

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Zierz

**Quantifizierung myohistologischer Mitochondrienveränderungen bei  
Mitochondriopathien**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Maximilian Anheier

geboren am 15.04.1979 in Düsseldorf

Betreuer: Prof. Dr. Marcus Deschauer

Gutachter/Gutachterin:   1. Prof. Dr. Deschauer  
                                  2. Prof. Dr. Marwrin  
                                  3. Prof. Dr. Vorgerd

02.11.2010

23.11.2011

Meinen Eltern

Mitochondriopathien sind eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die auf Defekten der mitochondrialen Atmungskette beruhen. Klinisch imponieren Mitochondriopathien als Multisystemerkrankungen mit sehr unterschiedlichen Symptomen, wobei insbesondere die Muskulatur und das Nervensystem betroffen sind. Die Diagnosestellung einer Mitochondriopathie ist aufgrund der Heterogenität der Erkrankung schwierig. In der Muskelbiopsie zeigen diese Patienten typischerweise Cytochrom-c-Oxidase negative Zellen in der kombiniert sequentiellen COX-SDH Färbung sowie Ragged-red Fasern in der modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung. Diese Veränderungen sind jedoch auch bei gesunden älteren Patienten sowie Patienten mit anderen neuromuskulären Erkrankungen, z.B. Myositiden und der amyotrophen Lateralsklerose beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Muskelpräparate von Patienten mit genetisch gesicherten Mitochondriopathien, Myositis, amyotropher Lateralsklerose sowie gesunder Kontrollen untersucht und die myohistologischen Veränderungen in der modifizierten Gomori-Trichrom-Färbung sowie der kombiniert sequentiellen COX-SDH Färbung quantifiziert.

Es zeigte sich, dass Cytochrom-c-Oxidase negative Fasern und Ragged-red Fasern ein sensitiver Marker sind, um eine Mitochondriopathie zu diagnostizieren (Sensitivität jeweils 0,86). Ragged-red Fasern haben des Weiteren eine hohe Spezifität (0,94) für Mitochondriopathien. Da die Cytochrom-c-Oxidase negativen Fasern nicht sehr spezifisch sind, dürfen sie nicht das alleinige Kriterium zur Diagnosestellung sein. Des Weiteren wurde beobachtet, dass auch die untersuchten gesunden Kontrollen mit zunehmendem Alter einige CNF zeigten (0,14 % CNF, 0,01% RRF), bei den Patienten mit Mitochondriopathien konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Anzahl der RRF und CNF gezeigt werden. Bei den untersuchten Patienten mit Myositiden (4,46 % CNF, 0,38 % RRF) konnten mehr CNF und RRF beobachtet werden als bei den gesunden Kontrollen, bei den Patienten mit ALS (0,19 % CNF, 0 % RRF) konnte kein Unterschied zu den gesunden Kontrollen gezeigt werden. Des Weiteren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der CNF und RRF sowie dem Paresegrad des biopsierten Muskels gezeigt werden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Übersicht	1
1.2	Aufbau, Funktion und biochemische Grundlagen der Mitochondrien	1
1.3	Genetik der Mitochondrien	2
1.4	Symptomatik von Mitochondriopathien	4
1.4.1	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie	6
1.4.2	Kearns-Sayre-Syndrom	6
1.4.3	MELAS-Syndrom	7
1.4.4	MERRF-Syndrom	7
1.4.5	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie	7
1.4.6	NARP	8
1.4.7	Leigh-Syndrom	8
1.4.8	MNGIE-Syndrom	9
1.5	Neurodegenerative Erkrankungen und Mitochondriopathien	9
1.6	Diagnostik	9
1.6.1	Anamnese und klinisch neurologische Untersuchung	10
1.6.2	Laborchemische Untersuchungen	10
1.6.3	Elektrophysiologische Untersuchungen	10
1.6.4	Zerebrale Bildgebung	11
1.6.5	Myohistologische Veränderungen	11
1.6.6	Molekulargenetische Diagnostik	16
1.7	Therapie von Mitochondriopathien	17
1.8	Ziele und Fragestellung der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Materialien	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Technik der Biopsie	21
2.2.2	Anfertigung der Schnitte	21
2.2.3	Modifizierte GOMORI-TRICHROM-Färbung	21
2.2.4	Cytochrom-c-Oxidase Reaktion	22

2.2.5	Arbeiten mit Axio-Vision	23
2.2.6	Kriterien für die Auswertung	23
2.3	Ein- und Ausschlusskriterien	24
2.3.1	Kriterien für die Patienten mit Mitochondriopathien	24
2.3.2	Kriterien für die gesunden Kontrollen	24
2.3.3	Kriterien für Patienten mit Myositis	25
2.3.4	Kriterien für Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose	25
2.4	Untersuchtes Patientengut	25
2.4.1	Patienten mit der Punktmutation 3243A>G	25
2.4.2	Patienten mit weiteren Punktmutationen	25
2.4.3	Patienten mit singulären Deletionen	25
2.4.4	Patienten mit multiplen Deletionen	26
2.4.5	Gesunde Kontrollen	26
2.4.6	Patienten mit Myositis	26
2.4.7	Patienten mit ALS	26
2.5	Statistik	
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	Patienten mit der Punktmutation 3243A>G der mtDNA	27
3.2	Patienten mit weiteren Punktmutationen der mtDNA	28
3.3	Patienten mit singulären Deletionen der mtDNA	29
3.4	Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA	31
3.5	Auswertungen der gesunden Kontrollen	33
3.6	Patienten mit Myositis	35
3.7	Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose	37
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
4.1	Beziehungen zwischen dem Alter und der Anzahl der betroffenen Muskelfasern	44
4.1.1	Vergleich der CNF und RRF bei Patienten mit Mitochondriopathien ≥ 50 Jahre und < 50 Jahre	46
4.2	Vergleich der CNF und RRF in paretischen und nichtparetischen Muskeln bei Patienten mit Mitochondriopathien	49

4.2.1	Vergleich der CNF in paretischen und nichtparetischen Muskeln	49
4.2.2	Vergleich der RRF in paretischen und nichtparetischen Muskeln	50
4.3	Diagnosestellung einer Mitochondriopathie über die Muskelbiopsie	51
4.4	Vergleich der myohistologischen Veränderungen der Patienten mit Myositis und der gesunden Kontrollen	56
4.5	Myohistologische Veränderungen bei Patienten mit ALS	58
4.6	Problematik von Ragged-red like- und intermediären Fasern	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>68</b>

**Tabellarischer Lebenslauf**

**Selbstständigkeitserklärung**

**Danksagung**

## Abkürzungen

ADP	Adenosindisphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
CNF	Cytochrom-c-Oxidase negative Fasern
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CPF	Cytochrom-c-Oxidase positive Fasern
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DM	Diabetes mellitus
IDDM	insulinpflichtiger Diabetes mellitus
IBM	Einschlusskörpermyositis
IM	intermediäre Fasern
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa
M	Musculus
MC	Mitochondriale Enzephalomyopathie
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Episoden
MERRF	Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Ragged-red-Fasern
min	Minute
Mit.	Mittelwert
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MNGIE	myo-, neuro- und gastrointestinale Enzephalopathie
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	mitochondriale DNA
n.a.	nicht auswertbar
nDNA	nukleäre DNA

NIDDM	nicht insulinpflichtiger Diabetes mellitus
PNP	Polyneuropathie
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RRF	Ragged-red-Fasern
SD	Standardabweichung
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SSF	subsarkolemmal fuchsinophile Fasern
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure

### 1 Einleitung

#### 1.1 Übersicht

Mitochondriopathien sind eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die auf Defekten der mitochondrialen Atmungskette beruhen. Klinisch imponieren sie als Multisystemerkrankungen mit sehr unterschiedlichen Symptomen, wobei insbesondere die Muskulatur und das Nervensystem betroffen sind. Daher wurde auch der Begriff mitochondriale Enzephalomyopathie geprägt. Zusätzlich zur Muskelschwäche werden häufig Symptome wie Krampfanfälle, Ataxie, Demenz, Kardiomyopathie, Reizleitungsstörungen des Herzens und Störungen des Endokriniums beobachtet.

Die Mitochondrien werden auch als die „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da in der Atmungskette der Mitochondrien das energiereiche Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird. ATP ist für die meisten Aufgaben der Zelle als Energielieferant nötig, so werden zum Beispiel die Muskelkontraktion, der Aufbau von Ionengradienten, die Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden und Kohlehydraten durch ATP getrieben [1].

#### 1.2 Aufbau, Funktion und biochemische Grundlagen der Mitochondrien

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene Organellen, die in allen Zellen des Körpers mit Ausnahme der Erythrozyten vorkommen. In Muskelzellen kommen bis zu 10000 Mitochondrien pro Zelle vor, die durchschnittliche Anzahl pro Zelle beträgt 500-2000. Insgesamt bestehen Mitochondrien aus vier Kompartimenten: Die äußere Membran, die innere Membran, der intramembranöse Raum sowie die Matrix [2].

Ihre wichtigste Aufgabe ist die Bereitstellung des energiereichen Adenosintriphosphats (ATP), welches für beinahe alle Funktionen der Zelle unentbehrlich ist. ATP wird in der Atmungskette an der Innenmembran der Mitochondrien gebildet. Die Atmungskette besteht aus den Enzymkomplexen I – V, durch die an der Innenmembran der Mitochondrien ein elektrochemischer

Protonengradient aufgebaut wird (Komplex I – IV). Der Komplex V (ATP–Synthase) nutzt diesen Gradienten zur oxidativen Phosphorylierung von ADP und Phosphat zu ATP [3].

Neben der Produktion von energiereichem ATP haben die Mitochondrien noch weitere Funktionen. So spielen sie zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Apoptose [4] und der Wärmeproduktion [5] .

### 1.3 Genetik der Mitochondrien

Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom. Die mitochondriale DNA besteht aus einer ringförmigen Doppelstrang-DNA von 16569 Basenpaaren, welche bereits 1981 komplett entschlüsselt werden konnte [6]. Insgesamt 13 Untereinheiten der Atmungskette werden durch die mtDNA kodiert, dazu zwei rRNA-Gene und 22 tRNA-Gene. Insgesamt werden 20 % der Proteine der Atmungskette durch die mtDNA kodiert, der Rest wird durch die Kern DNA kodiert. Dies erklärt die verschiedenen Modi der Vererbung, so ist ein maternaler als auch ein autosomaler Erbgang möglich. Der maternale Erbgang erklärt sich daraus, dass eine Oozyte sehr viel mtDNA enthält, ein Spermium hingegen nur sehr wenig, so dass der geringe Anteil der paternalen mtDNA kaum Einfluss auf die Vererbung hat. Die Sequenz der mitochondrialen DNA zeigt eine ausgeprägte Ökonomie, da es nur wenige nichtkodierende Basen zwischen den Genen gibt.

Die nichtkodierende Region der mtDNA, die so genannte D-loop Region ist 1,1 kb lang und der unbeständigste Teil des Genoms. Sie enthält regulierende Signale für die Replikation und Transkription [7].

Tabelle 1: Die Komplexe der Atmungskette

Komplex	Enzymaktivität	Untereinheiten	von mtDNA kodierte Untereinheiten
Komplex I	NADH-Coenzym-Q-Reduktase	41	7
Komplex II	Succinat-Coenzym-Q-Reduktase	4	-
Komplex III	Coenzym-Q-Cytochrom-c-Reduktase	11	1
Komplex IV	Cytochrom-c-Oxidase	13	3
Komplex V	ATP-Synthase	14	2

# 1 Einleitung

In der Zelle liegen jeweils tausende von Kopien der mtDNA vor. Bei einem gesunden Menschen liegen alle Kopien der mtDNA in derselben Form vor, was als Homoplasmie bezeichnet wird. Bei Patienten mit Mitochondriopathien findet man neben der normalen ursprünglichen Wildtyp-DNA auch mtDNA mit Mutationen. Das Vorliegen dieser beiden DNA-Typen nebeneinander in einer Zelle wird als Heteroplasmie bezeichnet und kann in verschiedenen Geweben und Patienten unterschiedlich sein [1].

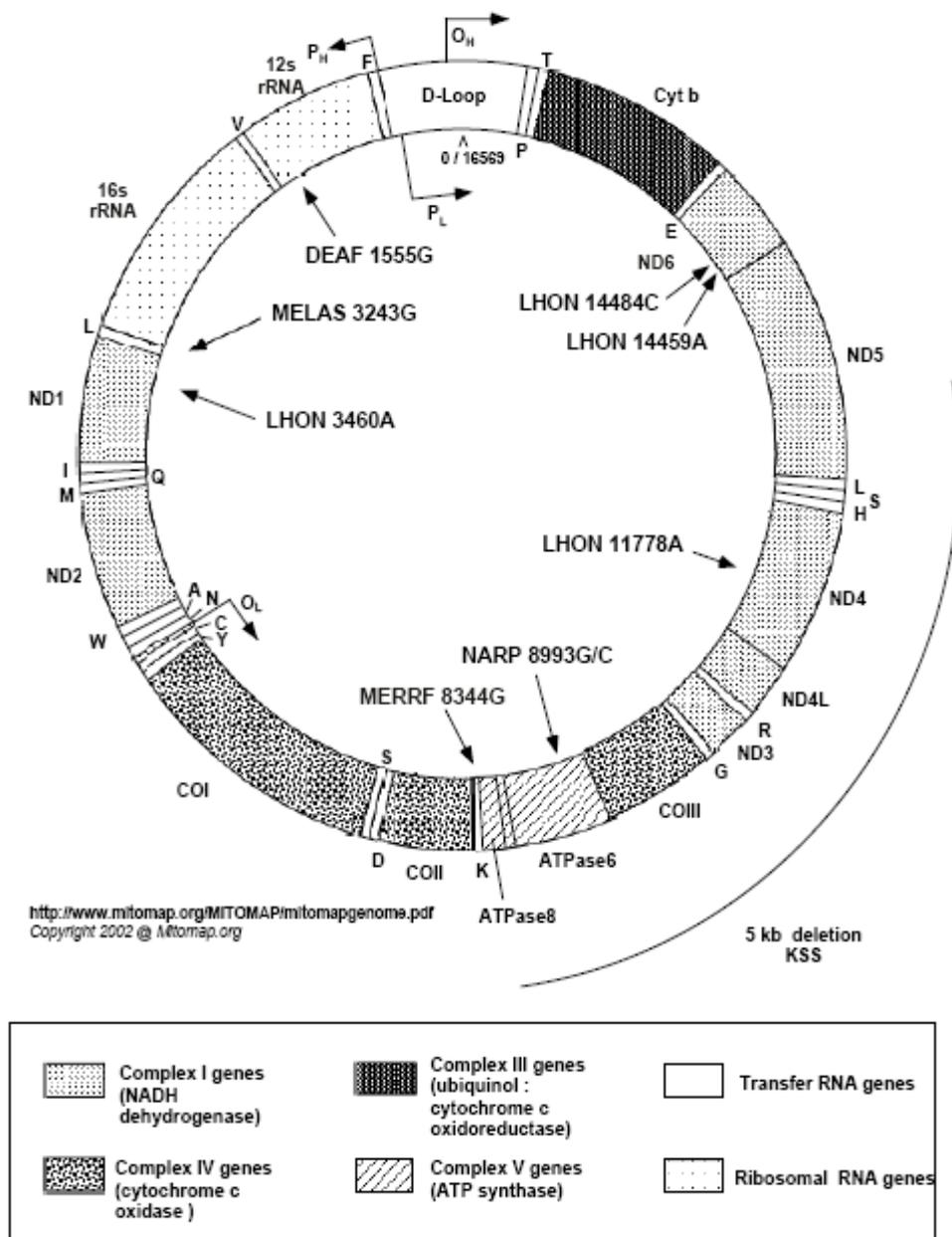


Abbildung 1: Mitochondriale DNA mit Genverteilung und Mutationen (Quelle: Mitomap)

Mitochondriopathien werden durch Punktmutationen, Deletionen oder auch Deletionen der mitochondrialen DNA verursacht. Bei den Deletionen muss zwischen singulären und multiplen Deletionen unterschieden werden [8, 9]. Bisher sind weit über 200 Punktmutationen und Deletionen nachgewiesen worden.

Die mitochondriale DNA hat eine Mutationsrate, die gegenüber der Kern DNA um zehn – bis zwanzigfach erhöht ist. Für die exakte Anordnung der Komplexe der Atmungskette werden annähernd 60 Proteine benötigt, die durch die Kern DNA kodiert werden. Zu diesen 60 Proteinen der Atmungskette kodiert die Kern DNA für annähernd weitere 1000 Proteine der Mitochondrien, die nicht Bestandteil der Atmungskette sind [10].

Mutationen von nukleären Genen, die für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen DNA wichtig sind, zeigen ein breites Spektrum klinischer Phänotypen. Das Spektrum reicht von schwerer Enzephalopathie und schweren Leberfunktionsstörungen in der Kindheit bis zu chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie, Ataxie, Myopathie und parkinsonähnlichen Symptomen [11]. Defekte in diesen nukleären Genen führen sekundär zu multiplen Deletionen der mtDNA oder zu einer Depletion der mtDNA (Defekte der intergenomischen Kommunikation). Bei den meisten Patienten mit Defekten im nukleären Gen liegt dieser im POLG1 Gen [12].

### 1.4 Symptomatik von Mitochondriopathien

Wie bereits erwähnt können Mitochondriopathien zu einer Vielfalt von Symptomen führen, da verschiedene Organsysteme betroffen sein können. Am häufigsten sind Muskulatur und Nervensystem betroffen, was man sich durch den hohen Energiebedarf dieser Zellen erklärt.

Der Erkrankungsbeginn reicht vom Kindesalter bis zum jungen Erwachsenenalter. Mitochondriopathien manifestieren sich häufig als chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO), welche durch eine Ptosis und Augenbewegungsstörungen gekennzeichnet ist. Häufig weisen Patienten mit CPEO eine Multiorganbeteiligung auf, welche CPEO plus genannt wird [13]. Über die Erstmanifestation einer Mitochondriopathie im späten Erwachsenenalter gibt es bisher nur wenige Fallberichte. So gibt es z.B. den Fall einer Erstmanifestation einer mitochondrialen

Enzephalomyopathie bei einem 67 Jahre alten Patienten, der eine Punktmutation 11777C>A aufwies [14].

Eine Klassifizierung der Mitochondriopathien ist schwierig, da eine Mutation zu verschiedenen Phänotypen führen kann. Auf der anderen Seite können bei einem bestimmten Phänotyp verschiedene Mutationen vorliegen. So überschneiden sich beispielsweise einige Symptome des MELAS- und MERRF Syndroms [15].

Bei den Mitochondriopathien gibt es einige charakteristische Symptomkombinationen, die als Syndrome beschrieben sind. Im Folgenden werden die wichtigsten Symptomkombinationen zusammengefasst.

Tabelle 2: Organbeteiligung bei mitochondrialen Enzephalomyopathien

<b>Organbeteiligung bei mitochondrialen Enzephalomyopathien</b>	
• Skelettmuskel	Myopathie, generalisierte Muskelhypotonie, Belastungsintoleranz, Rhabdomyolyse
• ZNS	Ataxie, Hirnstammsymptomatik, Entwicklungsretardierung, Epilepsie, Myoklonien, Demenz, periphere Neuropathie, Migräne, Dystonie, schlaganfallähnliche Attacken, Basalgangliendgeneration, Basalganglienverkalkung
• Auge	Ptosis, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie, Katarakt, Nystagmus, Retinopathie
• Ohr	Innenohrschwerhörigkeit
• Herz	Kardiomyopathie (hypertroph, dilatativ), Herzreizeleitungsstörungen
• Endokrinium	Diabetes mellitus, Hyperparathyreoidismus

### 1.4.1 Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)

Die schon erwähnte chronisch progressive externe Ophthalmoplegie ist die häufigste klinische Manifestation einer mtDNA-Mutation. Sie ist charakterisiert durch eine Lähmung der äußeren Augenmuskeln sowie eine Ptosis. Später können sich dazu weitere Symptome entwickeln, wie eine retinale Degeneration, Taubheit, Muskelschwäche, Störungen des Endokriniums und Kardiomyopathie [13]. Erkrankungsbeginn ist zwischen dem 10. und 40. Lebensjahr, führendes Erstsymptom ist meist eine Ptosis. Molekulargenetisch finden sich meist weiträumige singuläre Deletionen der mtDNA, dabei weisen etwa 40 % der Patienten eine Deletion von 4977 Basenpaaren („common deletion“) auf. Des Weiteren können Punktmutationen der mtDNA vorliegen, insbesondere an Position 3243A>G. Zu Beginn der Erkrankung gibt es keine klinischen, morphologischen oder molekularen Charakteristiken, die voraussagen, ob CPEO als isoliertes Symptom verbleibt oder Teil einer Multisystemerkrankung wird [16]. Bei autosomal-dominantem und rezessivem Erbgang wurden multiple Deletionen der mitochondrialen DNA gefunden mit ursächlichem Gendefekt in der nDNA. Bei CPEO-Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA wurden bisher Mutationen in sieben nukleären Genen identifiziert, welche eine wichtige Rolle für die Replikation von mtDNA spielen. MtDNA Polymerase Gamma 1 und 2 (POLG1/2), C10Orf2 (PEO1 oder Twinkle), Thymidinphosphorylase, Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT1) 1, OPA1 und RRM2B [17].

### 1.4.2 Kearns-Sayre-Syndrom

Das Kearns-Sayre-Syndrom [18] ist die Trias aus chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie (CPEO), Retinadegeneration und einem Herzblock sowie einem Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr [18]. Die Prognose des Kearns-Sayre-Syndroms ist schlechter als die der CPEO. Die betroffenen Patienten überleben selten das 30. Lebensjahr [5]. In der genetischen Untersuchung der KSS Patienten finden sich meist weiträumige singuläre Deletionen der mtDNA [19].

### 1.4.3 MELAS-Syndrom

Das erstmals 1984 beschriebene MELAS-Syndrom steht für Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden [20]. Der Erkrankungsbeginn ist meist das Kindesalter oder das junge Erwachsenenalter. Als Erstsymptom zeigen sich Krampfanfälle und rezidivierende Kopfschmerzen, die schlaganfallähnlichen Episoden kommen meist später hinzu. Zusätzliche Symptome sind Hörminderung, Diabetes mellitus, Demenz, Ataxie, Optikusatrophie und Belastungsintoleranz.

80 % der Patienten mit dem MELAS-Syndrom tragen die Punktmutation 3243A>G der mtDNA im tRNA-Gen für Leucin. Diese Mutation kann jedoch auch andere Phänotypen zeigen, z.B. CPEO, Muskelsteife oder Hörminderung [21, 22]. Es wurde auch ein Fall beschrieben, in dem eine Mutation in dem POLG1 Gen das klinische Vollbild eines MELAS-Syndrom ausbildete [23].

### 1.4.4 MERRF-Syndrom

Das MERRF-Syndrom steht für Myoklonus Epilepsie mit Ragged-red-Fasern. Es wurde 1980 erstmals beschrieben [24]. Als Leitsymptome zeigen sich Myoklonien, generalisierte Krampfanfälle und eine zerebelläre Ataxie. Die Muskelbiopsie zeigt in der Regel Ragged-red-Fasern, wobei es auch einen beschriebenen Fall gibt, der keine RRF in der Muskelbiopsie zeigt [25] [26]. Weitere Symptome sind denen des MELAS-Syndrom sehr ähnlich, so zeigen sich unter anderem auch hier Hörstörungen und Demenz. Erkrankungsbeginn kann sowohl die Kindheit, als auch das Erwachsenenalter sein.

80 % der Patienten mit dem MERRF-Syndrom zeigen eine Punktmutation der mtDNA an der Nukleotidposition 8344 im tRNA-Gen für Lysin [27]. Aber auch die oben beschriebene Punktmutation an der Position 3243 kann zum MERRF-Syndrom führen [28].

### 1.4.5 Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON)

Die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie ist die häufigste Ursache für die Erblindung ansonsten gesunder junger Männer. Krankheitsbeginn ist meist die späte Jugend oder das frühe Erwachsenenalter. In einigen seltenen Fällen sind auch andere Gewebe, wie Skelettmuskulatur, Herz und Hirn ebenso betroffen.

Über 95 % der Leberschen hereditären Optikusneuropathie sind Ursache von drei Punktmutationen der mtDNA in Komplex I-Untereinheiten. Dies sind im einzelnen die Mutationen 11778G>A, 3460G>A, sowie 14484T>C [29]. Sie treten in einem Verhältnis von 7 : 1 : 2 auf. Das Verhältnis von betroffenen Männern zu betroffenen Frauen beträgt für die einzelnen Mutationen 2,5 : 1 (11778), 2 : 1 (3460) und 5,7 : 1 (14484). Nur 15 % der Erkrankten sind Frauen. Nur 50 % der mutationstragenden Männer und 10 % der Frauen entwickeln die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie [30].

Histopathologische Untersuchungen zeigen typischerweise eine Verminderung der retinalen Ganglienzellen sowie einen beeinträchtigten axonalen Transport der Mitochondrien.

### 1.4.6 NARP (Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa)

Klinisch zeigt sich die Erkrankung durch eine Neuropathie (sensorische Polyneuropathie), Ataxie und Retinitis pigmentosa [31]. Zusätzlich finden sich Entwicklungsstörungen, epileptische Anfälle, eine neurogene Muskelschwäche sowie Demenz.

NARP tritt im Erwachsenenalter auf. Es beruht auf einer Punktmutation der mtDNA an Nukleotidposition 8993 im ATPase 6 Gen.

### 1.4.7 Leigh-Syndrom

Das Leigh-Syndrom ist auch bekannt als subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie. Sie wurde von Leigh 1951 erstmals beschrieben und ist gekennzeichnet durch Muskelschwäche und Muskelhypotonie, Krampfanfälle, Entwicklungsverzögerung und Laktatazidose [32]. Zusätzliche Symptome können Pyramidenbahnzeichen, Optikusatrophie, Nystagmus, Retinitis pigmentosa, CPEO und Erbrechen sein. Nach Erkrankungsbeginn, meist Kinder in den ersten beiden Lebensjahren, es kommen jedoch auch Fälle im Erwachsenenalter vor, führt das Leigh-Syndrom innerhalb von vier Jahren zum Tod.

Das Leigh-Syndrom wird verursacht durch Mutationen in der mtDNA oder auch in Genen der Kern DNA, die für die Atmungskette kodieren. Relativ häufig findet sich die Punktmutation 8993 der mtDNA im ATPase 6 Gen, die auch zum NARP-Syndrom führen kann.

### 1.4.8 MNGIE-Syndrom

Das MNGIE-Syndrom steht für myo-, neuro- und gastrointestinale Enzephalopathie. Hier stehen neben Ophthalmoplegie, Neuropathie und Leukenzephalopathie vor allem Beschwerden des Gastrointestinaltraktes im Vordergrund. Dies sind vor allem Darmmotilitätsstörungen, Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen [33].

Das MNGIE-Syndrom beruht auf Mutationen im Thymidinphosphorylase-Gen, die zu multiplen Deletionen der mtDNA oder einer Depletion der mtDNA führen.

### 1.5 Neurodegenerative Erkrankungen und Mitochondriopathien

In der letzten Zeit wird vermehrt der Zusammenhang zwischen Defekten der Mitochondrien und neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. So wurde bei Patienten mit Parkinson ein Defekt im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette gefunden [34]. Atmungskettendefekte wurden des Weiteren auch gefunden bei Patienten mit Chorea Huntington, hier in den Komplexen II und III der Atmungskette, sowie bei Patienten mit Friedreich Ataxie in den Komplexen I und III der Atmungskette [35]. Bei Friedreich Ataxie und Chorea Huntington beruht der Atmungskettendefekt auf einer primären Mutation der Kern DNA [36], sie sind hier also das Ziel eines biochemischen Zelldefekts, der sich in einem Defekt der Mitochondrien äußert.

Auch bei Patienten mit spastischer Spinalparalyse [37], ALS, Multipler Sklerose und Morbus Alzheimer werden Defekte der Mitochondrien als Ursache der Erkrankungen diskutiert [38]. So führt eine Minderfunktion der Mitochondrien zu einer Reihe schwerer Konsequenzen für die Zellfunktion, wie zum Beispiel dem Generieren freier Radikale und einer Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrien und in Folge dessen zu einer erhöhten Exotoxizität [39].

### 1.6 Diagnostik

Die Diagnose einer mitochondrialen Enzephalomyopathie ist aufgrund der genetischen Heterogenität, der verschiedenen Phänotypen und des Fehlens klarer diagnostischer Kriterien schwierig. Die Untersuchung von Patienten mit möglichen

Mitochondriopathien beruht auf einer breit angelegten Diagnostik. Neben Anamnese und klinisch neurologischer Untersuchung spielen laborchemische Untersuchungen, bildgebende Verfahren, elektrophysiologische Untersuchungen, molekulargenetische und natürlich myohistologische Untersuchungen eine Rolle [40].

### 1.6.1 Anamnese und klinisch neurologische Untersuchung

Die am häufigsten von Patienten geäußerten muskulären Beschwerden sind Ptosis und Belastungsintoleranz. Es muss im Weiteren darauf geachtet werden, auch die Familienanamnese möglichst vollständig zu erheben.

Die klinisch neurologische Untersuchung kann folgende Symptome zeigen: Kleinwuchs, geistige Retardierung, Demenz, Bewusstseinsstörung, eine verminderte Sehschärfe, Doppelbilder, Gesichtsfeldausfälle, Nystagmus, Hypakusis, Dysarthrie, polyneuropathisches Syndrom, Myoklonien, Rigor, Dystonie, Ataxie, Brady- oder Dysdiadochokinese [41].

### 1.6.2 Laborchemische Untersuchungen

In den laborchemischen Untersuchungen wiesen etwa die Hälfte der Patienten mit Mitochondriopathien einen erhöhten Ruhelaktatwert im Serum auf. In der Liquoruntersuchung zeigen bei Vorliegen einer Enzephalopathie zweidrittel eine Erhöhung des Laktats [42]. Fast 80% der Patienten mit CPEO zeigen im Fahrradbelastungstest einen Laktatanstieg im Serum, der bei gesunden Patienten ausbleibt [43]. Der Laktatanstieg beruht darauf, dass in defekten Mitochondrien Pyruvat nicht ausreichend oxidiert werden kann und durch die Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert wird.

Wegen der nicht seltenen Beteiligung des endokrinen Systems empfiehlt sich hier eine breit angelegte Laboruntersuchung mit Bestimmung von Glukose im Serum, die Durchführung eines oralen Glukosetoleranztestes und Bestimmung der Schilddrüsenparameter. Auch die Leberenzyme und Kreatinkinase können erhöht sein [44].

### 1.6.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

Das EMG kann bei Patienten mit Mitochondriopathien sowohl ein myopathisches, als auch ein neuropathisches Muster zeigen. Insgesamt zeigt das EMG jedoch nur bei ungefähr 50 % der Fälle mit Mitochondriopathien ein pathologisches Muster [45].

Das EEG zeigt manchmal epilepsietypische Potentiale und kann zur Identifizierung einer subklinischen ZNS-Beteiligung beitragen [42]. Insgesamt ist es jedoch wenig spezifisch zur Diagnosesicherung bei Mitochondriopathien.

### 1.6.4 Zerebrale Bildgebung

Auch in der bildgebenden Diagnostik mittels CT und MRT zeigen Mitochondriopathien viele unterschiedliche Pathologien. Im CT zeigen sich am häufigsten Verkalkungen der Basalganglien und hypodense Strukturen im Bereich der Basalganglien. Das MRT zeigt vor allem hyperintense Läsionen der weißen Substanz, der Pyramidenbahn und des extrapyramidalen Systems ohne spezifisches Verteilungsmuster [46]. Obwohl unspezifisch sollten solche Befunde auf eine Mitochondriopathie aufmerksam machen oder eine subklinische ZNS-Beteiligung einer Mitochondriopathie aufzeigen [47].

### 1.6.5 Myohistologische Veränderungen

Die Muskelbiopsie gilt als eines der besten diagnostischen Kriterien zur Diagnosesicherung einer mitochondrialen Enzephalomyopathie [48]. Sie kann diagnostische Hinweise liefern, auch wenn der Skelettmuskel klinisch nicht betroffen ist.

Die histologischen und histochemischen Untersuchungen am gefrorenen Muskelpräparat beinhalten in der Regel die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung, die Succinat-Dehydrogenase-Färbung, die Nikotinamid Adenin Dinucleotid-Tetrazolin Reduktase (NADH-TR) und die kombinierte sequentielle Cytochrom-c-Oxidase-SDH Färbung (COX-SDH).

Die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung wird angewandt, um Mitochondrien im Muskelpräparat zu zeigen. Sie wurde von Engel und Cunningham 1963 etabliert. Die Akkumulation der Mitochondrien, das sarkoplasmatische Retikulum und das Sarkolemm zeigen sich in der Färbung rot, die Myofibrillen grün und der Kern rot bis rosa [49].

Bei Mitochondriopathien kann die Muskelbiopsie in der modifizierten Gomori-Trichrom-Färbung in unterschiedlichem Ausmaß Ragged-red-Fasern zeigen. Die massive Akkumulation der Mitochondrien führt zu einer starken Rotfärbung der betroffenen Muskelfaser sowie einer zerrissen aussehenden Struktur der Zelle. RRF

haben in der Regel mehr als 80% mutierte mtDNA in der molekulargenetischen Untersuchung [50].

RRF zeigen sich typischerweise bei Patienten mit dem MELAS, MERRF, Kearns-Sayre-Syndrom und Patienten mit CPEO. Bei Patienten mit LHON, NARP, nukleären Defekten und bei Kindern zeigen sich in der Regel keine RRF [51].

Die kombinierte sequentielle COX-SDH-Färbung [52] zeigt bei Patienten mit Mitochondriopathien eine unterschiedliche Anzahl von COX-negativen Fasern. CNF zeigen sich als blaue Muskelfasern im Muskelpräparat. Mosaikartig verteilte CNF über das Muskelpräparat in der COX-SDH-Färbung sind eins der am häufigsten beobachteten Bilder in der Muskelbiopsie. [53].

Das Prinzip der kombinierten sequentiellen COX-SDH Färbung beruht auf der parallelen Aktivität von Cytochrom-c-Oxidase und Succinat-Dehydrogenase in Zellen mit Mitochondrien. Bei der Durchführung der Färbung der Präparate erfolgt zuerst die histochemische Reaktion der COX, anschließend die der SDH. Dabei führt die COX zu einem braunen Reaktionsprodukt, während die SDH zu einem blauen Reaktionsprodukt führt. In gesunden Zellen sind die Mitochondrien mit dem Endprodukt der COX-Reaktion, einem braunen Polymer gesättigt und färben sich entsprechend braun. Daher zeigt die sequentielle Reaktion der Succinat-Dehydrogenase in gesunden Zellen keine blaue Färbung. Dies beruht darauf, dass das Substrat der Reaktion keinen Zugang zu den entsprechenden Stellen im Inneren der Mitochondrien erlangt. In Cytochrom-c-Oxidase fehlerhaften Zellen wird das blaue Produkt der Succinat-Dehydrogenase-Reaktion in die Mitochondrien platziert und die betroffene Zelle färbt sich entsprechend blau [52].

Drei Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase, die den Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette bilden, werden von der mtDNA kodiert. Daher ist die Cytochrom-c-Oxidase Aktivität direkt vom Status der mtDNA abhängig. Die Succinat-Dehydrogenase ist ein Bestandteil des Komplexes II der mitochondrialen Atmungskette, von der alle Untereinheiten von der Kern DNA direkt kodiert werden. Die Succinat-Dehydrogenase Aktivität ist daher nicht von der mtDNA abhängig [54]. Das Vorhandensein von Cytochrom-c-Oxidase negativen Muskelfasern in der Muskelbiopsie, beziehungsweise ein gleichzeitiges starkes Anfärben der Succinat-Dehydrogenase in der selben Muskelfaser, ist ein starker Hinweis auf eine mtDNA

Mutation, die Untereinheiten von Komplex IV der Atmungskette beeinträchtigt [55] [40]. Dazu zählen nicht nur Mutationen in Strukturgenen von Komplex IV der mtDNA sondern auch Mutationen in tRNA-Genen und weiträumige Deletionen der mtDNA.

Bei der Mehrzahl der Mitochondriopathien sind die RRF auch COX-negativ. Dies trifft allerdings nicht auf das MELAS-Syndrom zu, bei dem die RRF COX-positiv sein können [56].

RRF in der modifizierten Gomori-Trichrom-Färbung werden auch im Alter bei gesunden Patienten ohne Hinweis auf eine mitochondriale Erkrankung gefunden [57]. So konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von RRF bei älteren Patienten im Vergleich zu jüngeren signifikant erhöht war. Auch die Anzahl der CNF ist bei älteren Patienten im Vergleich zu jüngeren erhöht.

Als Ursache dafür werden die hohe Mutationsrate der mtDNA, die limitierten Reparatursmechanismen, das Fehlen von Histonen sowie die Generierung freier Radikale an der inneren Mitochondrienmembran angenommen [58].

Einzelne RRF werden auch bei durch Medikamente verursachten Myopathien beschrieben, so bei längerandauernder Zidovudin-Therapie [59].

Bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose zeigten histologische Untersuchungen ebenfalls Veränderungen, die für Mitochondriopathien typisch sind. So wurden bei Patienten mit ALS und bei Patienten mit neurogener Atrophie CNF beobachtet [60]. Diese histologischen Veränderungen werden am ehesten als Ursache einer neurogenen Transformation des Skelettmuskels angenommen. Sie sind nicht für die ALS spezifisch, sondern werden, wie bereits erwähnt, auch bei anderen neurogenen Atrophien beobachtet.

Auch in weiteren neuromuskulären Erkrankungen wurden für Mitochondriopathien spezifische histologische Veränderungen beschrieben. So wurden bei Patienten mit myotoner Dystrophie, Nemalinmyopathie, distaler Myopathie mit „rimmed vacuols“, Gliedergürteldystrophie und bei der Muskeldystrophie vom Typ-Duchenne CNF gefunden. Der Durchschnitt der CNF bei allen Biopsien lag bei 3,6 %. Auch vereinzelte RRF, in der Summe jedoch deutlich weniger als CNF, wurden in allen Gruppen bis auf die Nemalinmyopathie gefunden [61].

Myohistologische Veränderungen, die bei Patienten mit Mitochondriopathien beobachtet werden, wurden auch bei Patienten mit verschiedenen Formen der

Myositis gefunden [62]. So konnte gezeigt werden, dass histologische Auffälligkeiten, die Defekte der mtDNA repräsentieren, bei Patienten mit Einschlusskörpermyositis höher waren als bei gesunden und altersgleichen Kontrollen [57]. Bei einigen Patienten mit Myositis erreichte das Ausmaß an betroffenen Muskelfasern in der histologischen Untersuchung das von Patienten, die aufgrund einer primären Mitochondriopathie untersucht worden waren [63].

In der Literatur wird für Mitochondriopathien eine Einteilung in diagnostische Haupt- und Nebenkriterien vorgenommen, in die auch die Ergebnisse der Muskelbiopsie einfließen [64]. Des Weiteren wird unterschieden zwischen einer definitiven, einer wahrscheinlichen und einer möglichen Diagnose einer Mitochondriopathie. Von einer definitiven Diagnose wird gesprochen, wenn entweder zwei Hauptkriterien oder ein Hauptkriterium zusammen mit zwei Nebenkriterien vorliegen. Von einer wahrscheinlichen Diagnose wird gesprochen, wenn ein Hauptkriterium zusammen mit einem Nebenkriterium vorliegt oder drei Nebenkriterien vorliegen. Eine mögliche Diagnose liegt vor bei einem allein stehend vorliegenden Hauptkriterium oder zwei Nebenkriterien, von denen eins klinisch sein muss [65].

Tabelle 3: diagnostische Hauptkriterien (nach Bernier et al. 2002)

### **Hauptkriterien**

---

#### ***Klinische Kriterien***

Klinisch komplette mitochondriale Enzephalomyopathie oder mitochondriale Zytopathie, die mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt:

- Unerklärte Kombination von multisystemischen Symptomen die pathognomonisch für eine ME ist und mindestens drei der folgenden Symptome beinhaltet: neuropathisch, myopathisch, kardial, renal, hepatisch, endokrin, hämatologisch, ophthalmologisch, dermatologisch oder dysmorph
- Fortschreitende klinische Erkrankung mit Exazerbationen oder
- Eine Familienanamnese, die eine ME anzeigen könnte (mindestens einen mütterlich Verwandten außer der Patient zeigt eine mögliche oder definitive ME)
- Ausschluss anderer metabolischer oder nichtmetabolischer Erkrankungen

---

#### ***Histologische Kriterien***

- > 2 % RRF im Skelettmuskel

---

#### ***Enzymatische Kriterien***

- > 2 % CNF bei Patienten < 50 Jahre
- > 5 % CNF bei Patienten > 50 Jahre
- < 20 % Aktivität eines Atmungskettenkomplexes im Gewebe
- < 30 % Aktivität eines Atmungskettenkomplexes in der Zelle
- < 30 % Aktivität desselben Atmungskettenkomplexes in mehr als 2 Geweben

---

#### ***Funktionale Kriterien***

- ATP-Syntheserate der Fibroblasten > 3 SD unter dem Durchschnitt

---

#### ***Molekulargenetische Kriterien***

- Identifikation einer mtDNA oder Kern Mutation
-

Tabelle 4: diagnostische Nebenkriterien (nach Bernier et al. 2002)

### **Nebenkriterien**

---

#### ***Klinische Kriterien***

- Symptome vereinbar mit einer mitochondrialen Enzephalomyopathie

---

#### ***Histologische Kriterien***

- 1-2 % RRF bei Patienten zwischen 30 und 50 Jahren
- Vorhandensein von RRF bei Patienten < 30 Jahre
- > 2 % subsarcolemmale Kumulation bei Patienten < 16 Jahre
- ausgedehnte elektronenmikroskopische Veränderungen im Gewebe

---

#### ***Enzymatische Kriterien***

- Antikörper basierte Demonstration eines Atmungskettendefektes
- 20 % - 30 % Aktivität eines Atmungskettenkomplexes im Gewebe
- 30 % - 40 % Aktivität eines Atmungskettenkomplexes in der Zelle
- 30 % - 40 % Aktivität desselben Atmungskettenkomplexes in mehr als zwei Geweben

---

#### ***Funktionale Kriterien***

- ATP-Syntheserater der Fibroblasten 2-3 SD unter dem Durchschnitt
- Fibroblasten wachsen nicht auf einem Medium mit Galactose

---

#### ***Molekulargenetische Kriterien***

- Identifikation einer mtDNA oder Kernmutation mit möglicher Pathogenität

---

#### ***Metabolische Kriterien***

- Ein oder mehrere metabolische Indikatoren einer verminderten Atmungskettenfunktion
- 

### 1.6.6 Molekulargenetische Diagnostik

Defekte der mitochondrialen DNA können nur zum Teil aus Blutzellen mittels PCR und Southern-Blot nachgewiesen werden. Nicht immer ist jedoch in den Blutzellen aufgrund des Heteroplasmiegrades die Mutation nachweisbar, so dass DNA aus den betroffenen Organsystemen gewonnen werden sollte, was meist durch eine Muskelbiopsie gelingt. Aus diesen Zellen können dann Deletionen mitochondrialer DNA mittels Southern-Blot oder Long-PCR nachgewiesen werden. Punktmutationen der mitochondrialen DNA können mittels PCR nachgewiesen werden. Negative molekulargenetische Ergebnisse schließen eine Mitochondriopathie nicht aus [41].

### 1.7 Therapie von mitochondrialen Enzephalomyopathien

Bisher ist keine effektive Therapie für Mitochondriopathien bekannt. Dies liegt nicht zuletzt an dem Fehlen entsprechender Tiermodelle, sowie an der Seltenheit der Erkrankung und der Heterogenität der Erkrankung. Einige symptomatische Therapieoptionen haben sich etabliert, so z.B. die chirurgische Behandlung einer Ptosis oder eine medikamentöse Krampfanfallprophylaxe. Diese Verfahren können im Zweifelsfall spezifische Probleme beheben und die Lebensqualität in einigen Fällen verbessern [11]. Des Weiteren ist beschrieben, dass bei MELAS eine Steroidtherapie während einer akuten Exazerbation einen Behandlungserfolg bringen kann [66].

### 1.8 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Mitochondriopathien waren lange Zeit fast nur von akademischem Interesse. Nur wenige Zentren auf der Welt hatten klinische und experimentelle Erfahrung mit Mitochondriopathien. Die Ermangelung einer wirksamen Therapie sowie das Fehlen eines diagnostischen „Goldstandards“ ließen viele Betroffenen undiagnostiziert [67]. Mehrere epidemiologische Studien der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, dass Mitochondriopathien zu den häufigsten genetischen Erkrankungen zählen [68] [69]. So wird die Prävalenz für das MELAS-Syndrom in England mit 12,5/100.000 und in Finnland mit 16,3/100.000 Bewohner angegeben. In einer neueren Studie aus Australien wird die Prävalenz der Mutation 3243A>G der mtDNA, die zum MELAS-Syndrom führen kann, in der australischen Bevölkerung sogar mit 236/100.000 Bewohner angegeben [70].

Die Diagnosestellung einer Mitochondriopathie ist bei manchen Patienten nach wie vor eine Herausforderung. In dieser Arbeit werden die myohistologischen Veränderungen in der kombiniert-sequentiellen Cytochrom-c-Oxidase Färbung und in der Gomori-Trichrom Färbung quantifiziert. Untersucht wurden Patienten mit verschiedenen Gendefekten der mtDNA sowie eine gesunde Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden Untersuchungen bei Patienten mit ALS und verschiedenen Myositiden durchgeführt.

Ziel war es, Unterschiede der histologischen Ergebnisse zwischen den einzelnen Gendefekten zu quantifizieren sowie in Beziehung zu anderen neurogenen Muskelerkrankungen zu setzen. Des Weiteren sollte die Altersverteilung der Ergebnisse betrachtet werden. Es konnte ja bereits gezeigt werden, dass auch im Alter bei ansonsten gesunden Patienten ohne Hinweis auf eine mitochondriale Erkrankung vereinzelte RRF in der modifizierten Gomori-Trichrom Färbung gefunden wurden [57]. Eine weitere Fragestellung war, wie sicher die Diagnosestellung einer Mitochondriopathie alleine über die histologische Untersuchung einer Muskelbiopsie ist.

So wird beschrieben, dass der Muskel das verlässlichste Gewebe zur Diagnose einer Mitochondriopathie ist [71]. Eine vergleichende Studie unterschiedlicher Färbemethoden zeigte, dass die modifizierte Gomori-Trichrom Färbung die Verlässlichste zur Diagnosestellung einer Mitochondriopathie ist. So wurden neben der modifizierten Gomori-Trichrom Färbung auch die Succinat-Dehydrogenase, die NADH Tetrazolium Reduktase, HE-Färbung sowie Cytochrom-c-Oxidase und Actomysin ATPase untersucht und verglichen [71].

Es wird weiter beschrieben, dass die Identifikation von mehr als zwei RRF in der Gomori-Trichrom Färbung beim Gebrauch einer 25fachen Vergrößerung ein wahrscheinliches Zeichen einer Mitochondriopathie sind [65]. Die in der Literatur genannten Werte und Mindestzahlen weichen insgesamt voneinander ab. So wird in einer anderen Arbeit das Vorhandensein von mehr als 2 % RRF im Muskelpräparat, bzw. das Vorhandensein von mehr als 2 % CNF bei einem Alter des Patienten von unter 50 Jahren, respektive mehr als 5 % CNF bei einem Alter über 50 Jahren als ein diagnostisches Major-Kriterium gewertet [65].

Zusammenfassend gelten die myohistologischen Veränderungen der RRF und CNF bei erwachsenen Patienten mit Mitochondriopathien als wichtiges Diagnosekriterium. Es ist derzeit aber unklar wie spezifisch und wie sensitiv sie zur Diagnosestellung einer Mitochondriopathie sind. Dabei ist vielfach auch unklar, wie unterschiedlich das Ausmaß der histologischen Veränderungen bei den verschiedenen genetisch definierten Formen der Mitochondriopathien ist.

In der vorliegenden Arbeit sollen anhand eines großen Patientenkollektivs die Veränderungen in der Muskelbiopsie quantifiziert werden, um so Rückschlüsse auf die Sensitivität und Spezifität der RRF und CNF als diagnostisches Kriterium zu ziehen. Hiefür wurden Patienten mit Mitochondriopathien untersucht, denen

## 1 Einleitung

---

verschiedene Gendefekte zugrunde lagen. Des Weiteren wurden die CNF und RRF bei einer gesunden Kontrollgruppe sowie bei Patienten mit Myositis und ALS quantifiziert.

### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Materialien

Axio-Vision Software

Zeiss Mikroskop

Diamantschreiber

0,05 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,4

750 mg Saccharose

2 ml Katalase

20 mg Cytochrom C

10 mg DAB (Diaminobenzidine)

100 µl Natrium-Succinat

100 µl PMS (Poldinmethylsulfat)

10 µl Natrium-Azid

800 µl NBT (Nitroblau-Tetrazolium)

70 % Alkohol

96 % Alkohol

100 % Alkohol

Xylol

Hämatoxylin SHANDON

1,2 g Chromotrop 2 R

0,6 g Fast Green FCF

1,2 g Molybdätophosphorsäure

2 ml Eisessig

200 ml Aqua bidest

Roti Histokit

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Technik der Biopsie

Die Biopsie erfolgt unter aseptischen Bedingungen in Lokalanästhesie. Das Anästhetikum darf dabei nur in die Haut und in das Unterhautfettgewebe injiziert werden, nicht jedoch in den Muskel selbst.

Der Hautschnitt wird parallel zum Muskelfaserverlauf geführt und ist etwa 4-6 cm lang. Danach wird die Muskelfaszie freipräpariert und ebenfalls parallel zum Muskelfaserverlauf eröffnet. Dann wird ein Muskelfaserbündel mit einem Durchmesser von mindestens 0,5 cm und einer Länge von ca. 3 cm so umstochen, dass die Fäden das Muskelbündel an beiden Enden umschließen. Mit einem Scherenschlag wird das gefasste Faserbündel unter leichtem Zug an den umschlingenden Fäden exzidiert.

Bei der Entnahme muss der Muskel sehr vorsichtig behandelt werden, da es durch Manipulation durch Instrumente am Muskel schnell zu Artefakten kommen kann. Dies erschwert unter Umständen die Beurteilbarkeit unter dem Mikroskop.

Nach ausreichender Blutstillung erfolgt der schichtweise Wundverschluss von Faszie und Haut.

Der entnommene Muskel wird nach der Entfernung in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff gefroren wurde, getaucht und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.2.2 Anfertigung der Schnitte

Die Proben werden zunächst für ca. 10 min. im Mikrotom gelagert. Die Umgebungstemperatur im Mikrotom beträgt ca. -20° C. Dieser Arbeitsschritt wird durchgeführt, damit der Muskel bei der folgenden Bearbeitung nicht bricht. Der Muskel wird nun mit dem Mikrotom geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Für die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung wird der Muskel in einer Schichtdicke von 5 µm geschnitten. Für die Cytochrom C Oxidase Reaktion wird der Muskel in einer Schichtdicke von 10 µm geschnitten.

#### 2.2.3 Modifizierte GOMORI-TRICHOM-Färbung

Die angefertigten Schnitte müssen bis kurz vor der Färbung im Mikrotom gelagert werden. Erst unmittelbar vor der Färbung werden sie auf Zimmertemperatur gebracht

(ca. 2min). Zunächst werden nun die Schnitte mit Hämatoxylin SHANDON für 10 min bearbeitet.

Danach werden sie kurz mit Leitungswasser abgespült und anschließend für 15 min in Leitungswasser gebläut. Im Anschluss wird der Schnitt für 10 min in die GOMORI-Lösung getaucht. Zur Herstellung der GOMORI-Lösung benötigt man 1,2 g Chromotrop 2 R, 0,6 g Fast Green FCF, 1,2 g Molybdätophosphorsäure, 2 ml Eisessig und 200 ml Aqua bidest. Die GOMORI-Lösung sollte nach einem halben Jahr frisch hergestellt werden.

Anschließend werden die Schnitte zweimal für jeweils eine Minute in absoluten Ethanol inkubiert. Als nächstes wird der Schnitt mit Xylol zweimal abgespült und anschließend mit Roti Histokit II eingedeckt.

### 2.2.4 Cytochrom-c-Oxidase Reaktion

Die 10µm Schnitte (Poly-L-Lysin beschichtet) werden bis kurz vor der Färbung bei -80° C im Kühlschrank gelagert und erst kurz vor der Färbung auf Zimmertemperatur gebracht. Die Schnitte werden nun auf dem Objektträger mit einem Diamantschreiber umkreist. Zunächst werden nun 50 µl des Inkubationsmediums auf die Schnitte gegeben und diese bei 37° C für 60 Minuten inkubiert. Das Inkubationsmedium setzt sich wie folgt zusammen: 10 mg DAB, 9 ml 0,05 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,4, 750 mg Saccharose, 2 ml Katalase (5µl Stammlösung sowie 5 ml Bidest) sowie 20 mg Cytochrom C. Mit DAB wurde nur unter dem Abzug gearbeitet, da es karzinogen ist. Anschließend wird der Objektträger mit 0,05 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,4 gespült. Als nächstes schließt sich die SDH-Färbung an. Herstellung der SDH-Lösung: 100µl Natrium-Succinat, 100µl PMS (erst kurz vorher herstellen, da lichtempfindlich), 10µl Natrium-Azid und alles zu 800µl NBT geben und vortexen. Die Objektträger müssen nun vorsichtig um die Schnitte herum abgetrocknet werden und anschließend werden 50µl der SDH-Lösung auf die Schnitte gegeben. Nun werden die Schnitte für 60 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach werden sie mit Aquadest gespült sowie daran anschließend mit verschiedenen Alkohollösungen in aufsteigender Reihe. Zunächst kurz mit einer 70% Alkohollösung, dann für 30 sec mit 96% Lösung. Anschließend zweimal mit absolutem Alkohol für mindestens zwei Minuten. Zum Abschluss werden die Schnitte noch zweimal mit Xylol gespült.

### 2.2.5 Arbeiten mit Axio-Vision

Axio-Vision ist ein Bildbearbeitungs- und Analysesystem für die moderne Mikroskopie. Das Programm erlaubt die interaktive Vermessung einer Vielzahl von Objektparametern, wie Größe, Umfang und Anzahl. Auf dem Mikroskop ist eine Digitalkamera installiert, welche mit dem Computer vernetzt ist.

Über diese Kamera wurden die angefertigten Muskelpräparate schrittweise durchgemustert und die jeweils betroffenen Muskelzellen mit einer speziellen Software quantifiziert. So wurden am Computer die Zellen einzeln markiert und bei jedem Muskelpräparat insgesamt 1000 Muskelfasern ausgezählt.

### 2.2.6 Kriterien für die Auswertung

#### Auswertung der COX-SDH Färbung

Wir haben bei der Auswertung zwei verschieden angefärbte Muskelfasertypen unterschieden:

1. COX-negative Fasern: Um als COX-negative Faser klassifiziert zu werden, mussten folgende Kriterien erfüllt sein: In der 10fachen Vergrößerung musste die Faser sich blau angefärbt präsentieren, ohne Anfärbungen von braun. Nur dann wurde die Faser als COX-negativ eingestuft.
2. COX-positive Fasern: Fasern die sich komplett braun angefärbt haben, wurden als COX-positive Fasern eingeordnet.

Einzelne Fasern, die sowohl blaue als auch braune Anteile zeigten, wurden nicht als CNF eingestuft, sie entsprechen intermediären Fasern.

#### Auswertung der Gomori-Trichrom Färbung

Auch bei der Auswertung der Gomori-Trichrom Färbung wurden zwei verschieden angefärbte und morphologische Muskelfasertypen unterschieden.

1. Ragged-red Fasern: Um als Ragged-red Faser klassifiziert zu werden muss die Faser vor allem zwei Kriterien erfüllen. Sie muss sich einerseits rot anfärben und auf der anderen Seite eine typische „zerrissene“ Struktur aufweisen. Nur wenn beide Kriterien erfüllt sind wurden die Fasern als Ragged-red Faser klassifiziert. Manche Fasern wiesen nur eine gewisse subsarcolemmale Rotfärbung auf. Diese wurden nicht als RRF eingestuft.
2. Normale Fasern: Als normale oder gesunde Fasern wurden solche klassifiziert, die sich weder rot angefärbt haben, noch eine zerrissene Struktur

gezeigt haben. In der Gomori-Trichrom Färbung färben sich solche Fasern dunkelgrün.

### 2.3 Ein- und Ausschlusskriterien

#### 2.3.1 Kriterien für die Patienten mit Mitochondriopathien

Die in der Arbeit untersuchten Patientenproben mit Mitochondriopathien mussten zwei Kriterien erfüllen, um in die Arbeit eingeschlossen zu werden. Die Patienten mussten einen Phänotypen aufweisen, der auf eine Mitochondriopathie hinweist. Ohne entsprechende Phänotypen wurde keine Muskelbiopsie durchgeführt. Die Diagnose musste außerdem durch den molekulargenetischen Nachweis eines für die Erkrankung ursächlichen Defektes der mtDNA gesichert sein. Punktmutationen der mtDNA waren mittels PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse nachgewiesen worden. Deletionen der mtDNA waren mittels Southern-Blot-Analyse und Long-Range-PCR identifiziert worden. Nur bei wenigen Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA wurde der zugrunde liegende nukleäre Gendefekt gefunden.

#### 2.3.2 Kriterien für die gesunden Kontrollen

Die Patientenproben, die in der gesunden Kontrollgruppe vorgestellt werden, stammten von Patienten, bei denen unter dem Verdacht auf eine Muskelerkrankung eine Muskelbiopsie durchgeführt worden war. Nach Abschluss aller Untersuchungen konnte dieser Verdacht aber nicht bestätigt werden. Die Patienten mussten sich neurologisch unauffällig in der klinischen Untersuchung zeigen. Lediglich subjektive Beschwerden waren zulässig. Die Paraklinik zeigte bei den betreffenden Patienten normale Werte von Kreatinkinase und Laktat. Das EMG war unauffällig. Der Fahrradbelastungstest durfte keinen pathologischen Anstieg von Laktat zeigen.

Die durchgeführte histologische Untersuchung der Muskelbiopsie durfte keinen Anhalt für ein myopathisches Gewebssyndrom, kein Anhalt für ein neurogenes Gewebssyndrom sowie keine Veränderungen, die auf eine Strukturmyopathie hinweisen zeigen.

### 2.3.3 Kriterien für die Patienten mit Myositis

Die in der Arbeit vorgestellten Myositis-Patienten wurden vor allem nach histologischen Kriterien eingeschlossen.

So mussten die Patienten mit Dermatomyositis vor allem entzündliche Infiltrate perivaskulär und perifaszikulär aufweisen. In den immunhistochemischen Untersuchungen mussten sie überwiegend CD 4 positive T-Zellen zeigen.

Die Patienten, die an Polymyositis litten, zeigten entzündliche Infiltrate überwiegend endomysial. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte hier vorwiegend CD 8 positive T-Zellen.

Die Patienten mit Einschlusskörpermyositis zeigten die typischen „rimmed vacuols“ sowie entzündliche Infiltrate ebenfalls überwiegend endomysial. Die immunhistochemische Untersuchung zeigt überwiegend CD 8 positive T-Zellen.

### 2.3.4 Kriterien für Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose

Siebzehn Patienten mit ALS von denen Muskelbiopsien entnommen wurden, werden in dieser Arbeit untersucht. Bei allen wurde eine definitive ALS auf die El Escorial-Kriterien [72] Bezug nehmend festgestellt.

## 2.4 Untersuchtes Patientengut

### 2.4.1 Patienten mit der Punktmutation 3243 A>G

Es wurden insgesamt acht Patienten untersucht, die in den genetischen Untersuchungen die Punktmutation 3243A>G aufwiesen. Der älteste Patient war zum Untersuchungszeitpunkt 61 Jahre alt, das Alter des Jüngsten betrug 41 Jahre. Der Altersdurchschnitt betrug 47 Jahre

### 2.4.2 Patienten mit weiteren Punktmutationen

Es wurden drei weitere Patienten mit jeweils unterschiedlichen Punktmutationen untersucht. Dies sind im Einzelnen die Punktmutation 8344A>G, 11778G>A sowie 7497G>A von denen jeweils ein Patient untersucht wurde.

### 2.4.3 Patienten mit singulären Deletionen

Es wurden insgesamt 27 Patienten untersucht, die in der molekularbiologischen Untersuchung singuläre Deletionen der mitochondrialen DNA aufwiesen. Der

Altersdurchschnitt betrug 44 Jahre, wobei der älteste Patient 68 und der jüngste 14 Jahre alt waren.

### 2.4.4 Patienten mit multiplen Deletionen

Insgesamt wurden 22 Patienten mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA untersucht. Der älteste Patient dieser Gruppe war zum Zeitpunkt der Muskelbiopsie 76 Jahre alt, der jüngste Patient 14. Bei einem Patienten konnte das Alter nicht ermittelt werden. Der Altersdurchschnitt dieser Gruppe lag bei 45,7 Jahren.

### 2.4.5 Gesunde Kontrollen

Es wurden insgesamt 16 gesunde Kontrollen untersucht. Der Altersdurchschnitt lag bei 48,4 Jahren. Der älteste Patient aus der Gruppe war 72, der jüngste 35 Jahre alt.

### 2.4.6 Patienten mit Myositis

Es wurden insgesamt acht Patienten mit verschiedenen Myositisformen untersucht. Zwei Patienten litten an Einschlusskörpermyositis, vier an Polymyositis und weitere zwei an Dermatomyositis. Das Durchschnittsalter der Gruppe betrug 66 Jahre.

### 2.4.7 Patienten mit ALS

Es wurden insgesamt die Muskelpräparate von 17 Patienten untersucht, die an Amyotropher Lateralsklerose erkrankt waren. Der Altersdurchschnitt dieser Gruppe lag bei 57 Jahren, wobei der älteste Patient 71 und der jüngste 40 Jahre alt waren.

## 2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung sowie die Anfertigung einiger Grafiken wurde das Programm GraphPad Prism hinzugezogen. Für die Berechnung der Signifikanz wurde ein ungepaarter t-Test mit einem Confidenzintervall von 95 % verwendet. P-Werte von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

Spezifität, Sensitivität und der positiv prädiktive Wert wurden mit einer Vierfeldertafel berechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten mit der Punktmutation 3243 A>G

Der Durchschnitt der bestimmten CNF in der Gruppe der Patienten mit der Punktmutation 3243 A>G betrug 6,92 % (SD=9,36). Die Werte lagen zwischen 27,2 % maximal und 0,358 % minimal. Die durchschnittliche Anzahl der RRF betrug 2,19 % (SD=3,70). Hier variierten die Werte von 11 % maximal bis zu 0,09 %. Von den acht untersuchten Patienten waren jeweils vier Frauen und vier Männer. Der biopsierte Muskel eines Patienten wies eine Parese auf, die übrigen untersuchten Muskelpräparate stammten nicht von paretischen Muskeln.

Bei den Patienten mit der Punktmutation 3243A>G wurde des Weiteren untersucht, ob die in der Gomori-Trichrom Färbung untersuchten RRF in der kombiniert sequentiellen COX-SDH-Färbung COX-positive Fasern waren. Bei vier Patienten gelang dieser Nachweis, ein Patient zeigte zwei RRF als sicher COX-positiv, eine Faser erschien fraglich COX-positiv. Bei den übrigen drei Patienten waren die Präparate der Gomori-Trichrom Färbung und der COX-SDH-Färbung nicht direkt hintereinander geschnitten worden, so dass die entsprechenden Muskelfasern in den Präparaten nicht verglichen werden konnten.

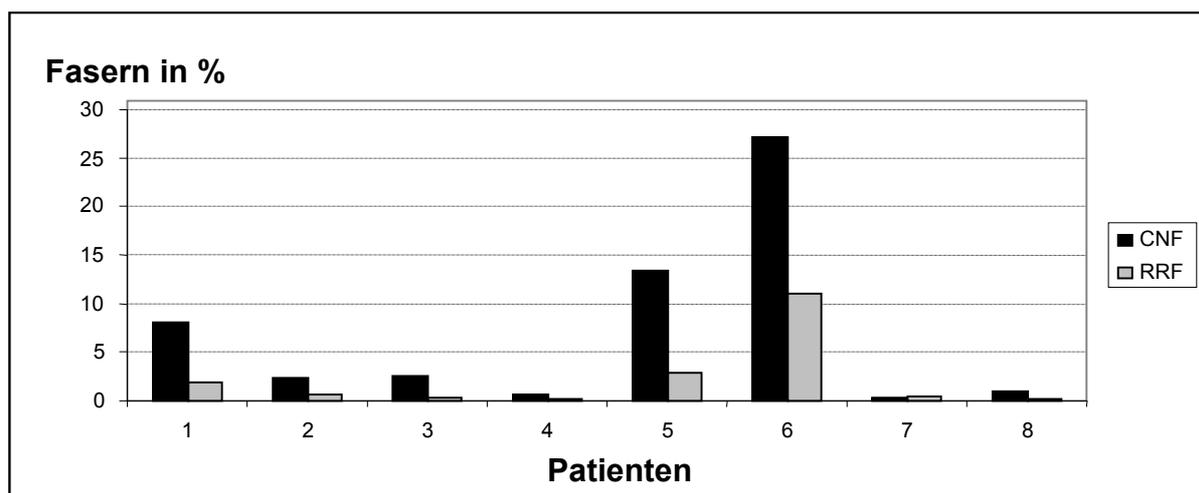


Abbildung 2: Patienten mit Punktmutation 3243A>G. Dargestellt sind jeweils die CNF und RRF von acht Patienten mit der angegebenen Mutation

### 3 Ergebnisse

Tabelle 5: Patienten mit Punktmutation 3243A>G. Aufgelistet sind das Alter, das Geschlecht, der Paresegrad der Muskulatur in der klinisch neurologischen Untersuchung, die Anzahl der CNF und RRF, der Phänotyp, der Muskel aus dem die Muskelbiopsie gewonnen wurde, ein Hinweis, ob der bioptierte Muskel in der klinischen Untersuchung Paresen aufwies und ob die RRF in der kombiniert sequentiellen COX/SDH-Färbung COX-positiv waren

Alter	M/ W	Paresen	CNF	RRF	Phänotyp	bioptierter Muskel	bioptierter Muskel paretisch	RRF CNF
50	M	Multiple Paresen KG 4-5	8	1,9	CPEO, Myopathie, NIDDM	M. biceps brachii re.	+	+
45	W	keine	2,4	0,7	IDDM, Hörstörung	M. biceps brachii re.	n.a.	n.a.
61	M	keine	2,5	0,3	schmerzhafte Muskelsteife, Hörstörungen	M. biceps brachii re.	n.a.	+/-
44	M	keine	0,7	0,09	Kardiomyopathie, Hör- und Gleichgewichtsstörungen	M. biceps brachii li.	-	n.a.
44	M	nein	13,4	2,9	Schlaganfälle, CPEO, Retinopathie, Hörstörung, Kleinwuchs	M. biceps brachii li.	-	n.a.
41	W	keine	27,2	11	Schlaganfälle, Kleinwuchs, Schwerhörigkeit, Laktatazidose, MELAS	n.a.	-	+
44	W	keine	0,358	0,499	Schlaganfall, Hypakusis	M. deltoideus re.	-	+
44	W	keine	0,879	0,093	MELAS, NIDDM	M. deltoideus	-	+
<b>47</b>			<b>6,92</b>	<b>2,19</b>				

n.a.=nicht auswertbar, + = ja, - = nein

### 3.2 Patienten mit weiteren Punktmutationen

Es wurden drei weitere Patienten mit jeweils unterschiedlichen Punktmutationen untersucht.

Tabelle 6: Patienten mit weiteren Punktmutationen. Aufgelistet sind das Alter, die jeweils vorliegende Punktmutation, das Geschlecht, die Paresen der klinisch neurologischen Untersuchung, die CNF und RRF, der Phänotyp, der Muskel aus dem die Biopsie entnommen wurde und ob der bioptierte Muskel klinisch paretisch war

Alter	Mutation	Geschlecht	Paresen	CNF	RRF	Phänotyp	bioptierter Muskel	bioptierter Muskel paretisch
33	8344 A>G	W	keine	39,8	0	MERRF	M. quadriceps femoris li.	-
49	11778 G>A	M	keine	0,2	0	LHON	M. biceps brachii li.	n.a.
50	7497 G>A	W	generalisierte Parese KG 3-4	79,4	47,8	Myopathie	n.a.	n.a.

n.a.=nicht auswertbar, + = ja, - = nein

Ein Patient mit der Punktmutation 8344A>G war zum Untersuchungszeitpunkt 33 Jahre alt. Die histologische Auswertung zeigte 39,8% CNF in der Cytochrom-c-Oxidase Färbung und keine RRF in der Gomori-Trichrom Färbung. Die klinische Untersuchung zeigte keine Paresen, somit wies auch der bioptierte M. quadriceps femoris links keine Paresen auf.

### 3 Ergebnisse

Ein Patient mit der Punktmutation 11778G>A zeigte 0,2 % CNF und ebenfalls keine RRF. Er war zum Zeitpunkt der Untersuchung 49 Jahre alt. Paresen waren in der klinischen Untersuchung ebenfalls nicht nachweisbar. Ein Patient mit der Punktmutation 7497G>A war 50 Jahre alt und zeigte 79,4% CNF sowie 47,8% RRF. Die klinische Untersuchung zeigte hier generalisierte Paresen vom Kraftgrad 3-4. Im Phänotyp zeigt der Patient mit der 8344A>G Mutation das MERRF-Syndrom, wobei sich mikroskopisch keine RRF darstellen lässt. Der Patient mit der Mutation 11778G>A litt an der Leberschen hereditären Optikusneuropathie und der Patient mit der Punktmutation 7497G>A zeigte eine Myopathie.

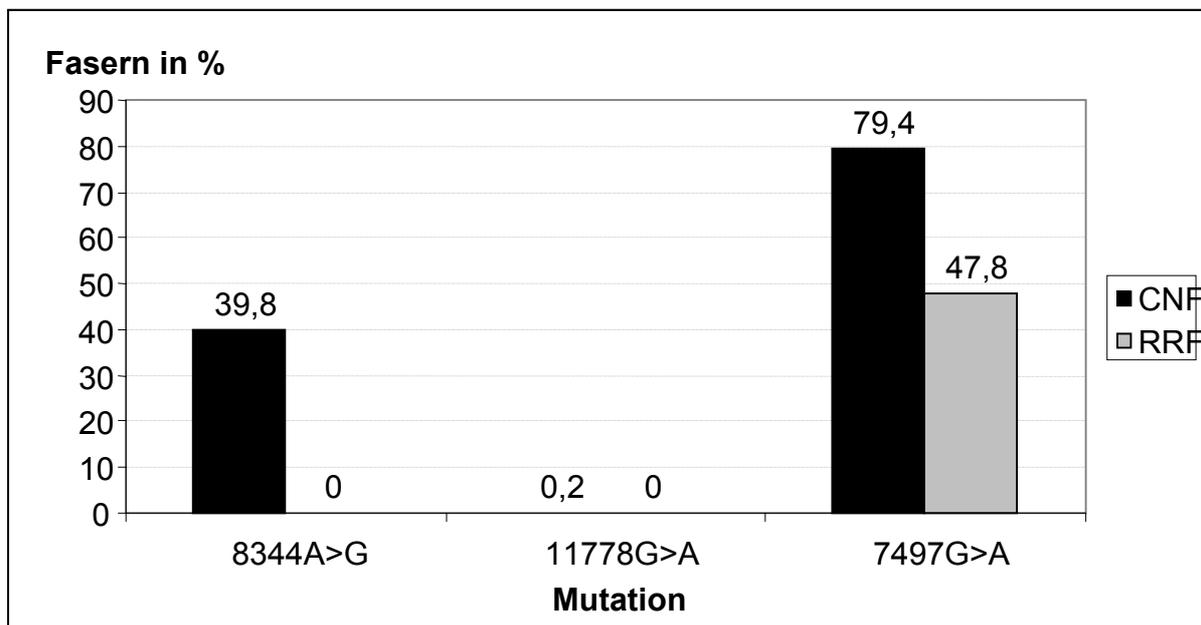


Abbildung 3: Auswertungen weiterer Punktmutationen. Dargestellt sind jeweils die CNF und RRF von drei Patienten mit den jeweils angegebenen Punktmutationen

#### 3.3 Patienten mit singulären Deletionen

Der Durchschnitt der ausgezählten CNF in der Gruppe der Patienten mit den singulären Deletionen in den Cytochrom-c-Oxidase Färbungen lag bei 10,37 % (SD=10,93). Der Maximalwert in dieser Gruppe betrug 47,5 %, der Minimalwert 0,07 % CNF.

### 3 Ergebnisse

Tabelle 7: Dargestellt sind die Ergebnisse von 27 Patienten mit singulären Deletionen der mtDNA. Aufgelistet sind das Alter, Geschlecht, Paresen in der klinisch neurologischen Untersuchung, die CNF und RRF, der Phänotyp, der bioptierte Muskel und ob der betreffende Muskel klinisch Paresen zeigte

Alter	Geschlecht	Paresen	CNF	RRF	Phänotyp	bioptierter Muskel	bioptierter Muskel paretisch
38	M	allg. Muskelschwäche	25,6	6,8	CPEO, Myopathie, Hypakusis, RSB	M. quadriceps femoris li.	+
29	M	Keine	21	18,3	CPEO	n.a.	-
46	M	KG 4 bei Fingerspreizung	17,3	11,2	CPEO	M. biceps brachii li.	-
59	W	Keine	14,1	5,4	CPEO, Myopathie	M. pectoralis li.	-
41	W	Geringgradig ausgeprägte Paresen	21,5	16,4	CPEO, Myopathie	M. biceps brachii li.	+
49	W	multiple Paresen KG 4-5	7,9	9,1	CPEO, Myopathie, Retinadegeneration	M. quadriceps femoris	+
39	W	multiple Paresen KG 4	12,4	0,3	CPEO, Myopathie, Hypakusis, Kardiomyopathie	M. biceps brachii li.	+
14	W	Schulterhebung und Kopfdrehung KG 4-5	47,5	6,4	CPEO, Retinadegeneration	M. biceps brachii re	-
56	M	n.a.	5,7	n.a.	CPEO, Retinadegeneration	M. vastus lateralis	-
49	W	keine	9,4	8,6	CPEO, Myopathie	M. vastus lateralis re	-
15	M	n.a.	3,7	1	CPEO	n.a.	n.a.
45	W	keine	16,3	3,4	CPEO, Hypakusis, Retinadegeneration, fragl. Myopathie	M. biceps brachii li.	-
68	W	Parese der OEX KG 4-5	17,9	3,7	CPEO, Diabetes, Myopathie, Hypakusis	M. biceps brachii li	+
34	W	Keine	24,8	0,392	CPEO, Myopathie	M. deltoideus li.	-
57	W	Keine	0,489	0,887	CPEO	M. deltoideus re.	-
47	M	n.a.	1,189	0	CPEO	n.a.	n.a.
61	W	generalisierte Parese der Skelettmuskulatur	4,683	0,126	CPEO	M. deltoideus re.	+
35	W	Keine	2,94	0,13	CPEO	n.a.	n.a.
36	M	Keine	2,298	0,099	CPEO	M. biceps brachii re.	-
51	M	Keine	6,6	1,857	CPEO	M. tibialis anterior re.	-
16	W	Keine	1,71	0,37	KSS, CPEO, Retinadegeneration, Kleinwuchs, RSB, Hypakusis, Ataxie	M. tibialis anterior re.	-
47	W	Keine	0,07	0	CPEO	M. biceps brachii re.	n.a.
63	W	n.a.	5,5	0,78	CPEO	M. gastrocnemius li.	-
57	W	Kopfkliniation KG 4, Fuß und Zehendorsaextension KG 4-5	2,89	1,09	CPEO	M. biceps brachii li.	n.a.
49	W	Keine	3,83	1,88	CPEO, Retinadegeneration	M. tibialis anterior li.	n.a.
42	M	Kopfbeugung KG 4	1,39	0	CPEO	M. tibialis anterior li.	-
35	M	gleichmäßig verteilte Paresen KG 4	1,19	0	CPEO	n.a.	n.a.
<b>44</b>			<b>10,37</b>	<b>3,78</b>			

n.a.=nicht auswertbar, + = ja, - = nein

Der Durchschnitt der ausgezählten RRF in der Gomori-Trichrom Färbung bei den Patienten mit singulären Deletionen lag bei 3,78 % (SD=5,17). Der Patient mit den

meisten RRF zeigte 18,3 % RRF, drei Patienten mit singulärer Deletion zeigten keine RRF.

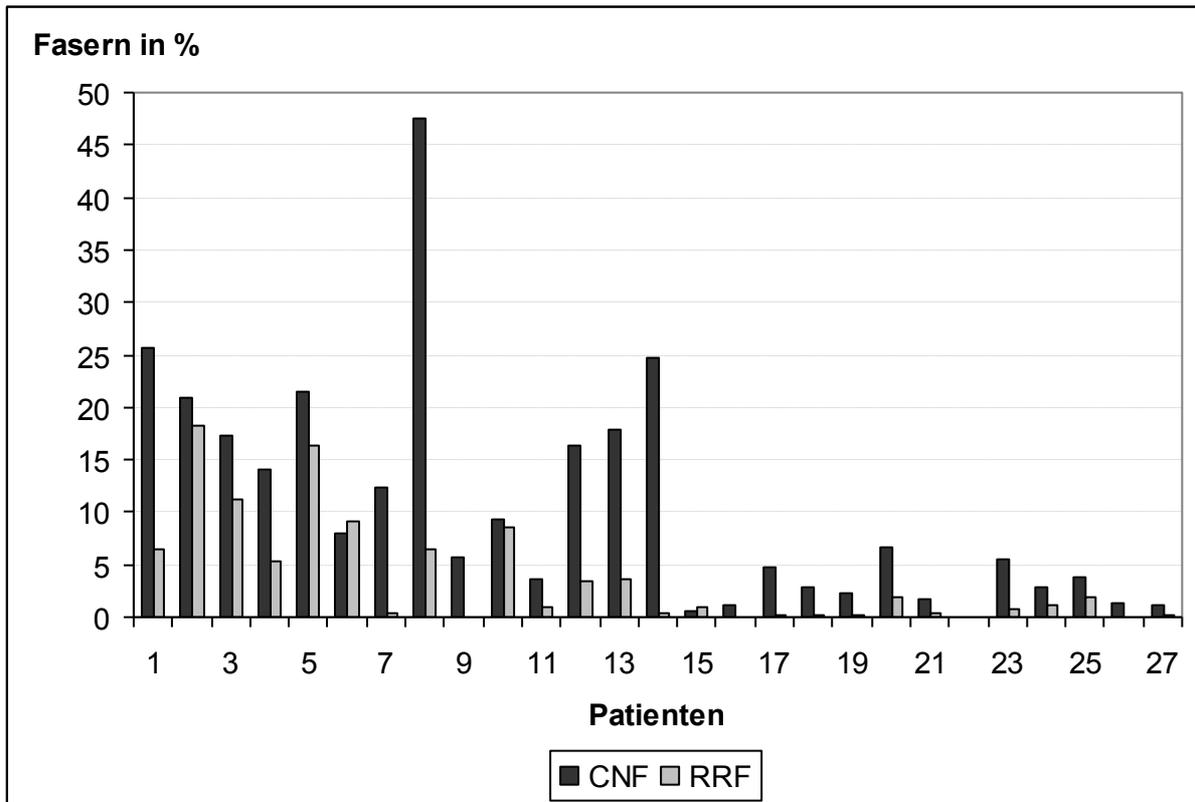


Abbildung 4: Dargestellt sind die CNF und RRF von 27 Patienten mit singulären Deletionen der mtDNA

#### 3.4 Patienten mit multiplen Deletionen

Der Mittelwert der ausgezählten CNF in der Gruppe der Patienten mit multiplen Deletionen in den Präparaten der Cytochrom-c-Oxidase Färbung lag bei 7,37 % CNF (SD=6,72). Der Maximalwert betrug 22,2 % CNF, der Patient mit den wenigsten ausgezählten Fasern zeigte 0,54 % CNF. Bei einem der Patienten aus der Gruppe konnte keine COC/SDH-Färbung angefertigt werden, da kein qualitativ ausreichender Muskel mehr vorhanden war, so dass hier bei insgesamt 21 Patienten die CNF ausgezählt wurden. Bei 19 Patienten aus der Gruppe mit genetischen gesicherten multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA wurden die RRF in den Präparaten mit der Gomori-Trichrom Färbung ausgezählt. Bei drei Patienten konnte keine Gomori-Trichrom-Färbung angefertigt werden, da kein qualitativ ausreichender Muskel mehr vorhanden war. Der Durchschnitt betrug hier 2,21 % RRF (SD=2,95).

### 3 Ergebnisse

Der Maximalwert betrug 9,5 % RRF. Zwei Patienten mit gesichertem Gendefekt zeigten keine einzige RRF im Muskelpräparat.

Tabelle 8: Dargestellt sind die Ergebnisse von 22 Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA. Aufgelistet sind das Alter, Geschlecht, Paresegrad in der klinisch neurologischen Untersuchung, die CNF und RRF, der Phänotyp, der bioptierte Muskel und ob der betreffende Muskel klinisch Paresen zeigte

Alter	Geschlecht	Paresen	CNF	RRF	Phänotyp	bioptierter Muskel	bioptierter Muskel paretisch
43	M	n.a.	22,2	n.a.	CPEO	M. biceps brachii li.	n.a.
55	W	Leichte Schwäche M. biceps brachii li.	6,2	0,47	CPEO	M. biceps brachii li.	+
44	M	keine Paresen	20	9,5	CPEO	M. biceps brachii li.	-
35	W	keine Paresen	17,1	8,8	CPEO	M. biceps brachii li.	-
45	M	leichtgradige proximale Paresen	4	4	CPEO	M. deltoideus re.	+
54	M	multiple Paresen KG 4	10,25	2,19	CPEO, Hypakusis	M. tibialis anterior li.	-
46	W	keine Paresen	0,97	n.a.	CPEO	n.a.	n.a.
49	M	keine Paresen	1,857	5	CPEO	M. deltoideus li.	-
36	M	keine Paresen	1,83	0	CPEO	M. deltoideus	-
39	W	Leichte Armbeugerparese	9,26	n.a.	Ptosis, leichte Pallhypästhesie	M. vastus lateralis li.	-
37	W	leichte Parese der Armabduktion und Kopfbeuger	9,34	1	CPEO	M. biceps li.	-
33	W	proximale Paresen KG 3-4	11,97	1,88	CPEO	n.a.	n.a.
45	W	keine Paresen	10,53	0,388	CPEO, subklinische PNP	M. tibialis anterior li.	-
59	W	keine Paresen	2,049	0,565	CPEO, Herzblock, NIDDM	M. biceps brachii li.	-
37	W	keine Paresen	0,54	0	CPEO, Epilepsie	M. tibialis anterior re.	-
59	W	Parese der Skelettmus. KG 3-4/5	2,8	0,654	CPEO, Dysphagie	n.a.	n.a.
76	W	minimale prox. Parese der Beine	12,7	4,6	CPEO, Myopathie, DM	M. biceps brachii re.	-
56	M	keine Paresen	1,4	0,063	CPEO, Retinadegeneration	M. biceps brachii li.	-
51	M	n.a.		0,143	CPEO	n.a.	n.a.
58	W	keine Paresen	1,08	0,45	CPEO	M. vastus medialis li.	-
14	M	multiple Paresen KG 4	1,23	0,08	CPEO	M. biceps brachii re.	-
25	M	Keine	1,57	0,28	MELAS	n.a.	-
<b>45</b>			<b>7,01</b>	<b>2,11</b>			

n.a.=nicht auswertbar, + = ja, - = nein

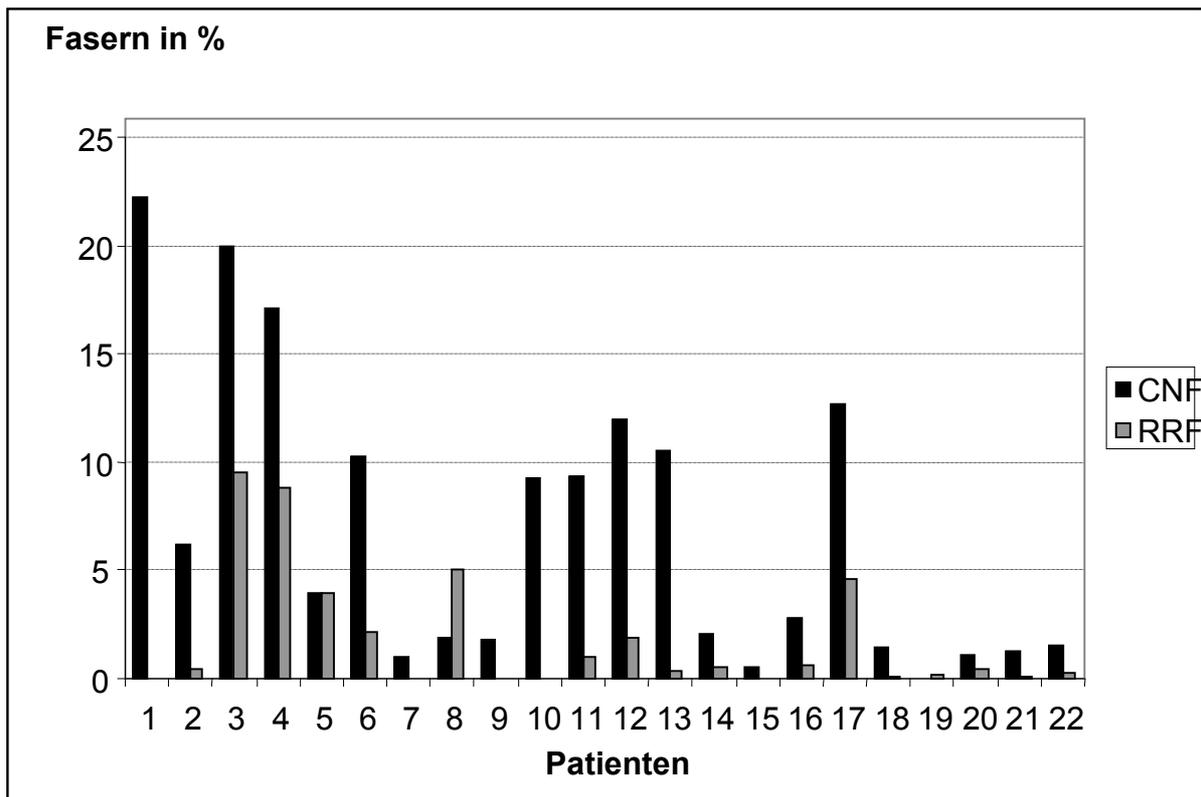


Abbildung 5: Dargestellt sind die CNF und RRF von 22 Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA

#### 3.5 Auswertungen der gesunden Kontrollen

Der Durchschnitt der ausgezählten CNF bei den gesunden Kontrollpatienten in der Cytochrom-c-Oxidase Färbung lag bei 0,136 % (SD=0,17). Der ausgezählte Maximalwert betrug 0,59 % CNF, sechs der 16 Patienten zeigten keine CNF im Muskelpräparat. Der Mittelwert der ausgezählten RRF in der Gomori-Trichrom Färbung betrug 0,01 % (SD=0,04). Ein Patient zeigte 0,162 % RRF, die übrigen 15 zeigten keine RRF in den Präparaten.

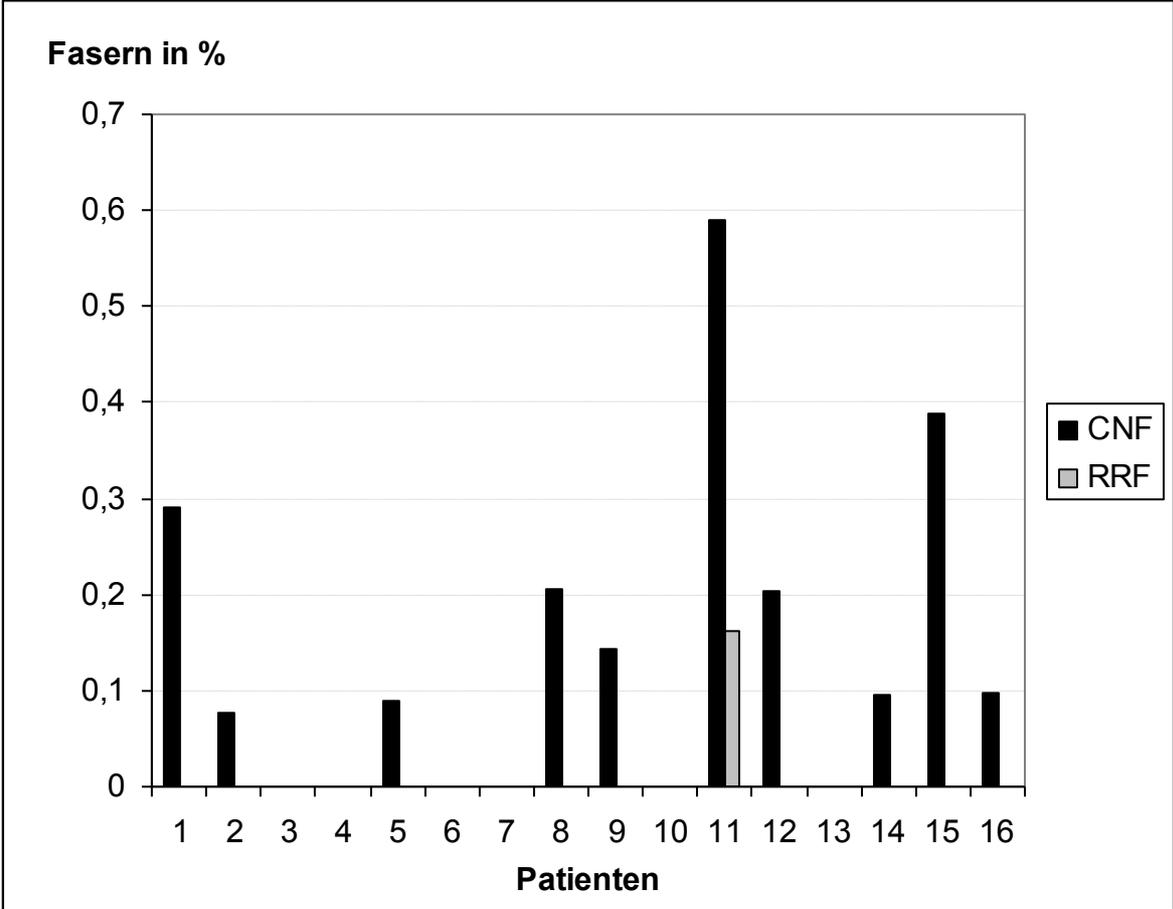


Abbildung 6: Dargestellt sind die CNF und RRF von 16 gesunden Kontrollpatienten

Tabelle 9: Aufgelistet sind das Alter sowie die CNF und RRF von 16 gesunden Kontrollpatienten

<b>Alter</b>	<b>CNF</b>	<b>RRF</b>
45	0,29	0
35	0,076	0
37	0	0
44	0	0
44	0,09	0
41	0	0
43	0	0
40	0,206	0
65	0,144	0
48	0	0
65	0,59	0,162
72	0,204	0
53	0	0
48	0,096	0
49	0,388	0
45	0,092	0
<b>48</b>	<b>0,136</b>	<b>0,01</b>

#### 3.6 Patienten mit Myositis

Der gesunden Kontroll-Gruppe wurden zwei weitere Gruppen gegenübergestellt. Es wurde hier zum einen eine Gruppe von acht Patienten mit histologisch gesicherten Formen von Myositis untersucht. Zum anderen eine Gruppe von 17 Patienten mit amyotropher Lateralsklerose.

Der Mittelwert der ausgezählten CNF bei allen acht Patienten mit Myositis in der Cytochrom-c-Oxidase Färbung betrug 4,46 % (SD=4,56). Die meisten wurden bei einem Patienten mit 13,83 % ausgezählt, der Patient mit den wenigsten zeigte 0,185 % CNF. Der Durchschnitt der ausgezählten RRF in der Gomori-Trichrom-Färbung betrug 0,38 % (SD=0,41). Zwei der acht untersuchten Patienten zeigten keine

### 3 Ergebnisse

einzigste RRF. Am meisten zeigte ein Patient mit 1,198 % RRF. Beide Maximalwerte (CNF und RRF) wurden von demselben Patienten erreicht, der an Polymyositis litt.

Tabelle 10: Patienten mit Myositis. Dargestellt sind die Myositisform, das Alter sowie die CNF und RRF.

Myositisform	Alter	CNF	RRF
IBM	46	n.a.	0
IBM	64	1,38	0,09
Polymyositis	70	3,03	0,22
Polymyositis	77	6,41	0,59
Polymyositis	76	13,83	1,198
Polymyositis	60	3,27	0,63
Dermatomyositis	63	3,13	0,45
Dermatomyositis	71	0,19	0
	<b>66</b>	<b>4,46</b>	<b>0,38</b>

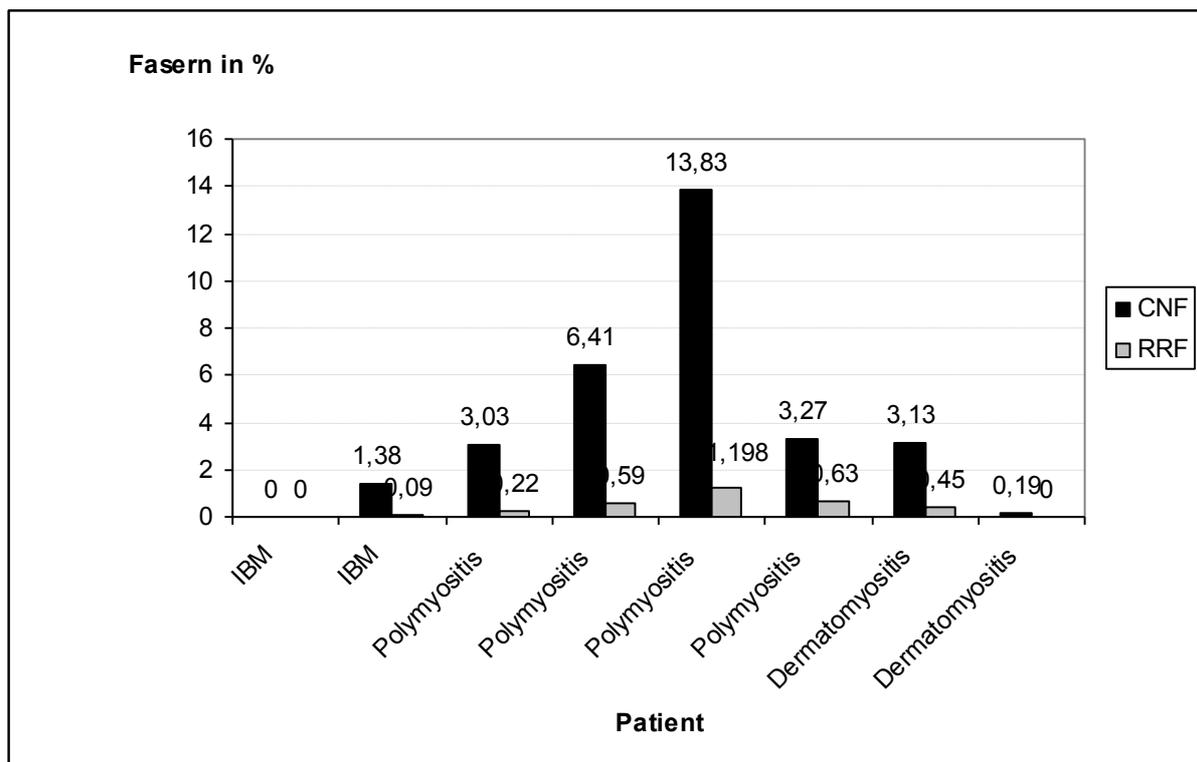


Abbildung 7: Patienten mit Myositis. Dargestellt sind die CNF und RRF von 8 Patienten mit der jeweiligen Myositisform

#### 3.7 Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose

Es wurden von allen 17 Patienten Muskelpräparate mit der Cytochrom-c-Oxidase angefertigt und untersucht. Der Durchschnitt der der ausgezählten CNF betrug 0,19 % in dieser Färbung (SD=0,26). In sechs Präparaten fand sich keine einzige CNF. Der Maximalwert betrug 0,968 %. Von 14 der 17 Patienten wurde eine Gomori-Trichrom-Färbung angefertigt. Keine wies eine RRF auf.

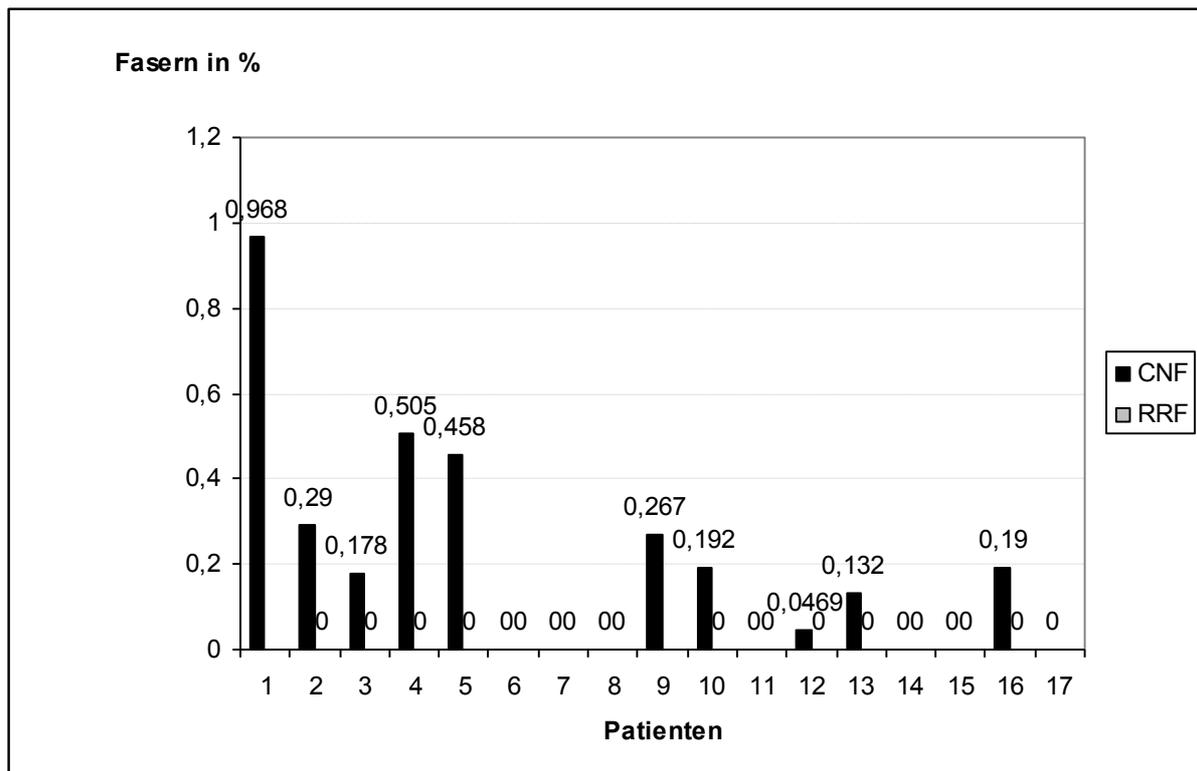


Abbildung 8: Dargestellt sind die CNF und RRF von 17 Patienten mit amyotropher Lateralsklerose

Tabelle 11: 17 Patienten mit amyotropher Lateralsklerose. Aufgelistet sind das Alter, CNF und RRF

<b>Alter</b>	<b>CNF</b>	<b>RRF</b>
71	0,968	n.a.
66	0,29	0
60	0,178	0
67	0,505	0
62	0,458	0
43	0	0
46	0	0
40	0	0
53	0,267	n.a.
64	0,192	0
52	0	0
66	0,0469	0
61	0,132	0
45	0	0
45	0	0
63	0,19	0
63	0	n.a.
<b>57</b>	<b>0,19</b>	<b>0</b>

#### 3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen graphisch zusammengefasst und neu aufgeschlüsselt. So zeigen die Abbildungen 10 und 11 die statistisch zusammengefassten Ergebnisse der Patienten mit Mitochondriopathie.

### 3 Ergebnisse

---

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse. Links die verschiedenen untersuchten Gruppen, daneben die Anzahl der jeweils in den Gruppen untersuchten Patienten, der Altersdurchschnitt in den Gruppen sowie die Anzahl der CNF und RRF mit Angabe der Standardabweichung

<b>Gruppe</b>	<b>Patienten [n]</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>CNF [%]</b>	<b>RRF [%]</b>
<b>Punktmutation 3243A&gt;G</b>	8	47	6,92 (SD=9,36)	2,19 (SD=3,70)
<b>8344A&gt;G</b>	1	33	39,8	0
<b>11778G&gt;A</b>	1	49	0,2	0
<b>7497G&gt;A</b>	1	50	79,4	47,8
<b>Singuläre Deletionen</b>	27	44	10,37 (SD=10,93)	3,77 (SD=5,17)
<b>Multiple Deletionen</b>	22	45	7,01 (SD=6,72)	2,11 (SD=2,95)
<b>Gesunde Kontrollen</b>	16	48,4	0,14 (SD=0,17)	0,01 (SD=0,04)
<b>Myositis</b>	8	66	4,46 (SD=4,56)	0,38 (SD=0,41)
<b>ALS</b>	17	57	0,19 (SD=0,26)	0 (SD=0)

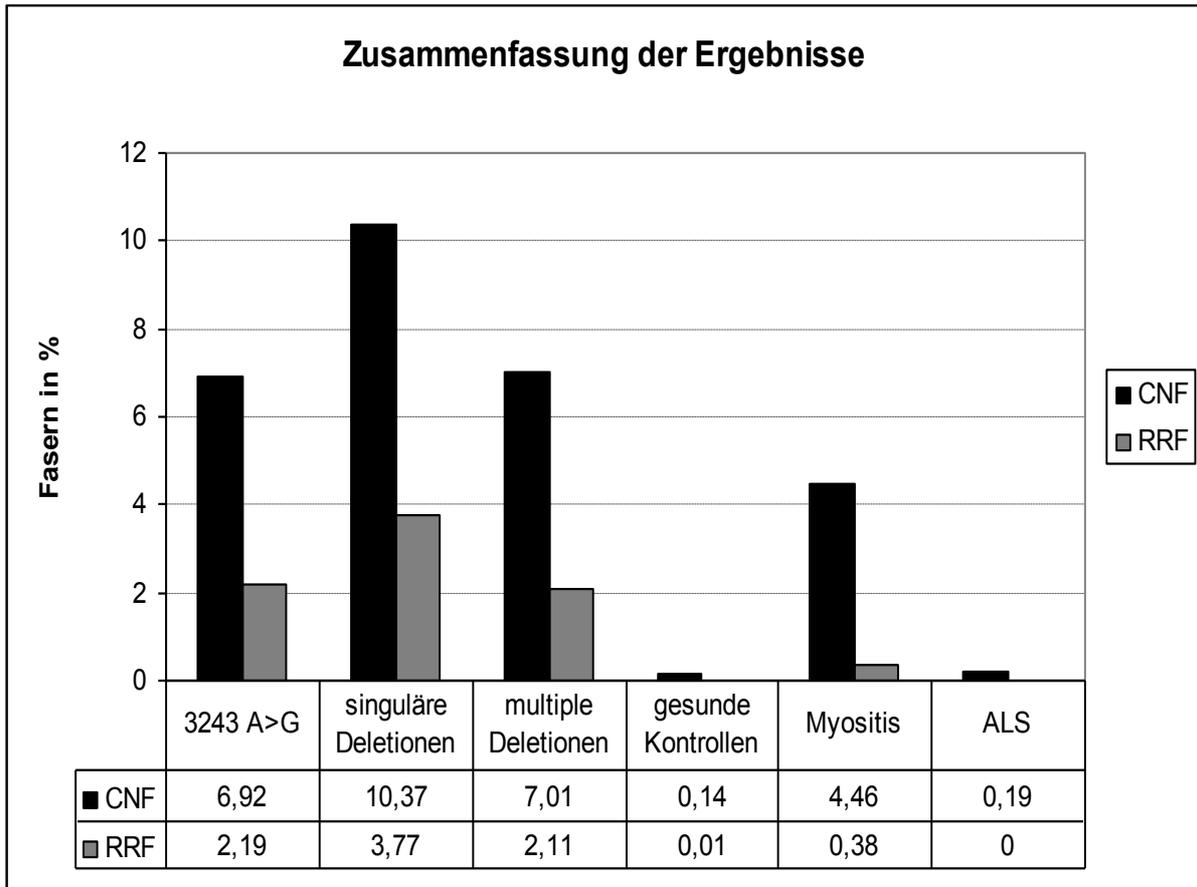


Abbildung 9: Dargestellt sind die CNF und RRF der jeweils untersuchten Gruppen

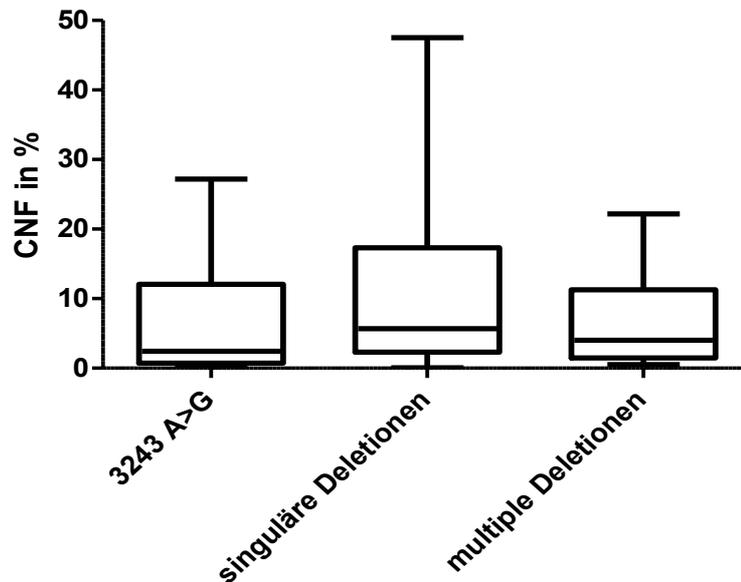


Abbildung 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der CNF in den Gruppen der Patienten mit Mitochondriopathie, hier dargestellt für die 8 Patienten mit der Punktmutation 3243A>G, den 27 Patienten mit singulären Deletionen und den 22 Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

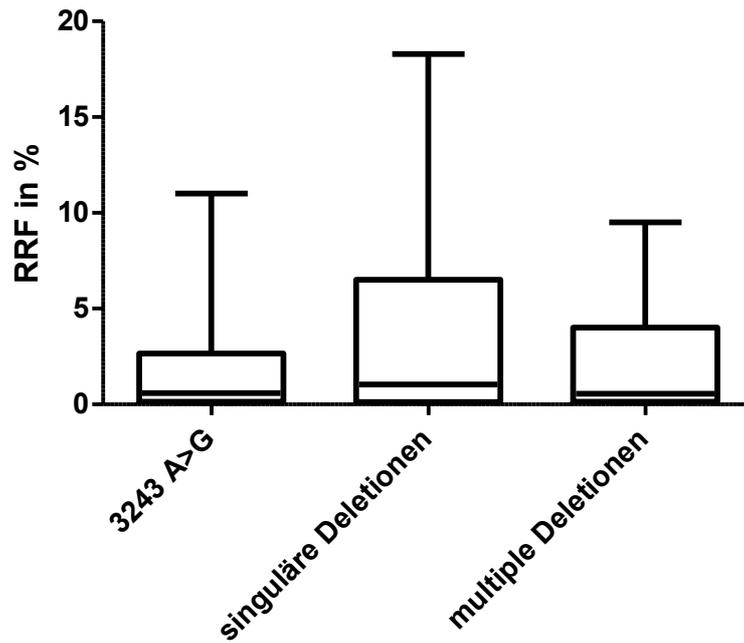


Abbildung 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der RRF in den Gruppen der Patienten mit Mitochondriopathien aufgeteilt in die Gruppen mit der Punktmutation 3243A>G, die singulären Deletionen und die multiplen Deletionen (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

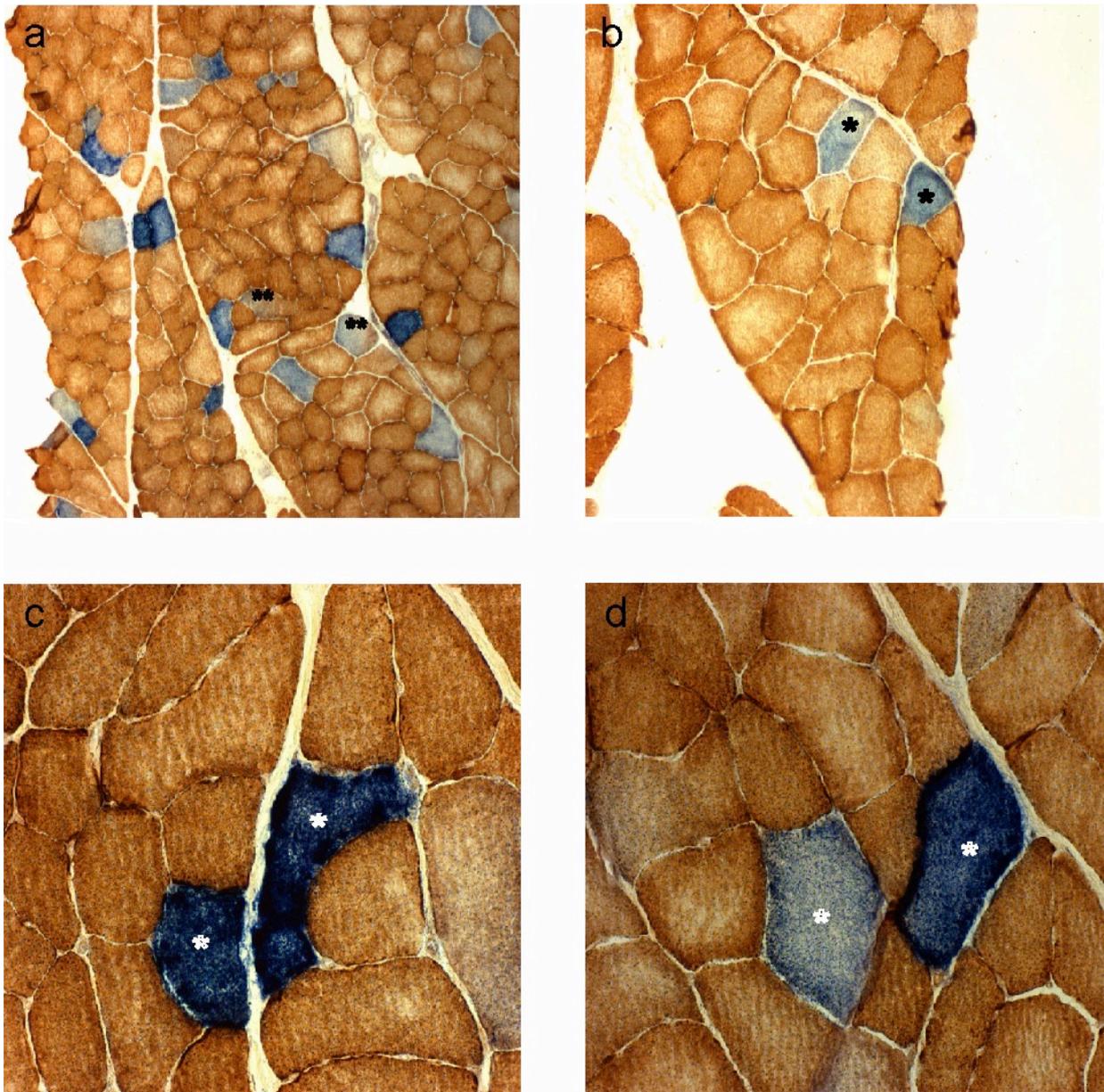


Abbildung 12: Myohistologische Veränderungen in der kombiniert sequentiellen COX/SDH-Färbung; a zeigt die typische mosaikartige Verteilung der Fasern im Muskelpräparat sowie zwei Fasern, die Anteile von braun mit anzeigt und so nicht als CNF gewertet wurde (\*\*); b zeigt zwei typische CNF (\*); c und d zeigen jeweils typische CNF (\*)

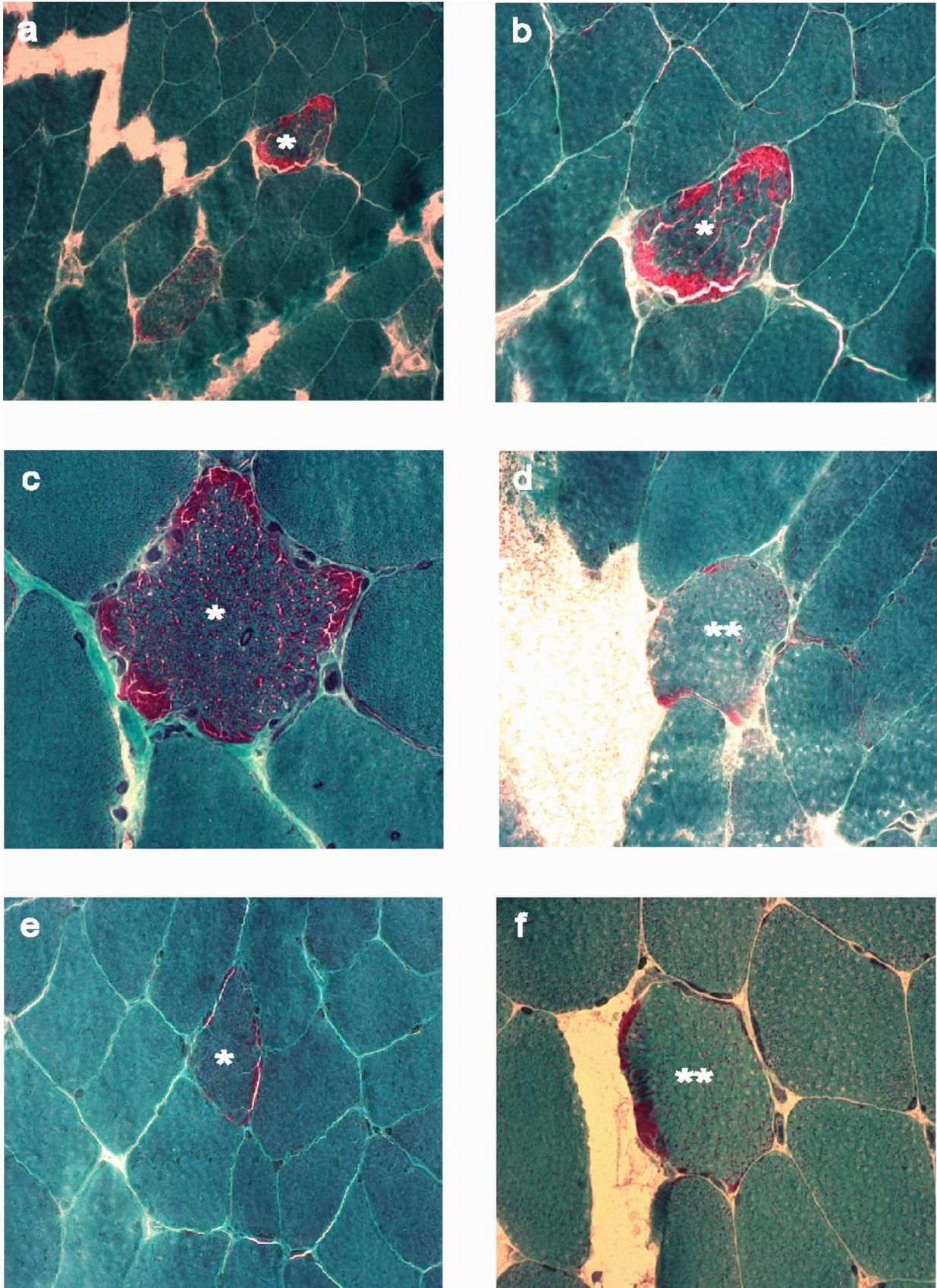


Abbildung 13: Myohistologische Veränderungen in der modifizierten Gomori-Trichrom Färbung. a-c und e zeigen typische RRF (\*), die sowohl die typische rote Anfärbung als auch die zerrissene Struktur der Muskelfaser zeigen; in d und f sind Muskelfasern dargestellt (\*\*), die zwar eine rote Anfärbung aufweisen, jedoch nicht die typische zerrissene Struktur aufweisen und somit nicht als RRF gewertet wurden

## 4 Diskussion

### 4.1 Beziehungen zwischen dem Alter und der Anzahl der betroffenen Muskelfasern

Wie bereits in der Einleitung erwähnt werden RRF und CNF nicht nur bei Mitochondriopathien, sondern auch bei gesunden Patienten im Alter beschrieben. So wurde bei gesunden Patienten im Alter zwischen 60 und 90 Jahren in 66 – 83 % in der Muskulatur der Extremitäten und in 75 – 100 % im Diaphragma CNF gefunden [73]. Auch RRF wurden bei gesunden Kontrollen beobachtet [18]. Daher wurden in der Arbeit ebenfalls 16 gesunde Patienten untersucht, um sowohl mitochondriopathietypische myohistologische Veränderungen zu zeigen, als auch die Altersverteilung zu beobachten.

Es konnten im eigenen Patientengut ebenfalls in den gesunden Kontrollen CNF und bei einem Patienten RRF nachgewiesen werden. Der Durchschnitt an CNF betrug in der Gruppe 0,14 %, der der RRF 0,01 %. Der Alterdurchschnitt in dieser Gruppe lag bei 48 Jahren und entspricht in etwa dem Durchschnitt der Patienten mit Mitochondriopathie.

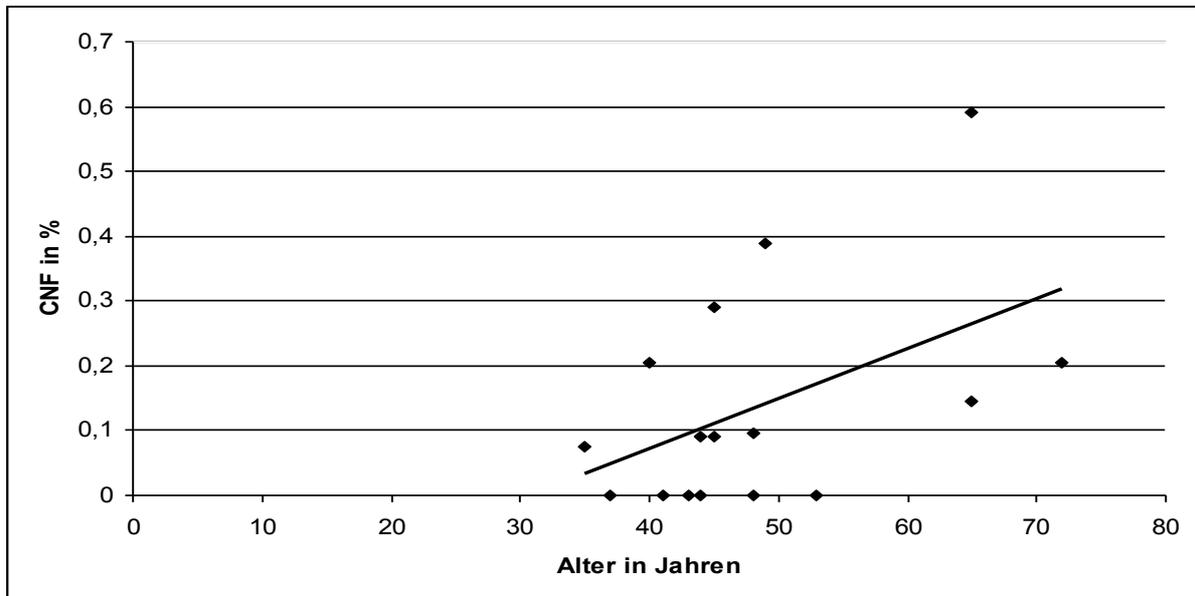


Abbildung 14: Alterskorrelation der gesunden Kontrollen; auf der x-Achse ist das Alter aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der CNF in %; die Korrelationsgrade zeigt einen Anstieg der CNF mit zunehmendem Alter, der jedoch statistisch nicht signifikant ist ( $p=0,057$ ,  $r=0,48$ )

In den untersuchten gesunden Kontrollen scheint ebenfalls ein Zusammenhang des Alters und der CNF zu bestehen, was in Abbildung 14 dargestellt ist. Der Zusammenhang ist statistisch jedoch knapp nicht signifikant ( $p=0,057$ ), der Korrelationskoeffizient  $r$  mit 0,48 eher gering.

Dies kann allerdings an der kleinen Gruppe der gesunden Kontrollen liegen ( $n=16$ ). Es konnte also sowohl einen Anstieg der CNF mit zunehmenden Alter, als auch mitochondriopathietypische myohistologische Veränderungen bei gesunden Kontrollen gezeigt werden.

Bei den Patienten mit Mitochondriopathien konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Anzahl der betroffenen Muskelfasern in der Muskelbiopsie hergestellt werden. Der Korrelationskoeffizient beträgt  $-0,14$  für die CNF und  $0,01$  für die RRF. Sowohl für die CNF als auch für die RRF konnte keine statistische Signifikanz mit dem Alterszusammenhang gezeigt werden (CNF:  $p=0,29$ ; RRF:  $p=0,97$ ). Das Ergebnis ist in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

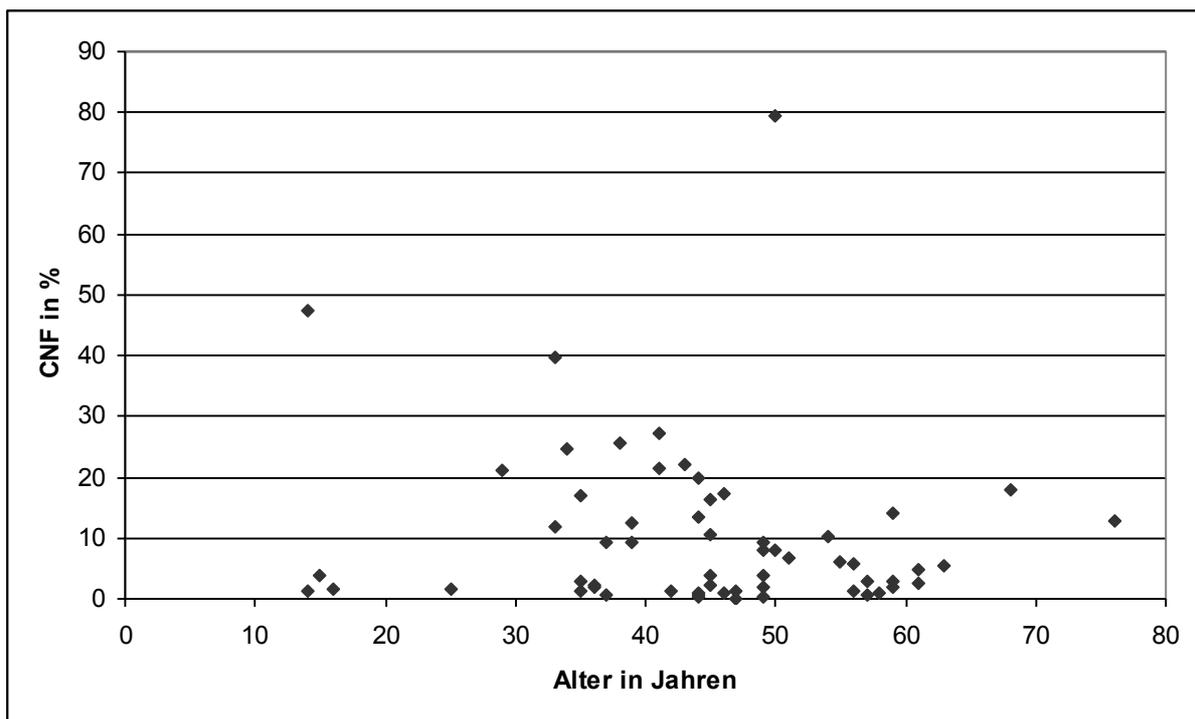


Abbildung 15: Alterskorrelationen der Patienten mit Mitochondriopathie; auf der x-Achse ist das Alter aufgetragen, auf der y-Achse die betroffenen CNF in %. Die Grafik zeigt, dass keine Korrelation zwischen dem Alter und den betroffenen Fasern besteht (CNF:  $p=0,29$ ;  $r=-0,14$ )

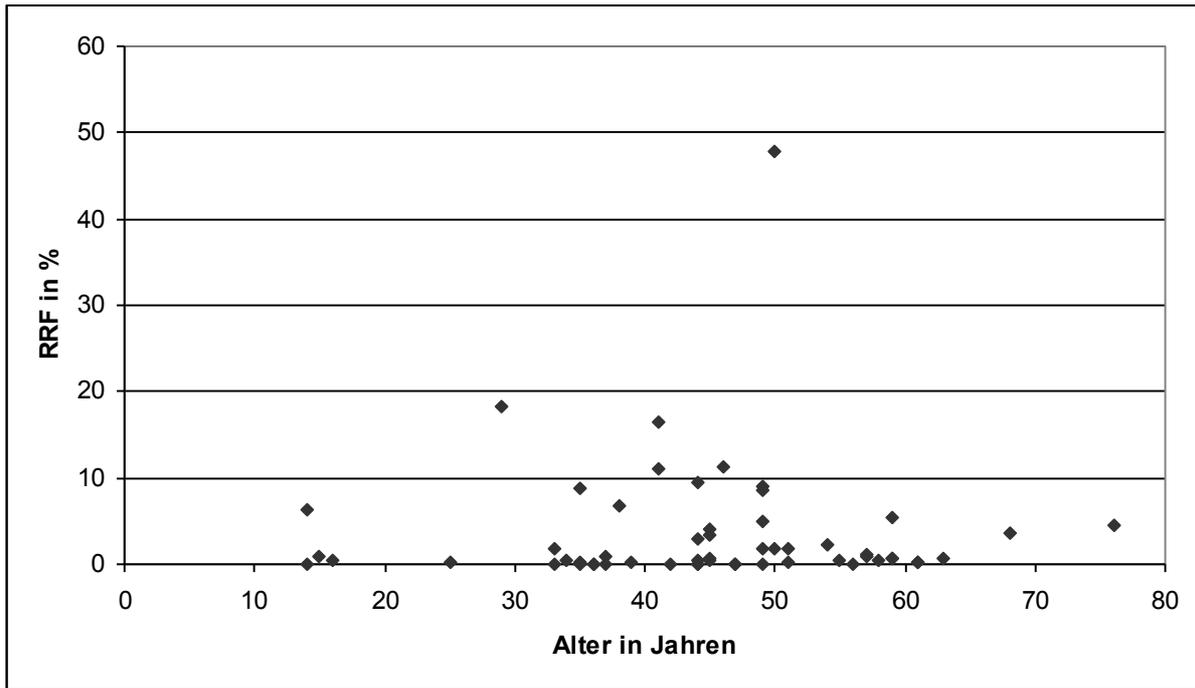


Abbildung 16: Alterskorrelationen der Patienten mit Mitochondriopathie; auf der x-Achse ist das Alter aufgetragen, auf der y-Achse die betroffenen RRF in %. Die Grafik zeigt, dass keine Korrelation zwischen dem Alter und den betroffenen Fasern besteht (RRF:  $p=0,97$ ;  $r=0,01$ )

### 4.1.1 Vergleich der RRF und CNF bei Patienten mit Mitochondriopathien $\geq 50$ Jahre und $< 50$ Jahre

Um die Verteilung der RRF und CNF bei Patienten mit Mitochondriopathien im Bezug auf das Alter noch weiter zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Patienten mit einem Alter größer 50 Jahre und darunter verglichen. Auch hier wurden die Werte der CNF und der RRF getrennt voneinander betrachtet.

Es wurden 18 Patienten mit RRF untersucht die älter oder gleich 50 Jahre alt waren. Jünger waren 37 Patienten. Der Durchschnitt der ausgezählten RRF bei den Patienten  $\geq 50$  Jahre betrug 0,83 %. Der Durchschnitt in der Gruppe  $< 50$  Jahre betrug 0,7 %. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,3778$ ). Das Ergebnis wird in Abbildung 17 gezeigt.

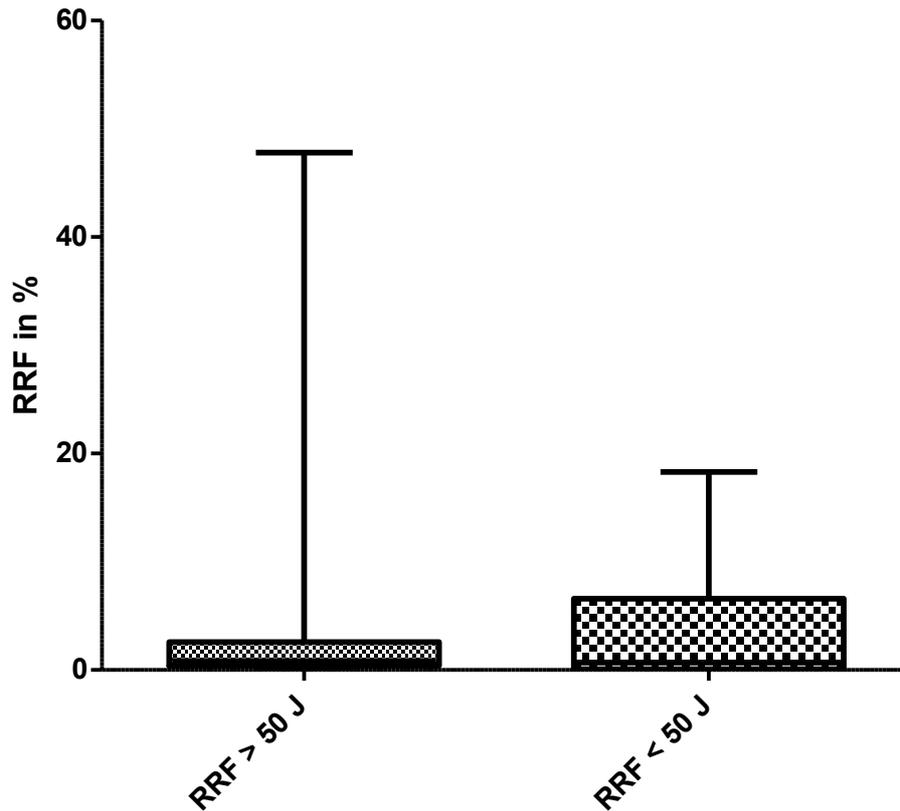


Abbildung 17: RRF bei Patienten mit Mitochondriopathien  $\geq 50$  Jahre und  $< 50$  Jahre; links die Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt  $\geq 50$  Jahre alt waren, rechts die Patienten  $< 50$  Jahre; auf der y-Achse sind die RRF in % aufgetragen (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Analog hierzu wurden die CNF bei Patienten mit Mitochondriopathien  $\geq 50$  Jahre und  $< 50$  Jahre betrachtet. Hier wurden 18 Patienten  $\geq 50$  Jahre und 41  $< 50$  Jahre untersucht. Der Durchschnitt der älteren Gruppe betrug 5,6 % CNF. Der Durchschnitt bei den Patienten  $< 50$  Jahre betrug 4 % CNF. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,2316$ ). Abbildung 18 zeigt das Ergebnis.

Bei den hier vorgestellten Patienten mit Mitochondriopathien handelt es sich um die Patienten mit der Punktmutation 3243A>G, den Patienten mit den Punktmutationen 8344A>G, 11778A>G, 7497G>A sowie den Patienten mit singulären und multiplen Mutationen der mtDNA.

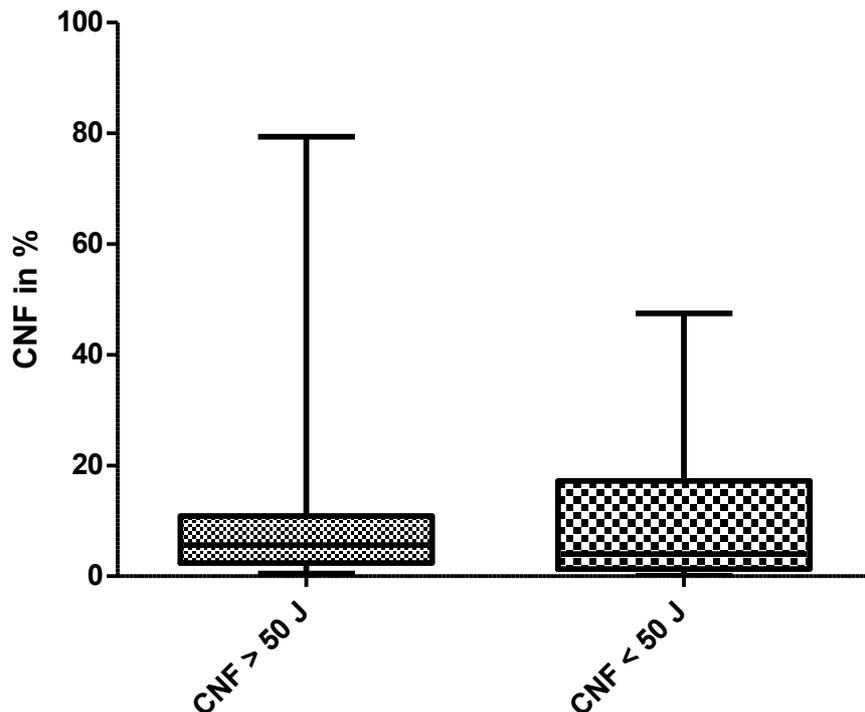


Abbildung 18: CNF bei Patienten mit Mitochondriopathien  $\geq 50$  Jahre und  $< 50$  Jahre; links die Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt  $\geq 50$  Jahre alt waren, rechts die Patienten, die  $< 50$  Jahre alt waren; der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,23$ ) (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Bei Patienten ohne Mitochondriopathien wird ein Anstieg der RRF und CNF mit zunehmendem Alter beobachtet. Die Ursache wird in einem Defekt der mitochondrialen Atmungskette mit Generierung freier Radikale vermutet [58, 73]. Bei den untersuchten gesunden Kontrollen findet sich der Anstieg der CNF mit zunehmendem Alter bestätigt. Auch für die Patienten mit Mitochondriopathie wird eine Zunahme der betroffenen CNF und RRF mit steigendem Alter vermutet und entsprechend größere Prozentzahlen an Fasern bei älteren Patienten für die Diagnosestellung gefordert [65]. In den hier untersuchten Patienten mit Mitochondriopathie konnte ein Anstieg der RRF und CNF mit zunehmendem Alter der Patienten nicht bestätigt werden. Eine Entsprechende Forderung nach höheren Prozentzahlen mit zunehmendem Alter zur Diagnosestellung ist also kritisch zu überdenken, da bei den gesunden Kontrollen eine entsprechender Anstieg gezeigt werden konnten, wenn auch nicht statistisch signifikant.

### 4.2 Vergleich der CNF und RRF in paretischen und nichtparetischen Muskeln bei Patienten mit Mitochondriopathien

Bisher liegen wenige Studien zur Beziehung der Anzahl der betroffenen Muskelfasern bei Patienten mit Mitochondriopathien und dem Paresegrad des biopsierten Muskels vor. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte bisher nicht gezeigt werden [16]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Zusammenhang untersucht, um gegebenenfalls eine Beziehung aufzuzeigen.

Bei den meisten Patienten mit Mitochondriopathien konnte wir anhand der Arztbriefe und der myohistologischen Befunde sowohl der biopsierte Muskel, als auch der Paresegrad des biopsierten Muskels ermittelt werden. Es wurden die Werte sowohl für die CNF als auch für die RRF verglichen. In dem hier vorgestellten Patientengut der Patienten mit Mitochondriopathien handelt es sich um die Patienten mit der Punktmutation 3243A>G, Patienten mit singulären und multiplen Deletionen.

#### 4.2.1 Vergleich der CNF in paretischen und nichtparetischen Muskeln

Zuerst wird der Vergleich der CNF aus paretischen und nichtparetischen Muskelfasern vorgestellt. Der Stichprobenumfang ist jedoch insgesamt klein. So wurden nur 9 Proben aus paretischen Muskeln biopsiert, dem stehen 34 aus klinisch unauffälligem Muskel gegenüber. Der Durchschnitt der CNF aus paretischen Muskeln beträgt 8 %. Der Durchschnitt der CNF aus klinisch unauffälligem Muskel beträgt 6,15 %. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis.

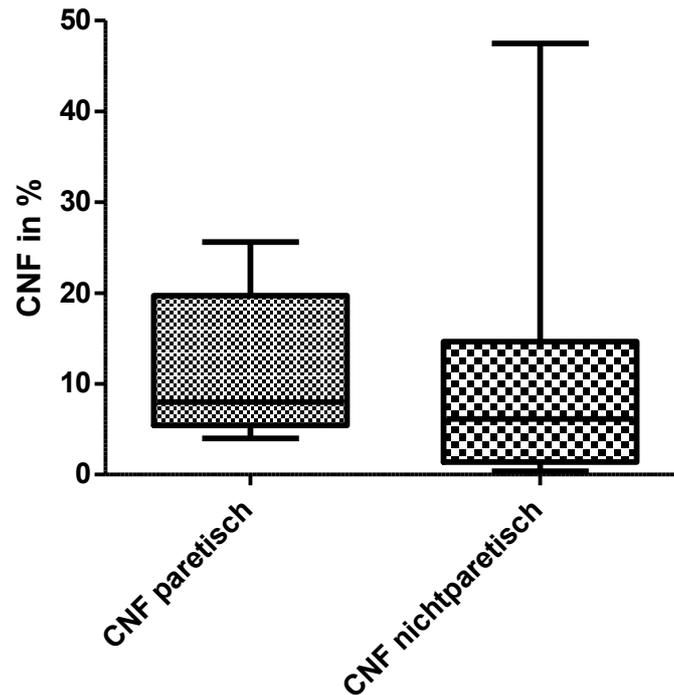


Abbildung 19: CNF aus biopsierten paretischen und nichtparetischen Muskeln bei Patienten mit Mitochondriopathien; links das Ergebnis der 9 Patienten, deren Biopsie aus einem paretischen Muskel gewonnen wurde; rechts das Ergebnis der 34 Patienten, deren Biopsie aus klinisch unauffälligem Muskel gewonnen wurde; der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,4675$ ) (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Vergleicht man nun die zwei Gruppen gegeneinander, so ist der Unterschied der CNF bei Patienten mit Mitochondriopathien in paretischen und nichtparetischen Muskeln statistisch nicht signifikant ( $p=0,4675$ ).

### 4.2.2 Vergleich der RRF in paretischen und nichtparetischen Muskeln

Analog der CNF wurden auch die RRF hinsichtlich der Biopsie aus paretischen und nichtparetischen Muskeln untersucht. Auch hier war der Stichprobenumfang vor allem die RRF aus paretischen Muskeln betreffend klein. Es wurden 9 Patienten aus paretischen Muskeln biopsiert, bei 32 erfolgte die Muskelbiopsie aus klinisch unauffälliger Muskulatur.

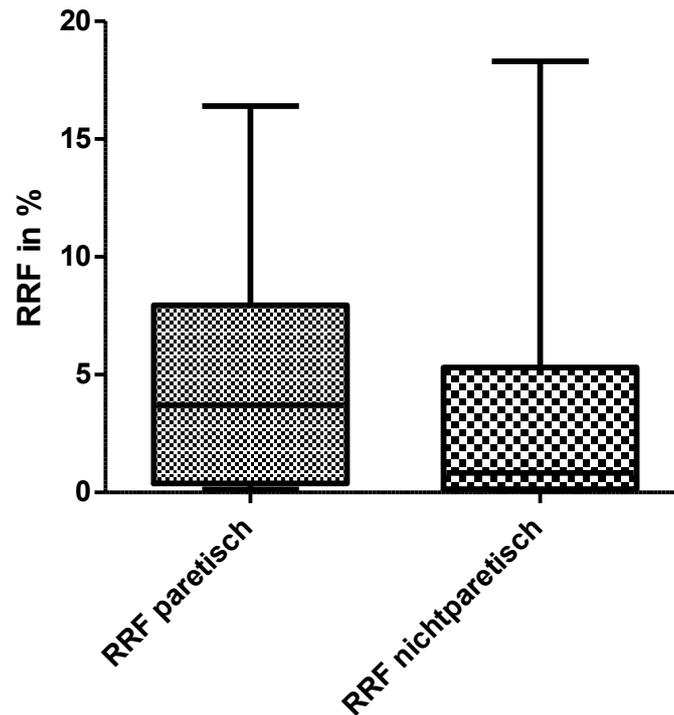


Abbildung 20: RRF aus biopsierten paretischen und nichtparetischen Muskeln bei Patienten mit Mitochondriopathien; links 9 Patienten, deren Biopsie aus einem paretischen Muskel gewonnen wurde, rechts 32 Patienten, bei denen die Biopsie aus klinisch unauffälligem Muskel gewonnen wurde. Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,3634$ ) (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Auch hier ist der Unterschied in den zwei Gruppen statistisch nicht signifikant ( $p=0,3634$ ).

Es muss jedoch festgestellt werden, dass in beiden Gruppen der Umfang der Gruppe, in dem aus paretischen Muskeln eine Biopsie gewonnen wurde klein ist (n jeweils 9).

### 4.3 Diagnosestellung einer Mitochondriopathie über die Muskelbiopsie

Wie schon in der Einleitung erwähnt ist die Diagnosestellung einer Mitochondriopathie aufgrund der genetischen Heterogenität, der verschiedenen Phänotypen und des fehlen eines diagnostischen Goldstandards schwierig. Vor allem wenn andere Regionen als die Skelettmuskulatur oder das zentrale Nervensystem primär betroffen sind ist die frühzeitige Diagnose sehr schwierig [74]. Mehrere Arbeiten beschreiben die Muskelbiopsie mit dem Nachweis von RRF oder CNF als bestes diagnostisches Mittel [11, 55].

Rollins et al. beschreiben in ihrer Arbeit hingegen spezifische Veränderungen für Mitochondriopathien in der Lichtmikroskopie nur bei einer Minderheit der untersuchten Fälle. So fanden sie nur bei 2,5 % der untersuchten Patienten RRF in der Gomori-Trichrom Färbung und in 6,8 % der Fälle CNF. Hier muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass nur Patienten untersucht wurden, bei denen klinisch eine Mitochondriopathie vermutet wurde und der Altersdurchschnitt der untersuchten Patienten bei zwölf Jahren lag [75].

Wie in der Einleitung erwähnt ist die kombiniert-sequentielle COX-SDH Färbung ein gutes Mittel, um eine mtDNA Mutation aufzuzeigen. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten mit Punktmutationen oder Deletionen der mtDNA ließen sich bei allen CNF in der kombiniert-sequentiellen COX-SDH Färbung nachweisen. Die Bandbreite der Ergebnisse ist jedoch sehr groß und reicht von 0,2% CNF bis zu 79,4 % CNF. Der niedrigste Wert von 0,02 % wurde bei einem Patienten mit LHON ermittelt. Da die zugrunde liegende LHON-Mutation 11778 in einer Komplex I-Untereinheit liegt und nicht die COX betrifft, muss man davon ausgehen, dass bei diesem Patienten kein kausaler Zusammenhang besteht. Wie in der Literatur beschrieben und bereits erwähnt waren auch in den hier untersuchten gesunden Kontrollen sowie bei Patienten mit Myositis und ALS vereinzelte CNF nachweisbar.

Von Bernier et al. wurden als ein Major-Kriterium zur Diagnosesicherung einer Mitochondriopathie > 2 % CNF gefordert. Dieser Cutt Off-Wert wurde ebenfalls für das eigene Patientengut benutzt. Es wurden alle untersuchten Patienten mit Mitochondriopathie in einer Gruppe zusammengestellt und diese zunächst nur den gesunden Kontrollen gegenüber gestellt.

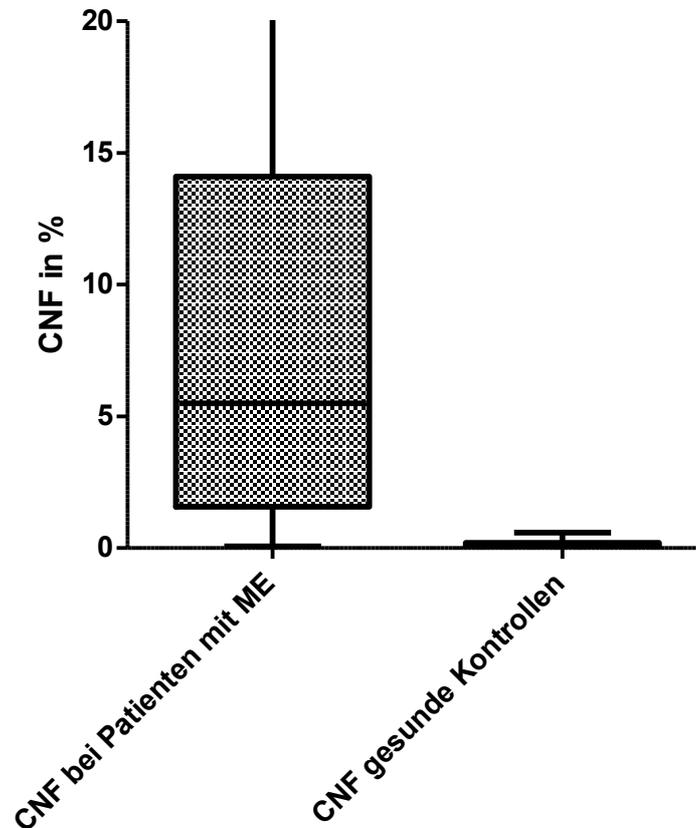


Abbildung 21: CNF bei Patienten mit Mitochondriopathie und bei gesunden Kontrollen; links die Werte für die CNF bei den Patienten mit Mitochondriopathie, rechts die gesunden Kontrollen (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Der Durchschnitt der CNF bei allen untersuchten Patienten mit Mitochondriopathie (n=59) betrug 10,23 %. Der Durchschnitt in den gesunden Kontrollen (n=16) betrug 0,136 % CNF.

Benutzt man 2 % als Cut Off Wert so ergibt sich eine Sensitivität von 0,69 und eine Spezifität von 1. Die Gruppe unserer gesunden Kontrollen ist mit 16 Patienten allerdings nicht sehr groß. Da wie oben beschrieben auch bei anderen Erkrankungen CNF und RRF beschrieben werden wurden die CNF der Patienten mit Mitochondriopathien nicht nur den gesunden, sondern allen Kontrollgruppen gegenübergestellt, das heißt neben den gesunden Kontrollen auch den Patienten mit Myositis und ALS. Da die schon vorher bestimmte Sensitivität für 2 % CNF bei lediglich 0,69 lag, wurde hier 1 % CNF als Cut Off Wert gewählt. So lag dann die Sensitivität für 1 % CNF als diagnostisches Kriterium zur Feststellung einer

Mitochondriopathie bei 0,86. Die Spezifität lag bei 0,85. Der positiv prädiktive Wert lag bei 0,89.

Die RRF werden ebenfalls als gutes diagnostisches Kriterium für eine Mitochondriopathie beschrieben [65]. Es wurden zunächst alle Patienten mit Mitochondriopathie den gesunden Kontrollen gegenübergestellt und auf das Vorhandensein jeglicher RRF getestet. Hier zeigte sich für das Vorhandensein von RRF bei Patienten mit Mitochondriopathie eine Sensitivität von 0,86 und Spezifität von 0,94. Der positive prädiktive Wert lag bei 0,98.

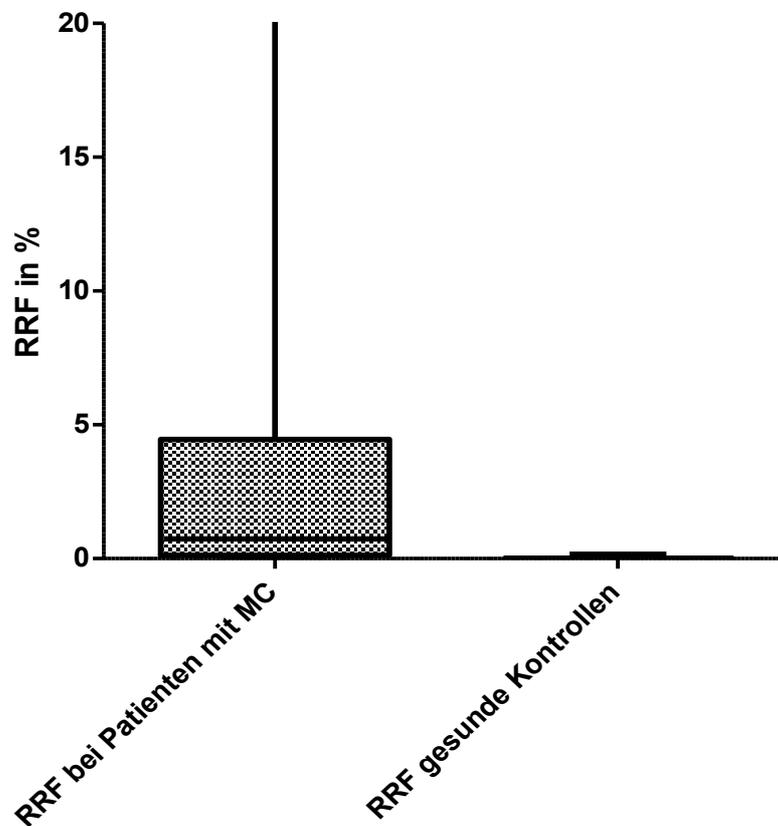


Abbildung 22: RRF bei Patienten mit Mitochondriopathie und bei gesunden Kontrollen; links die RRF bei Patienten mit Mitochondriopathie, rechts die RRF bei unseren gesunden Kontrollen (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Auch für die RRF wurden die Patienten mit Mitochondriopathie zusätzlich allen Kontrollgruppen gegenüber gestellt und die Gruppen auf RRF als diagnostisches Kriterium überprüft.

So ergab sich für das Vorhandensein von RRF als diagnostisches Kriterium für Patienten mit Mitochondriopathie eine Sensitivität von 0,86. Die Spezifität betrug 0,82 und der positiv prädiktive Wert lag bei 0,87.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass das Vorhandensein von 1 % CNF in einem Muskelpräparat in der kombiniert sequentiellen COX-SDH-Färbung ein gutes diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer Mitochondriopathie darstellt. Es darf jedoch nicht das einzige Kriterium bleiben, sondern es müssen weitere, beispielsweise klinische Kriterien vorliegen.

Das Vorhandensein von RRF ist ebenfalls ein gutes diagnostisches Kriterium zur Diagnosestellung einer Mitochondriopathie. Da sich aber auch bei Patienten mit Myositis vereinzelt RRF in der Muskelbiopsie fanden, was so auch von Rifai et al. vorbeschrieben war [57], kann auch hier das Vorhandensein von RRF in einer Muskelbiopsie nicht das alleinige diagnostische Kriterium bleiben. Auf der anderen Seite illustriert z.B. das Fehlen von RRF in der Muskelprobe einer Patientin mit MERRF die Problematik der begrenzten Sensitivität der myohistologischen Untersuchung. Selbst beim MERRF-Syndrom, bei dem der Nachweis der RRF namensgebend war, können RRF manchmal fehlen [26]. Erst durch den Nachweis vieler CNF (39,8 %) fanden sich bei dieser Probe klare Hinweise auf eine Mitochondriopathie.

Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit ist es daher in der Routinediagnostik wichtig, sowohl eine modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung, als auch eine kombiniert sequentielle COX-SDH-Färbung durchzuführen.

Schließlich zeigen die Ergebnisse, dass bei klinischem Verdacht auf eine Mitochondriopathie trotz nicht über das normale Maß hinausgehenden myohistologischen mitochondrialen Veränderungen eine molekulargenetische Diagnosesicherung möglich ist. Daher sollte bei Patienten, die beispielsweise das klassische Bild einer CPEO zeigen, trotz eines unauffälligen Muskelbiopsiebefundes stets eine molekulargenetische Untersuchung der mtDNA hinsichtlich Mutationen oder Deletionen erfolgen.

### 4.4 Vergleich der myohistologischen Veränderungen der Patienten mit Myositis und der gesunden Kontrollen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt zeigen auch Patienten mit Verschiedenen Formen der Myositis Veränderungen in der Muskelbiopsie, die sonst als typische Veränderungen bei Patienten mit Mitochondriopathien beschrieben sind [76].

Rifai et al. beobachteten RRF bei untersuchten gesunden Kontrollen sowie bei Patienten mit Myositis [57]. Die Anzahl an gefundenen RRF bei Patienten mit Myositis wird hier ohne Unterschied zu den altersgleichen gesunden Kontrollen angegeben. RRF zeigten sich bei den untersuchten gesunden Kontrollen in wesentlich höherem Maße bei älteren Patienten (0,33 % RRF bei einem Altersdurchschnitt von 67 Jahren) als bei den jüngeren Patienten (0,02 % RRF bei einem Altersdurchschnitt von 25 Jahren), so dass hier die Vermutung aufgestellt wird, dass die Anzahl von RRF mit dem Alter ansteigt. Weiterführend wird von Rifai et al. postuliert, dass das Vorhandensein von RRF in einer Muskelbiopsie nicht als singuläres Kriterium herangezogen werden sollte, eine mitochondriale Myopathie zu diagnostizieren, insbesondere bei älteren Patienten.

Oldfors et al. beschreiben eine größere Anzahl CNF bei Patienten mit Einschlusskörpermyositis im Vergleich zu altersgleichen gesunden Kontrollen. Hier wurden drei Patienten mit Einschlusskörpermyositis untersucht (39, 60 und 71 Jahre alt), die alle 2-5 % CNF aufwiesen. Die untersuchten Zellen zeigten eine große Anzahl mtDNA Deletionen [76]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten gesunden Kontrollen (insgesamt 9 Patienten) wurden weniger als 1 % CNF beobachtet.

Brierley et al. konnten zeigen, dass CNF von gesunden älteren Patienten große Mengen mutierter mtDNA enthielten. Im Gegenzug wurde bei keiner untersuchten Cytochrom-c-Oxidase positiven Muskelfaser ein Anhalt für mutierte mtDNA gefunden. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass mtDNA Mutationen eine große Rolle bei der altersabhängigen Verschlechterung der Muskelfunktion haben [58].

Von uns wurden insgesamt 8 Patienten mit verschiedenen Formen von Myositis untersucht, zwei litten an Einschlusskörpermyositis, zwei an Dermatomyositis und vier an Polymyositis. Der Durchschnitt der ausgezählten CNF betrug 4,46 %, der an RRF betrug 0,38 %. Das Durchschnittsalter der Gruppe betrug 66 Jahre.

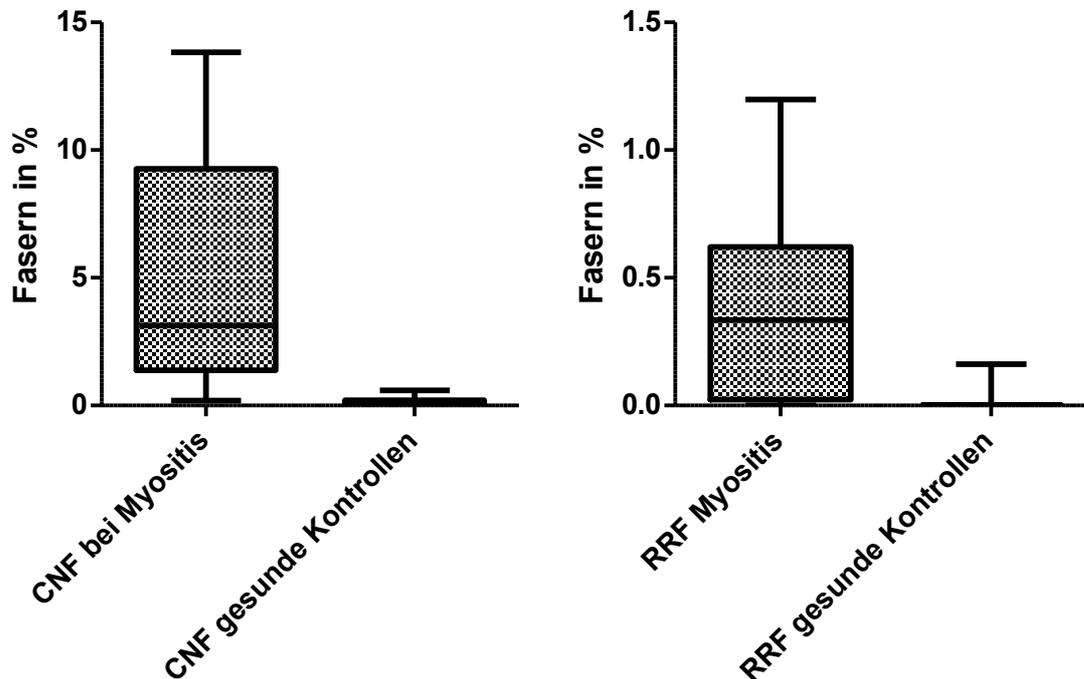


Abbildung 23: CNF und RRF bei Patienten mit Myositis und bei den gesunden Kontrollen; links CNF bei unseren gesunden Kontrollen im Vergleich mit CNF bei den untersuchten Patienten mit Myositis; rechts analog die RRF bei gesunden und bei unseren Myositis-Patienten (angegeben sind hier Minimum und Maximum, unteres und oberes Quartil sowie der Median)

Es konnte im eigenen Patientengut im Vergleich der CNF bei Patienten mit Myositis und bei den gesunden Kontrollen ein statistisch signifikanter Unterschied der Fasern gezeigt werden. Im Vergleich der RRF bei unseren Myositispatienten und den gesunden Kontrollen ist der Unterschied statistisch nicht signifikant.

Wie in der Literatur vorbeschrieben finden sich CNF und RRF auch bei Patienten mit Myositis. Im Vergleich zu unseren gesunden Kontrollen zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede, im Fall der CNF sogar statistisch signifikant. Dies bestätigt die These, dass CNF und RRF für die Diagnosestellung einer mitochondrialen Enzephalomyopathie nicht das einzige diagnostische Kriterium sein können. Die Ursache der gemeinsamen myohistologischen Veränderungen bei

Mitochondriopathien und Myositis ist nach wie vor unklar. Ein Defekt in den nDNA Genen POLG1, ANT1 und C10orf2, die mit multiplen Deletionen der mtDNA assoziiert sind wurde bei Patienten mit Myositis ausgeschlossen [77]. Eine Beeinträchtigung des Elektronentransports in der Atmungskette konnte für Patienten mit Dermatomyositis, die in der Muskelbiopsie typische Veränderungen für Mitochondriopathien zeigten, ebenfalls ausgeschlossen werden [78].

Was erwähnt werden muss, ist dass die Auswertung der Muskelpräparate der Patienten mit Myositis aufgrund der myositisspezifischen Veränderungen, wie die Degeneration der Muskelfaser sowie die perivenöse Infiltrate von Plasmazellen [79], deutlich erschwert war.

### 4.5 Myohistologische Veränderungen bei Patienten mit ALS

Da der Zusammenhang zwischen Defekten der Mitochondrien und neurodegenerativen Erkrankungen, so auch der amyotrophen Lateralsklerose diskutiert wird [39, 80], wurden 17 Patienten mit ALS auf das Vorliegen von mitochondriopathietypischen myohistologischen Veränderungen untersucht. Es fanden bei diesen Patienten durchschnittlich 0,19 % CNF, was in etwa dem Durchschnitt unserer gesunden Kontrollgruppe von 0,14 % CNF entspricht. RRF konnten bei keinem Patienten mit ALS in der Muskelbiopsie gefunden werden. Somit konnte festgestellt werden, dass RRF und CNF kein histologisches Zeichen einer ALS sind.

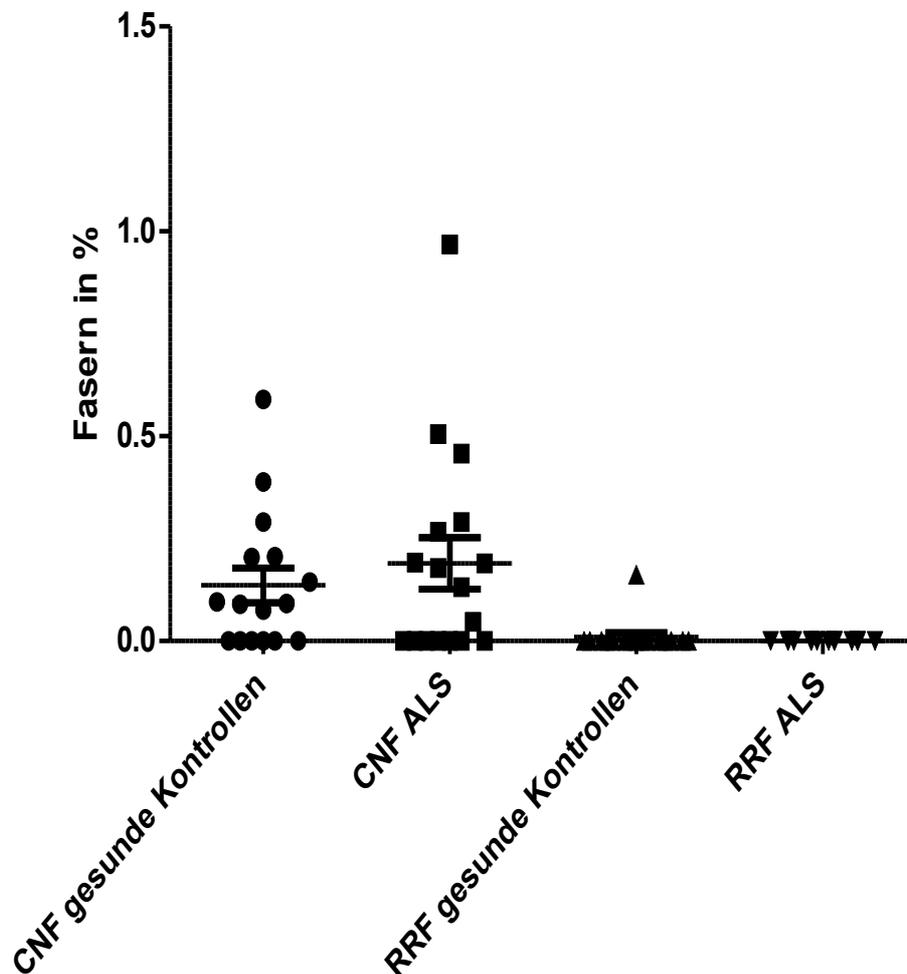


Abbildung 24: Vergleich der Ergebnisse der gesunden Kontrollen und der Patienten mit ALS; ganz links die CNF unserer gesunden Kontrollen, daneben die CNF bei den Patienten mit ALS, daneben die RRF unserer gesunden Kontrollen neben den RRF der Patienten mit ALS (angegeben sind hier neben den Einzelwerten der Mittelwert und die Standardabweichung)

#### 4.6 Problematik von Ragged-red like- und intermediären Fasern

Wie bereits erwähnt gelten RRF und CNF als gutes Mittel um typische myohistologische Veränderungen bei Mitochondriopathien aufzuzeigen [11, 55]. Die Auswertung der Muskelpräparate in der Praxis gestaltet sich jedoch manchmal schwierig. Ursache hierfür sind einerseits die unterschiedliche Qualität der angefertigten Muskelpräparate, andererseits auch die Unsicherheit der Deklaration der einzelnen Fasern. Im Material und Methoden-Teil wurden die genauen Kriterien

für CNF und RRF beschrieben, es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es Zwischentypen geben kann. Im Fall der RRF wird von Ragged-red like Fasern gesprochen. Diese zeigen eine subsarcolemmale Anreicherung des roten Farbstoffes, jedoch keine typische zerrissene Struktur. Bei den CNF gibt es die so genannten intermediären Fasern, die sich nicht komplett blau anfärben, sondern noch deutliche braune Anteile in derselben Muskelfaser zeigen und nicht komplett COX-negativ sind. In den analysierten Schnitten waren sowohl die Ragged-red-like-Fasern als auch intermediäre COX-Fasern in vielen Präparaten zu erkennen. Da bei diesen Fasern aber der Übergang zum Normalen fließend ist und keine klare Unterscheidung möglich ist, wurde auf eine Analyse verzichtet.

### 5 Zusammenfassung

Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Mitochondriopathien ist die Diagnosestellung vielfach schwierig [81]. Da die Prävalenz der Erkrankung bislang unterschätzt wurde, ist die Etablierung eines diagnostischen „Goldstandards“ wichtig. Die Muskelbiopsie gilt als eins der sichersten Mittel, um eine Mitochondriopathie zu diagnostizieren [41, 48, 82], obwohl typische histologische Kriterien für die Mitochondriopathien wie RRF und CNF auch bei gesunden Patienten höheren Alters, sowie anderen neuromuskulären Erkrankungen (u.a. verschiedenen Formen der Myositis und ALS) beschrieben werden [57, 60]. In der vorliegenden Arbeit sollen anhand eines großen Patientenkollektivs die Veränderungen in der Muskelbiopsie quantifiziert werden und so Rückschlüsse auf die Sensitivität und Spezifität der RRF und CNF als diagnostisches Kriterium gezogen werden. Hiefür wurden Patienten mit Mitochondriopathien untersucht, denen verschiedene Gendefekte zugrunde lagen. Des Weiteren wurden die CNF und RRF bei einer gesunden Kontrollgruppe sowie bei Patienten mit Myositis und ALS quantifiziert. Fordert man für Patienten mit genetisch gesicherten Mitochondriopathien  $\geq 1\%$  CNF in der kombiniert sequentiellen COX-SDH Färbung als diagnostischen Cut-Off Wert, so liegt die Sensitivität bei 0,86, die Spezifität bei 0,85 und der positiv prädiktive Wert bei 0,89. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Vorhandensein von  $\geq 1\%$  CNF in einer Muskelbiopsie ein gutes diagnostisches Kriterium ist. Analog zu den CNF wurden die Patienten in der modifizierten Gomori-Trichrom Färbung auf RRF untersucht. Hier wurde überhaupt schon das Vorhandensein einer RRF als Kriterium bewertet und hierfür in dem Patientengut eine Sensitivität von 0,86, eine Spezifität von 0,94 und ein positiv prädiktiver Wert von 0,98 festgestellt. So lässt sich abschließend sagen, dass RRF eine sehr hohe Spezifität für das Vorliegen einer Mitochondriopathie besitzen.

Da in der Literatur CNF und RRF bei Patienten mit Mitochondriopathien mit zunehmendem Alter und auch bei gesunden Älteren gehäuft beschrieben werden [18, 58, 65, 73] untersuchten wird die Altersbeziehungen in unseren Patientengruppen. In der Gruppe der gesunden Kontrollen konnten wenige CNF und lediglich bei einem von sechzehn untersuchten Patienten RRF nachgewiesen werden. Die Anzahl der CNF war mit steigendem Alter ebenfalls zunehmend, die

Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant und der Korrelationskoeffizient betrug 0,48. Des Weiteren wurden in der Gruppe der Patienten mit Mitochondriopathien die Verteilung der CNF und RRF jeweils auf das Alter Bezug nehmend untersucht. Hier zeigte sich eine Normalverteilung der pathologischen Muskelfasern, so dass sich eine Zunahme der CNF und RRF bei Patienten mit Mitochondriopathien im Alter nicht bestätigen lässt.

Bei Patienten mit verschiedenen Formen der Myositis sind mitochondriopathietypische Veränderungen wie RRF und CNF in der Muskelbiopsie beschrieben [57, 62, 63, 76]. Auch die untersuchten Patienten mit Myositis wiesen diese Veränderungen auf. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen war die Anzahl der CNF statistisch signifikant erhöht. Auch die Zahl der RRF war im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, statistisch jedoch nicht signifikant.

Da ein Zusammenhang zwischen Defekten der Mitochondrien und neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert wird [39, 80] wurden Patienten mit amyotropher Lateralsklerose auf das Vorliegen von RRF und CNF untersucht. Dabei fanden wir 0,19 % CNF, was in etwa unseren gesunden Kontrollen (0,14 % CNF) entspricht und keine RRF. Dies zeigt, dass CNF und RRF kein histologisches Zeichen einer ALS sind.

Es gibt bisher wenige Studien zur Frage des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der RRF und CNF sowie des Paresegrades der biopsierten Muskulatur. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Werte der CNF und RRF bei Patienten mit Mitochondriopathien, die aus paretischen und nicht paretischen Muskeln gewonnen wurden, verglichen. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Paresegrad der Muskulatur und der absoluten Anzahl der CNF und RRF gezeigt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Schon EA, Manfredi G: **Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction.** *J Clin Invest* 2003, **111**:303-312.
2. Stryer L: Biochemie. 3.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1996.
3. Schapira AH: **The "new" mitochondrial disorders.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, **72**:144-149.
4. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G: **Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1366**:151-165.
5. Finsterer J: **Mitochondriopathies.** *Eur J Neurol* 2004, **11**:163-186.
6. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, et al: **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** *Nature* 1981, **290**:457-465.
7. Cormio A, Milella F, Vecchiet J, Felzani G, Gadaleta MN, Cantatore P: **Mitochondrial DNA mutations in RRF of healthy subjects of different age.** *Neurobiol Aging* 2005, **26**:655-664.
8. Schapira AH, Cock HR: **Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies.** *Eur J Clin Invest* 1999, **29**:886-898.
9. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: **Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies.** *Nature* 1988, **331**:717-719.
10. DiMauro S, Schon EA: **Mitochondrial respiratory-chain diseases.** *N Engl J Med* 2003, **348**:2656-2668.
11. Zeviani M, Di Donato S: **Mitochondrial disorders.** *Brain* 2004, **127**:2153-2172.
12. Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, et al: **Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia.** *Ann Neurol* 2002, **52**:211-219.
13. Zierz S, von Wesebe O, Gerbitz KD, Jerusalem F: **[Ophthalmoplegia-plus: clinical variability, biochemical defects of the mitochondria respiratory chain and deletions of the mitochondria genome].** *Nervenarzt* 1990, **61**:332-339.
14. Deschauer M, Bamberg C, Claus D, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW: **Late-onset encephalopathy associated with a C11777A mutation of mitochondrial DNA.** *Neurology* 2003, **60**:1357-1359.
15. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM: **Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes.** *Brain* 1997, **120 ( Pt 10)**:1713-1721.
16. Laforet P, Lombes A, Eymard B, Danan C, Chevally M, Rouche A, Frachon P, Fardeau M: **Chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers: clinical, morphological and genetic investigations in 43 patients.** *Neuromuscul Disord* 1995, **5**:399-413.
17. Deschauer M, Hudson G, Muller T, Taylor RW, Chinnery PF, Zierz S: **A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia.** *Neuromuscul Disord* 2005, **15**:311-315.

18. Larsson B, Bjork J, Henriksson KG, Gerdle B, Lindman R: **The prevalences of cytochrome c oxidase negative and superpositive fibres and ragged-red fibres in the trapezius muscle of female cleaners with and without myalgia and of female healthy controls.** *Pain* 2000, **84**:379-387.
19. Servidei S: **Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation.** *Neuromuscul Disord* 2004, **14**:107-116.
20. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP: **Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome.** *Ann Neurol* 1984, **16**:481-488.
21. Deschauer M, Wieser T, Neudecker S, Lindner A, Zierz S: **Mitochondrial 3243 A-->G mutation (MELAS mutation) associated with painful muscle stiffness.** *Neuromuscul Disord* 1999, **9**:305-307.
22. Deschauer M, Muller T, Wieser T, Schulte-Mattler W, Kornhuber M, Zierz S: **Hearing impairment is common in various phenotypes of the mitochondrial DNA A3243G mutation.** *Arch Neurol* 2001, **58**:1885-1888.
23. Deschauer M, Tennant S, Rokicka A, He L, Kraya T, Turnbull DM, Zierz S, Taylor RW: **MELAS associated with mutations in the POLG1 gene.** *Neurology* 2007, **68**:1741-1742.
24. Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T: **Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities ): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature.** *J Neurol Sci* 1980, **47**:117-133.
25. Andermann F, Berkovic S, Carpenter S, Andermann E: **The Ramsay Hunt syndrome is no longer a useful diagnostic category.** *Mov Disord* 1989, **4**:13-17.
26. Berkovic SF, Carpenter S, Evans A, Karpati G, Shoubridge EA, Andermann F, Meyer E, Tyler JL, Diksic M, Arnold D, et al.: **Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 1. A clinical, pathological, biochemical, magnetic resonance spectrographic and positron emission tomographic study.** *Brain* 1989, **112 ( Pt 5)**:1231-1260.
27. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC: **Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation.** *Cell* 1990, **61**:931-937.
28. Verma A, Moraes CT, Shebert RT, Bradley WG: **A MERRF/PEO overlap syndrome associated with the mitochondrial DNA 3243 mutation.** *Neurology* 1996, **46**:1334-1336.
29. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE: **The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation.** *Brain* 1995, **118 ( Pt 2)**:319-337.
30. Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF: **Leber hereditary optic neuropathy.** *J Med Genet* 2002, **39**:162-169.
31. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA: **A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy.** *Am J Hum Genet* 1990, **46**:428-433.
32. Willems JL, Monnens LA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Meyer AE, van Dam K, van Haelst U: **Leigh's encephalomyelopathy in a patient with cytochrome c oxidase deficiency in muscle tissue.** *Pediatrics* 1977, **60**:850-857.
33. Bardosi A, Creutzfeldt W, DiMauro S, Felgenhauer K, Friede RL, Goebel HH, Kohlschutter A, Mayer G, Rahlf G, Servidei S, et al.: **Myo-, neuro-, gastrointestinal encephalopathy (MNGIE syndrome) due to partial**

- deficiency of cytochrome-c-oxidase. A new mitochondrial multisystem disorder.** *Acta Neuropathol (Berl)* 1987, **74**:248-258.
34. Gu M, Cooper JM, Taanman JW, Schapira AH: **Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease.** *Ann Neurol* 1998, **44**:177-186.
35. Pandolfo M: **Molecular genetics and pathogenesis of Friedreich ataxia.** *Neuromuscul Disord* 1998, **8**:409-415.
36. Schapira AH: **Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1366**:225-233.
37. Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, et al: **Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease.** *Cell* 1998, **93**:973-983.
38. Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA: **Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia.** *J Neurol Sci* 2005, **233**:145-162.
39. Beal MF: **Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1366**:211-223.
40. Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM: **The diagnosis of mitochondrial muscle disease.** *Neuromuscul Disord* 2004, **14**:237-245.
41. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM: **The neurology of mitochondrial DNA disease.** *Lancet Neurol* 2002, **1**:343-351.
42. Jackson MJ, Schaefer JA, Johnson MA, Morris AA, Turnbull DM, Bindoff LA: **Presentation and clinical investigation of mitochondrial respiratory chain disease. A study of 51 patients.** *Brain* 1995, **118 ( Pt 2)**:339-357.
43. Zierz S, Meessen S, Jerusalem F: **[Lactate and pyruvate blood levels in the diagnosis of mitochondrial myopathies].** *Nervenarzt* 1989, **60**:545-548.
44. Quade A, Zierz S, Klingmuller D: **Endocrine abnormalities in mitochondrial myopathy with external ophthalmoplegia.** *Clin Investig* 1992, **70**:396-402.
45. Finsterer J, Fuglsang-Frederiksen A: **Macro-EMG in mitochondriopathy.** *Clin Neurophysiol* 1999, **110**:1466-1470.
46. Lindner A, Hofmann E, Naumann M, Becker G, Reichmann H: **Clinical, morphological, biochemical, and neuroradiological features of mitochondrial encephalomyopathies. Presentation of 19 patients.** *Mol Cell Biochem* 1997, **174**:297-303.
47. Chaturvedi S, Bala K, Thakur R, Suri V: **Mitochondrial encephalomyopathies: advances in understanding.** *Med Sci Monit* 2005, **11**:RA238-246.
48. Fadic R, Johns DR: **Clinical spectrum of mitochondrial diseases.** *Semin Neurol* 1996, **16**:11-20.
49. Engel WK, Cunningham GG: **Rapid Examination of Muscle Tissue. an Improved Trichrome Method for Fresh-Frozen Biopsy Sections.** *Neurology* 1963, **13**:919-923.
50. Ozawa M, Nonaka I, Goto Y: **Single muscle fiber analysis in patients with 3243 mutation in mitochondrial DNA: comparison with the phenotype and the proportion of mutant genome.** *J Neurol Sci* 1998, **159**:170-175.
51. Bourgeois JM, Tarnopolsky MA: **Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders.** *Mitochondrion* 2004, **4**:441-452.

52. Sciacco M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT: **Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy.** *Hum Mol Genet* 1994, **3**:13-19.
53. Filosto M, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vатtemi G, Rizzuto N, Padovani A, Simonati A: **Neuropathology of mitochondrial diseases.** *Biosci Rep* 2007, **27**:23-30.
54. Aure K, Fayet G, Leroy JP, Lacene E, Romero NB, Lombes A: **Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation.** *Brain* 2006, **129**:1249-1259.
55. Sarnat HB, Marin-Garcia J: **Pathology of mitochondrial encephalomyopathies.** *Can J Neurol Sci* 2005, **32**:152-166.
56. Karppa M, Herva R, Moslemi AR, Oldfors A, Kakko S, Majamaa K: **Spectrum of myopathic findings in 50 patients with the 3243A>G mutation in mitochondrial DNA.** *Brain* 2005, **128**:1861-1869.
57. Rifai Z, Welle S, Kamp C, Thornton CA: **Ragged red fibers in normal aging and inflammatory myopathy.** *Ann Neurol* 1995, **37**:24-29.
58. Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James OF, Turnbull DM: **Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle.** *Ann Neurol* 1998, **43**:217-223.
59. Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL: **Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy.** *N Engl J Med* 1990, **322**:1098-1105.
60. Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Muller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S: **Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies.** *Brain* 2005, **128**:1870-1876.
61. Yamamoto M, Koga Y, Ohtaki E, Nonaka I: **Focal cytochrome c oxidase deficiency in various neuromuscular diseases.** *J Neurol Sci* 1989, **91**:207-213.
62. Chariot P, Ruet E, Authier FJ, Labes D, Poron F, Gherardi R: **Cytochrome c oxidase deficiencies in the muscle of patients with inflammatory myopathies.** *Acta Neuropathol* 1996, **91**:530-536.
63. Horvath R, Fu K, Johns T, Genge A, Karpati G, Shoubridge EA: **Characterization of the mitochondrial DNA abnormalities in the skeletal muscle of patients with inclusion body myositis.** *J Neuropathol Exp Neurol* 1998, **57**:396-403.
64. Walker UA, Collins S, Byrne E: **Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification.** *Eur Neurol* 1996, **36**:260-267.
65. Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR: **Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children.** *Neurology* 2002, **59**:1406-1411.
66. Rossi FH, Okun M, Yachnis A, Quisling R, Triggs WJ: **Corticosteroid treatment of mitochondrial encephalomyopathies.** *Neurologist* 2002, **8**:313-315.
67. DiMauro S: **Mitochondrial DNA medicine.** *Biosci Rep* 2007, **27**:5-9.
68. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM: **The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations.** *Ann Neurol* 2000, **48**:188-193.
69. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Karppa M, Majamaa-Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE:

- Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population.** *Am J Hum Genet* 1998, **63**:447-454.
70. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rochtchina E, Howard C, Mitchell P, Sue CM: **Population prevalence of the MELAS A3243G mutation.** *Mitochondrion* 2007, **7**:230-233.
71. Reichmann H, Vogler L, Seibel P: **Ragged red or ragged blue fibers.** *Eur Neurol* 1996, **36**:98-102.
72. Brooks BR: **El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors.** *J Neurol Sci* 1994, **124 Suppl**:96-107.
73. Muller-Hocker J: **Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration.** *J Neurol Sci* 1990, **100**:14-21.
74. Sciacco M, Prella A, Comi GP, Napoli L, Battistel A, Bresolin N, Tancredi L, Lamperti C, Bordoni A, Fagiolari G, et al: **Retrospective study of a large population of patients affected with mitochondrial disorders: clinical, morphological and molecular genetic evaluation.** *J Neurol* 2001, **248**:778-788.
75. Rollins S, Prayson RA, McMahon JT, Cohen BH: **Diagnostic yield muscle biopsy in patients with clinical evidence of mitochondrial cytopathy.** *Am J Clin Pathol* 2001, **116**:326-330.
76. Oldfors A, Larsson NG, Lindberg C, Holme E: **Mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis.** *Brain* 1993, **116 ( Pt 2)**:325-336.
77. Oldfors A, Moslemi AR, Jonasson L, Ohlsson M, Kollberg G, Lindberg C: **Mitochondrial abnormalities in inclusion-body myositis.** *Neurology* 2006, **66**:S49-55.
78. Miro O, Casademont J, Grau JM, Jarreta D, Urbano-Marquez A, Cardellach F: **Histological and biochemical assessment of mitochondrial function in dermatomyositis.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**:1047-1053.
79. Poeck H: *Neurologie.* Springer Verlag; 1998.
80. Hervias I, Beal MF, Manfredi G: **Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis.** *Muscle Nerve* 2006, **33**:598-608.
81. Wong LJ: **Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders.** *Mitochondrion* 2007, **7**:45-52.
82. Siciliano G, Volpi L, Piazza S, Ricci G, Mancuso M, Murri L: **Functional diagnostics in mitochondrial diseases.** *Biosci Rep* 2007, **27**:53-67.

## 7 Thesen

1. Ragged-red Fasern in der modifizierten Gomori-Trichrom Färbung haben in dem untersuchten Patiengut eine hohe Spezifität (0,94) und eine gute Sensitivität (0,86) für das Erkennen einer Mitochondriopathie
2.  $\geq 1$  % CNF in der kombiniert sequentiellen COX-SDH Färbung haben in dem Patientengut eine gute Sensitivität (0,86) und gute Spezifität (0,85)
3. Mit zunehmendem Alter zeigen auch gesunde Patienten wenige CNF (0,14%) in der Muskelbiopsie. RRF werden bei gesunden fast überhaupt nicht beobachtet (0,01%).
4. Patienten mit Mitochondriopathien, die älter als 50 Jahre sind, zeigen nicht mehr RRF und CNF als Patienten unter 50 Jahre.
5. Patienten mit Myositis zeigen statistisch signifikant mehr CNF als gesunde Kontrollen. Sie zeigen ebenfalls mehr RRF als die gesunden Kontrollen, dies ist statistisch jedoch nicht signifikant.
6. RRF und CNF finden sich bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose nicht häufiger als bei gesunden Kontrollen.
7. Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der CNF sowie RRF und dem Paresegrad des bioptierten Muskels.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Maximilian Anheier  
Geburtsdatum/-ort: 15.04.1979 in Düsseldorf  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1989 - 1998 Gymnasium Theodorianum, Paderborn

### **Zivildienst**

1998 - 1999 Brüderkrankenhaus St. Josef, Paderborn

### **Studium**

10/1999 - 06/2006 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg; Gesamtnote: befriedigend  
03/2002 Ärztliche Vorprüfung  
08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
06/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Praktische Ausbildung**

#### **Praktisches Jahr:**

11.04.2005 - 31.07.2005 Innere Medizin; Carl von Basedow-Klinikum Merseburg  
Medizinische Klinik II (Hämatologie/Onkologie und Gastroenterologie)  
(PD Dr. med. habil. E. Schleyer)

01.08.2005 - 20.11.2005 Chirurgie; Carl von Basedow-Klinikum Merseburg  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie sowie Klinik für  
Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie  
(Dr. med. L. Kuhne, PD Dr. med. W.-A. Cappeller)

21.11.2005 - 12.03.2006 Neurologie; Universitäts- und Poliklinik für Neurologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Prof. Dr. med. S. Zierz)

### **Chirurgische Assistenzzeit:**

- 01.09.2006 - 31.10.2007 Klink für Chirurgie  
Krankenhaus St. Joseph-Stift Dresden  
(Dr. med. M. Freitag)
- 01.11.2007 - 30.04.2008 Chirurgische Intensivstation  
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität  
Dresden  
(Prof. Dr. med. H. D. Saeger)
- 01.05.2008 - 31.10.2008 Klink für Chirurgie  
Krankenhaus St. Joseph-Stift Dresden  
(Dr. med. M. Freitag)
- 01.11.2008 - 30.04.2009 Klinik für Gefäßchirurgie  
Städtisches Klinikum Dresden-Friedrichstadt  
(Dr. med. H. J. Florek)
- 01.05.2009 - 31.01.2010 Klink für Chirurgie  
Krankenhaus St. Joseph-Stift Dresden  
(Dr. med. M. Freitag)
- seit 01.02.2010 Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Endokrine Chirurgie  
Florence-Nightingale-Krankenhaus Düsseldorf  
(Prof. Dr. med. K.-H. Schultheis)

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Es wurden keine anderen, als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle wörtlichen oder sinngemäßen übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht.

Ich habe nur diesen einen Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht und keinen Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt.

Düsseldorf, 28. August 2010

Maximilian Anheier

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Stephan Zierz für die Einführung in das Thema der Mitochondriopathien sowie die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Klinik sehr herzlich bedanken.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil Marcus Deschauer möchte ich mich besonders für die Bereitstellung des Themas, sowie die sehr gute Betreuung während der Promotionszeit bedanken. Weiterhin bedanke ich mich für die Einführung in die wissenschaftliche Tätigkeit und den geduldvollen Umgang mit allen Problemen, die im Rahmen der Arbeit auftraten. Dr. Deschauer stand mir für meine Fragen stets mit vielen Anregungen und Vorschlägen zur Seite.

Weitergehend möchte ich mich bei Frau Kathleen Zietz sowie den übrigen Mitarbeitern des Muskellabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg für die Hilfe bei der Anfertigung der Muskelpräparate und die übrige Unterstützung bedanken.

Überdies möchte ich mich bei meinen Eltern für die ausdauernde und großzügige Unterstützung während der Studien- und Promotionszeit herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin, Frau Dr. Daniela Tiedau, die mich über die gesamte Zeit mit viel Motivation, Lob und Kritik begleitet hat.