

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Zierz)

**Long-Range-Polymerasekettenreaktion-Untersuchungen
bei Patienten mit chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie
und unterschiedlicher Multisystembeteiligung**

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

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

von Anna Rokicka

geboren am 29.08.1976 in Lodz (Polen)

Betreuer: Prof. Dr. med. Marcus Deschauer

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Deschauer
Prof. Dr. rer. nat. habil. R. Horstkorte
PD Dr. med. C. Kornblum (Bonn)

15.02.2012

Referat

Zielstellung: Eine chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) kann sowohl als Einzelsymptom, als auch im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Multisystem-Symptomatik auftreten (CPEO-plus). Eine besonders schwere Form ist das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS). Bis heute ist die nosologische Entität des KSS umstritten. Molekulargenetisch findet man bei der sporadischen Form der CPEO in der Southern-Blot-Analyse aus Muskel-DNA singuläre Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA). Es wurde postuliert, dass sich beim KSS im Gegensatz zur CPEO die Deletionen nicht nur in DNA aus Muskelgewebe, sondern auch in Blutzellen nachweisen lassen. In der familiären Form der CPEO führen Mutationen der nukleären DNA zu multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA.

Methoden: Es wurden 25 Patienten mit sporadischer CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung untersucht, bei denen sich in der Southern-Blot-Analyse aus Muskel-DNA eine singuläre mtDNA-Deletion gezeigt hatte. Zum sensitiven Nachweis von mtDNA-Deletionen im Muskel, Blut und Urin wurden Long-Range-PCR-Untersuchungen durchgeführt, bei denen unterschiedliche Elongationszeiten (10 Min., 4 Min., 2 Min.) zur Anwendung kamen. Der Nachweis von Deletionen in mtDNA aus Muskel, Blut und Urin wurde zwischen Patienten mit KSS (n=3) und CPEO mit unterschiedlicher Multisystemsptomatik (n=22) verglichen. Zusätzlich erfolgte die Long-Range-PCR-Untersuchung der mtDNA aus Muskel-, Blut- und (teilweise) Urinproben von 15 Patienten mit CPEO sowie von einem Patienten mit einem MELAS-Phänotyp, bei denen multiple Deletionen der mitochondrialen DNA in der PCR-Untersuchung aus Muskelgewebe nachgewiesen wurden.

Ergebnisse: Bei allen Patienten mit der sporadischen CPEO-Form wurde die singuläre mtDNA-Deletion auch in der Long-Range-PCR aus Muskel-DNA nachgewiesen. Die singuläre Deletion war auch bei 11 von 25 Patienten in der Blut- bzw. bei 7 von 20 Patienten in der Urin-DNA mittels der Long-Range-PCR nachweisbar. Die Sensitivität der PCR nahm durch Verkürzung der Elongationszeit zu. Der Schweregrad der Symptomatik korrelierte nicht mit der Deletionsdistribution in den mitotischen Geweben, dem Heteroplasmiegrad im Muskel sowie der Länge der singulären mtDNA-Deletion. Der Deletionsnachweis in einem der mitotischen Gewebe (Blut oder Urin) korrelierte signifikant mit einem früheren Erkrankungsbeginn. Es zeigte sich auch eine nicht signifikante Tendenz, dass der höhere Heteroplasmiegrad im Muskel mit einem früheren Erkrankungsbeginn einhergeht.

Die multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA waren mittels Long-Range-PCR nur in der Muskel-DNA nachweisbar. Die Verkürzung der Elongationszeit ergab keinen zusätzlichen Informationsgewinn. Der Patient mit einem MELAS-Phänotyp und multiplen mtDNA-Deletionen im Muskel erwies sich als „compound heterozygot“ für zwei Punktmutationen der nukleären DNA im POLG1-Gen (R627Q und G848S).

Schlussfolgerungen: Der Nachweis von singulären Deletionen der mtDNA aus mitotischen Geweben (Blut und Urin) ist für das KSS nicht spezifisch. Die Sensitivität der PCR-Untersuchung kann durch Verkürzung der Elongationszeit erhöht werden. Long-Range-PCR-Untersuchungen sind im Vergleich zur Southern-Blot-Analyse, die bislang als Goldstandard in der Diagnostik von mtDNA-Deletionen gilt, sensitiver und einfacher durchzuführen. Die vorliegenden Daten stützen die Annahme, dass das KSS keine eigene nosologische Entität zu sein scheint, sondern eine der verschiedenen möglichen Symptomkonstellationen.

Rokicka, Anna: Long-PCR-Untersuchung bei Patienten mit CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung. Halle, Univ. Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2011

Inhaltsverzeichnis	Seiten
1 Einleitung.....	1
1.1 Die mitochondrialen Erkrankungen	1
1.2 Die Mitochondrien.....	1
1.3 Besonderheiten der mitochondrialen DNA	3
1.3.1 Maternale Vererbungsmuster.....	3
1.3.2 Mutationen der mitochondrialen DNA.....	4
1.3.3 Polyplasmie.....	5
1.3.4 Schwellenwerteffekt.....	5
1.3.5 Selektion der mtDNA in verschiedenen Stadien des Zellzyklus.....	5
1.3.6 Molekulargenetische Prozesse im mitochondrialen Genom.....	7
1.3.7 Hypothesen zu Entstehungsmechanismen der singulären mtDNA-Deletionen.....	7
1.4 Molekulargenetische Veränderungen der mitochondrialen DNA bei Patienten mit CPEO und KSS.....	8
1.4.1 Singuläre Deletionen der mitochondrialen DNA.....	8
1.4.2 Punktmutationen der mitochondrialen DNA.....	10
1.4.3 Defekte der intergenomischen Kommunikation: Mutationen im nukleären Genom mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA.....	11
1.5 Biochemische und histologische Veränderungen bei mitochondrialen Myopathien.....	12
1.6 Definition der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO), der CPEO-plus und des Kearns-Sayre-Syndroms (KSS).....	12
1.7 Klinische Symptome der CPEO, der CPEO-plus und des KSS.....	13
1.8 Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit der CPEO und dem KSS und singulären Deletionen der mitochondrialen DNA in der bisherigen Studienlage	14
1.8.1 Southern-Blot-Analysen von Blut- und Muskelproben.....	15
1.8.2 PCR-Untersuchungen von Blut- und Muskelproben.....	16
1.8.3 PCR-Untersuchungen von Urinzellen	16
1.9 Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit der CPEO und multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA in der bisherigen Studienlage.....	17
2 Zielstellung.....	18
3 Materialien und Methoden.....	19
3.1 Materialien.....	19
3.2 Methoden.....	19
3.2.1 Patienten.....	19
3.2.2 Untersuchungsmaterial.....	20
3.2.3 DNA-Präparation	21
3.3 Genetische Untersuchungsmethoden.....	21
3.3.1 Southern-Blot-Analyse.....	21
3.3.2 PCR.....	21
3.3.3 Long-Range-PCR.....	23
3.3.4 Common-Deletion-PCR (CD-PCR).....	23
3.3.5 Reaktionsprotokolle.....	24
3.3.6 Reaktionsansatz.....	24
3.3.7 Primer-Sequenzen und Lage.....	26
3.3.8 Modifikationen der Long-Range-PCR-Untersuchung.....	28
3.3.9 Gelelektrophorese.....	29
3.3.10 Untersuchung der nukleären Mutationen bei den Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen.....	30

3.4	Statistische Auswerteverfahren.....	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen.....	31
4.1.1	Klinische Daten von 25 Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen.....	31
4.1.2	Einteilung der Patienten in klinische Untergruppen.....	34
4.1.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei den Patienten mit singulären mtDNA Deletionen.....	34
4.1.4	Unterschiede im Genotyp und Phänotyp bei den Patienten mit der 4977-bp „Common Deletion“ und bei den Patienten mit anderen singulären Deletionen der mtDNA.....	45
4.1.5	Molekulargenetische Befunde der Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen.....	47
4.2	Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen.....	53
4.2.1	Klinische Daten der Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen.....	53
4.2.2	Molekulargenetische Befunde der Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen.....	53
4.3	Patient mit multiplen mtDNA-Deletionen und einem Phänotyp des MELAS- Syndroms.....	57
5	Diskussion.....	58
5.1	Patienten mit singulären Deletionen der mitochondrialen DNA.....	58
5.1.1	Korrelation zwischen Gewebedistribution der singulären Deletionen der mtDNA und dem Phänotyp.....	58
5.1.2	Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad der singulären mtDNA-Deletion im Muskel und dem Phänotyp.....	61
5.1.3	Korrelation zwischen den molekulargenetischen Befunden und dem Alter bei dem Erkrankungsbeginn sowie dem Alter bei der Probenentnahme	62
5.1.4	Länge der singulären Deletion der mitochondrialen DNA bei Patienten mit unterschiedlichem klinischen Phänotyp.....	63
5.1.5	„Common Deletion“ der mitochondrialen DNA bei den Patienten mit der CPEO und mit dem KSS.....	63
5.1.6	Untersuchung der singulären Deletionen der mitochondrialen DNA mittels Southern-Blot-Analyse und PCR-Methode.....	64
5.1.7	Veränderungen der PCR-Methode in der Untersuchung der singulären Deletionen der mitochondrialen DNA.....	65
5.2	Patienten mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA	66
5.2.1	Untersuchung der multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA mittels der Southern-Blot-Analyse und der PCR-Methode.....	66
5.2.2	Veränderungen der PCR-Methode in der Untersuchung der multiplen mtDNA-Deletionen.....	66
5.2.3	Untersuchung der nukleären Mutationen bei den Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen.....	67
5.2.4	Nachweis der multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA bei einem Patienten mit dem MELAS-Phänotyp.....	67
6	Zusammenfassung.....	67
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Thesen.....	79

Anhang:

- 9 Tabellarischer Lebenslauf
- 10 Selbständigkeitserklärung
- 11 Erklärung über frühere Promotionsversuche
- 12 Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
AP	Auftragspuffer
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BZ	Blutzucker
CK	Creatin-Kinase
cMRT	Schädel MRT
COX	Cytochrom C-Oxidase
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CT	Computer-Tomographie
CTP	Cytidintriphosphat
Cyt.b	Cytochrom b
Cyt.c	Cytochrom c
D-Loop	displacement-loop, Kontrollregion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$, Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
HSP	heavy strand promotor
kb	Kilobase/ Kilobasen
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	Lebersche hereditäre Optikusneuropathie
LSP	light strand promotor
MELAS	mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatazidose und schlaganfallähnliche Episoden
MNGIE	mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalopathie
mRNA	messenger RNA, auch Boten-RNA
MRT	Kernspin-Tomographie (Magnet-Resonanz-Tomographie)
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGenom	mitochondriales Genom
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa
ND	NADH-Dehydrogenase (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Dehydrogenase)
oGTT	oraler Glukosetoleranz-Test
OH	Ursprung des schweren Strangs
OL	Ursprung des leichten Strangs
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PNS	Peripheres Nervensystem
POLG	Polymerase Gamma
PS	Pearson-Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA

RRF	Ragged-Red-Fasern
rpm	Umdrehungen pro Minute
rtPCR	real time PCR
SANDO	sensorische ataktische Neuropathie, Dysarthrie und Ophthalmoparese
SD	Standardabweichung
SDH	Succinat-Dehydrogenase
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TP	Thymidin-Phosphorylase
Tris	(HOCH ₂) ₃ CNH ₂ , Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit / Einheit
VEP	visuell evozierte Potentiale
WT-DNA	Wildtyp-DNA
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Die mitochondrialen Erkrankungen

Eine Erkrankungsgruppe, über die sich das Wissen in den letzten 20 Jahren schnell entwickelt hat, sind die mitochondrialen Erkrankungen. Sie stellen eine Gruppe von klinisch, biochemisch und genetisch heterogenen Erkrankungen dar, deren Grundlage in einer Störung des oxidativen Energiestoffwechsels liegt.

Eine fehlerhafte Kopplung des Protonengradienten der Atmungskette und der Phosphorylierung von ADP in den Mitochondrien wurde zum ersten Mal 1962 von Luft beschrieben (Luft et al., 1962) und legte eine Grundlage zur Erforschung der mitochondrialen Myopathien. Die von Luft definierten drei charakteristischen Merkmale der mitochondrialen Erkrankungen: (1) morphologische Veränderungen der Mitochondrien, (2) charakteristische biochemische Defekte und (3) klinische Multiorganmanifestation konnten in der nächsten Dekade durch die Entwicklung der histologischen und biochemischen Untersuchungsmethoden genauer identifiziert werden. Obwohl die mitochondriale DNA (mtDNA) kurz darauf (Nass u. Nass 1963) entdeckt wurde, wurde die mtDNA-Sequenz erst 1981 entschlüsselt (Anderson et al., 1981).

Die erste pathogene Mutation der mitochondrialen DNA ist seit 1988 bekannt (Holt et al., 1988). Damit wurde ein neues Feld der molekulargenetischen Forschung erschlossen.

Bereits im Jahr 2000 waren schon über 100 Punktmutationen (Servidei 2000) sowie unzählige mtDNA-Deletionen identifiziert. Die Liste der mtDNA-Mutationen wächst bis heute weiter an.

Die molekulargenetische Forschung hat wesentlich zur Aufklärung von Pathomechanismen und genetischen Grundlagen einer der häufigsten Mitochondriopathien im Erwachsenenalter, der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie und des selten auftretenden Kearns-Sayre-Syndroms, beigetragen. Heutzutage beruht die Diagnosestellung nicht nur auf den klinisch-deskriptiven Kriterien. Eine wesentliche Rolle wird hier der molekulargenetischen Diagnostik eingeräumt.

Dies bedingt aber auch ein Überdenken althergebrachter nosologischer Einteilungen sowie der Definitionen verschiedener mitochondrialer Erkrankungen (Jaksch-Angerer et al., 1999).

1.2 Die Mitochondrien

Die Mitochondrien sind unter den intrazellulären Organellen in biochemischer und molekulargenetischer Hinsicht einzigartig. Die gewisse Autonomie der Mitochondrien mit der Doppelmembran, dem eigenständigen genetischen Material (mtDNA), dem Proteinsyntheseapparat sowie der mitochondrialen Atmungskette resultiert daraus, dass diese

Organellen vor etwa 1,5-2 Billionen Jahren aus einer Symbiose früher Eukaryoten mit Sauerstoff-produzierenden Bakterien entstanden sind.

Jede Zelle besitzt je nach Energiebedarf bis zu 1000 Mitochondrien, jedes Mitochondrium enthält zwischen 5 und 10 Kopien des mtGenoms, was insgesamt bis zu 10.000 mtDNA Kopien (Polyplasmie) in einer einzelnen Zelle und damit mehr als 1% der gesamten Zell-DNA ausmacht.

Das 16.569 Basenpaare lange, doppelsträngige und zirkuläre Molekül ist äußerst kompakt gebaut und bis auf die D-Loop-Region, die in die Initiation der DNA-Replikation und Transkription involviert ist, besteht die mtDNA nahezu aus Exonen. Sie kodiert für 22 mitochondriale tRNAs, zwei ribosomale RNAs und 13 Proteine, die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V darstellen. Die Gene aller anderen Untereinheiten, einschließlich des vollständigen Komplexes II, Transkriptions-, Replikations- und Translationsfaktoren sowie anderer für die intergenomische Kommunikation wichtigen Proteine, befinden sich im Zellkern.

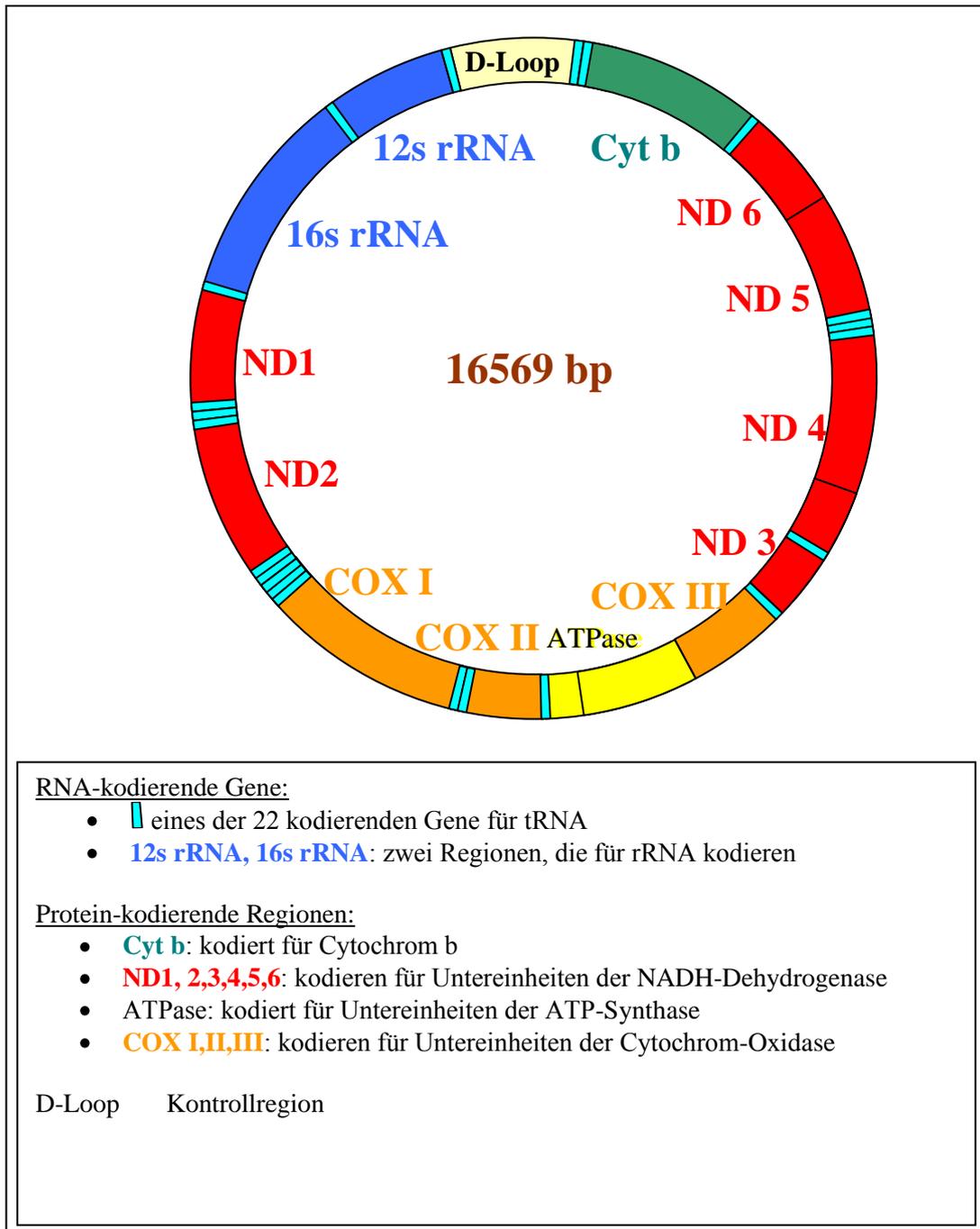


Abb.1: Schematische Darstellung der 16569 bp-langen mitochondrialen DNA mit der Lage der Protein- und RNA-kodierenden Gene sowie der Kontrollregion D-Loop

1.3 Besonderheiten der mitochondrialen DNA

1.3.1 Maternale Vererbungsmuster

Die mitochondriale DNA wird maternal vererbt. Die väterlichen Mitochondrien gelangen zwar während der Fertilisation in die Eizelle, sind aber in der Anzahl von etwa 100, im Vergleich zu

100000 Mitochondrien in der Oozyte, in absoluter Minderheit (0,01%) und werden durch bislang nicht geklärte Mechanismen aus der Oozyte aktiv eliminiert. Die verbliebenen maternalen Mitochondrien werden bei der Teilung der Zygote in den Blastomeren verteilt, so dass das mitochondriale Genom nahezu ausschließlich maternal vererbt wird. In seltenen Einzelfällen kann auch paternale mtDNA nachweisbar sein (Schwartz u. Vissing 2002, Kraysberg et al., 2004).

1.3.2 Mutationen der mitochondrialen DNA

Die mitochondrialen Erkrankungen können sowohl durch Mutationen der mitochondrialen als auch der nukleären DNA verursacht werden (DiMauro u. Schon, 1998). Mit den mitochondrialen Erkrankungen, definiert als Dysfunktion der Atmungskette, resultieren maternal vererbte **Punktmutationen** der mtDNA, sporadisch auftretende oder maternal vererbte sogenannte „**Large Scale Rearrangements**“ der mtDNA, wozu **Deletionen** und **Duplikationen** gehören. Eine Reihe von Mutationen der nukleären DNA führt sekundär zu **multiplen Deletionen** der mtDNA, welche autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbte, mitochondriale Erkrankungen verursachen.

Bei einer Reihe von mitochondrialen Erkrankungen besteht eine enge Korrelation zwischen dem Genotyp und Phänotyp (z.B. eine LHON wird durch eine Punktmutation der mtDNA, insbesondere G11778A, T14484C oder G3460A verursacht). In der Mehrzahl der Fälle jedoch können die gleichen Mutationen zu unterschiedlichen Phänotypen führen und auch bestimmte Phänotypen durch unterschiedliche genetische Defekte verursacht werden (z.B. einer CPEO kann eine nukleäre Mutation, eine Large Scale singuläre Deletion oder eine Punktmutation zugrunde liegen).

Durch kompakten Aufbau, fehlenden Histonenschutz, ineffiziente Reparaturmechanismen und häufige Replikationszyklen sowie freie Radikale aus der benachbarten Atmungskette ist das mitochondriale Genom besonders für Mutationen anfällig, welche 10-20-fach häufiger als im Kerngenom auftreten (Merriwether et al. 1991, Wallace et al. 1987).

Eine Anhäufung der **somatischen Mutationen der mtDNA** wie Punktmutationen (Fayet et al., 2002), Deletionen (Oldfors et al., 2006; Nicholas et al., 2009), unter anderem die sog. Common Deletion wurde beim Alterungsprozess (Cortopassi u. Arnheim 1990; Corral-Debrinski 1992a; Elson et al., 2001; Kraysberg et al., 2006), degenerativen Erkrankungen (Bender et al., 2006), bei Myositis (Oldfors et al., 2006) oder sogar bei koronarer Herzerkrankung (Corral-Debrinski 1992b) in verschiedenen, meist postmitotischen Geweben beobachtet (Kleine et al., 1997). Die Mengen der auf diese Weise geschädigten mtDNA liegen in den betroffenen Geweben in der Regel unter 1-3 % (Kleine et al., 1997; Porteous et al., 1998 ; Elson et al., 2001; He et al., 2002), selten höher bei ca. 12% (Corral-Debrinski et al., 1992a).

Diese Fälle gehören jedoch nicht zu den mitochondrialen Erkrankungen (Kleine et al., 1997; Suomalainen u. Kaukonen 2001). Die Häufigkeit von somatischen mtDNA-Mutationen kann durch verschiedene Faktoren wie z.B. nukleäre Mutationen, Inflammation erhöht werden (Elson et al., 2001).

1.3.3 Polyplasmie

Im Gegensatz zu den nukleären Genen, die aus einem maternalen und einem paternalen Allel bestehen, existieren die mtDNA-Moleküle in jeder Zelle in mehreren Tausend Kopien (Polyplasmie), um sich vor Akkumulation von mtDNA-Mutationen zu schützen. Zellen wie Leukozyten oder Spermien, die eine kurze Lebenszeit haben, besitzen wenige (unter 1000) Kopien der mtDNA. In den lange lebenden Zellen, wie Skelettmuskeln, Nervenzellen oder Oocyten, ist das mtDNA-Genom in über 100.000 Kopien vorhanden (Chinnery u. Samules, 1999b).

Normalerweise sind alle mtDNA-Moleküle identisch (Homoplasmie). Beim Vorliegen einer Mutation der mitochondrialen DNA tragen die betroffenen Zellen und Gewebe zwei Populationen der mtDNA: normale (Wildtyp-DNA) und mutierte DNA, was als Heteroplasmie bezeichnet wird. Der prozentual ausgedruckte Heteroplasmiegrad bezeichnet die Proportion der mutierten DNA zu der Wildtyp-DNA.

1.3.4 Schwellenwerteffekt

Bevor eine klinische Dysfunktion zum Vorschein kommt, muss die mtDNA-Mutation in einer bestimmten Anzahl das mtGenom betreffen, um einen für verschiedene Gewebe unterschiedlich hohen Schwellenwert zu überschreiten („threshold expression“) (Thorburn et al., 2001). Die Schwelle der pathogenen Grenzkonzentration der mutierten mtDNA hängt vom Typ der Mutation und vor allem vom Energiebedarf sowie der biologischen Eigenart der Zelle ab und wird bei singulären mtDNA-Deletionen im Durchschnitt zwischen 50-60% (Schwartz u. Vissing 2002; He et al., 2002) und 85-95% angegeben (Oldfors et al., 2006). Der Schwellenwert scheint bei Punktmutationen höher, etwa bei 80-95%, zu liegen (Boulet et al., 1992; Chomyn et al., 1992; Schwartz u. Vissing, 2002).

1.3.5 Selektion der mtDNA in verschiedenen Stadien des Zellzyklus

Das mitochondriale Genom repliziert dauerhaft und unabhängig vom Zellzyklus (Bogenghagen et al., 1977). Die Verteilung der mitochondrialen DNA in die Tochter-Mitochondrien scheint in allen Stadien des Zellzyklus zufällig stattzufinden.

(a) Selektion der mtDNA in den postmitotischen Geweben („relaxed replication“)

In den sich nicht mehr teilenden Zellen (postmitotischen Zellen, wie z.B. Muskel) erfolgt die Replikation der mtDNA im Rahmen des natürlichen Zell-Turn-overs, bei der sog. „relaxed replication“ (Birky, 1994). Beim Vorliegen einer Mutation der mtDNA kann es hierbei zur Verschiebung des Heteroplasmiegrades kommen (Chinnery u. Samules, 1999b), was bei Patienten mit KSS bereits bewiesen wurde (Larsson et al., 1990). Nach dem Zufallsprinzip kann es zur vermehrten Replikation der mutierten mtDNA (klonale Expansion) kommen (Elson et al., 2001; He et al., 2002). Es wurde auch ein gewisser replikativer Vorteil der kürzeren mtDNA im Vergleich zu der Wildtyp-mtDNA postuliert (Wallace, 1989; Shoubridge et al., 1990).

(b) Selektion der mtDNA in den mitotischen Geweben (mitotische Segregation)

In den mitotisch aktiven Zellen (z.B. Blut- oder Urinzellen) erfolgt die Verteilung der Mitochondrien im Rahmen der mitotischen Segregation („random segregation“) während der Zellteilung in die Tochterzellen. Dabei kann es zur Verschiebung im Anteil der mutierten mtDNA in neuen Zellen kommen. So kann die mitotische Segregation im Verlauf zur Anhäufung der mtDNA-Mutation in einem Gewebe führen. Die daraus resultierende Apoptose oder ein direkter Tod der betroffenen Zellen würde allerdings in sich regenerierenden Geweben ohne manifeste Folgen bleiben. In der Regel ist die Mutationslast in den mitotisch aktiven Zellen niedriger als in den postmitotischen Zellen (Becher et al., 1999; Chinnery u. Turnbull, 1999 a).

(c) Selektion der mtDNA bei der Oogenese („mitochondrial bottleneck“)

Das Konzept eines sogenannten mitochondrialen „bottleneck effect“ bei der Oogenese erklärt zum Teil deutliche Unterschiede im Heteroplasmiegrad und beim klinischen Phänotyp, die entlang der maternalen Linie (Dahl u. Thorburn 2001; Chinnery et al., 2004) bzw. unter den Zwillingen (Blakely et al., 2004) der Familien mit mitochondrialen Erkrankungen beobachtet wurden. Während der Oogenese wird die mtDNA zur etwa 100.000 Kopien amplifiziert (Chinnery u. Turnbull 2000; Thorburn u. Dahl 2001). Die „Bottleneck-Hypothese“ nimmt an, dass die Anzahl der mtDNA-Kopien in der Urkeimzelle zunächst bis auf einige wenige Kopien reduziert wird, um dann als Matrize für die Amplifikation zu dienen. Sollten sich hierunter mutierte mtDNA-Moleküle befinden, so wird die Mutation vervielfältigt (Hauswirth u. Laipis, 1982; DiMauro 2001).

1.3.6 Molekulargenetische Prozesse im mitochondrialen Genom

Die Mitochondrien haben ein eigenes Replikations- und Transkriptionssystem. Die 1121-bp lange D-loop-Region der mitochondrialen DNA („displacement-loop“) nimmt, neben nukleär kodierten Replikations- und Transkriptionsfaktoren, an der Regulierung dieser Prozesse teil (Thorburn u. Dahl 2001).

(a) Replikation

Die mitochondriale DNA (mtDNA) besteht aus 2 Strängen, einem guaninreichen H(heavy)-Strang und einem cytosinreichen L(light)-Strang. Die Replikation der mitochondrialen DNA erfolgt mittels nukleär kodierter Polymerase bidirektional, jedoch asynchron in zwei Phasen. Zunächst wird der schwere Strang (beginnend vom OH=Ursprung des schweren Strangs) im Uhrzeigersinn repliziert. Nachdem 2/3 dieses Stranges kopiert wurden, wird der Promotor des leichten Stranges freigelegt, so dass der leichte Strang (beginnend vom OL= Ursprung des leichten Strangs) in die entgegengesetzte Richtung repliziert wird (Wallace, 1982). Es wurden auch andere Modelle der Replikation der mitochondrialen DNA vorgestellt, in denen die Replikation der mtDNA an mehreren Ausgangspunkten beginnt (Yang et al., 2002).

(b) Transkription und Translation

Im Gegensatz zur nukleären DNA werden nicht einzelne Gene, sondern ein gesamter mtDNA-Strang zur polycistronischen RNA transkribiert, die dann zu rRNA, tRNA und mRNA weiterverarbeitet wird. Anhand der Matrize der mRNA erfolgt im Zytoplasma an den Ribosomen mit Hilfe von nukleär kodierten Enzymen die Eiweißsynthese (Translation). Die mitochondriale DNA hat, ähnlich wie bei den Prokaryoten, keine Introns und besteht zu 97% aus kodierenden DNA-Sequenzen. 28 der insgesamt 37 Gene liegen auf dem schweren H-Strang, die übrigen 9 Gene auf dem leichten L-Strang.

1.3.7 Hypothesen zu Entstehungsmechanismen der singulären mtDNA-Deletionen

Wie die singulären Deletionen der mitochondrialen DNA entstehen, ist bislang unklar. Die meisten propagierten Mechanismen sind mit der Bearbeitung der mtDNA verbunden.

(a) „Slip replication“

Ausgehend von der Tatsache, dass singuläre Deletionen der mitochondrialen DNA oft durch kurze direkte Wiederholungen der mtDNA-Sequenz („direct repeats“) an den „Bruchstellen“ flankiert sind und dass die meisten Deletionen in den ersten 2/3 der mitochondrialen DNA zwischen den beiden Ursprüngen OH und OL (Positionen nt 5763 und 110) liegen, wurde ein

Replikationsmechanismus, sog. „slip-replication“, als ein möglicher Entstehungsmechanismus der Deletionen der mitochondrialen DNA vorgestellt. Hierbei wird ein Fragment der mtDNA-Matrize bei der Replikation übersprungen (Shoffner et al. 1989).

(b) „Illegitimate“ (nichthomologe) Rekombination

Die mtDNA-Moleküle rekombinieren miteinander (Kraytsberg et al., 2004; Zsurka et al., 2005). Es wird auf diesem Weg ca. 0,7% der gesamten mtDNA der Zelle ausgetauscht und neu zusammengefügt. Der Vorgang der nichthomologen (sequenz-unspezifischen, illegitimate) Rekombination wurde u.a. bei den Saccharomyces, die ebenfalls eine ringförmige DNA besitzen, beobachtet. Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass die singulären („large-scale“) Deletionen der menschlichen mtDNA auf diese Weise auftreten könnten (Mita et al., 1990).

(c) Reparatur der geschädigten DNA

Die somatischen Mutationen der mtDNA, die sich z.B. beim Altern in den postmitotischen Geweben anhäufen, sind hinsichtlich der Lage, der Größe und der flankierenden, direkten Wiederholungen der mtDNA-Sequenz („direct repeats“) mit den singulären mtDNA-Deletionen von Patienten mit Mitochondriopathien identisch. In den neueren Arbeiten (Krishnan et al., 2008) wurde die Gemeinsamkeit im Ursprung der somatischen, der singulären und auch der multiplen mtDNA-Deletionen postuliert. Die Autoren vermuten, dass die Mutationen der mtDNA eher bei der Reparatur der geschädigten DNA als bei der Rekombination auftreten.

1.4 Molekulargenetische Veränderungen der mitochondrialen DNA bei Patienten mit CPEO und KSS

Die CPEO und das KSS gehören zu heterogenen Erkrankungen, denen sowohl Mutationen der nukleären DNA als auch der mitochondrialen DNA zugrunde liegen können (Van Goethem et al., 2002).

1.4.1 Singuläre Deletionen der mitochondrialen DNA

Die singulären Deletionen führen in 96% der Fälle zu einer sporadischen Form der CPEO. Nur 4% der Frauen mit CPEO und singulären Deletionen vererben die Erkrankung an ihre Kinder (Chinnery et al., 2004). Auch das KSS tritt sporadisch auf und ist mit singulären mtDNA-Deletionen verbunden (Rötig u. Munnich, 2003).

Die singulären Deletionen entstehen de novo während der Oogenese oder der frühen embryonalen Stadien und sind heteroplasmatisch (Chinnery et al., 2004; Emma et al., 2006).

Der unterschiedliche Heteroplasmiegrad in verschiedenen Geweben spiegelt die Verteilung der Mitochondrien nach dem Zufallsprinzip in verschiedene Keimbahnen während der Embryogenese wider (Lightowlers et al. 1997).

Der Heteroplasmiegrad im Muskel bei Patienten mit der CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung bis zum Kearns-Sayre-Syndrom variiert zwischen 18 und 90% in der Southern-Blot-Analyse (Zeviani et al., 1988; Moraes et al., 1989; Cortopassi u. Arnheim 1990; Yamashita et al., 2008). In der Regel ist die Mutationslast in den mitotisch aktiven Zellen niedriger als in den postmitotischen Zellen (Becher et al., 1999; Chinnery et al., 1999a). Die Untersuchungen von einzelnen Muskelfasern zeigten, dass die Fasern mit oxidativem Energiedefizit eine Mutationslast von ca. 95% haben, während die morphologisch nicht betroffenen oder veränderten Fasern ca. 31% der deletierten mtDNA bei den Patienten mit mitochondrialer Myopathie beinhalten (Sciaccio et al., 1994). Es wurde auch die Rolle der absoluten DNA-Menge und der verbleibenden Menge von Wildtyp-DNA hinsichtlich der Beeinträchtigung des oxidativen Metabolismus in Muskelfasern postuliert (Sciaccio et al., 1994). In den Untersuchungen von verschiedenen Geweben konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Menge der Wildtyp-DNA und dem Phänotyp beobachtet werden (Auré et al., 2007). In manchen Arbeiten konnte eine Korrelation zwischen dem **Heteroplasmiegrad** der singulären mtDNA-Deletion und dem Reduktionsgrad der Atmungskettenaktivität im Muskel sowie dem Anstieg COX-negativer Fasern (Schröder et al., 2000; Gellerich et al., 2002) nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel bzw. anderen Geweben und der klinischen Symptomatik ist nicht sicher (Poulton et al., 1991a).

In wieweit die **Gewebedistribution** der Deletion mit der klinischen Manifestation korreliert, ist bislang unklar. Es wurde allerdings postuliert, dass sich bei dem Kearns-Sayre-Syndrom, im Gegenteil zur CPEO, die singulären Deletionen der mitochondrialen DNA nicht nur in postmitotischen Geweben (Muskelproben), sondern auch in proliferierenden Zellen, z.B. in den Blutzellen, in hoher Heteroplasmie nachweisen lassen (Blakely et al., 2004).

Die Länge der beschriebenen singulären mtDNA-Deletionen bei CPEO- und KSS-Patienten reicht von 1,1 kb bis 9,6 kb (Yamashita et al., 2008) in unterschiedlichen mtDNA-Regionen, wobei die meisten Deletionen im sog. major arc zwischen den beiden Replikationsursprüngen OH und OL liegen. Ein Zusammenhang zwischen der Länge der Deletion, der Anzahl der ausgefallenen mitochondrialen Gene und der Schwere der klinischen Symptomatik wurde in vielen Studien nicht festgestellt (Zeviani et al., 1988; Holt et al., 1989a; Moraes et al., 1989; Gerbitz et al., 1990; Auré et al., 2007). Eine aktuelle Arbeit mit 136 Patienten belegt jedoch diesen Zusammenhang (Yamashita et al., 2008).

Eine bestimmte mtDNA-Deletion, die mit einer Häufigkeit von ca. 30-40% bei Patienten mit sporadischer Form der CPEO und des KSS (Holt et al., 1989b; Moraes et al., 1989; Ernst et al., 1994; Laforêt et al., 1995; Rötig et al., 2003; Auré et al., 2007) vorkommt, wird „**Common Deletion**“ genannt. Diese Deletion von 4977 Basenpaaren tritt zwischen zwei jeweils 13-Basenpaare-langen direkten Wiederholungen (direct repeats), zwischen den Nukleotidenpositionen nt 13447-13459 und nt 8470-8482 (Porteous et al., 1998; Müller-Höcker et al., 1998; Cortopassi u. Arnheim, 1990) auf. Die deletierten mtDNA-Segmente enthalten sämtliche Fragmente der Gene, die für vier Polypeptide vom Komplex I, einen vom Komplex IV, zwei vom Komplex V und fünf tRNAs kodieren.

Außer der CPEO und dem KSS stellt die „Common Deletion“ eine häufige Ursache des Pearson-Syndroms (Pearson et al., 1979; Porteous et al., 1998) dar und akkumuliert mit dem Alter als somatische Mutation in kleinen Mengen (ca. 0,1%) in den postmitotischen Geweben (Cortopassi u. Arnheim, 1990).

Bei Patienten mit singulären Deletionen wurden in einigen Fällen zusätzlich Duplikationen der mitochondrialen DNA beschrieben, zum ersten Mal bei Patienten mit dem Kearns-Sayre-Syndrom (Poulton et al., 1989) und dem Pearson-Syndrom (Rötig et al., 1990). Sie treten bei diesen Erkrankungen am häufigsten auf (Poulton et al., 1994b, 1995a; Odoardi et al., 2003). Es handelt sich hier um ein doppeltes Vorhandensein eines Abschnittes der mtDNA (meistens zwischen den Replikationsursprüngen OH und OL). Es ist bislang unklar, ob die Duplikationen der mtDNA von einer pathogenen Bedeutung sind (Manfredi et al., 1997). Die Anwesenheit kleiner Mengen von Duplikationen und Triplikationen der mitochondrialen DNA konnte bei gesunden Probanden beobachtet werden (Tengan u. Moraes, 1998). Diese Veränderungen scheinen auch keine Beeinträchtigung des oxidativen Metabolismus hervorzurufen (Odoardi et al., 2003). Durch viele Ähnlichkeiten zwischen Duplikationen und Deletionen (Poulton et al., 1994a) wird vermutet, dass die Duplikationen eine Übergangsform zu den singulären Deletionen der mitochondrialen DNA darstellen (Poulton et al., 1993, 1994a).

Die Duplikationen der mtDNA entziehen sich der routinemäßigen *PvuII*-Southern-Blot-Analyse, so dass deren Häufigkeit unterschätzt wird (Odoardi et al., 2003). Diese Rearrangements werden bei etwa 40% der Patienten, die eine mit singulären Deletionen assoziierte mitochondriale Enzephalomyopathie aufweisen, vorgefunden (Odoardi et al., 2003).

1.4.2 Punktmutationen der mitochondrialen DNA

Die meisten Punktmutationen der mtDNA, die zu mitochondrialen Erkrankungen (unter anderem zur CPEO) führen, betreffen tRNA-Gene. Eine Punktmutation der mtDNA bedingt eine Beeinträchtigung der Translation von mitochondrial kodierten Untereinheiten der

Atmungsketten-Komplexe I, III, IV und V (Zsurka et al., 2004). Bis jetzt wurden weit über 100 pathogene Punktmutationen der mitochondrialen DNA beschrieben. Mit dem CPEO-Phänotyp sind insgesamt siebzehn und mit dem KSS-Phänotyp (allein oder als Overlap mit MERRF) zwei tRNA-Punktmutationen verbunden (Mitomap, <http://www.mitomap.org>, Stand vom 02.04.10). Die mitochondrialen Punktmutationen sind meist heteroplasmatisch, können aber auch in Homoplasmie vorkommen. Die Mutationslast in heteroplasmatischen Punktmutationen ist in postmitotischen Geweben in der Regel höher als in mitotischen Geweben (Seneca et al., 2001; Fu et al., 1996). Die Punktmutationen weisen einen maternalen Vererbungsmodus auf (DiMauro u. Davidzon, 2005a).

1.4.3 Defekte der intergenomischen Kommunikation: Mutationen im nukleären Genom mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA

Die mitochondrialen Erkrankungen mit einem CPEO-Phänotyp können durch Mutationen im nukleären Genom hervorgerufen werden. Diese unterliegen den Mendelschen Vererbungsmustern. Die Mutationen von spezifischen, autosomalen Genen verursachen sekundär eine Instabilität der mtDNA (Zeviani et al. 1989) und führen zu multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA oder zu einer Depletion (Reduktion der mtDNA-Kopien). Diese werden meistens in den postmitotischen Geweben vorgefunden (Moslemi et al., 1999; Van Goethem et al., 2003b; Spinazolla u. Zeviani 2005).

Die CPEO tritt bei etwa 28% der Fälle (Deschauer et al., 2001) familiär auf. Es wurden bislang bei den Patienten mit CPEO- bzw. CPEO-plus-Phänotyp autosomal dominant vererbte Mutationen im Adenin-Nukleotid-Translokator-1- (ANT-1) (Kaukonen et al., 2000), Twinkle- (PEO1 bzw. C10Orf2) (Spelbrink et al., 2001), sowie im Polymerase-Gamma-1- (POLG1, Van Goethem et al., 2001), als auch im POLG2-Gen (Longley et al., 2006) festgestellt. Eine neu entdeckte, autosomal dominant vererbte Mutation im OPA1-Gen führt zur Optikusatrophy, CPEO, Ataxie, Hörminderung und sensomotorischen Neuropathie (Hudson et al., 2008). Eine Mutation im RRM2B-Gen führt neben einer mtDNA-Depletion auch zur autosomal dominant vererbten CPEO mit multiplen mtDNA-Deletionen (Tynismaa et al., 2009).

Die POLG1-Mutationen können auch einen autosomal-rezessiven Erbgang aufweisen (Deschauer u. Zierz 2003a; Hirano u. DiMauro 2001). Mutationen im Thymidin-Phosphorylase-Gen (Nishino et al., 1999) führen zu einer CPEO im Rahmen eines autosomal-rezessiven MNGIE-Syndroms mit gastrointestinaler Symptomatik.

Andere nukleäre Mutationen wie z.B. DGUOK (Mandel et al., 2001), SUCLA2 (Elpeg et al., 2005), MPV 17 (Spinazolla et al., 2006) führen zur mtDNA-Depletion und autosomal-rezessiven kindlichen Multisystemerkrankungen.

Der sporadischen Form der CPEO mit multiplen mtDNA-Deletionen liegen meistens Mutationen von bislang nicht identifizierten Genen zugrunde. Mutationen in POLG1-, ANT1- und Twinkle-Genen werden nur selten, in ca. 10% der Fälle, identifiziert (Hudson et al., 2006).

1.5 Biochemische und histologische Veränderungen bei mitochondrialen Myopathien

Als morphologisches Korrelat der mitochondrialen Genese der Erkrankungen lassen sich in erster Linie charakteristische histologische Befunde in der Skelettmuskelbiopsie darstellen. Typisch ist hier der Nachweis von sog. Ragged-Red-Fasern (RRF), die durch eine abnorme Proliferation von Mitochondrien entstehen (DiMauro et al., 2001). Bei Patienten mit Mutationen, die die Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheiten beeinträchtigen, werden COX-negative Fasern vorgefunden (DiMauro u. Hirano 2005b). Biochemisch finden sich im Muskel bei CPEO-Patienten mit Deletionen der mtDNA kombinierte Defekte der Atmungskettenkomplexe (Gellerich et al. 2002).

1.6 Definition der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO), der CPEO-plus und des Kearns-Sayre-Syndroms (KSS)

Durch die Vielfalt der klinischen Symptomatik der mitochondrialen Erkrankungen ist manchmal eine genaue Zuordnung zum bestimmten Syndromen erschwert.

Zu den Erkrankungen, die durch keinen konstanten klinischen Phänotyp gekennzeichnet sind, gehören auch die CPEO und das Kearns-Sayre-Syndrom.

Die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) ist eine der häufigsten mitochondrialen Erkrankungen des Erwachsenenalters. Als Leitsymptome treten bei der CPEO eine meist bilaterale Ptosis und eine progrediente Lähmung der äußeren Augenmuskeln auf. Diese Erkrankung kann sowohl als Einzelsymptom, als auch im Zusammenhang mit einer unterschiedlich schwer ausgeprägten Multisystems symptomatik auftreten. Eine besonders schwere Erkrankung, welche mit der chronisch progredienten externen Ophthalmoplegie einhergeht, überwiegend bereits im Kindesalter beginnt und einen deutlich schwereren klinischen Verlauf nimmt, ist das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS).

Das Kearns-Sayre-Syndrom wurde nach zwei Ärzten der Mayo-Klinik, George Kearns, einem Ophthalmologen, sowie Thomas Sayre, einem Pathologen, benannt. Sie hatten 1958 die ersten Patienten beschrieben und über eine Koinzidenz von chronischer externer Ophthalmoplegie,

Retinitis pigmentosa und einem Herzblock berichtet (Kearns u. Sayre, 1958). Diese drei klassischen Diagnosekriterien der neu definierten Erkrankung wurden in späteren Arbeiten um weitere fakultative Symptome ergänzt. Berenberg und Mitarbeiter (Berenberg et al., 1977) hatten in einer Serie von 35 Fällen neben o.g. Symptomen zusätzlich den Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr als ein Diagnosekriterium eingeführt. In der von Rowland (Rowland, 1983) vorgestellten Klassifizierung wurden als diagnostische Merkmale ein Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr, eine CPEO, eine Pigmentdegeneration der Retina und mindestens eines der folgenden Symptome postuliert: Herzblock, Liquoreiweißerhöhung von mindestens 100 mg/dl, zerebelläre Ataxie.

Die bunte klinische Symptomatik, die gemeinsam mit der chronisch progredienten externen Ophthalmoplegie auftreten kann, wurde 1968 vom Drachmann (Drachmann, 1968) als „Ophthalmoplegia plus“ (CPEO-plus) beschrieben. Dieser Begriff wird bis heute für die Patienten verwendet, die eine CPEO mit Multisystembeteiligung aufweisen, jedoch die KSS-Kriterien nicht erfüllen.

1.7 Klinische Symptome der CPEO, der CPEO-plus und des KSS

Bei den Patienten mit KSS und CPEO-plus-Syndrom wurden bislang unterschiedliche Organbeteiligungen beschrieben. Die Gewebe mit besonderer Abhängigkeit von der mitochondrialen Energieproduktion und mit hohem Energiebedarf, wie z. B. das visuelle System, das Innenohr, das zentrale und periphere Nervensystem, die Herz- und Skelettmuskulatur oder die Inselzellen des Pankreas, sind hierbei am stärksten betroffenen. Im Einzelnen wurden folgende Symptome bei Patienten mit CPEO, CPEO-plus-Syndrom und KSS beobachtet:

1. Beginn der Symptomatik: üblicherweise in den ersten drei Lebensdekaden, aber auch schon ab der Geburt möglich (Berenberg et al., 1977; Holt et al., 1989a; Yamashita et al., 2008).

2. Muskelbeteiligung: Ptosis, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie, Schwäche der kranialen und skelettalen Muskulatur, erhöhte muskuläre Ermüdbarkeit, Myopathiezeichen im EMG.

3. Augenbeteiligung und andere okuläre Symptome: Pigmentdegeneration der Retina, Opticusatrophie, Katarakt, korneale Ödeme und Trübung, Exophthalmus, Glaukom, Strabismus, interne Ophthalmoplegie (Berenberg et al., 1977), Veränderungen im VEP oder klinisch Visusminderung (Crisi et al., 1994).

4. Herzbeteiligung/Kardiopathie: Leitungsstörung wie z.B. AV-Block oder Schenkelblock (Kleber et al., 1987; Wilson et al., 1993; Park et al., 2004), Kardiomyopathie (Hübner et al., 1986; Kleber et al., 1987; Rustin et al., 1994).

5. Geistige Retardierung, Demenz (Berenberg et al., 1977), psychische Störungen.

6. Zentrales Nervensystem (ZNS): zerebelläre Ataxie, pyramidale und extrapyramidale Symptomatik, Hinterstrangläsionen, EEG-Veränderungen bis zur Epilepsie, erhöhter Eiweiß- und Gammaglobulinanteil im Liquor (Berenberg et al., 1977), Leukenzephalopathie, spongioforme Veränderungen.

Die neuroradiologischen Befunde, die jedoch auf relativ kleinen Fallzahlen beruhen (Chu et al., 1999) und zusätzlich eine geringe Korrelation mit der klinischen Manifestation aufweisen, reichen von unspezifischen, in der T2-Sequenz hyperintensiven Läsionen im Thalamus, dem Hirnstamm, den Stammganglien und der subkortikalen weißen Substanz über Verkalkungen in den Basalganglien (Sacher et al., 2005) bis zu zerebralen und zerebellären Atrophien.

7. Peripheres Nervensystem: sensible und/oder motorische Neuropathie (meist axonal).

8. Innenohr: sensoneurinale Schwerhörigkeit, vestibuläre Dysfunktion (Berenberg et al., 1977).

9. Endokrinopathien: Diabetes mellitus (Poulton et al., 1995b; Park et al., 2004; Yamashita et al., 2008), verzögerte Pubertät (Berenberg et al., 1977), irreguläre Menstruation, Hypogonadismus, Hypoparathyreoidismus (Abramowicz et al., 1996; Chu et al., 1999; Katsanos et al., 2001), Schilddrüsen- und Epiphysenfunktionsstörungen, Mangel an Nebennierenrindenhormonen, ggf. auch Störungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-Rückkopplungsmechanismus, Kleinwuchs bei Hypopituitarismus (Chu et al., 1999), Osteomalazie, Rachitis und Osteoporose.

10. Nephropathie: makro- und mikroskopische Nierenanomalien, gewöhnlich manifestiert in Form eines Debré-de-Toni-Fanconi-Syndroms bzw. einer Tubulopathie mit Ionen- und Säure-Basen-Haushaltsstörungen (Katsanos et al., 2001; Rötig et al., 2003; Emma et al., 2006; Yamashita et al., 2008).

11. Laborchemische Veränderungen: erhöhter CK-Spiegel (Sciacco et al., 2001; Yamashita et al., 2008), sideroblastische Anämie, z.B. im Rahmen der Entwicklung des dem KSS vorausgehenden Pearson-Syndroms (Wilson et al., 1993), aber auch bei den Patienten, welche nicht am PS (Pearson et al., 1979) erkrankt sind.

12. Gastrointestinale Symptome mit Leberfunktionsstörungen (Wilson et al., 1993) oder enteralen Resorptionsstörungen.

1.8 Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit der CPEO und dem KSS und singulären Deletionen der mitochondrialen DNA in der bisherigen Studienlage

Obwohl nach der Erstbeschreibung der CPEO/CPEO-plus und des KSS intensive klinische, histologische und biochemische Studien durchgeführt wurden (Berenberg et al., 1977; DiMauro et al., 1985), blieb die Pathogenese beider Erkrankungen lange unbekannt.

Den Durchbruch brachte 1988 die Arbeit vom Holt, Harding und Morgan-Huges (Holt et al., 1988), in der über Deletionen der mitochondrialen DNA bei Patienten mit mitochondrialen Myopathien berichtet wurde. Die Erkenntnis, dass größere singuläre Deletionen der mitochondrialen DNA im Zusammenhang mit der progredienten Ophthalmoplegie und dem KSS stehen, konnte nachfolgend durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt werden (Lestienne et al., 1988; Ozawa et al., 1988; Zeviani et al., 1988).

1.8.1 Southern-Blot-Analysen von Blut- und Muskelproben

Die ersten molekulargenetischen Untersuchungen sprachen für eine Analogie zwischen der klinischen Multiorganbeteiligung und der Verteilung der singulären Deletionen in verschiedenen Geweben bei den Patienten mit einem KSS-Phänotyp. Es wurden mittels Southern-Blot-Analyse die singulären Deletionen sowohl in einem postmitotischen Gewebe (Muskel) als auch in einem mitotischen Gewebe (Blut) bei Patienten mit einem KSS-Phänotyp in mehreren Arbeiten nachgewiesen. Hierzu gehören folgende Einzelfallberichte:

- Moraes et al., 1989 (1 Patient wies eine singuläre mtDNA-Deletion im Muskel und im Blut auf; 1 Patient im Muskel, im Hirn und in der Leber; 3 Patienten im Muskel und in Fibroblasten);
- Larsson et al., 1990 (2 Patienten wiesen die Deletion im Muskel und in Fibroblasten auf; 1 Patient im Muskel, im Blut und in Fibroblasten);
- Eviatar et al., 1990 (1 Patient wies die Deletion im Muskel, im Blut, in Fibroblasten der Haut und im Nierengewebe auf);
- Zeviani et al., 1990 (1 Patient wies die Deletion im Skelett- und Herzmuskel, in der Leber, der Milz, der Niere und im Hirngewebe auf);
- McShane et al., 1991 (1 Patient wies die Deletion im Muskel und Blut auf);
- Poulton et al., 1991a (1 Patient wies die Deletion im Muskel und Blut auf);
- Fischel-Ghodsian et al., 1992 (1 Patient wies die Deletion im Blut auf);
- Midro et al., 1995 (1 Patient wies die Deletion im Blut auf);
- DeCoo et al., 1997 (2 Patienten wiesen die Deletion im Muskel und Blut auf);
- Mohri et al., 1998 (1 Patient wies die Deletion im Muskel und Blut auf).

Zupanc et al., 1991, konnten eine Deletion der mitochondrialen DNA bei einer Patientin, die eine Kombination des Kearns-Sayre-Phänotyps und des MELAS-Syndroms aufwies, mittels Southern-Blot-Analyse in Muskel- und Blut-DNA nachweisen.

Bei den Patienten mit dem CPEO-Phänotyp wurden hingegen die singulären mtDNA-Deletionen mittels der Southern-Blot-Untersuchung zwar im Muskelgewebe, nicht jedoch in den mitotischen Geweben wie Blut nachgewiesen:

- Zeviani et al., 1990 (bei 5 CPEO-Patienten, dieselbe Arbeit zeigte jedoch auch singuläre Deletionen in anderen Geweben mittels PCR, siehe 1.8.2.)
- Merelli et al., 1991 (bei 1 CPEO-Patienten)

1.8.2 PCR-Untersuchungen von Blut- und Muskelproben

Mit der Einführung der sensitiven PCR-Untersuchung zeigte sich die diagnostische Überlegenheit der PCR gegenüber der Southern-Blot-Analyse, vor allem in der Untersuchung der DNA-Proben aus Blut, wo der Heteroplasmiegrad niedriger ist (Zeviani et al., 1990 Poulton et al., 1991b; Tabaku et al., 1999). Mittels dieser hochsensitiven Methode konnte nachgewiesen werden, dass auch die oligosymptomatischen Patienten mit dem CPEO- bzw. dem CPEO-plus-Phänotyp die singulären Deletionen sowohl in den postmitotischen als auch in den mitotischen Geweben aufwiesen. Es handelt sich hier ebenfalls um Einzelfallberichte:

- Johns et al., 1989a (1 Patient mit CPEO-plus wies die Deletion im Muskel und Blut auf)
- Zeviani et al., 1990 (einige der 5 untersuchten CPEO-Patienten wiesen die Deletion im Muskel und Blut auf)
- DeCoo et al., 1997 (1 CPEO- Patient wies die Deletion im Blut auf)
- Tabaku et al., 1999 (1 CPEO- plus-Patient wies die Deletion im Muskel und Blut auf)
- Poulton et al., 1991b (8 von 24 Patienten mit mitochondrialer Myopathie und 5 von 12 asymptomatischen Angehörigen wiesen die Deletion im Blut auf)

Bei den Patienten mit KSS konnte die singuläre Deletion der mtDNA mittels PCR-Untersuchung ebenfalls in beiden Geweben (Blut und Muskel) nachgewiesen werden:

- Ota et al., 1991 (3 von 4 untersuchten KSS-Patienten wiesen die Deletion im Muskel und Blut auf)

1.8.3 PCR-Untersuchungen von Urinzellen

Der Untersuchung der Urinzellen, die ein mitotisches Gewebe repräsentieren, wurde bislang in der Diagnostik der CPEO und des KSS keine bedeutsame Rolle eingeräumt. Eine singuläre mtDNA-Deletion in Urinzellen wurde bislang von zwei Autoren mittels PCR bei jeweils einem Patienten mit CPEO nachgewiesen (Johns at al., 1989b; Shanske et al., 2002).

Die neuen Untersuchungen (McDonnell et al., 2004; Shanske et al., 2004) der mit einem MELAS-Syndrom assoziierten Punktmutation 3243A>G zeigten, dass diese sich in den Urin-Zellen mit einer ähnlich hohen Mutationslast im Vergleich zu den Muskelzellen bzw. einer höheren im Vergleich zu den Blut-Leukozyten nachweisen lässt. Die singulären mtDNA

Deletionen konnten in Urinzellen häufiger und mit höherer Mutationslast bei jüngeren und schwerer betroffenen Patienten beobachtet werden (Blackwood et al., 2010).

1.9 Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit der CPEO und multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA in der bisherigen Studienlage

Die autosomal vererbte Form der CPEO/CPEO-plus mit multiplen Deletionen der mtDNA bildet eine genetisch heterogene Gruppe, die durch Mutationen in den nukleären Genen verursacht wird. Die Anzahl der nukleären Gendefekte ist in den vergangenen Jahren auf 6 gewachsen (siehe 1.4.3).

Die multiplen Deletionen bei CPEO wurden vor allem in postmitotischen Geweben identifiziert (Moslemi et al., 1999; Van Goethem et al., 2003b; Spinazolla u. Zeviani 2005). Es gibt nur wenige systematische Untersuchungen, die multiple Deletionen in verschiedenen Geweben untersucht haben:

- Suomalainen et al., 1992; Suomalainen et al., 1997: Bei 3 Patienten mit autosomal-dominant vererbter CPEO wurden multiple mtDNA-Deletionen in Hirngewebe, der Skelett- und Herzmuskulatur vorgefunden.
- Nishizuka et al., 1998: Bei Zwillingen mit CPEO fanden sich die multiplen Deletionen in der mtDNA von Skelettmuskelgewebe, jedoch nicht in Bluteukozyten.
- Moslemi et al., 1999: Bei einer Patientin mit autosomal-dominant vererbter CPEO wurden multiple mtDNA-Deletionen überwiegend im Hirn und in der Skelettmuskulatur, zusätzlich auch in der Lunge und der Schilddrüse vorgefunden.

Es schien, dass die multiplen Deletionen im Blut nicht nachzuweisen waren (Suomalainen u. Kaukonen 2001). Die neuesten Untersuchungen (Milone et al., 2008) konnten jedoch multiple Deletionen der mtDNA im Blut und Muskel von Kindern mit POLG1-Mutation und SANDO-Symptomatik (sensorische ataktische Neuropathie, Dysarthrie, Ophthalmoparese) mittels PCR nachweisen.

Bei den Patienten mit autosomal-dominant vererbter CPEO erreichen die multiplen Deletionen in den postmitotischen Geweben Werte von ca. 40% im Muskel (Carozzo et al., 1998; Suomalainen et al., 1997) bis zu 60% im Hirn (Suomalainen et al., 1997). Der Anteil der multiplen mtDNA-Deletionen scheint in den Muskelproben der Patienten mit autosomal-rezessiver CPEO-Form niedriger (10%) als derjenigen mit autosomal-dominanter Form zu sein (Carozzo et al., 1998).

Außer bei nukleären Gendefekten treten die multiplen Deletionen der mtDNA auch (wie bereits im Kapitel 1.3.2 erwähnt) bei Alterungsprozessen, bei anderen Muskelerkrankungen, insbesondere der Einschlusskörpermyositis (Oldfors et al., 2006) oder degenerativen Erkrankungen auf. In diesen Fällen sind die multiplen Deletionen nicht ein Ausdruck des Defektes der intergenomischen Kommunikation, sondern entstehen als somatische Mutationen und werden auch meistens in postmitotischen Geweben (Corral-Debrinski et al., 1992a; Mitusi et al., 2002), selten aber auch in mitotischen Geweben (Tsuchishima et al., 2000; Li et al., 1995) vorgefunden.

Hinsichtlich der molekulargenetischen Untersuchungsmethoden lassen sich die multiplen Deletionen der mtDNA sowohl in der Southern-Blot-Analyse als auch mittels Long-Range-PCR darstellen, wobei die letztere Methode sensitiver ist (Deschauer et al., 2003b).

2. Zielstellung

Die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) ist eine der häufigsten Manifestationen einer mitochondrialen Erkrankung. Eine besonders schwere Form der CPEO stellt das Kearns-Sayre-Syndrom dar. Es wurde bislang postuliert, dass der Unterschied zwischen KSS und CPEO sowohl im Ausmaß der klinischen, als auch der molekulargenetischen Gewebe- und Organbeteiligung liegt. Das KSS wurde als eine Störung gesehen, die sich durch eine Multisystembeteiligung auszeichnet, während die CPEO eine auf Muskelgewebe begrenzte Erkrankung darstellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der multisystemischen Symptomatik und der Verteilung der Deletionen in mitotischen und postmitotischen Geweben bei Patienten mit CPEO und KSS besteht. Somit wurde der Frage nach der nosologischen Entität des Kearns-Sayre-Syndroms nachgegangen und die diagnostische Wertigkeit der Long-Range-PCR aus Blut und Urin untersucht.

Neben dem Vergleich verschiedener Methoden (PCR und Southern-Blot-Untersuchung) bei den Patienten mit der sporadischen Form der CPEO und des KSS und singulären Deletionen der mtDNA wurde auch die Sensitivität der PCR bei den Patienten mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA untersucht. Schließlich wurde auch ein besonderer Fall eines Patienten mit einer MELAS-Symptomatik und Mutation in einem nukleären Gen beschrieben.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

DNA-Marker

Marker II- DNA Molecular Weight Marker II (0,12-23,1 kbp) (Lösung in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8; 250 µg/ml) von Roche

Marker X- DNA Molecular Weight Marker X (0,07-12,2 kbp) (Lösung in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8; 250 µg/ml) von Roche

Marker 100- O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder von Fermentas

Puffer

EDTA- C₁₀H₁₆N₂O₈, Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat

Tris- (HOCH₂)₃CNH₂

TBE-Puffer- Tris-Borsäure-EDTA-Puffer

50xTAE Puffer- Zusammensetzung: 242g Tris, 57.1 ml Essigsäure, 100ml 0.5mM EDTA pH 8, ad 1000ml H₂O

1xTAE-Puffer- Zusammensetzung: 100ml 50xTAE-Puffer, 4900 ml H₂O

Auftragspuffer (AP)- Zusammensetzung: 500 µl 5% Xylene Cyanol (0.5g Xylene Cyanol in 10ml Aquadest), 500 µl 5% Bromphenolblau (0.5g Bromphenolblau in 10ml Aquadest), 9ml 30% Ficoll (3g Ficoll in 10ml H₂O)

Auftragspuffer 6X Orange Loading Dye Solution von Fermentas

Lösungen für die PCR:

Kit Expand Long Template PCR System von Roche

Taq DNA Polymerase Kit von Qiagen

dNTP-Mix: jeweils 10 mM pro dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

Enzyme

Expanded Long Template Enzyme Mix Roche, 5 U/µl

Taq DNA Polymerase von Qiagen, 5 U/µl

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten

Die Patienten wurden anhand folgender Kriterien in die Studie eingeschlossen:

1. Klinische Symptome: Alle Patienten wiesen eine chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) entweder als Einzelsymptom oder mit unterschiedlicher

Multisystembeteiligung auf. Aus diagnostischen Gründen war eine Muskelbiopsie durchgeführt worden.

2. Molekulargenetische Veränderungen: Bei den Patienten wurden entweder eine singuläre Deletion der mitochondrialen DNA in der Southern-Blot-Analyse aus Muskel-DNA oder multiple Deletionen der mitochondrialen DNA in der Southern-Blot-Analyse und/oder in der PCR-Untersuchung aus Muskel-DNA nachgewiesen.

3. Myohistologische Veränderungen: Nachweis von „Ragged-Red-Fasern“ in der modifizierten Trichrom-Gomori-Färbung oder Vermehrung von COX-negativen Fasern in der kombinierten COX/SDH-Färbung.

Es wurden insgesamt 25 Patienten (17 Frauen und 8 Männer) mit CPEO bzw. KSS und singulären Deletionen und 15 Patienten (7 Frauen und 8 Männer) mit CPEO und multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA untersucht. Die Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen waren im Alter zwischen 13 und 68 Jahren, das Alter der Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen lag zwischen 41 und 76 Jahren.

Zusätzlich wurde ein 29-jähriger Patient mit einem MELAS-Syndrom und multiplen mtDNA-Deletionen untersucht.

Als Kontrollen wurde DNA aus Muskelgewebe und Blut von 10 Patienten (mittleres Alter: 46,6 Jahre, Streubreite: 33-67 Jahre) herangezogen, bei denen eine Muskelerkrankung vermutet wurde, die sich aber nach umfangreichen Untersuchungen (klinisch, laborchemisch aus Blut, elektrophysiologisch, myohistologisch und biochemisch in der Muskelbiopsie) nicht bestätigt hatte. Die Muskelbiopsie war aus diagnostischen Gründen erfolgt.

Die klinischen Daten der Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen hinsichtlich der multisystemischen Symptome wurden den Krankenakten entnommen. Die klinische Untersuchung sowie die Zusatzdiagnostik fanden während des stationären Aufenthaltes oder der ambulanten Vorstellung in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg statt. Ergänzend wurden auch Daten aus anderen medizinischen Einrichtungen, wo die Patienten untersucht wurden, benutzt. Dabei waren eine Liquoruntersuchung (n=6), eine kardiologische (n=21), ophthalmologische (n=22), HNO-ärztliche (n=20) und zerebrale bildgebende (n=17) Diagnostik nur bei einem Teil der Patienten erfolgt.

3.2.2 Untersuchungsmaterial

Es wurde die genomische DNA aus Muskel-, Blut- und Urinproben der Patienten isoliert.

3.2.3 DNA-Präparation

Zur Präparation der genomischen DNA aus dem Muskelgewebe wurde der E.Z.N.A.®Tissue DNA Mini Kit (Safety-Line) der Firma peqLab verwendet. Die DNA aus EDTA-Blut wurde nach der Methode von Miller (Miller et al., 1988) isoliert. Zur Gewinnung von DNA aus dem Urin wurde das QIAamp Viral RNA Mini Kit von Quiagen verwendet. Der in dem Kit enthaltene Lysepuffer (AVL-Puffer) inaktiviert zahlreiche PCR-Inhibitoren, die sich in Urinproben befinden. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde spektrophotometrisch gemessen. In der aus Urin extrahierten DNA war Natriumazid enthalten, das die spektrophotometrischen Messwerte zwischen 220 und 280 nm beeinflusst, so dass die DNA-Konzentration mit dieser Methode hier nicht verlässlich bestimmt werden konnte.

3.3 Genetische Untersuchungsmethoden

3.3.1 Southern-Blot-Analyse

Die Southern-Blot-Analyse erfolgte nach gängigem Protokoll (Sambrook u. Russel, 2001). Bei dieser Methode wurde die in der genomischen DNA enthaltene zirkuläre mtDNA mit dem Restriktionsenzym PvuII oder BamHI einmal geschnitten und somit linearisiert. Anschließend wurde die genomische DNA auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die im Elektrophoresegel vorhandene DNA wurde durch eine alkalische Pufferlösung einsträngig gemacht und anschließend über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond N+ Membran von Amersham) übertragen (geblottet) und durch die Wärme fixiert. Die Hybridisierung (Anlage an den DNA-Einzelstrang einer komplementären DNA) erfolgte mit einer mtDNA-Sonde, die mittels PCR generiert wurde, über Nacht bei 42°C. Die hybridisierte DNA wurde mittels Chemolumineszenz (ECL-Kit) und Entwicklung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

3.3.2 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, die selektiv ein bestimmtes DNA-Fragment millionenfach vermehrt.

Das Prinzip der Methode besteht darin, ein Fragment der DNA zu amplifizieren (vermehren), welches sich zwischen zwei Primern (Starter-Oligonukleotiden) befindet, die sich komplementär auf den ursprünglichen DNA-Strang auflagern (Saiki et al., 1989). Somit entstehen DNA-Stränge (als Kopien), deren Länge durch die Lage der beiden Primer definiert ist. Der PCR-Prozess besteht aus drei Schritten, die in einem Thermocycler wiederholt durchgeführt werden (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1987):

(a) Schritt 1: Trennung (Denaturierung):

Durch Erwärmung auf über 90 Grad Celsius kommt es zur Trennung der DNA-Stränge. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die beide DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Am Anfang der PCR-Reaktion beträgt die Denaturierungszeit einige Minuten, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. In nachfolgenden Zyklen ist die Denaturierungszeit von 10 bis 30 Sekunden ausreichend, um die DNA-Stränge auseinander zu halten.

(b) Schritt 2: Bindung (Hybridisierung, Annealing):

Die Temperatur wird gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge komplementär anlagern können. Die Annealingtemperatur wird anhand der Schmelztemperatur der Primer geschätzt, welche wiederum von der Zusammensetzung der Primer abhängig ist. Es ist wichtig, Primer mit ähnlicher Schmelztemperatur für einen PCR-Prozess zu wählen. Eine weitere Optimierung der Annealingtemperatur wurde dann empirisch ermittelt.

(c) Schritt 3: Verlängerung (Elongation, Polymerisation):

Auf der Matrize von jedem Einzelstrang baut das Enzym Polymerase, beginnend vom 3'-Ende des angelagerten Primers, einen neuen, komplementären DNA-Strang an. So entsteht eine Kopie des ursprünglichen Strangs. Die im Reaktionsansatz enthaltenen Primer und freie Nukleotide werden dabei verbraucht.

Die Schritte 1-3 werden insgesamt in ca. 30 Zyklen wiederholt. In folgenden Zyklen dienen dann die neuen Stränge als Vorlagen.

Die Temperatur der Elongationsphase hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab. Beim Enzymmix der Long-Range-PCR stellt eine Temperatur von 68°C eine optimale Bedingung für die Elongation dar. Bei der konventionellen PCR mit Taq-Polymerase liegt die optimale Temperatur bei 72°C.

Die Elongationszeit hängt von der Länge des amplifizierten DNA-Fragments ab.

(d) Schritt 4: Endphase (finale Elongation)

Schließlich erfolgt einmalig die finale (terminale) Elongation über 7 Minuten, wo die Verlängerung der noch nicht vollständigen DNA-Stränge abgeschlossen werden kann.

Der Ansatz mit vervielfältigter DNA wird bei 4°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur ist die DNA doppelsträngig und kann somit unspezifisch nicht amplifiziert werden.

Weil die neu synthetisierten DNA-Stränge als Vorlagen für den nächsten Zyklus dienen, wird die DNA exponentiell vervielfacht (amplifiziert).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene PCR-Verfahren benutzt:

- a) eine Long-Range-PCR-Untersuchung, die einer Amplifikation von langen Fragmenten der mitochondrialen DNA diente,
- b) eine konventionelle PCR-Untersuchung, die nur beim Vorliegen der „Common Deletion“ ein PCR-Produkt ergab.

3.3.3 Long-Range-PCR

Die Einführung eines Polymerase-Mixes (Barnes 1994) erlaubte Amplifikationen von langen DNA-Fragmenten. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene Long-Range-PCR-Reaktionen zur Anwendung. Es wurden 10kb- bzw. 15kb-lange mtDNA-Fragmente amplifiziert.

In beiden Untersuchungen (Long-Range-PCR 10- und 15-kb) wurden die Primer-Paare so ausgewählt, dass sich überlappende mtDNA-Abschnitte untersucht werden konnten, um eine Deletion sicher aufzudecken (Abb. 2). Da die meisten Deletionen zwischen den beiden Replikationsursprüngen OH und OL liegen, wurde die Long-Range-PCR 10kb, die dieses Gebiet abdeckt, als erste Untersuchung durchgeführt. War hierbei eine Deletion nicht nachweisbar, so kam zusätzlich die 15kb umfassende PCR zur Anwendung.

In beiden Long-Range-PCR-Protokollen betrug die Elongationszeit in den ersten 10 Zyklen 10 Minuten. In den folgenden 20 Zyklen wurde diese in jedem Zyklus um 20 Sekunden verlängert, bis am Ende jeder Long-Range-PCR die Elongationsdauer 16 Minuten und 20 Sekunden betrug. Diese Maßnahme diente der Sicherstellung, dass das gewünschte DNA-Fragment in voller Länge vervielfältigt wird.

3.3.4 Common-Deletion-PCR (CD-PCR)

Diese PCR-Methode wurde zum Nachweis der häufigen sog. „Common Deletion“ verwendet. Die Deletion hat eine Länge von 4977 Basenpaaren und liegt zwischen den Nukleotidenpositionen nt 8470-13447. Bei der CD-PCR-Reaktion lagern sich die Primer auf beiden Seiten in geringem Abstand von der gesuchten Deletion an. Die Bedingungen der Reaktion wurden so ausgewählt, dass nur beim Vorliegen der „Common Deletion“ die Amplifikation des um 4,9 kb verkürzten mtDNA-Fragmentes zustande kommt und ein Produkt von 470 Basenpaaren ergibt. In der CD-PCR-Reaktion wurde die konventionelle Taq-Polymerase (kein Long-Range-PCR-Enzym-Mix) verwendet, die keine Amplifikation von sehr langen Fragmenten erlaubt. Mit der CD-PCR-Reaktion wurde Muskel-DNA von den Patienten mit einer Deletionslänge um 5 kb getestet (n= 15). Beim Vorliegen einer anderen als der „Common Deletion“ kam entweder das erwartete Produkt von 470 bp überhaupt nicht zustande oder hatte eine andere Länge.

3.3.5 Reaktionsprotokolle

Long-Range-PCR (10 kb)

	Initiale Denaturierung	10 Zyklen			20 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	93°C	93°C	57°C	68°C	93°C	57°C	68°C	68°C	4°C
Zeit (Min.)	3:00	0:30	0:30	10:00	0:30	0:30	10:00- 16:20	7:00	∞

Long-Range-PCR (15kb)

	Initiale Denaturierung	10 Zyklen			20 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	93°C	93°C	62°C	68°C	93°C	62°C	68°C	68°C	4°C
Zeit (Min.)	3:00	0:10	0:30	10:00	0:10	0:30	10:00- 16:20	7:00	∞

Common-Deletion-PCR (CD-PCR):

	initiale Denaturierung	32 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	94°C	94°C	70°C	72°C	72°C	4°C
Zeit (Min.)	1:00	1:00	0:30	1:00	10:00	∞

3.3.6 Reaktionsansatz

Die Long-Range-PCR wurden mit einem Kit Expand Long Template PCR System von Roche und die Common-Deletion-PCR mit einem Taq DNA Polymerase Kit von Qiagen durchgeführt.

Long-Range-PCR (10 kb):

Mastermix 1

1,5 µl Primer 10kb-F (10pmol/l)

1,5 µl Primer 10kb-R (10pmol/l)

2,5 µl dNTP-Mix

18,5 µl H₂O

Mastermix 2

10 µl BSA 0,1%

5 µl Puffer 3

8,55 µl H₂O

0,75 µl Enzym-Mix (Expanded Long Template Enzyme Mix Roche 5 U/µl)

DNA-Volumen: 2 µl

Long-Range-PCR (15 kb):

Mastermix 1

1,5 µl Primer LONG-F (10pmol/l)

1,5 µl Primer CD-R (10pmol/l)

2,5 µl dNTP-Mix

Mastermix 2

5 µl Puffer 2

19,25 µl H₂O

0,75 µl Enzym-Mix (Expanded Long Template Enzyme Mix Roche, 5 U/µl)

DNA Volumen 2 µl

Common-Deletion-PCR (CD-PCR):

Mastermix

2,5 µl Primer CD-F (10pmol/l)

2,5 µl Primer CD-R (10pmol/l)

2,5 µl PCR-Puffer II

0,5 µl dNTP-Mix

1,5 µl MgCl₂

13,3 µl H₂O

0,2 µl Taq-Polymerase (Taq DNA Polymerase von Qiagen, 5 U/µl)

DNA Volumen: 2 µl

3.3.7 Primer-Sequenzen und Lage

Long-Range-PCR (10 kb):

Primer:	mt-Position	5' Sequenz-3'
Long 10 kb-F	6221-6238	CCCTCTCTCCTACTCCTG
Long 10 kb-R	16153-16133	CAGGTGGTCAAGTATTTATGG

Long-Range-PCR (15 kb):

Primer:	mt-Position	5' Sequenz-3'
LONG-F	15149-15174	TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGC
CD-R	13720-13692	GGCTTCCGGCTGCCAGGCCTTTAATGGGG

Common-Deletion-PCR (CD-PCR):

Primer:	mt-Position	5' Sequenz-3'
CD-F	8274-8305	CCCTCTACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC
CD-R	13720-13692	GGCTTCCGGCTGCCAGGCCTTTAATGGGG

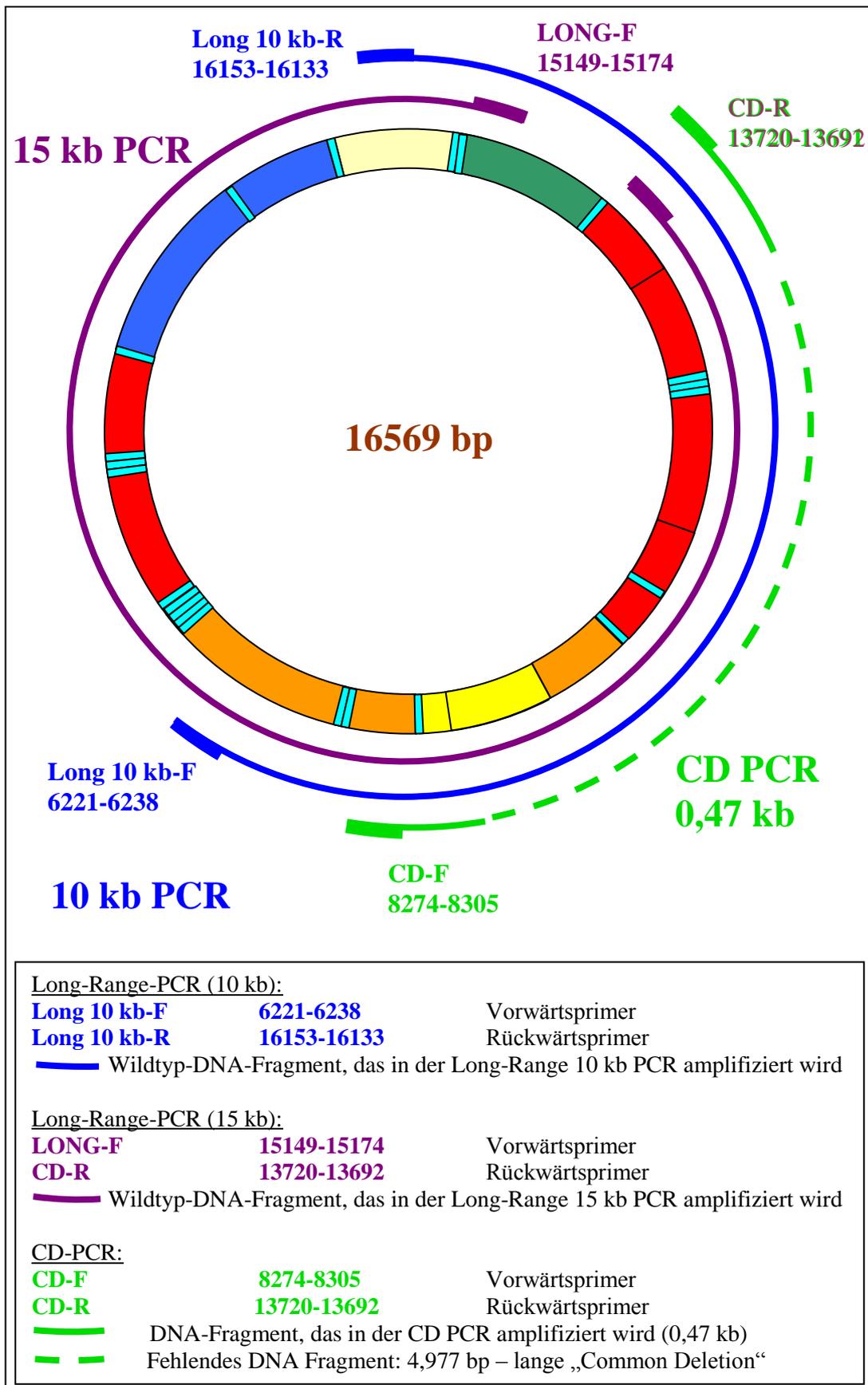


Abb. 2: mtDNA mit Darstellung der Primerlage und der amplifizierten DNA-Fragmente

3.3.8 Modifikationen der Long-Range-PCR-Untersuchung

Um die Sensitivität des Deletionsnachweises zu erhöhen wurden verschiedene Veränderungen der PCR-Untersuchung vorgenommen.

(a) Modifikation der Elongationszeit

Die Dauer der Elongationszeit wird durch die Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes determiniert, d.h. je länger der Amplifikat, desto länger muss auch die Elongationszeit sein.

Um eine bessere Darstellung der singulären mtDNA-Deletionen zu gewährleisten, wurden sowohl in der Long-Range-PCR 10 kb, als auch in der Long-Range-PCR 15 kb drei verschiedene Elongationszeiten von 10, 4 oder 2 Minuten angewendet. Die finale Elongationszeit dauerte entsprechend den Standardbedingungen 7 Minuten.

Diese Modifikation der Elongationszeit wurde in den Long-Range-PCR bei den Untersuchungen von singulären und multiplen mtDNA-Deletionen angewendet.

Reaktionsprotokolle:

Long-Range-PCR (10 kb), 4 Min. Elongationszeit

	initiale Denaturierung	10 Zyklen			20 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	93°C	93°C	57°C	68°C	93°C	57°C	68°C	68°C	4°C
Zeit (Min.)	3:00	0:30	0:30	4:00	0:30	0:30	4:00- 10:20	7:00	∞

Long-Range-PCR (10 kb), 2 Min. Elongationszeit

	initiale Denaturierung	10 Zyklen			20 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	93°C	93°C	57°C	68°C	93°C	57°C	68°C	68°C	4°C
Zeit (Min.)	3:00	0:30	0:30	2:00	0:30	0:30	2:00- 8:20	7:00	∞

Long-Range-PCR (15 kb), 4 Min. Elongationszeit

	initiale Denaturierung	10 Zyklen			20 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	94°C	92°C	62°C	68°C	92°C	62°C	68°C	68°C	4°C
Zeit (Min.)	3:00	0:10	0:30	4:00	0:10	0:30	4:00- 10:20	7:00	∞

Long-Range-PCR (15 kb), 2 Min. Elongationszeit

	initiale Denaturierung	10 Zyklen			20 Zyklen			finale Elongation	
Temperatur	94°C	92°C	62°C	68°C	92°C	62°C	68°C	68°C	4°C
Zeit (Min.)	3:00	0:10	0:30	2:00	0:10	0:30	2:00- 8:20	7:00	∞

(b) Modifikation der DNA-Konzentration und des dNTP-Gehaltes im PCR-Ansatz

Bei der Untersuchung der Patienten mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA wurde außer der Verkürzung der Elongationszeit auch eine Reduktion der DNA-Menge im PCR-Ansatz (Verdünnung mit H₂O im Verhältnis 1:10) sowie eine Reduktion der dNTP-Menge von 2,5 µl dNTP-Mix auf 2,0 µl pro Ansatz durchgeführt. Sowohl die Reduktion der dNTP- als auch der DNA-Menge im PCR-Ansatz dienten der Erhöhung der Spezifität der PCR-Untersuchungen.

3.3.9 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Long-Range-PCR-Produkte erfolgte in einem 0,8%-igen, die der CD-PCR-Produkte in einem 1,5%-igen, horizontalen Agarosegel.

Für das Gel wurde die Agarose in 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach der Polymerisation (ca. 30 Minuten) wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt. 8 µl von jeder DNA-Probe wurden mit je 2 µl Loading-Buffer versetzt. Das Gemisch (10 µl) wurde in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard sind Marker II, Marker X (bei Produkten der Long-Range-PCR) und Marker 100 bp (bei CD-PCR-Produkten) in einer Menge von 3 µl pro Geltasche bei jeder Elektrophorese mitgelaufen. Die Elektrophorese lief bei 120 mV für 90 Minuten (bei CD-PCR Produkten) bzw. 3 Stunden (bei Produkten der Long-Range-PCR) im TBE-Puffer bei Raumtemperatur.

Die Gele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (0,04 µg/ml) über 25 Minuten gefärbt und die DNA-Banden am UV-Transluminator (GeneFlash von Syngene) sichtbar gemacht und als Thermodruck und Datenfile dokumentiert.

3.3.10 Untersuchung der nukleären Mutationen bei den Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen

Bei der Mehrzahl der Patienten mit multiplen Deletionen und CPEO waren die nukleären Gene Adenin-Nukleotid-Translokator-1-(ANT-1), Twinkle-(C10Orf2) sowie das Polymerase-Gamma (POLG1)- und POLG-2-Gen bereits untersucht worden. Hinsichtlich des RRM2B-Gens war nur die bislang beschriebene Mutation R327X untersucht worden. Bei dem Patienten mit MELAS-Phänotyp war die mitochondriale Punktmutation 3243A>G ausgeschlossen worden.

Bei dem einen Patienten mit einem MELAS-Phänotyp und multiplen Deletionen wurden das ANT1- und das Twinkle-Gen mittels Sequenzierung analysiert wie vorbeschrieben (Kaukonen et al. 2000; Spelbrink et al. 2001). Das gesamte POLG1-Gen wurde von der Mitochondrial Research Group in Newcastle upon Tyne/UK untersucht.

3.4 Statistische Auswerteverfahren

Zur statistischen Auswertung wurde das SPSS-Programm (Version 16) benutzt. Es kamen folgende statistische Tests zur Anwendung: Chi-Quadrat-Test (bei kleinen Probengrößen wurde zusätzlich eine Korrektur mit dem Exakten Fisher-Test durchgeführt), Mann-Whitney-U-Test, t-Test und Varianzanalyse.

4 Ergebnisse

4.1 Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen

4.1.1 Klinische Daten von 25 Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen

Die klinischen Daten aller Patienten mit singulären Deletionen der mitochondrialen DNA wurden in der Tabelle 1 zusammengestellt. Von 25 untersuchten Patienten erfüllten 3 die Kriterien des KSS. Die anderen 22 Patienten bildeten die CPEO-Gruppe mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung.

Nur eine Person hatte eine positive Familienanamnese (Nr. 10). Die Mutter, ähnlich wie die Patientin selbst, präsentierte ein CPEO-plus-Syndrom mit beidseitiger Ptosis, Ermüdbarkeit der Gliedmaßen und gelegentlich Schluckbeschwerden und wurde bereits publiziert (Binder u. Sluga 1980).

Als erstes Symptom manifestierte sich bei der Mehrheit der Patienten (n=23) eine progrediente Ptosis, bei einem eine Retinopathie (Nr. 2) und bei einem eine proximale Muskelparese (Nr. 14). Zu den Herzleitungsstörungen gehörten: SA-Block (Nr.: 5, 12) AV-Block (Nr.: 2, 3, 12, 17), Schenkelblock (Nr.: 1, 2, 4, 5, 11). Eine Herzschrittmacher-Implantation war nur bei einer Patientin (Nr. 3) mit KSS-Phänotyp notwendig. Die pathologischen Veränderungen in der Schädel-MRT-Untersuchung beinhalteten hyperintense T2-Läsionen im Marklager, im Thalamus und in den Stammganglien sowie eine leichte Hirnatrophie (Nr.: 1, 4, 6, 10, 12) und Verkalkungen in den Basalganglien (Nr. 4). Zu den psychischen Störungen gehörten psychomotorische Verlangsamung (Nr. 1), leichte Intelligenzminderung (Nr. 4), vegetative Labilität mit einem Hyperventilationssyndrom (Nr. 5) und depressive Episoden (Nr.: 7, 12, 14). Als endokrine Störungen wurden Diabetes mellitus (Nr.: 1, 3, 6) oder pathologischer oGTT (nach 2 Stunden BZ: 7,8 - 11,1 mmol/l) (Nr.: 5, 11, 14), Kleinwuchs (Nr.: 2, 3), Amenorrhoe (Nr. 2), Hypermenorrhoe (Nr. 7) und eine Verminderung des ACTH-Spiegels (Nr. 4) klassifiziert. Wesentliche Veränderungen in den Laboruntersuchungen, wie z.B. Blutbildveränderungen (insbesondere sideroblastische Anämie) oder Zeichen einer Nephropathie, fanden sich bei keinem der 25 Patienten.

Tab. 1: Befunde aller 25 Patienten mit singulären Deletionen der mitochondrialen DNA

+	Ergebnis positiv
-	Ergebnis negativ
n.d.:	Untersuchung nicht durchgeführt
Alter (Jahre):	Alter bei Probenentnahme in Jahren
Geschl.:	Geschlecht
K:	seit Kindheit
M:	männlich
W:	weiblich
Erkrankungsbeginn (Jahre):	Alter bei dem Erkrankungsbeginn (in Jahren)
CPEO:	chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
KSS:	erfüllte Diagnosekriterien des Kearns-Sayre-Syndroms
Muskulatur:	Beteiligung der quergestreiften Muskulatur
Herz:	kardiale Beteiligung
Schluckstörung:	Dysphagie oder Dysarthrophonie
Belastungsintoleranz:	abnorme muskuläre Ermüdbarkeit, Myalgien bei Belastung
Paresen:	manifeste Paresen der Extremitäten- oder Nackenmuskulatur
ZNS:	Beteiligung des zentralen Nervensystems (siehe 4.1.2 Punkt b)
Innenohrschwerhörigkeit:	sensorineurale Schwerhörigkeit (Innenohr- bzw. Schallempfindungsschwerhörigkeit) in der HNO-ärztlichen Untersuchung
Retinitis pigmentosa:	Pigmentdegeneration der Retina in der augenärztlichen Untersuchung
Zerebelläre Ataxie:	zerebelläre Ataxie in der klinischen Untersuchung
Eiweißerhöhung im Liquor:	Liquoreiweiß > 100 mg/dl
Pathologisches cMRT:	pathologische Veränderungen in der Schädel-MRT-Untersuchung (siehe 4.1.1)
Polyneuropathie:	klinische und/oder elektrophysiologische Zeichen einer sensiblen oder motorischen Neuropathie
Heteroplasmiegrad i.M. (%):	Heteroplasmiegrad im Muskel (%)

Nr.	Patienten Alter (Jahre)/ Geschl.	Erkrankungs- beginn (Jahre)	CPEO	Muskulatur			ZNS				Eiweißerhöhung im Liquor	Pathologisches cMRT	Polyneuropatie	Endokrine Störung	Herz		KSS	Länge der Deletion (kb)	Heteroplasmiegrad i.M. (%)
				Schluck- störung	Belastungs- intoleranz	Paresen	Zerebelläre Ataxie	Psychische Störung	Innenohr - Schwerhörigkeit	Retinitis pigmentosa					Leitungs - störung	Kardio- myopathie			
1	30/ W	10	+	+	+	+	-	+	-	+	n.d.	+	+	+	+	-	+	4	87
2	16/ W	12	+	-	+	-	+	-	+	+	n.d.	-	-	+	+	-	+	2,5	42
3	13/ W	1	+	-	+	-	+	-	-	+	n.d.	n.d.	-	+	+	-	+	6	43
4	38/ M	14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	9	57
5	41/ W	13	+	-	+	+	-	-	+	+	n.d.	-	-	+	+	+	-	5,5	48
6	68/ W	36	+	+	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	+	-	-	-	5	48
7	38/ W	14	+	+	+	+	-	+	-	-	n.d.	-	-	+	-	-	-	5	50
8	49/ W	K	+	+	+	+	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	-	-	n.d.	-	4	40
9	49/ W	35	+	-	-	-	-	-	+	+	n.d.	-	-	+	+	-	-	5	40
10	47/ W	12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	5	52
11	67/ M	17	+	-	-	-	-	-	+	-	n.d.	n.d.	-	+	+	-	-	5	48
12	52/ M	15	+	-	-	-	-	+	-	-	n.d.	+	-	-	+	-	-	5	50
13	14/ W	12	+	-	+	+	-	-	-	+	n.d.	-	-	-	-	-	-	5	60
14	41/ W	35	+	-	-	+	-	+	-	-	n.d.	-	-	+	-	-	-	2,5	78
15	45/ W	K	+	-	+	+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	-	5,5	44
16	46/ M	12	+	-	+	+	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	5	51
17	56/ M	53	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	n.d.	+	-	-	4	37
18	43/ W	33	+	-	-	+	-	-	n.d.	+	n.d.	-	-	-	n.d.	n.d.	-	8	11
19	35/ W	24	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	52
20	35/ M	32	+	-	+	+	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	-	-	4	45
21	48/ W	22	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-	2	38
22	64/ W	n.d.	+	-	+	-	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	-	5	29
23	57/ W	36	+	-	-	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.	-	5,5	30
24	25/ M	16	+	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	-	-	-	-	-	5,5	40
25	36/ M	20	+	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	5	48

4.1.2 Einteilung der Patienten in klinische Untergruppen

Das gesamte Patientenkollektiv wurde zwecks statistischer Auswertung anhand der klinischen Symptome in verschiedene Gruppen geteilt:

(a) KSS bzw. CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung:

- Kearns-Sayre-Syndrom-Gruppe (KSS-Gruppe), n=3: In diese Gruppe wurden Patienten eingeschlossen, welche die von Rowland vorgeschlagenen Diagnosekriterien des KSS (Rowland 1983) erfüllen: externe Ophthalmoplegie, Pigmentdegeneration der Retina, Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr und mindestens eines der folgenden Symptome: Herzblock, Liquoreiweißerhöhung, zerebelläre Ataxie.
- Ophthalmoplegie-Gruppe (CPEO-Gruppe), n=22: In die CPEO-Gruppe wurden Patienten eingeschlossen, die außer einer Ophthalmoplegie eine unterschiedlich ausgeprägte Multisystembeteiligung aufwiesen, jedoch die Kriterien des KSS nicht erfüllten. Ein Patient aus der Gruppe zeigte ausschließlich eine Ptosis und progrediente Lähmung der äußeren Augenmuskeln, jedoch keine Hinweise auf eine andere Begleitsymptomatik (Nr. 25).

(b) Patienten mit Beteiligung des zentralen Nervensystems (CPEO + ZNS) bzw. Patienten ohne Beteiligung des zentralen Nervensystems (CPEO –ZNS):

- CPEO + ZNS, n=12: In Gruppe mit ZNS-Beteiligung (CPEO + ZNS) wurden Patienten mit mindestens einem der folgenden Symptome eingeschlossen: zerebelläre Ataxie, Demenz oder geistige Retardierung, sensoneurale Schwerhörigkeit und Retinitis pigmentosa. Hierzu gehörten 12 Patienten (Nr.: 1- 6, 8, 9, 11, 13, 18, 21).
- CPEO - ZNS, n=13: Die Gruppe der Patienten ohne ZNS-Beteiligung (CPEO - ZNS) bildeten 13 Patienten, die keine der o.g. Symptome aufwiesen.

(c) Patienten mit Paresen bzw. Patienten ohne Paresen:

- Patienten mit Paresen, n= 15: In diese Gruppe wurden Patienten mit manifesten Extremitätenparesen (Nr.: 1, 4-8, 10, 13-16, 19-20) oder Paresen der Nackenmuskulatur, letztere isoliert (ohne Extremitätenparesen) bei zwei Patienten (Nr.: 18, 23), eingeteilt.
- Patienten ohne Paresen, n=10: Patienten ohne manifeste Paresen.

4.1.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei den Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen

(a) Gewebedistribution der singulären mtDNA-Deletionen im Vergleich zum Phänotyp

- **Nachweis der singulären mtDNA-Deletionen im Blut und Urin bei Patienten mit KSS bzw. CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung:**

Bei allen Patienten war im Muskel die singuläre Deletion der mtDNA sowohl im Southern-Blot als auch in der PCR-Untersuchung nachweisbar.

Die Nachweisrate der Deletion im Blut (Untersuchung aller 25 Patienten), im Urin (Untersuchung von 20 Patienten) bzw. in beiden mitotischen Geweben (Blut und/oder Urin) mittels PCR zeigt die Tabelle 2.

Tab. 2: Vergleich der Nachweisrate der singulären mtDNA-Deletionen im Blut und Urin bei Patienten mit KSS (n=3) und CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung (n=22)

Phänotyp (Gruppen)	Deletion im Blut	Deletion im Urin	Deletion im Blut und/oder Urin
KSS (n=3)	2/3 (66,7%)	1/2 (50 %)	3/3 (100%)
CPEO (n=22)	9/22 (40,9%)	6/18 (33,3%)	11/22 (50%)

Die statistische Analyse mit dem Chiquadrat-Test ergab:

- Deletion im Blut: $\chi^2(1) = 0,71$; $p > 0,05$, ($p = 0,399$)
- Deletion im Urin: $\chi^2(1) = 0,22$; $p > 0,05$, ($p = 0,639$)
- Deletion im Blut und/oder Urin: $\chi^2(1) = 2,68$; $p > 0,05$, ($p = 0,102$)

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der singulären mtDNA-Deletion in den beiden mitotischen Geweben (Blut und Urin) bei den Patienten aus der KSS- und der CPEO-Gruppe.

- Nachweis der singulären mtDNA-Deletionen im Blut und Urin bei Patienten mit Beteiligung des zentralen Nervensystems (CPEO + ZNS) bzw. Patienten ohne Beteiligung des zentralen Nervensystems (CPEO – ZNS):

Die Häufigkeit der singulären mtDNA-Deletion im Blut bzw. im Urin wurde mit der klinischen Beteiligung des zentralen Nervensystems verglichen.

Tab. 3: Vergleich der Nachweisrate der singulären mtDNA-Deletion im Blut und im Urin bei Patienten mit ZNS-Beteiligung (n=12) und ohne ZNS-Beteiligung (n=13)

Phänotyp (Gruppen)	Deletion im Blut	Deletion im Urin	Deletion im Blut und/oder Urin
CPEO + ZNS (n=12)	6/12 (50,0%)	4/12 (25,0%)	8/12 (75,0%)
CPEO - ZNS (n=13)	5/13 (38,5%)	4/13 (30,8 %)	6/13 (46,2%)

Die statistische Analyse mit dem Chi-Quadrat-Test ergab folgende Resultate:

- Deletion im Blut: $\chi^2(1) = 0,34$; $p > 0,05$, ($p = 0,561$)
- Deletion im Urin: $\chi^2(1) = 0,02$; $p > 0,05$, ($p = 0,891$)
- Deletion im Blut und/oder Urin: $\chi^2(1) = 1,07$; $p > 0,05$, ($p = 0,302$)

Die singuläre mtDNA-Deletion war bei den Patienten aus der CPEO + ZNS-Gruppe im Blut, im Urin bzw. in beiden mitotischen Geweben nicht signifikant häufiger als in der CPEO – ZNS- Gruppe nachweisbar.

- Gewebedistribution der singulären mtDNA-Deletionen im Vergleich zum Alter bei Erkrankungsbeginn:

Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verteilungsmuster der Deletion in einem (Muskel), zwei (Muskel und Blut oder Urin) bzw. drei Geweben (Muskel und Blut und Urin) und dem Alter bei Erkrankungsbeginn besteht.

Tab. 4: Deskriptive Statistik des Alters bei Erkrankungsbeginn und der Verteilung der Deletion in einem, zwei bzw. drei Geweben

Gruppen	Patientenzahl	Mittelwert	Standardabweichung
Deletion in 1 Gewebe	9	27,33	13,69
Deletion in 2 Geweben	9	14,56	8,97
Deletion in 3 Geweben	4	26,25	7,23

Die Auswertung mit Chi-Quadrat-Test ergab statistisch signifikante Unterschiede für die Gruppe 2 (Patienten mit Deletion in 2 Geweben): $\chi^2(2) = 6,47$; $p < 0,05$, ($p = 0,039$). Diese Patienten waren signifikant jünger bei Erkrankungsbeginn im Vergleich zu Patienten mit der Deletion in 1 und 3 Geweben. Diese Relation stellt Abbildung 5 dar.

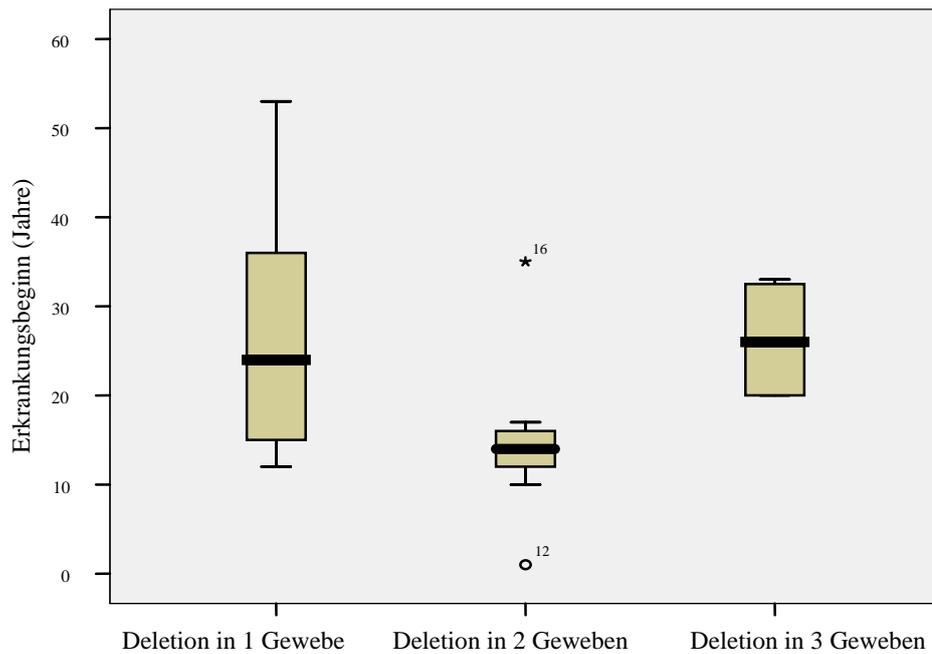


Abb. 3: Abhängigkeit zwischen dem Erkrankungsbeginn (Jahre) und Nachweis der singulären mtDNA-Deletion in 1 (Muskel), 2 (Muskel und Blut oder Urin) oder 3 Geweben (Muskel und Blut und Urin)

(b) Heteroplasmiegrad im Muskel im Vergleich zum Phänotyp

- Heteroplasmiegrad im Muskel bei Patienten mit KSS bzw. CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung:

Es wurde zunächst untersucht, ob sich die Patienten aus der KSS- und CPEO-Gruppe hinsichtlich des Heteroplasmiegrades im Muskel unterscheiden.

Tab. 5: Deskriptive Statistik des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) bei den Patienten in der KSS- und CPEO-Gruppe

Phänotyp (Gruppen)	Patientenzahl	Mittelwert (%)	Standardabweichung
KSS	3	57,33	25,70
CPEO	22	45,50	12,86

Auf Grund der Unterschiede in der Patientenzahl beider Gruppen wurde anstatt des t-Tests der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede

im Heteroplasmiegrad in den beiden Gruppen ($U = 30,0$; $p > 0,05$, $p = 0,801$), was die Abbildung 6 darstellt.

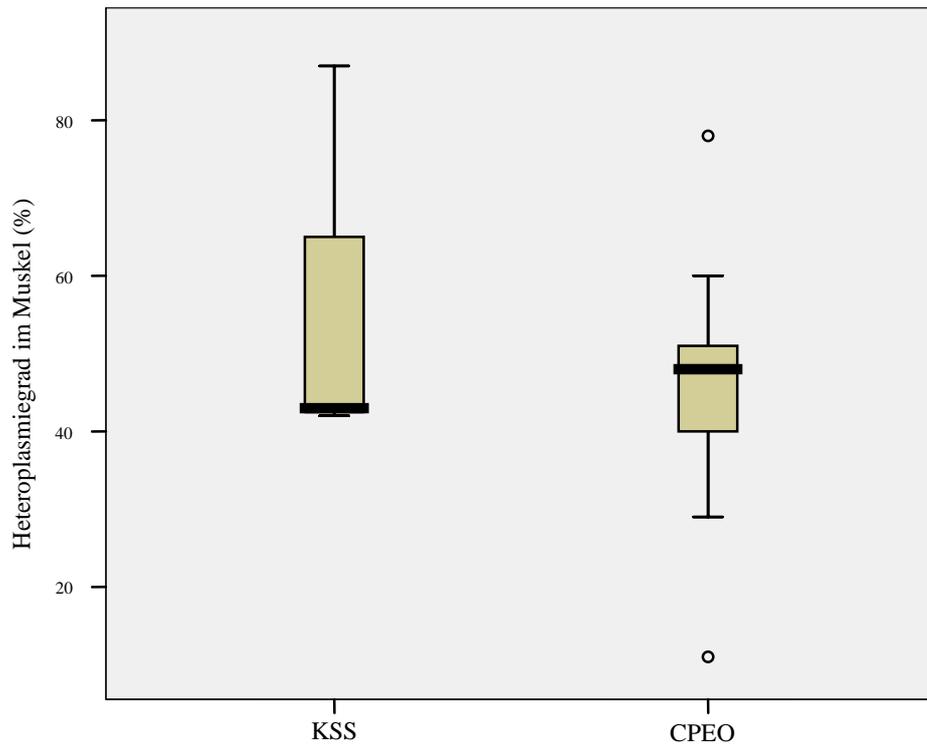


Abb. 4: Vergleich des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) in der KSS- (n=3) und CPEO-Gruppe (n=22)

- Heteroplasmiegrad im Muskel bei Patienten mit Beteiligung des zentralen Nervensystems (CPEO + ZNS) bzw. Patienten ohne Beteiligung des zentralen Nervensystems (CPEO -ZNS):

Des Weiteren erfolgte eine Beurteilung des Heteroplasmiegrades im Muskel bei den Patienten mit und ohne Beteiligung des zentralen Nervensystems.

Tab. 6: Deskriptive Statistik des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) bei den Patienten in den Gruppen: CPEO + ZNS und CPEO - ZNS

Phänotyp (Gruppen)	Patientenzahl	Mittelwert (%)	Standardabweichung
CPEO + ZNS	12	46,83	17,55
CPEO - ZNS	13	47,00	12,17

Die statistische Analyse mit dem t-Test zeigte bei $t(23) = -0,03$ und $p > 0,05$, ($p = 0,978$), dass der Heteroplasmiegrad im Muskel bei den Patienten mit ZNS-Beteiligung nicht signifikant höher/niedriger als bei den Patienten ohne ZNS-Beteiligung war.

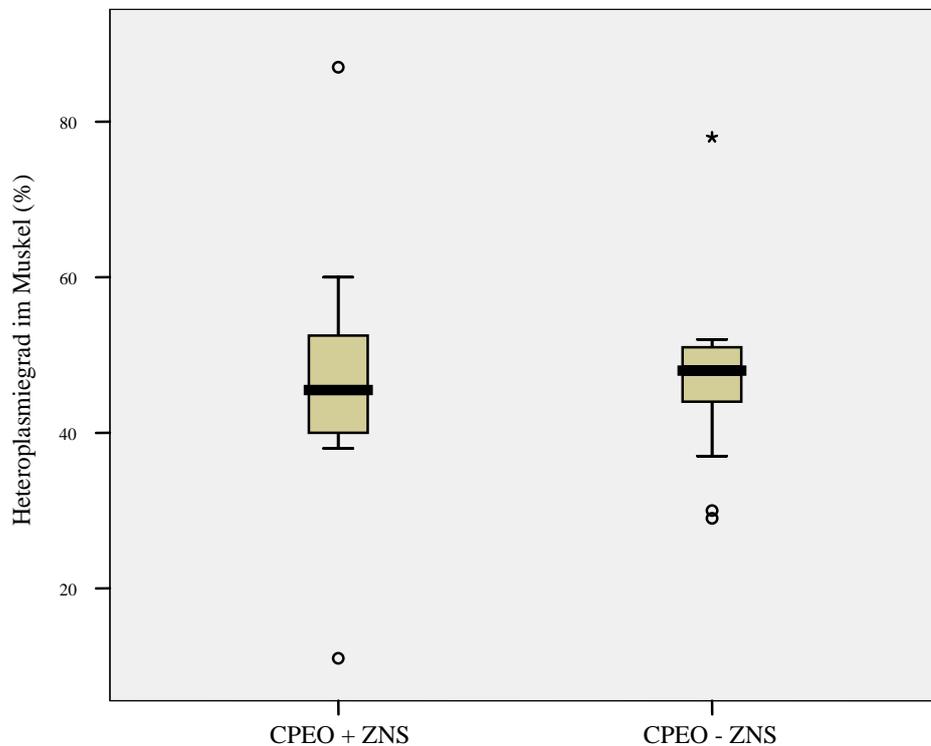


Abb. 5: Vergleich des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) in den Gruppen: CPEO + ZNS (n=12) und CPEO – ZNS (n=13)

- Heteroplasmiegrad im Muskel bei Patienten mit Paresen bzw. Patienten ohne Paresen:

Um die Korrelation zwischen dem Phänotyp und dem Heteroplasmiegrad im Muskelgewebe näher einzuschätzen, wurden die Patienten anhand der Muskelbeteiligung (Paresen) untersucht.

Tab. 7: Deskriptive Statistik des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) bei den Patienten in den Gruppen mit und ohne Extremitätenparesen

Phänotyp (Gruppen)	Patientenzahl	Mittelwert (%)	Standardabweichung
Patienten mit Paresen	15	50,20	17,73
Patienten ohne Paresen	10	42,00	6,32

Der mittlere Heteroplasmiegrad im Muskel war bei den Patienten mit Paresen höher als in der Gruppe ohne Paresen. Diese Unterschiede waren jedoch in der statistischen Auswertung mit dem t-Test nicht signifikant bei: $t(23) = 1,40$, bzw. $p > 0,05$, ($p = 0,176$).

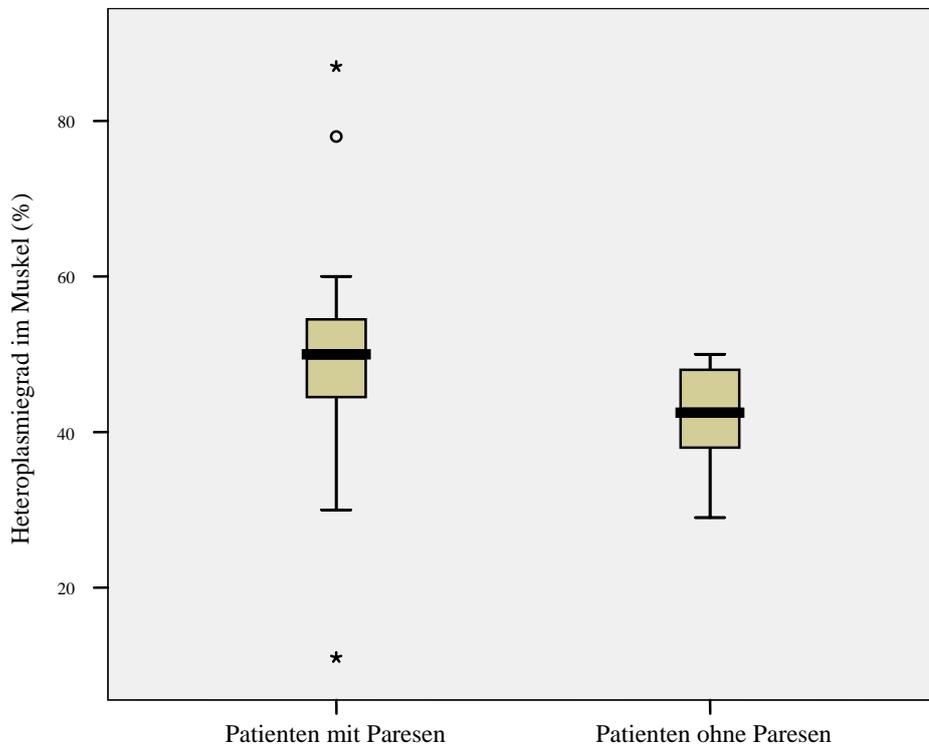


Abb. 6: Vergleich des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) in den Gruppen: Patienten mit Paresen (n=15) und Patienten ohne Paresen (n=10).

(c) Länge der Deletion im Vergleich zum Phänotyp

- Länge der Deletion bei Patienten mit KSS bzw. CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung:

Die Deletionslänge reichte von 2,0 bis 9,0 kb. Die Länge der mtDNA-Deletion wurde bei den Patienten mit einem KSS-Phänotyp im Vergleich zur CPEO-Gruppe beurteilt.

Tab. 8: Deskriptive Statistik der Deletionslänge (kb) in der KSS- und CPEO-Gruppe

Phänotyp (Gruppen)	Patientenzahl	Mittelwert (kb)	Standardabweichung
KSS	3	4,17	1,76
CPEO	22	5,02	1,45

Auf Grund der Unterschiede in der Patientenzahl beider Gruppen wurde anstatt des t-Tests der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die Analyse zeigte bei $U = 25,0$ bzw. $p > 0,05$, ($p = 0,482$) keine statistisch signifikanten Unterschiede der Deletionslänge in den beiden Gruppen.

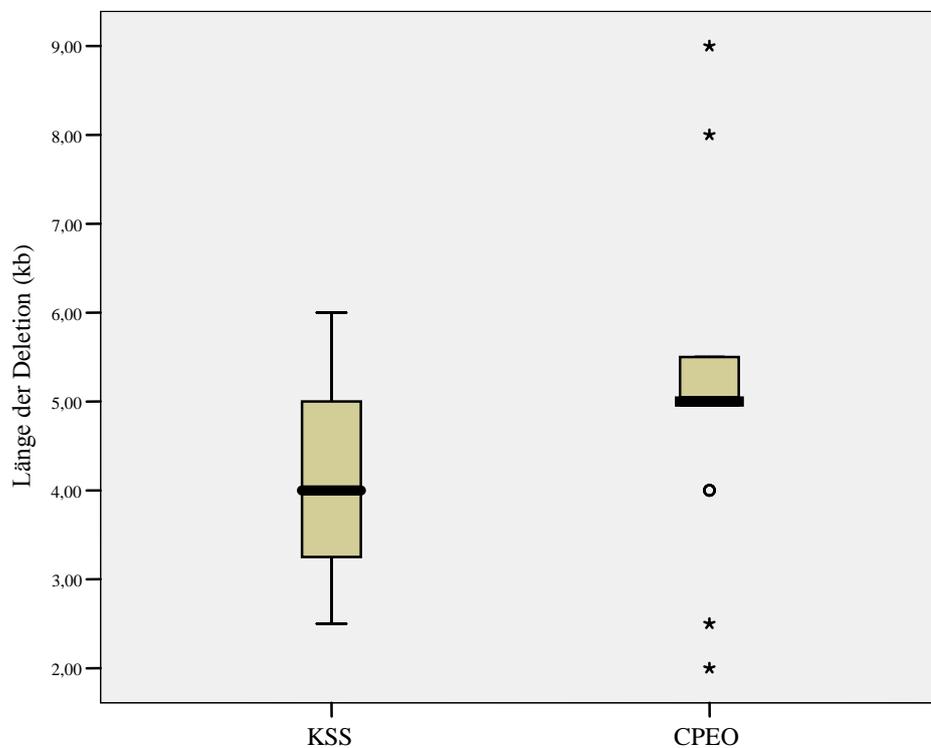


Abb. 7: Vergleich des Länge der Deletion (kb) in den Gruppen: KSS (n=3) und CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung (n=22)

(d) Alter der Patienten im Vergleich zu den molekulargenetischen Befunden

- Alter der Patienten beim Erkrankungsbeginn

Das durchschnittliche Alter bei dem Erkrankungsbeginn aller Patienten lag bei 21,5 Jahren, wobei das genaue Alter zum Erkrankungsbeginn in 3 Fällen nicht eruiert werden konnte (Nr.: 8, 15, 22). Das mittlere Alter zum Erkrankungsbeginn lag bei 7,6 Jahren bei den Patienten mit KSS (n=3) sowie bei 23,7 Jahren bei den Patienten mit CPEO und unterschiedlicher

Multisystembeteiligung (n=20). Vordem 20. Lebensjahr waren 14 Patienten aus dem Kollektiv erkrankt, davon alle KSS-Patienten (n=3) und 11 Patienten aus der CPEO-Gruppe.

- Alter der Patienten beim Erkrankungsbeginn im Vergleich zum Heteroplasmiegrad im Muskel

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und dem Alter beim Erkrankungsbeginn besteht, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Es zeigte sich bei $F(1, 23) = 1,88$ bzw. $p > 0,05$, ($p = 0,184$) keine signifikante Korrelation zwischen beiden untersuchten Werten.

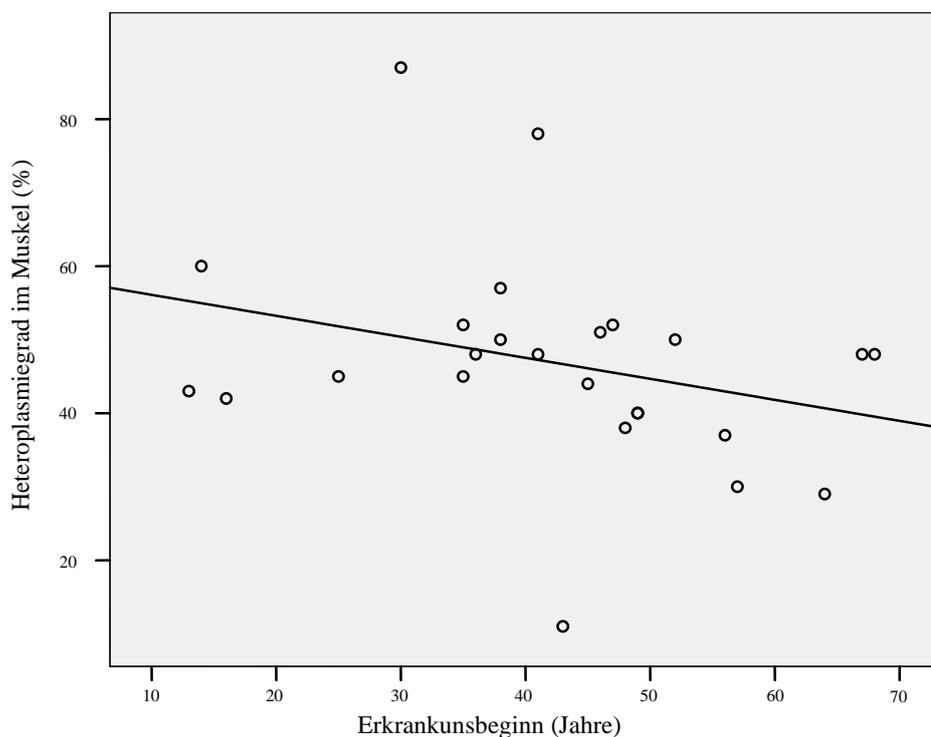


Abb. 8: Abhängigkeit zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und dem Alter der Patienten bei Erkrankungsbeginn

- Alter der Patienten beim Erkrankungsbeginn im Vergleich zur Länge der Deletion

Es wurde auch die Korrelation zwischen der Deletionslänge und dem Alter der Patienten beim Erkrankungsbeginn ebenfalls mittels der Varianzanalyse untersucht. Hierbei fand sich bei $F(1, 23) = 0,003$, $p > 0,05$, ($p = 0,959$) ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zwischen beiden untersuchten Werten. Diese Ergebnisse stellt Abbildung 9 dar.

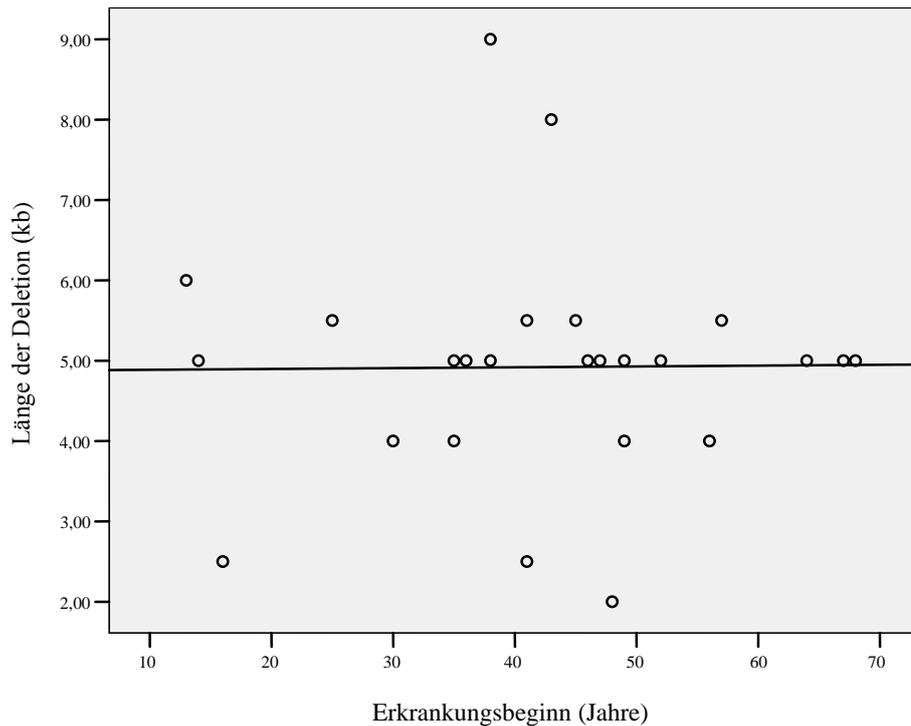


Abb. 9: Abhängigkeit zwischen der Länge der Deletion und dem Alter der Patienten beim Erkrankungsbeginn

- Alter der Patienten bei der Probenentnahme

Das durchschnittliche Alter aller untersuchten Patienten mit einer singulären Deletion der mtDNA lag zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Muskelbiopsie) bei 39,9 Jahren, davon bei Patienten mit KSS bei 19,7 Jahren und bei Patienten mit CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung bei 45,2 Jahren.

- Alter der Patienten bei der Probenentnahme im Vergleich zum Deletionsnachweis in den mitotischen Geweben

Es wurde die Korrelation zwischen dem Alter der Patienten bei der Probenentnahme und einem positiven bzw. negativen Deletionsbefund aus den mitotischen Geweben untersucht.

Tab. 9: Deskriptive Statistik vom Alter der Patienten bei der Probenentnahme und positivem sowie negativem Deletionsbefund im Blut und im Urin

untersuchte Geweben	Deletionsnachweis	Patientenzahl	Alter der Patienten bei der Probenentnahme Mittelwert (Jahre)	Standardabweichung
Blut	ja	11	32,18	13,12
	nein	14	49,93	11,54
Urin	ja	7	42,71	12,09
	nein	13	42,31	16,65

Die statistische Auswertung mit dem t-Tests für Blut und mit dem Mann-Whitney-U-Test (große Gruppenunterschiede in der Patientenzahl) für Urin zeigte folgende Ergebnisse:

- für Blut: $t(23) = 3,60$; $p < 0,05$, ($p = 0,002$)
- für Urin: $U = 38,50$; $p > 0,05$, ($p = 0,579$)

Die Patienten, die eine Deletion im Blut aufwiesen, waren bei der Probenentnahme signifikant jünger als die Personen, die keine Deletion im Blut aufwiesen. In der Untersuchung der Deletion im Urin zeigte sich diese Korrelation nicht.

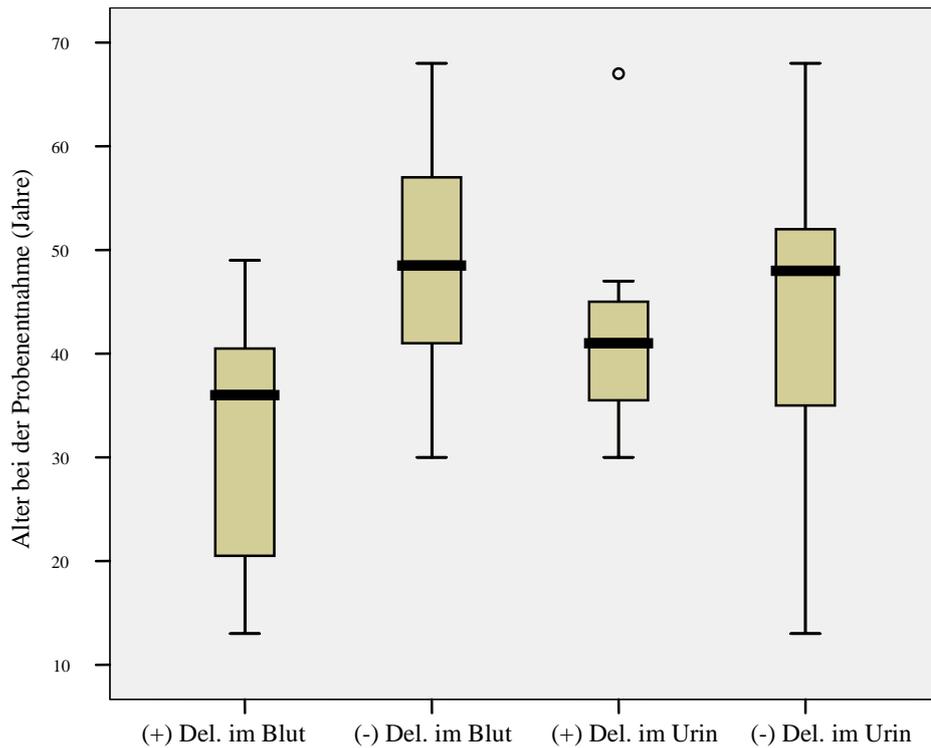


Abb. 10: Abhängigkeit des Alters der Patienten bei der Probenentnahme von einem positiven (+) oder negativen (-) Ergebnis der PCR-Untersuchung der singulären mtDNA-Deletion aus mitotischen Geweben (Blut und Urin)

4.1.4 Unterschiede im Genotyp und Phänotyp bei den Patienten mit der 4977-bp „Common Deletion“ und bei den Patienten mit anderen singulären Deletionen der mtDNA

Um den Einfluss der Deletionslänge und -lage zu eliminieren, wurden die Patienten (n=7) mit einer identischen Deletion („Common Deletion“) separat beurteilt. Die Befunde stellt Tabelle 10 dar.

Tab. 10: Vergleich der klinischen und molekulargenetischen Befunde der Patienten mit „Common Deletion“ (n=7) und der Patienten mit anderen singulären mtDNA-Deletionen (n=18)

klinische und molekulargenetische Befunde	„Common Deletion“ (n=7)	andere Patienten (n=18)
Deletionsnachweis im Blut	5/7 (71,4%)	6/18 (33,3%)
Deletionsnachweis im Urin	2/7 (28,6%)	5/13 (38,5%)
Deletionsnachweis im Blut und/oder Urin	5/7 (71,4%)	9/18 (50,0%)
Erkrankungsbeginn (Jahre)	14,83 (SD: 2,99)	24,87 (SD: 13,75)
Alter bei der Probenentnahme (Jahre)	36,86 (SD: 13,42)	44,17 (SD: 15,42)
Heteroplasmiegrad im Muskel (%)	50,86 (SD: 4,63)	45,39 (SD: 16,95)

Die statistische Analyse beider Gruppen mit dem χ^2 - Test / Chiquadrat-Test ergab:

- für Deletionsnachweis im Blut: $\chi^2(1) = 2,97$; $p > 0,05$, ($p = 0,085$)
- für Deletionsnachweis im Urin: $\chi^2(1) = 0,20$; $p > 0,05$, ($p = 0,658$)
- für Deletionsnachweis im Blut und/oder Urin: $\chi^2(1) = 0,94$; $p > 0,05$, ($p = 0,332$)

Die statistische Analyse beider Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test ergab:

- für Erkrankungsbeginn (Jahre): $U = 25,5$; $p > 0,05$, ($p = 0,132$)
- für Alter bei der Probenentnahme (Jahre): $U = 46,5$; $p > 0,05$, ($p = 0,326$)
- für Heteroplasmiegrad im Muskel (%): $U = 30,5$; $p < 0,05$, ($p = 0,047$)

Es fanden sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Patienten mit Common Deletion und den Patienten mit anderen singulären Deletionen hinsichtlich des Deletionsnachweises in den mitotischen Geweben.

Die Patienten mit der „Common Deletion“ wiesen einen signifikant höheren Heteroplasmiegrad im Muskel auf und waren jedoch statistisch nicht signifikant früher als die anderen Patienten erkrankt. Das Alter bei der Probenentnahme war bei den Patienten mit „Common Deletion“ nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum restlichen Patientenkollektiv.

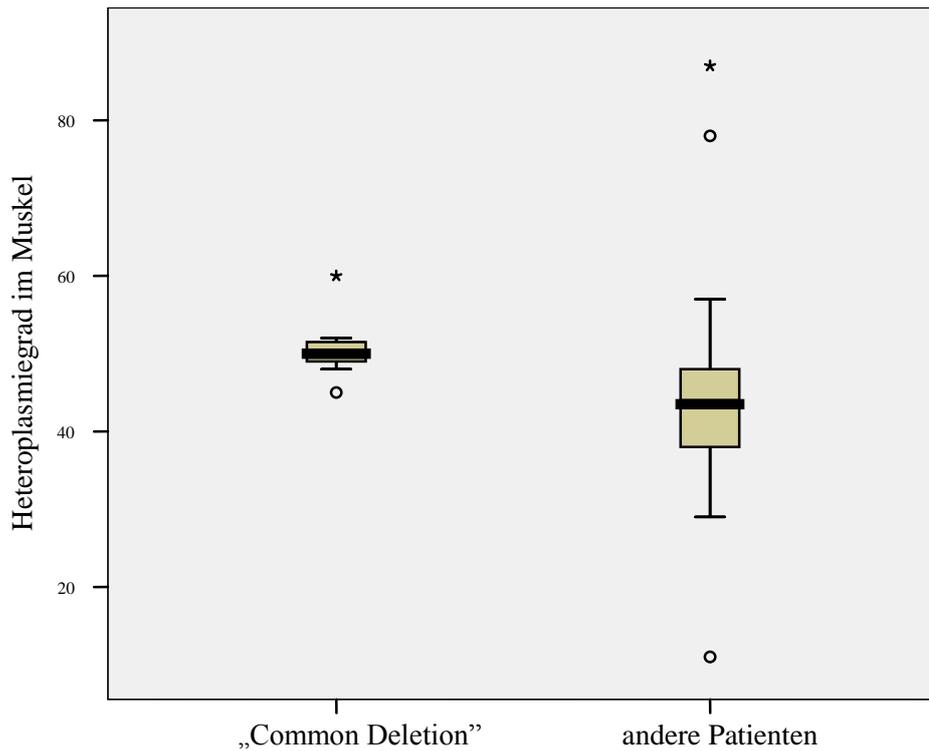


Abb. 11: Vergleich des Heteroplasmiegrades im Muskel (%) bei den Patienten mit der „Common Deletion“ und den Patienten mit anderen singulären mtDNA-Deletionen

4.1.5 Molekulargenetische Befunde der Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen

Die molekulargenetischen Daten aller Patienten mit singulären Deletionen der mitochondrialen DNA wurden in der Tabelle 11 zusammengestellt.

Tab. 11: Molekulargenetische Daten von 25 Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen.

Die Nummerierung der Patienten ist mit der Tabelle 1 identisch. Von links nach rechts wurden die Patienten von den schwer betroffenen bis zu den oligosymptomatischen Patienten geordnet.

- n.d.: Untersuchung nicht durchgeführt
- M: männlich
- W: weiblich
- K: in der Kindheit
- + Ergebnis positiv
- Ergebnis negativ

Symptomatik	KSS			CPEO																						
	1 W	2 W	3 W	4 M	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W	11 M	12 M	13 W	14 W	15 W	16 M	17 M	18 W	19 W	20 W	21 W	22 W	23 W	24 M	25 M	
Patientennummer																										
Geschlecht																										
Erkrankungsbeginn (Jahre)	10	12	1	14	13	36	14	K	35	12	17	15	12	35	K	12	53	33	24	32	22	n.d	36	16	20	
Alter bei Probenentnahme (Jahre)	30	16	13	38	41	68	38	49	49	47	67	52	14	41	45	46	56	43	35	35	48	64	57	25	36	
Länge der Deletion (kb)	4	2,5	6	9	5,5	5	5	4	5	5	5	5	5	2,5	5,5	5	4	8	5	4	2	5	5,5	5,5	5	
Nachweis der „Common Deletion“	n.d	n.d	n.d	n.d	-	-	+	n.d	-	+	-	+	+	n.d	-	+	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-	-	+	+	
Deletion im Southern Blot aus Muskel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Heteroplasmiegrad (%) im Southern Blot aus Muskel	87	42	43	57	48	48	50	40	40	52	48	50	60	78	44	51	37	11	52	45	38	29	30	40	48	
Deletion im Southern Blot aus Blut	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Deletion in PCR aus Muskel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Deletion in PCR aus Blut	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	
Deletion in PCR aus Urin	+	n.d	-	n.d	n.d	-	-	-	-	+	+	-	-	+	n.d	-	-	+	-	+	-	n.d	-	-	+	

(a) Nachweisrate singulärer mtDNA-Deletionen mittels Southern-Blot-Analyse und Long-Range-PCR-Untersuchung im Muskel, Blut und Urin

- Southern-Blot-Untersuchung:

Eine singuläre mtDNA-Deletion im Muskel wurde bei allen untersuchten Patienten (n=25) nachgewiesen (Einschlusskriterium). In der mtDNA aus Blut dagegen war eine singuläre Deletion nur bei einem von 25 untersuchten Patienten nachweisbar. Der Patient wies einen CPEO-plus-Phänotyp (Tab. 1 und 11, Patient Nr. 4) auf.

-Long-Range-PCR-Untersuchung:

Eine singuläre mtDNA-Deletion im Muskel war ebenfalls bei allen untersuchten Patienten (n=25) nachweisbar, in der DNA aus Blut bei 11 von 25 (44%) und in der Urin-DNA bei 7 von 20, d.h. bei 35% der untersuchten Patienten nachweisbar.

Die Länge der Deletion bei den einzelnen Patienten stimmte in allen untersuchten Geweben und mittels beider Verfahren (Southern-Blot, Long-Range-PCR) überein.

(b) Detektion der 4977-bp „Common Deletion“ der mtDNA

Die Nachweisrate der „Common Deletion“ lag bei 28 % (7 von 25 Patienten, Tab.11). Die Common-Deletion-PCR-Untersuchung wurde ausschließlich aus Muskel-DNA durchgeführt, um sie sicher nachzuweisen.

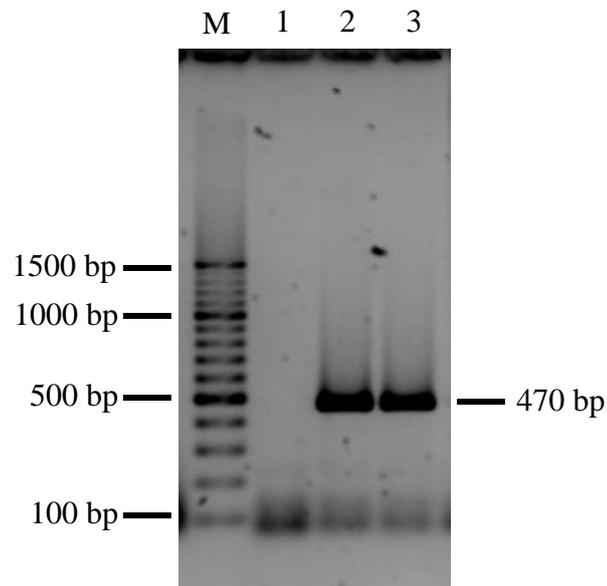


Abb. 12: Gel-Elektrophorese der Common-Deletion-PCR-Untersuchung (Produkt: 470 bp) aus Muskel-DNA bei 3 Patienten mit der Deletionslänge von 5 kb in der Long-Range-PCR-Untersuchung

Spur M: Marker 100,

Spur 1: Common-Deletion-PCR-Untersuchung negativ,

Spuren 2-3: Common-Deletion-PCR-Untersuchung positiv.

(c) Sensitivität der Long-Range-PCR-Untersuchung in Abhängigkeit von der Elongationszeit

Durch die Verkürzung der Elongationszeit nahm die Sensitivität der PCR-Untersuchung zu. Die verkürzte mtDNA-Bande konnte in vielen Fällen (18 von 25) mittels Long-Range-PCR mit verkürzter Elongationszeit (von 4 und 2 Minuten) deutlich besser dargestellt werden (Abb. 13). Weiterhin konnten die singulären Deletionen der mtDNA, die bei Standardbedingungen mit 10 Minuten Elongationszeit nicht zur Darstellung kamen, bei Elongationszeiten von 4 und 2 Minuten nachgewiesen werden. Dies wurde vor allem in der PCR-Untersuchung von Blut (bei 6 Patienten), aber auch von Urin (bei 2 Patienten) beobachtet (Tab. 12).

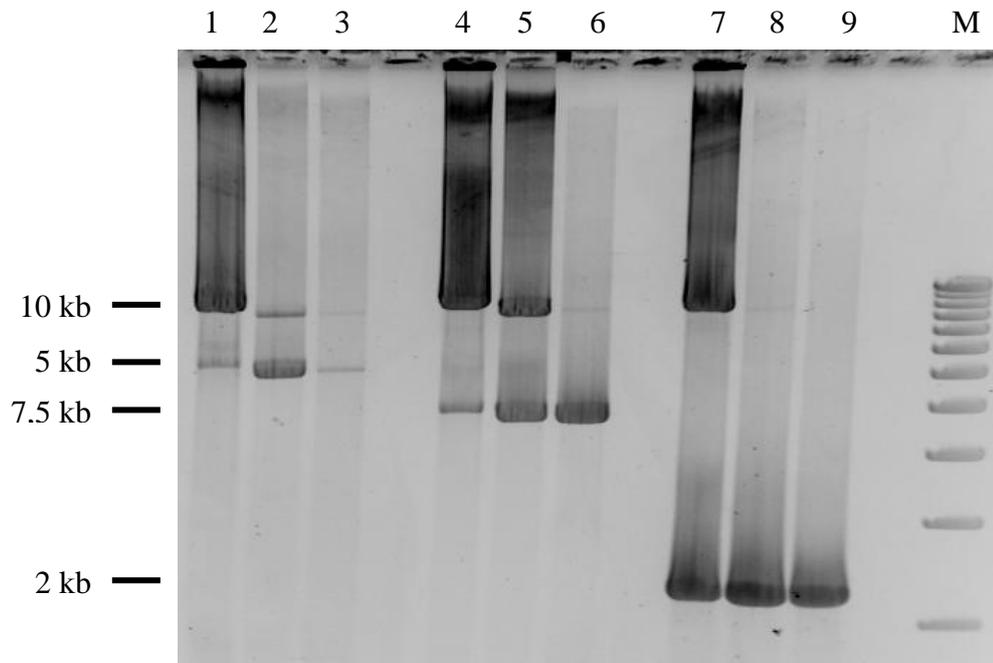


Abb. 13: Gel-Elektrophorese der Long-Range-PCR-Untersuchung aus Blut-DNA. Zunahme der Sensitivität der Long-Range-PCR-Untersuchung durch Verkürzung der Elongationszeiten von 10 auf 4 bzw. 2 Minuten, bei unterschiedlicher Länge der mtDNA-Deletion

Die Proben wurden von 1 bis 9 nummeriert. M: Marker.

Spuren 1-3: Eine relativ kurze Deletion von 2,5 kb. Bei 10 Minuten Elongationszeit (Spur 1) war eine schwache Deletionsbande sichtbar. Bei 4 Minuten Elongationszeit (Spur 2) wurde das verkürzte Fragment von 7,5 kb besser amplifiziert, war allerdings bei 2 Minuten Elongationszeit (Spur 3) deutlich schlechter nachweisbar.

Spuren 4-6: Eine 5 Kilobasen lange Deletion. Die Standardbedingungen mit 10 Minuten (Spur 4) waren für die Amplifikation des 10 Kilobasen langen Wildtypfragmentes optimal, das verkürzte 5 kb lange Fragment kam bei Elongationszeit von 4 Minuten (Spur 5) deutlicher und bei 2 Minuten (Spur 6) noch stärker zur Darstellung, wobei die Elongationszeit von 2 Minuten (Spur 6) für das Wildtyp-Fragment nicht mehr ausreichend war.

Spuren 5-9: Eine relativ lange Deletion von 8 kb. Bei der Elongationszeit von 10 Minuten (Spur 7) waren sowohl das Wildtypfragment als auch die Deletion gut sichtbar. Die Wildtyp-DNA wurde schon bei 4 Minuten Elongationszeit (Spur 8) kaum noch amplifiziert, wobei das verkürzte 2 kb lange Fragment eine sehr kräftige Bande bildete. Bei Elongationszeit von 2 Minuten (Spur 9) war nur die Deletion zu sehen.

Tab. 12: Elektrophoresenergebnisse der 10 kb-Long-Range-PCR-Untersuchung (24 Patienten) und 15 kb-Long-Range-PCR-Untersuchung (eine Patientin, die mit * gekennzeichnet wurde) aus drei Geweben bei Elongationszeiten von 10, 4, und 2 Minuten.

Deletionslänge von 9 bis 2 kb. Zunahme der Sensitivität der PCR-Untersuchung bei Verkürzung der Elongationszeit.

CPEO:	chronisch progressive Ophthalmoplegie bzw. Ophthalmoplegia-plus-Symptomatik
KSS:	Kearns-Sayre-Syndrom
kb:	Kilobasen
n.d.:	Untersuchung nicht durchgeführt
Nr.:	Patientennummer (identisch mit der Nummerierung in den Tabellen 1 und 9)
M:	männlich
W:	weiblich
++	Deletion sehr gut sichtbar
+	Deletion gut sichtbar
(+)	Deletion schwach sichtbar
-	Deletion nicht sichtbar

Phänotyp (Nummer)/Alter/ Geschlecht	Länge der Deletion (kb)	Deletionsnachweis in der PCR aus Muskel			Deletionsnachweis in der PCR aus Blut			Deletionsnachweis in der PCR aus Urin		
		10 Min.	4 Min.	2 Min.	10 Min.	4 Min.	2 Min.	10 Min.	4 Min.	2 Min.
CPEO (Nr. 4)/ 30/ M	9	+	++	-	+	+	++	n.d.	n.d.	n.d.
CPEO (Nr.18)/ 43/ W	8	+	++	++	+	++	++	-	+	-
KSS (Nr. 3)/ 13/ W	6*	++	-	-	++	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 5)/ 41/ W	5,5	+	++	++	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
CPEO (Nr. 15)/45/ W	5,5	+	+	++	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
CPEO (Nr. 23)/ 57/ W	5,5	+	++	++	-	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 24)/ 25/ M	5,5	++	++	+	+	+	-	-	-	-
CPEO (Nr. 6)/ 68/ W	5	+	+	++	-	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 7)/ 38/ W	5	+	++	+	-	+	-	-	-	-
CPEO (Nr. 9)/ 49/ W	5	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-
CPEO (Nr. 10)/ 47/ W	5	+	++	++	+	++	+	(+)	++	(+)
CPEO (Nr. 11)/ 67/ M	5	++	++	-	-	-	-	+	+	-
CPEO (Nr. 12)/ 52/ M	5	+	++	++	-	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 13)/ 14/ W	5	+	++	++	-	++	++	-	-	-
CPEO (Nr. 16)/ 46/ M	5	(+)	++	++	-	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 22)/ 64/ W	5	++	++	+	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
CPEO (Nr. 25)/ 36/ M	5	+	++	++	-	++	+	+	++	(+)
CPEO (Nr. 19)/ 35/ W	5	+	++	++	-	-	-	-	-	-
KSS (Nr.1)/ 30/ W	4	+	+	++	-	-	-	-	(+)	++
CPEO (Nr. 8)/ 49/ W	4	(+)	+	++	-	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 17)/ 56/ M	4	+	++	+	-	-	-	-	-	-
CPEO (Nr. 20)/ 35/ W	4	++	++	+	-	+	-	+	++	-
KSS (Nr. 2)/ 16/ W	2,5	+	++	++	-	+	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
CPEO (Nr. 14)/ 41/ W	2,5	+	++	++	-	-	-	++	+	-
CPEO (Nr. 21)/ 48/ W	2	+	++	++	-	-	-	-	-	-

4.2 Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen

4.2.1 Klinische Daten der Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen

Alle untersuchten Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen wiesen eine CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung auf. Kein Patient erfüllte Diagnosekriterien eines KSS.

4.2.2 Molekulargenetische Befunde der Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen

(a) Nachweis der multiplen mtDNA-Deletionen im Muskel, Blut und Urin mittels Long-Range-PCR-Untersuchung und mittels Southern-Blot-Analyse

Bei allen Patienten (n=15) wurden die multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA in den Muskelproben mittels 10 kb-Long-Range-PCR nachgewiesen. Bei 8 von 13 untersuchten Patienten waren die multiplen Deletionen auch im Southern-Blot sichtbar. Die verlässliche Bestimmung des Heteroplasmiegades war im Southern-Blot aufgrund der multiplen Banden, die zum Teil voneinander nicht abgrenzbar waren, nicht möglich. Die Southern-Blot Untersuchung wurde aus Blut- und Urin-DNA nicht durchgeführt.

Mittels 10 kb-Long-Range-PCR waren im Blut und Urin die multiplen Deletionen bei keinem Patienten nachweisbar. Daher war eine Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation hinsichtlich Verteilung der multiplen Deletionen in verschiedenen Geweben nicht möglich.

(b) Einfluss der Veränderungen in der Long-Range-PCR-Untersuchung auf den Nachweis der multiplen mtDNA-Deletionen

- Verkürzung der Elongationszeit

Die PCR-Untersuchung der DNA aus Muskelproben mit verkürzten Elongationszeiten von 4 und 2 Minuten brachte keinen zusätzlichen Informationsgewinn.

Die multiplen Banden (multiple Deletionen) kamen bei den Patienten in der Untersuchung mit 4 und 2 Minuten Elongationszeit nicht besser zur Darstellung.

Bei den gesunden Kontrollen (n= 10) zeigten sich bei manchen Patienten schwache Banden, die multiplen Deletionen ähnelten (Abb. 16, Spur 2). Bei einer Elongationszeit von 10 Minuten waren diese bei keiner Kontrollperson sichtbar. Bei 4 und 2 Minuten Elongationszeit waren sie schwach sichtbar (5/10 Kontrollen bei 4 Minuten, 7/10 Kontrollen bei 2 Minuten).

Die Wildtyp-Bande war bei der Elongationszeit von 10 Min. gut sichtbar, jedoch meistens bei Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen (8/15) schwächer ausgeprägt als bei den Kontrollpersonen (Abb. 16, Spuren 1 und 5).

Sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollpersonen war die Wildtyp-Bande in der Untersuchung mit 4 Minuten Elongationszeit deutlich schwächer und bei 2 Minuten Elongationszeit kaum mehr darstellbar (Abb. 14).

- Reduktion der DNA-Menge

Durch eine Reduktion der DNA-Menge im PCR-Ansatz (Verdünnung mit H₂O im Verhältnis von 1:10) zeigten sich in Long-Range-PCR bei Kontrollen bei Elongationszeiten von 4 und 2 Minuten nach wie vor unspezifische Banden (5/10 Kontrollen bei 4 Minuten, 5/10 Kontrollen bei 2 Minuten).

- Reduktion des dNTP-Gehaltes

Trotz der Reduktion des dNTP-Gehaltes im PCR-Ansatz wurden weiterhin unspezifische Banden bei den Kontrollpersonen (4/10 Kontrollen bei 4 Minuten, 6/10 Kontrollen bei 2 Minuten) beobachtet. Bei den Probanden kamen die multiplen mtDNA-Deletionen unverändert stark zur Darstellung.

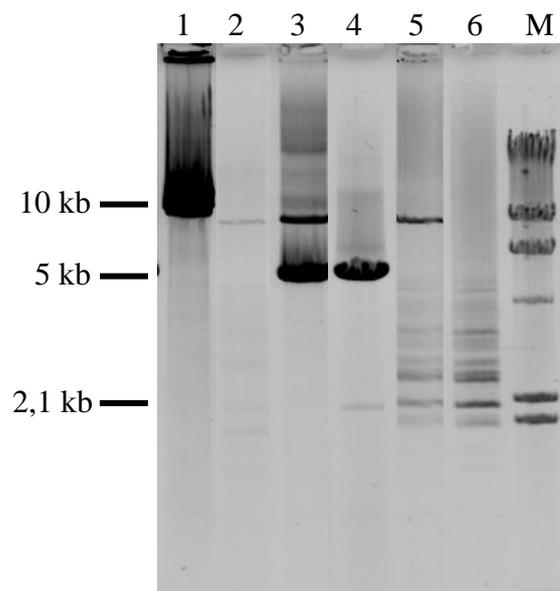


Abb. 14: Gel-Elektrophorese der Long-Range-PCR-Untersuchung aus Muskel-DNA bei der Elongationszeit von 10 und 2 Minuten. Die Proben wurden von 1 bis 6 nummeriert. M: Marker.

Spuren 1-2: negative Kontrolle: bei Elongationszeit von 10 Minuten (Spur 1) war nur Wildtyp-DNA sichtbar, bei Elongationszeit von 2 Minuten (Spur 2) außer der schmalen WT-Bande waren auch schwache multiple Banden sichtbar,

Spuren 3-4: singuläre Deletion (5 kb): bei Elongationszeit von 10 Minuten (Spur 3) waren die Wildtyp-DNA und die Deletion gut sichtbar, bei Elongationszeit von 2 Minuten (Spur 4) war die WT-Bande nicht vorhanden. Außer der deutlichen Deletionsbande waren auch zusätzlich schwache Banden von ca. 2,1 kb sichtbar,

Spuren 5-6: multiple mtDNA-Deletionen: bei Elongationszeit von 10 Minuten (Spur 5) waren Wildtyp-DNA und multiple Deletionen gut sichtbar, bei Elongationszeit von 2 Minuten (Spur 6) waren nur multiple mtDNA-Deletionen sichtbar.

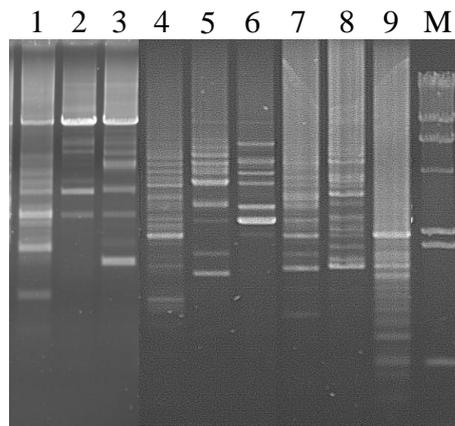


Abb. 15: Gel-Elektrophorese der Long-Range-PCR-Untersuchung aus Muskel-DNA bei Elongationszeit von 10, 4 und 2 Minuten. Die Proben wurden von 1 bis 9 nummeriert. M: Marker. Untersuchung der multiplen mtDNA-Deletionen

Spuren 1-3: Elongationszeit von 10 Minuten: Wildtyp-DNA und multiple Deletionen gut sichtbar,

Spuren 4-6: Elongationszeit von 4 Minuten: Wildtyp-DNA kaum noch darstellbar, multiple Deletionen gut sichtbar,

Spuren 7-9: Elongationszeit von 2 Minuten: Wildtyp-DNA nicht darstellbar, multiple Deletionen zum Teil schwer voneinander zu trennen.

(c) Untersuchung der multiplen mtDNA-Deletionen in den mitotischen Geweben (Blut und Urin)

Die 10 kb-Long-Range-PCR-Untersuchung der DNA aus Blutproben aller Patienten (n=15) zeigte bei 10 und 4 Minuten Elongationszeit nur eine Wildtyp-DNA-Bande und bei einer Elongationszeit von 2 Minuten kein PCR-Produkt.

In der Untersuchung der DNA aus Urinproben wurde mittels PCR mit 10, 4 und 2 Minuten Elongationszeit bei keinem der 4 untersuchten Patienten (Patientennummer: 3,11,12,13) ein Amplifikat erhalten.

(d) Untersuchung der Mutationen der nukleären DNA bei Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen

Von den 15 Patienten mit CPEO und multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA wurden in Kooperation mit der Mitochondrial Research Group in Newcastle upon Tyne (England) Untersuchungen der bekannten nukleären Gene, deren Mutationen in multiplen mtDNA-Deletionen resultieren, durchgeführt. Es konnten bei 5 Patienten die nukleären Mutationen identifiziert werden. Hierbei handelte es sich bei 2 Patienten um Mutationen im Twinkle-Gen: K319T (Deschauer et al., 2003b), K319E (Hudson et al., 2005) sowie bei einem Patienten um eine Mutation im ANT1-Gen: A90D (Deschauer et al., 2005). Im POLG-1-Gen konnte bei einem Patienten die A467T-POLG-1-Mutation homozygot nachgewiesen werden. Ein Patient wurde als compound Heterozygote für zwei POLG-1-Mutationen (A467T und W748S) identifiziert (Paus et al., 2008). Eine Mutation im POLG-2 und im RRM2B-Gen konnte bei keinem Patienten festgestellt werden.

Tab. 13: Ergebnisse der 10 kb-Long-Range-PCR-Untersuchung, der Southern-Blot-Analyse aus Muskel-DNA und der Untersuchung der nukleären Mutationen bei 15 Patienten mit CPEO und multiplen mtDNA-Deletionen

M:	männlich
W:	weiblich
n.d.:	Untersuchung nicht durchgeführt
+	Ergebnis positiv
-	Ergebnis negativ

Patientennummer/ Alter bei Probenentnahme/ Geschlecht/	Untersuchung der Muskel- mtDNA		nukleäre Mutation
	Southern- Blot	Long-Range- PCR	
1/55/W	+	+	nicht identifiziert
2/ 43/ M	+	+	nicht identifiziert
3/ 44/ M	+	+	nicht identifiziert
4/ 54/ M	-	+	nicht identifiziert
5/ 53/ M	+	+	nicht identifiziert
6/ 46/ W	+	+	nicht identifiziert
7/ 37/ W	-	+	nicht identifiziert
8/ 76/ W	-	+	nicht identifiziert
9/ 56/ W	n.d.	+	nicht identifiziert
10/ 68/ W	+	+	nicht identifiziert
11/40/ M	+	+	homozygote POLG1-Mutation A467T
12/ 56/ M	-	+	heterozygote ANT 1-Mutation A90D Deschauer et al., 2005
13/ 45/ M	+	+	heterozygote Twinkle-Mutation K319E Hudson et al., 2005
14/38W	n.d.	+	heterozygote POLG1-Mutationen A467T/ W748S Paus et al., 2008
15/36/M	-	+	heterozygote Twinkle-Mutation K319T Deschauer et al., 2003b

4.3 Patient mit multiplen mtDNA-Deletionen und einem Phänotyp des MELAS-Syndroms

Im Rahmen des Screenings anderer Patienten mit Mitochondriopathien (ohne CPEO) wurden mittels Long-Range-PCR bei einem Patienten mit dem Phänotyp eines MELAS-Syndroms multiple Deletionen der mitochondrialen DNA nachgewiesen. Die mitochondriale Punktmutation 3243A>G (Goto et al., 1990) wurde bereits ausgeschlossen.

Der Patient erkrankte im Alter von 23 Jahren und entwickelte eine multisystemische Symptomatik mit Schlaganfallähnlicher Episode und daraus resultierender persistierender

Hemianopsie und symptomatischer Epilepsie. Zusätzlich bestanden eine sensible Neuropathie und afferente Ataxie sowie kognitive Einbußen. Im zerebralen MRT zeigte sich eine hyperintense Läsion im Lobus occipitalis rechtsseitig in den T2-gewichteten Sequenzen. Der Laktat Spiegel im Liquor war in der Akutsituation mit 3,4 mmol/l deutlich erhöht. Die histologischen Veränderungen im Muskelbiopsat mit Nachweis COX-negativer Fasern sowie Fasern mit vermehrter mitochondrialer Proliferation (Ragged-Red-ähnliche Fasern) ließen auf eine mitochondriale Ursache der Erkrankung schließen.

Molekulargenetisch zeigten sich in der Long-Range-PCR-Untersuchung aus Muskel-DNA multiple Deletionen der mitochondrialen DNA. In der DNA aus Blut und Urin konnten die multiplen Deletionen nicht dargestellt werden (Long-Range-PCR-Untersuchung mit Elongationszeiten von 10, 4 und 2 Minuten). In der Southern-Blot-Analyse aus Muskel waren die multiplen Deletionen nicht nachweisbar.

Im ANT1- und Twinkle-Gen fand sich keine Mutation, es konnten aber zwei heterozygote Mutationen im Polymerase-Gamma-1-Gen identifiziert werden: die Mutation R627Q im Exon 10 und die Mutation G848S im Exon 16.

5 Diskussion

5.1 Patienten mit singulären Deletionen der mitochondrialen DNA

5.1.1 Korrelation zwischen Gewebedistribution der singulären Deletionen der mtDNA und dem Phänotyp

Die singuläre mtDNA-Deletion war in der DNA aus Blut bzw. aus Urin nicht signifikant häufiger bei den Patienten mit dem KSS im Vergleich zur CPEO-Gruppe nachweisbar. In der Betrachtung beider untersuchten mitotischen Gewebe (Blut und/oder Urin) war die singuläre mtDNA-Deletion sowohl bei allen KSS-Patienten als auch bei der Hälfte der CPEO-Patienten nachweisbar.

Diese Daten bestätigen Studienergebnisse (Zeviani et al., 1990; Merelli et al., 1991; Johns et al., 1989a, Johns et al., 1989b; DeCoo et al., 1997; Tabaku et al., 1999), wo der Deletionsnachweis in den post- und mitotischen Geweben für das Kearns-Sayre-Syndrom nicht spezifisch ist, da er auch bei den Patienten mit der CPEO vorgefunden wird.

Wie es in der Tabelle 1 und der Tabelle 11 dargestellt wurde, korrelierte die Anzahl der betroffenen Organe und Systeme (Muskelbeteiligung, ZNS-Beteiligung, pathologischer Liquorbefund, pathologisches cMRT, Polyneuropathie, endokrine Störung, Herzbeteiligung) nicht mit der Distribution der singulären Deletion in den mitotischen Geweben (Blut und/oder Urin). Es fand sich insbesondere kein Zusammenhang zwischen dem Befall des zentralen

Nervensystems und embryologisch verwandter Organe (Innenohr, Retina) und dem Nachweis der singulären mtDNA-Deletionen in den mitotischen Geweben. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von einer Untersuchung aus Frankreich (Auré et al., 2007), die solch einen Zusammenhang an einem ähnlich großen Patientenkollektiv (Untersuchung der Blut-DNA von 27 Patienten) in statistisch relevanter Signifikanz festgestellt hat.

Aus der fehlenden Korrelation zwischen der klinischen Multisystembeteiligung und dem Deletionsnachweis in den mitotischen Geweben stellt sich zunächst die Frage, ob die untersuchten Gewebe (Muskel, aber vor allem Blut und Urin) mit den am meisten betroffenen Organen genetisch verwandt sind.

Zur Beantwortung der ersten Frage sind folgende Fakten zu nennen:

(a) Sowohl Muskelgewebe als auch Blut stammen aus dem Mesoderm, in dem auch Herzmuskel, Herzleitungssystem (Cheng et al., 1999), Skelettsystem, glatte Muskulatur, Bindegewebe, Lymphgefäße und Gonaden den Ursprung haben.

Die bei der CPEO, CPEO-plus und dem KSS immer betroffenen externen Augenmuskeln stammen aus dem Mesenchym (Sevel, 1986), welches aus Zellen aller 3 Keimblätter, vor allem aus dem mittleren Keimblatt (Mesoderm), entsteht.

(b) Die Urin-DNA stammt aus Epithelzellen des urogenitalen Traktes (Johnson et al., 2007), welche zum Teil mesodermaler (Nieren, Harnleiter, Geschlechtsorgane), zum Teil endodermaler (Harnblase, Harnröhre) Herkunft sind.

(c) Die Organe wie zentrales Nervensystem, die Retina und das Innenohr, stammen alle aus dem Ektoderm. In der Untersuchung von Muskel-, Blut- und Urin-DNA ist das Ektoderm nicht repräsentiert.

Dieser Fakt könnte das fehlende Korrelat zwischen der Distribution der singulären Deletion der mitochondrialen DNA in den untersuchten mitotischen Geweben und der Ausprägung der klinischen Symptomatik (insbesondere der ZNS-Beteiligung) erklären.

Des weiteren muss man sich fragen, ob jene Gewebe, in denen die Deletion nachgewiesen wurde, auch klinisch betroffen waren.

(a) Die quergestreifte **Muskulatur** ist eines der klinisch am häufigsten betroffenen Gewebe bei den Patienten mit einer mtDNA-Deletion (Yamashita et al., 2008). Die singuläre Deletion war bei allen untersuchten Patienten im Muskel nachweisbar. Davon wiesen 72% (18 von 25) eine muskuläre Belastungsintoleranz oder manifeste Muskelschwäche auf.

(b) Hinsichtlich der **Blutuntersuchungen** ist erwähnenswert, dass ein Teil der am Pearson-Syndrom erkrankten Patienten sekundär ein Kearns-Sayre Syndrom entwickeln kann. In solchen

Fällen werden singuläre Deletionen der mtDNA im Blut nachgewiesen (Larsson et al., 1990; McShane et al., 1991; Baerlocher et al., 1992; Rötig et al., 1995). Im eigenen Patientenkollektiv fanden sich keine Blutbildveränderungen, ebenso keine anamnestischen Hinweise für einen Pearson-Syndrom in der Kindheit. Trotzdem wurde eine singuläre mtDNA-Deletion im Blut bei 44% der Patienten nachgewiesen. Auch andere Autoren konnten singuläre mtDNA-Deletion im Blut in großer Heteroplasmie (um 50 %) bei Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom ohne Blutbildveränderungen vorfinden (Mohri et al., 1998).

(c) Zeichen einer Nephropathie fanden sich bei keinem Probanden, obwohl 35% der untersuchten Patienten eine singuläre mtDNA-Deletion im **Urin** aufwiesen. Neben den Urinzellen (Epithelien der Harnblase und der Harnröhre) bilden sich aus dem Endoderm auch Epithelien des Verdauungstraktes, der Leber, der Schilddrüse, des Pankreas und des Thymus. Bei den Patienten mit einer Deletion im Urin fand sich keine Anhäufung von Störungen der o.g. endodermalen Organe (Tab. 1 und 11).

Im untersuchten Patientenkollektiv mit singulären mtDNA-Deletionen waren diese Gewebe, in denen die Deletion nachgewiesen wurde, nicht immer klinisch betroffen. Zu den meist klinisch betroffenen Geweben gehörten: die quergestreifte Muskulatur (19 von 25 Patienten = 76%), das Herzkonduktionssystem (9 von 21 Patienten = 42,8%), die endokrinen Drüsen (10 von 24 Patienten = 41,6%), die Retina (9 von 22 Patienten = 40,9%), demnach allesamt postmitotische Gewebe mit einem hohen Energiebedarf, was mit der Beobachtung anderer Autoren übereinstimmt (Chinnery u. Turnbull, 1999a).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der multisystemischen Symptomatik und der Distribution der singulären mtDNA-Deletion in den mitotischen Geweben (Blut und Urin) festgestellt werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass der Nachweis der singulären mtDNA-Deletion in den mitotischen Geweben für das KSS nicht spezifisch ist und zur molekulargenetischen Differenzierung zwischen den KSS und der CPEO nicht beitragen kann.

Daraus folgend stellt sich auch die Frage, inwieweit das KSS eine eigene nosologische Entität darstellt. Das KSS repräsentiert sicherlich eine besonders schwere von vielen möglichen Formen der mitochondrialen Erkrankungen, die als eines der Hauptsymptome eine chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie aufweisen.

Das KSS ist mit einer schlechten Prognose verbunden. Jedoch sind auch Patienten, welche die Kriterien dieses Syndroms nicht erfüllen, durch schwere Verläufe gekennzeichnet.

5.1.2 Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad der singulären mtDNA-Deletion im Muskel und dem Phänotyp

Der Heteroplasmiegrad der mtDNA-Deletion ist einer der wichtigsten Faktoren, der auf der Zell- bzw. Gewebe-Ebene die Expression einer Mutation (den Phänotyp) zu determinieren scheint (Spelbrink et al., 1997; Chinnery u. Turnbull, 1999a; Cinnery u. Turnbull, 2000; Quintana-Murci et al., 2001; DiMauro u. Davidzon, 2005a; Emma et al., 2006). Auf der Gewebenebene setzte McShane anhand der Beobachtung der Patienten mit Pearson-Syndrom voraus, dass der Phänotyp auch von der Mutationslast abhängig sein muss (McShane et al., 1991). Es gibt nur wenige Arbeiten, die diese Voraussetzung bestätigen. In einer aktuellen Arbeit von Auré wurde in der Untersuchung von 27 CPEO-Patienten ein signifikant höherer Heteroplasmiegrad im Blut bei Patienten mit Beteiligung des zentralen Nervensystems und embryologisch verwandter Organe (Innenohr, Retina) im Vergleich zu Patienten ohne ZNS-Symptomatik nachgewiesen. Diesen Zusammenhang konnten die Autoren für das Muskelgewebe (Untersuchung von 63 Patienten) und den Urin (Untersuchung von 15 Patienten) nicht signifikant feststellen (Auré et al., 2007).

Im untersuchten Patientenkollektiv lag der durchschnittliche Heteroplasmiegrad im Muskel mit 46,7% im Vergleich zu den anderen Autoren (52%, Yamashita et al., 2008) in gleicher Größenordnung. Eine Abhängigkeit des Phänotyps von der Mutationslast konnte nicht nachgewiesen werden. Der Heteroplasmiegrad im Muskel war bei den KSS-Patienten nicht höher als bei den CPEO-Patienten. Es fanden sich auch keine statistisch signifikanten Unterschiede im Muskel-Heteroplasmiegrad zwischen den Patienten mit und ohne Paresen bzw. Patienten mit und ohne Beteiligung des zentralen Nervensystems.

Ein fehlender Zusammenhang zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und dem Phänotyp bei den Patienten mit mitochondrialer Myopathie (Holt et al., 1989a) bzw. bei Patienten mit CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung (Moraes et al., 1989) wurde bereits in mehreren Studien beobachtet. Yamashita (Yamashita et al., 2008) konnte in einer Untersuchung von 34 Patienten mit der gleichen Deletion („Common Deletion“) ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und der klinischen Manifestation feststellen. Mohri konnte zeigen, dass ein hoher Heteroplasmiegrad im Blut nicht zwingend mit hämatologischen Symptomen verbunden ist (Mohri et al., 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, insbesondere der fehlende Zusammenhang zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und der Beteiligung der Extremitätenmuskulatur, deuten auf die Komplexität dieses Problems hin. Der klinische Phänotyp wird nicht nur durch den Anteil deletierten DNA in den bestimmten Geweben determiniert, sondern hierbei müssen auch andere, bislang nicht definierte Faktoren eine Rolle spielen.

5.1.3 Korrelation zwischen den molekulargenetischen Befunden und dem Alter bei dem Erkrankungsbeginn sowie dem Alter bei der Probenentnahme

Das durchschnittliche Alter beim Erkrankungsbeginn war signifikant niedriger bei den Patienten mit Deletionsnachweis in zwei Geweben (Muskel und Blut oder Muskel und Urin). Bei niedriger Patientenzahl konnte diese Korrelation für 3 Gewebe (Muskel und beide mitotischen Gewebe: Blut und Urin) nicht nachgewiesen werden.

Auch das Alter bei der Probenentnahme war niedriger bei den Patienten, die eine Deletion in mitotischen Geweben hatten (für Blut signifikant, für Urin nicht signifikant). Das bedeutet, dass die Patienten, die eine Deletionsdistribution in mitotischen Geweben aufweisen, signifikant eher erkranken und signifikant jünger sind.

Die Patienten, die eher erkrankt waren, wiesen auch die Tendenz zum höheren Heteroplasmiegrad im Muskel auf, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Deletionslänge hatte keinen Einfluss auf das Alter beim Erkrankungsbeginn.

Eine Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und dem Alter der Patienten beim Erkrankungsbeginn ist bislang bei den Patienten mit CPEO und Kearns-Sayre-Syndrom nicht entschieden. Arbeiten mit kleineren Patientenzahlen wiesen darauf hin, dass die Patienten mit einem Heteroplasmiegrad im Muskel von über 50% früher erkranken als diejenigen mit einem Heteroplasmiegrad von unter 50% (Yamamoto et al, 1991). Die Arbeiten am größeren Patientenkollektiv konnten keine Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad im Muskel und dem Alter beim Erkrankungsbeginn feststellen (Yamashita et al., 2008).

Der Heteroplasmiegrad kann sich mit der Zeit ändern, wobei eine Zunahme der Mutationslast der singulären mtDNA-Deletion in postmitotischen Geweben bei KSS-Patienten beobachtet wurde (Larsson et al. 1990). Hingegen konnte bei den Patienten mit einer 3243A>G-Mutation der mtDNA eine lineare Reduktion des Heteroplasmiegrades im Laufe der Zeit im mitotischen Gewebe (Blut) beobachtet werden (Pyle et al., 2007).

Ob bei den Patienten mit einer singulären mtDNA-Deletion auch Eliminationsmechanismen im Rahmen der mitotischen Segregation eine Rolle in dem Deletionsnachweis in verschiedenen Geweben spielen, ist unklar. Mohri konnte während einer 6-jährigen Beobachtungszeit eines Patienten mit KSS-Phänotyp keine Veränderungen des Heteroplasmiegrades im Blut feststellen (Mohri et al., 1998).

Der Fakt, dass das durchschnittliche Alter bei der Probenentnahme bei den Patienten mit Deletionsnachweis im Blut signifikant niedriger war, könnte darauf hindeuten, dass mit dem

Alter die Deletion aus den mitotischen Geweben eliminiert wird. Eine Korrelation mit der klinischen Symptomatik bleibt immer noch unklar, da wie bereits erwähnt (Kapitel 5.1.2), ein höherer Heteroplasmiegrad nicht zwangsläufig mit gravierenden klinischen Symptomen korreliert.

5.1.4 Länge der singulären Deletion der mitochondrialen DNA bei Patienten mit unterschiedlichem klinischen Phänotyp

Die Schwere der Erkrankung (CPEO-Phänotyp versus Kearns-Sayre-Syndrom) war im untersuchten Patientenkollektiv von der Länge der Deletion unabhängig, was mit Beobachtungen anderer Autoren (Gerbitz et al., 1990; Gellerich et al., 2002; Rötig u. Munnich, 2003) übereinstimmt. Auch die Beteiligung des zentralen Nervensystems und der embryologisch verwandten Organe zeigte keine Korrelation zur Deletionslänge.

Außer der Menge der ausgefallenen mitochondrialen Gene spielt für die klinische Manifestation der Fakt, ob es sich um einen Verlust der Protein-kodierenden oder der tRNA-Gene handelt, eine wichtige Rolle. Bei der Deletion eines Struktur-Gens der mitochondrialen DNA wird nur die Bildung einer bzw. weniger durch die mtDNA kodierten Untereinheiten der Atmungskette beeinträchtigt. Die Deletion im tRNA-Gen dagegen kann die Translation aller mitochondrial kodierten Proteine beeinflussen und damit eine größere biochemische und schließlich klinische Auswirkung haben. Die meisten Deletionen der mitochondrialen DNA betreffen sowohl Struktur-Gene als auch tRNA-Gene.

Eine Studie an einer großen Patientengruppe zeigte eine Beziehung zwischen dem Ausfall der tRNA-Gene und dem Alter bei Erkrankungsbeginn sowie eine bevorzugte Entwicklung eines KSS bei größerer Länge der Deletion (Yamashita et al., 2008).

Andererseits können auch sehr kurze Deletionen eine schwerwiegende Auswirkung haben. Von Noer et al. (Noer et al., 1988) wurde ein Patient beschrieben, der eine sehr kurze 0,4 kb-Deletion im Muskel und in der Leber aufwies. Diese involvierte ausschließlich das für Strukturproteine kodierende ND5-Gen und führte dennoch zu einer Encephalomyopathie.

5.1.5 „Common Deletion“ der mitochondrialen DNA bei den Patienten mit der CPEO und mit dem KSS

Die „Common Deletion“ war bei insgesamt 28% aller Patienten nachweisbar. Dieses Ergebnis entspricht der beschriebenen Prävalenz der „Common Deletion“ bei Patienten mit sporadischer CPEO und KSS (Moraes et al., 1989; Ernst et al., 1994; Laforêt et al., 1995; Rötig u. Munnich, 2003; Auré et al., 2007). Obwohl der Schweregrad der Symptomatik bei diesen Patienten

unterschiedlich war, breitete sich das Phänotyp-Spektrum innerhalb der milden Verläufe aus (siehe Tabelle 11). Die „Common Deletion“ wird aber auch bei Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom oder Pearson-Syndrom (Kim et al., 1997; Müller-Höcker et al., 1998) identifiziert.

Die Patienten mit der „Common Deletion“ wiesen in der vorliegenden Studie im Vergleich zu den anderen Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen einen höheren Heteroplasmiegrad im Muskel auf und waren (jedoch statistisch nicht signifikant) eher erkrankt.

Hierbei spiegelt sich die bereits im Kapitel 5.1.3 beschriebene Tendenz wider, dass der höhere Heteroplasmiegrad mit einer früheren Krankheitsmanifestation korreliert. Ob das Vorliegen der „Common Deletion“ eine zusätzliche Rolle spielt, ist unklar.

5.1.6 Untersuchung der singulären Deletionen der mitochondrialen DNA mittels Southern-Blot-Analyse und PCR-Methode

In den durchgeführten Untersuchungen kamen zwei molekulargenetische Techniken zum Einsatz: eine Hybridisierungs- (Southern-Blot-Analyse) und eine Amplifikationsmethode (PCR).

Die Southern-Blot-Analyse, die bislang als Goldstandard in der molekulargenetischen Diagnostik galt, wird durch die einfachere und sich rasch entwickelnde PCR-Methode zurückgedrängt. Man muss hierbei die Vor- und Nachteile der beiden Methoden erwähnen, die sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutlich widerspiegeln.

Die Long-Range-PCR-Untersuchung zeigte eine höhere Sensitivität im Vergleich zur Southern-Blot-Analyse und konnte außer der Muskel-DNA die Deletionen in Blut und Urin, wo der Heteroplemiegrad deutlich niedriger ist, aufdecken. Bis auf einen Fall waren die mtDNA-Deletionen in Blut und Urin der Southern-Blot-Analyse unzugänglich (Nr 4., Tab. 11). Die DNA-Konzentration spielte hier keine Rolle, da sie im Blut höher als in den Muskelproben war. Die Spezifität der Long-Range-PCR-Untersuchung war mit dem Southern-Blot vergleichbar, da die Länge der Deletion in beiden Verfahren übereinstimmte. Einmalig lag die Deletion der mtDNA allerdings außerhalb der Region, die mit der 10 kb-PCR amplifiziert wurde (nt 6221-16153). Erst in der ergänzenden Untersuchung, Long-Range-PCR 15kb (nt 13720-15174) konnte die Deletion nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Deletion nicht nur mit dem Southern-Blot-Verfahren, sondern auch mittels Long-PCR sicher erfasst werden kann, wobei die Primerposition wichtig ist. In der 15kb umfassenden PCR sind sehr kurze Deletionen schwer im Gel zu erkennen, da sich die Bande kaum von einer Wildtyp-Bande in der Länge unterscheidet.

Die PCR-Untersuchung ist ein leistungsstarkes Verfahren, besonders zum Nachweis von sehr geringen DNA-Mengen, die in der Southern-Blot-Analyse nicht erkennbar sind. In der angewendeten PCR-Methode lagen die erforderlichen DNA-Mengen bei ca. 1 ng der genomischen DNA. Im Vergleich dazu waren für einen Ansatz in der Southern-Blot-Analyse 3500 ng der genomischen DNA erforderlich.

In der Untersuchung der Muskelgewebe diente die Methode des Southern-Blots der Einschätzung des Heteroplasmiegrades, die mittels Long-PCR nicht möglich ist. Ein anderes PCR-Verfahren, die real-time-PCR, die in der vorliegenden Studie nicht verwendet wurde, bietet die Möglichkeit der Bestimmung des Heteroplasmiegrades.

5.1.7 Veränderungen der PCR-Methode in der Untersuchung der singulären Deletionen der mitochondrialen DNA

(a) Einfluss der Verkürzung der Elongationszeit auf die Sensitivität der PCR

Die Sensitivität der PCR-Untersuchung konnte durch Reduktion der Elongationszeit erhöht werden. Die Nachweisrate der singulären mtDNA-Deletionen in den mitotischen Geweben (Blut und Urin), wo der Heteroplasmiegrad niedriger ist, wurde in der Untersuchung mit verkürzter Elongationszeit verbessert.

Die Zunahme der Sensitivität der PCR-Untersuchung bei Verkürzung der Elongationszeit lässt sich dadurch erklären, dass die um die Deletionslänge verkürzte DNA bei kürzeren Elongationszeiten bevorzugt amplifiziert wird, was bereits von anderen Autoren beobachtet wurde (Cortopassi u. Arnheim 1990; Luoma et al., 2005).

Das 10 kb-lange Wildtypfragment wurde bei kürzeren Elongationszeiten von 4 und 2 Minuten in geringerer Anzahl an Kopien amplifiziert und in der Gelelektrophorese bildete sich eine deutlich schmalere Wildtyp-Bande (Abb. 13 und 14).

(b) Einfluss der Deletionslänge auf die Sensitivität der PCR

Die Sensitivität der PCR-Untersuchung wurde auch durch die Länge der Deletion beeinflusst. Analog zur Amplifikation der Wildtyp-DNA waren sehr kurze Deletionen von ca. 2 bis 2,5 kb auch bei kurzen Elongationszeiten schlechter nachweisbar, weil relativ lange DNA-Fragmente intakt blieben. Das Optimum für alle Deletionsgrößen wurde bei 4 Minuten erreicht, wo außer einer starker Bande der deletierten (verkürzten) DNA noch eine schwache Wildtyp-Bande zum Vorschein kam (Abb. 13).

5.2. Patienten mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA

5.2.1 Untersuchung der multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA mittels der Southern-Blot-Analyse und der PCR-Methode

Alle Patienten mit multiplen Deletionen im Southern-Blot hatten diese auch in der Long-Range-PCR. Da die Sensitivität des Southern-Blot-Verfahrens bei einem Heteroplasmiegrad von etwa 5% liegt, waren bei einem geringen Anteil der Patienten die multiplen Deletionen nur in der PCR zu sehen (Tab. 13). Das stellt einen Unterschied zu den singulären Deletionen dar, die vom Southern-Blot sicher erfaßt werden (Deschauer et al. 2003b).

Die Blut- und Urinproben der Patienten mit multiplen Deletionen wurden mittels Southern-Blot nicht untersucht. Mittels Long-Range-PCR stellten sich die mutliplen Deletionen in den mitotischen Geweben (Blut und Urin) bei keinem der untersuchten Patienten dar, was ebenfalls mit den Beobachtungen anderer Autoren konform ist (Nishizuka et al., 1998; Suomalainen u. Kaukonen, 2001; Van Goethem et al., 2003b).

5.2.2 Veränderungen der PCR-Methode in der Untersuchung der multiplen mtDNA-Deletionen

Die mitochondriale DNA ist sehr anfällig für die Mutationen, die im Alter meistens in den postmitotischen Zellen in kleiner Menge kumulieren können (siehe Kapitel 1.3.2 und 1.9). In der hochsensitiven PCR-Untersuchung kann es, besonders bei älteren Personen, zur Amplifikation dieser verkürzten DNA-Fragmente kommen, die dann das Vorhandensein von multiplen Deletionen ohne vorliegende mitochondriale Erkrankung vortäuschen können (Deschauer et al., 2005).

Die PCR-Untersuchung mit einer Elongationszeit von 10 Minuten war ein zuverlässiges Screening für multiple mtDNA-Deletionen. Es fanden sich bei allen (n=10, mittleres Alter: 46,6 Jahre, Streubreite: 33-67 Jahre) gesunden Kontrollen keine Deletionen. Bei der Reduktion der Elongationszeit zeigten sich aber einige verkürzte DNA-Fragmente (multiple Banden in der Elektrophorese) in der Muskel-DNA der gesunden Kontrollpersonen. Die Spezifität von PCR-Untersuchungen kann prinzipiell durch verschiedene Vorgänge erhöht werden (Dieffenbach u. Dveksler, 1995). In der vorliegenden Studie konnte weder durch eine Verminderung der DNA-Konzentration noch des dNTP-Gehaltes im PCR-Ansatz eine ausreichende Sauberkeit der Kontrollproben in der PCR-Untersuchung mit 4 und 2 Minuten Elongationszeit erreicht werden. Die Verkürzung der Elongationszeit, um die multiplen mtDNA-Deletionen auch in mitotischen Geweben darzustellen, hat zu keinem Erfolg geführt.

5.2.3 Untersuchung der nukleären Mutationen bei den Patienten mit multiplen mtDNA-Deletionen

Bei 5 der 15 CPEO-Patienten mit multiplen Deletionen ist die nukleäre Mutation bereits identifiziert worden (Deschauer et al., 2003b, Deschauer et al., 2005; Hudson et al., 2005; Paus et al., 2008). In vielen Fällen lassen sich die Mutationen der nukleären Gene nicht identifizieren (Deschauer et al., 2003a; Hudson et al. 2006), was bei dem untersuchten Patientenkollektiv der Fall war. Es ist davon auszugehen, dass es noch weitere Gene gibt, die zu multiplen Deletionen der mtDNA bei den Patienten mit dem CPEO-Phänotyp führen.

5.2.4 Nachweis der multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA bei einem Patienten mit dem MELAS-Phänotyp

Der im Kapitel 4.3 beschriebene Patient mit einem MELAS-Phänotyp und multiplen Deletionen der mtDNA im Muskel erwies sich als „compound heterozygot“ für zwei Punktmutationen der nukleären DNA im POLG1-Gen (R627Q und G848S), während die für ein MELAS-Syndrom typische mitochondriale Punktmutation 3243A>G (Goto et al., 1990) ausgeschlossen werden konnte. Die multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA ließen sich, ähnlich wie bei den Patienten mit einem CPEO-Phänotyp, nur in der Long-Range-PCR-Untersuchung und nicht im Southern-Blot im Muskel nachweisen.

Sowohl die POLG1-Mutation R627Q als auch G848S wurden bei mehreren Patienten beschrieben, deren phänotypisches Spektrum von einer Myopathie über ein infantiles Alpers-Syndrom bis hin zum Parkinson-Syndrom reichte (Luoma et al., 2005; Kollberg et al., 2006; Davidzon et al., 2005; Nguyen et al., 2005; Horwath et al., 2006).

Die Assoziation des MELAS-Phänotyps mit einem POLG1-Defekt wurde bisher noch nicht beobachtet, so dass dieser Patient als Fallbericht publiziert wurde (Deschauer et al., 2007).

6 Zusammenfassung

Der Phänotyp einer CPEO mit unterschiedlicher Multisystembeteiligung kann auf dem Boden einer singulären Deletion der mitochondrialen DNA auftreten. Auch bestimmte Mutationen der nukleären DNA können mit dem Phänotyp der CPEO einhergehen, wobei diese zu multiplen Deletionen der mtDNA führen. Die vorliegende Studie hatte das Ziel, die molekulargenetischen Unterschiede im Bezug auf die klinische Symptomatik bei Patienten mit einer CPEO zu untersuchen.

Eine besonders schwere Form der sporadischen CPEO auf dem Boden der singulären mtDNA-Deletion stellt das Kearns-Sayre Syndrom dar. Der bislang postulierte Unterschied zwischen den beiden Phänotypen lag nicht nur in der klinischen Ausprägung der Multisystembeteiligung, sondern auch in der Ausprägung der molekulargenetischen Veränderungen. Die CPEO wurde als eine Erkrankung, bei der sich die singuläre mtDNA-Deletion auf die postmitotischen Gewebe begrenzt, dagegen das KSS als eine Erkrankung der post- und mitotischen Gewebe gesehen.

Diese Studie konnte zeigen, dass die Häufigkeit der singulären Deletion in den untersuchten mitotischen Geweben (Blut und Urin) mit dem KSS-Phänotyp nicht korreliert. Auch die Beteiligung des ZNS und verwandter Organe (Innenohr, Retina) ist nicht mit der Distribution der singulären mtDNA-Deletionen in den mitotischen Geweben verbunden.

Die untersuchten Gewebe repräsentierten zwei embryonale Keimblätter: Mesoderm (Muskel, Blut und Urin) und Endoderm (Urin). Das Ektoderm, aus dem sich das ZNS entwickelt, war in der Untersuchung von Muskel, Blut und Urin nicht repräsentiert. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Nachweis der singulären Deletionen in einem der drei Gewebe und dem Befall der aus dem gleichen Keimblatt stammenden Organe.

Desweiteren zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und der Deletionslänge sowie dem Heteroplasmiegrad im Muskel. Insbesondere korrelierte die höhere Mutationslast im Muskel nicht mit den Extremitätenpareesen.

Der Deletionsnachweis in einem der mitotischen Gewebe (Blut oder Urin) korrelierte signifikant mit einem früheren Erkrankungsbeginn. Es zeigte sich auch eine nicht signifikante Tendenz, dass der höhere Heteroplasmiegrad im Muskel mit einem früheren Erkrankungsbeginn einhergeht. Diese Korrelation spiegelte sich in der Untersuchung der Patienten mit der „Common Deletion“ wider, die signifikant eher erkrankt sind und eine signifikant höhere Mutationslast im Muskel im Vergleich zum übrigen Patientenkollektiv aufwiesen.

Die Progression der mitochondrialen Erkrankungen wird zum Teil durch die Zunahme der Mutationslast in den postmitotischen Geweben erklärt. Ob die mitotische Segregation tatsächlich zur Reduktion der Mutationslast in den sich teilenden Geweben führt, ist unklar. Im untersuchten Patientenkollektiv waren aber diese Patienten, die eine singuläre Deletion im Blut aufwiesen, signifikant jünger bei der Probenentnahme als diejenigen ohne Deletion im Blut.

Die Untersuchung der singulären mtDNA-Deletionen erfolgte durch Anwendung zweier molekulargenetischen Methoden (Southern-Blot-Analyse und PCR-Untersuchung). Die Spezifität der PCR-Untersuchung war, nach entsprechender Primerauswahl, der Southern-Blot-Untersuchung ebenbürtig. Die PCR bewies eine höhere Sensitivität, vor allem in der Untersuchung der Proben mit niedrigerem Heteroplasmiegrad (Blut und Urin). Die Sensitivität

der PCR konnte durch eine Verkürzung der Elongationszeit erhöht werden, wobei hier auch die Deletionslänge eine Rolle spielte. Eine Bestimmung des Heteroplasmiegrades konnte methodenbedingt nur mittels Southern-Blot-Analyse aus Muskelgewebe erfolgen, während die Blut- und Urin-Deletionen unter der Nachweisschwelle der Southern-Blot Methode blieben.

In der Untersuchung der CPEO-Patienten mit multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA kam nur die PCR-Methode zum Einsatz. Die multiplen Deletionen waren bei allen untersuchten Patienten nur im Muskel und nicht im Blut oder Urin in der PCR unter Standardbedingungen (Elongationszeit von 10 Minuten) nachweisbar. Da die mitochondriale DNA auf Grund ihrer Zusammensetzung und insuffizienten Reparaturmechanismen mutationsanfällig ist, sind auch multiple Deletionen ein Altersphänomen. Bei den verkürzten Elongationszeiten (4- und 2 Minuten) zeigen sich vermehrt multiple unspezifische Banden auch bei den Kontrollpersonen, so dass nur die PCR-Untersuchung mit 10 Minuten Elongationszeit für die multiple mtDNA-Deletionen ausreichend spezifisch war. Die zugrunde liegenden nukleären Mutationen konnten nur bei einem Teil der Patienten in der Sequenzierung der nukleären DNA identifiziert werden.

Desweiteren wurde ein Patient mit MELAS-Phänotyp mit einer sensiblen Ataxie und multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA beschrieben. Der Patient wies zwei rezessive Mutationen im POLG1-Gen auf: R627Q im Exon 10 und G848S im Exon 16. Bislang war das MELAS-Syndrom nur bei Punktmutationen der mtDNA beobachtet worden.

7 Literaturverzeichnis

- Abramowicz MJ, Cochaux P, Cohen LH, Vamos E (1996) Pernicious anaemia and hypoparathyroidism in a patient with Kearns-Sayre syndrome with mitochondrial DNA duplication. *J Inher Metab Dis* 19:109-111.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 5806:457-465.
- Auré K, Ogier de Baulny H, Laforet P, Jardel C, Eymard B, Lombes A (2007) Chronic progressive ophthalmoplegia with large-scale mtDNA rearrangement: can we predict progression? *Brain* 130:1516-1524.
- Baerlocher KE, Feldges A, Weissert M, Simonsz HJ, Rotig A (1992) Mitochondrial DNA deletion in an 8-year-old boy with Pearson syndrome. *J Inher Metab Dis* 15:327-330.
- Barnes WM (1994) PCR amplification up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:2216-2220.
- Bau V, Deschauer M, Zierz S (2009) Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie-Symptom oder Syndrom? *Klin Monatsbl Augenheilkd* 226:822-828.
- Becher MW, Wills ML, Noll WW, Hurko O, Price DL (1999) Kearns-Sayre syndrome with features of Pearson's marrow-pancreas syndrome and a novel 2905-base pair mitochondrial DNA deletion. *Hum Pathol* 30:577-581.
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson

- JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38: 515-517.
- Berenberg RA, Pellock JM, DiMauro S, Schotland DL, Bonilla E, Eastwood A, Hays A, Vicale CT, Behrens M, Chutorian A, Rowland LP (1977) Lumping or splitting? "Ophthalmoplegia-plus" or Kearns-Sayre syndrome? *Ann Neurol* 1:37-54.
- Binder S, Sluga E (1980) Zur Differentialdiagnose okulärer Myopathien. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 176:344-348.
- Birky CW (1994) Relaxed and stringent genomes: why cytoplasmic genes don't obey Mendel's laws. *J Hered* 85:355-365.
- Blackwood JK, Whittaker RG, Blakely EL, Alston CL, Turnbull DM, Taylor RW (2010) The investigation and diagnosis of pathogenic mitochondrial DNA mutations in human urothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 393:740-745.
- Blakely EL, He L, Taylor RW, Chinnery PF, Lightowlers RN, Schaefer AM, Turnbull DM (2004) Mitochondrial DNA deletion in "identical" twin brothers. *J Med Genet* 41:e19.
- Bogenhagen D, Clayton DA (1977) Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11:719-727.
- Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA (1992) Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 51:1187-200.
- Carrozzo R, Hirano M, Fromenty B, Casali C, Santorelli FM, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA, Miranda AF (1998) Multiple mtDNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogeneses. *Neurology* 50:99-106.
- Cheng G, Lichtenberg WH, Cole GJ, Mikawa T, Thompson RP, Gourdie RG (1999) Development of the cardiac conduction system involves within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development* 126:5041-5049.
- Chinnery PF, Turnbull DM (1999a) Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 354 Suppl. 1:17-21.
- Chinnery PF, Samuels DC (1999b) Relaxed replication of mtDNA: a model with implications for the expression for disease. *Am J Hum Genet* 64:1158-1165.
- Chinnery PF, Turnbull DM (2000) Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* 6:425-429.
- Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, Carrara F, Lombes A, Laforet P, Ogier H, Jaksch M, Lochmüller H, Horvath R, Deschauer M, Thorburn D, Bindoff LA, Poulton J, Taylor RW, Matthews J, Turnbull DM (2004) Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 364:592-596.
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G (1992) MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4221-4225.
- Chu BC, Terae S, Takahashi C, Kikuchi Y, Miyasaka K, Abe, S, Minowa K, Sawamura T (1999) MRI of the brain in the Kearns-Sayre syndrome: report of four cases and a review. *Neuroradiology* 41:759-764.
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC (1992a) Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 2:324-329.
- Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Lott MT, Wallace DC (1992b) Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res* 275:169-180.
- Cortopassi GA, Arnheim N (1990) Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 18:6927-6933.
- Crisi G, Ferrari G, Merelli E, Cocconcilli P (1994) MRI in a case of Kearns-Sayre syndrome confirmed by molecular analysis. *Neuroradiology* 36:37-38.

- Dahl H H-M, Thorburn DR (2001) Mitochondrial Diseases: Beyond the Magic Circle. *Am J Med Genet* 106:1-3.
- Davidzon G, Mancuso M, Ferraris S, Quinzii C, Hirano M, Peters HL, Kirby D, Thorburn DR, DiMauro S (2005) POLG mutations in Alpers syndrome. *Ann Neurol* 57:921-923.
- De Coo IF, Gussinklo T, Arts PJ, van Oost BA, Smeets HJ (1997) A PCR test for progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome on DNA from blood samples. *J Neurol Sci* 147:37-40.
- Deschauer M, Müller T, Dreha S, Zierz S (2001) Familiäre mitochondriale chronisch progressive externe Ophthalmoplegie. *Nervenarzt* 72:122-129.
- Deschauer M, Zierz S, Defekte der intergenomischen Kommunikation (2003a) Mutationen der Kern-DNA und multiple Deletionen in der mitochondrialen DNA bei chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie. *Aktuelle Neurologie* 30:103-106.
- Deschauer M, Kiefer R, Blakely EL, He L, Zierz S, Turnbull D, Taylor RW (2003b) A novel Twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromusc Disord* 13:568-572.
- Deschauer M, Hudson G, Müller T, Taylor RW, Chinnery PF, Zierz S (2005) A novel ANT1 gene mutation with probable germline mosaicism in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromusc Disord* 15:311-315.
- Deschauer M, Tennant S, Rokicka A, He L, Kraya T, Turnbull DM, Zierz S, Taylor RW (2007) MELAS associated with mutations in the POLG1 gene. *Neurology* 68:1741-1742.
- Dieffenbach CW, Dveksler GS: PCR primer: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, USA, 1995, pp.53-61.
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC (1985) Mitochondrial Myopathies. *Ann Neurol* 17:521-538.
- DiMauro S, Schon EA (1998) Nuclear power and mitochondrial disease. *Nat Genet* 19:214-215.
- DiMauro S (2001) Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Semin Cell Dev Biol* 9:397-405.
- DiMauro S, Davidzon G (2005a) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 37:222-232.
- DiMauro S, Hirano M (2005b) Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscul Disord* 15: 276-286.
- Drachman DA (1968) Ophthalmoplegia plus: the neurodegenerative disorders associated with progressive external ophthalmoplegia. *Arch Neurol* 18:654-674.
- Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, Pagnamenta A, Eshhar S, Saada A (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 76:1081-1086.
- Elson JL, Samules DC, Turnbull DM, Chinnery PF (2001) Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am J Hum Genet* 68: 802-806.
- Emma F, Pizzini C, Tessa A, Di Giandomenico S, Onetti-Muda A, Santorelli F, Bertini E, Rizzoni G (2006) "Batter-like" phenotype in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Nephrol* 21:355-360.
- Ernst PB, Wilichowski E, Wagner M, Hanefeld F (1994) Deletion screening of mitochondrial DNA via multiprimer DNA amplification. *Mol Cell Probes* 8:45-49.
- Eviatar L, Shanske S, Gauthier B, Abrams C, Maytal J, Slavin M, Valderrama E, DiMauro S (1990) Kearns-Sayre Syndrome presenting as renal tubular acidosis. *Neurology* 40:1761-1763.
- Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi AR, Blondy P, Lombès A, Fardeau M, Oldfors A (2002) Ageing Muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *Neuromuscul Disord* 12:484-493.

- Fischel-Ghodsian N, Bohlman MC, Prezant TR, Graham JM, Cederbaum SD, Edwards MJ (1992) Deletion in blood mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 31:557-560.
- Fu K, Hartlen R, Johns T, Genge A, Karpati G, Shoubridge EA (1996) A novel heteroplasmic tRNA^{Leu}(CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum mol Genet* 5:1835-1840.
- Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Müller T, Neudecker S, Zierz S (2002) Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta* 1556:41-52.
- Gerbitz KD, Obermaier-Kusser B, Zierz S, Pongatz D, Müller-Höcker J, Lestienne P: Mitochondrial myopathies (1990) divergences of genetic deletions, biochemical defects and the clinical syndromes. *J Neurol* 237:5-10.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S: A mutation in the tRNA^{Leu}(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies (1990) *Nature* 348:651-653.
- Hauswirth WW, Laipis PJ (1982) Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4686-4690.
- He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM (2002) Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e68.
- Hirano, M., S. DiMauro (2001) ANT1, Twinkle, POLG, and TP. New genes open our eyes to ophthalmoplegia. *Neurology* 57:2163-2165.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331:717-719.
- Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AH, Toscano A, Clark JB, Morgan-Hughes JA (1989a) Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with Major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 26:699-708.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1989b) Deletions of muscle mitochondrial DNA in mitochondrial myopathies: sequence analysis and possible mechanisms. *Nucleic Acids Res* 17:4465-4469.
- Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Fütterer N, Ahola S, Lamantea E, Prokisch H, Lochmüller H, McFarland R, Ramesh V, Klopstock T, Freisinger P, Salvi F, Mayr JA, Santer R, Tesarova M, Zeman J, Udd B, Taylor RW, Turnbull D, Soumalainen A, Zeviani M, Chinnery P (2006) Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase γ gene. *Brain* 129:1674-1684.
- Hudson G, Deschauer M, Busse K, Zierz S, Chinnery PF: Sensory ataxic neuropathy due to a novel c10orf2 mutation with probable germline mosaicism. *Neurology* 64 (2005) 371-373
- Hudson G, Deschauer M, Taylor RW, Hanna MG, Fialho D, Schaefer AM, He LP, Blakely E, Turnbull DM, Chinnery PF (2006) POLG1, C10ORF2, and ANT1 mutations are uncommon in sporadic progressive external ophthalmoplegia with multiple mitochondrial DNA deletions. *Neurology* 66:1439-1441.
- Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Soumalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF, Taylor RW (2008) Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131:329-337.
- Hübner G, Gokel JM, Pongratz D, Johannes A, Park JW (1986) Fatal mitochondrial Cardiomyopathy in Kearns-Sayre syndrome. *Virchows Arch A Pathol Anat histopathol* 408:611-621.
- Jaksch-Angerer M, Hofmann S, Bauer MF, Gempel K, Obermaier-Kusser B, Paetzke I, Gerbitz K-D (1999) Mitochondriale Erkrankungen. *Biochemisch-molekularbiologische*

- Diagnostik von Defekten der Atmungskette. *Dtsch Arztebl* 96:2972-2980.
- Johns DR, Drachman DB, Hurko O (1989a) Identical mitochondrial DNA deletion in blood and muscle. *Lancet* 1:393-394.
- Johns DR, Hurko O (1989b) Preferential amplification and molecular characterization of junction sequences of a pathogenetic deletion in human mitochondrial DNA. *Genomics* 5:623-628.
- Johnson DJ, Calderaro AC, Roberts KA (2007) Variation in nuclear DNA concentrations during urination. *J Forensic Sci* 52:110-113.
- Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttälä A, Zeviani M, Comi GP, Keränen S, Peltonen L, Suomalainen A (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289:782-785.
- Katsanos KH, Elisaf M, Bairaktari E, Tsianos EV (2001) Severe hypomagnesemia and hypoparathyroidism in Kearns-Sayre syndrome. *Am J Nephrol* 21:150-153.
- Kearns TP, Sayre GP (1958) Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block. *Arch Ophthalmol* 60:280-289.
- Kim SH, Chi JG, Reith A, Kadenbach B (1997) Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletion in paraffin embedded muscle tissues from patients with KSS and CPEO. *Biochim Biophys Acta* 1360:193-195.
- Kleber FX, Park JW, Hübner G, Johannes A, Pongratz D, König E (1987) Congestive heart Failure due to mitochondrial cardiomyopathy in Kearns-Sayre syndrome. *Klin Wochenschr* 65:480-486.
- Kleine S, Wiesmann U, Superti-Furga A, Krähenbühl S, Boltshauser E, Reichen J, Liechti-Gallati S (1997) Detection and characterisation of mitochondrial DNA rearrangements in Pearson and Kearns-Sayre syndromes by long PCR. *Hum Genet* 100:643-650.
- Kollberg G, Moslemi AR, Darin N, Nennesmo I, Bjarnadottir I, Uvebrant P, Holme E, Melberg A, Tulinius M, Oldfors A (2006) POLG1 mutations associated with progressive encephalopathy in childhood. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:758-768.
- Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown TA, Ebralidse K, Kunz WS, Clayton DA, Vissing J, Khrapko K (2004) Recombination of human mitochondrial DNA. *Science* 304:981.
- Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K (2006) Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 38:507-508.
- Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels CS, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink JN, Lightowlers RN, Turnbull DM (2008) What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet* 40:275-279.
- Laforêt P, Lombes A, Eymard B, Danan C, Chevally M, Rouche A, Frachon P, Fardeau M (1995) Chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers: clinical, morphological and genetic investigations in 43 patients. *Neuromusc Disord* 5:399-413.
- Larsson NG, Holme E, Kristiansson B, Oldfors A, Tulinius M (1990) Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 28:131-136.
- Lestienne P, Ponsogt G (1988) Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondria DNA Deletion. *Lancet* 1:885.
- Li YY, Hengstenberg C, Maisch B (1995) Whole mitochondrial genome amplification reveals basal level multiple deletions in mtDNA of patients with dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 210:211-218.
- Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N (1997) Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 13:450-455.
- Longley J, Clark S, Yu Wai Man C, Hudson G, Durham SE, Taylor RW, Nightingale S, Turnbull DM, Copeland WC, Chinnery PF (2006) Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase γ subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 78:1026-1034.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41:1776-1804.

- Luoma PT, Luo N, Löscher WN, Farr CL, Horvath R, Wanschitz J, Kiechl S, Kaguni LS, Suomalainen A (2005) Functional defects due to spacer-region mutations of human Mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome. *Hum Mol Genet* 14:1907-1920.
- Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, Anbinder Y, Berkowitz D, Hartman C, Barak M, Eriksson S, Cohen N (2001) The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 29:337-341.
- Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA (1997) The fate of human sperm-derived mt-DNA in somatic cells. *Am J Hum Genet* 61:953-960.
- McDonnell MT, Schaefer AM, Blakely EL, McFarland R, Chinnery PF, Turnbull DM, Taylor RW (2004) Noninvasive diagnosis of the 3243A > G mitochondrial DNA mutation using Urinary epithelial cells. *Eur J Hum Genet* 12:778-781.
- McShane MA, Hammans SR, Sweeney M, Holt IJ, Beattie TJ, Brett EM, Harding AE (1991) Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 48:39-42.
- Merelli E, Selleri L, Ferrari S, Sola P, Colombo A, Torelli G (1991) Mitochondrial DNA deletion in oculoskeletal myopathy. *Eur Neurol* 31:160-163.
- Merriwether DA, Clark AG, Ballinger SW, Schurr, TG, Soodyall H, Jenkins T, Sherry ST, Wallace DC (1991) The structure of human mitochondrial DNA variation. *J Mol Evol* 33:543-555.
- Midro AD, Zalewska R, Skrzypczak-Adamiak G, Wilichowski E (1995) Retinitis pigmentosa in Kearns-Sayre syndrome resulting from mutation of mitochondrial DNA "de novo. *Klin Oczna* 97:203-206.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Milone M, Brunetti-Pierri N, Tang LY, Kumar N, Mezei MM, Josephs K, Powell S, Simpson E, Wong LJ (2008) Sensory ataxic neuropathy with ophthalmoparesis caused by POLG mutations. *Neuromuscul Disord* 18:626-632.
- Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Fabrizi GM, Koga Y, DiMauro S, Schon E (1990) Recombination via flanking direct repeats in a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 18:561-567.
- Mitani T, Umaki Y, Nagasawa M, Akaike M, Aki K, Azuma H, Ozaki S, Odomi M, Matsumoto T (2002) Mitochondrial damage in patients with long-term corticosteroid therapy: development of oculoskeletal symptoms similar to mitochondrial disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 104:260-266.
- Mohri I, Taniike M, Fujimura H, Matsuoka T, Inui K, Nagai T, Okada S (1998) A case of Kearns-Sayre syndrome showing a constant proportion of deleted mitochondrial DNA in blood cells during 6 years of follow-up. *J Neurol Sci* 158:106-109.
- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, Nonaka I, Koga Y, Spiro AJ, Brownell AK, Schmidt B, Schotland DL, Zupanc M, DeVivo DC, Schon EA, Rowland LP (1989) Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320:1293-1299.
- Moslemi AR, Melberg A, Holme E, Oldfors A (1999) Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia: distribution of multiple mitochondrial DNA deletions. *Neurology* 53:79-84.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Müller-Höcker J, Jacob U, Seibel P (1998) The common 4977 base pair deletion of mitochondrial DNA preferentially accumulates in the cardiac conduction system of patients with Kearns-Sayre syndrome. *Mod Pathol* 11:295-301.
- Nass S, Nass M (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 19:593-629.

- Nguyen KV, Ostergaard E, Ravn SH, Balslev T, Danielsen ER, Vardag A, McKiernan PJ, Gray G, Naviaux RK (2005) POLG mutations in Alpers syndrome. *Neurology* 65:1493-1495.
- Nicholas A, Kraysberg Y, Guo X, Khrapko K (2009) On the timing and the extent of clonal expansion of mtDNA deletions: Evidence from single-molecule PCR. *Exp Neurol*. Epub
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283:689-692.
- Nishizuka S, Tamura G, Goto Y, Murayama K, Konno T, Hakozaki M, Nonaka I, Tohgi H, Satodate R (1998) Tissue-specific involvement of multiple mitochondrial DNA deletions in familial mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 247:24-27.
- Noer AS, Marzuki S, Trounce I, Byrne E (1988) Mitochondrial DNA deletion in encephalomyopathy. *Lancet* 8622:1253-1254.
- Odoardi F, Rana M, Broccolini A, Mirabella M, Modoni A, D'Amico A, Papacci M, Tonali P, Servidei S, Silvestri G (2003) Pathogenic role of mtDNA duplications in mitochondrial diseases associated with mtDNA deletions. *Am J Med Genet* 118:247-254.
- Oldfors A, Moslemi AR, Jonasson L, Ohlsson M, Kollberg G, Lindberg C (2006) Mitochondrial abnormalities in inclusion-body myositis. *Neurology* 66:49-55.
- Ota Y, Tanaka M, Sato W, Ohno K, Yamoto T, Maehara M, Negoro T, Watanabe K, Awaya S, Ozawa T (1991) Detection of platelet mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:2667-2675.
- Ozawa T, Yoneda M, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Suzuki H, Nishikimi M, Yamamoto M, Nonaka I, Horai S (1988) Maternal inheritance of deleted mitochondrial DNA in a family With mitochondrial myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 154:1240-1247.
- Park SB, Ma KT, Kook KH, Lee SY (2004) Kearns-Sayre syndrome -3 case reports and review of clinical feature. *Yonsei Med J* 45:727-735.
- Paus S, Zsurka G, Baron M, Deschauer M, Bamberg C, Klockgether T, Kunz WS, Kornblum C (2008) Apraxia of lid opening mimicking ptosis in compound heterozygosity for A467T and W748S POLG1 mutations. *Mov Disord* 23:1286-1288.
- Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, Naiman JL, Windmiller J, Lammi AT, Hoffman R, Marsh JC (1979) A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr* 95:976-984.
- Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, Melton JV, Pang Ch-Y, Wei Y-H, Murphy MP (1998) Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Eur J Biochem* 257:192-201.
- Poulton J, Deadman ME, Mark Gardiner E (1989) Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet* 8632:236-240.
- Poulton J, Deadman ME, Ramacharan S, Gardiner RM (1991a) Germ-line deletions of mtDNA in mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* 48:649-653.
- Poulton J, Deadman ME, Turnbull DM, Lake B, Gardiner RM (1991b) Detection of mitochondrial DNA deletions in blood using the polymerase chain reaction: non-invasive diagnosis of mitochondrial myopathy. *Clin Genet* 39:33-38.
- Poulton J, Deadman ME, Bindoff L, Morten K, Land J, Brown G (1993) Families of mtDNA rearrangements can be detected in patients with mtDNA deletions: duplications may be a transient intermediate form. *Hum mol Genet* 2:23-30.
- Poulton J, Holt IJ (1994a) Mitochondrial DNA: does more lead to less? *Nat Genet* 8:313-315.
- Poulton J, Morten KJ, Weber K, Brown KG, Bindoff L (1994b) Are duplications of mitochondrial DNA characteristic of Kearns-Sayre syndrome? *Hum Mol Genet* 3:947-951.
- Poulton J, Morten KJ, Marchington D, Weber K, Brown KG, Rotig A, Bindoff L (1995a) Duplications of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Muscle Nerve* 3:154-158.
- Poulton J, O'Rahilly S, Morten KJ, Clark A (1995b) Mitochondrial DNA, diabetes and Pancreatic pathology in Kearns-Sayre syndrome. *Diabetologia* 38:868-871 402.
- Pyle A, Taylor RW, Durham SE, Deschauer M, Schaefer AM, Samuels DC, Chinnery PF (2007) Depletion of mitochondrial DNA in leucocytes harbouring the 3243A->G mtDNA

mutation. *J Med Genet* 44:69-74.

- Quintana-Murci L, Rötig A, Munnich A, Rustin P, Bourgeron T (2001) Mitochondrial DNA inheritance in patients with deleted mtDNA. *J Med Genet* 38:e28.
- Rowland LP (1983) Molecular genetics, pseudogenetics, and clinical neurology. The Robert Wartenburg Lecture. *Neurology* 33:1179-1195.
- Rötig A, Cormier V, Blanche S, Bonnefont JP, Ledeist F, Romero N, Schmitz J, Rustin P, Fischer A, Saudubray J-M, Munnich A (1990) Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest* 86:1601-1608.
- Rötig A, Bourgeron T, Chretien D, Rustin P, Munnich A (1995) Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Hum Mol Genet* 4:1327-1330.
- Rötig A, Munnich A (2003) Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders. *J Am Soc Nephrol* 14:2995-3007.
- Rustin P, Leblond J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rötig A, Munnich A, Sidi D (1994) Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J Pediatr* 124:224-228.
- Sacher M, Fatterpekar GM, Edelstein S, Sansaricq C, Naidich TP (2005) MRI findings in an atypical case of Kearns-Sayre syndrome: a case report. *Neuroradiology* 47:241-244.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6230-6234.
- Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001, pp. 5.4-5.17, 6.33-6.64, 8.4-8.24, 8.77-8.80.
- Schröder R, Vielhaber S, Wiedemann FR, Kornblum C, Papassotiropoulos A, Broich P, Zierz S, Elger CE, Reichmann H, Seibel P, Klockgether T, Kunz WS (2000) New insights into the metabolic consequences of large-scale mtDNA deletions: a quantitative analysis of biochemical, morphological, and genetic findings in human skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:353-360.
- Schwartz, M., J. Vissing (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347:576-580.
- Sciaccio M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT (1994) 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* 3:13-19.
- Sciaccio M, Prella A, Comi GP, Napoli L, Battistel A, Bresolin N, Tancredi L, Lamperti C, Bordoni A, Fagiolari G, Ciscato P, Chiveri L, Perini MP, Fortunato F, Adobbati L, Messina S, Toscano A, Martinelli-Boneschi F, Papadimitriou A, Scarlato G, Moggio M (2001) Retrospective study of a large population of patients affected with mitochondrial disorders: clinical, morphological and molecular genetic evaluation. *J Neurol* 248:778-788.
- Seneca S, Verhelst H, De Meirleir L, Meire F, Ceuterick-De Groote C, Lissens W, Van Coster R (2001) A new mitochondrial point mutation in the transfer RNA(Leu) gene in a patient with a clinical phenotype resembling Kearns-Sayre syndrome. *Arch Neurol* 58:1113-1118.
- Sevel D (1986) The origins and insertions of the extraocular muscles: development, histologic features, and clinical significance. *Trans Am Ophthalmol Soc* 84:488-526.
- Servidei S (2000) Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromusc Disord* 10:10-15.
- Shanske S, Tang Y, Hirano M, Nishigaki Y, Tanji K, Bonilla E, Sue C, Krishna S, Carlo JR, Willner J, Schon EA, DiMauro S (2002) Identical mitochondrial DNA deletion in a woman with ocular myopathy and in her son with Pearson syndrome. *Am J Hum Genet* 71:679-683.

- Shanske S, Pancrudo J, Kaufmann P, Engelstad K, Jhung S, Lu J, Naini A, DiMauro S, De Vivo DC (2004) Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: implications for diagnosis. *Am J Hum Genet* 130:134-137.
- Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC (1989) Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7952-7956.
- Shoubridge EA, Karpati G, Hastings KEM (1990) Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal muscle fiber segments in mitochondrial disease. *Cell* 62:43-49.
- Spelbrink JN, Zwart R, Van Galen MJ, Van den Bogert C (1997) Preferential amplification and phenotypic selection in a population of deleted and wild-type mitochondrial DNA in cultured cells. *Curr Genet* 32:115-124.
- Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxson R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C (2001) Human mitochondrial DNA Deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 28:223-231.
- Spinazzola A, Zeviani M (2005) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* 354:162-168.
- Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rötig A, Gasparini P, Ferrero I, Mootha VK, Tiranti V, Zeviani M (2006) MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 38:570-575.
- Suomalainen A, Majander A, Haltia M, Somer H, Lönnqvist J, Savontaus ML, Peltonen L (1992) Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe Retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Invest* 90:61-66.
- Suomalainen A, Majander A, Wallin M, Setälä K, Kontula K, Leinonen H, Salmi T, Paetau A, Haltia M, Valanne L, Lönnqvist J, Peltonen L, Somer H (1997) Autosomal dominant Progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology* 48:1244-1253.
- Suomalainen A, Kaukonen J (2001) Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability. *Am J Med Genet* 106:53-61.
- Tabaku M, Legius E, Robberecht W, Sciot R, Fryns JP, Cassiman JJ, Matthijs G: (1999) A novel 7.4 kb mitochondrial deletion in a patient with congenital progressive external ophthalmoplegia, muscle weakness and mental retardation. *Genet Couns* 10:285-293.
- Tengan CH, Moraes CT (1998) Duplication and triplication with staggered breakpoints in human mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1406:73-80.
- Thorburn DR, Dahl H-HM (2001) Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal Diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 106:102-114.
- Tsuchishima M, Tsutsumi M, Shiroeda H, Yano H, Ueshima Y, Shimanaka K, Takase S (2000) Study of mitochondrial DNA deletion in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 24:12-15.
- Tyynismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A (2009) A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am J Hum Genet* 85:290-295.
- Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28:211-212.
- Van Goethem G, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2002) Progressive external ophthalmoplegia and multiple mitochondrial DNA deletions. *Acta Neurol Belg* 102:39-42.

- Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Löfgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M, Ceuterick C, De Jonghe P, Van Broeckhoven C (2003a) Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13: 133-142.
- Van Goethem G, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2003b) Progressive external ophthalmoplegia characterized by multiple deletions of mitochondrial DNA: unraveling the pathogenesis of human mitochondrial DNA instability and the initiation of a genetic classification. *Neuromolecular Med* 3:129-146.
- Wallace DC (1982) Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev* 46:208-240.
- Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G, Webster K A, Greenberg BD (1987) Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet* 12:81-90.
- Wallace DC (1989) Mitochondrial DNA mutations and neuromuscular disease. *Trends Genet* 5: 9-13.
- Wilson B, Claesson I, Forsell C, Tulinius M, Hagberg B (1993) A case of Kearns-Sayre syndrome with metaphyseal dysplasia. *Pediatr Radiol* 23:106-107.
- Yamashita S, Nishino I, Nonaka I, Goto Y (2008) Genotype and phenotype analyses in 136 patients with single large-scale mitochondrial DNA deletions. *J Hum Genet* 53:598-606.
- Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, Vergani L, Angeli P, Gringeri E, Jacobs HT, Holt IJ (2002) Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strnad accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* 111:495-505.
- Yamamoto M, Clemens PR, Engel AG (1991) Mitochondrial DNA deletions in mitochondrial cytopathies: observations in 19 patients. *Neurology* 14:1822-1828.
- Zeviani M, Moraes CT, Di Mauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP (1988) Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Syre syndrome. *Neurology* 38:1339-1346.
- Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S, DiDonato S (1989) An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339:309-311.
- Zeviani M, Gellera C, Pannacci M, Uziel G, Prella A, Servidei S, DiDonato S (1990) Tissue distribution and transmission of mitochondrial DNA deletions in mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 28:94-97.
- Zsurka G, Schröder R, Kornblum C, Rudolph J, Wiesner RJ, Elger CE, Kunz WS (2004) Tissue dependent co-segregation of the novel pathogenic G12276A mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) mutation with the A185G D-loop polymorphism. *J Med Genet* 41:e124.
- Zsurka G, Kraytsberg Y, Kudina T, Kornblum C, Elger CE, Khrapko K, Kunz WS (2005) Recombination of mitochondrial DNA in skeletal muscle of individuals with multiple mitochondrial DNA heteroplasmy. *Nat Genet* 37:873-877.
- Zupanc ML, Moraes CT, Shanske S, Langman CB, Ciafaloni E, DiMauro S (1991) Deletion of mitochondrial DNA in patients with combined features of Kearns-Sayre and MELAS syndromes. *Ann Neurol* 29:680-683.

8 Thesen

1. Zwischen CPEO-Patienten mit singulären mtDNA-Deletionen und unterschiedlicher Multisystembeteiligung bestehen keine molekulargenetischen Unterschiede hinsichtlich der Deletionsdistribution in den mitotischen Geweben, des Heteroplasmiegrades im Muskel sowie der Länge der singulären mtDNA-Deletion.

Insbesondere korreliert die Häufigkeit der singulären Deletion in den untersuchten mitotischen Geweben (Blut und Urin) nicht mit der Beteiligung des ZNS und verwandter Organe (Innenohr, Retina). Desweiterm korreliert die Mutationslast im Muskel nicht mit den Extremitätenparesen.

2. Der Deletionsnachweis in den mitotischen Geweben ist für das Kearns-Sayre-Syndrom nicht spezifisch und kann somit zur molekulargenetischen Differenzierung zwischen den KSS und der CPEO nicht beitragen. Diese Daten stützen die Annahme, dass das KSS keine eigene nosologische Entität zu sein scheint, sondern eine schwere Manifestation einer CPEO.

3. Die untersuchten Gewebe repräsentierten zwei embryonale Keimblätter: Mesoderm (Muskel, Blut und Urin) und Endoderm (Urin). Es bestand keine Korrelation zwischen dem Nachweis der singulären Deletionen in einem der drei Gewebe und dem Befall der aus dem gleichen Keimblatt stammenden Organe.

4. Der Deletionsnachweis in einem der mitotischen Gewebe (Blut oder Urin) korrelierte signifikant mit einem früheren Erkrankungsbeginn. Es zeigte sich auch eine, jedoch nicht signifikante Tendenz, dass der höhere Heteroplasmiegrad im Muskel mit einem früheren Erkrankungsbeginn einhergeht.

5. Die Patienten mit der „Common Deletion“ wiesen eine signifikant höhere Mutationslast im Muskel im Vergleich zum übrigen Patientenkollektiv auf.

6. Die Patienten, die eine singuläre mtDNA-Deletion im Blut aufwiesen, waren signifikant jünger bei der Probenentnahme als diejenigen ohne Deletion im Blut. Die Beobachtung unterstützt die Annahme einer Reduktion der Mutationslast in den sich teilenden Geweben durch mitotische Segregation im Laufe des Lebens (mit dem zunehmenden Alter) der betroffenen Patienten.

7. Die multiplen Deletionen der mitochondrialen DNA wurden bei Anwendung der sensitiven Long-Range-PCR-Untersuchung bei den Patienten mit CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung nur im Muskelgewebe und nicht im Blut oder im Urin nachgewiesen.

8. Ein MELAS-Phänotyp kann nicht nur durch Punktmutationen der mtDNA sondern auch einen POLG1-Defekt hervorgerufen werden. Es wurde ein Patient mit multiplen mtDNA-Deletionen im Muskel und einem MELAS-Phänotyp mit einer sensiblen Ataxie beschrieben. Der Patient wies zwei rezessive Mutationen im POLG1-Gen auf: R627Q im Exon 10 und G848S im Exon 16 (Deschauer et al., 2007).

9. Die Spezifität der Long-Range-PCR-Untersuchung ist, nach entsprechender Primerauswahl, in der Detektion der singulären mtDNA-Deletionen der Southern-Blot-Analyse gleich.

10. Die Long-Range-PCR-Untersuchung weist eine höhere Sensitivität im Vergleich zur Southern-Blot-Analyse, vor allem in der Untersuchung der Proben mit niedrigeren Heteroplasmiegrad (Blut und Urin), auf.

11. Die Sensitivität der Long-Range-PCR-Untersuchung wird durch Verkürzung der Elongationszeit in der Untersuchung der singulären mtDNA-Deletionen erhöht, wobei hier auch die Deletionslänge eine Rolle spielt.

12. Die Sensitivität der Long-Range-PCR kann in der Untersuchung der multiplen mtDNA-Deletionen durch Verkürzung der Elongationszeit nicht erhöht werden und ist mit einer Reduktion der Spezifität verbunden.

13. Die Überlegenheit der Southern-Blot-Analyse gegenüber der Long-Range-PCR-Untersuchung besteht in der Möglichkeit der Einschätzung des Heteroplasmiegrades.

Anhang:**Tabellarischer Lebenslauf**

Name	Anna Rokicka
Geburtsdatum	29.08.1976
Geburtsort	Lódź (Polen)
Familienstand	ledig
Adresse	Parkweg 4, 37671 Höxter
Sprachkenntnisse	Polnisch (Muttersprache), Deutsch, Englisch
Schulbildung	
1981-1995	Mittelschule Nowogard (Polen), Abschluss: Abitur
Studium	
1995- 2001	Medizinstudium an der Pommerschen Akademie für Medizin in Stettin (Polen), Abschluss: Approbation als Ärztin
1997-2001	Tätigkeit im Studentenwissenschaftskreis in der Forschungsgruppe für Pathophysiologie und Infektionskrankheiten
2005	deutsche Approbation
Beruflicher Werdegang	
10/2001-10/2002	Praktisches Jahr im Bezirkskrankenhaus in Nowogard (Polen)
11/2002-11/2003	Assistenzärztin am Klinikum Uckermark, Neurologische Klinik, Chefärztin: Dr. med. G. Stäber
12/2003-09/2006	Assistenzärztin am Städtischen Klinikum Dessau, Neurologische Klinik, Chefärztin: PD Dr. med. S. Spieker
10/2005-09/2006	Doktorandin im Muskellabor der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Poster	Long-PCR-Untersuchung bei Patienten mit CPEO und unterschiedlicher Multisystembeteiligung A. Rokicka, S. Zierz, M. Deschauer (Halle) P 489 Neurowoche, Berlin 2006
Publikation	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 68 (2007) 1741-1742
10/2006-09/2007	Assistenzärztin im St. Joseph-Krankenhaus Dessau, Krankenhaus für Psychiatrie, Psychotherapie, Psychotherapeutische Medizin, Chefarzt: Dr. med. H. Becker
10/2007-09/2009	Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Altenburg, Neurologische Klinik, Chefarzt: PD Dr. med. habil. J. Berrouschot
23/10/2007	EMG-Zertifikat
26/05/2009	Facharztanerkennung
Seit 11/2009	Oberärztin im St. Ansgar-Krankenhaus Höxter, Neurologische Klinik, Chefarzt: Dr. med. U. Heckmann

Anna Rokicka

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Anna Rokicka

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe noch nie zuvor einen Promotionsversuch unternommen. Diese Arbeit ist an keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Halle, den 01.04.2011

Anna Rokicka

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. S. Zierz, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Deschauer, der mich als Betreuer dieser Arbeit mit großer Hilfsbereitschaft unterstützt hat. Er stand mir mit seinem Wissen und seinen Erfahrungen jederzeit zur Seite.

Für die stetige Unterstützung im Labor danke ich den Mitarbeitern aus dem Muskellabor der Neurologischen Universitätsklinik Halle, insbesondere Frau Heinz sowie Frau Zietz und Frau Scholz.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr. med. K. Traufeller, Frau M. Knape und Herrn P. Joshi, mit denen ich im molekulargenetischen Labor zusammenarbeitete.

Herrn Dr. med. T. Stache danke ich besonders für die Hilfe bei den Korrekturarbeiten.

Weiterhin gilt mein Dank Frau C. Clajus und allen klinisch tätigen Kollegen, den ich für die Untersuchung und Identifizierung von Patienten sehr dankbar bin.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir immer hilfreich zur Seite standen.