotype ratio and male/female ratio was performed. Additionally all animals were checked twice a week (physical and behavioral observations) and their weight was measured once a week. None of the founder mice or their offspring showed any morphological or physiological impairment due to expression of one or multiple copies of the transgene. General health conditions were comparable to WT littermates concerning behavior, sex ratio, litter size, perinatal death rates /infanticides, ratio of transgene positive vs. negative animals, life span and body weight (for parameters, see supplementary material).

Generation of animals with strong transgene overexpression or Behr genotype

In order to generate mice mimicking a Behr syndrome-like genotype observed in patients (a null and a p.I437M allele in trans), we employed a two-step breeding scheme crossbreeding the lines Opa1-BAC-Gα(1), -BAC-D(1) (both carrying one functional BAC copy (1)) and BAC-I(2) (two copies with the *Opa1*^{+/-} -mouse strain (see figure 1). This approach generates Behr genotypes as well as wildtype controls within the same litter, each genotype with a theoretic share of 12.5 % and an expected portion of 14.29 % considering the known embryonic lethality of the *Opa1*^{-/-} Genotype. Among a total of 58 pups with line Opa1-BAC-I(2) as transgene donor we identified 16 animals (27.5 %) with a Behr syndrome genotype *Opa1*^{-/-}/*Opa1*-BAC-I(2), and 21 animals out of a total of 113 pups when line Opa1-BAC-D(1) was used as transgene donor (18.5 %), but none among a total of 132 pups when line Opa1-BAC-Gα(1) was used as transgene donor (see figure 1b).

In order to investigate the embryonic lethality of the Behr animals in line Opa1-BAC-Gα(1), we repeated the second breeding step and isolated the embryos at E12.5. Genotyping of the embryonic tissues revealed no animals with Behr genotype; however, we could observe the presence of mole structures, representing the remnants of reabsorbed embryos.

In a diametrical approach to the OPA1 deficiency in Behr syndrome, we addressed the effects of a strong OPA1 overexpression by crossbreeding two *Opa1*-BAC strains with high numbers of functional transgene copies. Crossbreeding the strains *Opa1*-BAC-E(3) and -H(3) gives rise to animals with in total 6 functional transgene copies plus the two endogenous *Opa1* alleles (n=6, *Opa1*^{+/+}/*Opa1*-BAC-E(3)+H(3)) and wildtype litter mates (n=8, *Opa1*^{+/+}).

Behr genotype and strong overexpression of Opa1 BAC transgene without phenotype

Over a course of 6 months (3 data points: 6, 12 and 24 weeks) we conducted a study to assess potential neurological and behavioral impairments due to the Behr genotype and the OPA1 overexpression.

During this preliminary investigation we analyzed 36 different variables designed to indicate alterations in the motor coordination, sensory-motor function, ataxia, behavior and wildness, body aspect, behavior and anxiety, neuromuscular function, autonomic function, activity and motor function as well as mobility (see supplementary material). However, no significant difference could be observed between wildtype and Behr genotype / overexpression animals at any age (overexpression: *Opa1*^{+/+}/*Opa1*-BAC-E(3)+H(3): 6, 12, 24 weeks; Behr syndrome: *Opa1*^{-/-}/*Opa1*-BAC-I(2): 6, 12, 24 weeks, *Opa1*^{-/-}/*BAC*-D(1): 3 weeks; p>0.05 in all tests performed). Necropsies performed on 18 months old overexpression mice did not reveal any significant organic or pathologic differences compared to wildtype littermates, especially with regard to the prevalence of cancer (see discussion).

DISCUSSION

Apart from a clearly dominant negative mechanism of action caused by certain missense mutations, large parts of the *OPA1*-associated disease spectrum can be explained by the degree of *OPA1*-loss: Individuals with *OPA1*^{+/+}, *OPA1*^{+/I437M}, and even homozygous *OPA1*^{I437M/I437M} are asymptomatic. The combination of a wildtype allele and a truncating allele (*OPA1*^{+/-}) gives rise to classic nonsyndromic optic atrophy. A further insult or a dominant-negative mutation induces ADOAplus phenotypes and a bi-allelic situation, including one null allele and one compromised allele raises a Behr-like syndrome (e.g. *OPA1*^{-/I437M}). Finally, two truncating alleles (*OPA1*^{-/-}) have been shown to be lethal in early embryonic development [8]. This model implies a direct link between functional *OPA1* levels and disease severity. In this study we generated and characterized a series of transgenic founder animals and breeding lines derived thereof that had integrated one or multiple copies of a BAC expressing a p.I400M mutant murine *OPA1* (the homologous position to p.I437M in human *OPA1*). Notably, the employed BAC contained the entire *Opa1* gene and large portions of upstream and downstream sequence. Our investigation of transcript and protein expression revealed that the transgene-derived *Opa1* is properly expressed and is subject to normal tissue specific regulation. We used certain of these BAC lines to generate i) mice mimicking a common Behr syndrome genotype in human patients, and ii) mice that strongly overexpress *OPA1*. These experiments showed that 2 of 3 tested transgenes are able to compensate for a homozygous mutation at the endogenous *Opa1* locus that is otherwise lethal during embryonic development. Mice with Behr syndrome-mimicking genotypes were viable and did not show any obvious deficit in early postnatal growth, development and behavior irrespective of one or two transgene copies being expressed. The effect of the latter on further development, motor function and behavior in mice up to the age of six months was studied in detail but did not reveal any defect or functional deficit compared to wildtype littermates. Similarly, overexpression of the p.I400M-*Opa1* transgene does not cause any health impairment in mice, even at high gene doses.

BAC copy number results for DNA level overestimate equivalent RNA transcripts

BAC-mediated transgenesis faces various technical obstacles including illegitimate intramolecular recombination, sheering of BAC-DNA and random linearization. cDNA analyses in founder mice and offspring revealed that the ratio of endogenous *Opa1* and BAC-derived transgenic p.I400M-*Opa1* is essentially stable over all 11 different investigated tissues, which implicates that the BAC construct contained all major regulatory sequences and conferred natural tissue-specific regulation at the respective genomic integration site in the respective transgenic animals. Addressing the question of random linearization and integration of fragmented BAC-constructs, we found that relative allelic discrimination using pyrosequencing on small cDNA template amplicons still overestimated the

number of functional copies compared to our more dedicated approach using long amplicons for a re-PCR in pyrosequencing. This indicates that even truncated transgene copies can still give rise to stable yet aberrant transcripts. The reason for this apparent escape from mRNA degradation of faulty transcripts remains unclear but should be carefully assessed, also in other transgenic animal models. With the exception of line *Opa1*-BAC-G, all lines segregated a stable number of transgene copies, suggesting single insertion events with a single BAC molecule or several BAC copies in tandem. In line BAC-G, however, the transgene-positive offspring diverged in two subgroups, harboring one (-G α (1)) and two (-G β (2)) transgene copies, respectively. This suggests for founder *Opa1*-BAC-G two independent insertion events at different genomic loci.

In sum, the observed peculiarities of murine BAC transgenesis further highlight the importance of in-depth, cross-generational molecular analyses on DNA and RNA level to distinguish between formal genomic copy numbers and functional full-length RNA equivalents.

Opa1-BAC Lines express elevated OPA1 protein levels

The presence of intact transgene-derived transcripts as determined by pyrosequencing coincides with elevated levels of OPA1 protein in all three investigated tissues (Brain, Liver and Eye). We confirmed that this increase in OPA1 is due to expression of the transgene rather than upregulation of expression from the endogenous gene by means of targeted mass spectrometry for lines *Opa1*-BAC-G α (1) and -BAC-D(1). Hence, we could show that both lines expressed the functional equivalent of one transgene copy on RNA level, had correspondingly elevated OPA1 protein levels and this elevation is due to translation of the transgene's mRNA. Furthermore, the results from Western blot and mass spectrometry indicate that the amount of OPA1 protein seems to be directly correlated to the number of intact OPA1 gene copies. Therefore, genomic gain of OPA1 copies does not seem to drive feedback mechanisms that downregulate OPA1 protein expression to a certain level. This lacking feedback could also be observed in heterozygous *Opa1*^{+/-} mice, where loss of one functional allele is not compensated by upregulation of the wildtype allele.

Behr animals and overexpression animals without pathologic impairment

The presence of the *OPA1* mutation c.1311A>G (p.I437M) in combination with another *OPA1* null allele in *trans* causes Behr syndrome in humans, which could be shown in seven different families, so far. By crossbreeding our mouse lines *Opa1*-BAC-G α (1), -BAC-D(1) and -BAC-I(2) each individually with the *Opa1*^{+/-} line, we intended to create a corresponding murine genotype: *Opa1*^{-/-}/*Opa1*-BAC-G α (1), *Opa1*^{-/-}/*Opa1*-BAC-D(1) or *Opa1*^{-/-}/*Opa1*-BAC-I(2). We were not able to obtain animals with this genotype using line *Opa1*-BAC-G α (1), as transgene donor line. Prenatal investigations revealed mole structures at E12.5 suggesting embryonic lethality of these animals. However, since we could generate viable

animals of the appropriate genotype with lines *Opa1*-BAC-D(1) and *Opa1*-BAC-I(2) as transgene donors, genomic positional effects might be a possible explanation for the embryonic lethality in line *Opa1*-BAC- Gα(1). Mice with Behr syndrome-mimicking genotypes from lines *OPA1*-BAC-D(1) and -BAC-I(2) did not show any defect or deficit in growth, development and behavior during the early postnatal weaning period. Furthermore thorough investigation of mice with Behr syndrome-mimicking genotypes from line I in the post weaning period up to the age of six months did not reveal differences in growth, development, motor and neuromuscular function compared to wildtype littermates. This may indicate a full compensation of the homozygous *Opa1* defect at the endogenous locus by two functional copies of the mutant transgene or another time course of the disease in mice (compared to humans) and warrants further investigation of mice with Behr syndrome-mimicking genotypes derived from BAC lines with a single functional transgene copy and longer observation periods or a Knockin approach at the endogenous locus.

In contrast to the study of Varanita and colleagues that described an elevated prevalence of cancer in their mouse model with transgenic overexpression of a wildtype *Opa1* isoform lacking exon 4b and 5b, we did not observe an increased rate of cancer, even in very old animals in our study. This might be explained by the natural regulation conferred by the inherent structure of the transgene, which involves all exons, introns and promoter sequences or by the presence of the p.I400M modifier which was predicted to modulate the GTPase activity, albeit via a yet unsolved mechanism. The absence of symptoms in animals overexpressing OPA1, therefore, indicates the potential of these mice to study protective effects of OPA1 overexpression in situations of mitochondrial challenge e.g. ischaemic incidents, inborn mitochondriopathies and aging.

FIGURES

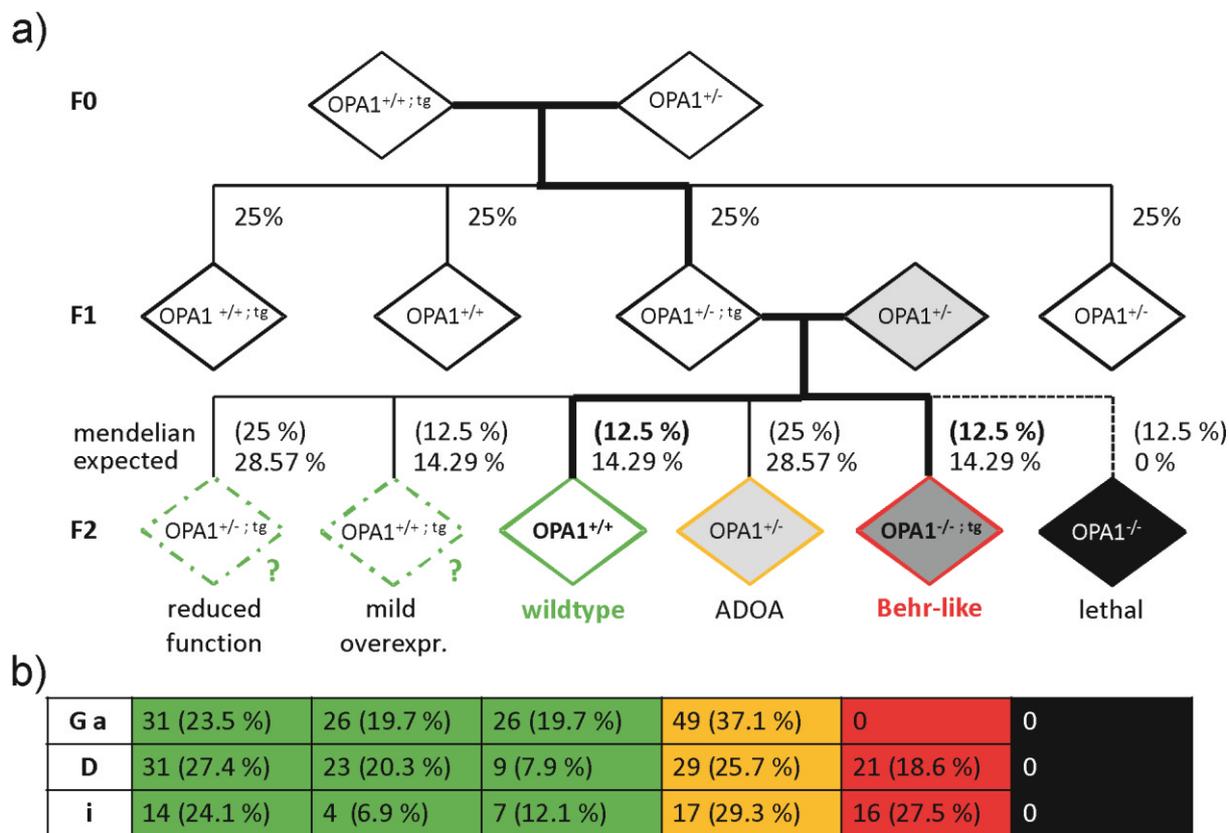


Figure 1 Breeding scheme for the generation of mice with Behr syndrome-mimicking genotype
 a) Sequential breeding of heterozygous *Opa1*^{+/-} mice with mice harboring one or several copies of the BAC transgene (tg = *Opa1*-BAC- α (1), -D(1), -I(2)) yields six hypothetical genotypes in the F2 generation. b) Absolute numbers and relative ratios from genotyping of F2 pups.



Figure 2 BAC construct for *Opa1*-p.I400M transgenic mice

The BAC clone RP24-230P9 containing the entire *Opa1* gene (strain: C57Bl6) was used as template for the generation of the final BAC transgene construct. Modifications include the introduction of the c.1200A>A/p.I400M (homologous to the c.1311/p.I437M in the human OPA1 gene) in Exon 14 (codon ATA (Ile) > ATG (Met)) and three further downstream silent substitutions, not affecting the corresponding amino acids (right box). Furthermore, single loxP sites (highlighted in red) were introduced upstream of exon 14 and downstream of exon 15 (exon sequences in bold). Restriction sites used for cloning of the fragment into the exchange cassette vector are highlighted in green.

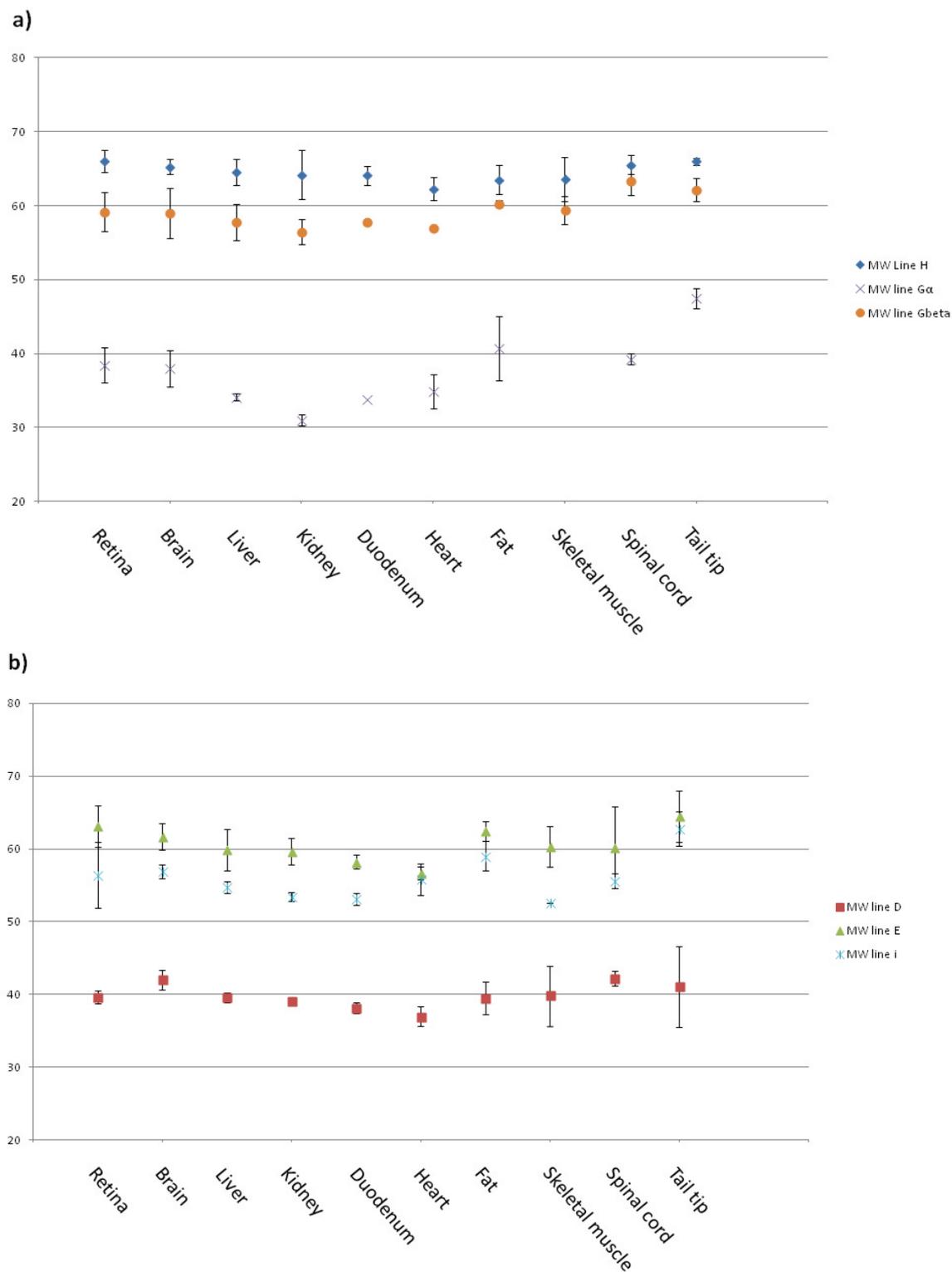


Figure 3 Relative expression of transgene-derived *Opa1* transcripts in various tissues

In all six investigated *Opa1*-BAC lines the proportion of transgene-derived *Opa1* transcripts in the total pool of *Opa1* transcripts was stable across all 10 analyzed tissues. Data were generated from three biological replicates. Comparison of Lines *Opa1*-BAC-E(3), -D(1), -H(3), -G α (1), -G β (2) and -I(2) revealed clusters of proportions that correspond with transgene copy number: Lines BAC-H(3) and BAC-E(3) with an equivalent of \sim 3-4 transcribed transgene copies (60% tg vs. 40% eg = 3 tg copies vs. 2 tg copies), lines BAC-D(1) and -G α (1) with an equivalent of \sim 1 transgene copy and lines BAC-G β (2) and BAC-I(2) with intermediate copy numbers.

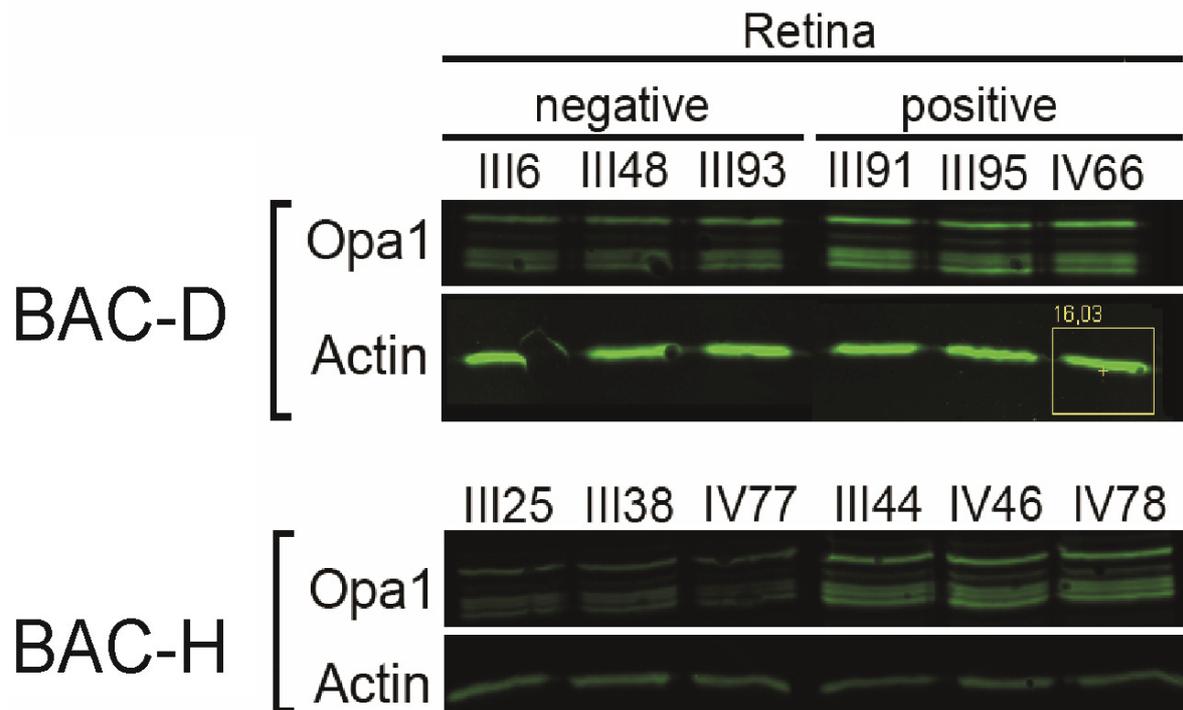


Figure 4 Semi-quantitative Western blot with protein lysates of whole retina prepared from lines BAC-D and -H

Transgene-positive and transgene-negative mice of lines *Opa1*-BAC-D(1) and -BAC-H(3) were compared in triplicates on protein level, using lysates of retinae for SDS-PAGE and Western blot. Signals were detected using a fluorescent secondary antibody on an Odyssey Sa system and intensities were directly assessed using the manufacturer's software and standardized virtual boxes (example given for ACTIN lane in IV66).

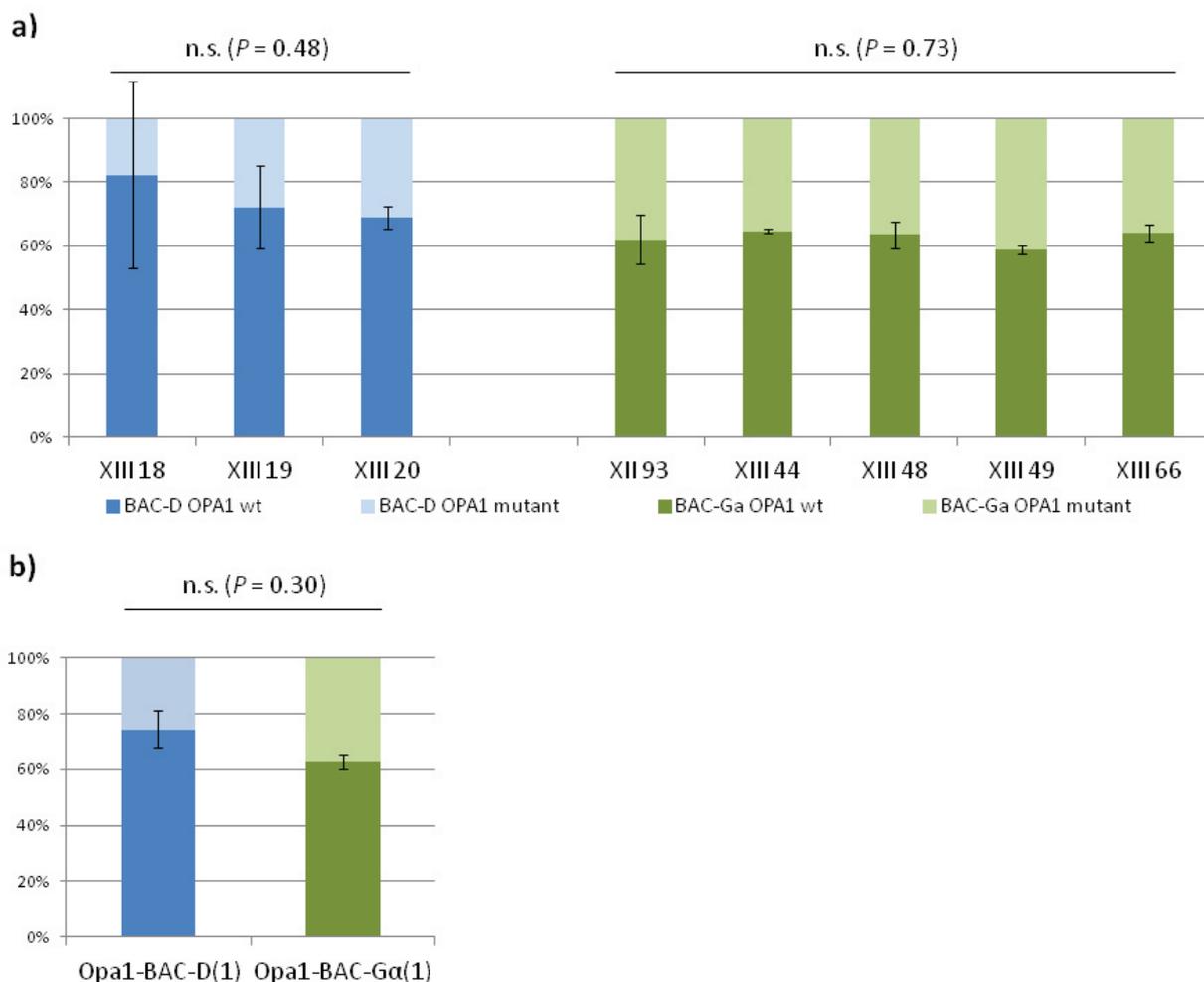


Figure 5 Relative quantification of transgene expression on protein level by mass spectrometry

a) To validate the expression of the p.I400M mutant OPA1 and its relative abundance, the relative amounts of the signature peptide (covering the variant site) and proteotypic OPA1 peptides were determined in brain lysates from three mice of of line *Opa1*-BAC-D(1) and five mice of line *Opa1*-BAC-Ga(1) and corresponding wildtype littermates by means of targeted mass spectrometry that allowed to calculate the relative proportions of the mutant and wildtype OPA1 protein. b) In both BAC lines, approximately one third of the total OPA1 protein is derived from the transgene. The proportion does not differ significantly between both tested lines ($P = 0.30$ (ANOVA)).

Table 1 Transgene copy numbers on DNA, RNA and protein level – assessed by pyrosequencing & Western blot

	Transgene copies (DNA)	Expressed transgene copies (RNA)	Expressed full-length transgene copies (RNA). F1	Expected fold-change of OPA1 (Prot)	OPA1 fold-change Liver (Prot)*	OPA1 fold-change Eye (Prot)*	OPA1 fold-change Brain (Prot)*
A	3	1-2	0	-	-	-	-
B	1	2-3	0	0	0	0	0
C	1	1	0	0	0	0	0
D	2	1	1	1.5	1.9 ^d	1.7 ^c	1.1 ^e
E	5	4	3	2.5	2.5 ^d	3 ^b	1.4 ^c
F	1	†	†	†	†	†	†
G alpha	1-2	1-2	1	1.5	1.5 ^d	1.8 ^e	1.6 ^d
G beta	2-3	2	2	2	1 ^e	1.3 ^e	2 ^d
H	5	3	3	2.5	1.9 ^b	3.5 ^a	1.5 ^d
I	3	3	2	2	1.8 ^d	2.5 ^c	1.2 ^e

* Student t test performed between positive and negative animals.

a= p<0.0001

b= p<0.001

c= p<0.01

d= p<0.05

e= non significant

† Founder F died soon after shipment

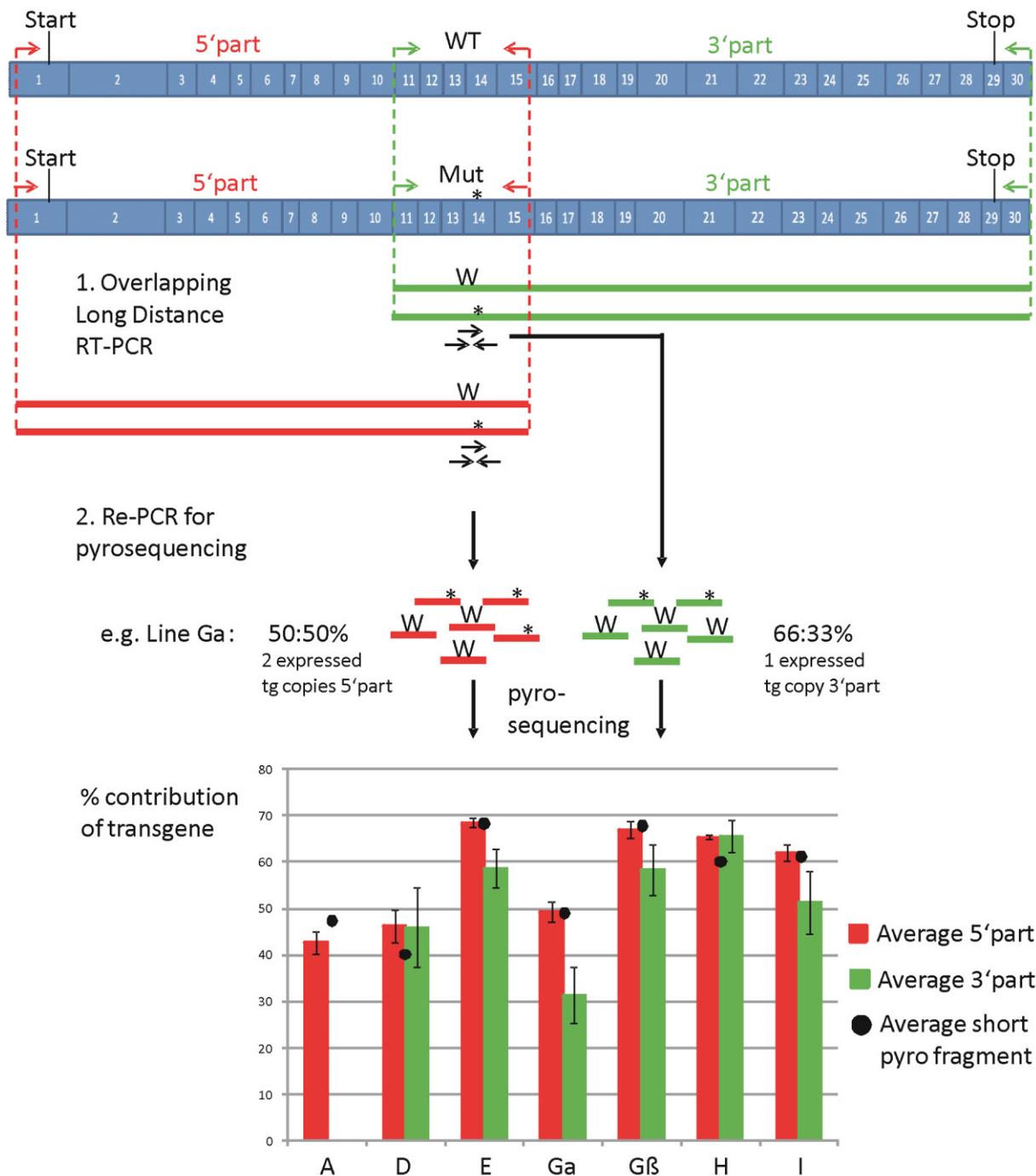
0 Founders B and C did not transmit the transgene to following generations



Supplementary Figure S1 Pyrosequencing assays to determine transgene copy numbers and the ratio of *Opa1* transcripts from the endogenous gene locus vs. the transcripts derived from the transgene

Left: DNA segment of the murine *Opa1* gene with intron sequences in lower case letters and exon sequences in upper case letters, respectively. PCR primers bind upstream (fwd) and downstream (rev, biotinylated) of exon 14 (highlighted in blue). The sequencing primer (seq) employed for pyrosequencing of the PCR product covers the boundary of intron 13 and exon 14. Right: cDNA segment of the murine *Opa1* gene with spliced exons. Fwd primer binds in exon 13, reverse primer in Exon 14. The sequencing primer (seq) employed for pyrosequencing of the RT-PCR product covers the boundary of exon 13 and 14.

OPA1 cDNA of endogenous WT gene and mutant transgene copy



Supplementary Figure S2 Testing the structural integrity of transgene-derived *Opa1* transcripts by quantitative pyrosequencing of amplicons derived from long distance RT-PCR products covering the entire coding sequencing of the *Opa1* cDNA

Opa1 cDNA was amplified in overlapping long distance (LD) PCRs, both of which cover the central region harboring the c.1200A/G/p.I400M-Mutation and the binding sites of primers used in the pyrosequencing assay (compare to supplementary figure S1). In a second step, 5'- and 3'-LD PCR products of each line were independently re-amplified with the established pyrosequencing primers. Resulting PCR-products were used for pyrosequencing as described. Results indicate reduced or absent relative abundance of the transgene's 3'amplicons, suggesting truncated BAC inserts or reduced steady state levels of transgene transcripts in lines BAC-A(1), -E(3), -Gα(1), -Gβ(2) and -I(2) due to incomplete 3'-5' exonuclease activity.

REFERENCES

1. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Burke A, Sellar PW, Clarke MP, Gnanaraj L, Ah-Kine D, Hudson G, Czermin B, Taylor RW *et al*: **The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations.** *Ophthalmology* 2010, **117**(8):1538-1546, 1546 e1531.
2. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G *et al*: **OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28.** *Nat Genet* 2000, **26**(2):211-215.
3. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E *et al*: **Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy.** *Nat Genet* 2000, **26**(2):207-210.
4. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP: **Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene.** *Hum Genet* 2001, **109**(6):584-591.
5. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K: **Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1.** *EMBO J* 2006, **25**(13):2966-2977.
6. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G: **Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis.** *J Biol Chem* 2003, **278**(10):7743-7746.
7. Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, Yu-Wai-Man P, Gasparre G, Sarzi E, Delettre C *et al*: **OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution.** *Genome Res* 2011, **21**(1):12-20.
8. Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC, Tonagel F, Pichler BJ *et al*: **A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy.** *Brain* 2007, **130**(Pt 4):1029-1042.
9. Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, Chinnery PF, Wissinger B: **Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy.** *Exp Neurol* 2009, **220**(2):404-409.
10. Roubertie A, Leboucq N, Picot MC, Nogue E, Brunel H, Le Bars E, Manes G, Angebault Prouteau C, Blanchet C, Mondain M *et al*: **Neuroradiological findings expand the phenotype of OPA1-related mitochondrial dysfunction.** *J Neurol Sci* 2015, **349**(1-2):154-160.
11. Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME, Votruba M: **Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**(11):1307-1318.
12. Sarzi E, Angebault C, Seveno M, Gueguen N, Chaix B, Bielicki G, Boddaert N, Mausset-Bonnefont AL, Cazevielle C, Rigau V *et al*: **The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse.** *Brain* 2012, **135**(Pt 12):3599-3613.

13. Ferre M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H, Ayuso C, Defoort S, Vignal C, Zanlonghi X *et al*: **Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations.** *Hum Mutat* 2009, **30**(7):E692-705.
14. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, Auer-Grumbach M, Toscano A, Musumeci O, Valentino ML, Caporali L *et al*: **Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations.** *Brain* 2010a, **133**(Pt 3):771-786.
15. Chao de la Barca JM, Prunier-Mirebeau D, Amati-Bonneau P, Ferre M, Sarzi E, Bris C, Leruez S, Chevrollier A, Desquirit-Dumas V, Gueguen N *et al*: **OPA1-related disorders: Diversity of clinical expression, modes of inheritance and pathophysiology.** *Neurobiol Dis* 2016, **90**(1):20–26.
16. Bonifert T, Karle KN, Tonagel F, Batra M, Wilhelm C, Theurer Y, Schoenfeld C, Kluba T, Kamenisch Y, Carelli V *et al*: **Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic OPA1 mutations and an intralocus modifier.** *Brain* 2014, **137**(Pt 8):2164-2177.
17. Schaaf CP, Blazo M, Lewis RA, Tonini RE, Takei H, Wang J, Wong LJ, Scaglia F: **Early-onset severe neuromuscular phenotype associated with compound heterozygosity for OPA1 mutations.** *Mol Genet Metab* 2011, **103**(4):383-387.
18. Carelli V, Sabatelli M, Carrozzo R, Rizza T, Schimpf S, Wissinger B, Zanna C, Rugolo M, La Morgia C, Caporali L *et al*: **'Behr syndrome' with OPA1 compound heterozygote mutations.** *Brain* 2015, **138**(Pt 1):e321.
19. Bonneau D, Colin E, Oca F, Ferre M, Chevrollier A, Gueguen N, Desquirit-Dumas V, N'Guyen S, Barth M, Zanlonghi X *et al*: **Early-onset Behr syndrome due to compound heterozygous mutations in OPA1.** *Brain* 2014, **137**(Pt 10):e301.
20. Civilelto G, Varanita T, Cerutti R, Gorletta T, Barbaro S, Marchet S, Lamperti C, Viscomi C, Scorrano L, Zeviani M: **Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models.** *Cell Metab* 2015, **21**(6):845-854.
21. Varanita T, Soriano ME, Romanello V, Zaglia T, Quintana-Cabrera R, Semenzato M, Menabo R, Costa V, Civilelto G, Pesce P *et al*: **The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage.** *Cell Metab* 2015, **21**(6):834-844.
22. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC: **OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L.** *J Cell Biol* 2007, **178**(5):749-755.
23. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE: **Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment.** *Mamm Genome* 1997, **8**(10):711-713.

Supplementary material to manuscript *A transgenic mouse model for OPA1-associated early-onset Behr Syndrome*

Primer sequences (5'-3' orientation)

Pyrosequencing DNA level	
Mm-I382M-DNA-F	TTCTTAAGACACCCCAAGAGCT
Mm-I382M-DNA-S	TTCTCTTCTGAATAGACCA
Mm-I382M-DNA-Rbiot	Bio-GCAGGAATCAAATGGGAAGTAT
Pyrosequencing RNA level	
Mm-I382M-RNA-F	ATCGAACTCCGAATGAGGAAA
Mm-I382M-RNA-S	TAGCCCCGAGACCAT
Mm-I382MRNA-Rbinew	TGACACCAGGCAAGTCCA
Mouse Genotyping	
LoxP-intern	CGAATTCGGCTTATAACTTCG
Intr14 neu rv	AGCTTAGATCCCATTGTGTA
Ex1Fneu	GAGCCAAGAAGAGGAGCACT
Ex1R	GTCAGTCACCTGCACATTCG
Whole transcript long distance	
MmOPA1cDNAupSyn	CCTGCTTGGACTGGCTACAT
MmOPA1cDNAupF	TATGCCCTTGTTGCTGAGGG
OPA1cDPrePyrouR	TGTAACAATACTGCGCTCAGC
MmOPA1cDNAloSyn	CCAGGGCTCTTCTGCTCAA
MmOPA1cDPrePyroIF	ACTCTCAGTGAAGGCCCTCA
MmOPA1cDNAloR	AGTGCCTGGAACACACGTAC
MmOPA1cDNA5'seq	TGAAGCTTGAAGGCAGGATG
MmOPA1cDNA3'seq	CGAGTTCAGCTGGCAGAAGA

Primers for amplification of the murine *Opa1* exons and for creation of the BAC construct are available upon request.

Extraction of total RNA and protein from murine tissue

a) RNA extraction

Harvested tissue samples were kept in RNAlater (QIAGEN, Hilden, Germany) overnight and then stored at -80°C. The following amounts of tissue were used for RNA-extraction:

Tissue	Amount
Retinae	Both retinae
CNS	40-50 mg
Liver	20 mg
Kidney	30 mg
Heart	30 mg
Duodenum	20 mg
Fat	40-50 mg
Skeletal muscle	40-50 mg
Spinal cord	5 mg
Tail tip	10 mg

The tissue samples were added to Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA) and homogenized with 400 µl of RNA lysis Buffer T (PepLab, Erlangen, Germany) using the *Precellys 24* high-throughput homogenizer (Bertin Technologies, Rockville, Washington D.C., USA). The samples were repeatedly grinded for 20 s at 5500 rpm with intermittent chilling on ice for 1 min. Grinding/chilling cycles were repeated until no obvious tissue clumps remained (typically 2-3 times). Hard-to-lyse tissues like tail tip, skeletal muscle and CNS were complemented with a 1/4" *Ceramic Sphere* (MP Biomedicals) during grinding. Following homogenization, the Lysates were centrifuged within the Lysing Matrix D tubes at 5000 G for 2 min, transferred to a DNA removing column of the *PeqGOLD Total RNA Kit* (PepLab) and further processed according to the manufacturer's protocol.

b) Protein extraction

for Western blot:

The tissue samples (max. 100 mg) were added to Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals) and homogenized with modified RIPA buffer pH 7.4 (50mM Tris Base, 150mM NaCl, 10mM NaPP, 1mM EDTA, 1% Triton), supplemented with 1 mM DTT and 1% Protease Inhibitor Cocktail Set III (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) before start. Samples were grinded as for RNA extraction. Following homogenization, the Lysates within the Lysing Matrix D tubes were centrifuged for 2min at 5000 G and 4°C. Lysates were transferred to a new microcentrifuge tube and centrifuged for 20 min at 9500 G and 4 °C. Supernatants were transferred to new microcentrifuge tubes and stored at -20 °C.

for Mass spectrometry:

Murine brain tissue was homogenized using the *Precellys* homogenizer. Tissue cubes were transferred into 2 mL *Precellys* homogenization tubes containing ceramic beads (ceramic 1.4 mm, Bertin Technologies) and 10 µl per mg tissue lysis buffer containing 10 % Glycerol , 1 % Nonidet P40 (NP40) (Roche, Freiburg, Germany), 150 mM NaCl, protease inhibitor mixture (Roche) and phosphate inhibitor cocktails II and III (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in TBS (30 mM Tris-HCl, pH 7.4) was added. Homogenization was performed at -20 °C for 3 times at 5500 rpm for 20 s with 30 s break in between followed by 2 times at 6500 rpm for 20 seconds with 5 seconds break. Homogenized suspension was incubated on ice for 20 min. To separate the clear lysate from cell debris centrifugation was performed at 15000 G for 15 min at 4 °C. Protein concentration was calculated using the Bradford method (BioRad, Hercules, CA, USA).

Mass spectrometry

Sample Preparation for MS

100 µg protein per sample was precipitated using methanol and chloroform [1] prior to an enzymatic in-solution cleavage of proteins using trypsin as described elsewhere [2]. The resulting peptide mix was desalted using StageTips (ProxeonThermo Scientific, Dreieich, Germany) as described previously [3].

Mass Spectrometric Analysis

Liquid chromatography for MS analysis

All peptide separations were performed on a NanoRSLC3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany) coupled to a QExactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer nano LC-ESI-MS/MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). After automatic injection tryptic peptides were loaded on a μ -Precolumn (300 μ m i.d. x 5 mm, C18 PepMap 100, 5 μ m, 100 Å; Dionex) with a flow rate of 30 μ L/min in 100 % buffer A (2 % acetonitrile, 0.1 % formic acid in HPLC-grade water). Peptides were eluted after 3 min and separated on a PepMap RSLC C18 analytical column (75 μ m i.d. x 25 cm, 2 μ m, 100 Å; Dionex) by a linear gradient from 2 % up to 30 % of buffer B (80 % acetonitrile and 0.08 % formic acid in HPLC-grade water) in 82 min at a flow rate of 0.3 μ L/min followed by a short gradient from 30 % to 95 % buffer B in 5 min to elute remaining peptides.

Data-dependent shotgun analysis

Eluted peptides were analyzed using a QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer recording a full scan followed by data dependent MS2 scans. For the full scan a mass range of 335 – 1500 m/z and resolution of 70,000 was chosen and the ten most intense peptide ions were selected for fragmentation using high-energy collision dissociation (HCD) with a predefined energy value of 26. Resulting fragment ions were detected and analyzed in the Orbitrap at a resolution of 17,500. For mass correction lock mass option was activated as described previously [4] with a lock mass of 445.12003. Dynamic exclusion of fragmented ions was set to 20 s. AGC target was set to 1×10^5 , with a maximum ion fill time of 200 ms and an isolation width of ± 2 Th.

For the quantification of OPA1 using targeted mass spectrometry an inclusion list of proteotypic peptides was generated from resulting raw data using Mascot Daemon (Matrix Science, London, UK) and the Scaffold software (Proteome Software Inc., Portland, USA) in combination with Basic Local Alignment Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) and Skyline 2.5/2.6 [5].

PRM

Parallel Reaction Monitoring was performed using a Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Selected precursor ions were fragmented and analyzed with a resolution of 17,500. AGC target was set to 2×10^5 with a maximum fill time of 250 ms and an isolation width of ± 2 Th. For higher energy collisional dissociation (HCD) normalized collision energy was set to 26. Data were acquired in profile mode. Peptides were analyzed in a scheduled manner using a time window of ± 5 minutes

Protein	Sequence	Mass [m/z]	CS [z]	Polarity	Start [min]	End [min]	(N)CE	Σ 1_BAC D XIII 20	Σ 1_BAC D control	Σ 1_BAC G α XIII 49	Σ 1_BAC G α control
OPA1	ALPSSDELASLAPDLK	871.44636	2	Positive	60.6	70.6	26	71776783	152229391	78501182	157649764
OPA1	AYMQNPNAILLC[+57.0]IQDGSVDAER	826.72991	3	Positive	40.7	50.7	26	37231376	155852984	36922861	155224145
OPA1	EGC[+57.0]TVSPETSLNVK	817.40872	2	Positive	44.4	54.4	26	97902239	465025023	86201241	472812409
OPA1	EVLEDFAEDEK	460.87703	3	Positive	45.2	55.2	26	10926794	44751009	11059330	40618335
OPA1	TPFQQFSSLHLSLHK	624.33185	3	Positive	51.6	61.6	26	17296966	102980943	25371708	89589836
OPA1	VNDEHPAYLASDEITTVR	677.33236	3	Positive	38.6	48.6	26	212168060	763463157	214221550	687666828
OPA1 _{382M}	EGC[+57.0]TVSPETSLNVK	826.38693	2	Positive	0	120	26	30659103	155002162	24935418	146434146
ACTB	AGFAGDDAPR	488.72778	2	Positive	20.3	30.3	26	3485582266	31155653148	4825697456	27191142396
ACTB	AVFPSVGRPR	599.85639	2	Positive	34.8	44.8	26	1211334651	8134990020	813969126	6109497270
ACTB	EITALAPSTMK	581.31283	2	Positive	35.1	45.1	26	5004392349	34801903040	8636011680	30772697947
ACTB	GYSFTTTAER	566.7671	2	Positive	27.8	37.8	26	4900752385	35869950461	7177039408	35575414952
ACTB	QEYDESGPVSVHR	506.23907	3	Positive	24.7	34.7	26	2641089530	20993239324	4575047936	18874462769

Protein	Sequence	Mass [m/z]	CS [z]	Polarity	Start [min]	End [min]	(N)CE
OPA1	EVLEDFAEDEGEK	460.87703	3	Positive	45.2	55.2	26
OPA1	TPFQQFSSLTHLSLHK	624.33185	3	Positive	51.6	61.6	26
OPA1	VNDEHPAYLASDEITTVR	677.33236	3	Positive	38.6	48.6	26
OPA1	EGC[+57.0]TVSPETISLNVK	817.40872	2	Positive	44.4	54.4	26
OPA1	AYMQNPNAIILC[+57.0]IQDGSVDAER	826.72991	3	Positive	40.7	50.7	26
OPA1	ALPSSDLASLAPDLDK	871.44636	2	Positive	60.6	70.6	26
OPA1 _{1382M}	EGC[+57.0]TVSPETMSLNVK	826.38693	2	Positive	0	120	26
ACTB	AGFAGDDAPR	488.72778	2	Positive	20.3	30.3	26
ACTB	QEYDESGPSIVHR	506.23907	3	Positive	24.7	34.7	26
ACTB	GYSFTTTAER	566.7671	2	Positive	27.8	37.8	26
ACTB	EITALAPSTMK	581.31283	2	Positive	35.1	45.1	26
ACTB	AVFPSIVGRPR_	599.85639	2	Positive	34.8	44.8	26

Data analysis

To determine the abundances of WT and mutated OPA1 protein, the relative amount of the non-mutated peptide EGCTVSPETISLNVK as well as the amount of total OPA1 protein was quantified across all samples. By subtracting the fraction of non-mutated peptide EGCTVSPETISLNVK from total OPA1, the relative abundance of the mutated peptide and thereby mutated OPA1 was determined. For quantifying the total OPA1 abundance, the five most intense fragment ions of five proteotypic peptides of wildtype OPA1 were used. For the peptide, spanning the mutation site, the five most intense fragment ions were used for quantification. For the line *Opa1*-BAC-D(1), three mice and for the line *Opa1*-BAC-Gα(1) five mice were used and the samples were analyzed in technical triplicates. The abundancies were determined for each mouse separately. Five mice of -BAC-D and -BAC-Gα lines which did not carry the mutated allele were used as negative controls. Normalization was performed using the five most intense fragment ions of five proteotypic peptides of β-ACTIN.

$$mOPA1_{total} = \frac{\sum I(OPA1_{Mutant})}{\sum I(OPA1_{Control})}$$

$$mEGCTVSPETISLNVK = \frac{\sum I(EGCTVSPETISLNVK_{Mutant})}{\sum I(EGCTVSPETISLNVK_{Control})}$$

$$mOPA1_{wildtype} = \frac{mEGCTVSPETISLNVK}{mOPA1_{total}}$$

Phenotypic characterization of OPA1 overexpression mice, using a modified SHIRPA test

This modified SHIRPA-test refers to the originally described method by Rogers and co-workers [6]. All features were recorded on video and independently scored by two scientists (I.G.M. , T.B.). The scientists were blinded for the genotype status of the mice.

Viewing Jar (Assessment of morphology and habitus)

Mice were placed in a standard 2000 ml beaker and inspected for the following features during 2 min:

Feature	scoring
Movement	0 = inactive 1 = active 0 = hyperactive
Tremor	1 = not observed 0 = observed
Eye lid closure	1 = eyes open 0 = eyes closed
Whiskers	1 = present 0 = absent
General appearance of fur	1 = well-groomed 0 = irregular
Tear fluid secretion	1 = no 0 = yes
Urination / defecation	1 = present 0 = absent

Arena (Assessment of activity, anxiety, apraxia)

Following the viewing jar, the mice were transferred into a transparent Box (30x30x30cm) without lid. Bottom segmented in nine fields.

Feature	Scoring
Reaction towards change of setting	0 = prolonged freezing (>5 s) 1 = short freezing, followed by movement 2 = immediate movement
Movement	Sum of all fields the animal touches with all 4 limbs within 30 s
Gait	1 = continuous movement, pelvis raised ~3 mm 0 = discontinuous movement
Lifting of tail	0 = Tail lugging 1 = Tail horizontally extended 0 = Tail vertically extended
Contact avoidance	(upon touching neck with cotton swab) 0 = no reaction 1 = reaction upon contact 2 = flight ahead of contact
Auricle reflex	1 = present 0 = absent
Cornea reflex	1 = present 0 = absent
Kyphosis	3 = Animal straightens spine while moving 2 = mild kyphosis but able to straighten 1 = mild kyphosis, unable to straighten 0 = pronounced kyphosis while walking & sitting

Above Arena (Assessment of paw color, autonomous reactions, avoidance behavior, aggressivity)

Mice lifted at tail above arena for max. 30 s

Feature	Scoring
Skin color of paw sole	0 = pale 1 = rosy 0 = purple / dark red
Ventral twisting	1 = absent 0 = present
Biting	1 = absent 0 = present
Vocal expression	1 = absent 0 = present
Aggressivity	1 = absent 0 = present
Hindlimb claspig	3 = hindlimbs sprayed out, away from abdomen 2 = one hindlimb retracted for >50 % of time suspended 1 = Both hindlimbs partially retracted for >50 % of time 0 = Both hindlimbs completely retracted for >50 % of time

Negative Geotaxis (Assessment of vestibular function, anxiety, motor coordination)

Mice placed at lower edge of a 45° tilted grid, facing across cliff, duration: 30 s

Feature	Scoring
Negative geotaxis	4 = change of direction, climbing upwards 3 = change of direction, freezing 2 = able to move but not changing direction 1 = unable/willing to move during observation time 0 = falling off of grid

Horizontal bars 2 mm / 4 mm / 6 mm (strength of forelimbs, endurance)

mice placed with forelimbs at metallic horizontal bars of different diameters for max. 30 s

Feature	Scoring
Horizontal Bars	4 = enduring more than 30 s or reaching side support 3 = 21-30 s 2 = 11-20 s 1 = 6-10 s 0 = 1-5 s

Ledge Test (balance)

Mice placed on edge of standard cage, observation for 2 min

Feature	Scoring
Ledge Test	3 = walks properly and returns to cage easily 2 = loses footing while walking, but otherwise appears coordinated

	<p>1 = unable/willing to use hindlimbs or lands on head 0 = (nearly) falls off the cage while walking/returning or shakes and refuses to move at all despite encouragement.</p>
--	--

Static Rods, diameters: 35 mm, 26 mm, 22 mm, 18 mm, 13 mm, 9 mm (balance, coordination)

Wooden rods of different diameters are fixed in a crane-like horizontal position with a “safe”, supported upper base and a free crane arm. Mice are placed at the end of the crane arm, facing across cliff. Observation for 2 min.

Feature	Scoring
Static rods	<p>4 = turns around and walks to supported end 3 = turns around without crossing the rod 2 = does not turn around but maintains position 1 = suspends from rod and drops or turns upside down 0 = falls immediately without attempt to grip rod</p>

Clicking test (auditory reflexes)

A ball-point pen is clicked repeatedly ~40 cm above cage with tested mouse. Reflexes are recorded.

Feature	Scoring
Startle response (Click-box)	<p>0 = none 1 = Preyer-Reflex 2 = Preyer-Reflex + additional responses</p>

Rotarod test (Accelerod) (endurance, agility)

Mice are placed on a rotating rod of 6 cm diameter on three consecutive days. Day 1: Training round for 5 min at constant speed of 4 rpm. Day 2: Fast round: constant acceleration of 1.48 m/min². Day 3: Slow round: constant acceleration of 1.06 m/min².

Feature	Scoring
Endurance	Persistence on rotating rod [s]

References

1. Wessel D, Flugge UI: **A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.** *Analytical biochemistry* 1984, **138**(1):141-143.
2. Gloeckner CJ, Boldt K, Ueffing M: **Strep/FLAG tandem affinity purification (SF-TAP) to study protein interactions.** *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* 2009, **Chapter 19**:Unit19 20.
3. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M: **Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics.** *Analytical chemistry* 2003, **75**(3):663-670.
4. Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M: **Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap.** *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2005, **4**(12):2010-2021.
5. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ: **Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments.** *Bioinformatics* 2010, **26**(7):966-968.
6. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE: **Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment.** *Mamm Genome* 1997, **8**(10):711-713.

IX.5 Methodisches Addendum zu Abschnitt III.5

CRISPR/Cas9-Konstrukte

Die verwendeten CRISPR/Cas9-Plasmide wurden entsprechend der Methode von Ran et al 2013 generiert. Dabei wurden zunächst Primerduplexe durch Hybridisierung einzelsträngiger, synthetischer Oligonukleotide erzeugt und diese anschließend mittels Golden-Gate Klonierung in den jeweiligen Vektor eingebracht. Bei den verwendeten Plasmiden handelte es sich um pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene Plasmid #62988) und pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene Plasmid #48138).

Minigene-Konstrukte

Unter Verwendung der Primer CRISPR-MINI-fw (5'-TATATAGCGGCCGCTGGCTTTTAGTGAGGGGAAA-3') und CRISPR-MINI-rv (5'-TATATAGGATCCAAGTCCGCTTGCCTTGTCTA-3') wurde ein 1740 bp großer Abschnitt des humanen OPA1-Gens (von c.557-279T stromaufwärts von Exon 4b bis c.678+308T stromabwärts von Exon 5) aus genomischer DNA von Fibroblasten des Indexpatienten von Familie OAK 302 amplifiziert und via Restriktionsverdau/Ligation direktional in die NotI/BamHI-Schnittstellen des Minigene-Vektor pSPL3 (Invitrogen @ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kloniert. Da der Patient aus Familie OAK 302 heterozygot für die Deep Intronic-Mutation war, konnten dabei sowohl Wildtyp-Allele als auch mutante Allele kloniert werden.

Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000 gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen @ Thermo Fisher Scientific) transfiziert. Dabei erfolgte die Transfektion in Standard 6-Well-Platten für Zellkultur unter Einsatz von insgesamt 10 µg Plasmid-DNA bei einem molaren Verhältnis von CRISPR-Konstrukt zu Minigene-Konstrukt von 3:1. Für die Dauer der Transfektion wurden die HEK293-Zellen in DMEM-Medium (Gibco @ Thermo Fisher Scientific) mit 10 % FCS (Invitrogen @ Thermo Fisher Scientific) ohne Antibiotika/Antimykotika gehalten. Die Transfektion erfolgte über Nacht. Am Folgetag wurden die Zellen trypsinisiert und auf eine 6-cm-Schale transferiert. Es folgte eine Kultivierung der transfizierten Zellen in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 1 % Amphotericin B (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 48 h bei 30 °C und 5 % CO₂ (siehe Doyon et al 2010). Anschließend wurden die Zellen geerntet und DNA sowie RNA isoliert (Isolate II RNA/DNA/Protein Kit, Bioline, London, UK).

cDNA-Analyse gespleißter Transkripte des OPA1-Minigenes

Die aus den transfizierten HEK293-Zellen isolierte RNA wurde unter Verwendung des Primers ET-SA2 (5'-GCTCACAAATACCACTGAGAT-3'; bindet an Sequenzen des 3'Tat Exons des pSPL3-Vektorrückgrats) revers transkribiert (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche, Basel, Schweiz) und anschließend in einer PCR Reaktion mit den Primern ET-SA2 (s.o.) und OPA1-Ex4b-intern-F (5'-TCACAAATTGGTTAGTGAAGTCAT-3'; bindet innerhalb von Exon 4b) amplifiziert. Prozessierte Minigene-Transkripte, die das kryptische Exon enthalten, liefern dabei ein Amplikon von 360 bp Länge, während prozessierte Transkripte ohne kryptisches Exon ein 267 bp langes PCR-Fragment liefern.

Elektroporation von primären Fibroblasten und Fluoreszenz-aktiviertes Cell Sorting (FACS)

Patientenfibroblasten (ca. 600.000 Zellen) wurden mit Hilfe des Nucleofector 2b Instruments (Lonza, Basel, Schweiz) nach Vorgaben des Herstellers mit dem Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) transfiziert (Programm: P-22). Nach zweitägiger Inkubation wurden die GFP-exprimierenden Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie auf einem FACS ARIA IIu -Gerät (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) von den GFP-negativen Zellen getrennt. Dabei wurde über die Gerätesoftware DIVA der „purity“ Modus ausgewählt, um eine hohe Reinheit der final selektierten GFP-positiven Zellen zu erzielen. Die Fluoreszenz-Charakteristika der initialen Zellsuspension wurde in einem Vorlauf mit einem Bruchteil der Probe bestimmt und dadurch die Subpopulation lebender GFP-exprimierender Zellen für den Hauptlauf manuell definiert. Das cell sorting erfolgte in der Flow Cytometry Core Facility (FCF) der Abteilung Innere Medizin II am Universitätsklinikum Tübingen.