

Mitochondriale Zytopathien

*Aufarbeitung der unterschiedlichen Pathogenese ausgewählter
mitochondrialer Zytopathien anhand von zwei Fallbeispielen*

Christian Haverkamp

Mitochondriale Zytopathien

Aufarbeitung der unterschiedlichen Pathogenese ausgewählter
mitochondrialer Zytopathien anhand von zwei Fallbeispielen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Lars Christian Arndt Simon Haverkamp

aus

Duisburg

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Gerhard Buse

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. J. Michael Schröder

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	4
1.1 Mitochondrien.....	4
1.1.1 Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS).....	4
1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies.....	5
1.1.3 Apoptose.....	5
1.2 Aufbau und Organisation der mitochondrialen DNA (mtDNA).....	6
1.3 Primäre Mitochondriopathien.....	8
1.3.1 Punktmutationen der mtDNA.....	8
1.3.2 Deletionen der mtDNA.....	11
1.4 Sekundäre Mitochondriopathien.....	11
1.5 Primäre Kardiomyopathie.....	12
1.5.1 Nukleäre Gendefekte.....	12
1.5.2 mitochondriale Gendefekte.....	15
2 Ziel der Arbeit.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Herkunft der Gewebeprobe.....	20
3.1.1 Kontrollen.....	20
3.1.2 Patient p1/p2.....	20
3.1.3 Patient p3	21
3.1.4 Patient p4.....	21
3.2 Präparation mitochondrialer DNA.....	25
3.2.1 Isolierung von mtDNA aus Blut.....	25
3.2.2 Isolierung von mtDNA aus Muskelgewebe.....	26
3.2.3 Organische Lyse.....	27
3.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion.....	27
3.3 Gelelektrophorese.....	27

3.3.1	Agarosegelelektrophorese.....	27
3.3.2	Acrylamidgelelektrophorese.....	28
3.4	PCR.....	30
3.4.1	Konventionelle PCR.....	30
3.4.2	„Long-distance“-PCR (LPCR).....	32
3.5	Sequenzierung.....	33
3.5.1	Aufreinigung der DNA.....	34
3.5.2	Sequenzierungsreaktion.....	34
3.5.3	Vorbereitung der Proben für die automatische Messung.....	34
3.5.4	Auswertung der Messung.....	35
3.6	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP).....	35
3.6.1	MERRF: Ban-II A8344G.....	35
3.6.2	MELAS: Apa-1 A3243G.....	35
3.6.3	LEIGH: Msp-I T8993C/G.....	36
3.6.4	LHON: SfaN-I 11778A/Mae-III 11778A.....	36
3.7	Lösungen und Puffer.....	37
4	Ergebnisse.....	40
4.1	LHON.....	40
4.1.1	Präparation.....	40
4.1.2	PCR.....	40
4.1.3	Restriktionsanalyse.....	40
4.2	Kardiomyopathien.....	42
4.2.1	Mikromuskel-Präparation.....	42
4.2.2	Präparation.....	43
4.2.3	LPCR Deletionsscreening.....	43
4.2.4	Sequenzierung.....	45
5	Diskussion.....	47
5.1	LHON.....	47

5.1.1 Pathogenese.....	47
5.1.2 Zytostatika Therapie.....	51
5.1.3 Literatur und abschließende Bewertung.....	54
5.2 Kardiomyopathie.....	56
5.2.1 Intergenomische Kommunikation.....	56
5.2.2 Bedeutung der gefundenen Veränderungen.....	65
5.2.3 Zusammenfassung.....	67
6 Verzeichnisse.....	69
6.1 Tabellenverzeichnis.....	69
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	69
6.3 Abkürzungsverzeichnis.....	70
6.4 Literaturverzeichnis.....	73

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind ca. 2 μm große Zellorganellen. Die Form ist vom Zelltyp abhängig und stark variabel. Jedes Mitochondrium ist von zwei Membranen umgeben. Die innere Membran umschließt die Matrix. Dort befinden sich Enzyme für den Zitratzyklus, für die β -Oxidation der Fettsäuren und das mitochondriale Genom mit den zugehörigen tRNAs und Ribosomen. Die innere Membran selbst enthält die Enzyme der Atmungskette, die ATP-Synthase (Adenosintriphosphat) und Carrier für Metaboliten. Durch zahlreiche Einfaltungen – sogenannte Cristae – ist die Oberfläche stark erhöht, sodass ca. 67 % der mitochondrialen Proteine darin zu finden sind. Ein hoher Anteil an Cardiolipin erhöht die elektrische Isolation, die zum Aufbau des elektrochemischen Gradienten gebraucht wird. Der Intermembranraum ist mit dem Zytosol für Moleküle, die kleiner als 5000 Dalton sind, äquivalent, da die äußere Membran Transportproteine enthält, die Wasserkanäle (Porine) durch die Membran bilden.

Die gesamte Zellatmung findet in den Mitochondrien statt. Die energiereichen Substrate, Pyruvat und Fettsäuren, werden über Acetyl-CoA in den Zitratzyklus eingebracht. Die bei deren Oxidation anfallenden Elektronen werden auf NAD^+ und FAD übertragen. Die Atmungskette nutzt diese Elektronen zur Reduktion von Sauerstoff unter Bildung von Wasser. Die entstehende Energie wird in einem elektrochemischen Gradienten gespeichert und von der ATP-Synthase für die Bereitstellung von ATP genutzt.

Drei Faktoren sind für die Pathophysiologie mitochondrialer Erkrankungen relevant:

- Durch die oxidative Phosphorylierung sind Mitochondrien die größten Energielieferanten der Zelle.
- Mitochondrien sind die größten Produzenten von reaktiven Sauerstoffspezies.
- Mitochondrien sind eine der zentralen Entscheidungsstellen für die Apoptose.

1.1.1 Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)

Die Atmungskette besteht aus fünf Enzymkomplexen, der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase oder auch NADH-Dehydrogenase (Komplex I), der Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase oder

1.1 Mitochondrien

auch Succinatdehydrogenase (Komplex II, aber auch Teil des Zitratzyklus), der Ubichinon:Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III), der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und der ATP-Synthase (Komplex V). Als Elektronen-Shuttle fungieren Ubichinon und Cytochrom-c. Die stark exergone Reaktion $4 e^- + 4 H^+ + O_2 \rightarrow 2 H_2O$ wird dazu in drei Teilreaktionen zerlegt. Die dabei frei werdende Energie wird von den Komplexen I, III und IV dazu genutzt, Protonen in den intermembranösen Raum zu pumpen. Der so entstehende elektrochemische Gradient ist die Energiequelle für den Komplex V, der ATP-Synthase. Der Transport eines Protons in die Mitochondrien-Matrix bei einem elektrochemischen Gradienten von 200 mV setzt etwa 19,3 kJ/mol frei. Die aus dem Intermembran- in den Matrixraum zurückfließenden Protonen betreiben nun das Rotorfragment des Biomotors ATP-Synthase, welches aus ADP und P_i ATP synthetisiert. Diesen Mechanismus, die Nutzung eines elektrochemischen Gradienten über einer Membran für eine energieabhängige Reaktion wie die ATP-Synthese, nennt man chemiosmotische Kopplung.¹

1.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Bei der OXPHOS fallen reaktive Sauerstoffspezies auch bei intakter Atmungskette als Abfallprodukt an. Ist die Atmungskette aber inhibiert, akkumuliert sich Ubisemichinon. Dieses ist in der Lage, Elektronen direkt an molekularen Sauerstoff abzugeben. Dadurch entsteht O_2^- , das von der Mangansuperoxiddismutase in H_2O_2 überführt wird. H_2O_2 kann mit der Glutathionperoxidase 1 zu Wasser entgiftet werden. Ist dieser Weg überlastet, entsteht in der Fentonreaktion $OH\cdot$. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führen in den Mitochondrien zunächst zu einer Inaktivierung der Eisen-Schwefel-Zentren von Komplex I, II und III, längerfristig werden alle Biomoleküle (Proteine, Fette und Nukleinsäuren) geschädigt.

1.1.3 Apoptose

Mitochondrien enthalten im Intermembranraum verschiedene Faktoren, die die Apoptose in Gang bringen, wie Cytochrom-c, den *apoptosis initiating factor* (AIF), Prokaspase 2, 3 und 9 und *caspase activated DNase* (CAD). Ins Zytosol freigesetzt aktiviert Cytochrom-c den Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1). Dieser aktiviert wiederum die Prokaspasen -9 und -2 zu den Kaspasen -9 und -2, die ihrerseits Kaspase-3, -6 und -7 aktivieren. Der AIF bindet an seine Zielsequenz im Kern und initiiert die

1.1 Mitochondrien

Chromatinkondensation und den Chromatinabau, an dem auch die CAD beteiligt ist.

Ein Öffnen der *mitochondrial permeability transition pore* (mtPTP) scheint zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten, zur Schwellung der inneren und zur Ruptur der äußeren Membran zu führen. Die mtPTP scheint sich aus dem Andenosin-Nukleotid-Translokator (ANT), Porin und weiteren Faktoren wie Bax (*BCL2-associated X protein*), Bcl2 (*b-cell leukemia/lymphoma 2*), Cyclophilin D und dem Benzodiazepin-Rezeptor zusammensetzen. Das Öffnen wird wahrscheinlich durch erhöhte Exposition mit ROS, einen Abfall von $\Delta\Psi$ oder eine exzessive Calciumaufnahme verursacht.²⁻⁹

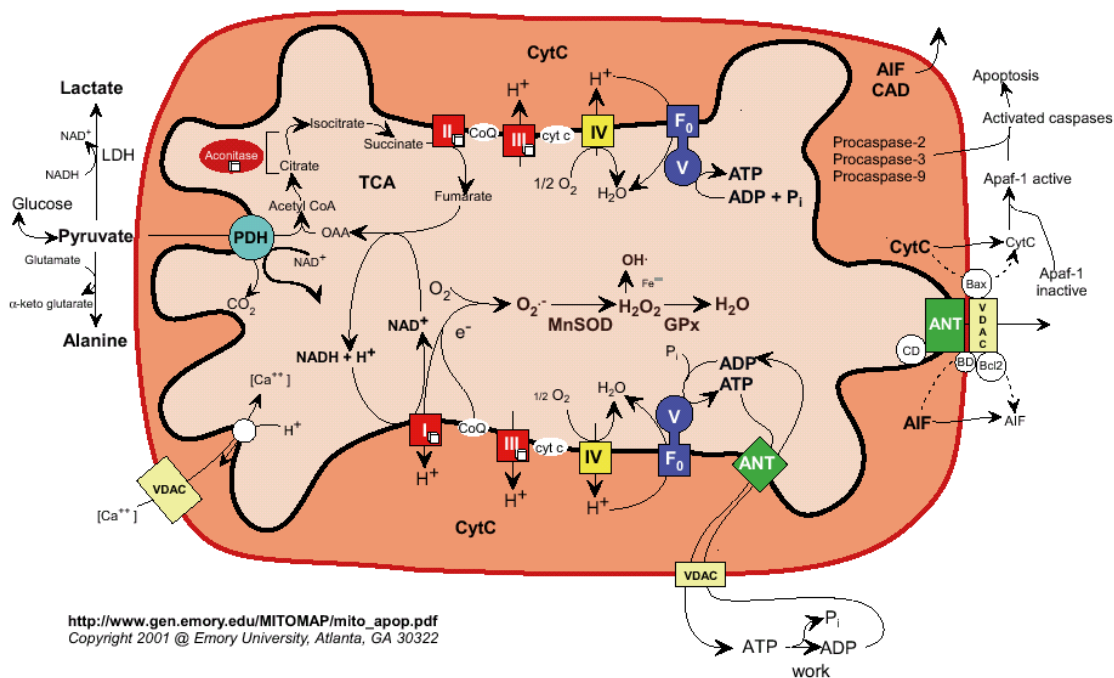


Abbildung 1: Wichtige Stoffwechselwege im Mitochondrium

1.2 Aufbau und Organisation der mitochondrialen DNA (mtDNA)

Mitochondrien stehen unter der Kontrolle von zwei Genomen. Der Hauptteil der mitochondrialen Struktur- und Funktionsproteine wird vom Kern codiert, im Zytosol translatiert und über eine Erkennungssequenz in das Mitochondrium transportiert. 13 Proteinuntereinheiten, 22 tRNAs und 2 rRNAs werden aber von einem mitochondrieneigenen Genom codiert. Die Proteine sind ausschließlich Bestandteil der Atmungskette: Cytochrom-b, die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom-c-Oxidase, die

1.2 Aufbau und Organisation der mitochondrialen DNA (mtDNA)

Untereinheiten 6 und 8 der ATP-Synthase und die Untereinheiten 1, 2, 3, 4L, 4, 5 und 6 der NADH-Dehydrogenase.

Das mitochondriale Genom ist ein ringförmiges, 16569 bp langes DNA-Molekül. Die Information ist sehr dicht gepackt, es gibt keine Introns. Die Replikation erfolgt asymmetrisch, d. h., die mtDNA liegt dabei in einem langen Bereich als Einzelstrang vor. Dies, wie auch das Fehlen von Histonen und Reparaturenzymen, macht das Genom anfällig für Mutationen. Es weist im Vergleich zu Genbereichen vergleichbarer Funktion im Kern eine ca. 10- bis 17-fach erhöhte Mutationsrate auf.

Die Vererbung der mtDNA erfolgt rein maternal, die Mitochondrien des Embryos stammen nur aus der weiblichen Eizelle. Bei der Zellteilung werden die Mitochondrien zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Durch Teilung der Mitochondrien und Replikation der mtDNA passt sich deren Anzahl und DNA-Gehalt dem Bedarf der Zelle an.

Punktmutationen der mtDNA in den Oozyten oder Mutationsereignisse in somatischen Zellen führen durch die hohe Kopiezahl der mtDNA zu einem Nebeneinander von Mutation und Wildtyp, der sogenannten Heteroplasmie. So sind etwa 10 Kopien in einem Mitochondrium und etwa 10000 Kopien in einer Leberzelle (mit ca. 1000 Mitochondrien) enthalten. Erst wenn der Mutationsload in einem Gewebe einen spezifischen Schwellenwert überschreitet, kommt es zum Auftreten einer Erkrankung. Dieser Schwellenwert ist abhängig vom Sauerstoffverbrauch des Gewebes und von der Mutation. Eine Ansammlung von Altersdeletionen im Laufe der Jahre ist physiologisch und wird als eine Ursache des Alterns angesehen. Auch Ischämie, verschiedene Gifte und Mutationen nukleärer DNA führen sekundär, wahrscheinlich über ROS, zu Mutationen der mtDNA.

1.2 Aufbau und Organisation der mitochondrialen DNA (mtDNA)

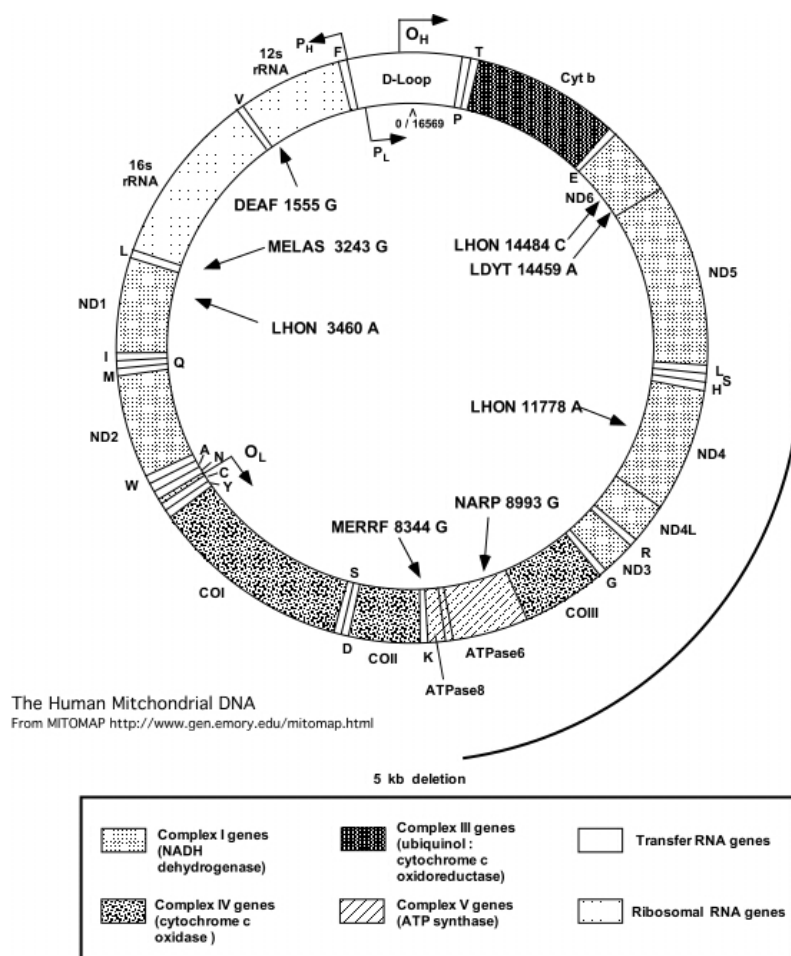


Abbildung 2: Mitochondriales Genom und charakteristische Mutationen

1.3 Primäre Mitochondropathien

1.3.1 Punktmutationen der mtDNA

1.3.1.1 Lebers Hereditäre Optische Neuropathie (LHON)

LHON führt akut bis subakut über einen zentralen Gesichtsfeldausfall zur Erblindung. Es sind vor allem Männer im mittleren Lebensabschnitt betroffen. Zurzeit sind 18 Mutationen der mitochondrialen DNA bekannt, die alleine oder in Kombination die Erkrankung verursachen.

1.3.1.1.1 Klinik

Die Symptomatik beginnt in der Regel im mittleren Lebensabschnitt mit einem akuten bis subakuten schmerzlosen, zentralen Gesichtsfeldausfall. Fundoskopisch können eine

1.3 Primäre Mitochondropathien

peripapilläre Teleangiektasie, eine Mikroangiopathie und ein Pseudoödem der Papille zu sehen sein. Der Erkrankungsgipfel liegt bei 27-34 Jahren, es sind aber auch Fälle mit 1 oder 70 Jahren beschrieben. Es sind beide Augen betroffen, sie erblinden entweder gleichzeitig oder mit einem mittleren Abstand von 2 Monaten. Die Progredienz der Erkrankung variiert von plötzlicher, vollständiger Erblindung bis zu einer fortschreitenden Abnahme der Sehkraft über einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren. Der Mittelwert liegt bei 3,7 Monaten. Das Ausmaß des Visusverlustes ist unterschiedlich und korreliert mit der zugrundeliegenden Mutation. Es reicht von völligem Erblinden bis zu einer schemenhaften Wahrnehmung. Die Mutationen 11778 und 3460 haben deutlich schwerere Folgen und führen in 75 % der Fälle zu einer Sehschärfe kleiner 6/60 auf dem besseren Auge. Bei Patienten mit der Mutation 14484 zeigt sich eine so starke Minderung der Sehschärfe nur in 30 % der Fälle. Auch ist bei dieser Mutation eine Rückbildung der Symptomatik beschrieben worden.

Als Begleitsymptome können am Herzen Reizleitungsstörungen wie Präexzitationssyndrom, Wolf-Parkinson-White-Syndrom und verlängertes QT-Intervall auftreten; neurologisch kann es zu kleineren Störungen wie veränderten Reflexen, Ataxie und sensorischer Neuropathie kommen. Es wurde aber auch von Patienten berichtet, die schwerste neurologische Krankheitsbilder entwickelten.¹⁰⁻¹³

1.3.1.1.2 Genetik

Die heute bekannten Mutationen werden in primäre und sekundäre Mutationen eingeteilt. Unter primären Mutationen versteht man Mutationen, die alleine in der Lage sind, die Krankheit auszulösen. Sie sind nicht in einem gesunden Kontrollkollektiv zu finden.

Die Mutation *MTND4*LHON11778A*¹⁴ ist die zuerst beschriebene und auch am häufigsten vorkommende Mutation. Sie führt zum Austausch eines hoch konservierten Arginins mit Histidin in der Untereinheit 4 der NADH-Dehydrogenase. Zusammen mit *MTND1*LHON3460A* (mäßig konserviertes Alanin zu Threonin)^{15; 16} und *MTND6*LHON14484A* (schwach konserviertes Methionin zu Valin)¹⁷ macht sie ca. 97 % aller LHON-Fälle in Europa und Australasien aus.¹⁸ Die *MTND6*LDYT14459A*-Mutation führt zu einem LHON-ähnlichen Krankheitsbild mit Dystonie.^{19; 20}

Neben den primären Mutationen sind eine Reihe von sekundären Mutationen bekannt. Diese sollen in Kombination mit weiteren Mutationen die Erkrankung auslösen können. Der pathogenetische Wert dieser Mutationen ist aber umstritten. Fehlende Heteroplasmie, das

1.3 Primäre Mitochondropathien

Auftreten zusammen mit primären LHON-Mutationen und eine fehlende Veränderung des Phänotyps machen die Beurteilung schwierig.²¹⁻²⁴

Haplotyp-Analysen zeigen für die Mutation MTND1*LHON3460A keine Assoziation mit einem mitochondrialen Haplotyp. Die Mutationen 11778 und 14484 hingegen finden sich häufiger beim Haplotyp J.²⁵⁻²⁸

1.3.1.1.3 Biochemie

Die bis heute beschriebenen primären Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch in Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette.

Die Mutation 3460 führt zu einer Aktivitätsminderung von ca. 65 % in Komplex I. Bei klonaler Expansion von Fibroblasten mit einer Heteroplasmie für 3460 zeigten die zu 0 % mutanten Klone keine, die zu 100 % mutanten Klone eine 65%ige Aktivitätsminderung der NADH-Dehydrogenase. Bei Zellhybriden mit unterschiedlichem Kern war die Aktivitätsminderung variabel.^{16; 29-31}

Die Mutation 11778 zeigt bei spektrophotometrischen Messungen keine Aktivitätsminderung von Komplex I. Der Elektronentransport durch die Atmungskette ist dennoch beeinträchtigt. Dies führt zu der Vermutung, dass die Interaktion der einzelnen Komponenten gestört sein könnte.^{30; 32-34}

Bei der Mutation 14484 konnte in Fibroblasten keine, in Lymphozyten nur eine leichte Reduktion der Atmungskettenaktivität gemessen werden.^{35; 36}

Die beschriebenen Veränderungen lassen sich sowohl bei betroffenen als auch bei unbetroffenen Mutationsträgern finden.

1.3.1.2 Weitere Punktmutationen

Neben LHON sind eine Reihe von Punktmutationen beschrieben, die zum Teil sehr schwere Krankheitsbilder verursachen können. Auf Punktmutationen, die auch mit Kardiomyopathie assoziiert sind, wird weiter unten eingegangen.

1.3 Primäre Mitochondropathien

Erkrankung	Gendefekt
MELAS	tRNA ^{Leu(UUR)}
MERRF	tRNA ^{Lys}
Progressive Myoklonusepilepsie und Taubheit	tRNA ^{Ser}
Kearns-Sayre-Syndrom	Deletionen (mehrere Gene)
Pearson-Syndrom	Deletionen (mehrere Gene)
PEO	Verschiedene tRNAs, Deletionen
Myopathie mit „ragged red fibers“	Verschiedene tRNAs, Deletionen
Taubheit, syndromisch	tRNA ^{Ser(UCN)}
Aminoglykosid-induzierte Taubheit	12S rRNA
Maternaler Diabetes (mit Taubheit)	tRNA ^{Leu(UUR)}
LHON	Proteincodierende Gene
Leigh-Syndrom, maternal	ATPase6
NARP	ATPase6
Progressive Enzephalopathie	Verschiedene tRNAs

Tabelle 1: Übersicht über Krankheiten mit mtDNA-Mutationen

1.3.2 Deletionen der mtDNA

In Tabelle 1 findet sich eine Übersicht über die wichtigen primären mitochondrialen Erkrankungen. Auf die Erkrankungen, die mit Kardiomyopathie assoziiert sind, wird in Kapitel 1.5.2 eingegangen.

1.4 Sekundäre Mitochondropathien

Es ist auffällig, dass viele klinische Symptome mitochondrialer Erkrankungen wie Blindheit, Taubheit, Demenz, Bewegungsstörungen, Myopathie und Kardiomyopathie Symptome typischer Alterserkrankungen sind. Es verwundert daher nicht, dass in postmitotischen Geweben mit fortschreitendem Alter eine Zunahme somatischer mtDNA-Mutationen gefunden wird. Diese Veränderungen sind multiple Deletionen, aber auch eine Zunahme der sogenannten „common deletion“, einer 5 kb großen Deletion, wurde gefunden.³⁷⁻⁴⁰ Es wird daher davon ausgegangen, dass die Akkumulation von somatischen mtDNA-Deletionen die Energieproduktion der Zelle immer weiter einschränkt, bis ein Level erreicht ist, welcher

1.4 Sekundäre Mitochondropathien

nicht mehr kompensiert werden kann. Die Zelle stellt ihre Funktion ein und stirbt.

Bei dilatativer Kardiomyopathie, die durch Atherosklerose der Koronarien bedingt ist, führt die Sauerstoffminderversorgung durch kurzzeitige Ischämie bei Angina Pectoris zu einem immer wiederkehrenden Anstieg von ROS. Bei diesen Patienten findet sich ein 8- bis 2200-fach erhöhter Level der *common deletion*. Weiterhin kommt es zu einer Induktion nukleärer OXPHOS-Gene.³⁷ Multiple Deletionen scheinen somit ein Zeichen der Schädigung von Mitochondrien zu sein.

1.5 Primäre Kardiomyopathie

Primäre Kardiomyopathien sind Störungen des Herzmuskels aufgrund von Fehlern des Struktur-, Funktions- und Intermediärstoffwechsels, die keine Beziehung zu koronarer Herzkrankheit, Myokarditis oder Hypertonie haben. Es werden klinisch drei Typen von Kardiomyopathien unterschieden: hypertrophische, dilatative und restriktive Kardiomyopathie.

Die biochemische und genetische Klassifikation primärer Kardiomyopathien unterscheidet Fehler in den kontraktilen Proteinen und Strukturproteinen und Störungen im Energiestoffwechsel des Herzens.

Eine Verringerung des Energiestoffwechsels der Zelle kann zum einen durch einen Defekt der oxidativen Phosphorylierung und zum anderen durch einen Defekt der Fettsäureoxidation begründet sein. Die mitochondriale Kardiomyopathie kann sowohl alleine als auch als Teil einer Multisystemerkrankung auftreten. Diese mitochondrialen Störungen können auf nukleären oder mitochondrialen Gendefekten beruhen.

1.5.1 Nukleäre Gendefekte

1.5.1.1 Defekte mitochondriale Enzymsysteme

1.5.1.1.1 OXPHOS

Atmungskettendefekte sind bei vielen mitochondrialen Erkrankungen gefunden worden. Ein schwerer Defekt von Komplex I fand sich bei familiärer Kardiomyopathie mit Katarakt und Laktatazidose, eine autosomal rezessive Mutation einer der nukleären Untereinheiten von Komplex I wird angenommen. Die mtDNA des Herzens wies multiple Deletionen auf. In

1.5 Primäre Kardiomyopathie

Patienten-Fibroblasten führte diese schwere Komplex-I-Defizienz zu einer deutlichen Zunahme von Hydroxylradikalen.^{41; 42}

Ein Defekt von Komplex-II fand sich bei zwei Brüdern mit hypertrophischer Kardiomyopathie und mitochondrialer Myopathie.⁴³

Auch Patienten mit dem Leigh-Syndrom (LS), einer verheerenden Enzephalomyopathie bei Neugeborenen und Kleinkindern, können eine schwere Kardiomyopathie entwickeln. Das klinische Leigh-Syndrom wird von Defekten einer Reihe von Enzymen des Energiestoffwechsels verursacht wie dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex und dem Komplex I, II, IV und V der Atmungskette. Etwa 20 % der Fälle werden von einem Defekt der Cytochromoxidase verursacht.⁴⁴ Die Mehrzahl der Patienten weist Mutationen im *SURF-1*-Gen⁴⁵ auf. Dieses Protein scheint für den Einbau der Untereinheit II in den Untereinheit-I/IV-Subkomplex der Cytochromoxidase erforderlich zu sein.⁴⁶⁻⁴⁸ Das Leigh-Syndrom mit seinen vielfältigen genetischen Ursachen ist somit ein deutliches Beispiel für die Komplexität der Pathogenese mitochondrialer Erkrankungen.

1.5.1.1.2 Fettsäurestoffwechsel

Auf die Defekte des Fettsäurestoffwechsels als Ursache für Kardiomyopathie soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Es sind aber verschiedene Enzymdefekte bekannt.

1.5.1.2 Translokasen

Eine Reihe von Translokasen regelt den Austausch von Substanzen zwischen der Matrix und dem Intermembranraum.

Ein Defekt der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase führt bei Kindern oft zu einer Kardiomyopathie. Es konnte im Gen für den Carnitin-Acylcarnitin-Carrier bei einem betroffenen Kind eine Cytosin-Insertion gefunden werden, die zu einem Frameshift und zu einer Verlängerung des Open-Reading-Frames um 23 Kodons führt.⁴⁹

Ein Defekt des ANT ist bei einem Kind mit mitochondrialer Myopathie beschrieben worden. Es zeigte keine kardialen Symptome, obwohl ANT-Knockout-Mäuse nicht nur eine Myopathie, sondern auch eine hypertrophische Kardiomyopathie mit einer stark erhöhten Mitochondrienzahl zeigen.^{50; 51}

1.5.1.3 Protein-Import

Der Transport von kerncodierten Proteinen in das Mitochondrium ist genau geregelt. Diese Proteine haben N-Terminal ein Signalpeptid, das von Rezeptoren der äußeren Mitochondrienmembran erkannt wird. Ist dieses Signalpeptid fehlerhaft, findet der Transport nicht statt. Dies kommt meist dem Ausfall des Proteins gleich. Sind die allgemeinen Faktoren wie HSP 60, HSP 70 und die beteiligten Kanäle bzw. Rezeptoren defekt, ist dies eine so gravierende Störung, dass sie in der Regel nicht mit dem Leben vereinbar ist.

1.5.1.4 Intergenomisches Signaling

Die primäre Ursache für die Störung des Signaltransfers zwischen DNA und mtDNA liegt beim Kerngenom. Sie wird daher auch nach den Mendel'schen Regeln vererbt. Dieser Fehler der nukleären DNA (nDNA) führt aber entweder zu multiplen mtDNA-Deletionen oder zu einer Depletion der mtDNA. Daher kann es durchaus zu den gleichen biochemischen Ausfällen kommen. Auch das morphologische Bild kann dem einer primären Mitochondropathie gleichen. Die eigentliche Ursache ist somit unklar, es könnte sowohl der Proteinimport durch ein fehlerhaftes Signalpeptid wie auch die Funktion der mitochondrialen Proteinbiosynthese gestört sein.

Die autosomalen Formen der progressiven externen Ophthalmoplegie (PEO) weisen in den Mitochondrien multiple Deletionen der mtDNA auf. Während die dominante Form durch eine Schwäche der Skelettmuskulatur symptomatisch wird, ist die rezessive Form eine Multisystemerkrankung, bei der Fälle von schwerer Kardiomyopathie beschrieben worden sind.⁵²

Multiple Deletionen finden sich auch bei Kardiomyopathie ohne PEO. Es sind sowohl Fälle mit dilatativer als auch mit hypertropher Kardiomyopathie beschrieben. Bei einer Patientin und ihrem Sohn mit dilatativer Kardiomyopathie, die beide an Herzversagen verstorben waren, fand man im Herzmuskel multiple Deletionen. Sowohl ein autosomal dominanter als auch ein maternaler Erbgang sind aufgrund dieses Stammbaums möglich.⁵³

Auch bei einem sporadischen Fall von hypertropher Kardiomyopathie mit proximaler Muskelschwäche fand man multiple Deletionen, wenn auch nur im Skelettmuskel.⁵⁴

Depletionen der mtDNA treten bei Kardiomyopathien selten auf. Es wurde aber über einen Fall von hypertrophischer Kardiomyopathie berichtet, der eine deutlich erniedrigte Kopiezahl

1.5 Primäre Kardiomyopathie

an mtDNA aufwies.⁵⁵

1.5.2 mitochondriale Gendefekte

1.5.2.1 *Deletion/Duplikation*

Das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) ist eine Multisystemerkrankung, die durch früh einsetzende PEO, Retinopathie und mindestens eines der folgenden Symptome definiert wird: Kleinhirnsyndrom, Blockierungen der Herzreizleitung oder hoher Proteingehalt des Liquors (>100 mg/l). Die Patienten sind oft mental retardiert und leiden an Hörverlust sowie an endokrinen Störungen. Kardiomyopathie wird nur als seltenes Spätphänomen beschrieben, es stehen vor allem Reizleitungsstörung im Vordergrund.

Die meisten Fälle von KSS treten sporadisch auf. An mtDNA-Veränderungen konnten bei den meisten Patienten heteroplasmatische Deletionen, wie die sogenannte „*common deletion*“, und Duplikationen gefunden werden.

In der Histologie der Muskelbiopsie findet man massive Proliferation von Mitochondrien, *red ragged fibers* (RRF) und Cytochrom-c-negative Fasern. Die eher milde Beteiligung des Herzens könnte im geringeren Prozentsatz an Aberrationen im Herzen (14-40 % statt 70-80 %) begründet liegen.

Bei der sporadischen PEO handelt es sich um eine milde, unvollständige Form des Kearns-Sayre-Syndroms. Es wurde eine subklinische Kardiomyopathie in 5/5 Fällen mit sporadischer PEO gefunden.⁵⁶

1.5.2.2 *Punktmutationen*

Eine Reihe von Punktmutationen der mitochondrialen DNA ist mit Kardiomyopathie assoziiert. Diese betreffen verschiedene tRNAs, aber auch die Untereinheit 6 der ATPase und die 12S-RNA. Der jeweilige klinische Phänotyp variiert stark sowohl zwischen als auch innerhalb der gefundenen Mutationen.

1.5 Primäre Kardiomyopathie

MtDNA Gen	Mutation	Zusätzliche Klinik	Kardiomyopathie (KM)
tRNA ^{Leu(UUR)}	A3242G	MELAS Diabetes, Taubheit, Nierenversagen	Hypertrophe KM
	A3260G	Maternale Myo- und Kardiomyopathie	Hypertrophe KM
	C3303T	Myopathie	Fatale infantile/hypertrophe KM
tRNA ^{Ile}	A4269G	Multisystem	Dilatative KM
	A4300G	-	Hypertrophe KM
	A4317G	Multisystem	Fatale infantile KM
	A4320G	Enzephalopathie	Hypertrophe KM
tRNA ^{Lys}	A8344G	MERRF	Hypertrophe KM
	G8363A	Multisystem, Hörverlust	Hypertrophe KM
tRNA ^{Gly}	T9997C	Gestörte Darmperistaltik	Hypertrophe KM
ATPase 6	T8993G	Leigh-Syndrom, NARP	Hypertrophe KM
12S rRNA	A1555G	aminoglykosidinduzierte Ototoxizität	Hypertrophe KM

Tabelle 2: Übersicht über mtDNA-Punktmutationen mit Assoziation zu Kardiomyopathie

1.5.2.2.1 tRNA^{Leu(UUR)}

Die tRNA^{Leu(UUR)} ist schon lange als Hotspot für Punktmutationen im mitochondrialen Genom bekannt. Die wichtigste Mutation ist A3243G. Diese ist mit der mitochondrialen Enzephalopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Episoden (MELAS-Syndrom) assoziiert.⁵⁷ Das MELAS-Syndrom beginnt in der Kindheit mit belastungsabhängiger Schwäche und Schmerzen der Muskulatur. Es treten tonisch-klonische Anfälle und rezidivierende Schlaganfälle auf. Im Verlauf kommt es zu einer fortschreitenden Demenz.⁵⁸

Es sind aber auch Patienten mit PEO, Myopathie, maternalem Diabetes und Taubheit bei A3243G beschrieben worden. Bei dieser Patientengruppe fand man mit erhöhter Häufigkeit hypertrophe Kardiomyopathie. Aber auch zwei Patienten mit isolierter Kardiomyopathie, ein 6-jähriger portugiesischer Junge und eine 30-jährige italienische Frau, sind in der Literatur beschrieben.^{59; 60}

Die Mutation A3260G verursacht eine maternale Myopathie und Kardiomyopathie.^{61; 62} Das klinische Bild variiert von asymptomatisch bis schwerst betroffen. Man findet proximale

1.5 Primäre Kardiomyopathie

Muskelschwäche, Belastungsintoleranz, erhöhten Serumlaktatspiegel in Ruhe und Belastung, eine verkleinerte kardiale Auswurfraction und eine hypertrophe Kardiomyopathie. Aktivitätsmessung der Atmungskettenenzyme zeigten erniedrigte Aktivitäten von Komplex I und IV bei klinisch betroffenen Patienten. Auch Hybridzellen aus Tumorzellen und Patientenzytoblasten mit A3260G-positiven Mitochondrien zeigen eine signifikant reduzierte Aktivität von Komplex I und IV, sodass eine nukleäre Ursache für die Aktivitätsminderung ausgeschlossen ist.^{63;64}

Weiterhin ist diese Mutation auch bei einer Familie mit MELAS-Phänotyp ohne Kardiomyopathie beschrieben worden⁶⁵. Somit zeigt auch diese Mutation keine strikte Kopplung von Mutation und Phänotyp.

Die Mutation C3303T wurde in einer Familie gefunden, deren Stammbaum einen maternalen Erbgang zeigt. Die Patienten litten an infantiler und chronischer Kardiomyopathie, mitochondrialer Myopathie und plötzlichem Herztod.⁶⁶

1.5.2.2.2 *tRNA^{Ile}*

Es sind zurzeit vier Punktmutationen in der *tRNA^{Ile}* beschrieben, die eine Assoziation mit Kardiomyopathie haben. Die Mutation A4269G⁶⁷⁻⁶⁹ ist bei einem 18-jährigen Patienten beschrieben worden, der an fortschreitendem Herzversagen verstorben ist. Die klinischen Symptome waren Kleinwuchs, Taubheit, Epilepsie und Glomerulosklerose, im späteren Verlauf kam es zu einer dilatativen Kardiomyopathie. Die Pathogenität dieser Mutation konnte in Zellhybrid-Experimenten gezeigt werden.

Bei einem jungen Mann mit hypertropher Kardiomyopathie konnte die Mutation A4300G⁷⁰ gefunden werden, wobei andere Symptome fehlten. Auch seine mütterlichen Verwandten zeigten Anzeichen einer Herzhypertrophie.

Die Mutation A4317G⁷¹ führte bei einem einjährigen Jungen zu fataler infantiler Kardiomyopathie mit Anämie, metabolischer Azidose und erhöhten Muskelenzymen.

Ein Fall von hypertrophischer Kardiomyopathie und Enzephalopathie ist zusammen mit der Mutation A4320G⁷² beschrieben worden.

1.5.2.2.3 *tRNA^{Lys}*

Der wichtigste Phänotyp einer Mutation in der *tRNA^{Lys}* ist die myoklonische Epilepsie mit

1.5 Primäre Kardiomyopathie

red ragged fibres (MERRF) mit der Mutation A8344G⁷³. Er ist charakterisiert durch Myoklonus, Epilepsie, Muskelschwäche, progrediente Kleinhirnsymptomatik, Seh- und Hörschwäche und geistige Retardierung. Das Herz ist aber nur in seltenen Fällen betroffen.⁷⁴

Ein Austausch von G nach A an Position 8363 ist dagegen bei zwei unverwandten Familien mit maternaler hypertrophischer Kardiomyopathie und Hörverlust beschrieben worden.⁷⁵

1.5.2.2.4 *tRNA^{Gly}*

Bei einer Familie mit maternal vererbter hypertrophischer Kardiomyopathie konnte die Mutation T9997C gefunden werden. Dieser Austausch von T zu C unterbricht eine Wasserstoffbrückenbindung in der Nachbarregion des Akzeptorstammes der tRNA. Das Thymin an dieser Stelle ist bei Säugetieren hoch konserviert. Verschiedene Familienmitglieder zeigten darüber hinaus eine intestinale Motilitätsstörung.⁷⁶

1.5.2.2.5 *ATPase 6*

Sowohl NARP-Syndrom (Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa) als auch das maternal vererbte Leigh-Syndrom werden von den beiden Mutationen T8993G und T8993C verursacht. Das NARP-Syndrom präsentiert sich klinisch mit Entwicklungsverzögerung im Kindesalter, Retinitis pigmentosa, progredienter Blindheit, proximaler Muskelschwäche im Rahmen einer kortikospinalen Degeneration, sensibler axonaler Polyneuropathie, Ataxie und Nystagmus. Ein histochemischer Hinweis auf eine mitochondriale Myopathie findet sich nicht, es zeigen sich in der Muskelbiopsie lediglich Denervierungszeichen. Die Ausprägung des Phänotyps hängt ab von der Mutationslast.⁷⁷

Das Leigh-Syndrom ist vor allem gekennzeichnet durch Nekrosen im Bereich des Hirnstamms, der Stammganglien und des Kleinhirns. Die Symptomatik hängt von der Lage der Läsionen ab.

Es können beide Phänotypen in einem Stammbaum auftreten. Eine Assoziation zwischen Leigh-Syndrom und hypertrophischer Kardiomyopathie ist bekannt.⁷⁸⁻⁸¹

1.5.2.2.6 *12S rRNA*

Die Mutation A1555G fand sich sowohl als Ursache für maternale hypertrophische Kardiomyopathie als auch für aminoglykosidinduzierte Ototoxizität.^{82; 83}

2 Ziel der Arbeit

Mitochondriale Zytopathien sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Ihre Pathogenese ist immer noch nicht vollständig verstanden.

Diese Arbeit zeigt anhand von 2 klinischen Fällen die Heterogenität mitochondrialer Zytopathien, die Problematik ihrer klinischen Interpretation und die offenen Fragen in der Pathogenese.

Dazu wird die mitochondriale DNA der beiden Patienten mit molekulargenetischen Methoden analysiert. Gefundene Veränderungen werden in Bezug auf die klinischen, pathoanatomischen und molekularbiologischen Befunde diskutiert.

Durch dieses Vorgehen entwickelt sich für jeden Patienten eine ganz spezielle Fragestellung, die sich direkt aus seinen Befunden ergibt.

Der erste Fall ist ein LHON-Patient mit einem Lymphom, der eine Chemotherapie benötigte. Bei genetisch vorgeschädigten Mitochondrien befürchteten wir ein erhöhtes Therapierisiko, vor allem weil Apoptose in der Pathogenese von LHON diskutiert wird. Um dieses Risiko abschätzen zu können, muss die klinisch gestellte Diagnose LHON molekularbiologisch gesichert werden. Die Effekte der Chemotherapie wurden klinisch genau überwacht und in vitro getestet. Abschließend soll der Einfluss der gefundenen Mutation auf die Empfindlichkeit der Zellen für Zytostatika beurteilt werden.

Der zweite Fall weist immunhistochemisch Zeichen einer Becker'schen Muskeldystrophie auf, histologisch, elektronenmikroskopisch und biochemisch finden sich Zeichen einer mitochondrialen Myopathie. Hier sollen Schädigungen der mtDNA gefunden werden, die die vorliegenden Befunde erklären können. Auch bei diesem Fall ist eine Beurteilung der vorliegenden Veränderungen in Hinblick auf das Krankheitsbild des Patienten von großer Wichtigkeit.

Abschließend soll in der Arbeit ein Überblick über die vermutete Pathogenese der gefundenen Veränderungen gegeben werden. Dazu wird die aktuelle Literatur noch einmal zusammengefasst und bewertet.

3 Material und Methoden

3.1 Herkunft der Gewebeproben

3.1.1 Kontrollen

Kontrolltemple wurde aus Muskelgewebe und EDTA-Blut (Ethyldiamintetraessigsäure) gewonnen. Das Muskelgewebe wurde vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen zur Verfügung gestellt. Es wurde dem Musculus quadriceps femoris entnommen und innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod bearbeitet, um autolytische Prozesse gering zu halten. Die Kontrollpersonen c1, c2, c3 litten weder an einer mitochondrialen Erkrankung noch an neuronalen oder muskulären Erkrankungen.

Die Blutproben stammen von Mitarbeitern des Instituts für Biochemie (Universitätsklinikum Aachen). Die DNA wurde direkt nach der Blutentnahme isoliert.

Die Auswahl der Kontrollen erfolgte so, dass Proben und Kontrollen der gleichen Altersgruppe entstammten.

3.1.2 Patient p1/p2

Der Patient (p1) stellte sich im März 1999 mit einem zentroblastischen Non-Hodgkin-Lymphom im Stadium II A nach der Ann-Arbor-Klassifikation in der medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums Aachen vor.

Er erlitt im Jahre 1979 einen akuten, beidseitigen Sehverlust. Es wurde damals klinisch die von uns molekulargenetisch bestätigte Diagnose LHON gestellt (siehe Ergebnisse).

Die Behandlung des Lymphoms erfolgte ab April des Jahres 1999 mit 6 Zyklen Chemotherapie (Cyclophosphamid, Vincristin, Epirubicin und Prednison), die zu einer vollständigen Remission führte. Die Behandlung wurde mit einer konsolidierenden Radiotherapie abgeschlossen.

In der Familienanamnese fanden sich keine weiteren Fälle von akutem Sehverlust.

Die Mutter (p2) des Patienten wurde ebenfalls von uns auf die Mutation 11778A untersucht.

Es wurde in beiden Fällen EDTA-Blut für die molekulargenetischen Untersuchungen

3.1 Herkunft der Gewebeproben

verwandt.

3.1.3 Patient p3

Die 28-jährige Patientin p3 litt an einer fortschreitenden proximalen Gliederschwäche seit dem siebten Lebensjahr mit den klinischen Zeichen einer Muskeldystrophie vom Gliedergürteltyp. Sie ist geistig nicht retardiert, hat keine externe Ophthalmoplegie, aber eine beidseitige Ptose. Eine Retinopathia pigmentosa konnte fundoskopisch ausgeschlossen werden. Sie kam wegen einer globalen, kardialen Dekompensation in die Klinik. Echokardiografisch zeigte sich eine reduzierte linksventrikuläre Funktion ohne Zeichen einer Dilatation. In der Familie sind 2 von 5 Kindern erkrankt.

In der Skelettmuskelbiopsie aus dem rechten Musculus deltoideus fand sich eine ungewöhnliche Muskeldystrophie mit Beteiligung des Myokards in weiteren Biopsien.

Die Immunhistochemie zeigt regelrechte Immunreaktivität des Sarkolemms für: Dystrophin 1, 2 und 3, Adhalin, Merosin, Beta-Sarkoglykan, Delta-Sarkoglykan und Beta-Dystroglykan. Die Reaktion für Gamma-Sarkoglykan war nicht verwertbar. Aus dem Reaktionsmuster ließ sich keine immunhistochemische Zuordnung zu einer bekannten Dystrophieform herstellen.

In der Elektronenmikroskopie fanden sich pleomorphe Veränderungen mit dominierenden mitochondrialen Anomalien, wobei auch ausgeprägte Veränderungen an den Myofibrillen, dem T-System, dem sarkoplasmatischen Retikulum und dem Nukleus zu beobachten waren. Auffallend ist, dass die mitochondrialen Anomalien, die heute im Vordergrund stehen, 1990 noch nicht nachweisbar waren, dafür aber die Kernveränderungen schon bestanden.

3.1.4 Patient p4

3.1.4.1 Klinische Vorgeschichte

Patient p4 wurde mit Sectio bei Missverhältnis geboren. Seine Eltern sind gesund. Die Schwangerschaft war durch eine EPH-Gestose (Ödeme, Proteinurie, Hypertonus) erschwert. Das Geburtsgewicht betrug 3280 g, die Geburtslänge 49 cm und der APGAR-Index 7/9/9. Es wurde auffällig dunkles bis schwarzes Fruchtwasser beschrieben, im Rahmen eines Ikterus praecox kam es zu einem Blutaustausch bei Rhesusinkompatibilität. Im Alter von einem Jahr fiel im Röntgenthorax bei stationärem Aufenthalt wegen Gastroenteritis ein grenzwertiger Herz/Thorax-Quotient auf. Das gelbe Heft berichtet über eine linksbetonte Hypotonie der

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Muskulatur.

Im Alter von 6 Jahren kam es zu einer massiven Gewichtszunahme. Eine zusätzlich bestehende Minderung der Beweglichkeit, Trägheit und häufiges Hinfallen (2- bis 3-mal pro Woche) wurde auf das starke Übergewicht zurückgeführt. Die motorische Einschränkung war so stark ausgeprägt, dass der Sportlehrer ihm die Teilnahme am Sportunterricht verbot.

Eine seit 1992 bestehende Neurodermitis führte wegen einer Superinfektion zum Aufenthalt in der Hautklinik des Universitätsklinikum Düsseldorf. Dort fielen folgende Laborparameter auf: GPT 121 U/L, LDH 681 U/L und Cholesterin 239 mg/dl. Diese wurden auf eine alimentär bedingte Fettleber zurückgeführt.

Ein Kuraufenthalt mit 10 Jahren führte zwar zu einer kurzfristigen Gewichtsreduktion von 59,1 kg auf 49,5 kg, es wurde aber auch eine beginnende Muskelschwäche im Gürtelbereich mit Hyperlordose der Lendenwirbelsäule und schlaffer Haltung bei pyknischem Körperbau auffällig. Eine Verhaltensstörung mit Auffälligkeiten im Sozialverhalten und Konzentrationsschwierigkeiten wurde beschrieben, zum einen bedingt durch das starke Übergewicht, zum anderen durch eine schwierige familiäre Situation. Es bestanden weiterhin auffällige Laborwerte: GOT 52 U/L, GPT 184 U/l.

Im Alter von 14 Jahren hat sich die Situation soweit verschlechtert, dass der Patient nicht mehr in der Lage war, Treppen zu steigen. Geradeaus konnte er noch 50 m am Stück gehen. Sein Körpergewicht betrug zu dem Zeitpunkt 99,5 kg bei einer Größe von 158 cm. Bei einer ambulanten Vorstellung im vorherigen Jahr waren es noch 76,5 kg bei einer Größe von 148 cm. Dabei befand er sich im Alter von 14 Jahren noch komplett im präpubertären Stadium (nach Tanner: G 1, PH 1). Es bestand eine beidseitige Gynäkomastie Stadium B2. Die Leberenzyme waren weiterhin erhöht: GOT 43 U/l, GPT 71 U/l.

Eine Untersuchung auf Prader-Willi-Syndrom im Institut für Humangenetik in Essen erbrachte keinen pathologischen Befund.

3.1.4.2 Kardiologische Untersuchungen

Die untersuchten Muskelproben wurden im Rahmen eines stationären Aufenthaltes in der Klinik für Kinderkardiologie entnommen. Grund für den stationären Aufenthalt war eine akute kardiale Dekompensation mit Dyspnoe. Als Ursache fand man eine ausgeprägte dilatative Kardiomyopathie, der Durchmesser des linken Ventrikels betrug in der

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Echokardiografie diastolisch 71 mm, systolisch 64 mm.

In weiteren konsiliarischen Untersuchungen ergab sich orthopädisch der Verdacht auf eine Muskeldystrophie vom Typ Becker oder vom intermediären Typ Duchenne oder eine Gliedergürtel-Muskeldystrophie. Das neuropädiatrische Konsil fand nicht auslösbare Muskeleigenreflexe. Im Rahmen der Syndromabklärung wurden von der Augenheilkunde keine pathologischen Veränderungen gefunden.

In der anschließenden Diagnostik fanden sich elektromyografisch in den untersuchten Muskeln (Musculus quadratus femoris und Musculus biceps brachii) Zeichen einer myopathischen Erkrankung. Zur Abklärung einer viralen Genese wurde serologisch eine akute oder frühere Infektion mit Hepatitis-B-Virus und Zytomegalie-Virus ausgeschlossen. Die Konstellation der Epstein-Barr-Virus (EBV)-spezifischen Antikörper zeigte eine schwache Virusaktivität an, die Folge einer passageren Aktivierung oder kürzlich durchgemachten Erstinfektion mit EBV sein kann. Dies spricht für eine EBV-Infektion, die länger als 6 Wochen, höchstens aber 12 Wochen zurückliegt.

Ein Autoimmunprozess wurde durch immunologische Bestimmung von Autoantikörpern im Serum untersucht. Es fanden sich keine Antikörper gegen Mitochondrien, glatte Muskulatur, Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur.

Eine Glykogenose vom Typ V konnte klinisch (McArdle-Test), die Typen II, III und VI a mit Hilfe von Leukozyten-Tests ausgeschlossen werden.

Die klinische Diagnose Dystrophinopathie ist molekulargenetisch im Institut für Humangenetik in Bonn überprüft worden. Es wurden 26 Abschnitte des Dystrophingens überprüft, mit der PCR-Methode werden etwa 98 % der nachweisbaren Deletionen erfasst. Mit dieser Methode wurde keine Deletion im Dystrophingen gefunden. Dieses Ergebnis schließt die Diagnose einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne/Becker nicht aus, da nur bei etwa 70 % der Patienten eine Deletion im Dystrophingen nachgewiesen werden kann.

Auffällig waren bei dem Patienten folgende Laborwerte: Triglyceride 318 mg/dl, Harnsäure 10,88 mg/dl, GOT 51-67 U/l, GPT 71-72 U/l, gamma-GT 10-32 U/l, LDH 414-495 U/l, CK 1485-1840 U/l, CK-MB 30 U/l, Myoglobin 1083 µg/l, alpha-HBDH 248 U/l, GLDH 8 U/l, CRP 11 mg/l, HDL-Cholesterin 21 mg/dl, LDL-Cholesterin 64 mg/dl.

Man fand Normwerte für Elektrolyte, Retentionswerte, Gesamtprotein, Gerinnung,

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Pankreasenzyme, Troponin I 0,1 µg/l und Schilddrüsenwerte (fT4 14,1 pmol/l, fT3 2,5 pmol/l, TSH 3,36 µU/l), ein unauffälliges Blutbild und Differenzialblutbild, Immunglobuline A, G und M jeweils im unteren Normbereich, Lutropin, Follitropin, Testosteron und IGFBP-3 im Serum normwertig.

Freies Carnitin war mit 87,9 µmol mäßig erhöht, Acylcarnitin mit 3,6 µmol/l grenzwertig niedrig. Als mögliche Ursache wurde sowohl eine verminderte renale Carnitin-Ausscheidung (dann allerdings meist auch Acylcarnitin erhöht) als auch eine Carnitinfreisetzung aus Muskulatur aufgrund einer Myopathie oder Muskeldystrophie diskutiert.

3.1.4.3 Histologische Untersuchung der Biopsie

Mikroskopisch fand man eine fortgeschrittene neurogene Muskelatrophie mit teilweiser Kompensation durch kollaterale Reinnervation. Zusätzlich lagen eine Begleitmyopathie und herdförmige Ablagerungen phospholipidähnlicher Substanzen vor, die an eine Chloroquinapplikation denken lassen. In der Trichrom-Färbung fanden sich einige Ragged Red Fibers, die auf eine mitochondriale Myopathie hinweisen. Auch fanden sich Ringbinden, sodass auch eine myotonische Dystrophie differenzialdiagnostisch zu erwägen ist.

Elektronenmikroskopisch fanden sich pleomorphe Veränderungen mit zumindest in einzelnen Fasern dominierenden mitochondrialen Veränderungen. Auffällig waren auch ungewöhnliche Kernpyknosen.

Das Fehlen der entsprechenden Bande im Western-Blot und der Nachweis einer Dystrophinrestmenge in der Immunhistochemie weisen dagegen auf eine Muskeldystrophie vom Typ Becker hin.

Aufgrund der neuropathologischen Befunde besteht der Verdacht auf eine Muskeldystrophie und eine mitochondriale Myopathie.

3.1.4.4 Biochemische Untersuchung der Biopsie

Biochemische Untersuchungen im Muskellabor des Instituts für Klinische Chemie, Molekulare Diagnostik und Mitochondriale Genetik der TU München zeigten einen mäßigen muskulären Carnitinmangel, einen kombinierten, partiellen Defekt in Komplex I und II und einen ausgeprägten Defekt von Komplex IV.

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Parameter	Messwert	Referenzbereich	Einheit
Gesamt-Carnitin	15,7	21,0 - 43,1	µmol/g NCP
Freies Carnitin	13,3	19,5 - 35,1	µmol/g NCP
Kurz. Acylcarnitin	2,4	0,5 - 13,4	µmol/g NCP
NADH/CoQ-Oxidoreduktase	6,5	12,0 - 40,0	U/g NCP
Succinat/Cyt-c-Oxidoreduktase	3,7	6,0 - 25,5	U/g NCP
Succinat/PMS-Oxidoreduktase	7,8	16,0 - 42,6	U/g NCP
Cytochrom-c-Oxidase	13,0	90,0 - 281,0	U/g NCP
Citratsynthase	123,0	45,0 - 105,0	U/g NCP
			<i>Enzymaktivitäten bezogen auf Citratsynthase</i>
NADH/CoQ-Oxidoreduktase	0,05	0,17 - 0,56	U/U CS
Succinat/Cyt-c-Oxidoreduktase	0,03	0,08 - 0,45	U/U CS
Succinat/PMS-Oxidoreduktase	0,06	0,23 - 0,44	U/U CS
Cytochrom-c-Oxidase	0,11	0,90 - 4,70	U/U CS

Tabelle 3: Enzymaktivitäten (Muskellabor des Instituts für klinische Chemie, Molekulare Diagnostik und Mitochondriale Genetik der TU München, persönliche Mitteilung)

3.1.4.5 Molekulargenetisches Screening

Die mitochondriale DNA ist mit Southern-Blot, SSCP und RFLP-Analyse auf die bekanntesten Mutationen in der klinischen Chemie der TU München gescreent worden. Es zeigte sich dabei keine Auffälligkeit.

3.2 Präparation mitochondrialer DNA

3.2.1 Isolierung von mtDNA aus Blut

Als Ausgangsmaterial stehen 5 ml mit EDTA gerinnungsfrei gehaltenes Frischblut von Kontrollen und Patienten zur Verfügung. Zunächst wird durch 15-minütige Zentrifugation bei 200 g das Plasma abgetrennt, es enthält die Thrombozyten. Die Leukozyten sind als weißer Ring über den Erythrozyten sichtbar, diese dürfen beim Abziehen nicht ins Plasma gelangen.

3.2.1.1 Thrombozytenpräparation

Die im Plasma enthaltenen Thrombozyten besitzen zwar Mitochondrien, haben aber als Zellfragment keinen Zellkern. Daher müssen keine Zellkerne abgetrennt werden, es ist jedoch wichtig, dass sich keine Leukozyten im Plasma mehr befinden, da deren Zellkerne die gewonnene mtDNA kontaminieren würden. Daher wird das Plasma zunächst bei 750 g zentrifugiert, um es von Rest-Leukozyten zu reinigen, die restlichen Leukozyten werden mit den übrigen vereint. Die anschließende Zentrifugation bei 1500 g pelletiert die Thrombozyten, der Überstand wird verworfen. Das Pellet kommt in die organische Lyse.

3.2.1.2 Leukozytenpräparation

Die Leukozyten und Erythrozyten werden mit 4,5 ml Hämolysispuffer versetzt und für ca. 10 min leicht geschwenkt. So werden die Erythrozyten lysiert, dies zeigt auch ein Farbumschlag hin zu einem tiefdunklen Rot. Die Leukozyten lysieren unter diesen Bedingungen nicht und können mit 10 min bei 2000 g pelletiert werden. Der Überstand wird verworfen. Das Leukozyten-Pellet wird in dem 5-fachen Volumen Saccharose-Puffer aufgenommen.

Mit einem Dounce-Homogenisator werden mit 5 Schlägen bei 6000 Umdrehungen die Zellen rupturiert, die kleineren Strukturen wie Zellkern und Mitochondrien bleiben aber intakt.

Eine 3-fache Zentrifugation bei 750 g für 5 min trennt Kerne und Zelldebris ab, eine anschließende Zentrifugation von 1 h bei 14000 Umdrehungen lässt die Mitochondrien pelletieren, die dann einer organischen Lyse unterzogen werden.

3.2.2 Isolierung von mtDNA aus Muskelgewebe

Das Muskelgewebe wird mit dem Skalpell von Bindegewebe befreit, zerkleinert und in H-Puffer aufgenommen. Die Zellmembranen werden mit dem Dounce-Homogenisator mit 5 Schlägen bei 6000 Umdrehungen rupturiert. Durch differenzielle Zentrifugation wird das Homogenisat erst bei 750 g für 5 min von den Kernen und dem Zelldebris befreit, dann werden die Mitochondrien bei 14000 Umdrehungen pelletiert und anschließend lysiert.

Für die Mikromuskelpräparation stehen Gewebemengen von 25 bis zu 3 mg zur Verfügung, bei der Maxipräparation ~3,6 g Gewebe, das in Portionen von ca. 100 mg unterteilt wird. Diese Portion wird dann wie eine Mikropräparation behandelt, die einzelnen

3.2 Präparation mitochondrialer DNA

Mitochondrienpellets werden gepoolt.

Die Maxipräparation dient der Gewinnung von Kontrolltemplate. Patientenmaterial liegt in der Größenordnung von ~50 mg vor, d. h., zwei Mikropräparationen sind in der Regel möglich.

3.2.3 Organische Lyse

Die gewonnenen Mitochondrien werden mit Lysis-Puffer und Proteinase-K über Nacht im Wasserbad bei 55 °C lysiert, das Volumen richtet sich nach der Präparation.

3.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die lysierten Mitochondrien werden mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Wasser versetzt und vermischt. Bei 5 min 4500 U wird die Phasentrennung wieder hergestellt, die wässrige Oberphase enthält die mtDNA, die Interphase Proteine. Die Oberphase wird abgezogen und solange mit Phenol/Chloroform/Wasser versetzt, bis keine Interphase mehr vorhanden ist. Abschließend wird die Probe mit Chloroform von Phenol befreit, in der Probe enthaltendes Chloroform wird bei 65 °C für 10 min verdampft. Die enthaltene mtDNA wird mit dem doppelten Volumen EtOH und einem zehntel Volumen Natriumacetat (NaAc) bei -70 °C gefällt und abzentrifugiert. Zur Reinigung der mtDNA von Salzen etc. wird das Pellet noch einmal mit 70 % Ethanol (EtOH) gewaschen und dann in TE-Puffer aufgenommen oder bei geringen Mengen sofort in die LPCR eingesetzt.

3.3 Gelelektrophorese

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

DNA wandert in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Phosphodiesterbindungen zur Anode. In einem Agarosegel behindert die Gelmatrix die DNA entsprechend ihrer Größe, sodass die großen Moleküle langsamer wandern als die kleinen. Ein mitlaufender Größenstandard macht eine Größenzuordnung möglich. Die Dichte der Gelmatrix kann über die Konzentration geregelt werden, sodass verschieden starke Auftrennungen möglich sind. Die Auflösungsgrenze liegt bei Größenunterschieden von 100 bp. Die DNA wird mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und fluoresziert unter UV-Bestrahlung. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 20 ng

3.3 Gelelektrophorese

DNA.

In Abhängigkeit der Fragmentgröße wurden folgende Agarosekonzentrationen benutzt:

Fragmentgröße	Agarosekonzentration	Spannung	Laufzeit
16000 bp	0,4 % - 0,8 %	30 V – 100 V	14 h
1000-3000 bp	1 %	250 V	2 h
<1000 bp	>2 %	150 V	2 h

Tabelle 4: Bedingungen für Agarosegelelektrophorese

Die für die gewünschte Agarosekonzentration benötigte Menge Agarose (Serva) wird unter ständigem Rühren in TBE-Puffer mit Ethidiumbromid (200 µl/l) aufgekocht. Nach leichter Abkühlung wird das Gel direkt in der Elektrophorese-Kammer (Biorad) gegossen. Wenn es ausgehärtet ist, wird das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Der verwandte Kamm liefert 20 Taschen à 20 µl. Die Proben werden mit Ladungspuffer versetzt und mit einer Pipette in die Taschen geladen. Der verwendete Längenmarker ist der Fragmentgröße angepasst, im Regelfall kann eine 1-kb-Leiter verwendet werden (Gibco/BRL). Die angelegte Spannung ist der Agarosekonzentration angepasst und ermöglicht eine schnelle Auftrennung, ohne durch Wärmeabgabe das Gel zu beschädigen.

3.3.2 Acrylamidgelelektrophorese

Acrylamidgelelektrophorese wird für SSCP (siehe 3.3.2.1) und RFLP (siehe 3.6.1) mit Fragmenten kleiner 50 bp verwendet. Die Elektrophoresekammer (LKB) war in beiden Fällen dieselbe, sie besteht aus einer Gelplatte (20 x 55 cm) und einer Thermokonstantplatte. Der Unterschied zwischen den beiden Verfahren liegt in der Gelzusammensetzung, der Probenbehandlung und den Laufbedingungen.

Vorbereitung der Apparatur:

Die Gelplatte wird zuerst mit 6 N KOH abgerieben, um Reste von alten Silanisierungen zu entfernen. Nach der vollständigen Entfernung der Kalilauge wird die Platte zuerst mit Aceton, dann mit EtOH und zum Schluss mit Aqua bidest. mit fuselfreien Tüchern geputzt. Anschließend wird die Platte eine halbe Stunde in 1:10 verdünnte Bind-Silane (von LKB/Pharmacia) gelegt, nach der Silanisierung wird die noch an der Platte haftende Silane mit Aqua bidest. abgespült und die Platte luftgetrocknet.

3.3 Gelelektrophorese

Die Kühlplatte wird auf die gleiche Weise gesäubert, zur Silanisierung werden 10 ml Repel-Silane (von LKB/Pharmacia) auf der Oberfläche verteilt. Nach 10 Minuten wird die Silane mit Papiertüchern entfernt und die Platte nochmals vorsichtig mit EtOH und Aqua bidest. abgespült und getrocknet.

Die Gelplatte wird auf die Kühlplatte geklammert, seitliche Spacer dienen als Abstandshalter. Unten wird die Gelkammer mit einem weiteren Spacer, Agarose und speziellem Klebeband abgedichtet. Die Platten werden in einem Winkel von 45° aufgestellt, die Acrylamidlösung wird blasenfrei in die Gelkammer gegossen. Die Gelkammer wird oben mit einem weiteren Spacer verschlossen. Über Nacht polymerisiert das Acrylamid bei 4 °C aus. Die Polymerisierung wird kurz vor dem Gießen durch die Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) und APS (Ammoniumperoxodisulfat) gestartet. Verhindert man ein Austrocknen des Gels, so ist dieses ungefähr 3 Tage haltbar.

Für die Elektrophorese wird die Gelkammer, d. h. Thermokonstantplatte, Gel und Gelplatte, senkrecht in die Apparatur eingespannt, sodass die Enden des Gels in dem Laufpuffer (TBE) liegen. Die oberen und unteren Spacer werden vorher entfernt. Oben wird ein Haifischzahnkamm eingesetzt, sodass etwa 30 Probenaschen à 7 µl entstehen.

Die jeweiligen Laufbedingungen, die Probenbehandlung und die zu verwendende Acrylamidlösung werden in den nachfolgenden Abschnitten behandelt.

Nach der Elektrophorese werden die Gele mit 10%igem Acetat und mit Aqua dest. gewaschen und über Nacht getrocknet.

Die von uns verwendeten Proben sind durch Zugabe von radioaktiven Nukleotiden zur PCR-Reaktion markiert. Die Auswertung erfolgt über einen Phosphorscreen mit einem computergesteuerten Scanner (Phosphorimager STORM, Molecular Dynamics). Die Exposition des Phosphorscreens richtet sich nach der Aktivität des verwandten Isotops und der aufgetragenen DNA-Menge.

3.3.2.1 Single Strand Conformation Polymorphismus (SSCP)

Die SSCP ist ein Screeningverfahren zum Punktmutationsnachweis. Einzelstrang-DNA nimmt eine spezielle Konformation ein, sie hat eine veränderte, nicht mehr streng mit der Länge korrelierte Laufgeschwindigkeit. Wird die DNA-Sequenz und damit die Konformation durch eine Punktmutation verändert, so ändert sich auch die Laufgeschwindigkeit. Proben mit

3.3 Gelelektrophorese

mutierter DNA weisen also ein verändertes Laufmuster im SSCP-Gel auf. Aussagen über die Mutation kann man mit diesem Verfahren nicht treffen. SSCP-Gelelektrophorese wird mit einem speziellen Acrylamidgel durchgeführt, welches 5 % Acrylamid (96,7 % Acrylamid; 3,3 % Methylenbisacrylamid) und 7 % Glycerol enthält. Dazu werden 17 ml 30 % Acrylamidlösung, 10 ml 10-fach TBE, 15 ml 0,5x Glycerol auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Diese Menge reicht für ein Gel.

Die Proben müssen im denaturierten Zustand vorliegen, d. h. als Einzelstrang-DNA. Dazu werden sie vor dem Auftragen mit SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat) in dem Verhältnis Template zu SDS gleich 1:5, sowie mit Ladebuffer versetzt und durch Erhitzen bei 95 °C und anschließendem direkten Abkühlen auf Eis denaturiert.

Die Laufbedingungen sind 2000 V für 3 Stunden.

3.3.2.2 Natives Gel

Das native Gel enthält 5 % Acrylamid (96,7 % Acrylamid; 3,3 % Methylenbisacrylamid) und 7 % Glycerol. Dazu werden 6 ml 30 % Acrylamidlösung, 10 ml 10fach TBE auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Diese Menge reicht für ein Gel.

Probenbehandlung: Die Proben werden mit 1-3 µl Ladebuffer versetzt, das Probenvolumen sollte 5 µl nicht überschreiten.

Die Laufbedingungen sind 2500 V für ca. 90 Minuten.

3.4 PCR

3.4.1 Konventionelle PCR

Das mitochondriale Genom wurde willkürlich in 14 Fragmente eingeteilt, für die optimale PCR-Bedingungen etabliert worden sind. Diese PCR-Fragmente werden für Sequenzierungen und RFLP verwendet. Die Größe liegt bei ca. 1000 bp.

Das Reaktionsvolumen beträgt 100 µl. Als Template werden 1-10 ng DNA eingesetzt. 90 µl fragmentspezifischer Mastermix werden mit Aqua ad injectabile, der DNA-Lösung (1 ng/µl) und 2,5 U Taq-Polymerase (5 U/µl, Pharmacia Biotech) auf das Reaktionsvolumen aufgefüllt. Der fragmentspezifische Mastermix besteht aus 150 µl 10-fach Taq-Puffer (Pharmacia Biotech), 15 µl Polymerisations-Mix [8 pmol/µl] (Pharmacia Biotech), 75 µl des jeweiligen

3.4 PCR

Vorwärts- und Rückwärtsprimers (MWG Biotech) und 1350 μ l Aqua sterile.

Die PCR-Bedingungen für die einzelnen Fragmente sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet. Für die jeweiligen Fragmente unterscheiden sich die PCR-Bedingungen in der Annealing-Temperatur, der Extensionszeit und der Zyklenanzahl.

	Temperatur in Celsius	Zeit in Sekunden
First Denaturation	94	300
Denaturation	94	30
Annealing	T_{ann}	60
Extension	72	T_{ext}

Tabelle 5: PCR-Grundprofil

3.4 PCR

F.-Nr	Primer	Sequenz 5' → 3'	Zyklen	T _{ext} [s]	T _m [°C]	T _{ann} [°C]	bp
1	L 1	GATCACAGGTCTATCACCT	38	60	60	61	1.500
	H1500	GAGGAGGGTGACGGGCGGTG			70		
2	L1501	AAGTATACTTCAAAGGACAT	35	60	52	55	1.500
	H3000	TGATCCAACATTGAGGTCGT			58		
3	L3001	GGACATCCCGATGGTGCAGC	35	50	66	62	1.500
	H4500	AGTAGATGACGGGTTGGGCC			64		
4	L4501	CTACCATCTTTCAGGCACA	38	65	60	60	1.649
	H6149	TAGTCAGTTGCCAAAGCCTC			60		
5	L6150	GTTCCCTAATAATCGGTGC	35	50	60	53	1.295
	H7444	CTAGATTTTATGTATACGGG			54		
6	L7415	ATTCGAAGAACCCGTATACA	35	40	56	55	950
	H8364	TCACTGTAAAGAGGTGTGG			58		
7	L8363	GAAATGCCCAACTAAATAC	35	35	56	53	843
	H9205	TTATGTGTTGTCGTGCAGGT			58		
8	L9207	ATGACCCACCAATCACATGC	35	30	60	61	783
	H9990	AAGACCCTCATCAATAGATG			56		
9	L9991	ACTCTTTTAGTATAAATAGT	38	60	48	43	1.460
	H11450	GTACTATTGACCCAGCGATG			60		
10	L11451	TTGCCGAGTACTCTTAAAA	35	45	56	60	1.120
	H12570	TAGGGAGAGCTGGGTTGTTT			60		
11	L12571	AGCTTCAAACCTAGACTACCTT	35	40	54	53	1.000
	H13570	TAATAGATAGGGCTCAGGCG			60		
12	L13571	CTCTCATCGCTACCTCCCTG	37	40	64	58	1.000
	H14570	GCGGTGTGGTCGGGTGTGTT			66		
13	L14571	TAACAATCAATACTAAACCC	35	40	52	55	1.000
	H15570	AGGAAATATCATTCGGGCTT			56		
14	L15571	ATTCGCCTACACAATTCTCC	35	40	58	50	999
	H16569	CATCGTGATGTCTTATTAA			52		
MERRF	L7415	ATTCGAAGAACCCGTATACA	35	35	s.o.	54	957
	H8372	GGGGCATTCACTGTAAAGAGGTGT GG			s.o.		

Tabelle 6: PCR spezielle Bedingungen

3.4.2 „Long-distance“-PCR (LPCR)

Die LPCR kann Fragmente bis zu einer Größe von 30 kb amplifizieren. Dies wird durch eine Polymerase mit Proofreading-Aktivität ermöglicht. Das Standardverfahren des Labors amplifiziert ein 14500 bp großes Fragment der mtDNA. Es wird zum Deletionscreening

3.4 PCR

verwandt.

Es ist für diese Arbeit eine PCR-Bedingung mit entsprechenden Primern entwickelt worden, die fast das gesamte mitochondriale Genom herstellt. Die Sicherheit lag aber noch unter dem Standardverfahren, sodass zur Diagnostik die herkömmliche Methode verwandt wurde.

Die LPCR-Bedingungen weichen von den konventionellen ab. Das Reaktionskit stammt von Takara Biomedicals (Japan). Das Reaktionsvolumen beträgt 50 µl mit 5 µl 10fach Puffer (TakaRa), 6,3 µl Polymerisationsmix, 1,6 µl von Primer 11 und 24 (8 pmol/100 µl), 30 ng Template, 2,5 U TaKaRaPolymerase und Aqua sterile bis zum Reaktionsvolumen. Die verwendeten Einstellungen für Temperatur und Zeit sind in Tabelle 7 aufgelistet, die Zykluszahl beträgt 30.

	Temperatur in Celsius	Zeit in Sekunden
First Denaturation	94	60
Denaturation	98	20
Annealing und Extension	68	600
Last Extension	68	1200

Tabelle 7: LPCR-Bedingungen

3.5 Sequenzierung

Das automatische Sequenzieren basiert auf der Methode von F. Sanger. Dazu wird die zu sequenzierende DNA mit einem Primer aus dem Bereich der gewünschten Region in einer modifizierten PCR-Reaktion amplifiziert. Im Reaktionsansatz zusätzlich vorhandene, mit unterschiedlichen Farben fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide werden von der DNA-Polymerase mit eingebaut. Diese führen durch das Fehlen der 3'-Hydroxygruppe zum Abbruch der PCR-Reaktion an den dadurch markierten Strängen. Nach Abschluss der Reaktion liegen im Reaktionsgemisch DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit einer Farbmarkierung entsprechend der letzten komplementären Base des zu sequenzierenden Stranges vor.

Diese werden in einem Gel oder einer Kapillare der Größe nach aufgetrennt, sodass die Fragmente der Sequenz nach am Detektionslaser vorbeilaufen. Die Farbe des Fluoreszenzsignals wird gemessen und ist der entsprechenden Base zugeordnet.

3.5 Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu das Gerät Abi Prism 310 Genetic Analyser von Perkin Elmer verwandt. Es trennt die DNA-Fragmente mit einer Kapillare auf.

3.5.1 Aufreinigung der DNA

400 ng Template werden für eine Sequenzierreaktion benötigt. Die entsprechende Menge DNA-Lösung wird mit dem doppelten Volumen eisgekühlten EtOH und einem zehntel Volumen NaAc gefällt. Das Pellet wird luftgetrocknet und in 14 µl Chromatografiewasser (Merck) aufgenommen.

3.5.2 Sequenzierungsreaktion

Der Reaktionsansatz besteht aus dem Template in 14 µl Wasser, 1 µl DMSO (Dimethylsulfoxid), 1 µl Primer (8 pmol/µl) und 4 µl Terminator-Ready-Reaktion-Mix (Applied Biosystems).

1. Denaturierung	96 °C	20 s
Annealing	Primerspezifisch	20 s
Extension	60 °C	240 s
Denaturierung	96 °C	20 s
Letzte Extension	60 °C	240 s

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für Sequenzierung

Das Sequenzierprogramm wird in 25 Zyklen durchlaufen. Das verwendete PCR-Gerät ist eine Eigenentwicklung des Instituts für Biochemie.

3.5.3 Vorbereitung der Proben für die automatische Messung

Nach der Sequenzierreaktion werden die Proben für die automatische Messung vorbereitet. Der Fluoreszenzfarbstoff ist jetzt in die Fragmente eingebaut, d. h., die Probe ist jetzt lichtempfindlich und muss bis zur Messung dunkel gelagert werden. Die noch erforderlichen Arbeitsschritte können aber bei zügiger Durchführung durchaus bei Licht erfolgen.

Die Probe wird mit einer modifizierten EtOH-Fällung gereinigt: 20 µl PCR-Ansatz werden mit 80 µl Chromatografiewasser, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 250 µl Ethanol (Raumtemperatur) versetzt und nach kurzem Mischen mit 14000 U bei 4 °C für eine halbe

3.5 Sequenzierung

Stunde zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen und wieder bei 14000 U zentrifugiert. Nachdem der EtOH vorsichtig abpipettiert ist, wird das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgt die Aufnahme in 12 ml Template-Suppression-Reagent (Applied Biosystems) und nach Denaturierung der Probe bei 95 °C die Auftragung auf die Kapillare des Sequenzierautomaten.

3.5.4 Auswertung der Messung

Die Chromatogramme werden manuell auf Heteroplasmie untersucht. Es muss sorgfältig zwischen einem Artefakt und einer heteroplasmatischen Mutation unterschieden werden. Es können daher nur Mutationen erkannt werden, die sich signifikant von dem Hintergrund unterscheiden. Um eine Mutation zu bestätigen, sollte dann auch der komplementäre Strang sequenziert werden.

Anschließend werden die Sequenzen mit der Cambridge-Sequenz verglichen. Dazu verwenden wir das Programm DNAtools (<http://www.seqtools.dk>).

3.6 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

3.6.1 MERRF: Ban-II A8344G

Für den Nachweis der Mutation A8344G verwandten wir das Enzym Ban-II. Es schneidet DNA, die die Sequenz GPuGCPy[^]C enthält. Das als Template eingesetzte Fragment F_{MERRF} enthält diese Sequenz als Wildtyp zweimal, es entstehen durch die Restriktionsreaktion drei neue DNA-Fragmente. Durch die Mutation A8344G entsteht eine neue Schnittstelle.

Die Reaktion findet bei 37 °C statt. Nach 24 h ist von einer vollständigen Reaktion auszugehen. Der Reaktionsansatz besteht aus 800 ng DNA, 5 µl Reaktionspuffer (10fach konz.), 1 µl Ban-II (10 U/µl, Boehringer Mannheim) und Aqua sterile bis zu einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

3.6.2 MELAS: Apa-1 A3243G

Der Nachweis der MELAS-Mutation A3243G gelingt analog zu der MERRF-Restriktion. Das verwandte Template ist das Fragment F3. Als Enzym wird Apa-I (Gibco BRL) mit der Schnittstelle GGGCC[^]C benötigt. Die Reaktionsbedingungen sind identisch. Das resultierende Restriktionsmuster ist wieder schematisch dargestellt (Abbildung 3).

3.6 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

3.6.3 LEIGH: Msp-I T8993C/G

Die LEIGH-Mutation T8993C und T8993G wird durch RFLP-Analyse von Fragment 7 nachgewiesen. Das Restriktionsmuster von Msp-I (Gibco BRL) mit der Schnittstelle C[^]CGG für dieses Fragment ist in Abbildung 3 dargestellt.

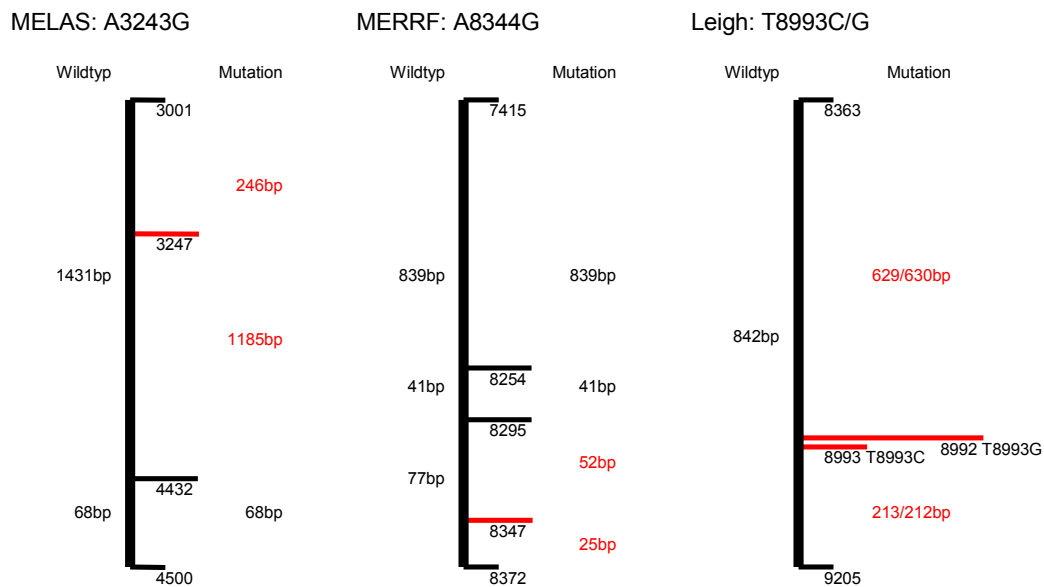


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Restriktionsmuster

3.6.4 LHON: SfaN-I 11778A/Mae-III 11778A

Für die RFLP-Analyse der LHON-Mutation 11778 stehen zwei verschiedene Tests zur Verfügung. Es kommt durch die LHON-Mutation bei der Restriktion von F10 mit SfaN-I zum Wegfall einer Schnittstelle, bei der Mae-III-Restriktion zu einer neuen Schnittstelle. Durch die Verwendung beider Testverfahren wird das Risiko eines falsch negativen oder falsch positiven Ergebnisses reduziert.

3.6 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

SfaI Restriktion: GATGC

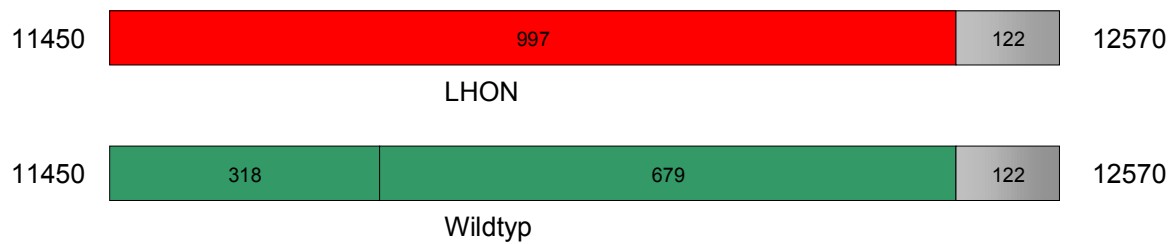


Abbildung 4: Restriktionsmuster LHON 11778 mit SfaI

MaeIII Restriktion: ^GTNAC

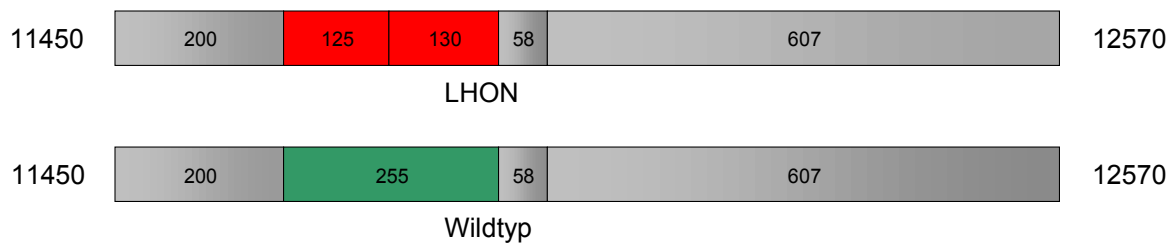


Abbildung 5: Restriktionsmuster LHON 11778 mit MAE III

3.7 Lösungen und Puffer

Fragmentspezifischer Mastermix (PCR)

- 5,55 % Vorwärtsprimer (8 pmol / 100 µl)
- 5,55 % Rückwärtsprimer (8 pmol / 100 µl)
- 1,11 % Polymerisations-Mix
- 11,11 % 10-fach Taq-Puffer
- 76,66 % Aqua sterile

Hämolyse-puffer

3.7 Lösungen und Puffer

10 mM NH_4HCO_3

144 mM NH_4Cl

H-Puffer

210 mM Mannitol

70 mM Saccharose

1 mM EDTA

5 mM HEPES (1M Lösung)

0,5 % Albumin

Ladepuffer (Agarosegele)

15 % Ficoll

50 mM EDTA

0,5 % SDS

1x TBE

0,1 % (w/w) Bromphenolblau

0,1 % (w/w) Xylencyanol

Ladepuffer (Polyacrylamidgele)

98 % deionisiertes Formamid

10 mM EDTA, pH 8,0

0,025 % Bromphenolblau

0,025 % Xylencyanol

Saccharose-Puffer

250 mM Saccharose

3.7 Lösungen und Puffer

10 mM TrisCl pH 7,4

1 mM EDTA

SDS-Lösung (0,1 %)

0,1 % SDS

1 mM EDTA

10xTBE

1 M Tris-HCl

0,83 M Borsäure

10 mM EDTA

eingestellt auf pH 8,3

TE-Puffer

10 mM TrisCl, pH 8,0

1 mM EDTA

4 Ergebnisse

4.1 LHON

4.1.1 Präparation

Es wurde mtDNA sowohl aus Leukozyten als auch Thrombozyten isoliert wie unter 3.2.1 beschrieben. Beide Blutzellreihen sollten untersucht werden, um die Mutation in der thrombo- wie auch myeloetischen Reihe nachzuweisen. Wir gehen dabei davon aus, dass zwei unabhängige Mutationsereignisse unterhalb der Stammzellebene sehr unwahrscheinlich sind. Können wir die Mutation homoplasmatisch in Leukozyten und Thrombozyten nachweisen, ist bei obiger Annahme damit zu rechnen, dass alle Zellen, die aus der Blutstammzelle hervorgehen, homoplasmatisch die LHON-Mutation tragen.

4.1.2 PCR

Die LHON-Mutation 11778A liegt im Fragment 10. Dieses wurde unter Standard-PCR-Bedingungen amplifiziert. Es konnte sauber und in großer Menge dargestellt werden.

4.1.3 Restriktionsanalyse

Der Restriktionsverdau mit zwei unterschiedlichen Enzymen erhöht die diagnostische Sicherheit. Während Mae-III die DNA schneidet, wenn die LHON Mutation 11778A vorhanden ist, schneidet SfaN1 nur die Wildtyp-DNA. Sowohl der Patient als auch die Mutter wurden mit beiden Enzymen getestet.

4.1.3.1 Patient p1

Sowohl in den Thrombozyten als auch in den Leukozyten ist die Primärmutation homoplasmatisch vorhanden. Man erkennt auf der Abbildung 6, dass das Wildtypfragment 10 von dem Enzym Mae-III dreimal geschnitten wurde. Als Längenstandard dient eine 1-kb-Leiter (L). Es sind 4 Banden (607 bp, 255 bp, 200 bp und 58 bp) bei der Kontrolle zu sehen. Bei der Patientenprobe ist eine weitere Schnittstelle hinzugekommen. Das 255 bp große Fragment fehlt, dafür sind zwei neue Fragmente (120 bp und 135 bp) zu erkennen.

4.1 LHON

Diese neue Schnittstelle wird von der LHON-Mutation an Position 11778 verursacht. Es finden sich keine Reste der Wildtypbande (255 bp).

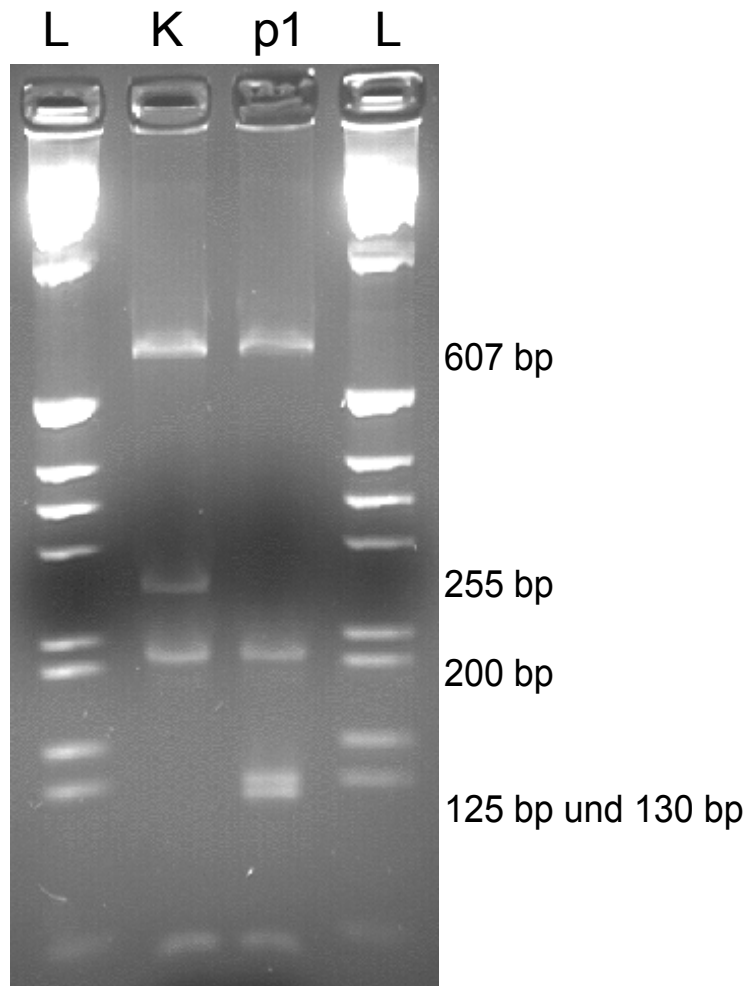


Abbildung 6: Agarosegel zur Auftrennung der Mae-III-Restriktionsfragmente

Die Mutter des Patienten p2 trägt die Mutation auch homoplasmatisch in beiden Zellreihen. Auf Abbildung 7 sieht man den Verdau von Fragment 10 (Leukozytenpräparation) mit dem Restriktionsenzym SfaN1. Die Kontrolle (K) zeigt 3 Banden (679 bp, 318 bp und 122 bp). Bei dem untersuchten Fragment 10 (p2) ist eine Schnittstelle an der Position 11778 weggefallen; die 679 bp und 318 bp großen Banden fehlen. Stattdessen entsteht eine 997 bp große Bande. Dieses Ergebnis stimmt mit dem hier nicht gezeigten Verdau mit Mae-III überein.

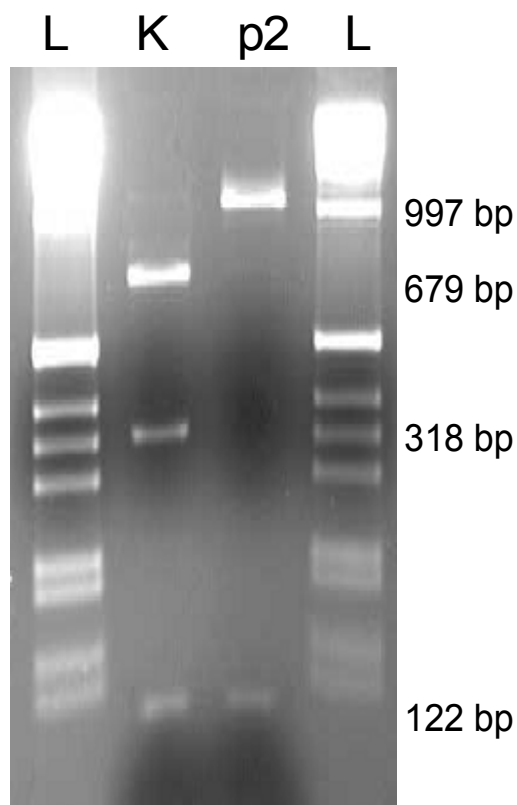


Abbildung 7: Agarosegel zur Auftrennung der *SfaN-I*-Restriktionsfragmente

4.2 Kardiomyopathien

4.2.1 Mikromuskel-Präparation

Mit dem von uns verwandten Verfahren zur Präparation mitochondrialer DNA aus Biopsieproben (siehe 3.2.2) können Gewebemengen bis zu ~ 3 mg verwendet werden. Dies zeigten Analysen von Probanden. Die gesamte DNA der Präparation wird in dem Mastermix für die LPCR aufgenommen und amplifiziert. Wie man in Abbildung 8 erkennt, sind Gewebemengen von 3 mg ausreichend, um ein Deletionsscreening mit LPCR durchzuführen. Die Mikromuskelproben (P) liefern die gleiche Menge an mtDNA-Amplifikat wie die verwandten Kontroll-Templates (K). Diese Menge ist ausreichend, um weitere Analysen durchzuführen.

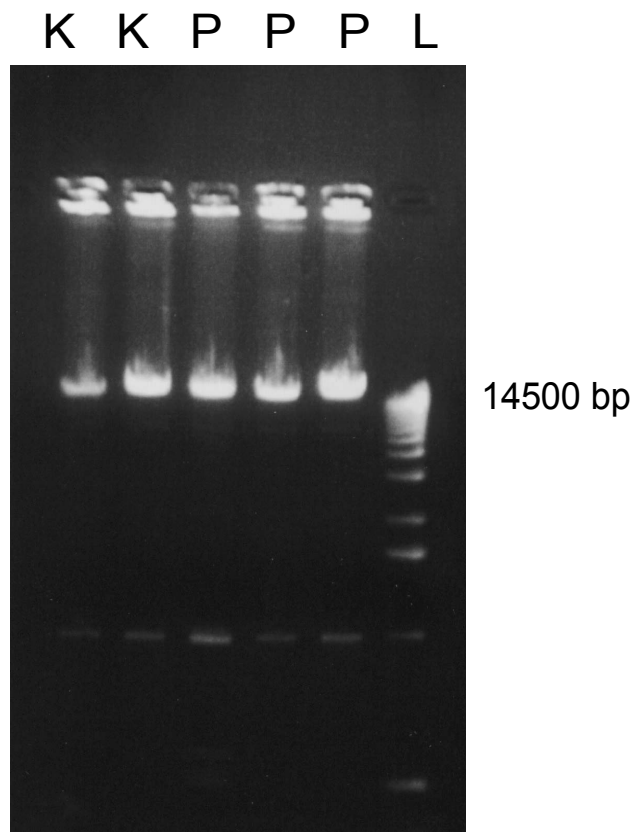


Abbildung 8: Kontroll-Mikromuskel-Präparation

4.2.2 Präparation

Von der tiefgekühlten Biopsieprobe wurde ca. 50 % für die erste Präparation verwandt. Dies entsprach bei Patient p4 einer Gewebemasse von ca. 18 mg, bei Patient p3 einer von 30 mg. Die Präparation wurde wie unter 3.2.2 durchgeführt. Die saubere, gefällte DNA wurde komplett als Template in die LPCR eingesetzt.

4.2.3 LPCR Deletionsscreening

Mit einer anschließenden LPCR kann fast das gesamte mitochondriale Genom amplifiziert werden, da zwischen den Primerbindungsstellen ca. 90 % der herkömmlichen Deletionen liegen. Man erhält eine große Menge PCR-Produkt. Vorliegende Deletionen innerhalb der Primer-Bindungsstellen werden entdeckt.

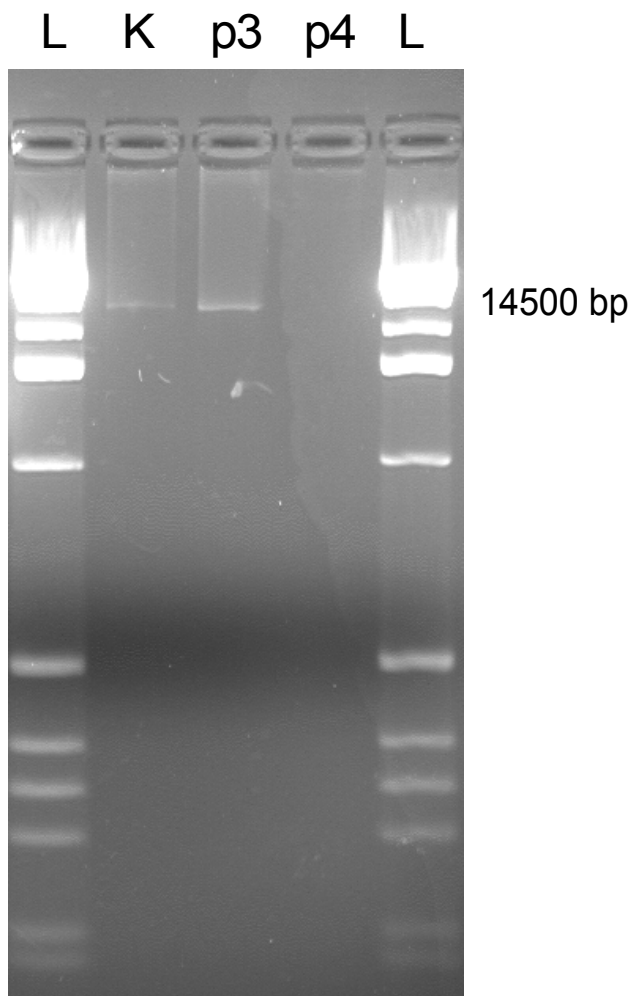


Abbildung 9: Agarosegel mit der LPCR aus Kontrolle (K), p3 und p4

Man erkennt auf der Abbildung 7 bei Patient p4 nach Ethidiumbromidfärbung keine DNA-Bande, bei Patient p3 nur eine sehr schwache Bande. Auch die Kontrollbande ist sehr dünn. Beide Banden haben eine Größe von ca. 14 kb, dies entspricht dem Wildtyp. Multiple Deletionen sind dagegen nicht zu erkennen. Das schlechte Ergebnis der Kontroll-PCR macht es aber nötig, den Versuch zu wiederholen, da hier ein Fehler bei der LPCR-Reaktion vorzuliegen scheint.

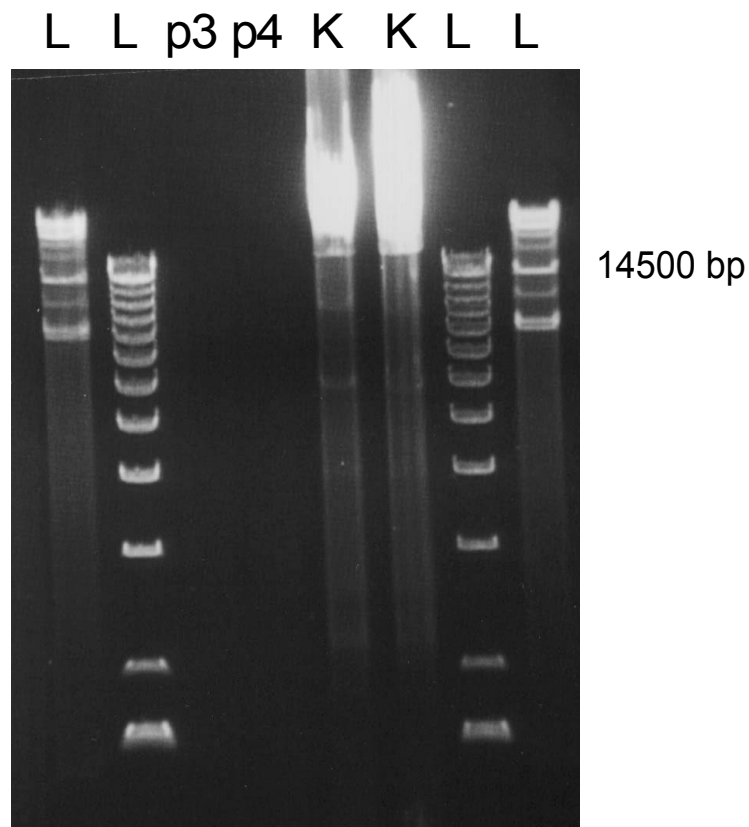


Abbildung 10: Agarosegel mit LPCR aus 2 Kontrollen (K), p3 und p4

Bei der Wiederholung wurde das restliche Biopsiematerial präpariert. Bei p4 waren noch 15,6 mg vorhanden, bei p3 noch 15,9 mg. Um Fehler bei der Präparation auszuschließen, wurden alle Puffer und Lösungen erneuert.

Diesmal war kein DNA-LPCR-Amplifikat bei den Patienten nachweisbar. Dafür waren beide Kontrollen deutlich positiv. Die LPCR hat somit funktioniert, konnte aber bei den Patienten weder mtDNA noch deren subgenomische Fragmente amplifizieren.

Da es unwahrscheinlich ist, dass beide Primerbindungsstellen deletiert sind, scheint im Falle der Patienten eine mtDNA-Depletion vorzuliegen.

4.2.4 Sequenzierung

Um neben Rearrangements auch Punktmutationen zu screenen, sollten auch die tRNAs Leucin und Isoleucin analysiert werden. In diesen beiden tRNAs ist eine Reihe von Kardiomyopathie-assoziierten Punktmutationen beschrieben. Weiterhin liegen sie zusammen mit den tRNAs für Methionin und Glutamin auf dem gleichen Fragment. Da die LPCR kein

4.2 Kardiomyopathien

mitochondriales Amplifikat geliefert hatte, wurde mittels Touch-Down-PCR das Fragment 3 aus Spuren des gefällten mtDNA-Pellets amplifiziert. Dieses Amplifikat diente als Stock für erneute PCRs von Fragment 3. Die nun mit dem Standard-PCR-Verfahren gewonnene DNA wurde in beide Richtungen sequenziert.

Trotz der für Sequenzierungen schlechten Qualität der DNA gelang eine lesbare Sequenz der zu untersuchenden tRNAs. Es konnte keine beschriebene Mutation nachgewiesen werden. Eine heteroplasmatische Mutation mit einem Heteroplasmiegrad kleiner 10 % kann aufgrund der vorliegenden Sequenzdaten nicht ausgeschlossen werden, da ein starkes Rauschen die Beurteilung verhindert.

Als Nebenbefund konnte bei Patient p3 ein Austausch von C nach T an Position nt 3387 gefunden werden. Dieser liegt nicht in einer tRNA, sondern in ND1 und führt nicht zu einem Aminosäureaustausch. Einen Eintrag in der Mitomap-Datenbank konnten wir nicht finden.

Als weiteren Polymorphismus fanden wir an Position nt 3107 bei beiden Patienten den Verlust eines Cytosins in der 12 S rRNA.^{84; 85}

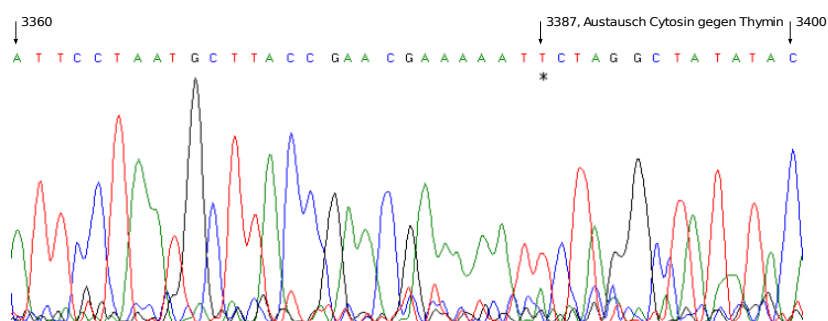


Abbildung 11: Sequenz des Fragments 3 von p4 im Bereich nt 3387

5 Diskussion

5.1 LHON

5.1.1 Pathogenese

LHON ist in Bezug auf die Pathogenese eine außergewöhnliche Krankheit. Sowohl das klinische Bild als auch die Genetik dieser Erkrankung sind gut verstanden. Es ist aber ungeklärt, welcher Pathomechanismus die Mutation mit der Optikusatrophie verbindet.

Während die meisten mitochondrialen Mutationen schwerwiegende klinische Bilder zur Folge haben, haben Patienten mit LHON eine gute Lebenserwartung, nur ihr Sehvermögen ist betroffen.

Bei den meisten mitochondrialen Erkrankungen gibt es einen Zusammenhang zwischen betroffenem Gewebe, Heteroplasmiegrad und klinischem Bild. Man geht davon aus, dass es nach Überschreiten eines gewebsspezifischen Schwellenwertes zu Funktionsstörungen kommt, da die nötige Energieversorgung des Gewebes nicht gewährleistet ist. Die LHON-Mutation dagegen liegt meist homoplasmatisch in allen Geweben vor. Dennoch wirkt sie nur auf den Nervus Optikus degenerativ. Auch sind nicht alle Mutationsträger betroffen. Es erkranken etwa 50 % der betroffenen Männer und ca. 10 % der betroffenen Frauen.¹³

Diese inkomplette Penetranz und die hohe Gewebsspezifität lassen weitere Faktoren vermuten.

5.1.1.1 *X-linked Visual-Loss-Susceptibility-Locus (VLSL)*

Die Tatsache, dass vor allem Männer an LHON erkranken, führte zu der Vermutung eines X-linked VLSL. Dieser konnte bisher nicht gefunden werden, ebenso wenig wie eine unbalancierte X-Inaktivierung, die dieses Model voraussetzt.⁸⁶⁻⁹² Dies schließt aber einen X-linked VLSL nicht aus. So ist die X-Inaktivierung gewebsspezifisch, die Studie untersuchte aber nur die Leukozyten. Dennoch scheinen aber eher anatomische und physiologische Unterschiede zwischen Männern und Frauen den Unterschied zu verursachen.

So deuten aktuelle experimentelle Arbeiten darauf hin, dass 17- β -Estradiol die Produktion von ATP verbessern und die Bildung von ROS reduzieren könnte. Es scheint weiterhin den

5.1 LHON

Einstrom von Calcium in die Zelle und die Mitochondrien zu verringern und den elektrochemischen Gradienten $\Delta\Psi$ zu stabilisieren.⁹³

5.1.1.2 *MtDN-Heteroplasmie*

Auch die Heteroplasmie von mtDNA erklärt die inkomplette Penetranz nicht. Sie ist vor allem für die unterschiedlich schweren Krankheitsbilder bei den klassischen mitochondrialen Erkrankungen ursächlich. LHON tritt aber fast immer homoplasmatisch auf, Heteroplasmie spielt nur eine untergeordnete Rolle.

5.1.1.3 *Atmungskettendefekt*

Alle primären LHON-Mutationen verändern Komplex I, es liegt also zunächst nahe, auch hier die Ursache für LHON zu suchen. Daher sind die biochemischen Eigenschaften der Mutationen, die spezifische Aktivität von Komplex I, der Sauerstoffverbrauch und die Effektivität der ADP-Phosphorylierung, bestimmt worden. Einen erhofften gemeinsamen Effekt auf Komplex I konnte man aber nicht finden. Vielmehr haben alle drei Mutationen unterschiedliche Effekte auf Komplex I, auch gibt es keine Korrelation zwischen den biochemischen Eigenschaften und dem klinischen Phänotyp. Sowohl bei erkrankten als auch gesunden Mutationsträgern finden sich gleichermaßen Aktivitätsminderungen.

Somit haben die primären LHON-Mutationen zwar Einfluss auf die Atmungskette, aber nicht in einem Ausmaß, der allein den Untergang der Neuronen erklären könnte. Die Mutationen reduzieren die an Komplex I gebundene Respirationsrate um 15-40 %, aber erst ab einer Beeinträchtigung von über 70 % sollte es zu einer Verminderung der ATP-Produktion kommen.⁹⁴⁻⁹⁷ Es wäre denkbar, dass die LHON-Mutationen den Stoffwechselweg auf eine Weise ändern, die erst in den Nervenzellen eine pathophysiologische Bedeutung erhält.⁹⁸ Nicht etwa, weil diese Zellen den größten Energiebedarf hätten (den hat die Photorezeptorschicht), sondern weil diese Zellen einen weiteren unbekanntem Faktor haben.

Dafür sprechen auch Studien aus den 60er Jahren, in denen ein Zusammenhang zwischen einer Chloramphenicol-Behandlung von Kindern mit zystischer Fibrose und einer Optikusatrophie gezeigt wurde. Das beschriebene klinische Bild erinnert sehr stark an LHON: ein plötzlicher, beidseitiger Visusverlust mit zentralem Skotom und ein Papillenödem mit anschließendem Abblassen der Papille. Neuropathologisch fand man eine Degeneration der

Ganglion-Zellschicht und des Nervus Optikus mit gleichzeitiger Demyelinisierung. Zum Zeitpunkt der Studie war noch nicht bekannt, dass Chloramphenicol ein spezifischer Inhibitor der mitochondrialen Proteinbiosynthese ist. Der auch von LHON betroffene Zelltyp reagiert also speziell empfindlich auf eine Störung der mitochondrialen Proteinbiosynthese.

5.1.1.4 Anatomie

Eine wichtige Rolle, wenn nicht die Schlüsselrolle, in der Pathogenese scheint die Anatomie zu spielen. In dem von Burde entwickelten *disk at risk*-Konzept wird postuliert, dass bestimmte anatomische Besonderheiten das Risiko einer Optikusneuropathie erhöhen. Er fand bei diesen Patienten folgende Besonderheiten: eine kleine Papille mit fehlender oder geringer Exkavation, eine erhöhte Verzweigung der zentralen Retinagefäße und eine Verbreiterung der Nervenfaserschicht.

Weiterhin fällt auf, dass die Septen der Lamina Cribosa, der Durchtrittsstelle des Nervus Optikus, entlang des horizontalen Meridians des Sehnerven enger gepackt sind und dickere Wände aufweisen. Dort nämlich verlaufen die Fasern, die die am stärksten betroffenen Gesichtsfelder versorgen, die zentralen und temporalen Anteile. Eine Anhäufung von Mitochondrien in den nicht myelinisierten Anteilen des prälaminiären Sehnervs vor der Lamina cribosa könnte man als Zeichen eines behinderten axoplasmatischen Transports deuten, der durch diese Engstelle verursacht wird.

So lassen sich die paravoveale Ganglienzellen in der Affenretina weniger auf Cytochrome-c-Oxidase anfärben, die kleinen und mittleren weniger als die großen, d. h., sie haben weniger Mitochondrien.

Ein mögliches Modell für die Pathogenese sähe dann so aus: Die LHON-Mutation führt zu einer Schwäche der Atmungskette. Dieser Defekt ist allein kein Problem, die Zelle kann ihn gut kompensieren. Erst an dieser anatomischen Enge beeinträchtigt die relative Insuffizienz der Mitochondrien den axoplasmalen Transport. Ist diese anatomische Enge so groß, dass es zu einer Axonschwellung kommt, werden die Nerven und Gefäße komprimiert und der axoplasmale Transport weiter beeinträchtigt. Es kommt zum Funktionsausfall kleiner Ganglienzellen, dann später zum Zelluntergang.⁹⁹⁻¹⁰²

5.1.1.5 Apoptose

Bei der Apoptose spielen ROS eine wichtige Rolle. Die Schlüsselposition bei der ROS-Entstehung liegt bei Komplex I der Atmungskette,⁹⁸ jenem Enzymkomplex, der von der LHON-Mutation betroffen ist. Weiterhin kann Rotenon, ein Komplex-I-Inhibitor, in einigen Zelllinien Apoptose induzieren.^{103; 104}

ROS aus der defekten Atmungskette führen zum Öffnen der *mitochondrial transition pore* und des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Kanals.¹⁰⁵ Dies sind frühe Schritte der Apoptose.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Neuronen in Kultur mit NMDA produzieren vermehrt ROS durch das Entkoppeln der Atmungskette.¹⁰⁹

Diese Fakten legen die Vermutung nahe, dass die 11778-Mutation durch ihre strukturellen Änderungen des Komplexes I die Bereitschaft zu Apoptose in den betroffenen Ganglienzellen erhöht.

5.1.1.6 Umweltfaktoren

Alkohol- und Tabakkonsum war in einer Fall-Kontroll-Studie aus dem Jahre 1996 bei Patienten mit der 3460-Mutation und 14484-Mutation bei Krankheitsbeginn erhöht, bei Patienten mit der 11778-Mutation (35 Fälle) dagegen nicht.¹¹⁰ Eine neuere Arbeit aus dem Jahre 2003 allerdings untersuchte 256 Mitglieder einer großen brasilianischen Familie mit der Mutation 11778 und fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen Rauchen und der klinischen Symptomatik.¹¹¹ Ein weiteres Argument für den Einfluss von Umweltfaktoren ist die bei Rauchern erniedrigte Komplex-I-Aktivität.¹¹² Darüber hinaus hat die Tabak-Alkohol-Amblyopie einige klinische Gemeinsamkeiten mit LHON wie einen subakuten Sehverlust, das zentrozökale Skotom und die papillär mikrovaskulären Abnormalitäten.^{113; 114}

5.1.1.7 Autoimmunerkrankung

Ein Autoimmunprozess als Ursache oder Aspekt in der Pathogenese wird von 5 Hinweisen gestützt:

1. Der subakute Beginn im jugendlichen Alter ist nicht typisch für eine genetische Erkrankung.

5.1 LHON

2. Die Papille in der Akutphase von LHON ähnelt klinisch der Sehnervpapille bei entzündlichen Erkrankungen, auch wenn kein Fluoresceinaustritt in der Angiografie zu sehen ist.
3. LHON ist bei einigen Patienten mit Erkrankungen ähnlich der multiplen Sklerose assoziiert.^{13; 115}
4. Es gibt LHON-Patienten, die eine erhöhte Konzentration von Immunglobulinen im Liquor haben.
5. Bei einer Analyse von 69 LHON-Patienten und ihren Verwandten, 58 gesunden Kontrollen und 14 Patienten mit ischämischer oder Kompressions-Optikusneuropathie hatte ein signifikanter Anteil der Patienten zirkulierende Antikörper gegen Tubulin, ein Strukturprotein des Nervus Optikus, im Serum.¹¹⁶

Dennoch ist die Theorie Autoimmunerkrankung kritisch zu sehen. Eine Immunreaktion auf den schon geschädigten Nerv ist durchaus denkbar.

5.1.2 Zytostatika Therapie

5.1.2.1 Fragestellung

Bei dem untersuchten Patienten stellte sich die Frage, ob es Interaktionen zwischen der Zytostatikatherapie und dem mitochondrialen Gendefekt geben würde. Vor allem die Apoptose-Theorie¹¹⁷ macht eine Interaktion denkbar. Wenn die Zellen durch die LHON-Mutation eine erhöhte Bereitschaft zur Apoptose haben, könnte eine apoptose-induzierende Chemotherapie gefährliche Folgen für den Patienten haben. Da die Mutation ebenfalls homoplasmatisch in befallenen Lymphozyten vorhanden ist und der homoplasmatische Nachweis der Mutation bei der Mutter des Patienten die Annahme bestärkt, dass die Mutation in allen Geweben vorhanden ist, kann man auch von einer erhöhten Apoptoseneigung in anderen Organsystemen ausgehen. Unter der zytostatischen Therapie könnte eine bis jetzt subklinische Apoptoseneigung klinisch relevant werden. Deshalb wurde der Patient klinisch genau überwacht und auch eine Dosisreduktion wurde diskutiert.

5.1.2.2 Cyclophosphamid

Cyclophosphamid ist eine alkylierende Verbindung, die zellzyklusunabhängig in der Lage ist, mit vielen Zellbestandteilen, vor allem aber der DNA, zu reagieren. Es ist ein Prodrug, das erst im Stoffwechsel in die aktive Form umgewandelt wird. Die therapielimitierende Nebenwirkung ist die hämorrhagische Zystitis.

5.1.2.3 Vincristin

Vincristin gehört zur Gruppe der Vinca-Alkaloide. Diese Stoffe hemmen die Zellteilung in der Metaphase durch Bindung an den Spindelapparat. Bei hohen Konzentrationen treten auch Chromosomenbrüche und Translokationen auf. Dann kommt es zu zytotoxischen Effekten. Durch diesen Wirkungsmechanismus ist eine direkte Schädigung der mitochondrialen DNA oder eine spezifische Schädigung der Atmungskette nicht naheliegend. Auch eine Wirkungsverstärkung durch einen vorbestehenden mitochondrialen Defekt liegt eher fern. In der Literatur ist kein Fall bekannt.

5.1.2.4 Epirubicin

Epirubicin unterscheidet sich von Doxorubicin lediglich durch die Stellung der Hydroxylgruppe im Aminozuckerrest (4'-Epidoxorubicin). Es ist im Vergleich zur Ursprungssubstanz weniger kardiotoxisch.

Doxorubicin ist ein Anthrazyklin und gehört in die Gruppe der zytotoxischen Antibiotika. Sie wirken am stärksten in der S-Phase, die Zellen akkumulieren in der G2-Phase. Die Wirkung wird auf zwei Effekte zurückgeführt: Zum einen interkaliert der Tetrazyklin-Rest mit der DNA und mindert so die Aktivität der RNA-Polymerase, und zum anderen entstehen bei der Verstoffwechslung durch die mikrosomale Cytochrom-P-450-Reduktase und NADPH Semichinon-Radikale, die über weitere Radikalreaktionen ROS entstehen lassen.

Die dosisabhängige kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin wurde schon früh mit der Schädigung mitochondrialer DNA in Zusammenhang gebracht. Schon 1993 konnte man an Mäusen zeigen, dass Doxorubicin dosisabhängig mitochondriale DNA schädigt. Es fanden sich alterstypische Deletionen bei den mit Doxorubicin behandelten Tieren.¹¹⁸

Weiterhin ist eine dosisabhängige, selektive Anhäufung von 8-Hydroxydeoxyguanosin Addukten der mtDNA von Kardiomyozyten in der Literatur beschrieben. Diese Addukte sind

bis zu ca. 5 Wochen nach der letzten Injektion von Doxorubicin nachweisbar. Es scheint, als würden nicht diese eher kurzlebigen, reversiblen Addukte, sondern ein davon ausgehender Schaden die langandauernde Produktion von ROS stimulieren. Dieser ständige oxidative Stress würde dann zu den bekannten Schäden im mitochondrialen Genom führen.¹¹⁹

Ein weiteres Zeichen dafür, dass der Wirkungsmechanismus in den Mitochondrien liegt, ist die Resistenz von Rho(0)-Zellen ohne mtDNA gegen Doxorubicin im Vergleich zu Rho(+)-Abkömmlingen der Zelllinie. Bei alkylierenden Zytostatika und Gamma-Strahlung waren beide Zelllinien gleichermaßen sensibel.¹²⁰

Aufgrund der beschriebenen Literatur ist eine unerwünschte Wirkung durch die vorbestehende Schädigung der mtDNA durchaus denkbar. Wenn der Wirkungsmechanismus in den Mitochondrien liegt, könnte auch eine geringe Vorschädigung der Atmungskette und des mitochondrialen Genoms signifikante Auswirkungen haben. Weiterhin ist zu bedenken, dass es sich nicht nur um ein einfaches Aufsummieren der schädlichen Effekte handeln muss.

5.1.2.5 Prednison

Prednison ist ein Glukokortikoid mit 4-facher glukokortikoider Potenz. Die relative mineralokortikoide Potenz beträgt nur 0,8. Für die Zytostatikatherapie von Non-Hodgkin-Lymphomen nutzt man die Wirkung auf das lymphatische Gewebe. Prednison induziert Apoptose bei lymphatischen Zellen.

5.1.2.6 Klinischer Verlauf und onkologische Tests

Der Patient zeigt während der Therapie keinerlei atypische Reaktionen auf die Medikamente und die Bestrahlung. Er befindet sich zurzeit in vollständiger Remission.

Um weitere Informationen zu erhalten, wurden von der medizinischen Klinik IV weitere in vitro Untersuchungen durchgeführt.

Ein Drug Sensivity Array wurde verwandt, um die 50 %ige Wirkkonzentration (IC_{50}) von Mafosfamid zu bestimmen. Mafosfamid ist ein Abkömmling des Cyclophosphamids, das in vivo erst in die aktive Form umgewandelt werden muss. Mafosfamid ist dagegen schon in vitro wirksam. Bei der Untersuchung wurde der IC_{50} der Patienten-Probe mit 6 gesunden Kontrollen verglichen. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten und denen der gesunden

5.1 LHON

Kontrollen im MTT-Assay (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromid) bezüglich der Empfindlichkeit für Mafosfamid gefunden werden.

Mit einer Durchflusszytometrie sollte der Anteil an apoptotischen Zellen nach 24 h und 48 h nach unterschiedlicher Exposition mit Mafosfamid verglichen werden. Zellen, die Annexin V positiv und Propidiumiodid negativ sind, repräsentieren den Anteil an Zellen in der frühen Phase der Apoptose; sind beide Proteine an der Oberfläche der Zelle nachweisbar, handelt es sich um Zellen, die sich in der späten Phase der Apoptose befinden oder sekundär durch Nekrose zugrunde gehen.

Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass der Anteil von Zellen in der Apoptose bei geringen Dosen bei dem Patienten im Vergleich zu den Kontrollen vermindert, bei hohen Dosen gleich groß war.¹²¹

5.1.3 Literatur und abschließende Bewertung

Zumindest eine verwandte Substanz, das Epirubicin, wird in der Literatur mit mitochondrialen Gendefekten in Verbindung gebracht. Der Wirkmechanismus scheint an der mtDNA anzusetzen. Es finden sich aber vor allem Deletionen nach Exposition mit Doxorubicin, Punktmutationen sind nicht beschrieben. Somit ist es durchaus denkbar, dass die LHON-Mutation 11778, die ja über einen bis jetzt ungeklärten Pathomechanismus wirkt, keine Interaktion mit Doxorubicin zeigt. Doxorubicin dagegen wirkt dosisabhängig über sich akkumulierende Deletionen der mtDNA und führt vor allem zu einer Kardiomyopathie, die eher über die klassische Pathogenese von mitochondrialen Erkrankungen zu erklären ist. So führen die Deletionen zu einer sinkenden Leistung der Atmungskette, dies wiederum führt zu einer sinkenden Leistungsfähigkeit des betroffenen Organsystems.

Somit lag die Hauptsorge auf der bei der LHON-Mutation diskutierten Apoptoseneigung, die möglicherweise mit der Polychemotherapie interagiert. Doch auch die Apoptose-Hypothese erklärt die auffallenden Besonderheiten dieser Erkrankung nicht. Erst weitere Fakten, wie z. B. die Anatomie, die Burde in seinem *disk at risk*-Konzept beschreibt, liefern einen wichtigen Schlüssel für das Verständnis.

So entwickelte Howell 1998 eine Hypothese, die versucht, eine Verbindung zwischen dem klinischen Bild und der zugrundeliegenden Mutation herzustellen:

Die primären LHON-Mutationen betreffen den Komplex I der Atmungskette. Dieser nimmt

5.1 LHON

eine Schlüsselstellung bei der Entstehung von freien Radikalen ein. So führt die Mutation zu einer Funktionseinschränkung der Atmungskette und dadurch vermutlich auch zu einem erhöhten Anfall an freien Radikalen. Diese Funktionseinschränkung wird von den Zellen normalerweise gut kompensiert. Erst die besondere Mikroanatomie und Histochemie der Retina und des Nervus Optikus macht die Ganglienzellschicht besonders verwundbar:

- Die Lamina cribrosa ist bedingt durch die begrenzte Vaskularisation besonders gefährdet durch Ischämie.
- Die Durchtrittsstellen des Nervus Optikus durch die Lamina cribrosa sind gerade dort eng, wo die Nervenfasern durchtreten, die die am stärksten betroffenen Gesichtsfelder versorgen.
- Vor dieser Durchtrittsstelle findet man eine Anhäufung von Mitochondrien. Dies weist auf einen gestörten axonalen Transport hin. Entlang des Axons transportierte Mitochondrien können diese Engstelle nicht oder nur langsam passieren.

So könnte auch eine nur leicht gestörte Atmungskette die Funktion des axonalen Transports weiter einschränken und zu einer Schwellung des Nervs führen. Eine Axonschwellung würde aber wiederum die Situation an dieser Engstelle weiter verschlechtern. Wird dann eine kritische Schwelle durch äußere Faktoren wie Wachstum, anatomische Besonderheiten oder Umweltgifte überschritten, bricht der axonale Transport zusammen, die Axonschwellung und damit die schlechte Sauerstoffversorgung nehmen zu. Dadurch ist eine normale Funktion des Nervus Optikus nicht mehr möglich. Steigt in dieser Phase des akuten Sehverlustes die Konzentration von ROS durch den veränderten Komplex I und die ischämische Situation soweit an, dass die *mitochondrial permeability transition pore* sich öffnet, führt dies zu einer Aktivierung der Apoptose durch Schwellung der Mitochondrien und Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten. Cytochrome-c wird freigesetzt, der NMDA-Kanal aktiviert.

Erst diese führt zu einer endgültigen Degeneration des Sehnervs und endgültigem Sehverlust.

Nach dieser Theorie von Howell führt die LHON-Mutation 11778 zu einer verstärkten Apoptose-Neigung durch ein vermehrtes Vorkommen von ROS im besonderen Kontext der anatomischen Situation an der Lamina cribrosa.

Es zeigte sich aber weder in den durchgeführten *in vitro* Tests noch im klinischen Verlauf eine veränderte Empfindlichkeit für eine zytostatische Polychemotherapie, die ja auch durch

Zellschädigung Apoptose induziert. Auch die anschließende Bestrahlung wurde gut vertragen. Aus unserer Verlaufsbeobachtung lässt sich somit kein weiteres Indiz für die Theorie von Howell ableiten. Unser Fall steht aber auch nicht im Widerspruch zu dieser Theorie, da sie als Bindeglied zwischen Mutation und Krankheitsbild die Mikroanatomie und Histochemie dieser besonderen Region Lamina cribrosa benutzt.

5.2 Kardiomyopathie

5.2.1 Intergenomische Kommunikation

MtDNA-Replikation ist ein gut geregelter Prozess, der unabhängig vom Zellzyklus abläuft. Eine Vielzahl an Proteinen, die alle im Kern codiert sind, ist daran beteiligt. Kommt es zu Störungen zwischen dem Zusammenspiel der kerncodierten Faktoren und der mtDNA, läuft die Replikation fehlerhaft ab; es entstehen Deletionen und bzw. oder Depletionen.

Somit sind diese Faktoren natürlich Kandidatengene für erbliche Erkrankungen mit mtDNA-Deletionen oder Depletionen.

Daneben konnten multiple Deletionen und mtDNA-Depletionen bei vielen degenerativen Erkrankungen gefunden werden. Sie werden im Allgemeinen als sekundärer Effekt von Schädigungen der mtDNA betrachtet.

5.2.1.1 Multiple Deletionen

Multiple mtDNA-Deletionen bei autosomal vererbten Erkrankungen sind schon lange bekannt. 1989 wurde die autosomal dominante progressive externe Ophthalmoplegie als erste Erkrankung des intergenomischen Signaltransfers beschrieben.¹²² Die Ursache dieser Erkrankung, die aufgrund ihrer autosomal dominanten Vererbung auf der nDNA zu finden sein musste, war lange Zeit unbekannt. Erst in den letzten Jahren konnten der Genlokus zunächst auf drei verschiedene Loci eingeeengt werden (10q24, 3p14-24 und 4q34-35), dann aber auch verschiedene Mutationen gefunden werden.

Bis heute sind Mutationen in drei verschiedenen Genen gefunden worden: ANT1 codiert den Adenin-Nukleotid-Translokator-1, ein Protein, das den ATP- und ADP-Transport an der inneren Mitochondrienmembran in Muskelzellen kontrolliert. Das Gen liegt auf Chromosom 10q24. Der genaue Pathomechanismus ist noch unklar, ein möglicherweise resultierendes

5.2 Kardiomyopathie

Ungleichgewicht im mitochondrialen Deoxynukleotidvorrat könnte die mtDNA-Poymerase- γ stören.¹²³

Spelbrink et al. fanden 2001 auf Chromosom 10 Mutationen im Gen C10orf2. Dieses Gen codiert für ein Protein, das zu einer Klasse von hexamerischen Helikasen gehört. Aufgrund von Färbeeigenschaften wurde das Genprodukt Twinkle genannt.^{124; 125}

Van Goethem et al. fanden im selben Jahr eine Mutation im B-Motiv der mtDNA-Polymerase- γ .¹²⁶ Seitdem sind noch weitere Mutationen in diesen Genen gefunden worden.¹²⁷⁻¹³⁹

5.2.1.2 MNGIE

MNGIE ist durch den kürzlich aufgeklärten Pathomechanismus eine außergewöhnliche mitochondriale Erkrankung. Sie ist klinisch charakterisiert durch Beginn zwischen 1. und 5. Dezennium, Ptose, progressive externe Ophthalmoparese, gastrointestinale Dysmotilität, Kachexie, periphere Neuropathie und Leukenzephalopathie. Sie wird autosomal rezessiv vererbt und zeigt sowohl multiple Deletionen der mtDNA als auch eine mtDNA-Depletion. Damit verursacht eine gestörte intergenomische Kommunikation diese Multisystemerkrankung, fraglich war nur, welches Gen dafür verantwortlich ist.

Durch Linkage-Analysen von vier ethnisch unterschiedlichen Familien mit 398 polymorphen Markern konnte der MNGIE-Lokus auf den langen Arm von Chromosom 22 eingeengt werden. Drei Kandidatengene wurden ausgeschlossen: Arylsulfatase-A, Carnitin-Palmitoyltransferase I und die 70 kDa große Untereinheit der ATP-abhängigen DNA-Helikase.¹⁴⁰

Durch die Analyse von drei weiteren Familien wurde die Region weiter eingeengt. Als Ursache wurde 1999 dort ein Gen gefunden, das die Thymidin-Phosphorylase (TP) codiert.

Es fanden sich bis heute 35 Patienten aus 21 unterschiedlichen Familien mit heterozygoten oder homozygoten TP-Mutationen. Es konnten bisher 16 unterschiedliche Mutationen charakterisiert werden. Spektrophotometrische Messungen an Leukozyten von homozygoten und heterozygoten Probanden und gesunden Kontrollen ergaben eindeutig einen Funktionsverlust durch die Mutation. Homozygote zeigten keine, heterozygote nur 30%ige Aktivität der TP.^{141; 142}

5.2 Kardiomyopathie

Die TP ist ein Protein, das aus 482 Aminosäuren besteht. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Thymidin zu Thymin. Dadurch ist der Abbau von Thymidin nicht möglich, es kommt letztendlich zu einem verstärkten Aufbau von Deoxythymidintriphosphat und damit zu einem Ungleichgewicht zwischen den Trinukleotiden. Dieses könnte die mtDNA-Replikation stören und so die Depletion der mtDNA induzieren.¹⁴³

5.2.1.3 MtDNA-Depletion-Syndrom (MDS)

Unter dem mtDNA-Depletions-Syndrom (MDS) fasst man eine heterogene Gruppe von schweren mitochondrialen Erkrankungen im Säuglings- und Kindesalter zusammen, die als wichtigsten molekulargenetischen Befund eine signifikante Verminderung der mitochondrialen DNA zeigen.

Es sind sowohl erworbene (z. B. medikamenteninduziert) als auch autosomal-rezessive und maternal vererbte Formen bekannt. Eine einheitliche klinische Unterscheidung anhand des Phänotyps ist derzeit aufgrund der wenigen beschriebenen Fälle und der ständig wachsenden Zahl an zugrundeliegenden Mutationen nicht möglich.

Als Pathomechanismus liegt bei den bislang gefundenen Formen wahrscheinlich eine Störung der mtDNA-Replikation vor. Diese wird von einer Vielzahl bislang noch unbekannter Proteine kontrolliert. Weiterhin müssen die 4 Desoxynukleotide in ausgeglichener und ausreichender Konzentration vorliegen, um die mtDNA-Replikation zu ermöglichen. Im Zytosol vorhandene Desoxynukleotide können aufgrund ihrer elektrischen Ladung die Mitochondrienmembran nicht durchdringen. Bislang ist nur ein Transporter, der *deoxynukleotid carrier* (DNC), bekannt. Die Produktion von Desoxynukleotiden im Zytosol erfolgt während der Mitose, die mtDNA wird dagegen unabhängig vom Zellzyklus repliziert, sodass in postmitotischen Geweben keine Kompensation über den DNC möglich ist. Eine de novo-Synthese ist in den Mitochondrien nicht möglich, sodass die Wiederverwertung der Nukleotide erforderlich ist.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷

S. Alberio unterscheidet in seinem Review aus dem Jahr 2007¹⁴⁶ in Anlehnung an die bislang beschriebenen klinischen Phänotypen und gefundenen Mutationen eine myopathische, eine encephalomyopathische und eine hepatocerebrale Form.

5.2 Kardiomyopathie

5.2.1.3.1 *Myopathisches MDS*

Die myopathische Form beginnt entweder bereits im Neugeborenenalter und führt im Verlauf weniger Monate durch zunehmende respiratorische Insuffizienz aufgrund einer Schwäche der Atemmuskulatur zum Tode oder entwickelt sich deutlich langsamer im Verlauf von Jahren und kann dabei häufig eine Muskeldystrophie imitieren. Gemeinsam ist beiden Verlaufsformen eine für eine mitochondriale Myopathie ungewöhnliche CK-Erhöhung, die die differenzialdiagnostische Abgrenzung zur Muskeldystrophie zusätzlich erschwert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen ebenfalls strukturelle Auffälligkeiten der Myoplasmamembran, die denen einer Muskeldystrophie vom Typ Duchenne ähneln.

Bei der kongenitalen Form finden sich bereits zu Beginn RRF und COX-negative Fasern. Diese können bei der kindlichen Verlaufsform initial fehlen. Biochemische Analysen zeigen eine Aktivitätsminderung jener Atmungskettenkomplexe, die mitochondrial codierte Untereinheiten enthalten.

Bei der kongenitalen Form sind bereits 11 verschiedene Mutationen im *TK2*-Gen der mitochondrialen Thymidinkinase 2 bei 12 Patienten gefunden worden. Bei einem Fall eines MDS, das klinisch und elektromyografisch als SMA imponierte, lag allerdings ebenfalls eine Mutation im *TK2*-Gen vor.^{146; 148}

5.2.1.3.2 *Encephalomyopathisches MDS*

Diese bislang erst bei 2 Patienten nachgewiesene autosomal-rezessiv vererbte Form wird durch eine homozygote Mutation in der Beta-Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthase (SUCLA) verursacht.

Der Index-Patient fiel klinisch durch eine schwere psychomotorische Verlangsamung mit herabgesetztem Muskeltonus, Hörminderung und generalisierten Anfällen auf, der ebenfalls betroffene Cousin zeigte ein ähnliches klinisches Bild. Bei beiden war die Aktivität im Komplex I und IV der Atmungskette im Muskelgewebe signifikant herabgesetzt, während Komplex III und V nur wenig beeinträchtigt war, passend dazu war das Verhältnis von mtDNA und nukleärer DNA um 32 % reduziert. Leber und Niere waren normal.¹⁴⁴

5.2.1.3.3 *Hepatocerebrale MDS*

Die bislang am häufigsten beschriebene Form des MDS ist die hepatocerebrale Form. Hierbei

5.2 Kardiomyopathie

steht ein frühes, rasch progredientes Leberversagen in Vordergrund. Es zeigt sich eine reduzierte Aktivität aller mitochondrial codierten Atmungskettenkomplexe in den Lebermitochondrien. Bislang sind Mutationen in drei verschiedenen Genen gefunden worden: *DGOUK*, *MPV17* und *POLG*.

Die mitochondriale Deoxyguanosinkinase (dGK), codiert von *DGOUK*, katalysiert die Phosphorylierung der Purindeoxyribonukleoside zu den jeweiligen Nukleotiden. Genetisch fanden sich 10 verschiedene Mutationen in *DGOUK* bei 12 Patienten mit hepatocerebralem MDS.

Das Genprodukt von *MPV17* ist ein bislang unbekanntes Protein. Experimentelle Daten lassen vermuten, dass es sich um ein mitochondriales Protein mit Beziehung zur inneren Mitochondrienmembran handelt. Drei Patienten mit Mutationen in diesem Gen auf Chromosom 2p21-22 sind bislang beschrieben. Klinisch kam es zu ausgeprägten Hypoglykämien, einer Laktatazidose und einem Ikterus durch eine progrediente Leberzirrhose.¹⁴⁹

Eine spezielle Form der hepatocerebralen MDS ist das Alpers-Huttenlocher-Syndrom. Die Patienten zeigen eine spongiforme Degeneration der grauen Substanz sowohl des Kortex als auch der tiefen Kerngebiete. Klinisch äußert sich dies in therapierefraktären epileptischen Anfällen und schwerer psychomotorischer Retardierung. Zusätzlich besteht auch hier eine progrediente Hepatopathie, die insbesondere die Therapie der Anfälle erheblich erschwert, da nahezu alle Antikonvulsiva hepatotoxisch sind.¹⁴⁶

Genetisch finden sich bei dieser Unterform, die klinisch bereits 1931 durch Bernard Alpers beschrieben wurde, Mutationen im *POLG*-Gen für die mitochondriale DNA-Polymerase. Es codiert die 140 kDa große katalytische Untereinheit pol- γ -A, besteht aus 23 Exons und ist lokalisiert auf Chromosom 15q25. Mutationen in diesem Gen sind mit einer Vielzahl von Phänotypen vergesellschaftet. So sind Mutationen in diesem Gen bereits sowohl bei der autosomal dominanten als auch bei der autosomal rezessiven progressiven externen Ophthalmoplegie^{126; 127; 132}, beim symptomatischen Parkinson-Syndrom¹⁵⁰, bei der spinocerebellären Ataxie mit Epilepsie (SCAE) und bei der *sensory ataxic neuropathy, dysarthria and ophthalmoparesis* (SANDO)^{139; 151; 152} gefunden worden. Im Unterschied zum AHS mit einer Depletion der mtDNA¹⁵³⁻¹⁵⁵ fanden sich allerdings bei diesen Erkrankungen multiple Deletionen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. So konnten multiple

5.2 Kardiomyopathie

Deletionen zwar bei der SCAE und der SANDO nachgewiesen werden, sind aber kein frühes oder wegweisendes Merkmal für diese Erkrankungen. MtDNA-Depletionen sind für das AHS allerdings ebenfalls nicht sensitiv oder spezifisch.¹⁵⁶ Dies könnte bedeuten, dass die gefundenen Mutationen über einen Schädigungsmechanismus, der über die gestörte mtDNA-Replikation hinausgeht, zu dem klinischen Phänotyp führt. Bislang sind 26 verschiedene Mutationen im *POLG*-Gen bei 31 Patienten mit AHS gefunden worden.

5.2 Kardiomyopathie

Mutationen	Patienten	Protein	
TK2		Eintrag NP_004605	Eintrag AAC51167
487-489GC>AA ¹⁵⁷	1	H163N	H90N
763T>A ¹⁵⁷	3	I254N	I181N
487-489GC>AA/449C>T ¹⁵⁸	1	H163N/T150M	H90N/T77M
287C>G/287C>G ¹⁵⁸	1	I95M/I59M	I22M/I22M
449C>T/449C>T ¹⁵⁸	3	T150M/T150M	T77M/T77M
547C>G/760C>T ¹⁵⁹	1	R225G/R296X	R183G/r254X
nc ¹⁵⁹	1	fs192X/-	fs149X/-
675C>G/NNNdel ¹⁶⁰	1	R225G/K244del	R152G/K171del
449C>T/701G>A ¹⁶¹	1	T150M/R234K	T77M/R161K
324C>G/770T>C ¹⁶²	1	C108W/L257P	nc
542C>T/542C>T ¹⁶²	1	A181V/A181V	nc
460T>A/515G>A ¹⁴⁶	1	Y154N/R172Q	Y81N/R99Q
SUCLA2			
13 bp del + 5 bp ins ¹⁴⁴	1		
DGOUK			
204delA/204delA ¹⁶³	3	del68fs80X	
313C>T/313C>T ¹⁶⁴	1	R105X	
763dupGAAT/763dupGAAT ¹⁶⁵	1	fs	
609delGT/609delGT ¹⁶⁵	1	fs	
425G>A/679G>A ¹⁶⁵	1	R142K	
nc ¹⁶⁶	3	D255Y	
749T>C/749T>C ¹⁶¹	1	L250S/L250S	
603-604delGA/8T>G ¹⁴⁶	1	K201fs214X/IVS4splicing site	
POLG			
2243G>C/3629Ains ¹⁵³	1	W748S/Y1210X	
713C>T/2243G>C ¹⁵³	1	L244P/W748S	
1399G>A/2542G>A ^{153; 155; 167}	3	A467T/G848S	
1399G>A/3482 + 2T>C ¹⁵³	1	A467T/Splice site	
1399G>A/2869G>C ¹⁵³	1	A467T/A957P	
1399G>A/1399G>A ^{153; 155}	2	A467T/A467T	
694C>G/752C>T;1760C>T ¹⁵³	1	R232G/T251I;P587L	
1399G>A/2246T>C ¹⁵⁶	1	A467T/F749S	
1399G>A/2554C>T ¹⁵⁶	1	A467T/R852C	
1399G>A/2517G>T ¹⁵⁴	1	A467T/E873X	
1399G>A/2740A>C ^{156; 167}	2	A467T/T914P	
1399G>A/2897T>G ¹⁵⁶	1	A467T/L966R	
1399G>A/3057G>A ¹⁵⁵	1	A467T/W1020X	
1399G>A/3518insGATC ¹⁵⁶	1	A467T/L1173X	
1399G>A/3573G>T ¹⁶⁷	1	A467T/K1191N	
926G>A/1880G>A ¹⁶⁷	1	R309H/R627Q	

5.2 Kardiomyopathie

2209G>C/2300C>A ¹⁶⁷	1	G737R/A767N
1399G>A/IVS15-9_12del ¹⁶⁷	1	A467T/-
1399G>A/IVS21 + 1T>C ¹⁶⁷	1	A467T/-
3286C>T;3708G>T/3286C>T;3708G>T ¹⁶⁷	1	R1096C;Q1236H/R1096C;Q1236H
1399G>A;2653A>T/2637T>G;3428A>G ¹⁶⁷	1	A467T;T885S/Q879H;E1143G
1880G>A/3287G>A ¹⁶⁷	1	R627Q/R1096H
2243G>C/3428A>G-2542G>A ^{155; 168}	5	W748S/E1143G-G848S
MPV17		
149G>A/149G>A ¹⁴⁹	1	R50Q/R50Q
498C>A/498C>A ¹⁴⁹	1	N166K/N166K
148C>T/116-141del ¹⁴⁹	1	R50W/fs

Tabelle 9: MDS-Mutationen

5.2.1.3.4 *TK2, DGUOK und SUCLA2 Pathomechanismus*

Die für die Replikation erforderlichen Deoxynukleotide müssen in einem ausgeglichenen Verhältnis verfügbar sein. Die Thymidinkinase 2 (TK2) und die Deoxyguanosinekinase (dGK) sind Teil der mitochondrialen Wiederverwertung der Purine und Pyrimidine (siehe Abbildung 12). Da die durch das *SUCLA2*-Gen codierte Beta-Untereinheit der ADP-bildenden Succinyl-CoA-Synthase-Ligase eng mit der mitochondrialen Nukleotid-Diphosphat-Kinase verbunden ist^{169; 170}, könnte dies dadurch ebenfalls die Homöostase der Nukleotiddiphosphate stören.

Die Gewebsspezifität der gefundenen Mutationen lässt sich dadurch allerdings nicht erklären. Selbst unterschiedliche Mutationen im selben Gen, wie z. B. *POLG*, können unterschiedliche Gewebe betreffen. Dieser Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt. Eine Möglichkeit könnte eine gewebsspezifische Kompensation über die zytosolischen Deoxyribonukleotidkinasen sein. So ist die Aktivität der zytosolischen Desoxycytidinkinase (dCK) im Gehirn und in der Leber besonders gering, eben jenen Organen, die durch die verminderte Aktivität der dGK durch die Mutation in *DGUOK* am meisten betroffen sind. Diese Möglichkeit kommt dagegen bei der TK2 nicht in Betracht, da die Aktivität der zytosolischen Thymidinkinase 1 (TK1) in allen postmitotischen Geweben einschließlich des Muskels sehr gering ist. Da kein Patient mit Mutationen in *TK2* homozygot für Mutationen mit Funktionsverlust ist, ist von einer geringen Restfunktion der TK2 auszugehen. Somit könnte eine hohe Expressionsrate der TK2 die Aktivitätsminderung kompensieren. Muskeln haben dagegen die geringste Expressionsrate der TK2 bei einem sehr hohen Energiebedarf,

5.2 Kardiomyopathie

sodass hier die Mutation als Erstes symptomatisch werden könnte.^{145; 171}

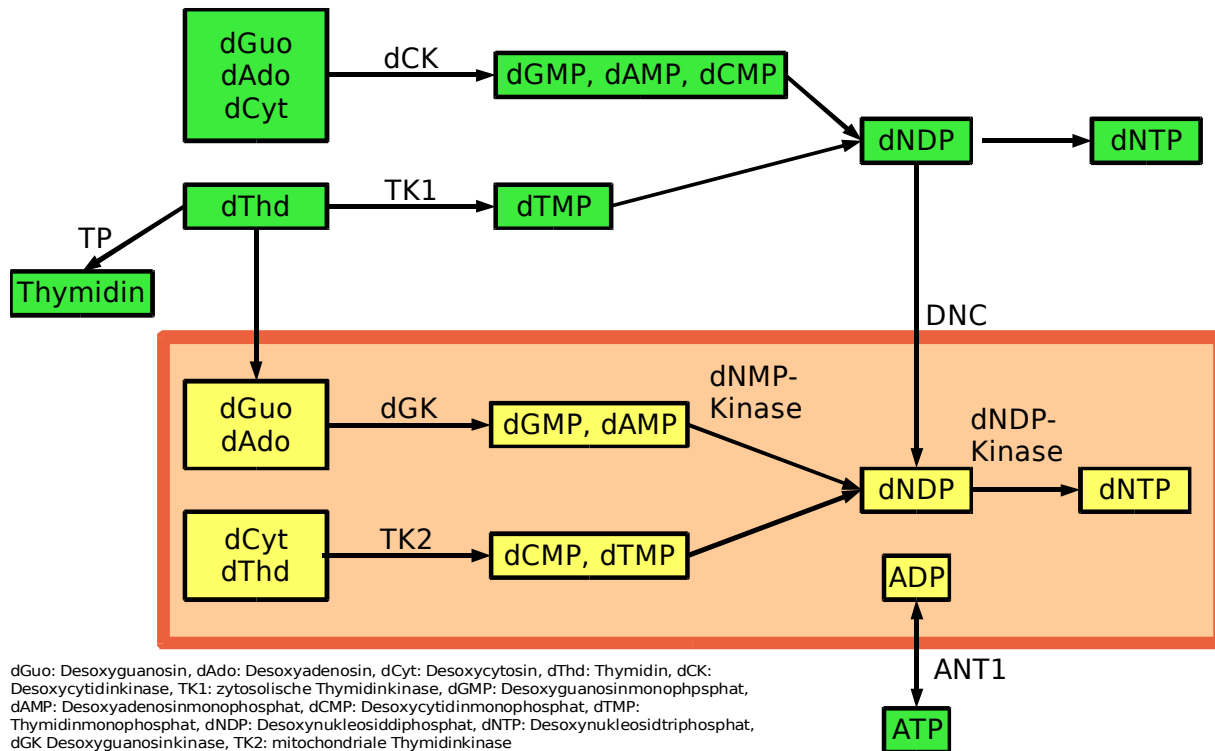


Abbildung 12: Mitochondrialer Nucleotidstoffwechsel¹⁴⁷

5.2.1.3.5 POLG Pathomechanismus

Die meisten Patienten mit *POLG*-Mutationen präsentieren sich klinisch mit einem AHS. Fast alle haben entweder den Aminosäureaustausch A467T oder W748S in der *linker region*, bei allen fand sich zumindest eine Mutation in diesem Bereich. Die Ursache dafür ist bislang unbekannt.

Der Austausch A467T führt zu einer beeinträchtigten Prozessivität der DNA-Polymerase. Die Interaktion von Pol- γ -A mit der Untereinheit Pol- γ -B wird gestört, sodass es zum Ablösen der DNA-Polymerase von der mtDNA während der Replikation kommt. Dadurch entstehen vermehrt Deletionen und Depletionen.^{146; 153; 172}

5.2.1.3.6 MPV17 Pathomechanismus

Die Rolle von *MPV17* ist noch weitgehend ungeklärt. In Fibroblasten von *MPV17* Knock-out-Mäusen ist der Level von ROS reduziert, eine Überexpression dagegen führt zu einem

5.2 Kardiomyopathie

erhöhten Level.¹⁷³ Dies lässt vermuten, dass MPV17 eine Rolle im Stoffwechsel der ROS spielt.

5.2.1.3.7 Erworbenes MDS als Zeichen einer sekundären mtDNA-Schädigung

Nukleosid Analoga zur antiviralen Therapie wie Zidovudin führen zu einer dosisabhängigen mitochondrialen Myopathie. In molekulargenetischen Untersuchungen zeigen sich Depletionen der mtDNA, verursacht durch eine Hemmung der mtDNA-Polymerase- γ . Fialuridine führte in einer abgebrochenen Studie zur Therapie von chronischer Hepatitis B-Infektion zu schweren Nebenwirkungen, ähnlich den Symptomen mitochondrialer Systemerkrankungen.¹⁷⁴⁻¹⁷⁸

5.2.2 Bedeutung der gefundenen Veränderungen

Die Klinik mit proximaler Muskelschwäche vom Gliedergürteltyp, Ptosis und Kardiomyopathie und die histologischen Befunde mit einer ungewöhnlichen Dystrophieform im Muskel und im Myokard der Patientin p3 erinnern an den Phänotyp der myopathischen Form des MDS. Im elektronenmikroskopischen Bild dominieren die mitochondrialen Veränderungen, es herrscht aber ein pleomorphes Bild mit ausgeprägten Veränderungen auch in anderen Zellorganellen vor. Darüber hinaus waren die mitochondrialen Veränderungen im Jahre 1990 noch nicht nachweisbar, wohl aber die Kernveränderungen. Aus dem zeitlichen Verlauf der Veränderungen könnte man somit ableiten, dass die mitochondrialen Veränderungen nicht die Ursache der Erkrankungen sein können. Allerdings sind bei einigen Erkrankungen mit multiplen Deletionen oder Depletionen wie dem AHS, das durch Mutationen der mitochondrialen DNA-Polymerase die Replikation der mtDNA stört, die Veränderungen der mtDNA ein spätes Krankheitsmerkmal. Dennoch könnten auch die Veränderungen der mitochondrialen DNA, die wir gefunden haben, nur eine Folge der vorbestehenden Zerstörung der Organellen sein. Eine allgemeine Dysfunktion der Zelle aus unbekannter Ursache würde auch die Atmungskette stören; aus der gestörten Atmungskette werden ROS freigesetzt, die zu dieser unspezifischen Zerstörung der DNA führen, die wir gefunden haben. Bei der Patientin konnte auch einmalig ein L-Amplifikat gewonnen werden, wenn auch in sehr geringer Menge. Dies war bei dem Patienten p4 nicht möglich.

Bei dem Patienten p4 fallen unter der Vielzahl der Befunde zwei sehr spezifische Veränderungen auf: die *ragged red fibers* und die verminderte Aktivität der Atmungskette

5.2 Kardiomyopathie

einschließlich der Cytochrom-c-Oxidase. Beides lenkt den Verdacht auf eine mitochondriale Ursache der Erkrankung. Ein weiterer wichtiger Befund ist die Immunhistochemie und der Western-Blot, die eine Muskeldystrophie vom Typ Becker vermuten lassen. Der molekulargenetische Nachweis für diese Erkrankung konnte nicht erbracht werden. Eine direkte Verbindung zwischen dem fehlenden Dystrophin und der reduzierten Cytochrom-c-Oxidase ist nicht vorstellbar. Allerdings finden sich bei Patienten mit mtDNA-Depletion ähnliche Veränderungen der Plasmamembran in den RRF wie bei der Duchenne-Muskeldystrophie. Dies könnte auch die erhöhte Serum-CK erklären, ein für mitochondriale Myopathien ungewöhnliches Merkmal.

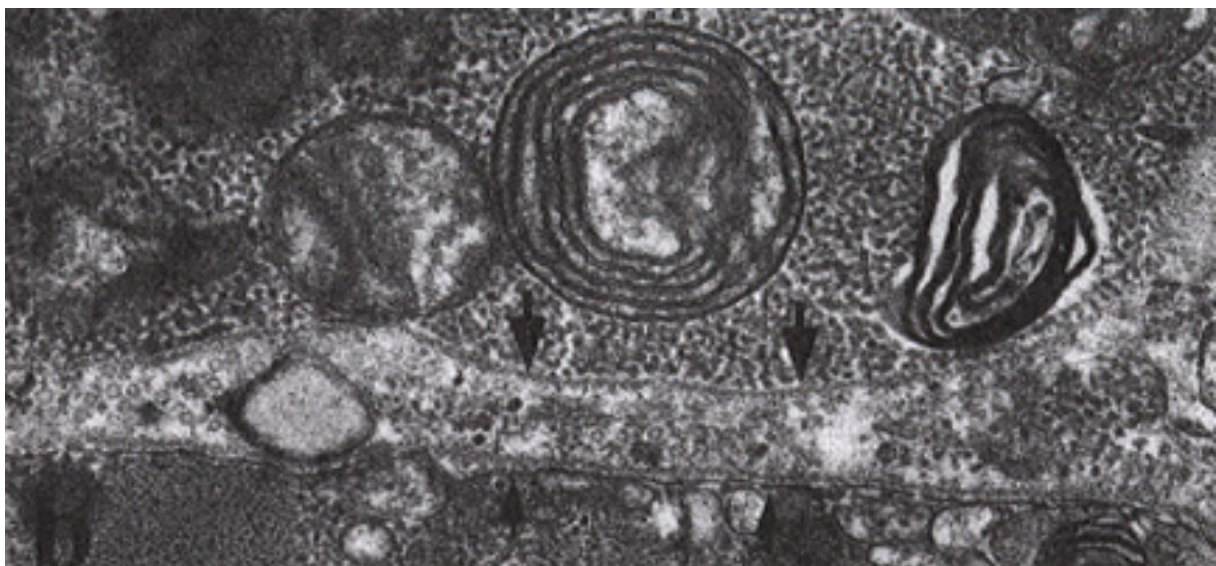


Abbildung 13 (aus *Biofactors* 1998, 7, 231-236): RRF mit Defekt der Plasmamembran bei *mtDNA-Depletion*.¹⁷⁹

Mithilfe der LPCR des gesamten mitochondrialen Genoms konnten wir bei dem Patienten p4 eine stark verminderte Menge des mitochondrialen Amplifikats detektieren, was auf eine Depletion der mtDNA hinweist. Ferner konnten wir multiple Deletionen der mtDNA bei diesem Patienten ausschließen. Bei früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir die hohe Sensivität der mitochondrialen Genomamplifikation unter Beweis stellen. Selbst bei vollständiger Depletion der mitochondrialen DNA konnten wir multiple Deletionsfragmente in hoher Qualität darstellen.¹⁸⁰

Fälle von mitochondrialer DNA-Depletion mit spätem Beginn sind bisher selten beobachtet worden. C. Barthélémy beschreibt in einer Arbeit aus dem Jahre 2001 vier Patienten mit spätem Beginn. Zu diesem Zeitpunkt waren erst 46 Fälle von mtDNA-Depletionen

5.2 Kardiomyopathie

beschrieben.^{55; 181-206} Die Erkrankung begann bei 32 von diesen Patienten im ersten Lebensjahr und verlief bei 25 Patienten in den ersten beiden Lebensjahren tödlich. Nur bei 8 Familien wurde von einem langsamen, späten Verlauf berichtet.^{55; 198; 200-202} Bei den Fällen mit spätem Verlauf zeigte sich eine größere Menge an mtDNA als bei den neonatalen Fällen.

Zur genauen molekulargenetischen Charakterisierung wurden bei diesen vier Fällen, von denen drei klinisch als KSS imponierten und einer als isolierte progressive Myopathie, ein Southern-Blot, LPCR, Atmungsketten-Messungen und In-Situ-Hybridization durchgeführt. Die Autoren konnten zeigen, dass trotz geringer DNA-Menge im Southern-Blot bei der In-Situ-Hybridization in dem Vergleich von mtDNA und zweier mitochondrialer Transkripte der Steady-State der Transkripte erhalten war. Die Autoren folgern aus der hohen Menge an Transkripten im Gegensatz zu der geringen mtDNA-Menge einen Kompensationsmechanismus auf Ebene der Transkription.²⁰⁷

5.2.3 Zusammenfassung

Diese neuen Erkenntnisse machen eine DNA-Depletion auch bei unseren Patienten denkbar, während der klassische Phänotyp der Depletion mit frühem, progredientem Verlauf dies undenkbar gemacht hat.

Zusammenfassend steht bei beiden Fällen klinisch eine Myopathie mit begleitender Kardiomyopathie im Vordergrund. Die Symptomatik begann erst im Jugendalter. Die CK im Serum war erhöht. Es ließen sich bei beiden Patienten histologisch typische mitochondriale Veränderungen nachweisen, ebenfalls fanden sich bei beiden Hinweise auf eine Dystrophinopathie. Bei dem Patienten p4 waren die Aktivitäten der Komplexe I, II und IV der Atmungskette erniedrigt. Der Ausfall des mitochondrialen Amplikons beim Patienten p3 sowie die starke quantitative Reduzierung beim Patienten p4 unterstützen die Diagnose eines MDS bei beiden Patienten, welche ebenfalls durch folgende Befunde unterstützt wird:

- Depletionen als spätes, unspezifisches Merkmal möglich
- Erhöhte Serum CK bei der myopathischen Form des MDS
- RRF
- Hinweise auf eine Dystrophinopathie
- Später Beginn möglich

5.2 Kardiomyopathie

Aufgrund der geringen Mengen der uns vorliegenden Proben war leider keine Southern-Blot-Analyse möglich, die Methode der Lightcycler-PCR stand zum Untersuchungszeitpunkt nicht zur Verfügung. Dadurch konnte die Diagnose eines MDS nicht gesichert werden. Es wäre daher sinnvoll, dies mit zukünftigen Untersuchungen nachzuholen. Sollte sich bei den untersuchten Patienten dadurch eine mtDNA-Depletion sichern lassen, wären in Anbetracht der in letzter Zeit gefundenen Mutationen bei Erkrankungen mit gestörter intergenomischer Kommunikation weitere Untersuchungen der nukleären DNA sinnvoll.

Wir haben eine quantitative PCR zur Bestimmung des Ausmaßes der Depletion der mtDNA initiiert. Bei Bestätigung werden wir die Gene für Thymidinkinase und Polymerase- γ auf Mutationen untersuchen.

6 Verzeichnisse

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Krankheiten mit mtDNA-Mutationen.....	11
Tabelle 2: Übersicht über mtDNA-Punktmutationen mit Assoziation zu Kardiomyopathie....	16
Tabelle 3: Enzymaktivitäten (Muskellabor des Instituts für klinische Chemie, Molekulare Diagnostik und Mitochondriale Genetik der TU München, persönliche Mitteilung).....	25
Tabelle 4: Bedingungen für Agarosegelelektrophorese.....	28
Tabelle 5: PCR-Grundprofil.....	31
Tabelle 6: PCR spezielle Bedingungen.....	32
Tabelle 7: LPCR-Bedingungen.....	33
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für Sequenzierung.....	34
Tabelle 9: MDS-Mutationen.....	63

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wichtige Stoffwechselwege im Mitochondrium.....	6
Abbildung 2: Mitochondriales Genom und charakteristische Mutationen.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Restriktionsmuster.....	36
Abbildung 4: Restriktionsmuster LHON 11778 mit SfaN I.....	37
Abbildung 5: Restriktionsmuster LHON 11778 mit MAE III.....	37
Abbildung 6: Agarosegel zur Auftrennung der Mae-III-Restriktionsfragmente.....	41
Abbildung 7: Agarosegel zur Auftrennung der SfaN-I-Restriktionsfragmente.....	42
Abbildung 8: Kontroll-Mikromuskel-Präparation.....	43
Abbildung 9: Agarosegel mit der LPCR aus Kontrolle (K), p3 und p4	44
Abbildung 10: Agarosegel mit LPCR aus 2 Kontrollen (K), p3 und p4	45
Abbildung 11: Sequenz des Fragments 3 von p4 im Bereich nt 3387.....	46

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12: Mitochondrialer Nukleotidstoffwechsel ¹⁴⁷	64
Abbildung 13 (aus Biofactors 1998, 7, 231-236): RRF mit Defekt der Plasmamembran bei mtDNA-Depletion. ¹⁷⁹	66

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AHS	Alpers-Huttenlocher-Syndrom
AIF	<i>apoptosis initiating factor</i>
ANT	Adenin-Nucleotid-Translokator
ATP	Adenosintripospat
bp	Basenpaare
CAD	<i>caspase activated DNase</i>
CK	Kreatinkinase
CK-MB	herzspezifische Kreatinkinase
CRP	C reaktives Protein
dAdo	Desoxyadenosin
dAMP	Desoxyadenosinmonophosphat
dCK	Desoxycytidinkinase
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dCyt	Desoxycytosin
dGK	Desoxyguanosinkinase
dGuo	Desoxyguanosin
dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dThd	Thymidin

6.3 Abkürzungsverzeichnis

dTMP	Thyminmonophosphat
EBV	Eppstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
ft3	freies Triiodthyronin
ft4	freies Tetraiodthyronin
gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transpeptidase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBDH	Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HSP 70	<i>heat shock protein 70</i>
HSP	<i>heavy strand promoter</i>
IGFBP-3	<i>insulin like growth factor binding protein</i>
KSS	Kearn-Sayre-Syndrom
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LHON	Lebers vererbare optische Neuropathie
LSP	<i>light strand promoter</i>
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
MELAS	Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Phasen
MERRF	Myoklonische Epilepsie mit <i>red ragged fibres</i>
MDS	mtDNA-Depletion-Syndrom
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure

6.3 Abkürzungsverzeichnis

MNGIE	mitochondrialen gastrointestinalen Enzephalomyopathie
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NARP	neurogene Muskelschwäche, Ataxie, Retinitis pigmentosa
nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEO	progressive externale Ophtalmoplegie
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRF	<i>ragged red fibers</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SANDO	<i>sensory ataxic neuropathy, dysarthria and ophthalmoparesis</i>
SCAE	spinocerebelläre Ataxie mit Epilepsie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCP	<i>single-strand-conformation-polymorphism</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TK1	zytosolische Thymidinkinase
TK2	mitochondriale Thymidinkinase
TP	Thymidin-Phosphorylase
TRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon

6.4 Literaturverzeichnis

- 1 B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J.D. WATSON (2003): Molekularbiologie der Zelle.
- 2 MARZO, I., BRENNER, C., ZAMZAMI, N., JÜRGENSMEIER, J. M., SUSIN, S. A., VIEIRA, H. L., PRÉVOST, M. C., XIE, Z., MATSUYAMA, S., REED, J. C. & KROEMER, G. (1998): *Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis*. Science 281, S. 2027-31.
- 3 LIU, X., KIM, C. N., YANG, J., JEMMERSON, R. & WANG, X. (1996): *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. Cell 86, S. 147-57.
- 4 GREEN, D. R. & REED, J.C. (1998): *Mitochondria and apoptosis*. Science 281, S. 1309-12.
- 5 PETIT, P. X., SUSIN, S. A., ZAMZAMI, N., MIGNOTTE, B. & KROEMER, G. (1996): *Mitochondria and programmed cell death: back to the future*. FEBS Lett 396, S. 7-13.
- 6 BRUSTOVETSKY, N. & KLINGENBERG, M. (1996): *Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺*. Biochemistry 35, S. 8483-8.
- 7 SUSIN, S. A., LORENZO, H. K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., BRENNER, C., LAROCLETTE, N., PRÉVOST, M. C., ALZARI, P. M. & KROEMER, G. (1999): *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process*. J Exp Med 189, S. 381-94.
- 8 MANCINI, M., NICHOLSON, D. W., ROY, S., THORNBERRY, N. A., PETERSON, E. P., CASCIOLA-ROSEN, L. A. & ROSEN, A. (1998): *The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling*. J Cell Biol 140, S. 1485-95.
- 9 ZORATTI, M. & SZABÓ, I. (1995): *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta 1241, S. 139-76.
- 10 NEWMAN, N. J., LOTT, M. T. & WALLACE, D.C. (1991): *The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation*. Am J Ophthalmol 111, S. 750-62.
- 11 JOHNS, D. R., SMITH, K. H. & MILLER, N.R. (1992): *Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 3460 mutation*. Arch Ophthalmol 110, S. 1577-81.

6.4 Literaturverzeichnis

- 12 JOHNS, D. R., HEHER, K. L., MILLER, N. R. & SMITH, K.H. (1993): *Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 14484 mutation.* Arch Ophthalmol 111, S. 495-8.
- 13 RIORDAN-EVA, P., SANDERS, M. D., GOVAN, G. G., SWEENEY, M. G., DA COSTA, J. & HARDING, A.E. (1995): *The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation.* Brain 118 (Pt 2), S. 319-37.
- 14 WALLACE, D. C., SINGH, G., LOTT, M. T., HODGE, J. A., SCHURR, T. G., LEZZA, A. M., ELSAS, L. J. 2. & NIKOSKELAINEN, E.K. (1988): *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy.* Science 242, S. 1427-30.
- 15 HUOPONEN, K., VILKKI, J., AULA, P., NIKOSKELAINEN, E. K. & SAVONTAUS, M.L. (1991): *A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy.* Am J Hum Genet 48, S. 1147-53.
- 16 HOWELL, N., BINDOFF, L. A., McCULLOUGH, D. A., KUBACKA, I., POULTON, J., MACKEY, D., TAYLOR, L. & TURNBULL, D.M. (1991): *Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial NDI mutation in six pedigrees.* Am J Hum Genet 49, S. 939-50.
- 17 MACKEY, D. & HOWELL, N. (1992): *A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology.* Am J Hum Genet 51, S. 1218-28.
- 18 MACKEY, D. A., OOSTRA, R. J., ROSENBERG, T., NIKOSKELAINEN, E., BRONTE-STEWART, J., POULTON, J., HARDING, A. E., GOVAN, G., BOLHUIS, P. A. & NORBY, S. (1996): *Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy.* Am J Hum Genet 59, S. 481-5.
- 19 NOVOTNY, E. J. J., SINGH, G., WALLACE, D. C., DORFMAN, L. J., LOUIS, A., SOGG, R. L. & STEINMAN, L. (1986): *Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease.* Neurology 36, S. 1053-60.
- 20 JUN, A. S., BROWN, M. D. & WALLACE, D.C. (1994): *A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia.* Proc Natl Acad Sci U S A 91, S. 6206-10.
- 21 KELLAR-WOOD, H., ROBERTSON, N., GOVAN, G. G., COMPSTON, D. A. & HARDING, A.E. (1994): *Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations in multiple*

sclerosis. Ann Neurol 36, S. 109-12.

22 NIKOSKELAINEN, E. K., HUOPONEN, K., JUVONEN, V., LAMMINEN, T., NUMMELIN, K. & SAVONTAUS, M.L. (1996): *Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations*. Ophthalmology 103, S. 504-14.

23 OOSTRA, R. J., BOLHUIS, P. A., WIJBURG, F. A., ZORN-ENDE, G. & BLEEKER-WAGEMAKERS, E.M. (1994): *Leber's hereditary optic neuropathy: correlations between mitochondrial genotype and visual outcome*. J Med Genet 31, S. 280-6.

24 OOSTRA, R. J., BOLHUIS, P. A., ZORN-ENDE, I., DE KOK-NAZARUK, M. M. & BLEEKER-WAGEMAKERS, E.M. (1994): *Leber's hereditary optic neuropathy: no significant evidence for primary or secondary pathogenicity of the 15257 mutation*. Hum Genet 94, S. 265-70.

25 BROWN, M. D., SUN, F. & WALLACE, D.C. (1997): *Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage*. Am J Hum Genet 60, S. 381-7.

26 LAMMINEN, T., HUOPONEN, K., SISTONEN, P., JUVONEN, V., LAHERMO, P., AULA, P., NIKOSKELAINEN, E. & SAVONTAUS, M.L. (1997): *mtDNA haplotype analysis in Finnish families with leber hereditary optic neuroretinopathy*. Eur J Hum Genet 5, S. 271-9.

27 MACMILLAN, C., KIRKHAM, T., FU, K., ALLISON, V., ANDERMANN, E., CHITAYAT, D., FORTIER, D., GANS, M., HARE, H., QUERCIA, N., ZACKON, D. & SHOUBRIDGE, E.A. (1998): *Pedigree analysis of French Canadian families with T14484C Leber's hereditary optic neuropathy*. Neurology 50, S. 417-22.

28 TORRONI, A., PETROZZI, M., D'URBANO, L., SELBITTO, D., ZEVIANI, M., CARRARA, F., CARDUCCI, C., LEUZZI, V., CARELLI, V., BARBONI, P., DE NEGRI, A. & SCOZZARI, R. (1997): *Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484*. Am J Hum Genet 60, S. 1107-21.

29 SMITH, P. R., COOPER, J. M., GOVAN, G. G., HARDING, A. E. & SCHAPIRA, A.H. (1994): *Platelet mitochondrial function in Leber's hereditary optic neuropathy*. J Neurol Sci 122, S. 80-3.

30 MAJANDER, A., HUOPONEN, K., SAVONTAUS, M. L., NIKOSKELAINEN, E. & WIKSTRÖM, M. (1991): *Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the*

6.4 Literaturverzeichnis

ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). FEBS Lett 292, S. 289-92.

31 COCK, H. R., TABRIZI, S. J., COOPER, J. M. & SCHAPIRA, A.H. (1998): *The influence of nuclear background on the biochemical expression of 3460 Leber's hereditary optic neuropathy*. Ann Neurol 44, S. 187-93.

32 CORTELLI, P., MONTAGNA, P., AVONI, P., SANGIORGI, S., BRESOLIN, N., MOGGIO, M., ZANIOL, P., MANTOVANI, V., BARBONI, P., BARBIROLI, B. & ET AL. (1991): *Leber's hereditary optic neuropathy: genetic, biochemical, and phosphorus magnetic resonance spectroscopy study in an Italian family*. Neurology 41, S. 1211-5.

33 HOFHAUS, G., JOHNS, D. R., HURKO, O., ATTARDI, G. & CHOMYN, A. (1996): *Respiration and growth defects in transmitochondrial cell lines carrying the 11778 mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. J Biol Chem 271, S. 13155-61.

34 VERGANI, L., MARTINUZZI, A., CARELLI, V., CORTELLI, P., MONTAGNA, P., SCHIEVANO, G., CARROZZO, R., ANGELINI, C. & LUGARESI, E. (1995): *MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells*. Biochem Biophys Res Commun 210, S. 880-8.

35 COCK, H. R., COOPER, J. M. & SCHAPIRA, A.H. (1995): *The 14484 ND6 mtDNA mutation in Leber hereditary optic neuropathy does not affect fibroblast complex I activity*. Am J Hum Genet 57, S. 1501-2.

36 OOSTRA, R. J., VAN GALEN, M. J., BOLHUIS, P. A., BLEEKER-WAGEMAKERS, E. M. & VAN DEN BOGERT, C. (1995): *The mitochondrial DNA mutation ND6*14,484C associated with leber hereditary optic neuropathy, leads to deficiency of complex I of the respiratory chain*. Biochem Biophys Res Commun 215, S. 1001-5.

37 CORRAL-DEBRINSKI, M., SHOFFNER, J. M., LOTT, M. T. & WALLACE, D.C. (1992): *Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease*. Mutat Res 275, S. 169-80.

38 CORRAL-DEBRINSKI, M., HORTON, T., LOTT, M. T., SHOFFNER, J. M., BEAL, M. F. & WALLACE, D.C. (1992): *Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age*. Nat Genet 2, S. 324-9.

39 MELOV, S., HINERFELD, D., ESPOSITO, L. & WALLACE, D.C. (1997): *Multi-organ*

characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. Nucleic Acids Res 25, S. 974-82.

40 MELOV, S., COSKUN, P. E. & WALLACE, D.C. (1999): *Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress, and senescence.* Mutat Res 434, S. 233-42.

41 LUO, X., PITKÄNEN, S., KASSOVSKA-BRATINOVA, S., ROBINSON, B. H. & LEHOTAY, D.C. (1997): *Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid peroxidation products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency.* J Clin Invest 99, S. 2877-82.

42 PITKANEN, S., MERANTE, F., MCLEOD, D. R., APPEGARTH, D., TONG, T. & ROBINSON, B.H. (1996): *Familial cardiomyopathy with cataracts and lactic acidosis: a defect in complex I (NADH-dehydrogenase) of the mitochondria respiratory chain.* Pediatr Res 39, S. 513-21.

43 ANGELINI, C., MELACINI, P., VALENTE, M. L., REICHMANN, H., CARROZZO, R., FANIN, M., VERGANI, L., BOFFA, G. M., MARTINUZZI, A. & FASOLI, G. (1993): *Hypertrophic cardiomyopathy with mitochondrial myopathy. A new phenotype of complex II defect.* Jpn Heart J 34, S. 63-77.

44 ZHANG, Y., YANG, Y. L., SUN, F., CAI, X., QIAN, N., YUAN, Y., WANG, Z. X., QI, Y., XIAO, J. X., WANG, X. Y., ZHANG, Y. H., JIANG, Y. W., QIN, J. & WU, X.R. (2007): *Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome.* J Inherit Metab Dis 30, S. 265.

45 TIRANTI, V., HOERTNAGEL, K., CARROZZO, R., GALIMBERTI, C., MUNARO, M., GRANATIERO, M., ZELANTE, L., GASPARINI, P., MARZELLA, R., ROCCHI, M., BAYONA-BAFALUY, M. P., ENRIQUEZ, J. A., UZIEL, G., BERTINI, E., DIONISI-VICI, C., FRANCO, B., MEITINGER, T. & ZEVIANI, M. (1998): *Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency.* Am J Hum Genet 63, S. 1609-21.

46 PECINA, P., HOUSTKOVÁ, H., HANSÍKOVÁ, H., ZEMAN, J. & HOUSTEK, J. (2004): *Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly.* Physiol Res 53 Suppl 1, S. S213-23.

47 COENEN, M. J., VAN DEN HEUVEL, L. P., NIJTMANS, L. G., MORAVA, E., MARQUARDT, I., GIRSCHICK, H. J., TRUIBELS, F. J., GRIVELL, L. A. & SMEITINK, J.A. (1999): *SURFEIT-1 gene analysis and two-dimensional blue native gel electrophoresis in cytochrome c oxidase deficiency.* Biochem Biophys Res Commun 265, S. 339-44.

48 WILLIAMS, S. L., VALNOT, I., RUSTIN, P. & TAANMAN, J. (2004): *Cytochrome c oxidase*

6.4 Literaturverzeichnis

subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. J Biol Chem 279, S. 7462-9.

49 HUIZING, M., IACOBAZZI, V., IJLST, L., SAVELKOUL, P., RUITENBEEK, W., VAN DEN HEUVEL, L., INDIVERI, C., SMEITINK, J., TRIJBELS, F., WANDERS, R. & PALMIERI, F. (1997): *Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient.* Am J Hum Genet 61, S. 1239-45.

50 BAKKER, H. D., SCHOLTE, H. R., VAN DEN BOGERT, C., RUITENBEEK, W., JENESON, J. A., WANDERS, R. J., ABELING, N. G., DORLAND, B., SENGERS, R. C. & VAN GENNIP, A.H. (1993): *Deficiency of the adenine nucleotide translocator in muscle of a patient with myopathy and lactic acidosis: a new mitochondrial defect.* Pediatr Res 33, S. 412-7.

51 GRAHAM, B. H., WAYMIRE, K. G., COTTRELL, B., TROUNCE, I. A., MACGREGOR, G. R. & WALLACE, D.C. (1997): *A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator.* Nat Genet 16, S. 226-34.

52 BOHLEGA, S., TANJI, K., SANTORELLI, F. M., HIRANO, M., AL-JISHI, A. & DiMAURO, S. (1996): *Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy.* Neurology 46, S. 1329-34.

53 SUOMALAINEN, A., PAETAU, A., LEINONEN, H., MAJANDER, A., PELTONEN, L. & SOMER, H. (1992): *Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA.* Lancet 340, S. 1319-20.

54 TAKEI, Y., IKEDA, S., YANAGISAWA, N., TAKAHASHI, W., SEKIGUCHI, M. & HAYASHI, T. (1995): *Multiple mitochondrial DNA deletions in a patient with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy but no ophthalmoplegia.* Muscle Nerve 18, S. 1321-5.

55 MARIN-GARCIA, J., ANANTHAKRISHNAN, R., GOLDENTHAL, M. J., FILIANO, J. J. & PEREZ-ATAYDE, A. (1997): *Cardiac mitochondrial dysfunction and DNA depletion in children with hypertrophic cardiomyopathy.* J Inherit Metab Dis 20, S. 674-80.

56 AKAIKE, M., KAWAI, H., YOKOI, K., KUNISHIGE, M., MINE, H., NISHIDA, Y. & SAITO, S. (1997): *Cardiac dysfunction in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia.* Clin Cardiol 20, S. 239-43.

57 GOTO, Y., NONAKA, I. & HORAI, S. (1990): *A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene*

6.4 Literaturverzeichnis

associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature 348, S. 651-3.

58 POECK, K. & HACKE, W. (2001): Neurologie. Springer-Verlag Berlin.

59 SILVESTRI, G., BERTINI, E., SERVIDEI, S., RANA, M., ZACHARA, E., RICCI, E. & TONALI, P. (1997): *Maternally inherited cardiomyopathy: a new phenotype associated with the A to G AT nt.3243 of mitochondrial DNA (MELAS mutation).* Muscle Nerve 20, S. 221-5.

60 VILARINHO, L., SANTORELLI, F. M., ROSAS, M. J., TAVARES, C., MELO-PIRES, M. & DiMAURO, S. (1997): *The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy.* J Med Genet 34, S. 607-9.

61 SWEENEY, M. G., BROCKINGTON, M., WESTON, M. J., MORGAN-HUGHES, J. A. & HARDING, A.E. (1993): *Mitochondrial DNA transfer RNA mutation Leu(UUR)A-->G 3260: a second family with myopathy and cardiomyopathy.* Q J Med 86, S. 435-8.

62 ZEVIANI, M., GELLERA, C., ANTOZZI, C., RIMOLDI, M., MORANDI, L., VILLANI, F., TIRANTI, V. & DiDONATO, S. (1991): *Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA(Leu)(UUR).* Lancet 338, S. 143-7.

63 MARIOTTI, C., TIRANTI, V., CARRARA, F., DALLAPICCOLA, B., DiDONATO, S. & ZEVIANI, M. (1994): *Defective respiratory capacity and mitochondrial protein synthesis in transformant cybrids harboring the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with maternally inherited myopathy and cardiomyopathy.* J Clin Invest 93, S. 1102-7.

64 KING, M. P. & ATTARDI, G. (1989): *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation.* Science 246, S. 500-3.

65 NISHINO, I., KOMATSU, M., KODAMA, S., HORAI, S., NONAKA, I. & GOTO, Y. (1996): *The 3260 mutation in mitochondrial DNA can cause mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS).* Muscle Nerve 19, S. 1603-4.

66 SILVESTRI, G., SANTORELLI, F. M., SHANSKE, S., WHITLEY, C. B., SCHIMMENTI, L. A., SMITH, S. A. & DiMAURO, S. (1994): *A new mtDNA mutation in the tRNA(Leu(UUR)) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy.* Hum Mutat 3, S. 37-43.

67 TANIIKE, M., FUKUSHIMA, H., YANAGIHARA, I., TSUKAMOTO, H., TANAKA, J., FUJIMURA, H., NAGAI, T., SANO, T., YAMAOKA, K., INUI, K. & ET AL. (1992): *Mitochondrial tRNA(Ile) mutation in fatal cardiomyopathy.* Biochem Biophys Res Commun 186, S. 47-53.

6.4 Literaturverzeichnis

- 68 KAIDO, M., FUJIMURA, H., TANIKE, M., YOSHIKAWA, H., TOYOOKA, K., YORIFUJI, S., INUI, K., OKADA, S., SPARACO, M. & YANAGIHARA, T. (1995): *Focal cytochrome c oxidase deficiency in the brain and dorsal root ganglia in a case with mitochondrial encephalomyopathy (tRNA(Ile) 4269 mutation): histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study.* J Neurol Sci 131, S. 170-6.
- 69 HAYASHI, J., OHTA, S., KAGAWA, Y., TAKAI, D., MIYABAYASHI, S., TADA, K., FUKUSHIMA, H., INUI, K., OKADA, S., GOTO, Y. & ET AL. (1994): *Functional and morphological abnormalities of mitochondria in human cells containing mitochondrial DNA with pathogenic point mutations in tRNA genes.* J Biol Chem 269, S. 19060-6.
- 70 CASALI, C., SANTORELLI, F. M., D'AMATI, G., BERNUCCI, P., DEBIASE, L. & DIMAURO, S. (1995): *A novel mtDNA point mutation in maternally inherited cardiomyopathy.* Biochem Biophys Res Commun 213, S. 588-93.
- 71 TANAKA, M., INO, H., OHNO, K., HATTORI, K., SATO, W., OZAWA, T., TANAKA, T. & ITOYAMA, S. (1990): *Mitochondrial mutation in fatal infantile cardiomyopathy.* Lancet 336, S. 1452.
- 72 SANTORELLI, F. M., MAK, S. C., VÁZQUEZ-ACEVEDO, M., GONZÁLEZ-ASTIAZARÁN, A., RIDAURA-SANZ, C., GONZÁLEZ-HALPHEN, D. & DIMAURO, S. (1995): *A novel mitochondrial DNA point mutation associated with mitochondrial encephalocardiomyopathy.* Biochem Biophys Res Commun 216, S. 835-40.
- 73 SHOFFNER, J. M., LOTT, M. T., LEZZA, A. M., SEIBEL, P., BALLINGER, S. W. & WALLACE, D.C. (1990): *Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation.* Cell 61, S. 931-7.
- 74 WALLACE, D. C., ZHENG, X. X., LOTT, M. T., SHOFFNER, J. M., HODGE, J. A., KELLEY, R. I., EPSTEIN, C. M. & HOPKINS, L.C. (1988): *Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease.* Cell 55, S. 601-10.
- 75 SANTORELLI, F. M., MAK, S. C., EL-SCHAHAWI, M., CASALI, C., SHANSKE, S., BARAM, T. Z., MADRID, R. E. & DIMAURO, S. (1996): *Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A).* Am J Hum Genet 58, S. 933-9.
- 76 MERANTE, F., TEIN, I., BENSON, L. & ROBINSON, B.H. (1994): *Maternally inherited*

hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene. Am J Hum Genet 55, S. 437-46.

77 HOLT, I. J., HARDING, A. E., PETTY, R. K. & MORGAN-HUGHES, J.A. (1990): *A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy.* Am J Hum Genet 46, S. 428-33.

78 DE VRIES, D. D., VAN ENGELEN, B. G., GABREËLS, F. J., RUITENBEEK, W. & VAN OOST, B.A. (1993): *A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome.* Ann Neurol 34, S. 410-2.

79 TATUCH, Y., CHRISTODOULOU, J., FEIGENBAUM, A., CLARKE, J. T., WHERRET, J., SMITH, C., RUDD, N., PETROVA-BENEDICT, R. & ROBINSON, B.H. (1992): *Heteroplasmic mtDNA mutation (T---G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high.* Am J Hum Genet 50, S. 852-8.

80 RUTLEDGE, J. C., HAAS, J. E., MONNAT, R. & MILSTEIN, J.M. (1982): *Hypertrophic cardiomyopathy is a component of subacute necrotizing encephalomyelopathy.* J Pediatr 101, S. 706-10.

81 PASTORES, G. M., SANTORELLI, F. M., SHANSKE, S., GELB, B. D., FYFE, B., WOLFE, D. & WILLNER, J.P. (1994): *Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a mitochondrial DNA point mutation (T8993G).* Am J Med Genet 50, S. 265-71.

82 PREZANT, T. R., AGAPIAN, J. V., BOHLMAN, M. C., BU, X., OZTAS, S., QIU, W. Q., ARNOS, K. S., CORTOPASSI, G. A., JABER, L., ROTTER, J. I. & ET AL. (1993): *Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness.* Nat Genet 4, S. 289-94.

83 SANTORELLI, F. M., TANJI, K., MANTA, P., CASALI, C., KRISHNA, S., HAYS, A. P., MANCINI, D. M., DiMAURO, S. & HIRANO, M. (1999): *Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation.* Am J Hum Genet 64, S. 295-300.

84 ANDREWS, R. M., KUBACKA, I., CHINNERY, P. F., LIGHTOWLERS, R. N., TURNBULL, D. M. & HOWELL, N. (1999): *Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.* Nat Genet 23, S. 147.

85 PREZANT, T. R., AGAPIAN, J. V. & FISCHEL-GHODSIAN, N. (1994): *Corrections to the human*

mitochondrial ribosomal RNA sequences. Hum Genet 93, S. 87-8.

86 VILKKI, J., OTT, J., SAVONTAUS, M. L., AULA, P. & NIKOSKELAINEN, E.K. (1991): *Optic atrophy in Leber hereditary optic neuroretinopathy is probably determined by an X-chromosomal gene closely linked to DXS7.* Am J Hum Genet 48, S. 486-91.

87 SWEENEY, M. G., DAVIS, M. B., LASHWOOD, A., BROCKINGTON, M., TOSCANO, A. & HARDING, A.E. (1992): *Evidence against an X-linked locus close to DXS7 determining visual loss susceptibility in British and Italian families with Leber hereditary optic neuropathy.* Am J Hum Genet 51, S. 741-8.

88 CARVALHO, M. R., MÜLLER, B., RÖTZER, E., BERNINGER, T., KOMMERELL, G., BLANKENAGEL, A., SAVONTAUS, M. L., MEITINGER, T. & LORENZ, B. (1992): *Leber's hereditary optic neuroretinopathy and the X-chromosomal susceptibility factor: no linkage to DXs7.* Hum Hered 42, S. 316-20.

89 JUVONEN, V., VILKKI, J., AULA, P., NIKOSKELAINEN, E. & SAVONTAUS, M.L. (1993): *Reevaluation of the linkage of an optic atrophy susceptibility gene to X-chromosomal markers in Finnish families with Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON)* Am J Hum Genet 53, S. 289-92.

90 CHALMERS, R. M., DAVIS, M. B., SWEENEY, M. G., WOOD, N. W. & HARDING, A.E. (1996): *Evidence against an X-linked visual loss susceptibility locus in Leber hereditary optic neuropathy.* Am J Hum Genet 59, S. 103-8.

91 PEGORARO, E., CARELLI, V., ZEVIANI, M., CORTELLI, P., MONTAGNA, P., BARBONI, P., ANGELINI, C. & HOFFMAN, E.P. (1996): *X-inactivation patterns in female Leber's hereditary optic neuropathy patients do not support a strong X-linked determinant.* Am J Med Genet 61, S. 356-62.

92 GALE, R. E., WHEADON, H., BOULOS, P. & LINCH, D.C. (1994): *Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns.* Blood 83, S. 2899-905.

93 SIMPKINS, J. W., WANG, J., WANG, X., PEREZ, E., PROKAI, L. & DYKENS, J.A. (2005): *Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4, S. 69-83.

94 ROSSIGNOL, R., MALGAT, M., MAZAT, J. P. & LETELLIER, T. (1999): *Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies.* J Biol Chem 274, S. 33426-32.

6.4 Literaturverzeichnis

- 95 MAZAT, J. P., LETELLIER, T., BÉDES, F., MALGAT, M., KORZENIEWSKI, B., JOUAVILLE, L. S. & MORKUNIENE, R. (1997): *Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies*. Mol Cell Biochem 174, S. 143-8.
- 96 LETELLIER, T., HEINRICH, R., MALGAT, M. & MAZAT, J.P. (1994): *The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach*. Biochem J 302 (Pt 1), S. 171-4.
- 97 MAZAT, J. P., ROSSIGNOL, R., MALGAT, M., ROCHER, C., FAUSTIN, B. & LETELLIER, T. (2001): *What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions...that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects*. Biochim Biophys Acta 1504, S. 20-30.
- 98 BROWN, M. D. (1999): *The enigmatic relationship between mitochondrial dysfunction and Leber's hereditary optic neuropathy*. J Neurol Sci 165, S. 1-5.
- 99 BURDE, R. M. (1993): *Optic disk risk factors for nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy*. Am J Ophthalmol 116, S. 759-64.
- 100 FECHTNER, R. D. & WEINREB, R.N. (1994): *Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma*. Surv Ophthalmol 39, S. 23-42.
- 101 KAGEYAMA, G. H. & WONG-RILEY, M.T. (1984): *The histochemical localization of cytochrome oxidase in the retina and lateral geniculate nucleus of the ferret, cat, and monkey, with particular reference to retinal mosaics and ON/OFF-center visual channels*. J Neurosci 4, S. 2445-59.
- 102 HOLLÄNDER, H., MAKAROV, F., STEFANI, F. H. & STONE, J. (1995): *Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals*. Ophthalmic Res 27, S. 296-309.
- 103 HARTLEY, A., STONE, J. M., HERON, C., COOPER, J. M. & SCHAPIRA, A.H. (1994): *Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease*. J Neurochem 63, S. 1987-90.
- 104 WOLVETANG, E. J., JOHNSON, K. L., KRAUER, K., RALPH, S. J. & LINNANE, A.W. (1994): *Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis*. FEBS Lett 339, S. 40-4.
- 105 SKULACHEV, V. P. (1996): *Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability*

transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. FEBS Lett 397, S. 7-10.

106 SCHINDER, A. F., OLSON, E. C., SPITZER, N. C. & MONTAL, M. (1996): *Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity.* J Neurosci 16, S. 6125-33.

107 NIEMINEN, A. L., PETRIE, T. G., LEMASTERS, J. J. & SELMAN, W.R. (1996): *Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition.* Neuroscience 75, S. 993-7.

108 MARCHETTI, P., CASTEDO, M., SUSIN, S. A., ZAMZAMI, N., HIRSCH, T., MACHO, A., HAEFFNER, A., HIRSCH, F., GEUSKENS, M. & KROEMER, G. (1996): *Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis.* J Exp Med 184, S. 1155-60.

109 DUGAN, L. L., SENSI, S. L., CANZONIERO, L. M., HANDRAN, S. D., ROTHMAN, S. M., LIN, T. S., GOLDBERG, M. P. & CHOI, D.W. (1995): *Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate.* J Neurosci 15, S. 6377-88.

110 CHARLMERS, R. M. & HARDING, A.E. (1996): *A case-control study of Leber's hereditary optic neuropathy.* Brain 119 (Pt 5), S. 1481-6.

111 SADUN, A. A., CARELLI, V., SALOMAO, S. R., BEREZOVSKY, A., QUIROS, P. A., SADUN, F., DENEGRI, A. M., ANDRADE, R., MORAES, M., PASSOS, A., KJAER, P., PEREIRA, J., VALENTINO, M. L., SCHEIN, S. & BELFORT, R. (2003): *Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy.* Am J Ophthalmol 136, S. 231-8.

112 SMITH, P. R., COOPER, J. M., GOVAN, G. G., HARDING, A. E. & SCHAPIRA, A.H. (1993): *Smoking and mitochondrial function: a model for environmental toxins.* Q J Med 86, S. 657-60.

113 FRISÉN, L. (1983): *Fundus changes in acute malnutritional optic neuropathy.* Arch Ophthalmol 101, S. 577-9.

114 KRUMSIEK, J., KRÜGER, C. & PATZOLD, U. (1985): *Tobacco-alcohol amblyopia neuro-ophthalmological findings and clinical course.* Acta Neurol Scand 72, S. 180-7.

115 HARDING, A. E., SWEENEY, M. G., MILLER, D. H., MUMFORD, C. J., KELLAR-WOOD, H., MENARD, D., McDONALD, W. I. & COMPSTON, D.A. (1992): *Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA*

6.4 Literaturverzeichnis

mutation. Brain 115 (Pt 4), S. 979-89.

116 SMITH, P. R., COOPER, J. M., GOVAN, G. G., RIORDAN-EVA, P., HARDING, A. E. & SCHAPIRA, A.H. (1995): *Antibodies to human optic nerve in Leber's hereditary optic neuropathy*. J Neurol Sci 130, S. 134-8.

117 HOWELL, N. (1998): *Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve*. Vision Res 38, S. 1495-504.

118 ADACHI, K., FUJIURA, Y., MAYUMI, F., NOZUHARA, A., SUGIU, Y., SAKANASHI, T., HIDAKA, T. & TOSHIMA, H. (1993): *A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Biochem Biophys Res Commun 195, S. 945-51.

119 SERRANO, J., PALMEIRA, C. M., KUEHL, D. W. & WALLACE, K.B. (1999): *Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration*. Biochim Biophys Acta 1411, S. 201-5.

120 SINGH, K. K., RUSSELL, J., SIGALA, B., ZHANG, Y., WILLIAMS, J. & KESHAV, K.F. (1999): *Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents*. Oncogene 18, S. 6641-6.

121 ZANSEN, S. & BUSE, G. (2003): *Successful chemotherapy in a male patient with malignant lymphoma and Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)*. Am J Hematol 72, S. 263-6.

122 ZEVIANI, M., SERVIDEI, S., GELLERA, C., BERTINI, E., DiMAURO, S. & DiDONATO, S. (1989): *An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region*. Nature 339, S. 309-11.

123 KAUKONEN, J., JUSELIN, J. K., TIRANTI, V., KYTTÄLÄ, A., ZEVIANI, M., COMI, G. P., KERÄNEN, S., PELTONEN, L. & SUOMALAINEN, A. (2000): *Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance*. Science 289, S. 782-5.

124 MORAES, C. T. (2001): *A helicase is born*. Nat Genet 28, S. 200-1.

125 SPELBRINK, J. N., LI, F. Y., TIRANTI, V., NIKALI, K., YUAN, Q. P., TARIQ, M., WANROOIJ, S., GARRIDO, N., COMI, G., MORANDI, L., SANTORO, L., TOSCANO, A., FABRIZI, G. M., SOMER, H., CROXEN, R., BEESON, D., POULTON, J., SUOMALAINEN, A., JACOBS, H. T., ZEVIANI, M. & LARSSON, C. (2001): *Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria*. Nat Genet 28, S. 223-31.

6.4 Literaturverzeichnis

- 126 VAN GOETHEM, G., DERMAUT, B., LÖFGREN, A., MARTIN, J. J. & VAN BROECKHOVEN, C. (2001): *Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions*. Nat Genet 28, S. 211-2.
- 127 AGOSTINO, A., VALLETTA, L., CHINNERY, P. F., FERRARI, G., CARRARA, F., TAYLOR, R. W., SCHAEFER, A. M., TURNBULL, D. M., TIRANTI, V. & ZEVIANI, M. (2003): *Mutations of ANTF1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO)*. Neurology 60, S. 1354-6.
- 128 COPELAND, W. C., PONAMAREV, M. V., NGUYEN, D., KUNKEL, T. A. & LONGLEY, M.J. (2003): *Mutations in DNA polymerase gamma cause error prone DNA synthesis in human mitochondrial disorders*. Acta Biochim Pol 50, S. 155-67.
- 129 DESCHAUER, M., KIEFER, R., BLAKELY, E. L., HE, L., ZIERZ, S., TURNBULL, D. M. & TAYLOR, R.W. (2003): *A novel Twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia*. Neuromuscul Disord 13, S. 568-72.
- 130 HIRANO, M., MARTI, R., FERREIRO-BARROS, C., VILÀ, M. R., TADESSE, S., NISHIGAKI, Y., NISHINO, I. & VU, T.H. (2001): *Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA*. Semin Cell Dev Biol 12, S. 417-27.
- 131 KOMAKI, H., FUKAZAWA, T., HOUZEN, H., YOSHIDA, K., NONAKA, I. & GOTO, Y. (2002): *A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions*. Ann Neurol 51, S. 645-8.
- 132 LAMANTEA, E., TIRANTI, V., BORDONI, A., TOSCANO, A., BONO, F., SERVIDEI, S., PAPADIMITRIOU, A., SPELBRINK, H., SILVESTRI, L., CASARI, G., COMI, G. P. & ZEVIANI, M. (2002): *Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia*. Ann Neurol 52, S. 211-9.
- 133 NAPOLI, L., BORDONI, A., ZEVIANI, M., HADJIGEORGIOU, G. M., SCIACCO, M., TIRANTI, V., TARENTIOU, A., MOGGIO, M., PAPADIMITRIOU, A., SCARLATO, G. & COMI, G.P. (2001): *A novel missense adenine nucleotide translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family*. Neurology 57, S. 2295-8.
- 134 PONAMAREV, M. V., LONGLEY, M. J., NGUYEN, D., KUNKEL, T. A. & COPELAND, W.C. (2002):

6.4 Literaturverzeichnis

Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. J Biol Chem 277, S. 15225-8.

135 SICILIANO, G., TESSA, A., PETRINI, S., MANCUSO, M., BRUNO, C., GRIECO, G. S., MALANDRINI, A., DEFLORIO, L., MARTINI, B., FEDERICO, A., NAPPI, G., SANTORELLI, F. M. & MURRI, L. (2003): *Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANTI gene.* Neuromuscul Disord 13, S. 162-5.

136 SUOMALAINEN, A. & KAUKONEN, J. (2001): *Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability.* Am J Med Genet 106, S. 53-61.

137 VAN GOETHEM, G., LÖFGREN, A., DERMAUT, B., CEUTERICK, C., MARTIN, J. & VAN BROECKHOVEN, C. (2003): *Digenic progressive external ophthalmoplegia in a sporadic patient: recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle.* Hum Mutat 22, S. 175-6.

138 VAN GOETHEM, G., SCHWARTZ, M., LÖFGREN, A., DERMAUT, B., VAN BROECKHOVEN, C. & VISSING, J. (2003): *Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy.* Eur J Hum Genet 11, S. 547-9.

139 VAN GOETHEM, G., MARTIN, J. J., DERMAUT, B., LÖFGREN, A., WIBAIL, A., VERVERKEN, D., TACK, P., DEHAENE, I., VAN ZANDIJCKE, M., MOONEN, M., CEUTERICK, C., DE JONGHE, P. & VAN BROECKHOVEN, C. (2003): *Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia.* Neuromuscul Disord 13, S. 133-42.

140 HIRANO, M., GARCIA-DE-YEBENES, J., JONES, A. C., NISHINO, I., DIMAURO, S., CARLO, J. R., BENDER, A. N., HAHN, A. F., SALBERG, L. M., WEEKS, D. E. & NYGAARD, T.G. (1998): *Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter.* Am J Hum Genet 63, S. 526-33.

141 NISHINO, I., SPINAZZOLA, A. & HIRANO, M. (1999): *Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder.* Science 283, S. 689-92.

142 NISHINO, I., SPINAZZOLA, A., PAPADIMITRIOU, A., HAMMANS, S., STEINER, I., HAHN, C. D., CONNOLLY, A. M., VERLOES, A., GUIMARÃES, J., MAILLARD, I., HAMANO, H., DONATI, M. A., SEMRAD, C. E., RUSSELL, J. A., ANDREU, A. L., HADJIGEORGIOU, G. M., VU, T. H., TADESSE, S., NYGAARD, T. G., NONAKA, I., HIRANO, I., BONILLA, E., ROWLAND, L. P., DIMAURO, S. & HIRANO, M. (2000): *Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder*

due to thymidine phosphorylase mutations. Ann Neurol 47, S. 792-800.

143 NISHINO, I., SPINAZZOLA, A. & HIRANO, M. (2001): *MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA.* Neuromuscul Disord 11, S. 7-10.

144 ELPELEG, O., MILLER, C., HERSHKOVITZ, E., BITNER-GLINDZICZ, M., BONDI-RUBINSTEIN, G., RAHMAN, S., PAGNAMENTA, A., ESHHAR, S. & SAADA, A. (2005): *Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion.* Am J Hum Genet 76, S. 1081-6.

145 SAADA, A. (2004): *Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity.* DNA Cell Biol 23, S. 797-806.

146 ALBERIO, S., MINERI, R., TIRANTI, V. & ZEVIANI, M. (2007): *Depletion of mtDNA: syndromes and genes.* Mitochondrion 7, S. 6-12.

147 ELPELEG, O. (2003): *Inherited mitochondrial DNA depletion.* Pediatr Res 54, S. 153-9.

SALVATORE DiMAURO, MICHIO HIRANO, ERIC A. SCHON (2006): *Mitochondrial Medicine.* Informa Healthcare.

149 SPINAZZOLA, A., VISCOMI, C., FERNANDEZ-VIZARRA, E., CARRARA, F., D'ADAMO, P., CALVO, S., MARSANO, R. M., DONNINI, C., WEIHER, H., STRISCIUGLIO, P., PARINI, R., SARZI, E., CHAN, A., DiMAURO, S., RÖTIG, A., GASPARINI, P., FERRERO, I., MOOTHA, V. K., TIRANTI, V. & ZEVIANI, M. (2006): *MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion.* Nat Genet 38, S. 570-5.

150 LUOMA, P., MELBERG, A., RINNE, J. O., KAUKONEN, J. A., NUPPONEN, N. N., CHALMERS, R. M., OLDFORS, A., RAUTAKORPI, I., PELTONEN, L., MAJAMAA, K., SOMER, H. & SUOMALAINEN, A. (2004): *Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study.* Lancet 364, S. 875-82.

151 WINTERTHUN, S., FERRARI, G., HE, L., TAYLOR, R. W., ZEVIANI, M., TURNBULL, D. M., ENGELSEN, B. A., MOEN, G. & BINDOFF, L.A. (2005): *Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations.* Neurology 64, S. 1204-8.

152 VAN GOETHEM, G., LUOMA, P., RANTAMÄKI, M., AL MEMAR, A., KAAKKOLA, S., HACKMAN, P., KRAHE, R., LÖFGREN, A., MARTIN, J. J., DE JONGHE, P., SUOMALAINEN, A., UDD, B. & VAN BROECKHOVEN, C. (2004): *POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement.* Neurology 63, S. 1251-7.

6.4 Literaturverzeichnis

- 153 FERRARI, G., LAMANTEA, E., DONATI, A., FILOSTO, M., BRIEM, E., CARRARA, F., PARINI, R., SIMONATI, A., SANTER, R. & ZEVIANI, M. (2005): *Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA*. Brain 128, S. 723-31.
- 154 NAVIAUX, R. K. & NGUYEN, K.V. (2005): *POLG mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion*. Ann Neurol 58, S. 491.
- 155 NGUYEN, K. V., ØSTERGAARD, E., RAVN, S. H., BALSLEV, T., DANIELSEN, E. R., VARDAG, A., MCKIERNAN, P. J., GRAY, G. & NAVIAUX, R.K. (2005): *POLG mutations in Alpers syndrome*. Neurology 65, S. 1493-5.
- 156 NGUYEN, K. V., SHARIEF, F. S., CHAN, S. S. L., COPELAND, W. C. & NAVIAUX, R.K. (2006): *Molecular diagnosis of Alpers syndrome*. J Hepatol 45, S. 108-16.
- 157 SAADA, A., SHAAG, A., MANDEL, H., NEVO, Y., ERIKSSON, S. & ELPELEG, O. (2001): *Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy*. Nat Genet 29, S. 342-4.
- 158 MANCUSO, M., SALVIATI, L., SACCONI, S., OTAEGUI, D., CAMAÑO, P., MARINA, A., BACMAN, S., MORAES, C. T., CARLO, J. R., GARCIA, M., GARCIA-ALVAREZ, M., MONZON, L., NAINI, A. B., HIRANO, M., BONILLA, E., TARATUTO, A. L., DiMAURO, S. & VU, T.H. (2002): *Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA*. Neurology 59, S. 1197-202.
- 159 CARROZZO, R., BORNSTEIN, B., LUCIOLI, S., CAMPOS, Y., DE LA PENA, P., PETIT, N., DIONISIVICI, C., VILARINHO, L., RIZZA, T., BERTINI, E., GARESSE, R., SANTORELLI, F. M. & ARENAS, J. (2003): *Mutation analysis in 16 patients with mtDNA depletion*. Hum Mutat 21, S. 453-4.
- 160 VILÀ, M. R., SEGOVIA-SILVESTRE, T., GÁMEZ, J., MARINA, A., NAINI, A. B., MESEGUER, A., LOMBÈS, A., BONILLA, E., DiMAURO, S., HIRANO, M. & ANDREU, A.L. (2003): *Reversion of mtDNA depletion in a patient with TK2 deficiency*. Neurology 60, S. 1203-5.
- 161 WANG, L., LIMONGELLI, A., VILA, M. R., CARRARA, F., ZEVIANI, M. & ERIKSSON, S. (2005): *Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes*. Mol Genet Metab 84, S. 75-82.
- 162 GALBIATI, S., BORDONI, A., PAPADIMITRIOU, D., TOSCANO, A., RODOLICO, C., KATSAROU, E., SCIACCO, M., GARUFI, A., PRELLE, A., AGUENNOUZ, M. ', BONSIGNORE, M., CRIMI, M., MARTINUZZI,

6.4 Literaturverzeichnis

A., BRESOLIN, N., PAPADIMITRIOU, A. & COMI, G.P. (2006): *New mutations in TK2 gene associated with mitochondrial DNA depletion*. *Pediatr Neurol* 34, S. 177-85.

163 MANDEL, H., SZARGEL, R., LABAY, V., ELPELEG, O., SAADA, A., SHALATA, A., ANBINDER, Y., BERKOWITZ, D., HARTMAN, C., BARAK, M., ERIKSSON, S. & COHEN, N. (2001): *The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA*. *Nat Genet* 29, S. 337-41.

164 TAANMAN, J., KATEEB, I., MUNTAU, A. C., JAKSCH, M., COHEN, N. & MANDEL, H. (2002): *A novel mutation in the deoxyguanosine kinase gene causing depletion of mitochondrial DNA*. *Ann Neurol* 52, S. 237-9.

165 SALVIATI, L., SACCONI, S., MANCUSO, M., OTAEGUI, D., CAMAÑO, P., MARINA, A., RABINOWITZ, S., SHIFFMAN, R., THOMPSON, K., WILSON, C. M., FEIGENBAUM, A., NAINI, A. B., HIRANO, M., BONILLA, E., DiMAURO, S. & VU, T.H. (2002): *Mitochondrial DNA depletion and dGK gene mutations*. *Ann Neurol* 52, S. 311-7.

166 TADIBOYINA, V. T., RUPAR, A., ATKISON, P., FEIGENBAUM, A., KRONICK, J., WANG, J. & HEGELE, R.A. (2005): *Novel mutation in DGUOK in hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome associated with cystathioninuria*. *Am J Med Genet A* 135, S. 289-91.

167 HORVATH, R., HUDSON, G., FERRARI, G., FÜTTERER, N., AHOLA, S., LAMANTEA, E., PROKISCH, H., LOCHMÜLLER, H., MCFARLAND, R., RAMESH, V., KLOPSTOCK, T., FREISINGER, P., SALVI, F., MAYR, J. A., SANTER, R., TESAROVA, M., ZEMAN, J., UDD, B., TAYLOR, R. W., TURNBULL, D., HANNA, M., FIALHO, D., SUOMALAINEN, A., ZEVIANI, M. & CHINNERY, P.F. (2006): *Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene*. *Brain* 129, S. 1674-84.

168 DAVIDZON, G., MANCUSO, M., FERRARIS, S., QUINZII, C., HIRANO, M., PETERS, H. L., KIRBY, D., THORBURN, D. R. & DiMAURO, S. (2005): *POLG mutations and Alpers syndrome*. *Ann Neurol* 57, S. 921-3.

169 KADRMAS, E. F., RAY, P. D. & LAMBETH, D.O. (1991): *Apparent ATP-linked succinate thiokinase activity and its relation to nucleoside diphosphate kinase in mitochondrial matrix preparations from rabbit*. *Biochim Biophys Acta* 1074, S. 339-46.

170 KOWLURU, A., TANNOUS, M. & CHEN, H. (2002): *Localization and characterization of the mitochondrial isoform of the nucleoside diphosphate kinase in the pancreatic beta cell:*

6.4 Literaturverzeichnis

evidence for its complexation with mitochondrial succinyl-CoA synthetase. Arch Biochem Biophys 398, S. 160-9.

171 SAADA, A., SHAAG, A. & ELPELEG, O. (2003): *mtDNA depletion myopathy: elucidation of the tissue specificity in the mitochondrial thymidine kinase (TK2) deficiency*. Mol Genet Metab 79, S. 1-5.

172 CHAN, S. S. L., LONGLEY, M. J. & COPELAND, W.C. (2005): *The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit*. J Biol Chem 280, S. 31341-6.

173 ZWACKA, R. M., REUTER, A., PFAFF, E., MOLL, J., GORGAS, K., KARASAWA, M. & WEIHER, H. (1994): *The glomerulosclerosis gene Mpv17 encodes a peroxisomal protein producing reactive oxygen species*. EMBO J 13, S. 5129-34.

174 ARNAUDO, E., DALAKAS, M., SHANSKE, S., MORAES, C. T., DiMAURO, S. & SCHON, E.A. (1991): *Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy*. Lancet 337, S. 508-10.

175 BRAHAMS, D. (1994): *Deaths in US fialuridine trial*. Lancet 343, S. 1494-5.

176 CUI, L., YOON, S., SCHINAZI, R. F. & SOMMADOSSI, J.P. (1995): *Cellular and molecular events leading to mitochondrial toxicity of 1-(2-deoxy-2-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil in human liver cells*. J Clin Invest 95, S. 555-63.

177 DALAKAS, M. C., ILLA, I., PEZESHKPOUR, G. H., LAUKAITIS, J. P., COHEN, B. & GRIFFIN, J.L. (1990): *Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy*. N Engl J Med 322, S. 1098-105.

178 DALAKAS, M. C., SEMINO-MORA, C. & LEON-MONZON, M. (2001): *Mitochondrial alterations with mitochondrial DNA depletion in the nerves of AIDS patients with peripheral neuropathy induced by 2'3'-dideoxycytidine (ddC)*. Lab Invest 81, S. 1537-44.

179 BONILLA, E. & TANJI, K. (1998): *Ultrastructural alterations in encephalomyopathies of mitochondrial origin*. Biofactors 7, S. 231-6.

180 BANK, C., SOULIMANE, T., SCHRÖDER, J. M., BUSE, G. & ZANSEN, S. (2000): *Multiple deletions of mtDNA remove the light strand origin of replication*. Biochem Biophys Res Commun 279, S. 595-601.

6.4 Literaturverzeichnis

- 181 BOUSTANY, R. N., APRILLE, J. R., HALPERIN, J., LEVY, H. & DELONG, G.R. (1983): *Mitochondrial cytochrome deficiency presenting as a myopathy with hypotonia, external ophthalmoplegia, and lactic acidosis in an infant and as fatal hepatopathy in a second cousin.* Ann Neurol 14, S. 462-70.
- 182 MORAES, C. T., SHANSKE, S., TRITSCHLER, H. J., APRILLE, J. R., ANDREETTA, F., BONILLA, E., SCHON, E. A. & DIMAURO, S. (1991): *mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases.* Am J Hum Genet 48, S. 492-501.
- 183 MAZZIOTTA, M. R., RICCI, E., BERTINI, E., VICI, C. D., SERVIDEI, S., BURLINA, A. B., SABETTA, G., BARTULI, A., MANFREDI, G., SILVESTRI, G. & ET AL. (1992): *Fatal infantile liver failure associated with mitochondrial DNA depletion.* J Pediatr 121, S. 896-901.
- 184 TELERMAN-TOPPET, N., BIARENT, D., BOUTON, J. M., DE MEIRLEIR, L., ELMER, C., NOEL, S., VAMOS, E. & DIMAURO, S. (1992): *Fatal cytochrome c oxidase-deficient myopathy of infancy associated with mtDNA depletion. Differential involvement of skeletal muscle and cultured fibroblasts.* J Inherit Metab Dis 15, S. 323-6.
- 185 TRITSCHLER, H. J., ANDREETTA, F., MORAES, C. T., BONILLA, E., ARNAUDO, E., DANON, M. J., GLASS, S., ZELAYA, B. M., VAMOS, E., TELERMAN-TOPPET, N. & ET AL. (1992): *Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA.* Neurology 42, S. 209-17.
- 186 RICCI, E., MORAES, C. T., SERVIDEI, S., TONALI, P., BONILLA, E. & DIMAURO, S. (1992): *Disorders associated with depletion of mitochondrial DNA.* Brain Pathol 2, S. 141-7.
- 187 BODNAR, A. G., COOPER, J. M., HOLT, I. J., LEONARD, J. V. & SCHAPIRA, A.H. (1993): *Nuclear complementation restores mtDNA levels in cultured cells from a patient with mtDNA depletion.* Am J Hum Genet 53, S. 663-9.
- 188 LARSSON, N. G., OLDFORS, A., HOLME, E. & CLAYTON, D.A. (1994): *Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion.* Biochem Biophys Res Commun 200, S. 1374-81.
- 189 GENGE, A., KARPATI, G., ARNOLD, D., SHOUBRIDGE, E. A. & CARPENTER, S. (1995): *Familial myopathy with conspicuous depletion of mitochondria in muscle fibers: a morphologically distinct disease.* Neuromuscul Disord 5, S. 139-44.
- 190 PAQUIS-FLUCKLINGER, V., PELLISSIER, J. F., CAMBOULIVES, J., CHABROL, B., SAUNIÈRES, A.,

6.4 Literaturverzeichnis

- MONFORT, M. F., GIUDICELLI, H. & DESNUELLE, C. (1995): *Early-onset fatal encephalomyopathy associated with severe mtDNA depletion*. Eur J Pediatr 154, S. 557-62.
- 191 MARIOTTI, C., UZIEL, G., CARRARA, F., MORA, M., PRELLE, A., TIRANTI, V., DiDONATO, S. & ZEVIANI, M. (1995): *Early-onset encephalomyopathy associated with tissue-specific mitochondrial DNA depletion: a morphological, biochemical and molecular-genetic study*. J Neurol 242, S. 547-56.
- 192 BAKKER, H. D., SCHOLTE, H. R., DINGEMANS, K. P., SPELBRINK, J. N., WIJBURG, F. A. & VAN DEN BOGERT, C. (1996): *Depletion of mitochondrial deoxyribonucleic acid in a family with fatal neonatal liver disease*. J Pediatr 128, S. 683-7.
- 193 BAKKER, H. D., VAN DEN BOGERT, C., SCHOLTE, H. R., ZWART, R., WIJBURG, F. A. & SPELBRINK, J.N. (1996): *Fatal neonatal liver failure and depletion of mitochondrial DNA in three children of one family*. J Inherit Metab Dis 19, S. 112-4.
- 194 MAASWINKEL-MOOIJ, P. D., VAN DEN BOGERT, C., SCHOLTE, H. R., ONKENHOUT, W., BREDEROO, P. & POORTHUIS, B.J. (1996): *Depletion of mitochondrial DNA in the liver of a patient with lactic acidemia and hypoketotic hypoglycemia*. J Pediatr 128, S. 679-83.
- 195 MACMILLAN, C. J. & SHOUBRIDGE, E.A. (1996): *Mitochondrial DNA depletion: prevalence in a pediatric population referred for neurologic evaluation*. Pediatr Neurol 14, S. 203-10.
- 196 MARUSICH, M. F., ROBINSON, B. H., TAANMAN, J. W., KIM, S. J., SCHILLACE, R., SMITH, J. L. & CAPALDI, R.A. (1997): *Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA de* Biochim Biophys Acta 1362, S. 145-59.
- 197 TAANMAN, J. W., BODNAR, A. G., COOPER, J. M., MORRIS, A. A., CLAYTON, P. T., LEONARD, J. V. & SCHAPIRA, A.H. (1997): *Molecular mechanisms in mitochondrial DNA depletion syndrome*. Hum Mol Genet 6, S. 935-42.
- 198 PAPADIMITRIOU, A., COMI, G. P., HADJIGEORGIOU, G. M., BORDONI, A., SCIACCO, M., NAPOLI, L., PRELLE, A., MOGGIO, M., FAGIOLARI, G., BRESOLIN, N., SALANI, S., ANASTASOPOULOS, I., GIASSAKIS, G., DIVARI, R. & SCARLATO, G. (1998): *Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome*. Neurology 51, S. 1086-92.
- 199 SCIACCO, M., GASPARO-RIPPA, P., VU, T. H., TANJI, K., SHANSKE, S., MENDELL, J. R., SCHON,

6.4 Literaturverzeichnis

- E. A., DiMAURO, S. & BONILLA, E. (1998): *Study of mitochondrial DNA depletion in muscle by single-fiber polymerase chain reaction*. Muscle Nerve 21, S. 1374-81.
- 200 CAMPOS, Y., MARTÍN, M. A., GARCÍA-SILVA, T., DEL HOYO, P., RUBIO, J. C., CASTRO-GAGO, M., GARCÍA-PEÑAS, J., CASAS, J., CABELLO, A., RICOY, J. R. & ARENAS, J. (1998): *Clinical heterogeneity associated with mitochondrial DNA depletion in muscle*. Neuromuscul Disord 8, S. 568-73.
- 201 VU, T. H., TANJI, K., VALSAMIS, H., DiMAURO, S. & BONILLA, E. (1998): *Mitochondrial DNA depletion in a patient with long survival*. Neurology 51, S. 1190-3.
- 202 VU, T. H., SCIACCO, M., TANJI, K., NICTER, C., BONILLA, E., CHATKUPT, S., MAERTENS, P., SHANSKE, S., MENDELL, J., KOENIGSBERGER, M. R., SHARER, L., SCHON, E. A., DiMAURO, S. & DeVIVO, D.C. (1998): *Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion*. Neurology 50, S. 1783-90.
- 203 SPELBRINK, J. N., VAN GALEN, M. J., ZWART, R., BAKKER, H. D., ROVIO, A., JACOBS, H. T. & VAN DEN BOGERT, C. (1998): *Familial mitochondrial DNA depletion in liver: haplotype analysis of candidate genes*. Hum Genet 102, S. 327-31.
- 204 NAVIAUX, R. K., NYHAN, W. L., BARSHOP, B. A., POULTON, J., MARKUSIC, D., KARPINSKI, N. C. & HAAS, R.H. (1999): *Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome*. Ann Neurol 45, S. 54-8.
- 205 DUCLUZEAU, P. H., LACHAUX, A., BOUVIER, R., STREICHENBERGER, N., STEPIEN, G. & MOUSSON, B. (1999): *Depletion of mitochondrial DNA associated with infantile cholestasis and progressive liver fibrosis*. J Hepatol 30, S. 149-55.
- 206 BLAKE, J. C., TAANMAN, J. W., MORRIS, A. M., GRAY, R. G., COOPER, J. M., MCKIERNAN, P. J., LEONARD, J. V. & SCHAPIRA, A.H. (1999): *Mitochondrial DNA depletion syndrome is expressed in amniotic fluid cell cultures*. Am J Pathol 155, S. 67-70.
- 207 BARTHÉLÉMY, C., OGIER DE BAULNY, H., DIAZ, J., CHEVAL, M. A., FRACHON, P., ROMERO, N., GOUTIERES, F., FARDEAU, M. & LOMBÈS, A. (2001): *Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copy number, multiple deletions, and compensation*. Ann Neurol 49, S. 607-17.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie in der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen durchgeführt.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Buse für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, seine langjährige Geduld und die rasche und konstruktive Durchsicht meiner Arbeit

Frau Dr. S. Zanssen für die langjährige Betreuung der Arbeit

Herrn Dr. T. Soulimane und Herrn Dr. G. Steffens für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die praktischen Ratschläge

Frau Dr. C. Bank und Frau S. Anglmayer für die zahlreichen Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung

Herrn Prof. Dr. K. Zerres für seine Beratung und Motivation sowie für sein offenes Wort

Frau Prof. Dr. S. Rudnik-Schöneborn für ihre Beratung, Ermutigung und die tatkräftige Unterstützung

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Wiebke Schreiber und meiner Familie für ihre Unterstützung während der langen Zeit.

Lebenslauf

Name: Lars Christian Arndt Simon Haverkamp
Geburtsdatum: 04.05.1976
Geburtsort: Duisburg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung/Zivildienst

1982-1986 Grundschule Mülheim an der Ruhr
1986-1995 Landfermann-Gymnasium Duisburg, Abitur (1,4)
07/1995-07/1996 Zivildienst im Altenheim Marienhof in Mülheim Ruhr
(Altenpflege)

Studium

1996-1998 Studium der Humanmedizin an der Gesamthochschule
Essen
Sept. 1998 Physikum
1998-2003 Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
Aug. 2000 1. Staatsexamen
Sept. 2002 2. Staatsexamen
2002-2003 PJ am Uniklinikum Aachen, Wahlfach Psychiatrie
Okt. 2003 3. Staatsexamen

Berufserfahrung

09/1996-11/1998 Wochenendaushilfe im Altenheim Marienhof (Pflegehelfer)
12/1998-09/1999 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie,
RWTH Aachen
10/1999-06/2002 Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik,
RWTH Aachen
(Datenbankprogrammierung, Netzwerkadministration)
01/2004-09/2004 Arzt im Praktikum, Neurologische Universitätsklinik
Freiburg
Seit 10/2004 Assistenzarzt, Neurologische Universitätsklinik Freiburg