

Mutationen bei primären Mitochondriopathien
und
multiple Deletionen der mitochondrialen DNA bei
idiopathischen inflammatorischen Myopathien

Corinna Fee Bank

Mutationen bei primären Mitochondropathien
und
multiple Deletionen der mitochondrialen DNA bei
idiopathischen inflammatorischen Myopathien

Von der
Medizinischen Fakultät
der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Corinna Fee Bank
aus Aachen

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

 Herr Universitätsprofessor
 Dr. med. Klaus Zerres

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Funktion und Genetik des Mitochondriums	1
1.1.1	Aufbau und Funktion	1
1.1.2	Genetik	2
1.2	Primäre Mitochondriopathien	4
1.2.1	Morphologische Veränderungen	4
1.2.2	Singuläre Deletionen und Duplikationen	4
1.2.2.1	Krankheitsbilder	5
1.2.2.2	Modelle der Deletionsentstehung	6
1.2.3	Punktmutationen	8
1.2.3.1	<i>Lebers</i> hereditäre optische Neuropathie	8
1.2.3.2	Andere durch Punktmutationen verursachte Erkrankungen	11
1.3	Gestörte intergenomische Signaltransduktion	13
1.3.1	Depletionen	13
1.3.2	Multiple Deletionen	14
1.4	Idiopathische inflammatorische Myopathien	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	19
2.1	Herkunft der Gewebeproben	19
2.1.1	Kontrollen	19
2.1.2	Patienten M und T	19
2.1.3	Patient D	21
2.1.4	Patienten P1, P4, P6	21
2.1.5	Patient L	25
2.2	Präparation mitochondrialer DNA	25
2.2.1	Extraktion aus Muskelgewebe	25
2.2.2	Extraktion aus peripherem Blut	26
2.2.3	Aufreinigung der mtDNA	27

2.3	Gelelektrophoresen	28
2.3.1	Agarose-Gele	28
2.3.2	Polyacrylamid-Gele	29
2.3.2.1	Sequenziergele	29
2.3.2.2	Native Gele	30
2.3.2.3	Gele für „single strand conformation polymorphism“	31
2.3.3	Isolation der Probe aus Agarosegel	32
2.3.4	Phosphorscreen	33
2.4	Polymerase chain reaction (PCR)	33
2.4.1	PCR, ca. 700 – 2000 Basenpaare	33
2.4.2	„Long distance“-PCR (long PCR)	35
2.5	Restriktion	36
2.5.1	LHON-Mutation, G3460A	37
2.5.2	Leigh-Mutation, T8993G, T8993C	37
2.5.3	MELAS-Mutation, A3243G	39
2.5.4	MERRF-Mutation, A8344G	40
2.5.5	Optimale Restriktionsbedingungen	40
2.6	Sequenzierung	41
2.6.1	Manuelles Sequenzieren	41
2.6.2	Automatisches Sequenzieren	42
2.7	„Single strand conformation polymorphism“ (SSCP)	45
2.8	Lösungen und Puffer	46
<u>3</u>	<u>Ergebnisse</u>	48
3.1	Patienten M u. T (LHON u. hypertrophe Kardiomyopathie)	48
3.2	Patient D	51
3.3	Patienten P1, P4, P6	54
3.3.1	Patient P1	56
3.3.2	Patient P4	58
3.3.3	Patient P6	60
3.4	Patient L	63

4	Diskussion	64
4.1	Methode longPCR	64
4.2	Patienten M u. T (LHON u. hypertrophe Kardiomyopathie)	65
4.2.1	LHON-Mutation, G3460A	65
4.2.2	Hypertrophe Kardiomyopathie	69
4.3	Patient D	70
4.3.1	Multiple Deletionen	70
4.3.2	Sekundäre LHON-Mutation, A4917G	72
4.4	Patienten P1, P4, P6	74
4.4.1	Auffälligkeiten der longPCR	74
4.4.2	Deletionsmechanismus bei idiopathischen inflammatorischen Myopathien	75
4.4.3	Verlust des Replikationsursprunges O _L	76
4.4.4	Einfluß von Radikalen	77
4.4.5	Einfluß des Nukleus	79
4.4.6	Pathogenität der mtDNA Deletionen	79
4.5	Patient L	80
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	82
<u>6</u>	<u>Verzeichnisse</u>	84
6.1	Abbildungsverzeichnis	84
6.2	Tabellenverzeichnis	85
6.3	Abkürzungsverzeichnis	86
<u>7</u>	<u>Literatur</u>	88

1 Einleitung

1.1 Funktion und Genetik des Mitochondriums

1.1.1 Aufbau und Funktion

Mitochondrien sind ca. 2 μm lange und ca. 0.5 μm breite ovale Zellorganellen. Sie werden von einer doppelten Membran eingefasst, wobei die innere Membran zahlreiche Einstülpungen, die cristae mitochondriales, aufweist.

Die Funktion der Mitochondrien¹ liegt hauptsächlich in der Bereitstellung der von der gesamten Zelle benötigten Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die hierzu benötigten Atmungskettenenzyme sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, wobei es sich bei den Komplexen I (NADH-Ubichinon-Reductase), III (Ubichinon-Cytochrom *c*-Reductase) und IV (Cytochrom *c*-Oxidase) um integrale Membranproteine handelt. Coenzym Q und Cytochrom *c* fungieren als Elektronenshuttle zwischen Komplex I und III (Coenzym Q) bzw. Komplex III und IV (Cytochrom *c*). Auch die ATP-Synthase (Komplex V) ist ein integrales Membranprotein.

Die ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat geschieht mit Hilfe eines Protonengradienten an Komplex V. Dieser Gradient wird von den Komplexen I, III und IV aufrechterhalten, welche die Eigenschaft von Protonenpumpen haben, d.h. sie pumpen Protonen in den Intermembranraum. Die Energie, die zum Pumpen gegen das H^+ -Konzentrationsgefälle nötig ist, wird durch die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter Ausnutzung des Potentialgefälles der Atmungskette gewonnen. Die Elektronen stammen aus den Reduktionsäquivalenten Nicotinsäure-Amid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2). Die Anzahl von Mitochondrien pro Zelle ist abhängig vom spezifischen Sauerstoff- und ATP-Bedarf des Gewebes.

1.1.2 Genetik

Die genetische Information des Mitochondriums ist auf einem 16.569 Basenpaar (bp) großen ringförmigen Molekül (Abb.1), welches in 2-10 Kopien je Mitochondrium im Matrixraum vorliegt, gespeichert².

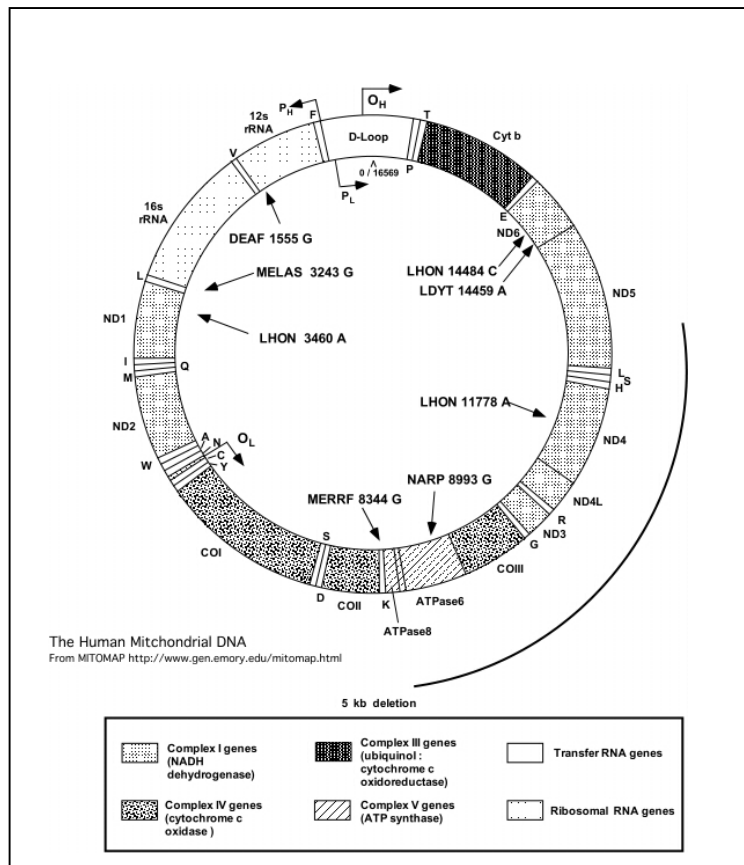


Abb.1: Schematische Darstellung des mitochondrialen Ringmoleküls (nach Wallace³). Neben der Lage der Gene ist auch die Lokalisation der wichtigsten Punktmutationen der häufigen mitochondrialen Erkrankungen MELAS, MERRF und LHON sowie die der ca. 5 kb großen „common deletion“ angegeben.

Auf dem Molekül liegen die für die Translation notwendigen zwei rRNAs (12S und 16S rRNA) und 22 tRNAs. Allerdings sind die Zellorganellen genetisch nur semiautonom, da die für die Replikation und Transkription benötigten Enzyme, z. B. Polymerasen kernkodiert sind. Bei den mitochondrial kodierten Proteinen handelt es sich um 13 funktionell wichtige der insgesamt 84 Untereinheiten der Atmungskette. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die einzelnen Untereinheiten. Obwohl Komplex V strenggenommen kein Bestandteil der

Atmungskette ist, ist er, da er ebenfalls mitochondrial kodierte Untereinheiten enthält, mit aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl der kern (nDNA)- bzw. mitochondrial (mtDNA)-kodierten Untereinheiten der verschiedenen Komplexe der Atmungskette

Komplex	I	III	IV	V
Synonym	NADH-Coenzym-Q-Reduktase	Coenzym-Q-Cytochrom-c-Reduktase	Cytochrom-c-Oxidase	ATP-Synthase
nDNA kodierte Untereinheiten	35	10	10	12
mtDNA kodierte Untereinheiten	7	1	3	2

Der genetische Code weicht dabei von dem universellen Code, hauptsächlich bei der Codierung der Stop- und Startsignale, ab. Einige wichtige Beispiele hierzu sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Abweichungen zwischen dem universellen und dem mitochondrialen Code (nach S.Anderson⁴)

Codon	Mitochondriale Bedeutung	Universelle Bedeutung
UGA	Tryptophan	Stopcodon
AUU	Startcodon (vermutlich)	Isoleucin
AUA	Startcodon	Isoleucin
AGA	Stopcodon	Arginin
AGG	Stopcodon	Arginin
AUA	Methionin	Isoleucin

Durch Erweiterung der Wobble-Regel können alle Codonmöglichkeiten mit den 22 mitochondrial kodierten tRNAs erfaßt werden: 14 tRNAs, die jeweils zwei verschiedene Codons ablesen können, haben den herkömmlichen G:U-Wobble. Es gibt jedoch auch acht tRNAs, welche jeweils vier Codons ablesen können und über einen G:N-Wobble verfügen⁴.

1.2 Primäre Mitochondropathien

1.2.1 Morphologische Veränderungen

Unter primären mitochondrialen Erkrankungen versteht man solche Störungen, die auf Mutationen von Genen (Strukturgene oder tRNA/rRNA) beruhen, welche Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette (einschließlich Komplex V) kodieren bzw. an deren Translation beteiligt sind. In den bis jetzt genau definierten Krankheitsbildern sind fast ausschließlich mitochondriale Gene betroffen⁵.

Die Mutationen führen zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Mitochondrien:

Das wichtigste Erkennungskriterium mitochondrialer Erkrankungen sind die bei der Gomori-Trichrom-Färbung im Lichtmikroskop erkennbaren verdickten, unscharfen Ränder der Muskelfasern, welche als "ragged-red fibers" (RRF) bezeichnet werden⁶. Das, elektronenmikroskopisch sichtbare, morphologische Korrelat dieses Phänomens ist eine gesteigerte mitochondriale Proliferation⁷.

Bei primären Mitochondropathien sind die Mitochondrien außerdem vergrößert (bis zu 5 µm im Durchmesser), und die cristae sind in ihrer Anzahl erhöht, erniedrigt oder ungewöhnlich orientiert. Darüberhinaus sind in den Mitochondrien parakristalline Einschlüsse zu erkennen⁶.

1.2.2 Singuläre Deletionen und Duplikationen

Die mitochondriale DNA kann, wie die Kern-DNA, Mutationen aufweisen, die zu Erkrankungen verschiedener Organe führen, besonders häufig zu Beeinträchtigungen der Muskel- und Nervenfunktionen. Diese Gewebe sind für Störungen in der Atmungskette besonders anfällig, da sie sich durch einen hohen Sauerstoffbedarf und gleichzeitig durch eine geringe Replikationsrate auszeichnen⁸.

1.2.2.1 Krankheitsbilder

Singuläre Deletionen und Duplikationen führen zum Kearns-Sayre-Syndrom (KSS), progressiver externer Ophthalmoplegie (PEO)⁹, okuläre Myopathie (OM) oder dem Pearson-Pankreas-Syndrom (PPS)¹⁰, je nachdem, in welchem Gewebe und in welchem Stadium der Entwicklung die Deletion/ Duplikation auftritt¹¹.

Das KSS macht sich durch eine typische Trias von Symptomen bemerkbar¹²: 1) Beginn der Erkrankung vor dem 20. Lebensjahr, 2) progressive externe Ophthalmoplegie, 3) Degeneration des Pigmentepithels der Retina. Außerdem liegt noch mindestens eines der folgenden Symptome vor: Kleinhirnsyndrom, Herzblock oder hoher Proteingehalt in der Zerebrospinalflüssigkeit (> 100mg/ dL).

Die Patienten sind oft mental retardiert und leiden an Hörverlust sowie endokrinen Störungen. Der Tod tritt meistens vor dem 3. Lebensjahrzehnt ein¹³.

In Muskelbiopsien erkennt man RRF und Fasern mit mangelhafter Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Aktivität, in einigen Fällen liegen Störungen der Atmungskette vor¹⁴.

Fast alle Fälle von KSS treten sporadisch auf, wobei die meisten auf singuläre heteroplasmatische Deletionen¹⁵ und nur einige auf Duplikationen¹⁶ zurückzuführen sind.

Bei der sporadisch auftretenden PEO handelt es sich um eine leichte, unvollständige Ausprägung des KSS¹⁷.

Die Hauptsymptome sind Ptosis, Ophthalmoplegie und Schwäche der proximalen Muskulatur. Allerdings ist es möglich, dass sich aus einer PEO - Erkrankung im Laufe des Lebens das Vollbild des KSS entwickelt.

Der PEO liegt, wie dem KSS, eine heteroplasmatische singuläre Deletion zugrunde; sie verkürzt die Lebenserwartung normalerweise nicht¹⁸.

Es sind auch autosomal vererbte Formen der PEO bekannt, allerdings sind hier multiple Deletionen der mtDNA sowie fehlerhafte Kerngene die Ursache (siehe 1.3.2.).

Von okulärer Myopathie spricht man, wenn ein Patient im Kindes- oder Jugendalter neben einer PEO noch eine beidseitige symmetrische Ptosis entwickelt. RRF sind nachweisbar. Alle Fälle sind sporadisch, und ca. 50% der Fälle werden durch eine singuläre Deletion hervorgerufen¹⁸.

Zum Symptomenkomplex des PPS kommt es, wenn das Deletionseignis in der Oogenese oder im frühen Embryonalstadium liegt, so dass alle drei Keimblätter - und folglich auch alle Organe - betroffen sind¹⁰.

Manifest werden die Störungen, die bereits im frühen Säuglingsalter beginnen, hauptsächlich im blutbildenden System, in der Leber, den Nieren und dem exogenen Pankreas. Es kommt zu einer makrozytären Anämie mit gleichzeitiger Neutro- und Thrombozytopenie, Laktatazidose, Pankreasfibrose und Atrophie der Milz. Die Erkrankung hat sehr oft letalen Ausgang¹⁹.

Ein Defekt des Komplexes I ist in Lymphozyten beschrieben worden²⁰. Dieses Syndrom tritt ebenfalls nur sporadisch auf; wird die Panzytopenie im frühen Kindesalter überlebt, entwickelt sich später ein KSS¹³.

1.2.2.2 Modelle der Deletionsentstehung

Der Mechanismus der Entstehung von Deletionen im mitochondrialen Genom ist nicht bekannt. Es werden Fehler bei der Replikation sowie bei der Rekombination diskutiert.

Beim Modell des „slip mispairing“⁹ geht man davon aus, dass es während der Replikation zu einer falschen komplementären Bindung zwischen einer Sequenz mit kurzen repetitiven Basenfolgen („direct repeat“) auf dem H-Strang und einem „direct repeat“ weiter unterhalb

auf dem L-Strang kommt. Diese Fehlpaarung wird durch die lange Einzelsträngigkeit des H-Stranges während der Replikation begünstigt.

Abb.2 (nach Ballinger²¹) zeigt schematisch, wie man sich die Deletionsentstehung beim „slip mispairing“ vorstellt: Zunächst (1) löst sich der H-Strang (dicke Linie) vom L-Strang (dünne Linie), an dem der neue leichte Strang (dünne Linie mit Pfeil) amplifiziert wird. Die hellen und die dunklen Kästchen stellen ähnliche / gleiche „direct repeats“ dar (im weiteren Text mit DR1 und DR2).

Während der Verlängerung (2) des leichten Tochterstranges werden auf den Elternsträngen DR1 und DR2 gleichzeitig exponiert. (3) Es kommt zu einer Paarung von DR1 des elterlichen H-Stranges mit dem DR2 des elterlichen L-Stranges. Dadurch bricht der elterliche H-Strang unmittelbar „downstream“ des DR1. (4) Der H-Strang wird normal bis zum 5'-Phosphatende des Moleküls weiter verlängert. (5) Bei der weiteren Replikation der DNA entstehen zwei Arten von Molekülen: aus dem L-Strang das Wildtypmolekül und aus dem H-Strang ein deletiertes Molekül.

Auch fehlerhafte Rekombinationen, wie z. B. eine fehlerhafte Topoisomeraseaktivität, werden bei der Deletionsentstehung diskutiert^{22,23}. Allerdings sind Rekombinationsereignisse bei der mitochondrialen DNA nicht gesichert²⁴.

Alle Theorien setzen das Vorhandensein von „direct repeats“ als „Verwechslungspartner“ voraus, welche den Bruchpunkt entweder direkt flankieren (Klasse I Deletionen) oder sich zumindest in direkter Nähe zu den Bruchpunkten befinden (Klasse II Deletionen).

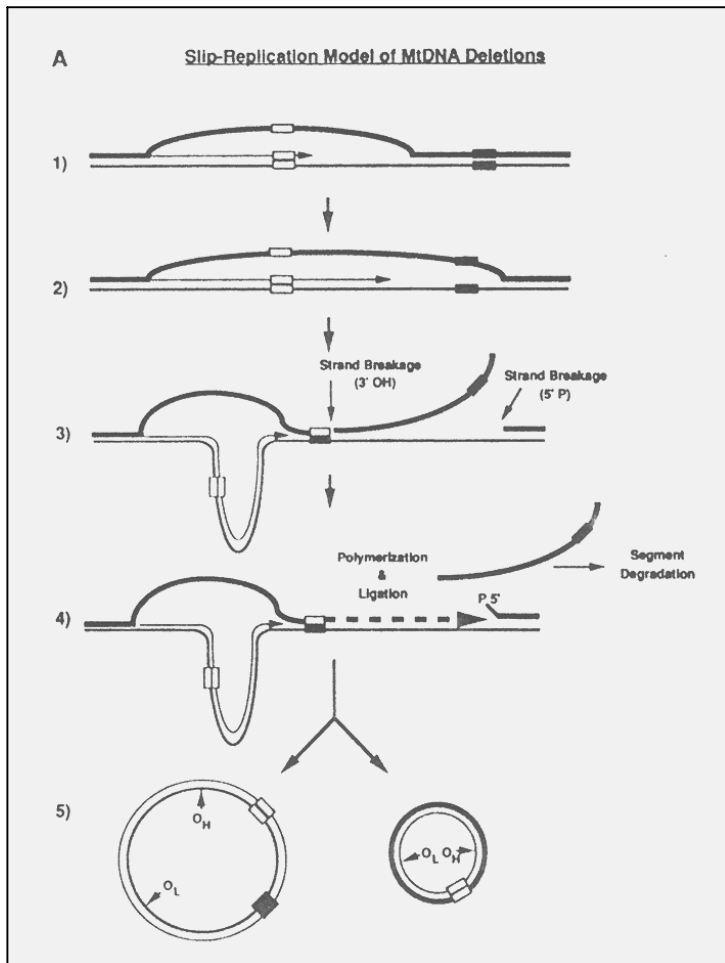


Abb.2: schematische Darstellung der Deletionsentstehung nach dem Modell des „slip mispairing“

1.2.3 Punktmutationen

1.2.3.1 Lebers hereditäre optische Neuropathie

Lebers hereditäre optische Neuropathie (*Leber's* hereditary optic neuropathy = LHON) manifestiert sich bei den zumeist männlichen Patienten zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr. Leitsymptom ist dabei ein akut oder subakut auftretender Ausfall des zentralen Gesichtsfeldes, wobei es morphologisch zunächst zu einer Schwellung und porzellanweißen Färbung und später zu einer Abblassung der Papilla nervi optici kommt²⁵.

Das zentrale Skotoma geht mit einer Demyelinisierung und Degeneration der Ganglionzellschicht der Retina und der zentralen Fasern des Nervus opticus sowie mit einem vermehrten Zelluntergang im Corpus geniculatum laterale²⁶ einher.

Außerdem können zusätzlich Reizleitungsstörungen am Herzmuskel auftreten²⁷.

Eine Sonderform mit weiteren neurologischen Ausfällen im Sinne einer Dystonie tritt bereits im frühen Kindesalter (2 – 4 Jahre) auf²⁸.

Die Erkrankung wird durch verschiedene primäre Punktmutationen, welche homoplasmatisch oder heteroplasmatisch vorliegen können, ausgelöst. Von primären Mutationen ist dann die Rede, wenn diese als Ursache der Erkrankung und nicht als zufälliges Zusammentreffen angesehen werden können²⁹.

Bei LHON sind die primären Punktmutationen G3460A³⁰, G11778A³¹ und T14484C³² bekannt, die alle in den Genen liegen, die die verschiedenen Untereinheiten (ND1, ND4 bzw. ND6) der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) kodieren. Sie sind verantwortlich für 96 % der LHON-Fälle in Nordeuropa und Australien sowie 85-90 % der Fälle weltweit³³, wobei auf die häufigste Mutation G11778A in Europa, Nordamerika und Australien 31-89 % der Fälle entfallen (in Japan 90 %) und auf die beiden anderen Mutationen je 10-15 % der Fälle³⁴.

Einige seltene andere primäre Mutationen³⁵ und verschiedene sekundäre Mutationen^{36,37}, deren klinische Bedeutung nicht ganz klar ist (siehe 4.3.2.), sind ebenfalls bekannt.

LHON wird maternal vererbt³⁸.

Die unterschiedlichen Primärmutationen zeigen keinen Unterschied in dem von ihnen hervorgerufenen Phänotyp, wohl aber Unterschiede in der Prognose: 50 % der Patienten mit der T14484C Mutation erlangen ihr Sehvermögen zurück, aber nur 4 % der Patienten mit der G11778A Mutation. Die Prognose der Patienten mit der Mutation G3460A liegt zwischen diesen beiden Extremen³⁴.

Im weiteren Verlauf der Arbeit ist die Punktmutation G3460A von Interesse. Hier wird das Alanin 52 in der Untereinheit 1 (ND1) gegen ein Threonin ausgetauscht (Punktmutation: ND1/A52T). Das Alanin 52 ist Bestandteil einer stark konservierten, α -helikalen Struktur, welche an der Reduktion von Ubichinon beteiligt ist³⁹. Das Nukleotid an Position 3460 ist allerdings nicht besonders stark konserviert. Abb.3 vergleicht die Sequenzen dieser Region

von verschiedenen Spezies, wobei die stark konservierten Nukleotide durch einen Rahmen gekennzeichnet sind.

Die Mutation führt in Thrombozyten zu einem starken (ca. 65 %) Abfall der Aktivität des Komplexes I⁴⁰. Eine ähnlich starke, wenn nicht stärkere, Minderung der Komplex I Aktivität ist in den betroffenen Geweben, dem Nervus opticus und der Ganglionzellschicht der Retina, zu erwarten.

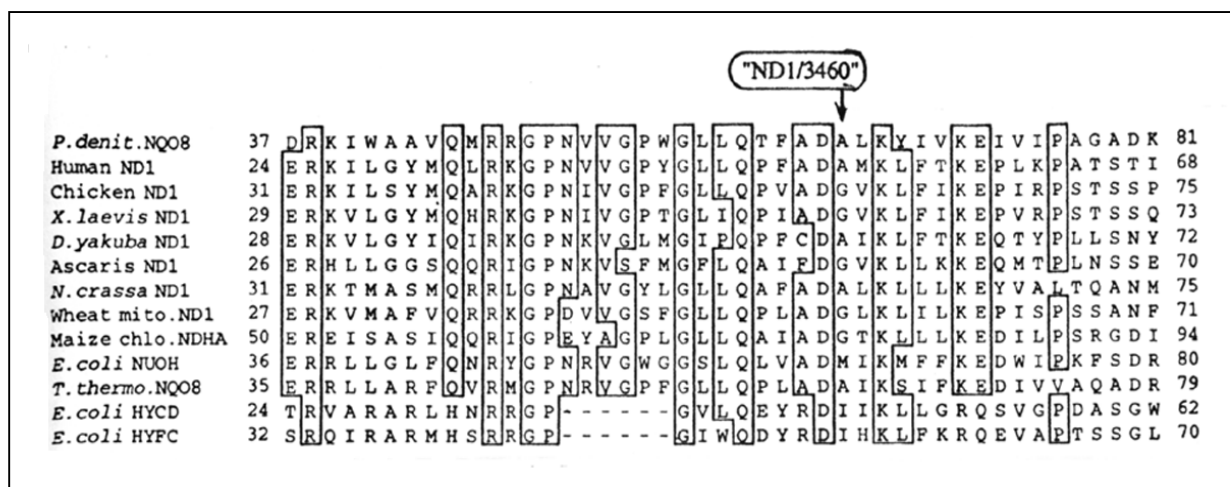


Abb.3: „Alignment“ der Sequenzen verschiedener Spezies. Gezeigt ist die α -helikale Struktur von ND1, welche das Nukleotid 3460 enthält.

Man vermutet, dass die verringerte Komplex I-Aktivität zu einem gestörten axoplasmatischen Transport und zu einer Schwellung des Axons führt. Dadurch werden Gefäße und Nervenendigungen, vor allem in der Lamina cribrosa, komprimiert, so dass es zunächst zu einem reversiblen Funktionsverlust kommt. Bildet sich die Schwellung wieder zurück, kehrt das Sehvermögen ebenfalls zurück; bleibt sie über einen gewissen Zeitraum bestehen, kommt es zu einer Apoptose der betroffenen Zellen und damit zu einem irreversiblen Sehverlust³³.

1.2.3.2 Andere durch Punktmutationen verursachte Erkrankungen

Myoklonale Epilepsie mit RRF (**MERRF**) heißt ein Krankheitsbild, welches durch **Myoklonus**, epileptische Krampfanfälle, **RRF** sowie eine sich progressiv entwickelnde Kleinhirnsymptomatik (u.a. Ataxie, Tremor) gekennzeichnet ist. Die Patienten leiden oft unter Visus- und Hörverlust und sind mental retardiert. Der Krankheitsbeginn liegt normalerweise zwischen dem 5. und dem 12. Lebensjahr, allerdings sind auch Erkrankungen im Erwachsenenalter möglich⁴¹.

Das Gehirn dieser Patienten zeigt in der Bildgebung typische Veränderungen⁴².

Defekte in Komplex III⁴², in Komplex IV⁴² und kombinierte Defekte in Komplex I und IV⁴³ sind beschrieben worden.

Auf genetischer Ebene liegt der Erkrankung die heteroplasmatische Mutation A8344G zugrunde⁴⁴, die maternal vererbt wird⁴⁵.

Andere, seltene Mutationen sind ebenfalls beschrieben worden⁴⁶.

MELAS (=Mitochondriale **My**opathie, **En**zephalopathie, **L**aktatazidose, „stroke like episodes“) ist eine weitere Erkrankung, welche durch eine Punktmutation im mitochondrialen Genom ausgelöst wird.

Hier stehen Wachstumsstörungen, eine persistierende Laktatazidose, anfallsartiges Erbrechen, Krampfanfälle und wiederkehrende zerebrale Infarkte mit den typischen Folgen wie Hemiparesen, Hemianopsie oder kortikalem Sehverlust im Vordergrund. Kopfschmerzen, Taubheit und Demenz werden ebenfalls oft beobachtet. MELAS beginnt meistens zwischen dem 3. und dem 11. Lebensjahr⁴⁷.

In der Computertomographie sind fokale Aufhellungen und Verkalkungen der Basalganglien erkennbar; außerdem findet man eine schwammige Degeneration des Hirngewebes⁴⁸.

Muskelbiopsien zeigen RRF und parakristalline Einschlüsse in den Mitochondrien⁴⁹.

In verschiedenen Fällen liegen Störungen im Komplex I vor⁵⁰.

In 80 % der Fälle ist die Punktmutation A3243G die Ursache dieser maternal vererbten Krankheit⁵¹, aber auch andere Punktmutationen sind bekannt⁴⁶.

Das **Leigh-Syndrom** ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die im Säuglings- oder Kleinkindesalter auftritt, wobei die klinische Ausprägung verschieden, die pathologischen Veränderungen im Gehirn jedoch einheitlich sind. Die Erkrankung führt innerhalb von Monaten oder Jahren zum Tode.

Die Kinder werden auffällig durch Entwicklungsstörungen, Abnahme der psychomotorischen Fähigkeiten, Ataxie, Krampfanfälle, periphere Neuropathie, Abnahme des Sehvermögens und einer Hirnstammsymptomatik⁵².

Sichern läßt sich die Diagnose postmortal durch charakteristische, sowohl makroskopische als auch mikroskopische, neuropathologische Veränderungen⁵³.

Auf biochemischer Ebene sind Störungen im Pyruvatdehydrogenasekomplex, im Komplex IV sowie selten in Komplex I und in Komplex V beobachtet worden⁵⁴.

Die häufigste Ursache des Leigh-Syndroms ist die hochprozentig heteroplasmatische (> 95 %), maternal vererbte Punktmutation bei nt8993 im ATP-ase Gen, Untereinheit 6 (SU6). Dabei sind sowohl die Mutation T8993C⁵⁵, die zu einem milderen Krankheitsverlauf führt, als auch die Mutation T8993G⁵⁶ bekannt, wobei letztere auch als de novo Mutation beschrieben worden ist⁵⁷.

In einigen Fällen sind auch Störungen in Kerngenen nachgewiesen, wobei die Funktionen dieser Gene jedoch nicht bekannt sind⁵⁸.

1.3 Gestörte intergenomische Signaltransduktion

Wie oben beschrieben (1.1.2), werden einige funktionell wichtige Untereinheiten der Atmungskette durch mitochondriale Gene kodiert. Andere Untereinheiten sowie alle anderen mitochondrialen Proteine sind im Kerngenom kodiert. Dadurch steht das Mitochondrium unter der Kontrolle von zwei Genomen, was eine intergenomische Signaltransduktion erforderlich macht.

In dieser Signaltransduktion kann es zu Störungen kommen, die sich in Funktionsverlusten der Atmungskette auswirken und damit zu dem gleichen morphologischen Bild führen wie die primären Mitochondriopathien (siehe 1.2.1). Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist jedoch komplexer und wird noch nicht voll verstanden.

1.3.1 Depletionen

Eine gestörte Signalübertragung zwischen Mitochondrium und Kern hat ihre Ursache wahrscheinlich in mutierten Kerngenen, welche im Wildtyp direkt für die Integrität und Funktion des Mitochondriums nötig sind. Dies sind z.B. Gene für Proteine, die für die Proteinbiosynthese der Mitochondrien oder für den Transport kernkodierter Proteine in das Mitochondrium notwendig sind. Durch die gestörte Signalübertragung kann es zur Depletion kommen, d. h. zu einer Verringerung der Kopienzahl des ringförmigen mt-DNA-Moleküls pro Organelle. Dies kann zu Mitochondriopathien führen; die Prävalenz der einzelnen Erkrankungen ist jedoch gering.

Beschrieben wird eine mitochondriale Myopathie, bei der die erkrankten Kinder schon im Säuglingsalter durch Muskelschwäche, Hypotonie, Ophthalmoplegie mit Ptosis, hohe Serumlaktatwerte und gestörte Nierenfunktion auffallen. Sie sterben an einer Schwäche der Atemmuskulatur⁵⁹.

In den muskulären Mitochondrien ist die Aktivität von Komplex III und IV erniedrigt, die Aktivität des Komplex IV kann in Myozyten auf weniger als 1 % des Normalwertes sinken⁵⁹.

Muskelbiopsien zeigen RRF und in ihrer Ultrastruktur veränderte Mitochondrien.

Die Anzahl der mtDNA-Moleküle pro Mitochondrium ist stark vermindert⁶⁰.

Einige Fälle von Depletionen der mitochondrialen DNA in Leberzellen sind ebenfalls bekannt. Die Säuglinge leiden an massivem Erbrechen, Diarrhöen und Gewichtsverlust.

Die Aktivität der Cytochrom *c*-oxidase ist auf 10 % des Normalwertes gesunken⁶¹.

Die Mitochondrien der Hepatozyten enthalten nur ca. 13 % der DNA eines gesunden Mitochondriums⁶⁰.

1.3.2 Multiple Deletionen

Multiple Deletionen im mitochondrialen Genom treten bei Mitochondropathien, aber auch bei anderen degenerativen Erkrankungen auf, wobei einige Erkrankungen nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden, was auch hier eine Kernbeteiligung nahe legt²³.

Eine Erkrankung, die durch multiple Deletionen hervorgerufen wird, ist die autosomal dominant²³ bzw. autosomal rezessiv^{62,63} vererbte Form der normalerweise sporadisch auftretenden PEO (adPEO bzw. arPEO). Die Klinik der adPEO wird hauptsächlich durch eine Schwäche der Skelettmuskulatur bestimmt; bei der arPEO handelt es sich um eine Multi-System-Erkrankung, bei der neben der Muskulatur z.B. auch Magen-Darm-Trakt und Nervensystem betroffen sind⁶⁴.

Kerngene, die mit diesen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, sind:

10q23.3 - q24.3⁶⁵ und 3p14.1 - 21.2⁶⁶.

Auch bei verschiedenen anderen autosomal dominant vererbten Mitochondropathien treten multiple Deletionen auf: Unter anderem sind eine progressive Enzephalomyopathie⁶⁷, eine sideroblastische Anämie⁶⁸ und eine idiopathische dilatative Kardiomyopathie⁶⁹ bekannt.

Bei einem Patienten mit der typischen MERRF-Symptomatik wurden ebenfalls multiple Deletionen beschrieben, die hier sporadisch auftraten⁷⁰.

Außerdem wurden multiple Deletionen in den Mitochondrien der Kardiomyozyten bei sporadisch auftretenden dilatativen oder hypertrophen Kardiomyopathien beobachtet⁷¹.

Multiple Deletionen werden ebenfalls mit degenerativen Erkrankungen und mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht. Es wird beobachtet, dass Menschen im Laufe ihres Lebens Deletionen anhäufen, die auch in ihrer Größe zunehmen; bei älteren Menschen können große multiple Deletionen nachgewiesen werden, die bei Feten oder Kindern nicht gefunden werden^{72,73}. Eine dabei oft beobachtete Deletion ist die 4977 bp lange "common deletion", die eine -auch bei KSS und PEO- relativ häufig gefundene Deletion darstellt. Es handelt sich hierbei um eine von einem 13 bp langen "direct repeat" begrenzten Deletion, bei der die Nukleotide 8470 - 13447 fehlen⁷⁴.

1.4 Idiopathische inflammatorische Myopathien

Unter inflammatorischen Myopathien versteht man Entzündungen des Muskelgewebes. Die inflammatorischen Myopathien ohne oder zumindest ohne eindeutige exogene Ursache, wie z. B. eine Infektion, werden unter dem Begriff der idiopathischen inflammatorischen Myopathien zusammengefaßt. Diese idiopathischen inflammatorischen Myopathien werden hier näher behandelt.

Bei den idiopathischen inflammatorischen Myopathien kann man zwischen Polymyositis, Dermatomyositis und Einschußkörperchenmyositis (IBM = inclusion body myositis) unterscheiden, wobei die IBM bei Patienten über 50 Jahren die Muskelerkrankung mit der höchsten Prävalenz darstellt⁷⁵. Die IBM ist auch das von den dreien am besten erforschte Leiden. Die große Ähnlichkeit der Krankheitsbilder erlaubt jedoch eine – zumindest weitgehende - Gleichbehandlung der Erkrankungen in Fragen der Ätiologie und Pathogenese⁷⁶.

Das Bindegewebe kann bei den inflammatorischen Myopathien mit betroffen sein. Bei der Dermatomyositis gibt es im Regelfall typische Effloreszenzen⁷⁷.

Das Leitsymptom aller drei Krankheitsbilder ist eine langsam progrediente Muskelschwäche, besonders der proximalen Muskulatur, zu der noch Gelenks- und Muskelschmerzen treten können⁷⁸.

Es handelt sich bei den idiopathischen inflammatorischen Myopathien um autoaggressive Erkrankungen unbekannter Genese, bei denen histologisch lymphoplasmohistiozytäre Infiltrationen, besonders perivaskulär, im Vordergrund stehen. Außerdem werden Kaliberveränderungen und Atrophien der Muskelfasern beobachtet. Auch kommt es zu Muskelfasernekrosen und damit verbundenem degenerativem Abbau der befallenen Faser. Als Reaktion des Muskels kommt es zu herdförmigen Regenerationsversuchen aus Satellitenzellen. Die Anzahl der myelinisierten peripheren Nervenfasern ist oft vermindert^{79,80}.

Die IBM zeigt im lichtmikroskopischen histologischen Bild eine Infiltration des Interstitiums mit Lymphozyten sowie Vakuolen, die von kleinen Granula eingefasst werden ("rimmed vacuoles"). RRF, Zeichen einer mitochondrialen Schädigung, werden normalerweise ebenfalls gefunden⁸¹. Elektronenmikroskopisch sieht man sowohl im Zytoplasma als auch im Kern unterschiedliche filamentöse Einschlüsse. Die Mitochondrien zeigen die typischen ultrastrukturellen Veränderungen mitochondrialer Erkrankungen, z. B. parakristalline Einschlüsse⁷⁶.

Außerdem gibt es Verbindungen zu degenerativen zerebralen Erkrankungen, speziell zum M. Alzheimer, aber auch zu Prionerkrankungen: In Plaques, die im Muskel von IBM-Patienten regelmäßig vorkommen, werden vermehrt β -Amyloid, hyperphosphoryliertes Tau, zelluläres Prionprotein und andere Proteine gefunden, deren Anhäufung vorher nur in neuronalem Gewebe bei M. Alzheimer und Prionerkrankungen beobachtet wurde⁸².

Obwohl die genaue Ätiologie dieser Erkrankungen noch nicht bekannt ist, vermutet man zur

Zeit ein multifaktorielles Geschehen, wobei sowohl eine genetische als auch eine exogene Komponente eine Rolle spielen^{83,84,85}.

Als mögliche veränderte Kerngene werden Gene im Major Histocompatibility Complex (MHC), Gene für T-Zellrezeptoren, sowie Gene für Immunglobuline genannt⁸⁴. Außerdem werden multiple Deletionen der mtDNA als Ursache diskutiert^{86,87}.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist das Entwickeln von Screeningstrategien, die es ermöglichen, eine größere Anzahl von Patienten auf das Vorliegen häufig vorkommender Mitochondropathien zu testen und diese Tests bei verschiedenen Patientengruppen anzuwenden. Die Untersuchung soll einen Test auf Deletionen sowie auf die häufigsten Punktmutationen bei den Erkrankungen MERRF (A8344G), MELAS (A3243G) und Leigh (T8993G, T8993C) umfassen.

Zum Deletionsscreening wird die relativ neue Methode der longPCR, d. h. einer PCR, die Fragmente länger als 3000 Basenpaare herstellen kann, optimiert. Darüber hinaus sollen gefundene Deletionen näher charakterisiert und –wenn möglich- sequenziert werden, wobei zwei Sequenzierungsmethoden zur Verfügung stehen.

Mit Hilfe dieser Methoden soll vorrangig ein Patientenkollektiv mit inflammatorischen Myopathien auf Deletionen untersucht werden.

Für die Restriktionstests sollen geeignete Enzyme gefunden und ihre Reaktionsbedingungen optimiert werden.

In zwei Fällen soll auch nach der LHON-Mutation G3460A gesucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Gewebeproben

2.1.1 Kontrollen

Muskelgewebe zur Gewinnung von Kontrolltemplate wurde von der Pathologie der Universitätsklinik der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde aus einem Skelettmuskel - meistens aus dem musculus quadriceps femoris - entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Tod der Kontrollpersonen weniger als 24 Stunden zurücklag, um autolytische Prozesse auszuschließen. Außerdem war gesichert, dass die Personen zu Lebzeiten nicht an mitochondrial verursachten oder sonstigen neuromuskulären Erkrankungen gelitten hatten. Es wurde hauptsächlich Kontrolltemplate der Personen C1, C2 und C3 verwendet. Das Durchschnittsalter der Kontrollen von 75 Jahren entsprach in etwa dem der Patienten mit inflammatorischen Myopathien.

2.1.2 Patienten M und T

Bei den zu untersuchenden Patienten, Mutter (M) und Tochter (T), handelt es sich um zwei Mitglieder einer Familie, in der wiederholt LHON-Fälle aufgetreten waren, die auf die homoplasmatische Mutation G3460A zurückgeführt werden konnten. Der Stammbaum (Abb.4) konnte mit Hilfe von Dr. Joaquin Arenas, Centro de Investigacion, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spanien aufgestellt werden.

Der Stammbaum zeigt in jeder der untersuchten Generationen Personen, bei denen die homoplasmatische Mutation G3460A vorliegt (diagonaler Strich). (Personen, welche überhaupt noch nicht untersucht worden sind, sind durch gestrichelte Kästchen gekennzeichnet.) Es sind auch immer wieder Personen an LHON erkrankt (dick umrandete Kästchen).

Außerdem treten in dieser Familie vermehrt Fälle einer hypertrophen Kardiomyopathie auf (grau ausgefüllte Kästchen).

Von den im Stammbaum hervorgehobenen Personen, der Mutter M (*1966) (durchgehender Pfeil) und ihrer Tochter T (*1996) (gestrichelter Pfeil), wurde uns von der Kinderklinik der RWTH Aachen jeweils 5ml frisches Blut, welches mit dem gerinnungshemmenden Zusatz EDTA versetzt wurde, zur Untersuchung übergeben.

Beide Ratsuchenden waren zum Zeitpunkt der Untersuchung (Sommer 1998) vollständig beschwerdefrei. Es sollte festgestellt werden, ob bei diesen beiden Personen ebenfalls die Punktmutation G3460A in Homoplasmie vorliegt.

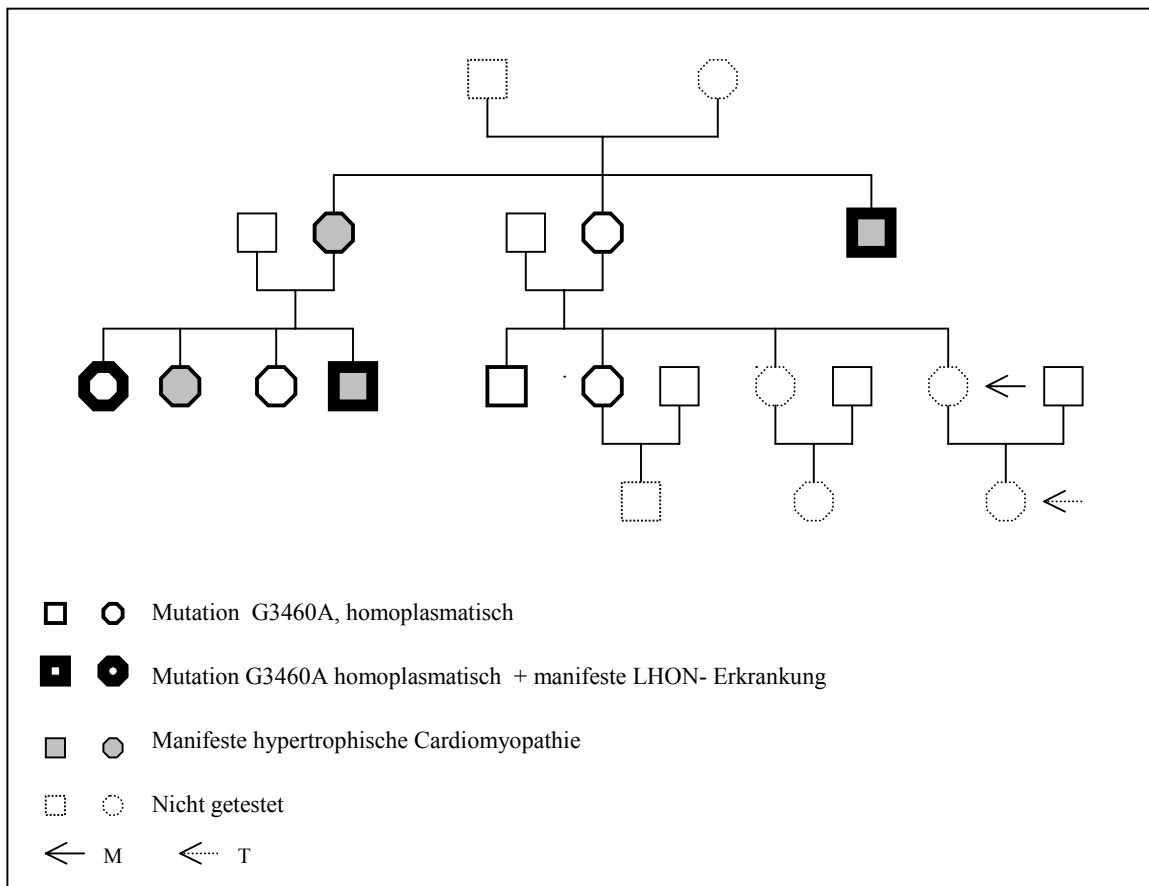


Abb.4: Stammbaum der von LHON und hypertropher Kardiomyopathie betroffenen Familie.

Genauere Untersuchungen der klinisch unauffälligen potentiellen Mutationsträger M und T, insbesondere eine Funduskopie des Augenhintergrundes sowie Echokardiographie und

Elektrokardiographie des Herzens, liegen nicht vor. Auch bei den anderen Familienmitgliedern sind solche Untersuchungen nicht vorgenommen worden.

2.1.3 Patient D

Dieser Patient (weiblich, *1963) litt zum Zeitpunkt der Probeentnahme 1995 an einer seit ca. vier Jahren bestehenden externen Ophthalmoplegie sowie einer peripheren Neuropathie. Außerdem bestand der Verdacht auf epileptische Krampfanfälle.

Um die klinische Verdachtsdiagnose Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) zu bestätigen, wurden Muskelbiopsieproben (M. deltoideus, M. tibialis anterior) an Prof. Dr. Schröder, Leiter des Instituts für Neuropathologie der RWTH Aachen, gesandt.

Das lichtmikroskopische Bild zeigte atrophische und teiltrophische Muskelfasern mit teilweise pyknotischen Kernen. Außerdem waren (besonders im M. tibialis) in der Trichrom-Färbung „ragged red fibers“ und nach der NADH- Reaktion eine Vermehrung der mitochondrialen Enzymaktivität zu erkennen.

Der elektronenmikroskopische Befund zeigt subsarkolemmal angehäuften Mitochondrien. Zahlreiche dieser Mitochondrien enthalten parakristalline Einschlüsse. Das Glykogen ist subsarkolemmal erhöht; selten sind membranöse zytoplasmatische Körperchen bzw. Lipofuszin Körper zu finden.

Die neuropathologische Untersuchung spricht für eine Myopathie mitochondrialer Genese.

Bei einer Genuntersuchung mittels Southern Blot konnte keine Deletion des mitochondrialen Genoms festgestellt werden.

2.1.4 Patienten P1, P4, P6

Es wurde uns die mtDNA eines Patientenkollektivs von IIM-Patienten ebenfalls von Prof. Dr. Schröder zur Verfügung gestellt, der auch die mikroskopischen Untersuchungen durchführte.

Bei allen Patienten war die Diagnose IIM sowohl durch die Klinik als auch durch die licht- und elektronenmikroskopischen Befunde gesichert. Nur die drei Patienten, deren mtDNA von uns ausführlich untersucht worden ist, werden hier näher dargestellt.

Patient P1 (männlich, *1929) wurde 1994 durch eine rasch progrediente periphere Neuropathie mit Atrophie der interossären Muskeln an Hand und Fuß auffällig.

Als Nebenbefund lag eine kortisonpflichtige, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COLD) vor.

Die lichtmikroskopische Untersuchung einer Muskelbiopsie zeigte zahlreiche atrophische und teilatrophische Muskelfasern. Einige Muskelfasern wiesen Spaltbildungen auf. Die Mitochondrien waren ungleichmäßig verteilt; in einigen Segmenten fehlten sie völlig.

Es waren „ragged red fibers“ und spärliche osmiophile Glykogenablagerungen zu erkennen. Es waren keine entzündlichen Infiltrate, auch nicht im endomysialen Bindegewebe, nachweisbar.

Das elektronenmikroskopische Bild des Muskels bestätigte die abnorme Verteilung der Mitochondrien: In einzelnen Fasern fand man subsarkolemmal angehäuften Mitochondrien, während im Bereich der Z-Band-Ströme und A-Bänder nur sehr wenige Mitochondrien zu sehen waren; in anderen Fasern waren die Mitochondrien relativ gleichmäßig verteilt. Es kamen keine parakristallinen Einschlüsse in den Mitochondrien vor, wohl aber vereinzelt kleinere membranöse zytoplasmatische Körperchen.

In der Biopsie des N. suralis rechts erkannte man tomakulöse Fasern sowie eine Mikroangiopathie.

Die abnorm verteilten Mitochondrien und die „ragged red fibers“ in der Muskelprobe sprachen für eine Muskelerkrankung mit mitochondrialer Mitbeteiligung. Die wahrscheinlichste Diagnose war eine akute Polymyositis, auf die vor allem das Fehlen von Mitochondrien im Bereich der Z-Band-Ströme hinwies. Dies ist auch ohne das Vorliegen von

entzündlichem Infiltrat ein sicheres Zeichen für eine akute Polymyositis. Das Fehlen von Entzündungszellen kann z. B. auf eine fehlerhafte Probeentnahme zurückzuführen sein^{88,78}.

Die Nervenveränderungen sprachen für eine tomakulöse Neuropathie, die Mikroangiopathie war auf die COLD zurückzuführen.

Patient P4 (weiblich, *1919) litt zum Zeitpunkt der Probenentnahme 1995 unter einer seit ca. 9 Monaten bestehenden progredienten, proximal betonten Parese des rechten Beines und des rechten Armes ohne Sensibilitätsverlust.

Neurologisch wurde eine periphere Neuropathie mit fehlenden Muskeleigenreflexen festgestellt. Das EMG zeigte starke Spontanaktivität. Es waren antinukleäre Antikörper nachweisbar.

Bei der Untersuchung des rechten M. gastrocnemius erkannte man im Lichtmikroskop in Haufen liegende teiltrophische und atrophische sowie hypertrophische Muskelfasern. Außerdem waren einige Fasern nekrotisch. Im Endomysium fanden sich mononukleäre Entzündungszellen, perivaskulär um die Arterien des Perimysiums liegen neben Lymphozyten auch Makrophagen. „Rimmed vacuoles“ waren zu erkennen.

Bei der NADH-Reaktion sah man eine unregelmäßige Verteilung der Enzymaktivität; in der Trichromfärbung waren spärliche fuchsinophile Ablagerungen sichtbar.

Das elektronenmikroskopische Bild zeigte ebenfalls atrophische Fasern, die teilweise „vacuoles mouchetes“ enthielten. Membranöse zytoplasmatische Körperchen kamen nur vereinzelt vor und die charakteristischen tubulofilamentösen Strukturen waren in dem untersuchten Gewebe an keiner Stelle gefunden worden. Abnorme oder vermehrte Mitochondrien waren nicht zu erkennen.

Die Biopsie des rechten N. suralis zeigte im Lichtmikroskop ein mäßiges subperineurales Ödem. Von den markhaltigen Nerven waren einige hypomyelinisiert, während andere sich in der Regenerationsphase befanden. Im Epineurium erschienen einige arterielle Blutgefäße

fibrosiert, daneben lagen fokal umschriebene Kapillarproliferate vor. Dies ist das typische Bild einer chronischen Neuropathie.

Die Befunde sprachen für eine chronisch-progrediente Myositis. Eine Einschlusskörpermyositis ist die wahrscheinlichste Verdachtsdiagnose, da die typischen „rimmed vacuoles“ gefunden worden waren und eine typische neuronale Mitbeteiligung vorlag. Die fehlenden Einschlusskörper ließen sich dadurch erklären, dass sie nur fokal vorkommen können und der befallene Muskelabschnitt nicht biopsiert worden war⁷⁸.

Patient P6 (weiblich, *1921) klagte zum Zeitpunkt der Probeentnahme 1993 über eine seit ca. 4 Jahren bestehende progressive Muskelschwäche und Schmerzen, besonders in den Beinen. Außerdem lag beidseits ein angedeuteter Steppergang vor.

Bei der klinischen Untersuchung wurden beidseitig strumpfförmige Hypoästhesien festgestellt. Das EMG zeigte myotone Entladungen.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung eines nicht näher spezifizierten Skelettmuskels sah man im Interstitium mononukleäre entzündliche Zellinfiltrate, Muskelnekrosen und „rimmed vacuoles“. In der Trichrom-Färbung erkannte man RRF.

Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten membranöse zytoplasmatische Körperchen sowie tubulofilamentöse und amorphe bzw. pleomorphe Einschlüsse. Einzelne atrophische Muskelfasern waren ebenfalls zu sehen. Es fand sich eine Anhäufung abnormer Mitochondrien: Die Mitochondrien waren vergrößert und enthielten parakristalline Einschlüsse.

Die Nervenbiopsie aus einem nicht näher bekannten Nerven zeigte eine mäßiggradige chronische Neuropathie.

Das Bild, besonders die tubulofilamentösen Einschlüsse und die „rimmed vacuoles“, war typisch für eine Einschlusskörpermyositis.

2.1.5 Patient L

Der Junge L (*1996) litt an einer Schwäche der Beinmuskulatur, wobei der Tonus der gesamten Muskulatur erniedrigt war, sowie einer Hörstörung und nächtlicher Epilepsie. Außerdem lag eine facies myopathica mit Ptose, fehlender Faltenbildung auf der Stirn und in der Nasolabialregion und oft leicht geöffnetem Mund vor. Seine körperliche und geistige Entwicklung war gegenüber der gleichaltriger Kinder verlangsamt.

Die Laktatwerte waren normal, die Werte der Creatinkinase lag im oberen Normbereich (bis 80 U/l).

Sowohl der Computer- als auch der Kernspintomograph zeigten keine morphologischen Veränderungen des Gehirnes. Es wurden somatosensibel evozierte Potentiale abgeleitet, die aber keine Auffälligkeit zeigten.

Bei biochemischen Untersuchungen konnten keine Stoffwechseldefekte festgestellt werden.

Aufgrund der Untersuchungen und des klinischen Bildes wurde dem Kind zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose Morbus Leigh eine Muskelprobe entnommen und uns von der Kinderklinik der RWTH zur näheren Untersuchung zur Verfügung gestellt.

2.2 Präparation mitochondrialer DNA

2.2.1 Extraktion aus Muskelgewebe

Die Extraktion von mtDNA aus Muskelgewebe geschieht grundsätzlich anhand der Präparationsanleitung von Wallace³¹, die allerdings in unserem Labor modifiziert wurde⁸⁹.

Diese Methode eignet sich sowohl für eine Mikro- (ca. 25mg im Falle der Patienten) als auch für eine Makropräparation (ca. 3g im Falle der Kontrollen).

Das Gewebe wird mit Hilfe eines Skalpells möglichst fein zerteilt, in H-Puffer (siehe p.46) aufgenommen und mit 5 Schlägen im Dounce-Homogenisator bei 6000 U homogenisiert. Anschließend werden die Zellreste und Kerne durch dreimaliges, fünfminütiges

Zentrifugieren mit bei 4°C (1810 G, EP5403) von dem Überstand getrennt.

Dieser Überstand, welcher die Mitochondrien enthält, wird für 60 Minuten mit 14000 G bei 4°C zentrifugiert (RMC 14). Das dadurch entstandene Mitochondrienpellet wird in der Menge Lysis-Puffer (Applied Biosystems) aufgenommen, die ca. einem Drittel des Volumens der Ausgangsgewebemenge entspricht. Dazu wird Proteinase K (20g/l, Applied Biosystems) bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml gegeben, um die Mitochondrien im 50°C warmen Wasserbad über Nacht zu lysieren.

2.2.2 Extraktion aus peripherem Blut

Ebenfalls in unserem Labor entwickelt wurde eine Technik zur Isolation von mtDNA aus peripherem Blut⁸⁹. Hierbei werden jeweils 5ml Vollblut eingesetzt, die mit Hilfe einer Na-K-EDTA-Küvette abgenommen worden sind.

Das Vollblut wird 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (900 G, EP5403). Anschließend wird das Plasma abgezogen, wobei der Leukozytensaum bei den Erythrozyten im Reagenzglas verbleibt. Das Plasma wird zur Seite gestellt und der Hämatokrit mit 4,5 ml Hämolysispuffer versetzt und bis zur Lyse der Erythrozyten (Lösung wird klar) sanft bewegt. Diese Lösung wird 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (2870 G, EP5403), so dass sich die Leukozyten als Pellet absetzen.

Die Leukozyten werden in ein vierfaches Volumen an Saccharose-Puffer aufgenommen und durch 5 Schläge bei 6000 U homogenisiert.

Anschließend wird die Lösung dreimal für fünf Minuten mit 1810 G zentrifugiert (EP5403) und der Überstand, welcher die Mitochondrien enthält, abgezogen. Dieser Überstand wird 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (14000 G, RMC 14) und das Mitochondrienpellet mit 250 µl Lysispuffer und Proteinase K (20 g/ l, Applied Biosystems) versetzt und über Nacht im Wasserbad bei 50°C lysiert.

Das Thrombozyten-Plasma wird fünf Minuten bei Raumtemperatur (EP5403) zentrifugiert

(1810 G); eventuell noch vorhandene Leukozyten werden abgezogen. Das dekontaminierte Plasma wird dann 45 Minuten mit 3340 G (EP5403) zentrifugiert, wobei sich die Thrombozyten als Pellet absetzen.

Die Thrombozyten werden in der gleichen Weise weiterbehandelt wie die Mitochondrien der Leukozyten.

2.2.3 Aufreinigung der mtDNA

Die mitochondriale DNA, die nach der Präparation in einem Gemisch aus DNA, RNA, Proteinen und anderen zu verwerfenden Zellresten vorliegt, muß aufgereinigt werden. Diese Reinigung geschieht mittels der Phenolextraktion nach Sambrook⁹⁰.

Hier macht man sich zu Nutze, dass bei einer Phasentrennung die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben, während die anderen mitochondrialen Bestandteile in der organischen bzw. der Interphase gelöst sind. Die Phasentrennung wird durch mehrmaliges Zugabe eines Phenol/Chloroform/Wasser-Gemisches (Applied Biosystems) und anschließendes kurzes (ca. 5 min.) Zentrifugieren (4500 U, Heraeus Labofuge GL) erreicht. Ist keine Interphase mehr sichtbar, wird die letzte Phasentrennung mit reinem Chloroform (Applied Biosystems) durchgeführt, um das Phenol, welches nachfolgende Reaktionen hemmen kann, vollständig zu entfernen.

Die wässrige Phase wird anschließend mit 1/10 Volumen NaAc-Lösung (Applied Biosystems) und 2 Volumen eisgekühltem 100% EtOH (Merck) versetzt und mindestens zwei Stunden bei -70°C gelagert. Anschließend wird die DNA durch ca. 60 minütiges Zentrifugieren bei 14000 G (RMC14) gefällt.

Das entstandene Pellet wird noch in 70 % igem EtOH gewaschen und in einer Speed Vac (Bachofen) getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in einer geeigneten Menge TE-Puffer (siehe 2.8.) aufgenommen. (z. B. bei einer Mikromuskelpräparation mit 25 mg Muskelgewebe 50 µl TE-Puffer).

2.3 Gelelektrophorese

2.3.1 Agarose-Gele

Mit Hilfe von Agarosegelen wird DNA zwischen ca. 16 kb bis ca. 50 bp nach Größe getrennt und gereinigt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel wird sie visualisiert. Dabei variiert die Agarosekonzentration mit der Größe der zu trennenden Fragmente (Tabelle 3).

Tabelle 3: unterschiedliche Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden Fragmente

Zu trennendes Fragmente	Größe	Agarosekonzentration
Restringierte PCR-Fragmente	< ca. 700 bp	1,5%
PCR-Fragmente	ca. 1000 bp	1%
LongPCR-Fragmente	14570 bp	0,8%
Mitochondriale, linearisierte DNA	16569 bp	0,6%

Die entsprechende Menge Agarose (Serva) wird in Ethidiumbromid-haltigem 1xTBE-Puffer (siehe 2.8) (200 µl Ethidiumbromid/l) bei 100°C und unter ständigem Rühren gelöst. Die warme Lösung wird direkt in die Gelkammer gegossen, bis die gewünschte Füllhöhe erreicht ist. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es mit Ethidiumbromid-freiem 1xTBE-Puffer überschichtet.

Es stehen verschiedene Kammern zur Verfügung: Zwei kleine Kammern aus der hauseigenen Werkstatt (12 bzw. 8 Taschen à 15 µl) und eine größere von der Firma Bio-Rad (20 Taschen à 20 µl). Die Proben werden mit einer Pipette in die Geltaschen geladen, nachdem ca. 1/10 des Volumens an Ladepuffer hinzugefügt worden ist. Damit die Größe der Banden besser abgeschätzt werden kann, wird auch immer ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen (1 kb Leiter, Gibco/BRL). Die kleinen Kammern laufen je nach Gelkonzentration mit 70- 150 Volt und die größere mit 150-250 Volt. Der Lauf wird gestoppt, wenn das mitlaufende Bromphenolblau mindestens das letzte Drittel des Gels erreicht hat.

2.3.2 Polyacrylamid-Gele

Polyacrylamid-Gele werden eingesetzt, wenn Fragmente getrennt werden sollen, die sich in einer so geringen Anzahl von Basen unterscheiden, dass die Auftrennungsmöglichkeit der Agarosegele nicht ausreicht ($< 100\text{bp}$).

2.3.2.1. Sequenziergele

Zum Sequenzieren werden Platten von 30 cm x 40 cm Größe verwendet, wobei die Platte, auf der später das Gel haften soll, bind-silanisiert (Bindsilane von LKB/Pharmacia), die Gegenplatte antibind-silanisiert (Antibindsilane von LKB/Pharmacia) wird. Die Platten können so behandelt ca. 14 Tage aufbewahrt werden.

Beim Zusammensetzen der Platten werden die seitlichen Ränder zur Erhöhung der Dichtigkeit mit „gel sealing tape“ (GibcoBRL) nach Einsetzen von Spacern verklebt, anschließend werden die Seiten geklammert.

Für die Erkennung von 40- 400 Basen, was die übliche Bandbreite darstellt, wird ein 8 % iges Polyacrylamidgel verwendet: Für 500 ml Lösung werden 210 g Harnstoff in 175 ml destilliertem H_2O (dH_2O) und 50 ml 10x TBE bei 50°C unter Rühren gelöst; zu dieser Lösung werden 100 ml Acrylamid 38 % (95 % Acrylamid, 5 % Methylenbisacrylamid) gegeben und alles mit dH_2O auf das Endvolumen aufgefüllt. Dem 8 %igen Polyacrylamidgel wird 0,8 % APS und 0,08 % TEMED (siehe 2.8) zugesetzt und das Gel in einem 45° - Winkel gegossen.

Sofort nach dem Gießen werden die Haifischkämme eingesetzt, die, um die Dichtigkeit der Taschen zu erhöhen, an beiden Seiten jeweils mit einer Klammer fixiert werden.

Zum Auspolymerisieren wird das Gel waagrecht gelegt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Pufferkammern der Sequenzierapparatur (Modell S2) von BRL werden mit 1x TBE-Puffer gefüllt, die Geltasche wird, nachdem das Gel eingespannt worden ist, durch Ausspülen mit 1xTBE-Puffer von Gelrückständen befreit. Ein Vorlauf von 30 min. bei 1000V sowie 30

min. bei 1500V sichert das gleichmäßige und langsame Erwärmen des Gels und der Glasplatten.

Die Proben werden durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert und dann mit Hilfe spezieller Pipettenspitzen aufgetragen. Es wird eine Spannung von 2000V angelegt; die Laufdauer richtet sich nach dem Abstand des Primers von der gesuchten Sequenz (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Abhängigkeit der Laufdauer von der Entfernung zwischen Primer und zu lesender Sequenz

Abstand vom Primer	Laufdauer
Bis 400 bp	10h
130 bp – 300 bp	8h
100 bp – 220 bp	3h
40 bp – 150 bp	2h

Die Gelplatten werden nach dem Lauf getrennt, das Gel wird 2x in 10% iger Essigsäure und anschließend einmal in dH₂O gewaschen, über Nacht getrocknet, und unter Auflegen eines Röntgenfilmes bei Raumtemperatur in einer Metallkassette exponiert. Die Dauer der Exposition richtet sich nach der Menge der aufgetragenen Probe, der Größe der Fragmente sowie nach dem Alter des Isotops. Die Röntgenfilme stammen von der Firma Du Pont (nicht mehr erhältlich).

2.3.2.2 Native Gele

Die nativen Gele dienen der Auftrennung nicht denaturierter DNA, z. B. der Trennung von Restriktionsfragmenten. Für native Gele verwenden wir Platten von 20 cm x 55 cm in einer Apparatur mit Termokonstantplatte von LKB (2010 Macrophor Electrophoresis Unit).

Für 500 ml Reaktionslösung (ausreichend für fünf Gele) werden 58 ml 30 % iges Acrylamid

(97 % Acrylamid, 3 % Methylen bisacrylamid) in 338,5 ml dH₂O und 100 ml 10x TBE gelöst; diese Lösung wird dann mit d H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die Gelplatte wird wieder bind-, die Termokonstantplatte antibind-silanisiert. Allerdings wird hier die Gelplatte nur bei ca. jeder dritten Benutzung bind-silanisiert, da sonst die Haftung so stark ist, dass das Gel beim Auseinandernehmen der Platten zerreißt.

Vor dem Zusammensetzen der Platten werden an den Seiten und an der unteren Kante Spacer eingesetzt. Das Platten-Sandwich wird an der unteren Schmalseite mit Agarose und zusätzlich mit Sealing-Tape abgedichtet, die Seiten werden geklammert.

Das Gel wird ebenfalls in einem Winkel von 45° gegossen und polymerisiert über Nacht bei 4°C aus.

Die Pufferkammern sind, wie bei dem Sequenziergel, mit 1xTBE gefüllt; die Haifischkämme werden in der gleichen Weise eingesetzt, allerdings werden sie hier über ihre gesamte Breite geklammert. Die Termokonstantplatte wird auf 7°C gekühlt; in dieser Zeit findet der Vorlauf von 30 min bei 1500V statt. Zu den Restriktionsproben werden noch jeweils 1-3 µl Ladepuffer hinzugegeben, bevor diese ohne vorherige Denaturierung aufgetragen werden.

Die Hauptanwendung in unserem Labor für native Gele ist die Auftrennung der Fragmente, die bei der MERRF-Restriktion entstehen (siehe 2.5.); dies dauert bei 2500V ca. 90 min..

Die Gelplatten werden getrennt, das Gel in 10% igem Acetat und anschließend in dH₂O gewaschen, über Nacht getrocknet und in einem Plastikkontainer exponiert. Die verwendeten Röntgenfilme sind von Aqua (Curix HAT.000G), die Expositionsdauer richtet sich nach der Menge der aufgetragenen DNA , dem Alter des verwendeten Isotops sowie der Größe der Restriktionsfragmente (ca. 5 Tage bei frischem Isotop).

2.3.2.3 Gele für single strand conformation polymorphism

Das Ausgangsgemisch für SSCP-Gele (SSCP: single strand conformation polymorphism) ist eine 30 % ige Acrylamidlösung (96,7 % Acrylamid; 3,3 % Methylenbisacrylamid). Das

gebrauchsfertige Gel enthält 5 % Acrylamidlösung und 7,5 % Glycerol. Um 100 ml dieser Mischung herzustellen (ausreichend für ein Gel), mischt man 58 ml dH₂O , 10 ml 10xTBE, 15 ml 0,5 x Glycerol und 17 ml 30 %ige Acrylamidlösung in einem geeigneten Gefäß.

Die Platten werden wie bei den nativen Gelen behandelt, geklammert und gegossen . Vor dem Gießen fügt man dem Reaktionsgemisch 0,68 % APS und 0,04 % TEMED hinzu. Das Gel lässt man ebenfalls über Nacht bei 4°C auspolymerisieren.

Die Temperatur der Thermokonstantplatte beträgt während des Auftragens der Proben 4°C, während des Laufes 7°C. Die Laufdauer und die angelegte Spannung richten sich nach der Anwendung. Bei dem für diese Arbeit aufgetragenen Fragment F3 (nt3001 – nt4500) waren die Bedingungen wie folgt:

- a) Taglauf: Vorlauf 30 min. bei 1000 V, Lauf 2500 V, 3 h
- b) Nachtlaf: Vorlauf 30 min. bei 500 V, Lauf 1000 V, 8,5 h

Die Proben werden vor dem Auftragen mit SDS –Lösung in dem Verhältnis Template: SDS = 1:5, sowie mit Ladepuffer versetzt und durch Erhitzen bei 95°C und anschließendem direkten Abkühlen auf Eis denaturiert.

Nach dem Lauf wird das Gel in 10 %igem Acetat und in H₂O gewaschen, über Nacht getrocknet und in einem Plastikkontainer exponiert. Die Filme sind von DuPont, die Expositionszeit richtet sich nach der Menge der aufgetragenen DNA und nach dem Alter des verwendeten Isotops sowie der Größe der aufgetragenen DNA- Fragmente.

2.3.3 Isolation der Probe aus Agarosegelen

Um das Template aus dem Agarosegel zurückzugewinnen, wird die Bande ausgeschnitten und das ausgeschnittene Agarosestück für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren. Danach wird durch Quetschen des gefrorenen Stückes mit dem warmen Finger das in dem Puffer gelöste Template aus dem Agaroseskelett gelöst und steht damit für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Die Ausbeute beträgt bei diesem Verfahren ca. 50 % und entspricht damit

der Ausbeute der kommerziellen Verfahren .

2.3.4 Phosphorscreen

Der Phosphorscreen ermöglicht es mit Hilfe eines computergesteuerten Scanners (Phosphorimager STORM) (beides von Molecular Dynamics) die Expositionszeit radioaktiver Gele auf ca. 1/10 zu reduzieren und gleichzeitig quantitative Untersuchungen leichter und genauer vorzunehmen (Programm: Imagequant, Molecular Dynamics). Der Screen von der Größe einer Gelplatte besteht aus dicht nebeneinander liegenden BaFBr:Eu⁺²-Kristallen, die, wenn sie durch ionisierende Strahlen angeregt werden, ihre Stellung ändern, so dass ein Bild des Geles entsteht. Werden diese Kristalle nun während des Scanvorganges von dem Laser abgetastet, geben sie die gespeicherte Energie in Form von blauem Licht wieder ab und kehren in ihre Grundstellung zurück. Das blaue Licht wird nun von einem Detektor qualitativ und quantitativ erfaßt. Indem man den Screen nach dem Scanvorgang ca. 15 Minuten dem Tageslicht aussetzt, wird das gespeicherte Bild vollständig gelöscht und der Screen kann - bei richtiger Pflege - beliebig oft wiederverwendet werden.

2.4 Polymerase chain reaction (PCR)

2.4.1 PCR, ca. 700 – 2000 Basenpaare

Um das mitochondriale Genom für nähere Untersuchungen von Punktmutationen oder anderen Veränderungen in einer übersichtlichen Form vorliegen zu haben, haben wir es in 14 ca. 1000 bp große Fragmente unterteilt (siehe Tabelle 5). F_{MERRF} ist ein Fragment für eine besondere Fragestellung.

In eine PCR werden 1-10ng (optimal 5ng) Template pro Reaktion gegeben. Die Primer liegen in einer Konzentration von 8pmol/100µl vor. Als Reaktionsmischung dient der „DNA Polymerization Mix“ von Pharmacia Biotech. Von der Taq- Polymerase werden 2,5 U hinzugefügt. Das Gesamtreaktionsvolumen beträgt 100 µl. Die Denaturierungstemperatur

liegt bei 94°C, die Denaturierungszeit im ersten Zyklus bei 300", anschließend bei jeweils 30". Die Annealingzeit liegt bei 60", die Extensionstemperatur bei 72°C. Annealingtemperatur (T_{ann}), Extensionszeit (t_{ext}) und Zykluszahl (Z) variieren je nach Fragment. Die genauen Werte und die für jedes Fragment verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die spezifische Hybridisierungstemperatur (T_m) kann für jeden Primer (bis ca. 20 bp) empirisch durch folgende Formel ermittelt werden: $T_m = 4x (G+C) + 2x (A+T)$.

Tabelle 5: 14 Fragmente, in die das mitochondriale Genom zur besseren Handhabbarkeit unterteilt worden ist. Die Lage der Primer sowie ihre Basenabfolge sind angegeben. F.-Nr.: Nummer des Fragmentes, Z:Zykluszahl, t_{ext} : Extensionszeit, T_m :spezifische Hybridisierungstemperatur, T_{ann} : experimentell ermittelte Annealingtemperatur, bp: spezifische Größe des Fragmentes

F.-Nr	Primer	Sequenz 5' → 3'	Z	t_{ext} [sec.]	T_m [°C]	T_{ann} [°C]	bp
1	H 1	GATCACAGGTCTATCACCT	38	60	60	61	1.500
	L1500	GAGGAGGGTGACGGGCGGTG			70		
2	H1501	AAGTATACTTCAAAGGACAT	35	60	52	55	1.500
	L3000	TGATCCAACATTGAGGTCGT			58		
3	H3001	GGACATCCCAGTGGTGCAGC	35	50	66	62	1.500
	L4500	AGTAGATGACGGGTGGGCC			64		
4	H4501	CTACCATCTTGCAGGCACA	38	65	60	60	1.649
	L6149	TAGTCAGTTGCCAAAGCCTC			60		
5	H6150	GTCCCCTAATAATCGGTGC	35	50	60	53	1.295
	L7444	CTAGATTTTATGTATACGGG			54		
6	H7415	ATTCGAAGAACCCGTATACA	35	40	56	55	950
	L8364	TCACTGTAAAGAGGTGTTGG			58		
7	H8363	GAAATGCCCCAACTAAATAC	35	35	56	53	843
	L9205	TTATGTGTTGTCGTGCAGGT			58		
8	H9207	ATGACCCACCAATCACATGC	35	30	60	61	783
	L9990	AAGACCCTCATCAATAGATG			56		
9	H9991	ACTCTTTTAGTATAAATAGT	38	60	48	43	1.460
	L11450	GTACTATTGACCCAGCGATG			60		
10	H11451	TTGCCGCAGTACTCTTAAAA	35	45	56	60	1.120
	L12570	TAGGGAGAGCTGGGTGTTT			60		
11	H12571	AGCTTCAAAGTACTACCTT	35	40	54	53	1.000
	L13570	TAATAGATAGGGCTCAGGCG			60		
12	H13571	CTCTCATCGCTACCTCCCTG	37	40	64	58	1.000
	L14570	GCGGTGTGGTCGGGTGTGTT			66		
13	H14571	TAACAATCAATACTAAACCC	35	40	52	55	1.000
	L15570	AGGAAATATCATTCGGGCTT			56		
14	H15571	ATTCGCCTACACAATTCTCC	35	40	58	50	999
	L16569	CATCGTGATGTCTTATTTAA			52		
MERRF	H7415	ATTCGAAGAACCCGTATACA	35	35	s.o.	54	957
	L8372	GGGGCAATTCAGTGTAAAGAGGTGTGG			s.o.		

Die ideale Annealingtemperatur (T_{ann}) des Reaktionsgemisches ist von verschiedenen

Faktoren, wie z.B. der Häufigkeit der Primersequenzen im mtGenom, abhängig und muß für jede Primerkombination, ausgehend von den beiden T_m -Werten, experimentell ermittelt werden.

Die verwendeten Primer stammen von der Firma MWG-Biotech; sie liegen in einer Arbeitskonzentration von 8 pmol/ μ l vor. Die Taq-Polymerase ist von Pharmacia Biotech.

Die PCR-Reaktionen werden in automatischen Thermocyclern durchgeführt, die in unserer Abteilung entwickelt wurden. Dabei werden die Proben mit einem Wachskügelchen (AmpliWax PCR Gem von Perkin Elmer) überschichtet, wenn das verwendete Gerät nicht über einen beheizbaren Deckel verfügt, um Volumenschwankungen durch verdunstendes Wasser während der Reaktion zu verhindern.

Soll das Template z.B. für eine anschließende SSCP radioaktiv markiert werden, so wird dem Reaktionsgemisch vor Ablauf der Reaktion 1 μ l α - P^{32} dATP (Amersham Pharmacia Biotech) unter Beachtung der Sicherheitsvorschriften hinzugefügt. Die Probe ist anschließend mit der erforderlichen Sorgfalt zu behandeln.

2.4.2 „Long distance“- PCR (longPCR)

Die Methode der longPCR⁹¹ wird weiterentwickelt, um ein Deletionsscreening-Verfahren zur Verfügung zu haben, welches die Untersuchung möglichst vieler Patienten in relativ kurzer Zeit erlaubt.

Diese relativ neue PCR-Methode ermöglicht es, Fragmente von mehr als 10.000 bp Länge zu amplifizieren. Hierzu ist ein spezielles Gemisch aus zwei Polymerasen nötig, von denen die eine nur kurze Stücke amplifizieren kann, dafür aber über Proofreading-Eigenschaften verfügt und die andere eine große Anzahl von Basen verknüpfen kann.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit war es technisch noch nicht möglich, das gesamte mitochondriale Genom von ca. 16500 bp zu amplifizieren; es sind nur Amplifikate von höchstens 15000 bp Länge möglich. Der verwendete Kit aus longPCR-Polymerase und Puffer

stammt von Takara Biomedicals (Japan). Die Primer sind die gleichen, die auch in der normalen PCR eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Reaktionsbedingungen der longPCR optimiert: Das Reaktionsvolumen beträgt 50 µl. 1/10 des Volumens besteht aus TaKaRa 10xPuffer (Mg⁺). Es werden 2,5 mM von jedem Nukleotid dazugegeben, ca. 30 ng Template sowie jeweils 12,8 µM der Primer 11 und 24. Die Aktivität der TaKaRaPolymerase sollte 2,5 U betragen. Die Vertiefung des Heizblockes sollte mit 10 Tropfen Silikonöl gefüllt sein, um eine ideale Temperaturkinetik zu erreichen. Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt optimiert: 1. Denaturierung: 94°C, 60“; weitere Denaturierungen: 98°C, 20“; Annealing+Extension: 68°C, 600“; letzte Extension: 1200“; Zykluszahl: 30.

Bei der longPCR trat ein Muster an Hintergrundbanden (2000bp, 4000 bp, 6000 bp, 8000 bp und 12000 bp) bei allen Templates regelmäßig auf (besonders gut sichtbar an C1 – C3 in Abb.19). Um das Vorliegen von mismatch-Banden auszuschließen, wurde ein Primershift (H14570 → H13570) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich zumindest bei der ca. 8000 bp großen Bande nicht um eine mismatch-Bande handelte, da die Bande –wie erwartet- nach dem Primershift um 1000 bp verkürzt war. Die anderen Banden waren entweder in ihrer Größe nicht verändert oder nicht beurteilbar (ohne Abbildung).

Die DNA aller Patienten wurden unter den optimierten Bedingungen untersucht.

2.5 Restriktion

Für die Patienten M und T wurde ein Test auf die LHON-Mutation G3460A entwickelt.

Zum Screening wurden Restriktionstests für die häufigsten Punktmutationen, die bei Mitochondriopathien auftreten können, vorgenommen: Ein Test wurde entwickelt für die Leigh-Mutationen T8993G und T8993C, die Melas-Mutation A3243G, sowie für die MERRF-Mutation A8344G.

2.5.1 LHON-Mutation, G3460A

Dieser Restriktionstest wurde nicht als Screeningtest eingesetzt. Er fand gezielt Anwendung bei der Untersuchung der beiden LHON-Fälle M und T. Bei diesem Test kommt durch die Mutation in Fragment3 keine Schnittstelle hinzu, sondern es entfällt die Schnittstelle bei nt3467 (Abb.5).

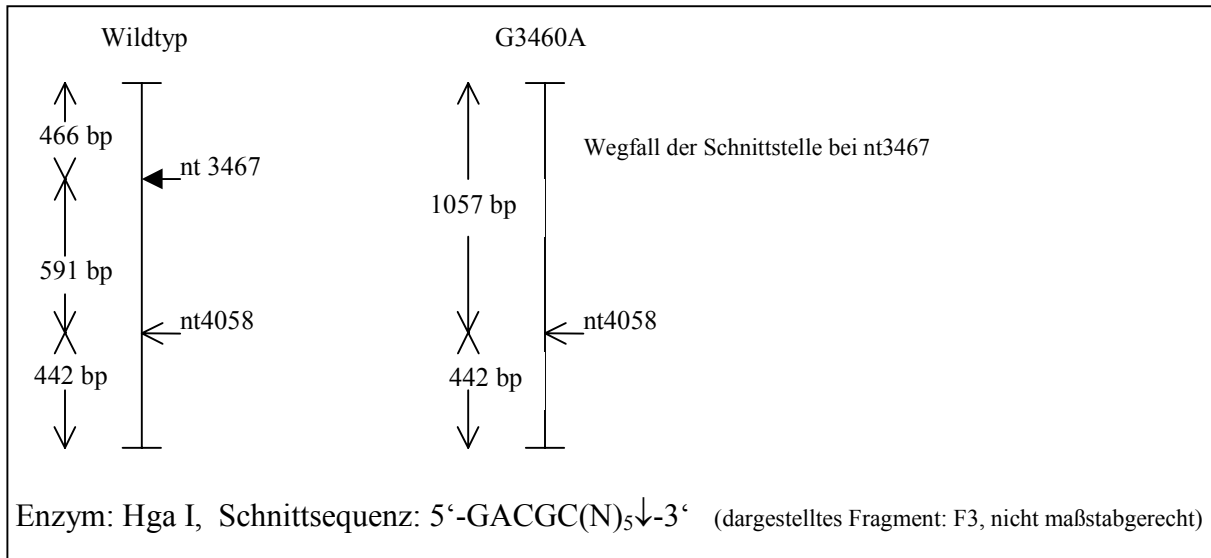


Abb.5: schematische Darstellung der Restriktion des Fragmentes F₃ mit Hga I; beim Vorliegen einer Punktmutation kommt es zum Verlust der gekennzeichneten Schnittstelle (←)

2.5.2 Leigh-Mutation, T8993G, T8993C

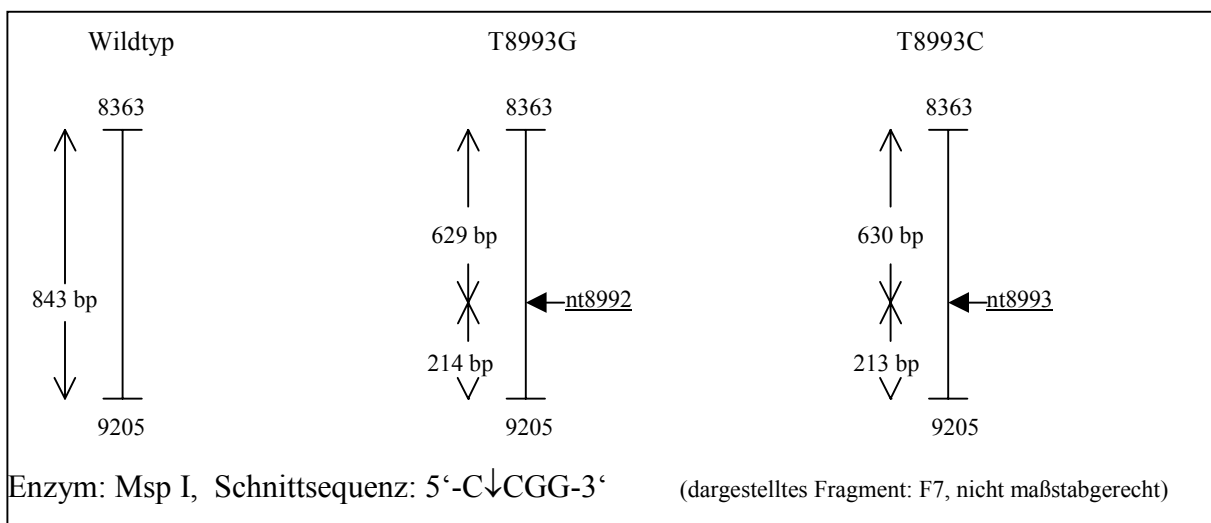


Abb.6: schematische Darstellung der Restriktion des Fragmentes F7 mit Msp I; beim Vorliegen einer Punktmutation kommt es zu einer Schnittstelle (←)

Um das Vorliegen einer Leigh-Mutation zu untersuchen (Abb.6), wird das Fragment7 (nt8363 – nt9205) als Template eingesetzt.

Beim Wildtyp gibt es für das Enzym Msp I keine Schnittstelle. Im Agarosegel erscheint eine Bande mit einer Länge von 842 Basenpaaren. Beim Vorliegen der Punktmutation T8993G kommt es zu einer Schnittstelle bei nt8992, bei der Punktmutation T8993C kommt es zu einer Schnittstelle bei nt8993. Dadurch entstehen im Agarosegel zwei Banden mit ca. 630 bp und ca. 214 bp.

Eine Unterscheidung zwischen den beiden möglichen Punktmutationen ist mit Msp I nicht möglich. Um genau zu wissen, welche der beiden Mutationen vorliegt, benötigt man das Enzym Ava I. Eine Vortestung mit Msp I ist jedoch immer nötig, da der Wildtyp im Restriktionstest mit Ava I genauso aussieht wie die Mutation T8993C. Bei beiden kommt es zu keiner Schnittstelle. Liegt allerdings die Mutation T8993G vor, so wird F7 hinter nt8991 in zwei Fragmente (628 bp und 215 bp) geteilt (Abb.7).

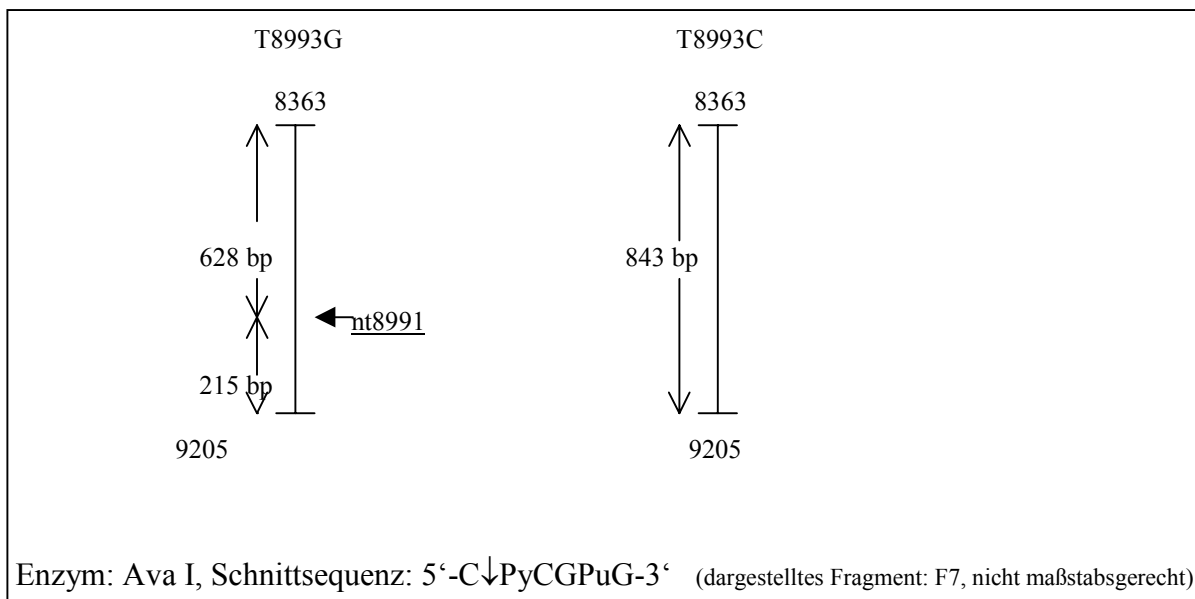


Abb.7: schematische Darstellung der Restriktion des Fragmentes F7 mit Ava I; beim Vorliegen der Punktmutation T8993G kommt es zu einer Schnittstelle (←)

2.5.3 MELAS-Mutation, A3243G

Die MELAS-Mutation wird nach dem selben Prinzip untersucht. Beim Wildtyp wird das Fragment3, in dem sich die potentielle MELAS-Mutation befindet, einmal von Apa I geschnitten. Beim Vorliegen der Mutation kommt eine zusätzliche Schnittstelle hinzu (Abb.8).

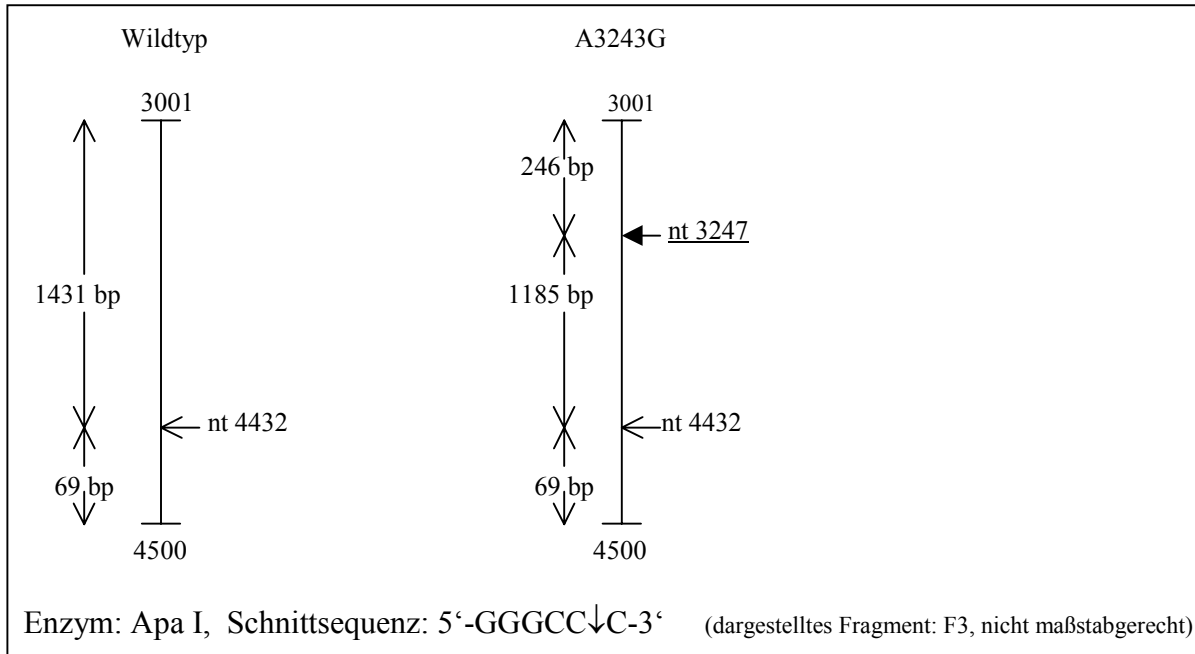


Abb.8: schematische Darstellung der Restriktion des Fragmentes F3 mit Apa I; beim Vorliegen einer Punktmutation kommt es zu einer zusätzlichen Schnittstelle (←)

2.5.4 MERRF- Mutation, A8344G

Ebenfalls durch eine zusätzliche Schnittstelle, diesmal im MERRF-Fragment, gekennzeichnet ist die MERRF-Mutation. Die Restriktion wird mit dem Enzym Ban II durchgeführt (Abb.9).

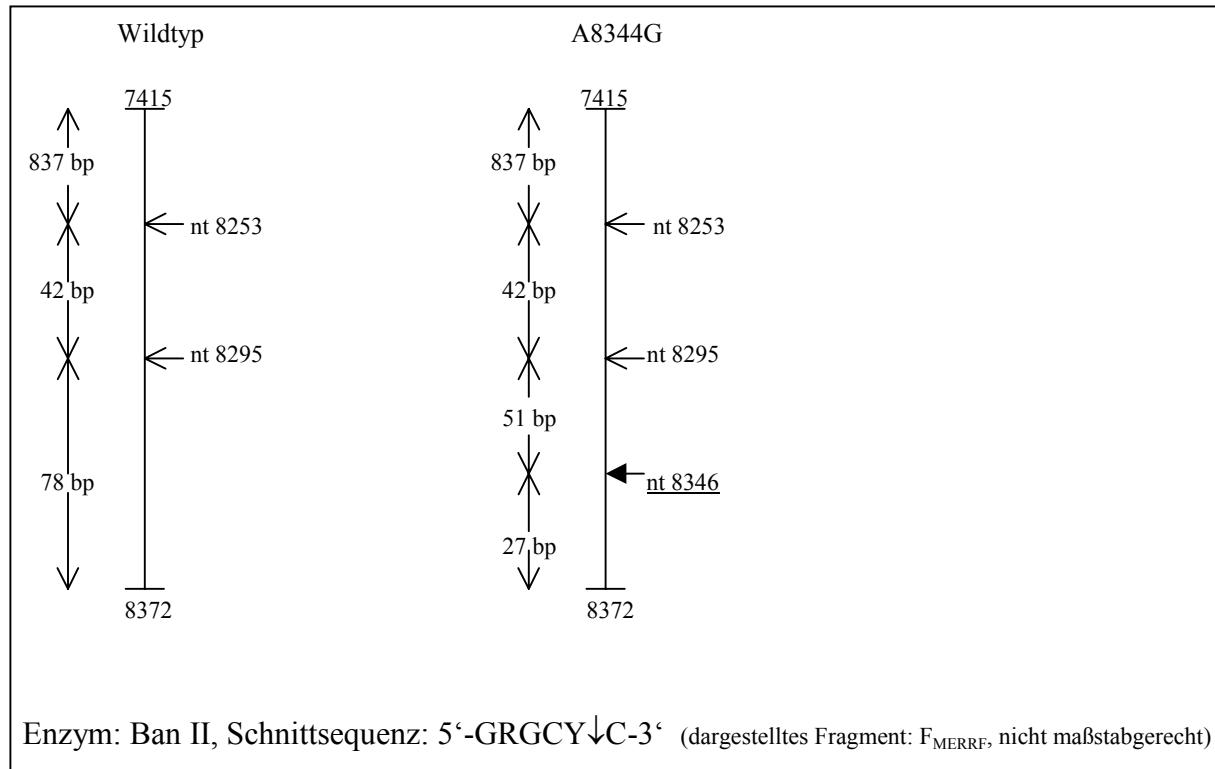


Abb.9: schematische Darstellung der Restriktion des Fragmentes F_{MERRF} mit Ban II; beim Vorliegen einer Punktmutation kommt es zu einer zusätzlichen Schnittstelle (←)

2.5.5 Optimale Restriktionsbedingungen

Die Bedingungen für eine Optimalrestriktion sind wie folgt: 50 µl Reaktionsvolumen; 5 µl Enzym spezifischer Puffer; 800 µg Template; 2 x 10 U (2. Zugabe nach ca. 12 h); 24 h Inkubation im Schüttler bei 37°C (Schüttelfrequenz 50/min.).

Die Reaktion wird beendet, indem man das Enzym durch eine Hitzeexposition von mindestens 60°C über 10 Minuten inaktiviert.

Ava I und Msp I sind von der Firma Gibco BRL, Ban II von Boehringer Mannheim, Apa I und Hga I von New England Biolabs.

2.6 Sequenzierung

Zum Sequenzieren von mtDNA-Sequenzen standen zwei Verfahren zur Verfügung: Die manuelle Sequenzierung mit radioaktivem P^{32} und die zyklische Sequenzierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen. Die wichtigste Voraussetzung für eine gute, deutlich und weit lesbare Sequenz ist bei beiden Methoden die Qualität des Sequenziertemplates. Das Template muss sehr rein vorliegen.

Dies erreicht man, indem man Proben aus PCRs verwendet, in denen die Annealingtemperatur so hoch und die Zykluszahl so niedrig wie möglich gewählt worden sind. Außerdem sollte die Aufreinigung des Templates in einem Agarosegel (0,8- 1,5% je nach Größe) über eine möglichst große Strecke geschehen (lange Gelkammer), damit sich die gewünschte Bande von Nebenprodukten anderer Größe optimal trennt. Im Idealfall sollte kein Hintergrundschmier vorhanden sein.

2.6.1 Manuelles Sequenzieren

In diesem Labor wird nach der üblichen Di-Deoxy-Methode sequenziert. Bei der manuellen Sequenzierung ist das ATP des Nukleotidmixes, der der Polymerase als Substrat dient, radioaktiv markiert (α - P^{32} dATP von Amersham Pharmacia Biotech); die Sequenzierreaktion findet in einem Zyklus nach dem in Tabelle 6 angegebenen Protokoll statt.

Um sowohl Zeit als auch Temperatur genau einstellen zu können, wird die Sequenzierreaktion im PCR-Gerät durchgeführt. Die Lösungen für die Reaktion stammen aus dem „T7- Sequenzierkit“ von Pharmacia.

Die Proben können entweder sofort nach der Sequenzierung auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C aufbewahrt werden. Vor jeder Auftragung müssen die Proben durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. und anschließendes direktes Abkühlen auf Eis denaturiert werden.

Tabelle 6: Bedingungen für das manuelle Sequenzieren

1. Denaturierung	10µl Template = 0,4 µg	6'	95°C
		2'	4°C (Eis)
		2'	95°C
		2'	4°C
			zentrifugieren
2. Annealing	+ 2 µl Sequ. Primer (10 ng/µl)	2'	95°C
	+ 2 µl Annealingpuffer	2'	T _{Ann} minus 5°C
3. Labellingmix	+ 3µl Labellingmix (RT)		
	+ 1,5 µl P ³² α-dATP		
	+ 2 µl T7-Polymerase (2,2/2,8 dil)	8'	Raumtemperatur
4. Sequencing	4 Sequencingmixe à 2,5 µl (37°C)		
	+ 4,5 µl Labelling reaction	5'	37°C
	+ 5 µl Stop- solution		

2.6.2 Automatisches Sequenzieren

Zum automatischen Sequenzieren wird eine thermostabile Polymerase (eine leicht veränderte *thermus aquaticus* DNA – Polymerase) verwendet, die zyklisches Sequenzieren erlaubt.

Um die einzelnen Nukleotide unterscheiden zu können, werden hier fluoreszenz-gelabelte Dideoxynukleotide verwendet, wobei jedes Nukleotid mit einer anderen Farbe markiert wird (G = gelb, A = grün, T = rot, C = blau).

Dies ermöglicht es (im Gegensatz zum radioaktiven Labelling), die Reaktion für alle vier Nukleotide in einem Reaktionsgefäß ablaufen zu lassen und sie auch in einer Spur aufzutragen.

Bei dem verwendeten Abi Prism, 310 Genetic Analyser von Perkin Elmer werden die

sequenzierten Stränge in einer Kapillare getrennt und gemäß ihrer Länge von einem automatischen Laserscanner detektiert. Der Rechner zeichnet die hintereinander erfassten Fluoreszenzsignale als farbige Peaks auf.

Als Reagenz wird der fertige Kit („dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit“) von Applied Biosystems verwendet, welcher bereits die vier markierten Dideoxynukleotide, Deoxynukleotide, Puffer und die Polymerase enthält. Allerdings verwenden wir nur die Hälfte der empfohlenen Menge von 8 µl, ohne dass dies zu Einbußen in der Qualität der Ergebnisse führt.

Bevor man eine PCR-Probe in einer Sequenzierreaktion einsetzen kann, muss diese gefällt werden, um Rückstände z. B. des Agarosegels zu entfernen.

Hierzu wird die Probe, die zwischen 100 und 400 ng DNA enthalten soll, mit dem doppelten Volumen an eisgekühltem 100 % Ethanol und einem Zehntel des Volumens 2M Natrium Acetats (Merck) für mindestens 15 min. bei -70°C gelagert. Anschließend wird die Probe 30 min. bei -10°C und 14000 U zentrifugiert; das luftgetrocknete Pellet wird in 14 µl eines besonders reinen Chromatographiewassers (Merck) gelöst.

Das Reaktionsvolumen beträgt 20 µl: Zu den 14 µl Template werden noch 4 µl des Terminator Ready Reaktion Mix, 1 µl DMSO und 1 µl (8 pmol) des spezifischen Primers gegeben. Die Primer entsprechen denen der PCR -Reaktionen (siehe Tabelle 5).

Die Sequenzreaktion im Thermocycler läuft unter den in Tabelle 7 beschriebenen Bedingungen ab.

Tabelle 7: Bedingungen für die Sequenzierreaktion beim automatischen Sequenzieren im PCR-Gerät

1. Denaturierung	96°C	20 "
Annealing	primerspezifisch ($T_m - 5^{\circ}\text{C}$)	20"
Extension	60°C	240"
Denaturierung	96°C	20 "
Letzte Extension	60°C	240 "
25 Zyklen		

Die Reaktion kann nur in einem PCR-Gerät mit beheizbarem Deckel durchgeführt werden, da eine Überschichtung der Reaktionslösung mit Wachs oder Öl die enzymatische Arbeit der Polymerase stört. Ein Reaktionsablauf ohne Deckel und ohne Überschichtung würde allerdings die Kinetik in einer Weise ändern, dass die Reaktion nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden kann.

Nach der Sequenzierreaktion wird die Probe erneut gefällt: Zu den 20 µl Probenvolumen werden 80 µl des reinen Chromatographiewassers, 10 µl 3M NaAc und 250 µl EtOH (ca. 20°C) hinzugefügt und die Probe dann sofort bei 4°C und 14000U für 30 Minuten zentrifugiert.

Nachdem der Überstand abpipettiert worden ist, wird das Pellet in frisch angesetzttem 70% igem EtOH (300 µl) gewaschen und noch einmal für 5 Minuten bei 4°C mit 14000 U zentrifugiert. Das EtOH wird vorsichtig abgezogen und das Pellet bei Raumtemperatur ca. 10-20 Minuten getrocknet.

Bis die DNA aufgetragen wird, kann sie als Pellet bei -20 °C gelagert werden.

Bevor die Probe auf den Sequenzer geladen werden kann, muß sie in 12 µl TRS (Template Suppression Reagent, wird von Applied Biosystems mit dem Polymer geliefert) gründlich gelöst werden. Anschließend wird sie durch zwei minütiges Erhitzen bei 95°C und anschließendes sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert.

Die Probe wird noch einmal durchmischt und in eine Mikrotiterplatte gefüllt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird die DNA in die Kapillare injiziert und gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Ein Laser detektiert die einzelnen Fragmente anhand des markierten Dideoxynukleotides.

2.7 Single strand conformation polymorphism (SSCP)

Mit Hilfe des „single strand conformation polymorphism“ (SSCP) können Punktmutationen in kurzen DNA-Stücken (ca. 20 – 500 bp) gefunden werden: Das Laufverhalten der kurzen Einzelstränge ist abhängig von ihrer Sekundärstruktur. Diese ändert sich jedoch, sobald eine Punktmutation oder eine kurze Deletion/Insertion vorliegt, so dass anhand des veränderten Laufverhaltens das DNA-Stück erkannt werden kann, in dem eine Mutation vorliegt. Das genaue Lokalisieren einer Mutation ist dann mit geringem Aufwand durch Sequenzieren möglich.

Die kurzen Bruchstücke, die für diese Technik nötig sind, erhält man durch Restriktion der bei uns üblichen Fragmente, wobei man ein Enzym wählen muß, welches in dem betreffenden Fragment Bruchstücke von ca. 20 – 500 bp Länge erzeugt.

Die Restriktion findet unter den oben beschriebenen Idealbedingungen statt (vergleiche 2.5.5.). Für die vorliegende Arbeit wurde F3 mit BsaJ I restringiert; dabei erhält man die in Abb.10 schematisch dargestellten Bruchstücke.

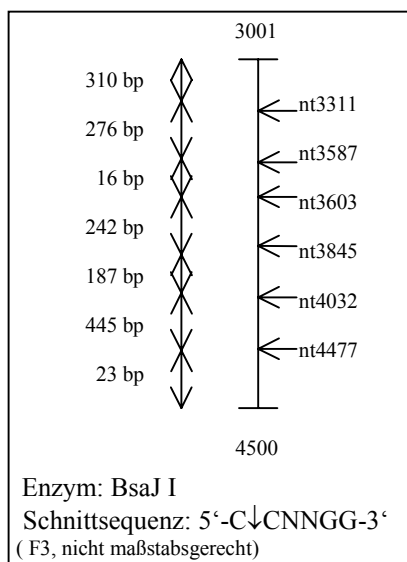


Abb.10: schematische Darstellung des mit BsaJ I geschnittenen Fragmentes F3 zur Auftragung in einer SSCP-Elektrophorese

2.8 Lösungen und Puffer

(Abkürzungen siehe 6.3)

Hämolysispuffer

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

1xTBE

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

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

3 Ergebnisse

3.1 Patienten M und T (LHON und hypertrophe Kardiomyopathie)

* LHON

Es wurden zwei symptomlose Familienmitglieder (Mutter (M) und Tochter (T)) einer Familie auf das Vorhandensein der Punktmutation G3460A untersucht. In dieser Familie tritt die durch die Mutation G3460A hervorgerufene LHON-Erkrankung gehäuft auf (siehe Stammbaum 2.1.2.). LHON führt zu einer subakut auftretenden, bilateralen, zentralen Blindheit im jungen Erwachsenenalter.

Nach Amplifikation des Bereiches, in dem die Punktmutation vermutet wurde (Fragment 3 (nt3000 – nt4500), Einteilung siehe 2.4, Tabelle 5), wurde die mtDNA sowohl aus Leukozyten als auch aus Thrombozyten sequenziert.

Die Punktmutation G3460A ist bei Mutter und Tochter sowohl in den Leukozyten als auch in den Thrombozyten vorhanden.

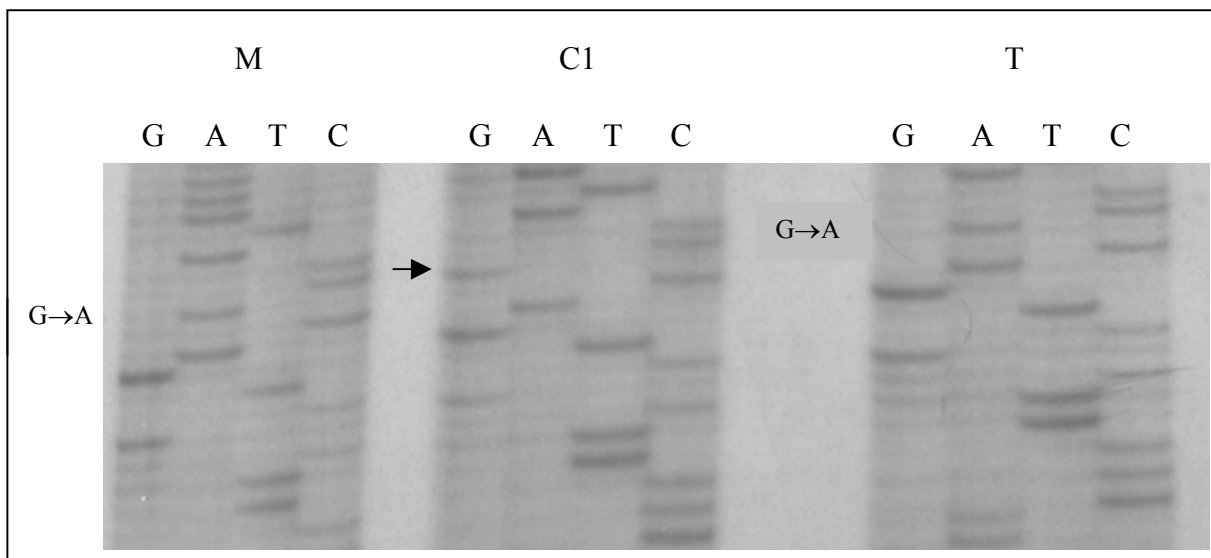


Abb.11: Röntgenfilm mit der aus Leukozyten gewonnenen Sequenz um die Punktmutation G3460A bei Mutter (M) und Tochter (T) sowie einer Kontrolle (C1). Die Wildtypsequenz ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Bei M und T ist der Basenaustausch zwischen G und A markiert (G→ A).

Abb.11 zeigt den Röntgenfilm mit der aus Leukozyten gewonnenen Sequenzen von M, T und der Kontrolle C1. Bei der Kontrolle ist das Guanin, welches sich beim Wildtyp an der Stelle nt3460 befindet, mit einem Pfeil markiert. Die entsprechenden Mutationen von Guanin zu Adenin bei M und T sind ebenfalls gekennzeichnet (G→ A).

Um den Heteroplasmiegrad der Mutation möglichst genau bestimmen zu können, wurde Template aus Leukozyten in einer PCR-Reaktion amplifiziert und gleichzeitig mit radioaktivem P^{32} markiert. Das amplifizierte F3 wurde mit Hga I unter optimalen Bedingungen restringiert und das Ergebnis computergestützt quantitativ ausgewertet.

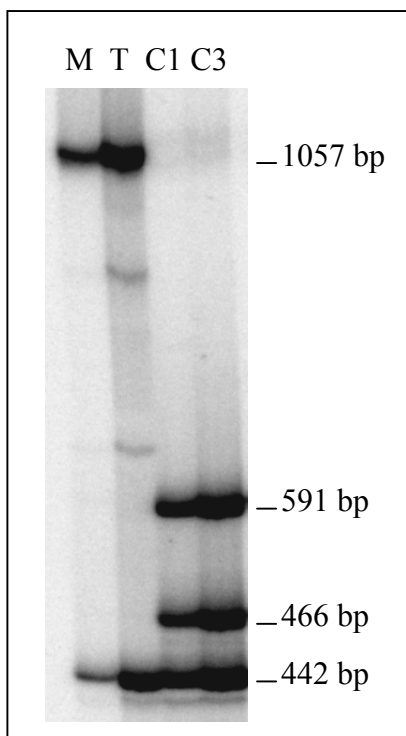


Abb.12: Polyacrylamidgel zur Auftrennung der Fragmente, die bei der Restriktion von F3 mit Hga I entstanden sind. Die Kontrollen (C1, C3) zeigen das Restriktionsmuster des Wildtypes; die betroffene Mutter (M) und ihre Tochter (T) bieten das Restriktionsmuster bei Vorliegen der Mutation G3460A. Bei M und T sind keine Reste des Wildtyps vorhanden.

In den beiden rechten Spuren des Polyacrylamidgeles (Abb.12), in denen die DNA der Kontrollen (C1, C3) aufgetragen worden ist, zeigt sich das Restriktionsmuster des Wildtypes. Beim Wildtyp wird das Fragment zweimal geschnitten, so dass drei Teilfragmente gebildet werden (591 bp, 466 bp, 442 bp).

In den beiden linken Spuren (M, T) erscheinen nur zwei Banden, was dem Restriktionsmuster beim Vorliegen der Mutation G3460A entspricht. Durch die Mutation kommt es zum Verlust einer Schnittstelle, so dass statt der beiden Teilfragmente mit 591 bp bzw. 466 bp ein großes Teilfragment mit 1057 bp erscheint. Das 442 bp große Fragment bleibt unverändert.

Weder bei M noch bei T waren Reste der 591 bp- bzw. 466 bp-Bande zu erkennen. Folglich liegt die Mutation G3460A hier, wie bei den übrigen Familienmitgliedern, homoplasmatisch vor.

* hypertrophe Kardiomyopathie

In der Familie kommen, neben der LHON-Erkrankung, gehäuft Fälle einer hypertrophen Kardiomyopathie vor (siehe Stammbaum 2.1.2). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein zufälliges Zusammentreffen beider Krankheitsbilder (siehe 4.2.2.)

Eine longPCR mit Template aus Leukozyten sowie Thrombozyten wurde zum Screening auf multiple Deletionen durchgeführt (vergleiche 1.3.2). Um die longPCR als verlässlichen Screeningtest anwenden zu können, wurden die Reaktionsbedingungen vor der Anwendung an Patientenmaterial optimiert (Einzelheiten siehe 2.4.2)

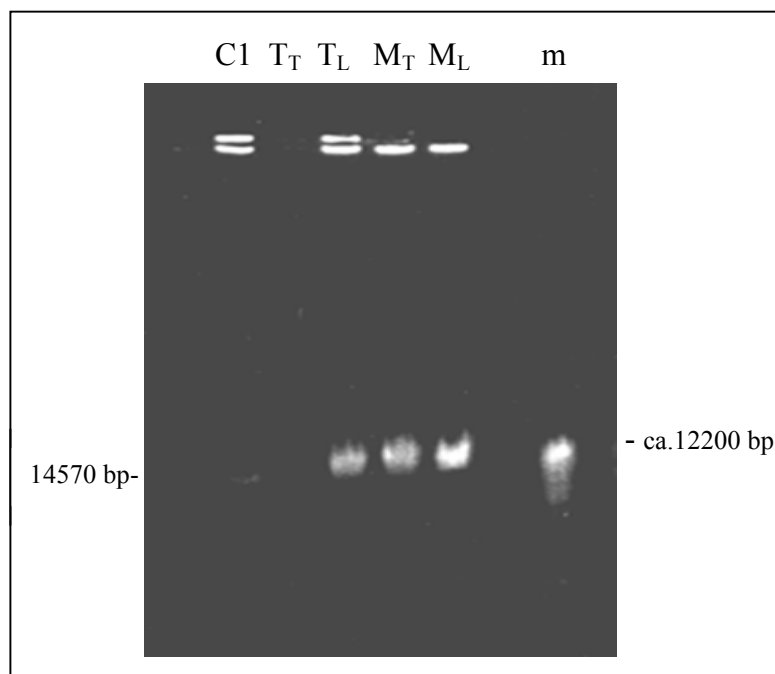


Abb.13: Agarosegel der long PCR aus Leukozyten (T_L, M_L) und Thrombozyten (T_T, M_T) von M und T. Als Längenstandard wurden 2 µl der 1kb-DNA Leiter (m) eingesetzt.
(nur die größte Bande der Leiter sichtbar (ca. 12200 bp))

Sowohl bei den Leukozyten von M und T als auch bei den Thrombozyten von M konnte die Wildtyp-DNA dargestellt werden, aber keine möglichen Deletionsbanden (siehe Abb.13). Folglich sind in dem untersuchten Bereich weder bei M noch bei T Deletionen vorhanden. Die Amplifikation der Thrombozyten der Tochter gelang nicht (in Spur T_T kein Amplifikat).

3.2 Patient D

Bei dem Patienten D bestand der Verdacht auf KSS. Beim KSS handelt es sich um eine neuro-muskuläre Mitochondropathie, die normalerweise durch singuläre, an verschiedenen Stellen im mitochondrialen Genom lokalisierten Deletionen hervorgerufen wird.

Bei der Patientin wurden wiederholt longPCRs durchgeführt, um eine eventuell vorliegende Deletion zu erkennen. Eine der identischen Gelelektrophoresen dieser longPCRs ist in Abb.14 dargestellt. Neben einer Bande von ca. 14500 bp (B3), bei der es sich um die Wildtypbande handelt, sind noch zwei andere Banden deutlich zu erkennen. Eine Bande ist ca. 6100 bp (B1) lang, die andere ca. 7100 bp (B2). Jede der drei Banden macht ungefähr ein Drittel des gesamten Amplifikates aus.

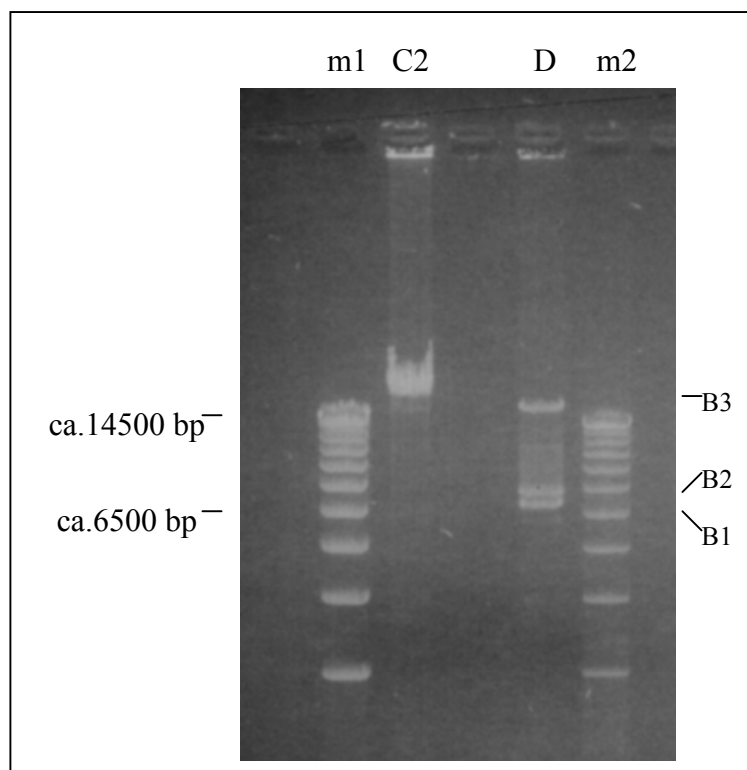


Abb.14: Agarosegel der longPCR des KSS-Patienten D sowie der Kontrolle C2. An den beiden Rändern sind 2 µl (m1) bzw. 3 µl (m2) der 1kb-DNA Leiter als Längenstandard aufgetragen. Die Banden des Patienten D, welche weiter untersucht worden sind, sind mit B1 bis B3 gekennzeichnet.

Aus der Bande B3 konnten alle Fragmente amplifiziert werden, wodurch bewiesen war, dass es sich bei dieser Bande um die intakte 14570 bp-Bande handelte.

Bei den kürzeren Fragmenten wurde versucht, den Bruchpunkt weiter einzugrenzen. Dazu wurden die oben definierten Fragmente (siehe 2.4.1, Tabelle1) beginnend am Rand (nt1, nt14570) aus Template der Banden B1 und B2 amplifiziert. War eine Amplifikation nicht möglich, konnte man davon ausgehen, dass das entsprechende Fragment nicht oder nicht mehr vollständig vorhanden war. Bei der Bande B1 konnten F1 bis F3 und F12 amplifiziert werden. Bei der Bande B2 konnte neben F1 bis F3 zusätzlich noch F4 dargestellt werden, nicht aber F12.

Abb.15 veranschaulicht die gefundenen Ergebnisse. Sie zeigt, welche Anteile der Ausgangsbanden als sicher vorhanden vorausgesetzt werden können und welche nicht.

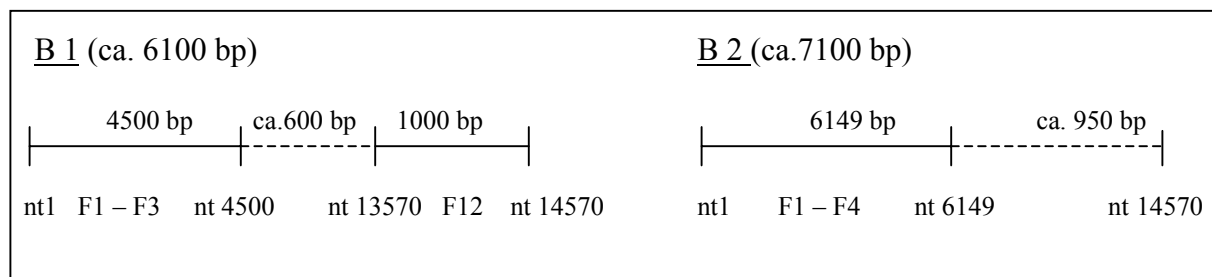


Abb.15: Nicht maßstabsgerechte Veranschaulichung der bereits bekannten (____) und der unbekannten (---) Anteile der ursprünglichen longPCR-Banden B1 und B2 des Patienten D

Die Unterschiede zwischen den beiden Molekülen B1 und B2 werden deutlich: Bei B1, bei der 4500 bp am Anfang und 1000 bp am Ende des Moleküls bekannt sind, muss der Bruchpunkt in den noch nicht untersuchten ca. 600 bp zwischen nt 4500 und nt 13570 liegen. Bei B2 war F4 noch vorhanden, nicht aber F12. Es sind bereits 6149 bp bekannt, der Bruchpunkt muss sich in den restlichen ca. 950 bp befinden.

Bei B2 konnte unter folgenden Bedingungen mit den Primern H6150 und L14570 ein deletionsüberbrückendes Fragment hergestellt werden: $T_{\text{ann}} = 57^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{ext}} = 65''$; $Z = 45$

Durch automatisches Sequenzieren dieses Fragmentes wurde die Deletion gefunden.

Dieselbe Deletion zeigten – allerdings in niedrigerer Quantität, so dass die Deletionsbanden

auf dem Agarosegel nicht erkennbar waren - auch die beiden untersuchten Kontrollen (C2, C3).

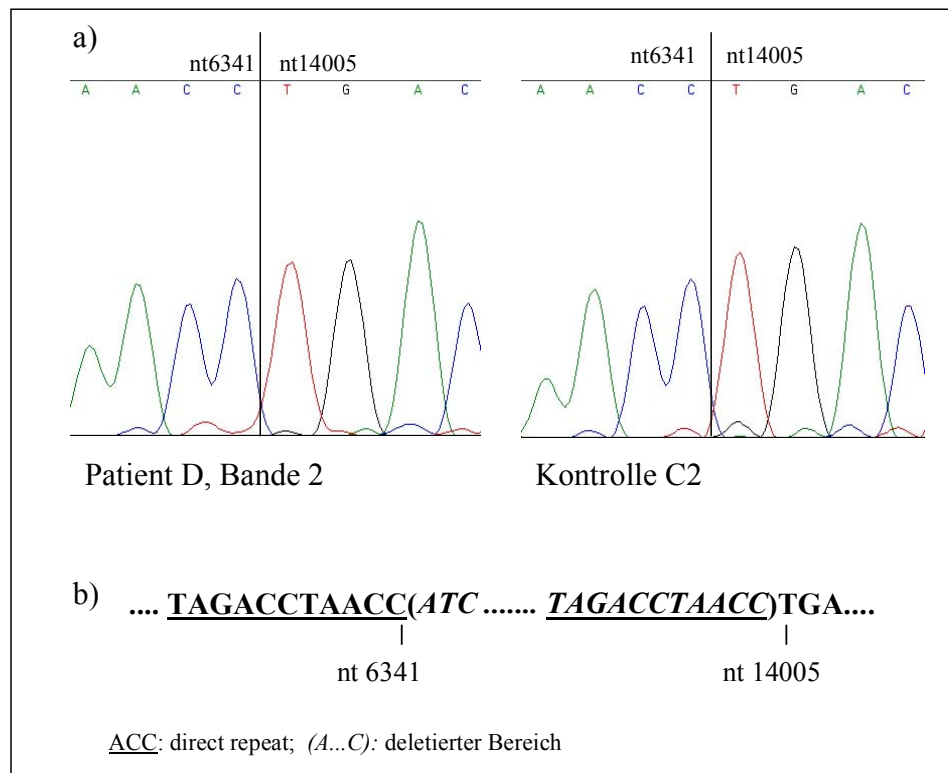


Abb.16: a) Sequenzbild der Bruchpunkte bei dem Patienten D und der Kontrolle C2; es handelt sich in beiden Fällen um die gleiche Deletion. In b) ist der Bruchpunktbereich noch einmal vergrößert dargestellt. Es liegt eine Typ I-Deletion vor.

In Abb.16 ist neben dem Patienten D die Kontrolle C2 dargestellt. Deletiert ist der Bereich nt 6342 - nt 14004, der von einem 11 Basenpaar langen " direct repeat" flankiert wird. Befindet sich ein „direct repeat“ in unmittelbarer Nähe der Bruchstelle und ist eine Kopie des „repeat“ deletiert, so spricht man von einer Typ I-Deletion. Hier liegt folglich eine Typ I-Deletion vor.

Bei der Bande 1 war es uns nicht möglich, mit der vorhandenen Templatemenge ein

deletionsüberbrückendes Fragment herzustellen, so dass der Bruchpunkt nicht genau bestimmt werden konnte.

Die Screeningtests für die häufigsten Punktmutationen bei MERRF, MELAS und M. Leigh wurden durchgeführt (vgl. 2.5.2 – 2.5.4). Alle Tests waren negativ, so dass die untersuchten Punktmutationen als Ursache der Erkrankung ausgeschlossen werden konnten. (Ergebnis wird nicht gezeigt.)

Beim Auswerten der Sequenzen des deletionsüberbrückenden Fragmentes wurde bei Patient D als symptomloser Nebenfund die sekundäre LHON-Mutation A4917G in homoplasmatischer Form gefunden (siehe Abb.17).

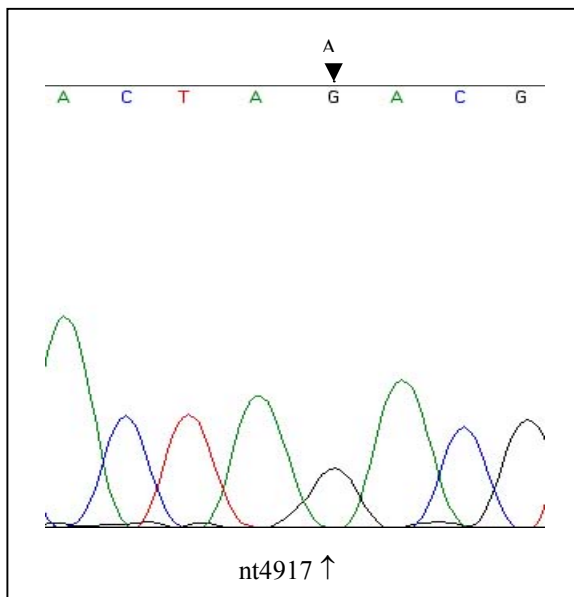


Abb.17: direkte Sequenzierung der Punktmutation A4917G bei Patient D; Nebenfund

3.3 Patienten P1, P4, P6

Von sieben Patienten mit idiopathischer inflammatorischer Myopathie wurde eine longPCR durchgeführt. Bei IIM kommt es durch eine chronische Entzündung der quergestreiften Muskulatur jenseits des 5. Lebensjahrzehntes zu progredienter Muskelschwäche der proximalen Muskulatur.

Die DNA dieser longPCRs wurde auf einem Agarosegel getrennt und somit dargestellt (siehe

Abb.18). Zur weiterführenden Untersuchung wurden drei Patienten ausgewählt (P1, P4, P6), deren Deletionsbanden besonders prägnant waren und sich deutlich von den regelhaft auftretenden Hintergrundbanden (4.4.1.) in ihrer Intensität und Lokalisation unterschieden.

Man erkennt auf Abb.18 auch, dass bei vielen Patienten Wildtyp-DNA nicht in einer Quantität vorhanden ist, dass sie auf dem Gel sichtbar wäre (sehr wenig Wildtyp-DNA bei P1 bis P4 und P6). Bei P1, P4 und P6 sind Deletionsbanden zu erkennen, die sich vom typischen Hintergrund-Bandenmuster, wie es in den Kontrollen C1 – C3 zu sehen ist, unterscheiden. Die Banden der Patienten P1, P4 und P6, welche zur näheren Untersuchung ausgewählt und daher aus dem Gel isoliert wurden, wurden markiert (A – E).

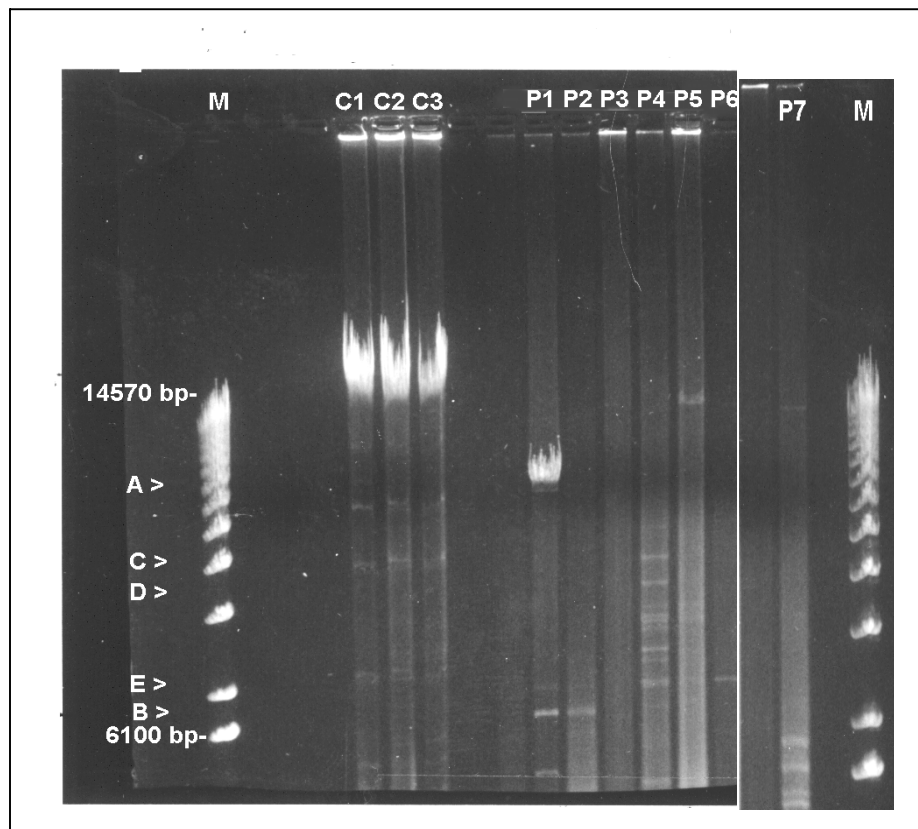


Abb.18: Agarosegel-Elektrophorese, auf der sowohl die Wildtypbande (so weit vorhanden) als auch die multiplen Deletionen zu erkennen sind. M: 1 kb DNA-Leiter; C1-C3: altersentsprechende Kontrollen B, S und SC; P1-P7: Patienten mit inflammatorischer Myopathie; A B (P1), C D (P4), E (P6): Deletionsfragmente, welche zur weitergehenden Untersuchung ausgewählt worden sind

Wir gingen davon aus, dass es sich bei diesen Banden um deletionsüberbrückende Fragmente handeln könnte. Die von P1, P4 und P6 ausgewählten Banden, ihre geschätzte Größe und die geschätzte Größe der jeweiligen Deletion sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Zur weiteren Untersuchung ausgewählte deletionsüberbrückende Banden, ihre Größe und die Größe der Deletion

Patient	Fragment	Größe des deletions-überbrückenden Fragmentes (ca.)	Größe der Deletion (ca.)
P1	A	7000 bp	7570 bp
	B	1800 bp	12770 bp
P4	C	4100 bp	10470 bp
	D	3100 bp	11470 bp
P6	E	1900 bp	12670 bp

3.3.1 Patient P1

Bei der Isolierung des Bruchpunktes wurde genauso vorgegangen wie bei dem KSS-Patienten (siehe 3.2.). Bei der Bande A konnten die Fragmente F7-F12 sicher amplifiziert werden.

F7–F12 umfassen bereits 6206 bp, so dass nur noch ca. 800 bp unbekannt sind. Sowohl F1 als auch F6 sind deutlich länger als 800 bp, so dass auf den Versuch, weitere Fragmente zu amplifizieren, im Hinblick auf die geringe Templatmenge verzichtet wurde. Ein negatives Ergebnis konnte vorausgesetzt werden.

Bei der Bande B war nur F1 vorhanden. Die Ergebnisse sind in Abb.19 veranschaulicht, in der die bekannten und unbekannten Anteile der jeweiligen Banden graphisch dargestellt werden.

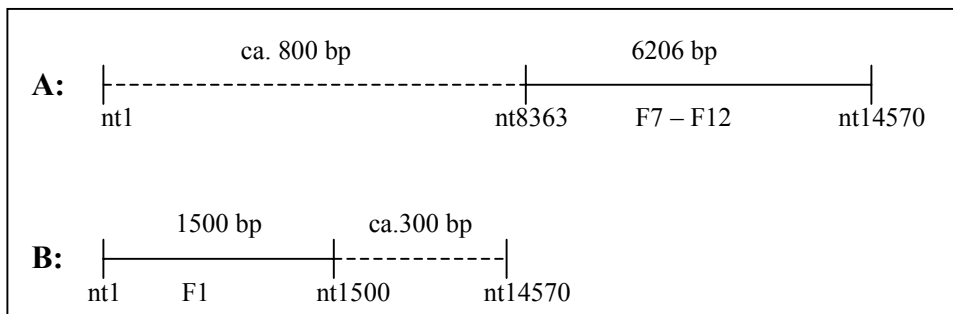


Abb.19: Nicht maßstabsgerechte Veranschaulichung der bereits bekannten (—) und der unbekannten (---) Anteile der ursprünglichen longPCR-Banden A und B von P1

Bei Bande B konnte das überbrückende Fragment schnell ermittelt und mit den Primern H1501 und L 14570 und $T_{\text{ann}} = 56^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{ext}} = 35''$ und 33 Zyklen sauber hergestellt werden.

Es wurde mit dem Primer H1500 im automatischen Sequenzer sequenziert, wobei der Bruchpunkt gefunden wurde (siehe Abb.20). Er liegt zwischen nt1734 und nt14495. Die Bruchstelle wird auch hier direkt von einem sieben Basenpaar langen „direct repeat“ flankiert, so dass auch hier eine Typ I-Deletion vorliegt. Bei diesem Molekül sind 12761 Basenpaare, d. h. der weitaus größte Teil des Moleküls nicht mehr vorhanden.

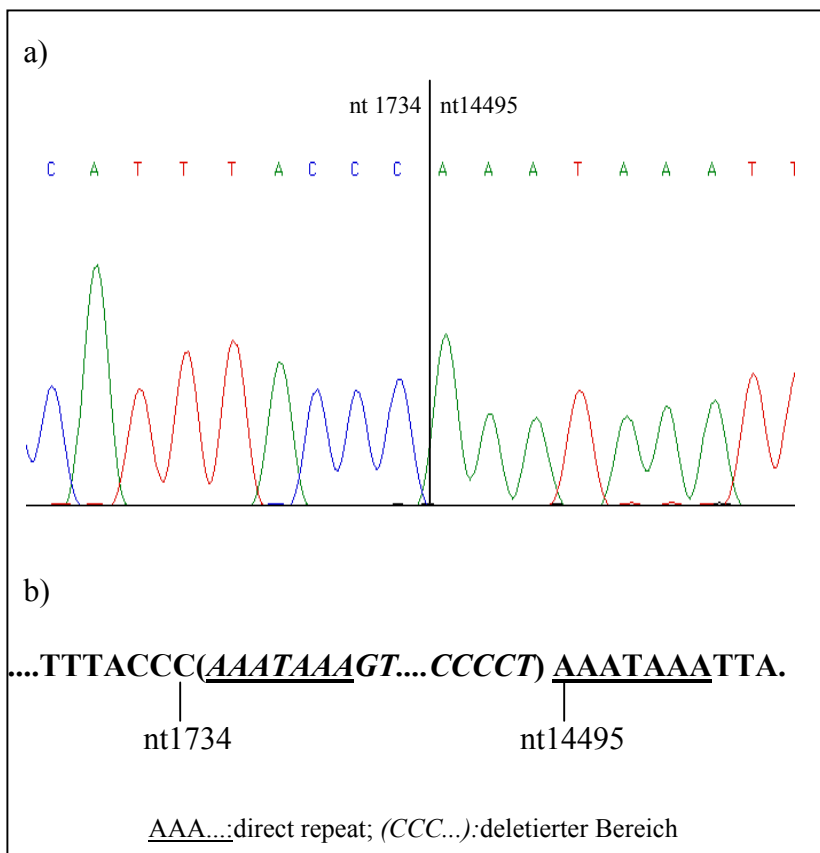


Abb.20:

- a) Automatische Sequenzierung der Typ I-Deletion v. P1, Bande B
- b) Darstellung der Bruchpunktumgebung

Bei Bande A (Patient P1) konnte aus dem zur Verfügung stehenden Template kein deletionsüberbrückendes Fragment mehr amplifiziert werden. Aus dem bisher bekannten Teil des Moleküls kann man jedoch schließen (siehe Abb.19), dass sich die 5'-Bruchstelle in den ersten ca. 800 Basenpaaren „downstream“ von nt1 und die 3'-Bruchstelle folglich höchstens ca. 800 bp vor nt8363 befinden muss.

3.3.2 Patient P4

Bei P4 wurde ebenfalls versucht, die Bruchpunkte in ihrer Lage näher zu bestimmen. Aus Template der Bande C konnten die Fragmente F1, F2 und F12 amplifiziert werden. Aus Template der Bande D nur F1 und F12 (siehe Abb.21).

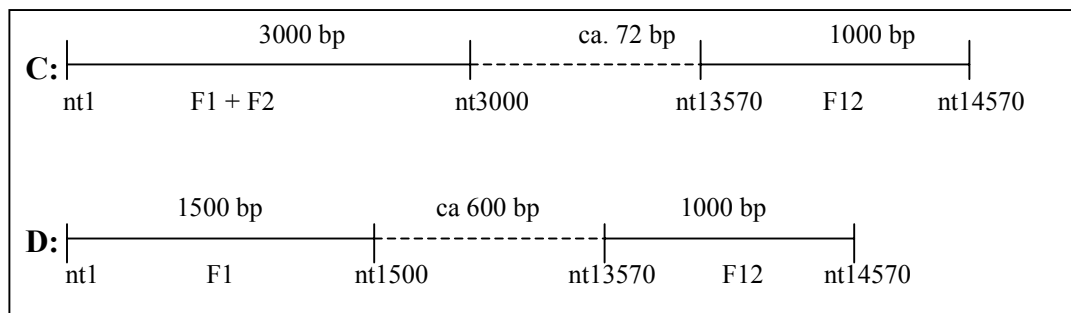
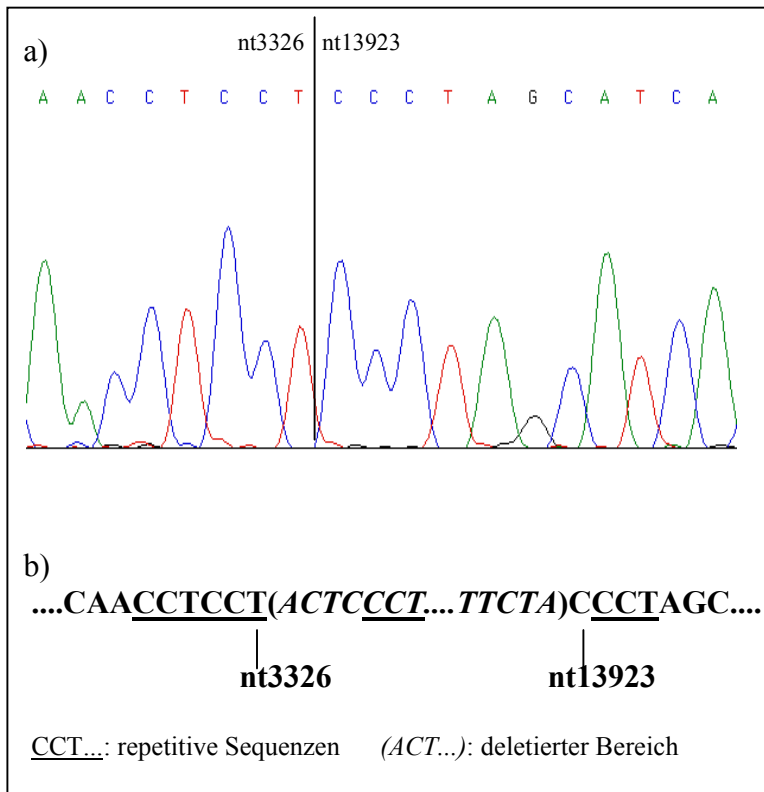


Abb.21: Nicht maßstabsgerechte Veranschaulichung der bereits bekannten (—) und der unbekannten (---) Anteile der Fragmente C und D von P4

Das deletionsüberbrückende Fragment C konnte mit Hilfe der Primer H3001 und L14570 sowie einer Annealingtemperatur von 61°C, einer Extensionszeit von 60 Sekunden und 35 Zyklen amplifiziert werden. F12 musste, obwohl bekannt, mit amplifiziert werden, da ein Fragment mit nur 72 Basenpaaren nicht sequenziert werden kann. Das deletionsüberbrückende Fragment war- wie erwartet- ca. 1000 bp lang. Durch automatisches Sequenzieren mit dem Primer H3001 konnte der Bruchpunkt ermittelt werden.

**Abb.22:**

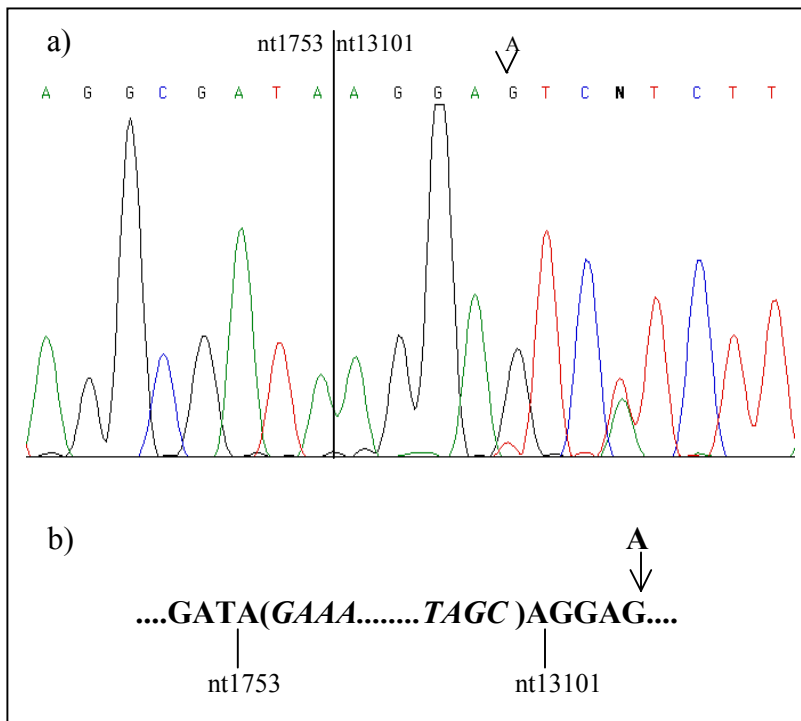
- a) Automatische Sequenzierung der Typ II-Deletion von P4, Bande C
- b) Darstellung der Bruchpunktumgebung von P4, Bande C

Der Bruchpunkt liegt zwischen den Nukleotiden nt3326 und nt13922; 10597 Basenpaare sind deletiert. Da er nicht exakt von einer repetitiven Sequenz flankiert wird, spricht man hier – ebenso wie bei dem völligen Fehlen von repetitiven Sequenzen – von einer Typ II Deletion (siehe Abb.22).

Für das deletionsüberbrückende Fragment der Bande D (erwartete Größe: ca. 600 bp) wurde als Primerpaar H1501 und L13570 eingesetzt. Bei einer $T_{\text{ann}} = 51^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{ext}} = 25$ " und 33 Zyklen war die Amplifikation eines die Bruchstücke verbindenden Fragmentes möglich. Es war ca. 700 bp lang.

Die automatische Sequenzierung mit dem Primer H1501 zeigte den Bruchpunkt (siehe Abb.23). Die Nukleotide nt1754- nt13100 (11346 bp) sind deletiert; es handelt sich um einen Bruchpunkt, der nicht von „direct repeats“ flankiert wird, d. h. um eine Typ II Deletion.

In der Nähe des 3'-Bruchendes befindet sich noch die Punktmutation A13105G.

**Abb.23:**

- a) Automatische Sequenzierung des Bruchpunktes von P4, Bande D
- b) Darstellung der Bruchpunktumgebung bei Bande D, P4

3.3.3 Patient P6

Bei dem Versuch, den Bruchpunkt der Bande E weiter einzugrenzen, ließen sich F1 und F2 nicht amplifizieren, wohl aber F12. Eine weitere Prüfung war nicht mehr nötig, da 1000 bp des ca. 1900 bp langen Fragmentes bereits bekannt waren. Die Amplifikation eines weiteren Fragmentes war mit ca. 900 verbleibenden Basen nicht mehr möglich. Eine Übersicht über die bekannten und die unbekannten Anteile der Bande E zeigt Abb.24.

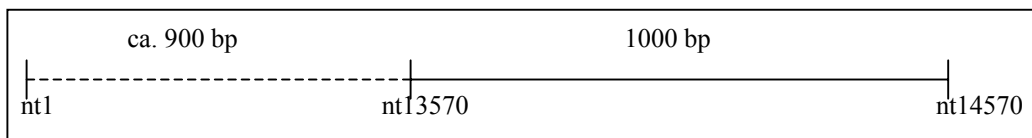


Abb.24: Nicht maßstabgerechte Veranschaulichung der bereits bekannten (—) und der unbekannten (---) Anteile der Bande E des Patienten 6

Für das deletionsüberbrückende Fragment wurden H1 und L13570 als Primer gewählt, da H1 den Anfang des gesamten langen Fragmentes darstellt und L13570 direkt an F12 anschließt

(siehe 2.4.1). Die Darstellung des überbrückenden Fragmentes erwies sich jedoch als sehr schwierig und musste schließlich wegen Templatemangels aufgegeben werden. Ein exakter Bruchpunkt liegt also für die mitochondriale DNA dieses Patienten nicht vor, er kann jedoch in seiner Lage eingegrenzt werden: Ca. 900 bp des Fragmentes sind nicht bekannt. Folglich muss hier der 5'-Bruchpunkt in den ca. 900 Nukleotiden "downstream" von nt 1 liegen, also ebenfalls weit am Anfang des Moleküls. Der 3'-Bruchpunkt liegt somit maximal ca. 900 bp vor nt13570.

Die gefundenen Ergebnisse sollen hier noch einmal zusammengefaßt werden (Tabelle 9):

Betrachtet man die Lage aller sequenzierten Deletionen (Abb.25), so fällt auf, dass alle 5'-Bruchpunkte an ungewöhnlicher Stelle, nämlich außerhalb des „major arc“, liegen. Die meisten bisher gefundenen Bruchpunkte befinden sich im „major arc“, d. h. zwischen den beiden Replikationsursprüngen (vgl.4.4.3). Ebenfalls bemerkenswert ist die Größe der gefundenen Deletionen: Der deletierte Bereich umfasst in allen Fällen mehr als 10 000 bp und damit einen Großteil des 16559 Basenpaare umfassenden mitochondrialen DNA-Ringmoleküls.

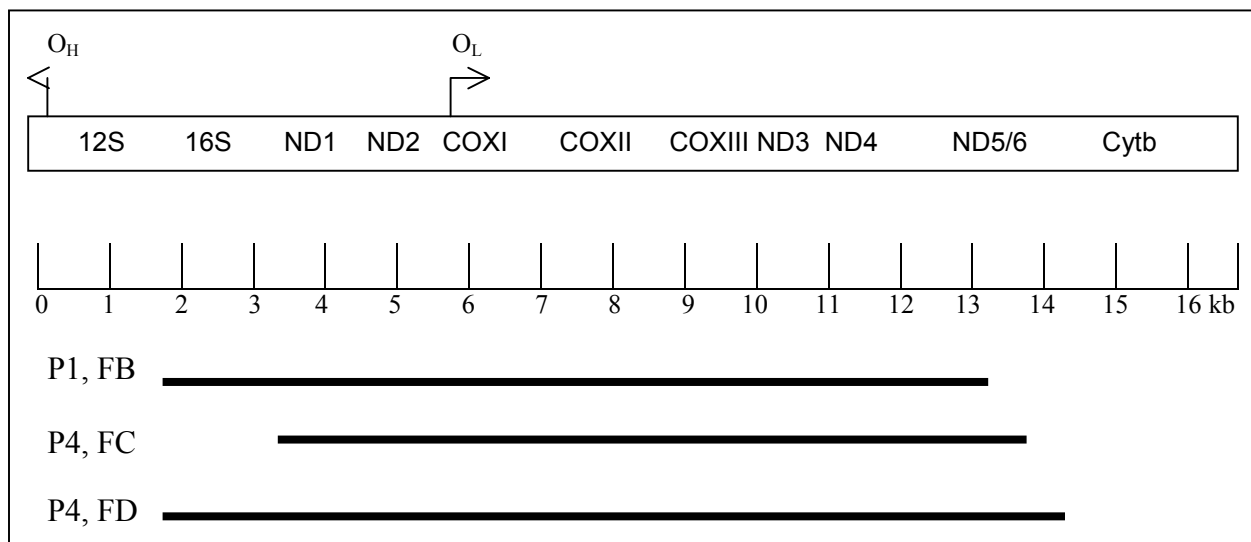


Abb.25: Der obere Teil des Bildes zeigt schematisch das linearisierte mitochondriale DNA-Molekül mit einigen wichtigen Genen; im unteren Teil symbolisieren die dicken schwarzen Linien (—) den Teil des Moleküls, welcher bei dem jeweiligen Fragment deletiert ist.

Bei den Deletionen sind sowohl Typ I- als auch TypII-Deletionen vertreten; in zwei von drei Fällen liegt ein „frameshift“ vor. Bei der Größe der Deletionen kommt es zu einem Verlust einer Vielzahl von Genen. Dabei sind sowohl Gene betroffen, welche Untereinheiten der Atmungskette kodieren, als auch tRNAs. Die rRNA ist in allen Fällen vollständig erhalten. Eine genaue Aufstellung der vollständig bzw. teilweise deletierten Gene zeigt ebenfalls Tabelle 9.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Eigenschaften der gefundenen Deletionen bei inflammatorischen Myopathien. Die komplett fehlenden Gene sowie die Gene, in denen die Bruchstellen liegen, werden durch die von ihnen kodierten Proteine angegeben.

Patient	Bruchstellen	Gene an der Bruchstelle	Vollständig deletierte Gene	Typ der Deletion	“frameshift”	Größe der Deletion
P1, FB	nt1734 nt14495	16S-rRNA ND6	17tRNAs ND1,2,3,4,5 COX1,2,3 ATPase6,8	I	+	12761bp
P4, FC	nt3326 nt13923	ND1 ND5	16tRNAs ND2,3,4 COX1,2,3 ATPase6,8	II	+	10597bp
P4, FD	nt1753 nt13101	16S-rRNA ND5	17tRNAs ND1,2,3,4 COX1,2,3 ATPase6,8	II	–	11348bp

3.4 Patient L

Bei Patient L bestand starker Verdacht auf eine mitochondriale Enzephalomyopathie, am ehesten auf einen M. Leigh. Beim M. Leigh handelt es sich um eine progressive neurodegenerative, innerhalb von Monaten oder Jahren letal endenden Mitochondropathie. Sie wird durch Punktmutationen hervorgerufen, in über 95% der Fälle durch die Mutationen T8993C oder T8993G. Diese lagen hier jedoch beide nicht vor; auch eine Deletion konnte nicht gefunden werden.

Das Fragment F3 (nt3000 – nt4500), welches die tRNA^{Leu[UUR]} (nt3230 – 3304) enthält, die als „hot spot“ für Mutationen bekannt ist (vgl.4.5.), wurde mit Hilfe von SSCP vollständig auf Punktmutationen gescreent.

Es liegt bei dem Patienten L keine Punktmutation in der tRNA^{Leu [UUR]} oder an einer anderen Stelle zwischen nt3000 und nt4500 vor.

4 Diskussion

4.1 Methode longPCR

Als wir mit den Versuchen zur Etablierung einer longPCR begannen, war es aufgrund der vorhandenen Polymerasen noch nicht möglich, das gesamte mitochondriale Genom in einem Stück zu amplifizieren. Folglich musste der zu amplifizierende Genbereich, da wir nur ein Amplifikationsprodukt haben wollten, sinnvoll eingeschränkt werden:

Die meisten Deletionen im mitochondrialen Genom liegen zwischen den beiden Replikationsursprüngen O_L und O_H (nt5763-nt110), wobei bei der häufigsten mitochondrialen Deletionserkrankung KSS nur wenige über nt 14500 hinausreichen⁹². Folglich erschien es uns angebracht, nt14570 (H14570) als hintere Grenze und nt1 (L1) als vordere Grenze für unser subgenomisches Amplifikat festzulegen .

Nur wenige der bis jetzt gefundenen Deletionen, sowohl der singulären⁹³ als auch der multiplen⁹³, befinden sich in dem Bereich vor dem Replikationsursprung O_L (nt5763). Die geringe Anzahl von bekannten Deletionen mit Bruchpunkten am Anfang des mitochondrialen Genoms hat auch methodische Gründe: Die alleinige Benutzung von Pvu II⁹⁴ zur Linearisierung und die Beschränkung vieler Studien auf ein Screening mittels „nested PCR“ mit Primern für den „major arc“ führen dazu, dass die in den ersten ca. 5000 Basen des Genoms liegenden Deletionen häufig unentdeckt bleiben. Da aus diesen Gründen der Anfang des mitochondrialen Genoms in den Untersuchungen bisher unterrepräsentiert ist, integrierten wir ihn in unser Deletionsscreening. Das in der longPCR eingesetzte Template besteht aus nicht linearisierter mtDNA.

Die longPCR bietet sich als Screeningmethode auf Deletionen in besonderem Maße an, da sie es erlaubt, mit einem geringen finanziellen und zeitlichen Aufwand eine große Anzahl an Deletionen aufzuzeigen. Sie ermöglicht es, bei einem Patienten in einem Ansatz die

Wildtypbande sowie gleichzeitig eine große Zahl möglicherweise vorhandener Deletionen und Duplikationen darzustellen.

Die longPCR Technik kann – im Gegensatz zum Southernblot, der eine große Menge DNA erfordert - außerdem auch bei geringen Templatemengen von nicht optimaler Qualität eingesetzt werden. Da oft nur kleine Biopsieproben oder post mortem entnommenes, nicht optimal aufbereitetes Gewebe zur Verfügung steht, ist dies in der praktischen Labortätigkeit ein wichtiger Gesichtspunkt⁹⁵.

Es ist allerdings bei der Verwendung von longPCR Techniken zu beachten, dass diese Methode nur semiquantitativ⁹⁶ ist, das heißt auch bei bekannter Templatemenge nur eine grobe Quantifizierung möglich ist.

Die longPCR stellt eine interessante und gute Screeningmethode dar. Allerdings haften ihr Methoden immanente Schwächen an⁹⁵; daher sollte das Ergebnis mit Hilfe einer anderen Methode (Southernblot oder Sequenzierung) verifiziert werden. Dies gilt besonders dann, wenn sich aus dem Ergebnis klinische Konsequenzen für die untersuchte Person ergeben.

Hier sind ausgewählte Deletionen exemplarisch durch direkte Sequenzierung bestätigt worden.

4.2 Patienten M und T (LHON und hypertrophe Kardiomyopathie)

4.2.1 LHON-Mutation, G3460A

Die Penetranz der LHON G3460A-Mutation beträgt bei Homoplasmie zwischen 14 und 40%⁹⁷. In unserer Familie liegt sie (soweit dies bei dem kleinen Stammbaum bestimmbar ist) bei 27%. Man vermutet, dass die primäre Mutation alleine noch nicht ausreicht, den klassischen Phänotyp hervorzurufen, sondern dass weitere Faktoren hinzukommen müssen, damit die Krankheit ausbricht. Der Heteroplasmiegrad der Mutation oder zusätzlich vorhandene Sekundärmutationen sollen z.B. die Penetranz verändern können (s. u.). Über andere zusätzliche Faktoren können nur Vermutungen angestellt werden.

Ziel der genetischen Beratung betroffener Familien sollte es sein, das individuelle Risiko für die ratsuchenden Personen und ihre Nachkommen zu ermitteln. Dies wird durch die unvollständigen Kenntnisse über die LHON-Erkrankung, besonders im Hinblick auf ihre Penetranz, sehr erschwert. Es soll im folgenden versucht werden, das Risiko für die Indexpatienten grob abzuschätzen, indem die verschiedenen Penetranzfaktoren diskutiert werden. Konkrete Wahrscheinlichkeitszahlen können nicht genannt werden.

Kleine Unterschiede im Heteroplasmiegrad werden z. B. für die Ausbildung bzw. Nichtausbildung des Phänotyps verantwortlich gemacht⁹⁸. Diese Theorie ist jedoch umstritten und außerdem auf die 85% der LHON-Patienten, bei denen die 3460-Mutation homoplasmatisch vorliegt⁹⁹, nicht anzuwenden. Homoplasmie der Mutation liegt bei den von uns untersuchten Patienten bereits im Blut vor. Man hat gezeigt¹⁰⁰, dass die Quantität mutierter mtDNA im Blut geringer ist als im betroffenen Gewebe, so dass man, wenn bereits Homoplasmie im Blut vorliegt, davon ausgehen kann, dass dies in Retina und nervus opticus auch der Fall ist.

Es wurde ebenfalls vermutet, dass die Penetranz der Erkrankung abhängig sein könnte von dem gleichzeitigen Vorliegen weiterer sogenannter Sekundärmutationen^{29,101}, d. h. Mutationen, deren Vorliegen die Wahrscheinlichkeit des Krankheitsausbruches erhöhen. Für LHON sind 17 dieser LHON-assoziierten Mutationen beschrieben worden⁹³.

Es konnte jedoch in neueren Untersuchungen sowohl für die 11778-Mutation¹⁰² als auch für die 3460-Mutation¹⁰³ gezeigt werden, dass das Vorliegen einer Sekundärmutation die Penetranz der Erkrankung nicht erhöht (siehe ausführlichere Diskussion 4.3.2.).

Unsere Patienten wurden nicht auf Sekundärmutationen untersucht, da dies keine weiteren Informationen im Hinblick auf LHON erwarten lässt. Bei den anderen, von Dr. Arenas (Spanien) untersuchten, Familienmitgliedern wurden die Sekundärmutationen bei nt9438, nt13708 und nt15812 ausgeschlossen.

Auch biochemische Messergebnisse geben keinen Aufschluss über die Ursachen unterschiedlicher Penetranz: Zwischen betroffenen und nicht betroffenen Familienmitgliedern besteht kein Unterschied in der Einschränkung der Aktivität von Komplex I¹⁰⁴. Folglich beruht der unterschiedliche Phänotyp auch nicht auf einer unterschiedlich hohen Restleistung der Atmungskette.

Auffällig ist aber, dass bei weitem mehr Männer von der Erkrankung betroffen sind als Frauen. So beträgt das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Merkmalsträgern für die 3460-Mutation 2:1¹⁰⁵ - 4,3:1¹⁰⁶ (je nach Studie). Dieser Umstand lässt vermuten, dass für den Ausbruch der Erkrankung neben der mitochondrialen Mutation ein weiterer X-chromosomal vererbter Faktor notwendig ist (VL_{SL}=„X-linked visual loss susceptibility locus“). Diese Theorie¹⁰⁷ erklärt die höhere Erkrankungswahrscheinlichkeit für Männer. Die erkrankten Frauen sind entweder homozygot für den entsprechenden Faktor oder heterozygot mit einer ungünstigen X-Chromosom Inaktivierung in den betroffenen Geweben. Als möglicher Genort des X-chromosomalen Gens wurde DXS7 angegeben¹⁰⁸. Andere Linkage-Studien sehen keinen Zusammenhang mit dem Genort DXS7¹⁰⁹ und stellen auch allgemein die Theorie eines X-chromosomalen VL_{SL} in Frage¹¹⁰. Auch konnte die unbalancierte X-chromosomale Inaktivierung nicht nachgewiesen werden¹¹¹.

Die vorgelegten Studien weisen jedoch methodische Mängel¹¹² auf, und es wurde auch bei einer neuen großen Studie gezeigt, dass alle Stammbaumdaten¹⁰⁶ mit der Theorie eines beteiligten X-chromosomalen Gens vereinbar sind. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch die Entdeckung eines X-chromosomalen Gens, welches in einer Familie als alleinige Ursache zu einer Atrophie des nervus opticus führt¹¹³.

Die Theorie eines X-chromosomalen VL_{SL} behält damit weiterhin ihre Stellung als eine wichtige Theorie zur Erklärung der bevorzugten Erkrankung männlicher Familienangehöriger, obwohl der Beweis ihrer Richtigkeit noch aussteht.

Es ist auch möglich, dass nicht ein einzelnes Gen, sondern die geschlechtsgebundenen, anatomischen und/oder physiologischen Unterschiede in ihrer Gesamtheit eine unterschiedliche, geschlechtsabhängige Penetranz bewirken³³.

Bei beiden Indexpatienten M und T handelt es sich um Frauen, wodurch ihr Erkrankungsrisiko deutlich niedriger liegt als das ihrer männlichen Verwandten. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass für eventuell zu erwartende Söhne der Mutter M das Risiko höher ist als das der Tochter T. Der Fall einer homoplasmatischen, unauffälligen ND1/A52T Trägerin mit einer ebenfalls homoplasmatischen, unauffälligen Tochter und einem homoplasmatischen, erkrankten Sohn ist bekannt²⁹.

Weiterhin günstig für die Prognose der Indexpatienten ist, dass Kinder von phänotypisch unauffälligen Trägerinnen eine geringere Wahrscheinlichkeit haben zu erkranken als Kinder, besonders Mädchen, erkrankter Frauen¹¹⁴. Die Mutter von M (* 1940) ist bis jetzt noch nicht erkrankt. Obwohl in Einzelfällen auch Manifestationen im 70. Lebensjahrzehnt bekannt sind¹⁰⁵, erkranken 95% der Patienten vor ihrem 50. Lebensjahr¹¹⁴. Eine Erkrankung der jetzt 60-jährigen Dame ist also unwahrscheinlich. Folglich hat ihre Tochter (M) eine verbesserte Prognose als Nachkomme einer asymptomatischen Anlageträgerin. Noch besser scheint die Prognose deren (T) Tochter zu sein, von der zur Zeit sowohl Mutter als auch Großmutter asymptomatisch sind.

Verlässlicher könnte das individuelle Risiko einer späteren Erkrankung für die noch jungen Indexpatienten durch eine ophthalmologische Untersuchung ermittelt werden: Abnormes Farbsehen, Veränderungen des Augenhintergrundes und atypische VEP (visual evoked potentials) können im Einzelfall bei noch asymptomatischen Personen einen späteren Visusverlust bereits anzeigen¹¹². Diese Untersuchungen sind bei den noch nicht voll aufgeklärten Indexpatienten nicht vorgenommen worden.

Es sind außerdem verschiedene Umwelteinflüsse angeschuldigt worden, das Auftreten von LHON zu begünstigen. Gesichert scheint dies bei der ND1/A52T-Mutation sowohl für einen

erhöhten Alkohol- als auch für den Tabakkonsum zu sein¹¹⁵. Es ist also ratsam, den Anlageträgern –noch eindringlicher als der Normalbevölkerung- als Prophylaxe ein maßvolles Rauch- und Trinkverhalten zu empfehlen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Wahrscheinlichkeit der Indexpatienten, an LHON zu erkranken, eher gering ist, aber nicht genau bestimmt werden kann. Es sollte allerdings eine Aufklärung der Patienten erfolgen, da besonders bei weiterem Kinderwunsch von M zu berücksichtigen ist, dass das Risiko für männliche Nachkommen höher sein kann als das der bereits geborenen Tochter.

4.2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie

Neben der LHON-Erkrankung kommen in der untersuchten Familie auch gehäuft Fälle einer hypertrophen Kardiomyopathie vor (siehe 2.1.2). Ein Zusammenhang zwischen LHON und hypertropher Kardiomyopathie ist bisher nicht beschrieben worden; bekannt ist nur eine Assoziation zwischen LHON und kardialen Reizleitungsstörungen¹¹⁶, wie z. B. dem Wolf-Parkinson-White-Syndrom¹¹⁷. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei der LHON-Erkrankung und der hypertrophen Kardiomyopathie um zwei Merkmale handelt, welche unabhängig voneinander vererbt werden und nur zufällig in dieser Familie zusammengetroffen sind.

Es gibt verschiedene Ursachen für das Auftreten einer erblichen Kardiomyopathie, die sowohl in der nukleären als auch in der mitochondrialen DNA zu suchen sind.

Auf mitochondrialer Ebene können sowohl multiple Deletionen als auch Depletionen und Punktmutationen eine isolierte hypertrophe Kardiomyopathie verursachen¹¹⁸.

Bei multiplen Deletionen liegt der Ursprungsdefekt, welcher zu den vermehrten Deletionen führt (siehe 1.3.2), in einem nukleären Gen¹¹⁹, so dass dieser nach Mendelschen Regeln vererbt wird. Der vorliegende Stammbaum lässt am ehesten an eine autosomal dominante Vererbung denken, welche eine Anlagenträgerschaft von M oder T so gut wie ausschließen

würde; allerdings ist eine Stammbaumanalyse in diesem sehr begrenzten Kollektiv nur schwer möglich. Bei den beiden Indexpatienten wurden erwartungsgemäß im untersuchten Bereich keine multiplen Deletionen gefunden. Allerdings ist zu beachten, dass nur periphere Blutzellen und kein Herzmuskelgewebe untersucht worden sind.

Auf das Vorliegen von Depletionen wurde die DNA von M und T nicht getestet; es gab allerdings bei dem Umgang mit dem Template keine Anzeichen für eine drastisch verringerte Konzentration der gelösten mtDNA.

In dem sequenzierten Bereich um das nt3460 lag keine Punktmutation vor. Nach weiteren Punktmutationen wurde nicht gezielt gesucht.

Interessant wäre die Untersuchung von Herzmuskelbiopsien der betroffenen Personen auf Deletionen, Depletion und auf Punktmutationen zumindest der tRNA-Gene, da dort die meisten bisher bei hypertrophen Kardiomyopathien vorliegenden Punktmutationen lokalisiert sind¹¹⁹.

4.3 Patient D

4.3.1 Multiple Deletionen

Bei der Patientin D konnten zwei Deletionen nachgewiesen werden, die beide vorher mit einem Southern-Blot nicht nachgewiesen werden konnten. Dadurch konnte die Verdachtsdiagnose KSS weiter gefestigt werden. Eine der beiden Deletionen konnte genau lokalisiert werden: Die Nukleotide nt6341- nt14004 waren nicht mehr vorhanden. Diese Deletion lag allerdings auch bei den beiden getesteten Kontrollen S und SC vor. Auf die Frage der Pathogenität einer Mutation, die sowohl bei Erkrankten als auch bei gesunden Kontrollen vorhanden ist, wird unten näher eingegangen.

In der Literatur wurde die oben genannte Deletion erst einmal beschrieben¹²⁰. In der Nähe sind ebenfalls Klasse I-Deletionen bekannt (nt6330 - nt14096¹²¹, nt6329 – nt13994¹²²). Den angegebenen Arbeiten ist nicht zu entnehmen, ob Kontrollen mit untersucht worden sind.

Es gibt Anzeichen dafür, dass bei den mehrere Kilobasen umfassenden Deletionen der genaue Lokalisationsort der Deletion für die Ausprägung der Erkrankung nicht ausschlaggebend ist^{123 124}. Weil immer auch mehrere tRNAs betroffen sind, kommt es zu einer diffusen, multiplen Schädigung der Atmungskette, die sich in verschiedenen Erkrankungen äußern kann- je nach betroffenem Gewebe und der Menge an geschädigter DNA.

Wichtiger für den Phänotyp ist die Quantität der vorliegenden Deletion¹²⁵. Für die Pathogenität einer Deletion ist das Vorliegen der Deletion in ausreichender Menge erforderlich. Für jedes Gewebe und Alter gibt es Schwellenwerte, bei deren Überschreitung die Einschränkung der Atmungskettenfunktion nicht mehr kompensiert werden kann und es zu Symptomen kommt¹²⁵. Ist die Deletion in einer geringeren Quantität vorhanden, bleibt sie symptomlos. Altersdeletionen, d. h. Deletionen, wie sie sich bei jedem Menschen im Laufe des Lebens in postmitotischem Gewebe anhäufen, liegen in geringer Kopienzahl vor⁷³.

Bei unserem Patienten D machen die Wildtypbande und die beiden Deletionsbanden jeweils ein Drittel des Amplifikates aus. Bei den Kontrollen S und SC war die Bande auf dem Gel der ursprünglichen longPCR nicht sichtbar, daß heißt nur in sehr kleiner Konzentration vorhanden.

Somit lässt es sich erklären, dass die gleiche Deletion, die bei einem Patienten mit KSS gefunden worden ist, auch bei den Kontrollen nachweisbar ist: Lange repetitive Sequenzen machen eine mtDNA-Sequenz besonders anfällig für Deletionsereignisse¹²¹. Hier liegt ein elf Basenpaar langer „direct repeat“ vor. Es ist daher vorstellbar, dass es an dieser Stelle sehr häufig zu niedrigprozentigen, nicht pathogenen Deletionen im Rahmen des Alterungsprozesses kommt - aber auch zu Deletionen in höheren Konzentrationen bei einer mitochondrialen Erkrankung. Das typische Krankheitsbild wird dann nicht bedingt durch die Lage der Deletion, sondern durch die quantitative Häufung oberhalb eines Schwellenwertes. In niedriger Kopienzahl bleibt die Deletion als eine der zahlreichen Altersdeletionen

symptomarm. Dieses Phänomen, dass gleiche Deletionen sowohl im Alter als auch bei Mitochondriopathien gefunden worden sind, ist bereits mehrfach beschrieben worden^{126 74}; es unterstützt die These, dass Mitochondriopathien lediglich die natürlichen Alterungsprozesse der Zelle um ein Vielfaches beschleunigen¹²⁵.

4.3.2 Sekundäre LHON-Mutation, A4917G

Ein Zufallsbefund ist die bei Patient D im Rahmen der Suche nach Deletionsbruchpunkten gefundene Mutation A4917G. Diese Mutation liegt homoplasmatisch vor.

Bei der A4917G Mutation handelt es sich um eine der Mutationen, welche als sekundäre LHON-Mutationen beschrieben werden. Unter einer sekundären LHON-Mutation versteht man eine Mutation, welche, im Gegensatz zu einer primären LHON-Mutation, den Austausch einer wenig konservierten Aminosäure verursacht und die LHON nicht alleine verursachen kann¹²⁷. Sogenannte sekundäre LHON-Mutationen werden auch in 10 – 15 % der gesunden europäischen Gesamtbevölkerung gefunden¹²⁸. Es wurde postuliert, dass diese Mutationen die Penetranz und Prognose bei LHON beeinflussen können^{129,36}.

Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es sich bei den als sekundäre LHON-Mutationen bezeichneten Phänomenen um nicht pathogene Polymorphismen handelt^{130,99}, die keinen Einfluss auf den Ausbruch oder die Schwere der Erkrankung haben.

Sekundäre LHON-Mutationen sind noch nie in heteroplasmatischem Zustand beschrieben worden¹¹²; liegt eine Punktmutation heteroplasmatisch vor, so ist dies ein Anhaltspunkt für ihre Pathogenität¹³¹. Folglich spricht auch das homoplasmatische Vorliegen der sekundären LHON-Mutationen –wie auch in unserem Fall- gegen eine pathogenetische Bedeutung der Mutation.

Außerdem gibt es keine Anzeichen dafür, dass die sekundären LHON-Mutationen bei einem gleichzeitigen Auftreten mit pathogenen primären LHON-Mutationen die Schwere der Erkrankung beeinflussen¹⁰³.

Man geht heute davon aus, dass es sich bei den sogenannten sekundären LHON-Mutationen um nicht pathogene, in der Population seit langem existierende Polymorphismen handelt, die in der Gesamtbevölkerung oder in bestimmten Haplotypen, für die sie charakteristisch sind, weit verbreitet sind¹³². (Unter einem Haplotyp versteht man hier mehrere, genau definierte mtDNA-Mutationen, die gemeinsam vererbt werden.) Die statistische Häufung vieler sogenannter sekundärer LHON-Mutationen bei LHON-Patienten, lässt sich durch populationsgenetische Entwicklungen erklären und sagt nichts aus über die Pathogenität der Mutationen¹³².

Dies gilt in besonderem Maße für die hier vorliegende Mutation A4917G¹³⁰: Diese Mutation kann alleine vorkommen, ist aber oft vergesellschaftet mit der T4216C-Mutation und ist dann spezifisch für den europäischen Haplotyp T. Die A4917G-Mutation ist sehr alt, in der Population in Europa sehr weit verbreitet und in den LHON-Familien nicht häufiger zu finden als in der Gesamtbevölkerung. Wenn sie zusammen mit einer primären LHON-Mutation auftritt, ändert sie nichts an der Ausprägung dieser Mutation. Das Vorliegen der T4216C-Mutation ist hier nicht untersucht worden, d.h. eine sichere Zuordnung des Patienten zu dem Haplotyp T ist hier nicht möglich. Es lässt sich aber sagen, dass die Mutation bei ihm kein LHON-spezifisches Krankheitsbild hervorrufen wird.

Es wird allerdings vermutet, dass bestimmte Haplotypen, besonders die durch die Mutationen bei nt4216, nt4917 und nt137078 gekennzeichneten, die Träger für die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen wie M.Alzheimer oder M.Parkinson prädisponieren^{133,134}. Ob und inwieweit sekundäre LHON-Mutationen aber die aktuelle Ausprägung des KSS bei diesem Patienten beeinflusst hat, kann nicht festgestellt werden.

4.4 Patienten P1, P4, P6

4.4.1 Auffälligkeiten der longPCR

Betrachtet man das Bild der Gelelektrophorese (Abb.18; 3.3) genauer, so fällt bei allen Kontrollen und Patienten ein sehr regelmäßiges Muster an Hintergrundbanden auf.

Das regelhafte Auftreten dieses immer gleichen Bandenmusters bei allen Reaktionen lässt zunächst vermuten, dass es sich hierbei um die Folge eines Primer-Mismatch in einem der ersten Reaktionszyklen handelt. Diese Möglichkeit wurde jedoch von uns (siehe 3.1) und anderen¹³⁵ ausgeschlossen, indem man die PCR mit anderen Primern wiederholte und (Größen angepasst) dasselbe Ergebnis erzielte (Primer-Shift). Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den Banden um niedrig prozentige Deletionen handelt, die in sogenannten „hotspots“ für Deletionen regelhaft und ohne Krankheitswert vorhanden und somit amplifiziert werden¹³⁵.

Auffällig ist auch, dass bei fünf Patienten (P1 – P4, P6) keine Wildtypbande von 14,5 kb erkennbar ist. Das Fehlen einer 14,5 kb Bande ist auch schon bei Altersdeletionen¹³⁶¹³⁷ beschrieben worden, nicht jedoch bei inflammatorischen Myopathien. Das Fehlen einer 14,5 kb Bande kann bei den untersuchten Patienten auf eine starke Schädigung der DNA durch das hohe Alter in Verbindung mit einer klinisch schon weit fortgeschrittenen inflammatorischen Myopathie zurückzuführen sein. Ein vollständiger Mangel an intakten DNA Molekülen ist allerdings schwer vorstellbar; Wallace geht in einem ähnlichen Fall davon aus, dass noch Wildtyp-DNA vorhanden ist, deren Quantität jedoch bei der gewählten PCR-Methode unter der Nachweisgrenze liegt¹³⁸.

Außerdem wird angenommen, dass ein minimaler Energiehaushalt der Zelle auch bei fast vollständigem Ausfall der Atmungskette aufrechterhalten werden kann: Hierbei wird der ATP-Bedarf durch Glykolyse gedeckt, während eine plasmamembranständige Oxidoreduktase für eine Aufrechterhaltung des NAD-Angebotes sorgt¹³⁶.

Es ist allerdings auch möglich, dass die geringe Intensität des großen, schädigenden Einflüssen besonders zugänglichen Wildtypmoleküls zum Teil einen Artefakt darstellt: Wiederholt stattgefundenen Auftau- und Einfriervorgänge können zu Schäden an dem Template, besonders den großen Molekülen, geführt haben. Das Template ist bereits längere Zeit vor dem Einsatz in der longPCR gewonnen worden. Die hohe Anzahl an Proben, die nicht mehr amplifiziert werden konnte, spricht ebenfalls für die relativ schlechte Qualität des Ausgangstemplates.

Da die Deletionsbanden hier prominenter sind als die Wildtypbanden, kann man davon ausgehen, dass hier Deletionen in einem hohen Prozentsatz vorliegen. Dies ist besonders deutlich bei P1, bei dem Bande A die bei weitem prominenteste Bande darstellt. Eine genaue Quantifizierung der Banden war allerdings sowohl aufgrund der gewählten Methode als auch aufgrund der geringen Templatemenge nicht möglich.

Außerdem ist es nicht auszuschließen, dass das Verhältnis artifiziell durch das verwendete PCR-Protokoll zu Gunsten der kürzeren Moleküle, d. h. der Deletionen, verschoben worden ist, wodurch eine Quantifizierung zusätzlich erschwert wäre.

4.4.2 Deletionsmechanismus bei idiopathischen inflammatorischen Myopathien

Das Vorhandensein multipler Deletionen bei idiopathischen inflammatorischen Myopathien ist schon von verschiedenen Autoren^{75,76,139,140} beschrieben worden. Multiple Deletionen treten auch bei der primären Mitochondropathie adPEO (autosomal dominante externe Ophthalmoplegie)⁶⁴, bei dilatativen Kardiomyopathien⁷¹, Enzephalomyopathien¹⁴¹ und im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, bei denen mitochondriale Ursachen diskutiert werden, wie z. B. bei der rheumatischen Polymyalgie¹⁴² sowie im Rahmen von physiologischen Alterungsprozessen⁷³, auf.

Wie oben erwähnt (siehe 1.2.2.2), setzen die verschiedenen Modelle zur Entstehung von Deletionen „direct repeats“ voraus. Es sind allerdings auch Deletionen ohne benachbarte

„direct repeats“ (ebenfalls Typ II Deletionen) bekannt. Man geht davon aus, dass hier die repetitive Sequenz entweder nach Entstehung der Deletion verlorengegangen ist oder dass in solchen Fällen ein anderer Pathomechanismus vorliegt¹⁴⁰. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei den von uns gefundenen Deletionen nur die beiden Typ II Deletionen von pyrimidinreichen Sequenzen flankiert werden, nicht jedoch die Typ I Deletion. Pyrimidinreiche Elemente begünstigen die Entstehung von DNA-Konformationen, welche anfällig sind gegenüber Strangbrüchen¹⁴³. Folglich sind nicht nur Stellen mit „direct repeats“, sondern auch pyrimidinreiche Stellen besonders anfällig für Deletionen.

Deletionsmechanismen, die auf „direct repeats“ zurückgreifen, sind bei den klassischen mitochondrialen Deletionserkrankungen wie dem KSS⁹ und der PEO¹²² sehr weit verbreitet. In unserem Kollektiv wurden häufiger Typ II Deletionen gefunden, die abhängig zu sein scheinen vom Pyrimidingehalt der molekularen Umgebung. Dies scheint zu bestätigen, dass in den degenerativen Erkrankungen mit multiplen mtDNA Deletionen ein anderer Pathomechanismus vorliegt.

4.4.3 Verlust des Replikationsursprunges O_L

Besonders interessant sind die hier gefundenen Deletionen wegen ihrer auffälligen Verteilung innerhalb des mitochondrialen DNA-Ringmoleküls. Ein Großteil der bisher gefundenen singulären und multiplen Deletionen⁹³ befindet sich auf dem „major arc“ des Moleküls zwischen den beiden Replikationsursprüngen (O_H und O_L), d. h. zwischen nt5763-nt110. Die Häufung von Deletionen in diesem Bereich erklärt man sich sowohl durch die lange Einzelsträngigkeit dieses DNA-Abschnittes im Rahmen der Replikation⁹ als auch durch eine deutlich höhere Zahl an längeren (ca.10-13 bp) repetitiven Sequenzen¹²² in diesem Bereich. Eine weitere Ursache kann z. B. in der geringeren Stabilität der Intermediärstrukturen von Deletionen des „minor arc“ liegen¹⁴⁴.

Die hier gefundenen Deletionen weichen jedoch von diesem Schema ab, da sie sich zwischen den nt200 und nt3326 befinden, d. h. am Beginn des Moleküls außerhalb des „major arc“. Auch dies könnte auf einen anderen Pathomechanismus hindeuten. Auch ist bei den hier gefundenen Deletionen O_L (nt5721 – nt5798), der Ursprungsort der Replikation des leichten Stranges, nicht mehr vorhanden. Dies ist ein bis jetzt sehr selten beschriebenes Phänomen^{93,145,146}; im Rahmen von inflammatorischen Myopathien ist erst eine Deletion bekannt¹³⁹, bei der der gesamte O_L nicht mehr vorhanden war.

Deletionen, bei denen u. a. auch O_L deletiert ist, zeigen, dass eine Replikation des mitochondrialen Ringmoleküls in einer nachweisbaren Quantität (bis zu 44% der vorhandenen mtDNA)¹⁴⁶ möglich ist, auch wenn einer der beiden Replikationsursprünge nicht mehr vorhanden ist. Dass die Vermehrung von kleinen DNA-Ringmolekülen auch ohne die herkömmlichen Replikationsursprünge stattfindet, ist in *E. coli* bereits lange bekannt¹⁴⁷. Hier weichen die Replikationsenzyme auf eine andere Gensequenz als Ursprung der Replikation aus. Für mitochondriale DNA wurde die Vermehrungsfähigkeit beim Verlust eines der Replikationsursprünge lange verneint¹⁴⁴. Es sind jedoch auch im Herzmuskel eines gesunden Menschen zahlreiche kleine mtDNA-Ringmoleküle beschrieben worden, bei denen einer oder sogar beide Replikationsursprünge nicht mehr vorhanden waren¹⁴⁸. Es scheint denkbar, dass hier ein Verlust der Replikationsursprünge auf eine ähnliche Weise kompensiert wird, wie bei den mit den Mitochondrien verwandten Bakterien.

4.4.4 Einfluß von Radikalen

Auch wenn Deletionen durch das fehlerhafte Arbeiten der an der Replikation / Rekombination beteiligten Enzyme erklärt werden können (vgl. 1.2.2.2), stellt sich weiterhin die Frage, was die erhöhte Fehlerrate dieser Enzyme verursacht bzw. wodurch eine Schädigung der mitochondrialen DNA zustande kommt.

Als eine Ursache für die erhöhte Zahl an Fehlern und damit an der erhöhten Rate an Deletionen wird die Schädigung der mitochondrialen DNA durch Radikale diskutiert¹⁴⁹. Die mtDNA ist gegenüber schädigenden Einflüssen weitaus anfälliger als die Kern-DNA¹⁵⁰. Die Mutationsrate der mtDNA ist ca. 10 – 20 mal so hoch wie die der Kern-DNA¹⁵¹, die durch Histone und durch verschiedene Reparaturmechanismen geschützt wird. Außerdem ist die mitochondriale DNA durch ihre Nähe zur Atmungskette, an der von einigen Komplexen Radikale produziert werden, einer höheren Konzentration an mutationsauslösenden Sauerstoffradikalen ausgesetzt.

AdPEO⁶⁵ und Alterungsprozesse¹⁵² sind schon mit der Schädigung der Nukleinsäuren durch Radikale in Zusammenhang gebracht worden. Auch bei inflammatorischen Myopathien gibt es deutliche Hinweise, dass Radikale in der Pathogenese eine Rolle spielen¹⁵³: Die Aktivität von Superoxid-Dismutasen¹⁵⁴ ist in betroffenem Gewebe gesteigert. Nitrotyrosine, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), welche einen direkten Marker für oxidativen Stress darstellen, waren im Muskel von Patienten ebenfalls deutlich erhöht⁸⁶. Auch die Lipid-Peroxidation ist im Muskel von Patienten mit inflammatorischen Myopathien gesteigert¹⁵⁴.

Die erhöhte Freisetzung von Radikalen kann die mtDNA in einem solchen Maße schädigen, dass es zum Auftreten multipler unspezifischer Deletionen als Ausdruck dieser Schädigung kommt. So ist z. B. in vitro nachgewiesen worden, dass die Replikation mitochondrialer DNA bei Schäden der Nucleinsäuren, z.B. durch Radikale, gestört ist: Die Polymerase I löst sich an der schadhaften Stelle von dem Template und bindet an einer anderen Stelle¹⁵⁵.

Die dadurch entstehenden fehlerhaften Replikations- bzw. Rekombinationsprodukte stellen somit vielleicht die einzige Möglichkeit des Mitochondriums dar, die Information eines geschädigten DNA-Moleküls zumindest teilweise zu nutzen¹⁵⁶.

4.4.5 Einfluß des Nukleus

Eine erhöhte Anfälligkeit der mtDNA für Deletionen kann auch auf nukleäre Ursachen zurückgeführt werden: Eine Fehlfunktion in einem der zahlreichen kernkodierten Enzyme, z. B. in einem mtDNA Bindungsprotein, welche an der Replikation bzw. Rekombination des mitochondrialen Ringmoleküls beteiligt sind, kann zu fehlerhaften Replikations- bzw. Rekombinationsereignissen führen. Ein verstärktes Auftreten von mitochondrialen Deletionen bei der adPEO ist z. B. mit Schädigungen auf den Chromosomen 3p⁶⁶ und 10q⁶⁵ assoziiert. Eine Mutation in einem Kerngen kann auch bei der Entstehung von inflammatorischen Myopathien eine Rolle spielen. Die Schädigung der Kern-DNA kann z. B. durch eine slow virus Infektion verursacht worden sein.

4.4.6 Pathogenität der mtDNA Deletionen

Fraglich ist, an welcher Stelle der Pathogenitätskaskade der inflammatorischen Muskelerkrankungen die mitochondrialen Deletionen anzusiedeln sind:

Askanas⁸⁷ geht davon aus, daß die z.B. durch einen Virus hervorgerufenen mtDNA-Deletionen zuerst vorliegen und eine funktionelle Störung der Atmungskette verursachen. Diese führt zu einer verstärkten Radikalbildung und zu einer chronischen Schädigung der Muskelzellen, welche erst sekundär die Erkrankung charakterisierende Entzündungsreaktion hervorruft.

Wahrscheinlicher ist die von den meisten Autoren vertretene These, dass die mitochondrialen Deletionen erst im Gefolge der chronischen Erkrankung auftreten, eventuell verursacht durch eine lange radikalische Schädigung der DNA oder durch Schäden der Kern-DNA. Für das sekundäre Auftreten von Deletionen sprechen verschiedene Gründe⁷: Es hat sich bei der Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs herausgestellt, dass bei immerhin 27% der Patienten mit inflammatorischen Myopathien keine Deletionen nachweisbar sind. Außerdem sind die Deletionen in ihrer Größe und ihrer Lage sehr uneinheitlich, so dass die Ausprägung

eines einheitlichen Phänotyps unwahrscheinlich erscheint. Auch korrelieren Anzahl und Quantität der Deletionen nicht mit der Schwere des Krankheitsbildes.

Die durch primäre Deletionen hervorgerufenen adPEO und arPEO zeigen andere Lähmungsmuster und im Mikroskop nicht die Veränderungen der IBM. Umgekehrt wurden bei keinem Patienten mit inflammatorischer Myopathie bis jetzt eine Ophthalmoplegie beobachtet, die als das klassische Hauptsymptom einer primären mtDNA-Deletion gilt.

Folglich erscheint es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den Deletionen des mitochondrialen Ringmoleküls im Rahmen von inflammatorischen Myopathien um sekundäre Phänomene handelt, die dennoch für den Verlauf der Erkrankung bedeutsam sein können: Multiple Deletionen führen zu einem Funktionsverlust der Atmungskette und damit zu einer weiteren irreversiblen Schädigung des Muskels, so dass die Krankheitssymptome verstärkt werden.

IBM ist eine Erkrankung, die erst nach dem 50.Lebensjahr auftritt, oft sogar erst jenseits des 70.Lebensjahres. Das hohe Erkrankungsalter macht ebenfalls eine langsame fortschreitende Schädigung durch Radikale wahrscheinlich, ebenso eine slow virus Infektion. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die pathomorphologischen Ähnlichkeiten zwischen inflammatorischen Myopathien und der ZNS-Erkrankung Morbus Alzheimer⁸², bei der es sich ebenfalls um eine degenerative, erst in höherem Lebensalter auftretende Störung handelt.

Es ist ebenfalls möglich, dass die physiologische Anhäufung von somatischen mtDNA Deletionen im Laufe des Lebens durch die Erkrankung lediglich beschleunigt wird.

4.5 Patient L

Bei L besteht der Verdacht einer mitochondrialen Enzephalomyopathie, im Besonderen der Verdacht auf das Vorliegen des Leigh-Syndroms. Das Screening auf die bekannten Leigh-Mutationen (vgl. 1.2.3.2) zeigte, daß in diesem Fall keine dieser Mutationen vorliegt. Die

Untersuchung des Gehirns könnte allerdings durch seine typischen Veränderungen⁵³ postmortal die Verdachtsdiagnose Leigh bestätigen. Nachdem auch die sonstigen üblichen Deletions- und Punktmutationstests keinen Hinweis auf eine Schädigung zeigten, wurde die gesamte tRNA^{Leu[UUR]} auf das Vorliegen einer Punktmutation gescreent. Die tRNA^{Leu[UUR]} ist als „hot spot“ mitochondrialer Punktmutationen bekannt¹⁵⁷.

Es zeigte sich, dass auch keine Punktmutation in der tRNA^{Leu[UUR]} für die Erkrankung verantwortlich zu machen ist. Die Erkrankungsursache konnte also nicht herausgefunden werden. Die Symptomkombination von facies myopathica mit ausgeprägter Ptosis, erniedrigtem Muskeltonus, Hörstörung und nächtlicher Epilepsie lassen allerdings weiterhin eine mitochondriale Erkrankung sehr wahrscheinlich sein. Weitere Untersuchungen wären nötig, um eine Mitochondropathie mit Sicherheit auszuschließen oder zu befürworten. Deletionen der mtDNA wurden als Ursache bereits ausgeschlossen (in den oben besprochenen Grenzen).

Das Vorliegen einer Punktmutation auf den ca. 16500 Basenpaaren der mitochondrialen DNA könnte am ehesten mit dem Screeningverfahren SSCP (siehe 2.7) untersucht werden.

Diese weitverbreitete Screeningmethode¹⁵⁸ erlaubt ein relativ schnelles, preisgünstiges Durchforsten des in kleine Fragmente aufgeteilten Genoms auf Mutationen bis hin zu singulären Basenaustauschen¹⁵⁹. Bei dem richtigen Einsatz von Restriktionsenzymen bietet es eine Genauigkeit von weit über 90%¹⁶⁰. Der Bereich, in welchem die Mutation liegt, ist hierdurch auf wenige hundert Basen einzugrenzen und damit einer direkten Sequenzierung zugänglich¹⁶¹.

Eine direkte Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms ist im Augenblick noch zu langwierig und zu teuer. Dies könnte sich jedoch in nächster Zeit durch die immer weiter fortschreitende Verbesserung des automatischen Sequenzierens ändern und somit die SSCP, welche ein Umgehen mit radioaktiven Substanzen erfordert, verdrängen.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, Erkrankungen mit verschiedenen molekulargenetischen Techniken auf Schäden der mitochondrialen DNA zu untersuchen. PCR, Restriktionstests und SSCP wurden zum Auffinden von Punktmutationen eingesetzt, longPCR und Sequenzierung zum Deletionsscreening.

Ein besonderer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Weiterentwicklung der longPCR-Methode und ihrer Anwendung bei Patienten mit inflammatorischen Myopathien. In den Muskelfasern dieser Patienten waren wiederholt multiple Deletionen der mtDNA nachgewiesen worden. Die meisten Deletionen wurden innerhalb des „major arc“ (nt5760 – nt190) gefunden.

In der vorliegenden Arbeit werden Deletionen beschrieben, welche im Vergleich zu den bisher bekannten, ungewöhnlich groß sind (ca. 10500 – 12800 Basenpaare). Außerdem sind die 5'-Bruchpunkte an einer ungewöhnlichen Stelle des mitochondrialen Genoms lokalisiert: Sie befinden sich alle im „minor arc“ zwischen den Nukleotiden nt800 und nt3326. Diese Bruchpunkte konnten mit Hilfe der longPCR, welche auch den Anfangsbereich des Genoms umfasst, aufgespürt werden. Die Entstehung der Deletionen und ihre Rolle im Pathomechanismus bleiben weiterhin ungeklärt.

Die longPCR wurde auch zum Deletionsscreening bei einer Patientin mit Verdacht auf Kearns-Sayre-Syndrom angewandt. Es wurden multiple Deletionen gefunden und zum Teil sequenziert, die diese Verdachtsdiagnose bestätigten. Die sekundäre LHON-Mutation A4917G wurde ebenfalls gefunden und in ihrer pathologischen Relevanz eingeordnet.

Darüber hinaus konnte die in einer Familie bekannte primäre LHON-Mutation G3460A bei den Indexpatienten durch Sequenzierung nachgewiesen und mit Hilfe eines Restriktionstestes

quantifiziert werden. Es wurde versucht, das zukünftige Erkrankungsrisiko der beiden noch jungen Patienten unter Einbeziehung der Familienanamnese abzuschätzen. Multiple mitochondriale Deletionen als Ursache der in der Familie ebenfalls vorliegenden dilatativen Kardiomyopathie konnten ausgeschlossen werden.

Es wurden Screening-Restriktionstests für die häufigsten Punktmutationen der mitochondrialen Erkrankungen MERRF, MELAS und M. Leigh entwickelt und bei Patienten mit entsprechender Indikation angewandt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene molekulargenetische Techniken zur Diagnostik einiger typischer mitochondrialer Erkrankungen weiterentwickelt und eingesetzt.

Es wurde aber auch gezeigt, daß bei den nicht als primäre mitochondriale Erkrankungen geltenden inflammatorischen Myopathien massive Schädigungen der mitochondrialen DNA vorliegen. Inflammatorische Myopathien gehören in eine Gruppe degenerativer Erkrankungen des alten Menschen, zu der auch Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson gehören und die durch die demographische Entwicklung zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Es erscheint lohnenswert, die Rolle, welche die Schädigung der mtDNA in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielt, weiter zu erforschen. Es ist vorstellbar, dass es dadurch zu einem besseren Verständnis dieser volkswirtschaftlich bedeutenden Erkrankungen kommt, welches möglicherweise in der Zukunft eine gezieltere, kausale Therapie ermöglicht.

6 Verzeichnisse

6.1 Abbildungsverzeichnis

- 1 Schematische Darstellung des mitochondrialen Ringmoleküls
- 2 Schematische Darstellung der Deletionsentstehung („slip mispairing“)
- 3 Sequenzalignment zwischen verschiedenen Spezies bei der G3460A-Mutation
- 4 Stammbaum der Familie der Patienten M und T
- 5 Schematische Darstellung der Restriktion von F3 mit BsaJ I bei LHON
- 6 Schematische Darstellung der Restriktion von F7 mit Msp I bei M. Leigh
- 7 Schematische Darstellung der Restriktion von F7 mit Ava I bei M. Leigh
- 8 Schematische Darstellung der Restriktion von F3 mit Apa I bei MELAS
- 9 Schematische Darstellung der Restriktion von F_{MERRF} mit Ban II bei MERRF
- 10 Schematische Darstellung der Restriktion von F3 mit BsaJ I für SSCP
- 11 Röntgenfilm mit der Sequenz um nt3460 von M und T
- 12 Polyacrylamidgel der Restriktion von F3 mit Hga I bei M und T
- 13 Agarosegel der longPCR von M und T
- 14 Agarosegel der longPCR von Patient D
- 15 Veranschaulichung der bereits bekannten und der unbekannten Anteile der Banden 1 und 2 des Patienten D
- 16 a) Sequenzbild der Bruchpunkte bei dem Patient D und C2
b) Vergrößerte Darstellung des Bruchpunktbereiches
- 17 Direkte Sequenzierung der Punktmutation A4917 G bei Patient D
- 18 Agarosegelelektrophorese der Patienten P1 – P7
- 19 Veranschaulichung der bereits bekannten und der unbekannten Anteile der Banden A und B des Patienten P1
- 20 a) Sequenzierung der Typ I Deletion von P1, Bande B
b) Vergrößerte Darstellung des Bruchpunktbereiches
- 21 Veranschaulichung der bereits bekannten und der unbekannten Anteile der Banden B und C des Patienten P4
- 22 a) Sequenzierung der Typ II Deletion von P4, Bande C
b) Vergrößerte Darstellung des Bruchpunktbereiches
- 23 a) Sequenzierung der Typ II Deletion von P4, Bande D
b) Vergrößerte Darstellung des Bruchpunktbereiches
- 24 Veranschaulichung der bereits bekannten und der unbekannten Anteile der Bande E des Patienten P6
- 25 Übersicht über die Größe und Lage der Deletionen bei P1, P4, P6

6.2 Tabellenverzeichnis

- 1 Übersicht über kern- und mitochondrial- kodierte Untereinheiten d. Atmungskette
- 2 Abweichungen zwischen dem universellen und dem mitochondrialen Code
- 3 Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Größe der Fragmente
- 4 Abhängigkeit der Laufdauer von der Entfernung zwischen Primer und zu lesender Sequenz
- 5 Fragmente, in die das mitochondriale Genom zur besseren Handhabbarkeit unterteilt worden ist
- 6 Bedingungen für das manuelle Sequenzieren
- 7 Bedingungen für die Sequenzierreaktion beim automatischen Sequenzieren
- 8 Zur weiteren Untersuchung ausgewählte deletionsüberbrückende Banden (P1,P4,P6)
- 9 Zusammenfassung der Eigenschaften der gefundenen Deletionen bei IIM

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-diphosphat
adPEO	autosomal dominante progressive externale Ophthalmoplegie
arPEO	autosomal rezessive progressive externale Ophthalmoplegie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar (e)
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase („inducible nitric oxide synthase“)
kb	Kilobasenpaare
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	<i>Leber's</i> hereditäre optische Neuropathie
longPCR	PCR mit weit auseinanderliegenden Primern
MELAS	mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Phasen
MERRF	myoklonische Epilepsie mit ragged-red fibres
mt	Mitochondrial
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mRNA	Boten („messenger“) –Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
ND1 - 6	Untereinheit 1 bis 6 der NADH-Dehydrogenase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
nt	Nukleotid
O _H	Replikationsursprung des schweren Stranges
O _L	Replikationsursprung des leichten Stranges
OM	okulare Myopathie

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEO	progressive externale Ophthalmoplegie
RRF	„ragged-red fibres“
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCP	Single strand conformation polymorphism
SU	Untereinheit eines Enzyms („subunit“)
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	„transfer“- Ribonukleinsäure

7 Literatur

- ¹ Löffler G (1990). In: Physiologische Chemie, 4. Auflage. Löffler G und Petrides PE, eds. (Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag), pp. 309 - 320
- ² Schmookler Reis RJ, Goldstein S (1983). Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells: Genome number, integrity, and methylation. J Biol Chem 258: 9078 - 9085
- ³ MITOMAP <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html> (Zugriff am 12.04.2000)
- ⁴ Anderson S, Bankier AT, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457 - 464
- ⁵ Taylor DJ, Radda Gk (1994). In: Current topics in bioenergetics, molecular basis of mitochondrial pathology, Vol. 17, Lee CP, ed. (San Diego, Academic Press), pp. 99 - 126
- ⁶ DiMauro S, Bonilla E, DeVivo DC et al. (1985). Mitochondrial myopathies. Ann Neurol 17, 521 - 538
- ⁷ Santorelli FM, Sciacco M, DiMauro S et al. (1996). Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: a study of 56 patients. Ann Neurol 39, 789 - 795
- ⁸ Wallace DC, Brown MD, Lott M et al. (1998). Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. Biofactors 7, 187 - 190
- ⁹ Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC et al. (1989). Spontaneous Kearns – Sayre/ chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: A slip replikation model and metabolic therapy. Proc Natl Acad Sci USA 86, 7952 - 7956
- ¹⁰ Cormier V, Rötig A, Munnich A (1990). Widespread multitissue deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow pancreas syndrome. J Pediatr 117, 599 - 602
- ¹¹ Schon EA, Grossmann MH (1998). Mitochondrial diseases: genetics. Biofactors 7, 191 - 195
- ¹² Kearns TP, Sayre GP (1958). Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia and complete heart block. Arch Ophthalmol 60, 280 - 289
- ¹³ DiMauro S (1998). Mitochondrial diseases: clinical considerations. Biofactors 7, 277 - 285
- ¹⁴ Bresolin N, Moggio M, Bet L et al. (1987). Progressive cytochrome c oxidase deficiency in a case of Kearns-Sayre syndrome: morphological, immunological and biochemical studies in muscle biopsies and autopsy tissues. Ann Neurol 21, 564 - 572
- ¹⁵ Zeviani M, Moraes CT, Rowland LP et al. (1988). Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 38, 1339 - 1346

-
- ¹⁶ Poulton J, Deadman ME, Gardiner RM (1989). Tandem direct duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy: analysis of nucleotide sequence and tissue distribution. *Nucleic Acids Res* 17, 10223 - 10229
 - ¹⁷ Pavlakis SG, Rowland LP, DiVivo DC et al. (1988). In: *Contemporary Neurology*. Plum F, ed. (Philadelphia, Davis), pp. 95 - 113
 - ¹⁸ Moraes CT, DiMauro S, Servadei S et al. (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns – Sayre syndrome. *New Engl J Med* 320, 1293 - 1299
 - ¹⁹ Pearson HA, Lobe JS, Kocoshis SA et al. (1981). A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction presenting in the neonate. *J Pediatr* 99, 259 - 261
 - ²⁰ Rotig A, Colonna M, Munnich A et al. (1988). Deletion of blood mitochondrial DNA in pancytopenia. *Lancet* 2, 567 - 568
 - ²¹ Ballinger SW, Shoffner JM, Wallace DC (1994). In: *Current topics in bioenergetics. Molecular basis of mitochondrial pathology*, Vol.17. Lee, CP, ed. (San Diego, Academic Press), pp. 59 - 98
 - ²² Schon EA, Rizzuto R, DiMauro S et al. (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 244, 346 - 349
 - ²³ Zeviani M, Servadei S, DiDonato S et al. (1989). An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339, 309- 311
 - ²⁴ Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1989). Deletions of muscle mitochondrial DNA in mitochondrial myopathies: sequence analysis and possible mechanisms. *Nucleic Acids Res* 17, 4465 - 4469
 - ²⁵ Nikoskelainen E (1984). New aspects of the genetic, etiology, and clinical puzzle of Leber's disease. *Neurology* 34, 1482 - 1484
 - ²⁶ Went LN (1972). In: *Handbook of clinical neurology*, Vol.13. Vinken PF, Bruyn GW, eds. (Amsterdam, North Holland Publishing Co.), pp.94 - 110
 - ²⁷ Mashima Y, Kigasawa K, Oguchi Y et al. (1996). High incidence of pre-excitation syndrome in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Genet* 50, 535 - 537
 - ²⁸ Novotny EJ, Singh G, Wallace DC et al. (1986). Leber's disease and dystonia: A mitochondrial disease. *Neurology* 36, 1053 - 1060

-
- ²⁹ Howell N, Kubacka I, McCullough DA et al. (1991). Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *Am J Hum Genet* 48, 935 - 942
- ³⁰ Huoponen K, Vilkki J, Savontaus ML et al. (1991). A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 48, 1147 - 1153
- ³¹ Wallace DC, Singh G, Nikoskelainen EK et al. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427 - 1430
- ³² Johns DR, Neufeld MJ, Park RD (1992). An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1551 - 1557
- ³³ Howell N (1998). Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. *Vision Res* 38, 1495 - 1504
- ³⁴ Kerrison JB, Newman NJ (1997). Clinical spectrum of Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Neurosci* 4, 295 - 301
- ³⁵ Leo-Kottler B, Christ-Adler M, Wissinger B et al. (1996). Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic results obtained in a family with a new point mutation at nucleotide position 14498 in the ND6 gene. *Ger J Ophthalmol* 5, 233 - 240
- ³⁶ Brown MD, Wallace DC (1994). Spectrum of mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Neurosci* 2, 138 - 145
- ³⁷ MITOMAP <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html> (Zugriff am 15.04.2000)
- ³⁸ Wallace DC (1970). A new manifestation of Leber's disease and a new explanation for the agency responsible for its unusual pattern of inheritance. *Brain* 93, 121 - 132
- ³⁹ Zickermann V, Barquera B, Finel M et al. (1998), Analysis of the Pathogenic Human Mitochondrial Mutation ND1/3460, and mutations of strictly conserved residues in its vicinity, using the bacterium *paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 37, 11792 - 11796
- ⁴⁰ Smith PR, Cooper JM, Schapira AH et al. (1994). Platelet mitochondrial function in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Sci* 122, 80 - 83
- ⁴¹ Fukuhara N, Tokigushi S, Shirakawa K et al. (1980). Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or syndrom? Light and electron microscopic studies of two cases and review of the literature. *J Neurol Sci* 47, 117 - 133
- ⁴² Berkovic SF, Carpenter S, Evans A et al. (1989). Myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF): A clinical, pathological, biochemical, magnetic resonance spectrographic and positron emission tomographic study. *Brain* 112, 1231 - 1260

-
- ⁴³ Wallace DC, Zheng X, Lott MT et al. (1988). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55, 601 - 610
- ⁴⁴ Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS et al. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 61, 931 - 937
- ⁴⁵ Lombes A, Mendell JR, Nakase H et al. (1989). Myoclonic epilepsy and ragged red fibers with cytochrome c oxidase deficiency, neuropathology, biochemistry and molecular genetics. *Ann Neurol* 26, 20 - 33
- ⁴⁶ Servidei S (1998). Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* 8, VIII - XI
- ⁴⁷ Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S et al. (1984). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16, 481 - 487
- ⁴⁸ Pavlakis SG, Rowland LP, DiVivo DC et al. (1988). In: *Contemporary Neurology*, Plum F, ed. (Philadelphia, Davis), pp. 95 - 113
- ⁴⁹ Hasuo K, Tamura S, Yasumori K et al. (1987). Computed tomography and angiography in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes); report of three cases. *Neurorad* 29, 393 - 397
- ⁵⁰ Koga Y, Nonaka I, Kobayashi M et al. (1988). Muscle pathology in complex I (NADH CoQ reductase) deficiency. *Ann Neurol* 24, 749 - 756
- ⁵¹ Goto Y, Nonaka I, Horai S (1990). A mutation in the tRNA (Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348, 651 - 653
- ⁵² DiMauro S, Servidei S, Zeviani M et al. (1987). Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 22, 498 - 506
- ⁵³ Monpetit VJA, Andermann F, Carpenter S et al. (1971). Subacute necrotizing encephalomyelopathy: a review and a study of two families. *Brain* 94, 1 - 30
- ⁵⁴ Degoul F, Diny M, Rodriguez D et al. (1995). Clinical, biochemical and molecular analysis of a maternally inherited case of Leigh syndrome (MILS) associated with the mtDNA T8993G point mutation. *J Inher Metab Dis*. 18, 682 - 688
- ⁵⁵ Santorelli FM, Shanske S, DiMauro S et al. (1994). A T→C mutation at nt8993 of mitochondrial DNA in a child with Leigh syndrome. *Neurology* 44, 972 - 974
- ⁵⁶ Tatuch Y, Christodoulou J, Robinson BH et al. (1992). Heteroplasmatic mtDNA mutation (T→G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 50, 852 - 858

-
- ⁵⁷ Seller A, Kennedy CR, Brown GK et al. (1997). Leigh syndrome resulting from de novo mutation at position 8993 of mitochondrial DNA. *J Inher Metab Dis* 20, 102 - 103
- ⁵⁸ Teraoka M, Yokoyama Y, Seino Y (1999). Two novel mutations of SURF1 in Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Genet* 105, 560 - 563
- ⁵⁹ Boustany RN, Aprille JR, Halperin J et al. (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, 462 - 470
- ⁶⁰ Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ et al. (1991). Mitochondrial DNA depletion with variable tissue expression: A novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Gen* 48, 492 - 501
- ⁶¹ Aprille JR (1985). In: *Achievements and perspectives of mitochondrial research*, Vol. II, Quagliariello E, Slater EL, Palmieri F et al. (eds.) (Amsterdam, Elsevier Science), pp.465 - 476
- ⁶² Yuzaki M, Oskoshi N, Kanazawa I et al. (1989). Multiple deletions in mitochondrial DNA at direct repeats of non D-loop regions in cases of familial mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 1352 - 1357
- ⁶³ Bohlega S, Tanji K, DiMauro S et al. (1996). Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology* 46, 1329 - 1334
- ⁶⁴ Carrozzini R, Hirano M, Miranda AF et al. (1998). Multiple mtDNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogeneses. *Neurology* 50, 99 - 106
- ⁶⁵ Soumalainen A, Kaukonen J, Amati P et al. (1995). An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. *Nat Genet* 9, 146 - 151
- ⁶⁶ Kaukonen JA, Amati P, Zeviani M et al. (1996). An autosomal locus predisposing to multiple deletions of mtDNA on chromosome 3p. *Am J Hum Genet* 58, 763 - 769
- ⁶⁷ Cormier V, Rotig A, Munnich A et al. (1991). Autosomal dominant deletions of the mitochondrial genome in a case of progressive encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 48, 643 - 648
- ⁶⁸ Casademont J, Barrientos A, Estivill X et al. (1994). Multiple deletions of mtDNA in two brothers with sideroblastic anemia and mitochondrial myopathy and in their asymptomatic mother. *Hum Mol Genet* 3, 1945 - 1949
- ⁶⁹ Soumalainen A, Paetau A, Somer H et al. (1992). Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet* 340, 1319 - 1320

-
- ⁷⁰ Blumenthal DT, Shanske S, Bodensteiner J et al. (1998). Myoclonus epilepsy with ragged red fibers and multiple mtDNA deletions. *Neurology* 50, 524 - 525
- ⁷¹ Ozawa T, Tanaka M, Toshima H et al. (1990). Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Research Com* 170, 830 - 836
- ⁷² Kao SH, Liu CS, Wie YH et al. (1997). Ageing-associated large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Biochem Mol Biol Int* 42, 285 - 298
- ⁷³ Zhang C, Baumer A, Nagley P et al. (1992). Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS Letters* 297, 34 - 38
- ⁷⁴ Cortopassi G, Arnheim N (1990). Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Research* 18, 6927 - 6933
- ⁷⁵ Desnuelle C, Paquis V, Askanas V et al. (1998). In: *Inclusion-Body Myositis and Myopathies*. Askanas V, Serratrice G, Engel WK, eds. (Cambridge, England, Cambridge University Press), pp.318 - 328
- ⁷⁶ Molnar M, Schröder JM (1998). Pleomorphic mitochondrial and different filamentous inclusion in inflammatory myopathies associated with mtDNA deletions. *Acta Neuropathol* 96, 41 - 51
- ⁷⁷ Morrow J, Isenberg D (1987). *Autoimmune Rheumatic Disease* (Oxford, Blackwell Scientific Publications)
- ⁷⁸ Swash M, Schwartz MS (1997). *Neuromuscular Diseases, a practical approach to diagnosis and management*, 3. Edition (London, Springer Verlag), pp. 285 - 290
- ⁷⁹ Schröder JM, Molnar M (1997). Mitochondrial abnormalities and peripheral neuropathy in inflammatory myopathy, especially inclusion body myositis. *Mol Cell Biochem* 174, 277 - 281
- ⁸⁰ Oldfors A, Larsson NG, Holme E et al. (1993). Mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. *Brain* 116, 325 - 336
- ⁸¹ Carpenter S, Karpati G (1984). *Pathology of skeletal muscle* (New York, Churchill Livingstone)
- ⁸² Askanas V, Engel WK (1998). In: *Inclusion-Body Myositis and Myopathies* (Cambridge, England, Cambridge University Press), pp.3 - 78
- ⁸³ Samter M, Talmage DW (1988). *Immunological diseases*, Vol.II, 4.edition (Boston / Toronto, Little, Brown and Company)
- ⁸⁴ Garlepp MJ (1996). Genetics of the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 8, 514 - 520

-
- ⁸⁵ Sönnicksen N, Apostoloff E (1992). Autoimmunkrankheiten. 2. Auflage (Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag)
- ⁸⁶ Yang CC, Alvarez RB, Askanas V (1998). Nitric oxide-induced oxidative stress in autosomal recessive and dominant inclusion body myopathies. *Brain* 121, 1089 - 1097
- ⁸⁷ Askanas V, Engel WK (1998). Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies. Diseases of oxidative stress and aging? *Arch Neurol* 55, 915 - 920
- ⁸⁸ Dalakas MC (1991). Polymyositis, dermatomyositis and inclusion body myositis. *N Engl J Med* 325, 1487 - 1498
- ⁸⁹ Zanssen, S (1996). Nachweis von Mutationen der mitochondrialen DNA des Menschen. Aachen, Dissertation
- ⁹⁰ Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning, a laboratory manual. 2.edition, Band III, E3 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ⁹¹ Tengan CH, Moraes CT (1996). Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR. *Biochem Mol Med* 58, 130 - 134
- ⁹² Nelson I, Degoul F, Ponsot G et al. (1989). Mapping of heteroplasmic mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res* 17, 8117 - 8124
- ⁹³ MITOMAP <http://www.gen.emory.edu/mitomap/html> (Zugriff 20. 01. 2000)
- ⁹⁴ Johns DR, Cornblath DR (1991). Molecular insight into the asymmetric distribution of pathogenetic human mitochondrial DNA deletions. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 244 - 250
- ⁹⁵ Kajander OA, Kunnas TA, Jacobs HT et al. (1999). Long-extension PCR to detect deleted mitochondrial DNA molecules is compromised by technical artefacts. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 507 - 514
- ⁹⁶ Kajander OA, Poulton J, Jacobs HT et al. (1999). The dangers of extended PCR in the clinic. *Nat Med* 5, 965 – 966. Letter.
- ⁹⁷ OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/0mim/dispmit?535000#GENOTYPE> (Zugriff am 12.3.2000)
- ⁹⁸ Black GC, Morten K, Poulton J et al. (1996). Leber's hereditary optic neuropathy: heteroplasmy is likely to be significant in the expression of LHON in families with the 3460 ND1 mutation. *Br J Ophthalmol* 80, 915 – 917
- ⁹⁹ Howell N (1997). Leber hereditary optic neuropathy: Mitochondrial mutations and degeneration of the optic nerve. *Vision Res* 37, 3495 - 3507
- ¹⁰⁰ Howell N, Xu M, Sherman J et al. (1994). A heteroplasmic LHON family: tissue distribution and transmission of the 11778 mutation. *Am J Hum Genet* 55, 203 - 206

-
- ¹⁰¹ Brown MD, Voljavec AS, Wallace DC et al. (1992). Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 130, 163 - 173
- ¹⁰² Gerbitz KD, Paprotta A, Zerres K et al. (1992). No genetic differences between affected and unaffected members of a German family with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) with respect to ten mtDNA point mutations associated with LHON. *FEBS letters* 314, 251 - 555
- ¹⁰³ Nikoskelainen EK, Huoponen K, Savontaus ML et al. (1996). Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. *Ophthalmology* 103, 504- 514
- ¹⁰⁴ Carelli V, Ghelli A, Lugaresi E et al. (1997). Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutation and correlation with the mitochondrial genotype. *Neurology* 48, 1623 - 1632
- ¹⁰⁵ Riordan-Eva P, Sanders MD, Harding AE et al. (1995). The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain* 118, 319 - 337
- ¹⁰⁶ Harding AE, Sweeney MG, Riordan-Eva P et al. (1995). Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am J Hum Genet* 57, 77- 86
- ¹⁰⁷ Bu XD, Rotter JI (1991). X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8198 - 8202
- ¹⁰⁸ Vilkki J, Ott J, Nikoskelainen EK et al. (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, 486 - 491
- ¹⁰⁹ Sweeney MG, Davis MB, Harding AE et al. (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, 741- 748
- ¹¹⁰ Chalmers RM, Davis MB, Harding AE et al. (1996). Evidence against an X-linked visual loss susceptibility locus in Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 59, 103 - 108
- ¹¹¹ Pegoraro E, Carelli V, Hoffman EP et al. (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, 356 - 362
- ¹¹² Chalmers RM, Schapira AHV (1999). Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta* 1410, 147 - 158

-
- ¹¹³ Assink JJ, Tijmes NT, Bergen AA et al. (1997). A gene for X-linked optic atrophy is closely linked to the Xp11.4 – Xp11.2 region of the X chromosome. *Am J Hum Genet* 61, 934- 939
- ¹¹⁴ Harding AE, Sweeney MG, Riordan-Eva P et al. (1995). Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am J Hum Genet* 57, 77 - 86
- ¹¹⁵ Charlmers RM, Harding AE (1996). A case-control study of Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 119, 1481 - 1486
- ¹¹⁶ Mashima Y, Kigasawa K, Oguchi Y et al. (1996). High incidence of pre-excitation syndrome in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Clin Genet* 50, 535 - 537
- ¹¹⁷ Nikoskelainen EK, Savontaus ML, Hartiala J et al. (1994). Pre-excitation syndrome in Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet* 344, 857 - 858
- ¹¹⁸ DiMauro S, Hirano M (1998). Mitochondria and heart disease. *Curr Opin Cardiol* 13, 190 - 197
- ¹¹⁹ Zeviani M, Bresolin N, DiDonato S et al. (1990). Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: a new autosomal dominant disease, *Am J Hum Genet* 47, 904 - 914
- ¹²⁰ Johns DR, Threlkeld AB, Hurko O et al. (1993). Multiple mitochondrial DNA deletions in myo-neuro-gastrointestinal encephalopathy syndrome. *Am J Ophthalmol* 115, 108 - 109
- ¹²¹ Mita S, Rizzuto R, Schon EA et al. (1990). Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 18, 561 - 567
- ¹²² Johns DR, Rutledge SL, Hurko O et al. (1989). Directly repeated sequences associated with pathogenic mitochondrial DNA deletions. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8059 - 8062
- ¹²³ Wei YH (1998). Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in aging and diseases: an emerging paradigm of gerontology and medicine. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 22, 55 - 67
- ¹²⁴ Larsson NG, Holme E, Tulinius M et al. (1990). Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre Syndrome. *Pediatr Res* 28, 131 - 136
- ¹²⁵ Reynier P, Malthiery Y (1995). Accumulation of deletions in mtDNA during tissue aging: analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 59 - 67
- ¹²⁶ Yen TC, Su JH, Wie YH et al. (1991). Ageing-associated 5 kb deletion in human liver mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 124 - 131

-
- ¹²⁷ Chinnery PF, Howell N, Turnbull DM et al. (1999). Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity. *J Med Genet* 36, 505 - 510
- ¹²⁸ Torroni A, Petrozzi M, Scozzari R et al. (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, 1107 - 1121
- ¹²⁹ Torroni A, Wallace C (1994). Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J Bioenerg Biomembr* 26, 261 - 271
- ¹³⁰ Oostra RJ, Bolhuis PA, Bleeker-Wagemakers EM et al. (1994). Leber's hereditary optic neuropathy: correlations between mitochondrial genotype and visual outcome. *J Med Genet* 31, 280 - 286
- ¹³¹ Schon EA, Bonilla E, DiMauro S (1997). Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29, 131 - 149
- ¹³² Howell N, Kubacka I, Mackey D et al. (1995). Phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes from Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Genetics* 140, 285 - 302
- ¹³³ Wallace DC (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8739 - 8746
- ¹³⁴ Hofmann S, Bezold R, Gerbitz KD et al. (1997). Disease relevance of the so-called secondary Leber hereditary optic neuropathy mutations. *Am J Hum Genet* 60, 1539 - 1542
- ¹³⁵ Krapko K, Bodyak N, Wei JY et al. (1999). Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res* 27, 2434 - 2441
- ¹³⁶ Kovalenko SA, Kopsidas G, Linnane AW et al. (1997). Deltoid human muscle mtDNA is extensively rearranged in old age subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 147 - 152
- ¹³⁷ Kovachenko SA, Kopsidas G, Linnane AW et al. (1998). The age-associated decrease in the amount of amplifiable full-length mitochondrial DNA in human skeletal muscle. *Biochem Mol Biol Int* 46, 1233 - 1241
- ¹³⁸ mündliche Mitteilung von DC Wallace, GBM-Herbsttagung in Hamburg, 07.09.1999
- ¹³⁹ Moslemi AR, Lindberg C, Oldfors A (1997). Analysis of multiple mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. *Hum Mutat* 10 (5), 381 - 386
- ¹⁴⁰ Oldfors A, Moslemi AR, Lindberg C et al. (1995). Mitochondrial DNA deletions in muscle fibers in inclusion body myositis. *J Neuropath Exp Neurol* 54, 581 - 587

-
- ¹⁴¹ Checcarelli N, Prella A, Scarlato G et al. (1994). Multiple deletions of mitochondrial DNA in sporadic and atypical cases of encephalomyopathy. *J Neurol Sci* 123, 74 - 79
- ¹⁴² Reynier P, Pellissier JF, Malthiery Y et al. (1994). Multiple deletions of the mitochondrial DNA in polymyalgia rheumatica. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 375 - 380
- ¹⁴³ Wells RD, Collier DA, Hanvey JC et al. (1988). The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine.oligopyrimidine sequences. *FASEB J* 2, 2939-2949
- ¹⁴⁴ Johns DR, Comblath DR (1991). Molecular insight into the asymmetric distribution of pathogenetic human mitochondrial DNA deletions. *Biochem Biophys Res Commun* 174, 244-250
- ¹⁴⁵ Miyabayashi S, Hanamizu H, Horai S et al. (1991). A new type of mitochondrial DNA deletion in patients with encephalomyopathy. *J Inher Metab Dis* 14, 805 - 812
- ¹⁴⁶ Ballinger SW, Shoffner JM, Wallace DC et al. (1992). Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Gen* 1, 11 - 15
- ¹⁴⁷ De Massy B, Fayet O, Kogoma T (1984). Multiple origin usage for DNA replication in *sdrA* (*rnh*) mutants of *Escherichia coli* K-12. Initiation in the absence of *oriC*. *J Mol Biol* 178 (2), 227 - 236
- ¹⁴⁸ Hayakawa M, Katsumata K, Ozawa T et al. (1995). Mitochondrial DNA minicircles, lacking replication origins, exist in the cardiac muscle of a young normal subject. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 952 - 960
- ¹⁴⁹ Wallace DC (1992). Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?. *Science* 256, 628 - 632
- ¹⁵⁰ Richter C, Park JW, Ames BN (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6465 - 6467
- ¹⁵¹ Wallace DC (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 61, 1175 - 1212
- ¹⁵² Luft R (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8731 - 8738
- ¹⁵³ Tews DS, Goebel HH (1998). Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin Immunol Immunopathol* 87, 240 - 247
- ¹⁵⁴ Askanas V, Engel WK (1998). Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 10, 530 - 542
- ¹⁵⁵ Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 265, 4718 - 4721

-
- ¹⁵⁶ Ballinger SW, Shoffner JM, Wallace DC (1994). In: Current topics in bioenergetics, molecular basis of mitochondrial pathology, Vol. 17. CP Lee, ed. (San Diego, Academic Press), pp. 59 - 98
- ¹⁵⁷ Zanssen S, Molnar M, Buse G et al. (1997). Multiple mitochondrial tRNA^{Leu[UUR]} mutations associated with infantile myopathy. Mol Cell Biochem 174, 231 - 236
- ¹⁵⁸ Hayashi K, Yandell DW (1993). How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mutat 2, 338 - 346
- ¹⁵⁹ Orita M, Iwahana H, Sekiya T et al. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 86, 2766 - 2770
- ¹⁶⁰ Barros F, Lareu MV, Carracedo A et al. (1997). Rapid and enhanced detection of mitochondrial DNA variation using single-strand conformation analysis of superposed restriction enzyme fragments from polymerase chain reaction-amplified products. Electrophoresis 18, 52 - 54
- ¹⁶¹ Guldberg P, Güttler F (1993). A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res 21, 2261 – 2262

Danksagung

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

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Buse danke ich für das freundliche Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Biochemie danke ich für die freundliche Zusammenarbeit:

- Frau Dr. S. Zanssen für die intensive Betreuung während meiner Zeit im Labor
- Herrn Dr. T. Soulimane für seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit
- Herrn C. Haverkamp für die Hilfestellung bei dem Umgang mit neuen Computeranwendungen
- Frau S. Anglmayer, Herrn B. Lennartz, Herrn M. Matthes, Herr L. Nothdurft, Frau A. Schell und Frau S. Thissen für eine gute Zusammenarbeit

Frau A. Küster danke ich für die Einführung in das Arbeiten mit dem Abi Prism 310 Sequenzer.

Ein besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung und Ermutigung in der Zeit meiner Promotion.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Bank
Vorname:	Corinna Fee
Geburtsdatum:	16.07.1973
Geburtsort:	Aachen
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Konfession:	römisch - katholisch

Ausbildung:

Schulausbildung:

1979 – 1983	Gemeinschaftsgrundschule Grünthalstraße, Stolberg
1983 – 1992	Ritzefeld-Gymnasium, Stolberg
1989 – 1990	High-School-Jahr in San Antonio, Texas, Abschluß: High School Diploma
1992	Abitur

Hochschulausbildung:

1992 – 1994	Studium der Rechtswissenschaften an der Universität zu Köln (Grundstudium abgeschlossen)
1994 – 2002	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
August 1996	Ärztliche Vorprüfung
August 1997	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dez 1997 – März 1999	ganztägige Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie bei Prof. Dr. G. Buse an der RWTH Aachen
März 2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Herbst 2001 – Herbst 2002	Praktisches Jahr am Bethlehem-Krankenhaus in Stolberg
November 2002	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung