

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. S. Zierz)

**Molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit
Mitochondriopathie mittels Sequenzierung des
mitochondrialen Genoms**

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

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

von Kathrin Schubert
geboren am 18.09.1989 in Potsdam

Betreuer: Prof. Dr. med. Marcus Deschauer

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Deschauer
Prof. Dr. med. K. Hoffmann
PD Dr. med. Dr. rer. nat. KG. Claeys (Aachen)

15.09.2015

05.08.2016

**In großer Dankbarkeit und Liebe
meinen Eltern Kristin und Volker Schubert**

Referat

Mitochondriopathien weisen ein großes Spektrum unterschiedlicher Phänotypen auf, wobei die meisten Erkrankungsbilder durch eine Multisystembeteiligung gekennzeichnet sind. Es sind jedoch auch Patienten mit isolierter mitochondrialer Myopathie beschrieben worden. Der Nachweis von Ragged Red Fasern und eine hohe Anzahl Cytochrom-c-Oxidase negativer Fasern im Muskelpräparat können auf das Vorliegen einer Mitochondriopathie hinweisen. Diese Arbeit schließt sieben Patienten ein, bei denen aufgrund ihrer klinischen Symptomatik und den Ergebnissen von myohistologischen Untersuchungen die Verdachtsdiagnose einer Mitochondriopathie gestellt wurde. Dabei wurden drei Patienten mit dem Phänotyp einer isolierten mitochondrialen Myopathie und vier Patienten mit mitochondrialer Myopathie bei Multisystembeteiligung, von denen ein Patient eine chronisch progressive externe Ophthalmoplegie aufweist, untersucht. Deletionen der mitochondrialen DNA und die häufige Punktmutation m.3243A>G waren bei keinem der Patienten nachweisbar.

Um nach selteneren und neuen Mutationen der mitochondrialen DNA zu suchen, erfolgte eine Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms aller sieben Patienten. Dabei konnte bei drei Patienten jeweils eine neue Punktmutation identifiziert werden, zwei in der tRNA^{Ala} (m.5610G>A und m.5631G>A) und eine in der tRNA^{Asp} (m.7539C>T). Interessanterweise fanden sich beide Veränderungen der tRNA^{Ala} bei Patienten mit isolierter mitochondrialer Myopathie, während die Mutation in der tRNA^{Asp} bei einem Patienten mit multisystemischer Beteiligung nachgewiesen wurde. Die Bestimmung der Heteroplasmie durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus zeigte bei allen drei Patienten einen hohen Mutationsanteil im Muskel sowie niedrigere Anteile mutierter DNA in anderen Geweben.

Der Nachweis von heteroplasmischen Mutationen bei symptomatischen Patienten mit myohistologischen Veränderungen sowie die abschließende Bewertung durch das Scoring-System nach Yarham et al. 2011 sprechen für eine sichere Pathogenität der drei neu identifizierten Punktmutationen. Aus den Ergebnissen lässt sich in Zusammenschau der bereits bekannten tRNA-Punktmutationen schließen, dass die tRNA^{Ala} vor allem mit dem Auftreten einer isolierten mitochondrialen Myopathie assoziiert ist. Im Gegensatz dazu scheinen Punktmutationen in der tRNA^{Asp} eher zur Ausprägung eines multisystemischen Phänotyps zu führen.

Schubert, Kathrin: Molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit Mitochondriopathie mittels Sequenzierung des mitochondrialen Genoms, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 78 Seiten, 2015

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau der Mitochondrien	1
1.2	Genetik der Mitochondrien	1
1.3	Aufbau und Funktion der menschlichen mitochondrialen tRNA	3
1.4	Mitochondriale Erkrankungen	4
1.4.1	Myohistologische Veränderungen	5
1.4.2	Biochemische Veränderungen	6
1.4.3	Molekulargenetische Veränderungen	8
2	ZIELSTELLUNG	11
3	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODIK	12
3.1	Patienten	12
3.1.1	Einschlusskriterien	12
3.1.2	Klinische Fallbeschreibungen	13
3.1.3	Histologische Vorbefunde	20
3.1.4	Biochemische Vorbefunde	22
3.1.5	Molekulargenetische Vorbefunde	24
3.2	Material	25
3.2.1	DNA-Extraktion	25
3.2.2	Amplifikation und Sequenzierung der mtDNA	25
3.2.3	PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen	25
3.3	Methodik	26
3.3.1	DNA-Extraktion	26
3.3.2	Amplifikation und Sequenzierung der mtDNA	27
3.3.3	PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen	31
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Sequenzierung der mtDNA	34
4.2	PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen	37
5	DISKUSSION	43
5.1	Pathogenitätsnachweis für mt-tRNA-Punktmutationen	43
5.1.1	Heteroplasmie	43
5.1.2	Klinische Symptomatik	44
5.1.3	Evolutionäre Konservation	45
5.1.4	Einzelfaserstudie und mt-tRNA ^{Ala} Steady-State-Level-Analyse	48
5.1.5	Zusammenfassung	51
5.2	mt-tRNA Mutationen bei isolierter mitochondrialer Myopathie	51
5.3	mt-tRNA Mutationen bei Mitochondriopathie mit Multisystembeteiligung	53
5.4	Fazit und Ausblick	55
6	ZUSAMMENFASSUNG	58

7	LITERATURVERZEICHNIS	59
8	THESEN.....	71
9	ANHANG	72

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

~	ungefähr
A	Adenin
Ala	Alanin
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriophosphat
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CIF	Cytochrom-c-Oxidase intermediäre Fasern
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
CNF	Cytochrom-c-Oxidase negative Fasern
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CPEO	chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CPF	Cytochrom-c-Oxidase positive Fasern
DGUOK	Deoxyguanosin-Kinase
D-Loop	displacement loop, Kontrollregion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
et al.	et alii, und Mitarbeiter
G	Guanin
GT	Gomori-Trichrom
IMM	isolierte mitochondriale Myopathie
k. A.	keine Angabe
KG	Kraftgrad
Leu	Leucin
Lys	Lysin
m	männlich
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden

MERRF	Myoklonische Epilepsie und Ragged Red Fasern
Met	Methionin
Min.	Minuten
MM	mitochondriale Myopathie
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
n	Anzahl
n. d.	nicht durchgeführt
NB	Normbereich
NCP	Normal Collagen Protein
nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p	p-Wert, Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEO	progressive externe Ophthalmoplegie
Phe	Phenylalanin
POLG	Polymerase Gamma
Pro	Prolin
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RRF	Ragged Red Fasern
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SE	Saline-Ethylendiamintetraacetat
Sek.	Sekunden
Ser	Serin
SMA	subsarkolemmale Mitochondrienakkumulation
T	Thymin
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquiticus
TBE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat-EDTA
TE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TK2	Thymin-Kinase 2

tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Trp	Tryptophan
TYMP	Thymidin-Phosphorylase
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
U/g	Units pro Gramm
U/min	Umdrehungen pro Minute
w	weiblich
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die nur in eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind von einer Doppelmembran umgeben, wodurch insgesamt vier Reaktionsräume entstehen: die Außenmembran, die Innenmembran, der Intermembranraum und die Matrix (DiMauro and Schon 2003). Die äußere Membran umschließt das komplette Mitochondrium und besitzt Proteinkanäle, die den Austausch von Stoffen mit dem Zytosol möglich machen. Die Innenmembran enthält zahlreiche Einstülpungen, die zu einer Oberflächenvergrößerung beitragen und die Matrix begrenzen. Da die innere Membran für fast alle geladenen und polaren Moleküle nicht permeabel ist, verfügt sie über eine Reihe spezifischer Transportproteine, die die Passage dieser Stoffe ermöglichen (Berg et al. 2014).

Eine wichtige Aufgabe der Mitochondrien ist die Energiegewinnung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Die entscheidenden Strukturen für die Bildung des energiereichen Adenosintriphosphats (ATP) befinden sich ebenfalls in der Innenmembran und werden unter der Bezeichnung Atmungskette zusammengefasst. Diese besteht insgesamt aus fünf Komplexen: der NADH-Dehydrogenase, der Succinat-Dehydrogenase, der Cytochrom-c-Reduktase, der Cytochrom-c-Oxidase und der ATP-Synthase (Schon and Manfredi 2003).

Die Matrix, die von der Innenmembran umschlossen wird, enthält zahlreiche Enzyme für verschiedene Stoffwechselvorgänge. In dieser Struktur befindet sich zudem das mitochondriale Genom (Berg et al. 2014).

1.2 Genetik der Mitochondrien

Menschliche Mitochondrien besitzen ihre eigene doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA), die als mtDNA bezeichnet wird. Es handelt sich um ein ringförmiges Molekül, das aus 16569 Basen besteht. Die mtDNA setzt sich im Gegensatz zur nukleären DNA (nDNA) fast ausschließlich aus kodierenden Sequenzen zusammen und enthält keine Introns (Taanmann 1999). Sie kodiert insgesamt 37 Gene: 13 Proteine, allesamt Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe, 22 Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNA) und 2 ribosomale Ribonukleinsäuren (rRNA) (Anderson et al. 1981). Die größte und bedeutungsvollste nicht-kodierende Region wird D-Loop (displacement loop) oder auch Kontrollregion genannt. Dieser Bereich verfügt über eine dreisträngige Struktur und enthält zudem hypervariable Segmente, die eine hohe Mutationsfrequenz aufweisen. Der D-Loop ist zudem die Steuerungsregion für die Replikation und Transkription der mtDNA (Mao and Holt 2009).

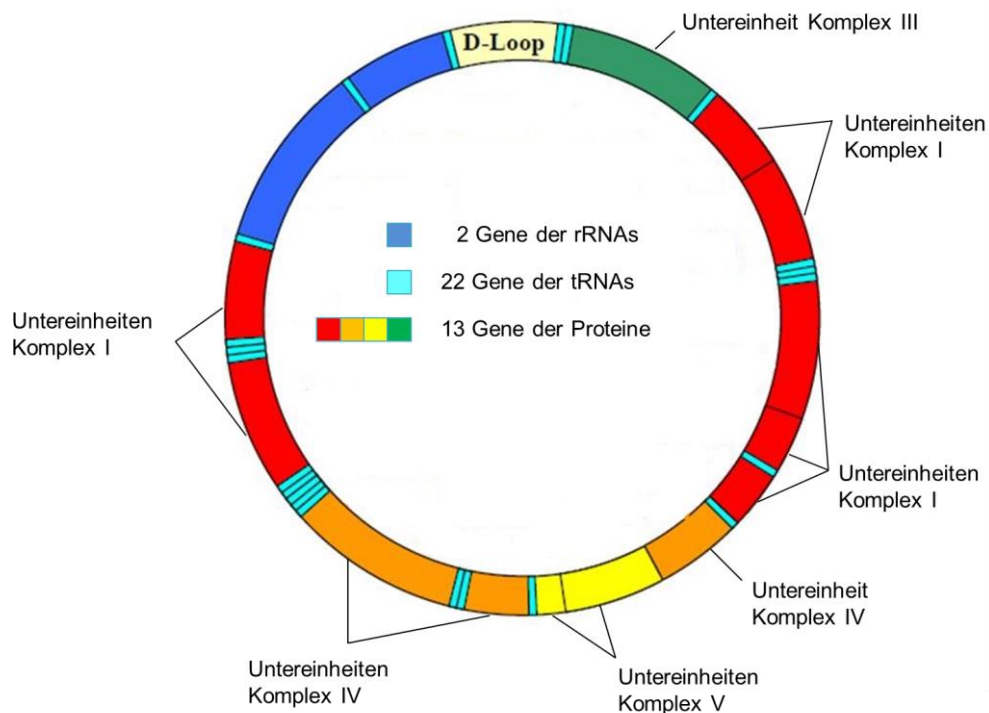


Abbildung 1: Die menschliche mitochondriale DNA (modifiziert nach Rokicka).

Der Großteil der ca. 900 Genprodukte in den Mitochondrien wird jedoch durch die Kern-DNA kodiert und von dort in das Mitochondrium transportiert. Neben dem Zellkern sind Mitochondrien die einzigen Zellorganellen, die ihre eigene DNA haben und die Fähigkeit besitzen Ribonukleinsäure (RNA) und Proteine herzustellen. In jeder Zelle befinden sich zwischen 100-1000 Mitochondrien, wobei jedes Mitochondrium mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms enthält (DiMauro and Schon 2003). Normalerweise enthalten alle Mitochondrien genetisch identische Kopien der mtDNA, was als Homoplasmie bezeichnet wird. Wenn eine Mutation vorliegt, bedingt sie eine Mischung aus zwei unterschiedlichen mtDNA-Populationen, die sich bei jeder Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen neu verteilen. Das gleichzeitige Vorliegen von mutierter DNA (Mutant) und unveränderter DNA (Wildtyp), innerhalb einer Zelle nennt man Heteroplasmie (DiMauro and Schon 2001).

Durch die Zufallsverteilung ist es möglich, dass der Anteil mutierter mtDNA im Verlauf mehrerer Zellteilungen und somit von Generation zu Generation ansteigt. Dadurch kann es zum Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes kommen. Man geht davon aus, dass Mutationen ab dem Schwellenwert manifest und damit symptomatisch werden. Der Schwellenwert für mutierte DNA ist in Geweben, die einen hohen Energiebedarf haben, niedriger (DiMauro and Schon 2001). Somit können in verschiedenen Geweben unterschiedliche Anteile an mutierter DNA vorliegen.

Den größten Anteil mutierter DNA findet man in der Regel in den klinisch betroffenen Organen. Jedoch besteht keine enge Korrelation zwischen dem Heteroplasmiegrad und der klinischen Ausprägung. Aufgrund des Schwellenwertes ist es zudem möglich bei Familienmitgliedern eine Mutation nachzuweisen, obwohl keine Symptomatik vorliegt (Deschauer 2003).

Eine weitere Besonderheit der Mitochondrien ist, dass ihre DNA maternal vererbt wird (Birky 1978, 1995). Eine Mutter, deren mtDNA eine Mutation enthält, überträgt diese an alle ihre Kinder. In dieser Generation geben jedoch nur die Töchter die Mutation an ihre Nachkommen weiter (DiMauro and Schon 2001). Es sind bisher nur sehr wenige Ausnahmen der maternalen Vererbung bei mtDNA bekannt (Schwartz and Vissing 2002).

1.3 Aufbau und Funktion der menschlichen mitochondrialen tRNA

Der Anteil der Gene, die tRNAs kodieren, macht in der mtDNA in etwa 10% aus (Florentz et al. 2003, Wittenhagen et al. 2003).

tRNA-Moleküle bestehen aus einem einzelnen RNA-Strang und enthalten zwischen 73-95 Nukleotide. Jedes tRNA-Molekül bildet jedoch durch Paarung konjugierender Basen doppelsträngige Bereiche aus (Sundaralingam 1979). Die klassische Sekundärstruktur einer tRNA ähnelt der Form eines Kleeblattes, wobei vier Stämme und drei Schleifen unterschieden werden. Der Akzeptorstamm besteht aus sieben konjugierenden Basenpaaren und bindet an seinem 3'-Ende, wo sich bei jeder tRNA das Basentriplett CCA befindet, die jeweils zugehörige Aminosäure. Die Dihydrouracil-Schleife ist für die Erkennung der tRNA durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase wichtig und hängt am D-Stamm. Daneben befindet sich der Anticodonstamm, der immer aus fünf konjugierenden Basenpaaren zusammengesetzt ist. Die Anticodonschleife besteht dagegen aus sieben ungepaarten Basen, von denen drei das sogenannte Anticodon bilden. Dieser Bereich spielt bei der Translation eine wichtige Rolle, denn an dieser Stelle interagiert das tRNA-Molekül mit dem komplementären Codon der abzulesenden messenger-RNA (mRNA). Die TΨC-Schleife ist mit dem T-Stamm verbunden und ist für die Bindung an die 5S-rRNA der Ribosomen zuständig. Zudem gibt es zwischen dem T-Stamm und dem Anticodonstamm einen variablen Bereich, der je nach tRNA-Molekül unterschiedlich lang ist (Helm et al. 2000, Yarham et al. 2010).

tRNA-Moleküle sind ein essenzieller Bestandteil der Proteinbiosynthese. Während der Translation an den Ribosomen werden einzelne Aminosäuren zu einem Protein aneinander geknüpft. Die mRNA dient dabei als Vorlage für die Herstellung eines Proteins, wobei immer jeweils drei Basen für eine bestimmte Aminosäure kodieren. Eine beladene tRNA bindet nun mit ihrem komplementären Anticodon an das

Basentriplett der mRNA, und die zugehörige Aminosäure wird an die bereits vorliegende Peptidkette angeknüpft. Auf diese Art wird schrittweise das gewünschte Protein gebildet (Florentz et al. 2003, Yarham et al. 2010).

Der Austausch einer Base innerhalb eines tRNA-Moleküls kann die Struktur der tRNA beeinflussen. Verbindungen, die zur Stabilisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der tRNA beitragen, können so zerstört werden. Das Vorliegen einer Punktmutation innerhalb einer tRNA kann damit zu Störungen im Ablauf der Translation führen und zur Herstellung fehlerhafter Proteine beitragen (Wittenhagen et al. 2003).

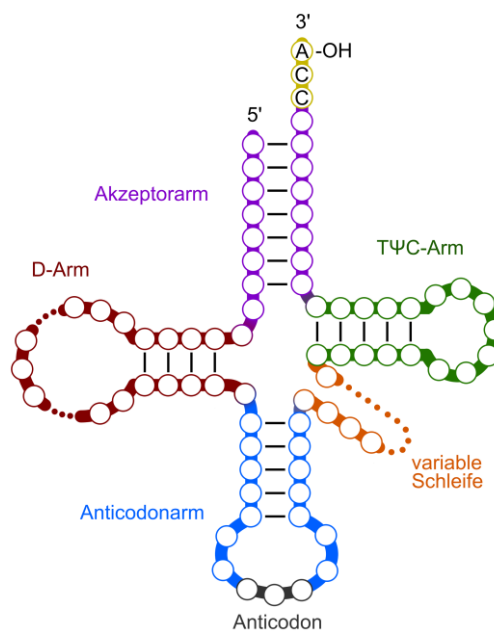


Abbildung 2: Klassische Sekundärstruktur einer tRNA (modifiziert nach Yikrazuul).

1.4 Mitochondriale Erkrankungen

Unter der Bezeichnung Mitochondriopathie werden im engeren Sinne Erkrankungen verstanden, die auf Störungen der Atmungskette beruhen. Sie können sich jedoch klinisch als auch biochemisch und genetisch im großen Maße voneinander unterscheiden, weshalb sie nicht immer leicht zu diagnostizieren sind. Man ging zunächst über viele Jahre davon aus, dass neuromuskuläre Symptome das klinische Korrelat zu Störungen im OXPHOS-System darstellen. In dieser Zeit wurde auch der Begriff der mitochondrialen Myopathie geprägt (Kleist-Retzow und Kornblum 2009). Auch heute noch steht die Beteiligung der Skelettmuskulatur bei Mitochondriopathien im Vordergrund. Das klinische Spektrum erstreckt sich jedoch von milden monosymptomatischen Verläufen bis hin zu schweren Multisystemerkrankungen, wobei zahlreiche Organsysteme (Abbildung 3) betroffen sein können (Petty et al. 1986).

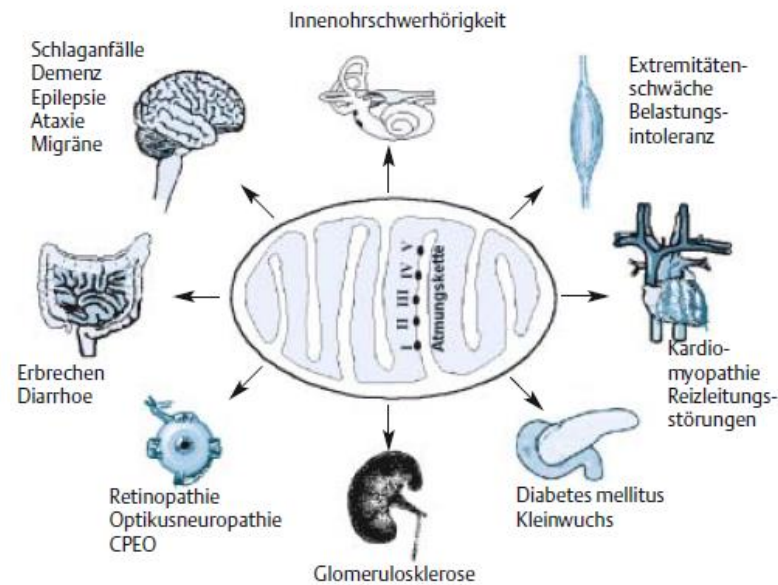


Abbildung 3: Organbeteiligungen mitochondrialer Erkrankungen (aus Deschauer 2003).

Es existieren einige Phänotypen, die charakteristische Leitsymptome aufweisen. Eine häufige mitochondriale Erkrankung ist dabei die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO), die durch eine Augenbewegungsstörung und Ptosis gekennzeichnet ist. Wenn zusätzlich eine Multisystembeteiligung besteht, spricht man von einer CPEO-Plus. Weitere bedeutsame Mitochondriopathien sind z. B. das MELAS-Syndrom (Mitochondriale Myopathie, Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden) oder das MERRF-Syndrom (Myoklonus Epilepsie mit Ragged Red Fasern) (Deschauer 2012).

Um eine mitochondriale Erkrankung zu diagnostizieren, reicht eine klinische Charakterisierung meist nicht aus. Ergänzend werden vor allem histologische und biochemische Analysen von Gewebeproben sowie molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt (DiMauro et al. 1985), wozu meist die Entnahme von Muskelgewebe notwendig ist.

1.4.1 Myohistologische Veränderungen

Die histologischen und histochemischen Untersuchungen werden am gefrorenen Muskelpräparat vorgenommen. Man unterscheidet verschiedene Färbungen, wobei in der Regel die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung (GT), die Succinat-Dehydrogenase-Färbung (SDH) und die kombinierte sequentielle Cytochrom-c-Oxidase-Succinat-Dehydrogenase Färbung (COX-SDH) durchgeführt werden (Filosto et al. 2007).

Um die Mitochondrien im Muskelpräparat darzustellen, verwendet man die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung. Hier lassen sich als Korrelat einer mitochondrialen Funktionsstörung häufig sogenannte Ragged Red Fasern (RRF) nachweisen. Sie entstehen durch eine abnorme Proliferation von genetisch, biologisch und morphologisch veränderten Mitochondrien, die wiederum Folge einer Mutation der mtDNA sind. RRF sind durch eine unregelmäßig zerrissene und fuchsinrot gefärbte Struktur gekennzeichnet, die hauptsächlich subsarkolemmal und zwischen den Myofibrillen liegen (Deschauer 2003). Die gleichen Bereiche färben sich bei Anwendung der Succinat-Dehydrogenase-Reaktion blau (DiMauro et al. 2001). Obwohl das Vorkommen von RRF mit mitochondrialen Erkrankungen assoziiert ist, die auf einem primären Defekt der mtDNA beruhen, können sie auch bei Mitochondriopathien, die durch Mutationen in der nDNA entstehen, auftreten. RRF sind demnach kein spezifischer Hinweis für das Vorliegen einer molekulargenetischen Veränderung in der mtDNA (Bourgeois and Tarnopolsky 2004).

Die kombinierte sequentielle COX/SDH-Färbung beruht auf der gleichzeitigen Aktivität von Cytochrom-c-Oxidase und Succinat-Dehydrogenase in Mitochondrien. Sie ermöglicht die Unterscheidung von Cytochrom-c-Oxidase negativen Fasern (CNF) und Cytochrom-c-Oxidase positiven Fasern (CPF) in einem Muskelpräparat. Das Auftreten von CNF ist mit einer Enzymaktivitätsminderung von Komplex IV der Atmungskette assoziiert. Die mosaikartige Verteilung von CNF und CPF ist ein häufig, jedoch nicht zwingend, zu beobachtendes Bild bei mitochondrialen Erkrankungen, die durch Mutationen in tRNA-Genen oder Deletionen der mtDNA verursacht werden. Letztlich kann dieses Bild jedoch bei allen Defekten der Atmungskette auftreten (Filosto et al. 2007).

Strukturelle Veränderungen der Mitochondrien kommen zudem auch unspezifisch bei anderen Muskelerkrankungen vor. Bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose konnten bspw. CNF nachgewiesen werden (Krasnianski et al. 2005). Außerdem lassen sich mit zunehmendem Alter RRF und CNF auch bei Patienten ohne Hinweis auf eine mitochondriale Erkrankung nachweisen (Rifai et al. 1995).

1.4.2 Biochemische Veränderungen

Wenn bei einem Patienten der Verdacht besteht, dass eine mitochondriale Erkrankung vorliegt, kann die Diagnose durch biochemische Untersuchungen des OXPHOS-Systems verifiziert werden (Hoefs et al. 2012). In der Diagnostik von Störungen der OXPHOS spielt die biochemische Analyse von Muskelgewebe eine zentrale Rolle. Die Aktivität der einzelnen Atmungskettenenzyme kann dabei photometrisch oder polarographisch gemessen werden. Dadurch ist es möglich auch isolierte Defekte

eines einzelnen Komplexes der Atmungskette aufzudecken. Da die Atmungskettenkomplexe sowohl durch das mitochondriale als auch durch das nukleäre Genom kodiert werden (Tabelle 1), können biochemische Untersuchungen wichtige Hinweise auf den zu Grunde liegenden molekulargenetischen Defekt geben (DiMauro et al. 2001).

Tabelle 1: Komplexe der Atmungskette (Schon et al. 2012)

Komplex	Enzym	Anzahl kodierter Untereinheiten durch	
		Kern-DNA	mitochondriale DNA
I	NADH-Dehydrogenase	~ 39	7
II	Succinat-Dehydrogenase	4	/
III	Cytochrom-c-Reduktase	10	1
IV	Cytochrom-c-Oxidase	10	3
V	ATP-Synthase	~14	2

Viele Defekte innerhalb der Atmungskettenkomplexe resultieren aus einer fehlerhaften mitochondrialen Proteinsynthese, die durch molekulargenetische Veränderungen der mtDNA bedingt sind. Eine Ausnahme stellt Komplex II dar, der ausschließlich durch die Kern-DNA kodiert wird, wodurch die mtDNA die Succinat-Dehydrogenase-Aktivität nicht beeinflusst (Auré et al. 2006). Einer verminderten SDH-Aktivität liegt also primär immer ein Defekt im nukleären Genom zugrunde. Bei Komplex IV werden dagegen drei Untereinheiten durch die mtDNA kodiert. Somit können molekulargenetische Veränderungen der mtDNA zu einer verminderten Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) führen (Auré et al. 2006).

Isolierte Defekte der Komplexe I, III und IV werden vor allem Veränderungen in der nDNA zugeschrieben. Sie können jedoch auch Ursache einer Mutation in einer durch die mtDNA kodierten Untereinheit des OXPHOS-Systems sein (DiMauro et al. 2001). Dabei lässt sich meist eine verminderte Aktivität von Komplex I oder Komplex IV nachweisen, da die mtDNA hier im Vergleich zu den anderen Komplexen den größten Anteil an Untereinheiten kodiert (Mayr et al. 2015).

Kombinierte Defekte der Komplexe I, III und IV lassen dagegen das Vorliegen einer primären Schädigung der mtDNA vermuten, entweder in Form einer tRNA-Mutation oder einer singulären Deletion. Ursächlich kann jedoch auch eine sekundäre Beeinträchtigung der mtDNA durch eine Störung der intergenomischen Kommunikation mit Nachweis von multiplen Deletionen oder einer Depletion der mtDNA sein (DiMauro et al. 2001).

Insgesamt sind kombinierte Atmungskettendefekte die häufigste Ursache für Störungen im mitochondrialen Energiestoffwechsel und lassen sich bei fast der Hälfte der bekannten Gendefekte finden (Mayr et al. 2015).

1.4.3 Molekulargenetische Veränderungen

Molekulargenetisch können sowohl Defekte der mtDNA als auch Störungen im Bereich der nukleären Gene für mitochondriale Erkrankungen ursächlich sein.

Primäre Schäden der mtDNA können durch Punktmutationen, die der klassisch maternalen Vererbung folgen oder durch singuläre Deletionen, die vor allem sporadisch auftreten, entstehen (Deschauer 2012).

Die Veränderungen in nukleären Genen können in zwei Gruppen unterteilt werden:

- a) Defekte, die direkt oder indirekt die Komplexe der Atmungskette und damit die OXPHOS beeinflussen und
- b) Defekte, die die mitochondriale Transkription, Translation oder Replikation betreffen und somit zu sekundären Schäden der mtDNA führen.

Letztere werden auch als Störungen der intergenomischen Kommunikation bezeichnet (DiMauro et al. 2001). Sie führen in der mtDNA zum Nachweis multipler Deletionen oder einer Depletion (quantitative Reduktion des Gehalts der mtDNA), die nach den Regeln der Mendelschen Gesetze vererbt werden. Somit ist es möglich sowohl autosomal-dominante als auch autosomal-rezessive Erbgänge bei einer Mitochondriopathie vorzufinden (Deschauer 2003).

Die beschriebenen molekulargenetischen Veränderungen sind zum Teil mit bestimmten Altersgruppen assoziiert. Im Erwachsenenalter treten vor allem singuläre Deletionen der mtDNA und Punktmutationen in mt-tRNA-Genen auf. Kinder zeigen dagegen häufig nukleäre Gendefekte (Kleist-Retzow und Kornblum 2009).

Des Weiteren konnten für einige Mitochondriopathien charakteristische molekulargenetische Veränderungen nachgewiesen werden. So liegen dem MELAS-Syndrom vorwiegend Punktmutationen der mtDNA zugrunde, wobei es sich sehr häufig um die Mutation m.3243A>G im tRNA^{Leu1}-Gen handelt. Bei der CPEO zeigen sich dagegen bei mehr als der Hälfte der Patienten singuläre Deletionen der mtDNA (Deschauer 2012).

Natürlich gilt der Nachweis einer molekulargenetischen Veränderung in der mtDNA nicht als Beweis für das Vorliegen einer mitochondrialen Erkrankung. Multiple Deletionen lassen sich bspw. auch im Alter (Bua et al. 2006, Herbst et al. 2007), bei Einschlusskörper-Myositis (Oldfors et al. 1993, Santorelli et al. 1996) oder bei einer toxischen mitochondrialen Myopathie durch Langzeittherapie mit Zidovudin (Dalakas et al. 1990) finden.

Punktmutationen in tRNA-Genen

Mutationen in mt-tRNA-Genen sind eine wichtige Ursache mitochondrialer Erkrankungen. Sie weisen ein weites Spektrum klinischer Phänotypen auf:

von isolierten, organspezifischen Krankheitsbildern wie bspw. eine Myopathie oder Innenohrschwerhörigkeit bis hin zu multisystemischen Störungen mit Enzephalopathie, gastrointestinalen Störungen und Kardiomyopathie (Yarham et al. 2010).

Punktmutationen in tRNA-Genen sind die am häufigsten auftretenden pathologischen Mutationen innerhalb der mtDNA. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um den Austausch einer einzelnen Base. Zahlreiche dieser Veränderungen wurden in verschiedenen tRNA-Genen identifiziert, wobei bestimmte tRNAs wie bspw. die tRNA^{Leu(UUR)} und tRNA^{Lys} öfter betroffen sind als andere (Zifa et al. 2007). Es resultiert jedoch nicht jede Punktmutation in eine Erkrankung. Man unterscheidet zwischen pathogenen, also krankheitsverursachenden Mutationen und Polymorphismen, die keine klinische Symptomatik hervorrufen und somit eine Genvariation darstellen (Zifa et al. 2007).

Wenn eine Punktmutation in einem mt-tRNA-Gen nachgewiesen wird, muss nachfolgend geklärt werden, ob diese Veränderung als Ursache der klinischen Symptome in Frage kommt oder nicht. Dazu wurden Kriterien entwickelt, die eine Einordnung der Mutation ermöglichen. Tabelle 2 zeigt die Faktoren, die in das Scoring-System einfließen und stellt zudem die Wertigkeiten dar, die zur Beurteilung der Pathogenität wichtig sind (Yarham et al. 2011).

Tabelle 2: Scoring-System für die Pathogenität von mt-tRNA-Punktmutationen

Kriterium	Bewertung	Punktzahl
mehr als ein unabhängiger Bericht	- Ja - Nein	2 0
evolutionäre Konservierung einer Base oder eines Basenpaares	- eine Veränderung - zwei Veränderungen > zwei Veränderungen	2 1 0
Nachweis von Heteroplasmie	- Ja - Nein	2 0
Einhergehen der Mutation mit klinischer Symptomatik	- Ja - Nein	2 0
Histochemische Hinweise auf eine mitochondriale Erkrankung	- starker Hinweis - schwacher Hinweis - kein Hinweis	2 1 0
biochemischer Defekt in Komplex I, III oder IV der Atmungskette	- Ja - Nein	2 0
Einzelfaserstudie mit dem Nachweis höherer Anteile mutierter DNA in CNF als in CPF	- Ja - Nein	3 0
Nachweis einer mutierten mt-tRNA durch Steady-State-Level-Analyse oder Nachweis von Pathogenität durch eine trans-mitochondriale Cybrid-Studie	- Ja - Nein	5 0
Gesamtscore	<i>maximal 20 Punkte</i>	

Nachdem die Mutation anhand aller Kriterien beurteilt und die vergebenen Punkte addiert wurden, erfolgt die Auswertung anhand der erreichten Punktzahl (Yarham et al. 2011).

Tabelle 3: Einordnung einer mt-tRNA-Mutation nach dem Scoring-System

Punktzahl	Ergebnis
≤ 6 Punkte	neutraler Polymorphismus
7-10 Punkte	vielleicht pathogen
11-13 Punkte	wahrscheinlich pathogen
≥ 11 Punkte	definitiv pathogen

Bei einem Score ab 11 Punkten ist die Einordnung in wahrscheinlich oder definitiv pathogen davon abhängig, ob eine Einzelfaserstudie, mt-tRNA-Steady-State-Level-Analyse oder trans-mitochondriale Cybrid-Studie durchgeführt wurde. Nur wenn mindestens eine dieser Untersuchungen erfolgt ist und das Ergebnis zudem für eine Pathogenität spricht, kann die Mutation als definitiv pathogen eingestuft werden.

Mit Hilfe dieses Scoring-Systems ist es möglich die Pathogenität von Mutationen in mt-tRNA-Genen einheitlich einzuschätzen.

2 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine gezielte Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms bei Patienten, die in Abhängigkeit von ihrer klinischen Symptomatik und den Ergebnissen von myohistologischen Untersuchungen ausgewählt wurden. Aufgrund dieser Befunde wurde bei diesen Patienten der Verdacht auf das Vorliegen einer Mitochondriopathie gestellt. Molekulargenetische mtDNA-Veränderungen, die im Rahmen dieser Erkrankungen häufig auftreten wie multiple Deletionen und die Punktmutation m.3243A>G, wurden zuvor bei allen Patienten durch entsprechende Untersuchungen ausgeschlossen.

Insgesamt wurden sieben Patienten mit dem Ziel untersucht in der mtDNA eine genetische Ursache für den jeweils vorhandenen Phänotyp zu finden. Dabei galt es festzustellen, ob die Patienten seltene oder bisher nicht identifizierte Punktmutationen aufweisen. Zusätzlich war es Ziel dieser Arbeit im Falle der Identifizierung einer bisher unbekannten Mutation in der mtDNA deren Pathogenität zu beweisen.

Außerdem war es Aufgabe zu eruieren, ob aus den Ergebnissen eine Genotyp-Phänotyp Korrelation abgeleitet werden kann.

3 Patienten, Material und Methodik

3.1 Patienten

Alle in dieser Arbeit erwähnten Patienten und deren Familienmitglieder wurden über die Extraktion Ihrer DNA aus den jeweiligen Geweben informiert und haben nach erfolgter Aufklärung Ihre Einwilligung zur Verwendung Ihrer DNA zu diagnostischen Untersuchungen bzw. wissenschaftlichen Analysen schriftlich dokumentiert. Es bestehen keine Einschränkungen bezüglich der Aufbewahrungsdauer der DNA-Proben.

Es existiert ein positives Ethikvotum von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Halle-Wittenberg zur molekulargenetischen Untersuchung von Mitochondriopathien vom 16.4.2010 im Rahmen des Deutschen Netzwerks für mitochondriale Erkrankungen (mitoNET).

3.1.1 Einschlusskriterien

Die Auswahl der Patienten erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Eine Myopathie musste als klinisches Zeichen vorhanden sein.
2. Die myohistologische Untersuchung zeigte eine mosaikartige Verteilung von CNF und CPF. Es war zum einen ein erhöhter Anteil an CNF von mindestens 10% nachweisbar, zum anderen waren RRF vorhanden. Des Weiteren fanden sich keine histologischen Auffälligkeiten, die für das Vorliegen einer anderen Erkrankung mit hohen Anteilen von CNF wie bspw. eine Myositis (Chariot et al.1996) sprechen.
3. Mithilfe der Long-Range-PCR zeigten sich keine Deletionen in der mtDNA.
4. Die Punktmutation m.3243A>G war nicht nachweisbar.
5. Es wurden bisher keine anderen Mutationen in der mtDNA nachgewiesen.

Bei 21 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen einer Mitochondriopathie wurde zwischen 1994 bis Juli 2013 eine Muskelbiopsie durchgeführt. Insgesamt erfüllten sieben dieser Patienten die oben genannten Kriterien und wurden somit in die Untersuchung eingeschlossen.

Dabei wurden drei Patienten mit dem Phänotyp einer isolierten mitochondrialen Myopathie (IMM) und vier Patienten mit mitochondrialer Myopathie (MM) bei Multisystembeteiligung, von denen ein Patient eine CPEO aufweist, untersucht.

3.1.2 Klinische Fallbeschreibungen

Eine Übersicht über die klinische Charakterisierung aller untersuchten Patienten zeigt Tabelle 4. Die Informationen über die vorliegende Symptomatik wurden aus Arztbriefen und Befunden übernommen. Die Laborparameter Kreatinkinase und Ruhelaktat wurden bei allen Patienten, außer bei Patient 4, zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In der Übersicht ist immer die maximal gemessene Erhöhung des jeweiligen Laborwertes angegeben.

Eine ausführlichere Beschreibung des Phänotyps erfolgt nur von Patienten, bei denen sich im Rahmen dieser Untersuchungen eine neu identifizierte Punktmutation in der mtDNA fand.

Tabelle 4: Klinische Patientencharakterisierung

	Patient (Geschlecht/Alter ¹⁾)	1 (w/69)	2 (w/29)	3 (w/50)	4 (m/1)	5 (w/1)	6 (w/42)	7 (m/42)
Klinik	Myopathie	+	+	+	+	+	+	+
	CPEO	-	-	-	-	-	-	+
	zerebelläre Ataxie	-	-	-	-	-	-	-
	Kardiomyopathie	-	-	-	-	-	-	-
	Hörminderung	k. A.	-	+	-	k. A. ²⁾	-	+
	Diabetes	-	-	-	-	-	+	-
	Epilepsie	-	-	-	-	-	-	-
	schlaganfallähnliche Episoden	-	-	-	-	k. A.	-	-
	Ptoxis	-	+	-	-	+	-	+
	Enzephalopathie	-	-	-	-	+	-	-
	Dysphagie	k. A.	(+)	+	-	+	-	-
	Kopfschmerzen	k. A.	-	+	-	-	-	k. A.
	Retinopathie	k. A.	-	-	-	k. A.	-	-
Diagnose		isolierte MM	isolierte MM	MM mit Multisystembeteiligung	isolierte MM	MM mit Multisystembeteiligung	MM mit Multisystembeteiligung	CPEO
<i>Laborparameter</i>	Kreatininkinase	1,1-fach erhöht	1,6-fach erhöht	6,3-fach erhöht	n. d.	2,1-fach erhöht	6,6-fach erhöht	3,2-fach erhöht
	Ruhelaktat im Plasma¹	1,04-fach erhöht	normwertig	normwertig	1,8-fach erhöht	1,1-fach erhöht	n. d.	1,4-fach erhöht
Familienanamnese		/	Mutter Gleichgewichts- störung und Polyneuro- pathie	Mutter Demenz und (Alters-) Schwerhörig- keit	Mutter leichte Ptoxis	/	/	Mutter Dysphagie, Vater und Tante Ptoxis und Doppelbilder

¹⁾ Alter zum Zeitpunkt des Ausbruches der Erkrankung²⁾ aufgrund fehlender Compliance nicht prüfbarLegende:

/ keine Muskelerkrankungen oder typische mitochondriale Symptome

(+) minimale Symptome

Patient 1

Klinisch besteht bei der 82-jährigen Frau seit dem 70. Lebensjahr eine progressive Schwäche im Bereich der Schultergürtel- und Beckengürtelmuskulatur mit proximal betonten Paresen. Drei Jahre später zeigte sich zudem eine progrediente, proximal betonte Schwäche der Arme. Es ist keine extramuskuläre mitochondriale Symptomatik nachweisbar. Eine Ptosis oder Ophthalmoplegie ist nicht vorhanden.

Die Familienanamnese ist bezüglich Muskelerkrankungen unauffällig.

Der Ruhelaktatwert lag mit 2,9 mmol/l (normal: < 2,8) knapp oberhalb des Normbereiches. Die Kreatinkinase war mit 2,7 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$ (normal: < 2,4) leicht erhöht.

In der neurologisch-orientierten Untersuchung im Alter von 74 Jahren zeigten sich eine Hypomimie der Gesichtsmuskulatur sowie eine ausgeprägte Dysarthrie. Zudem ließen sich eine Ellenbeugenparese mit Kraftgrad (KG) 3/5, eine Oberarmabduktionsparese mit KG 4/5, eine Oberarmadduktionsparese mit KG 4-5/5 und eine Hüftbeugeparese beidseits mit KG 4/5 nachweisen. Sensibilitätsstörungen bestanden nicht. Die Muskeleigenreflexe waren schwach auslösbar bis nicht erhältlich. Der Babinski-Reflex zeigte sich beidseits negativ.

In der im Alter von 74 Jahren durchgeführten Echokardiographie zeigten sich keine Hinweise hämodynamisch wirksamer Klappenvitien. Alle vier Herzhöhlen waren normal dimensioniert. Hinweise auf Wandbewegungsstörungen oder Narben fanden sich ebenfalls nicht.

In der Elektroenzephalographie waren keine Allgemeinveränderungen und keine Zeichen zerebraler Erregungssteigerung nachweisbar.

Die Elektromyographie (EMG) des Musculus deltoideus und Musculus biceps brachii rechts erbrachte den Nachweis von pathologischer Spontanaktivität mit positiven Wellen, Faszikulationen und Fibrillationen sowie kleine polyphasische Potentiale. Dieser Befund ist am ehesten mit einem myopathischen Gewebssyndrom vereinbar.

Patient 2

Patient 2 ist eine 42-jährige Frau, die seit dem 30. Lebensjahr über eine progressive Schwäche zunächst der Hände und nachfolgend auch der Arme und Beine klagt. Inzwischen ist sie nicht mehr selbstständig mobil und benötigt einen Rollstuhl. Zudem besteht eine leichte symmetrische Ptosis ohne Augenmuskelschwäche. Extramuskuläre mitochondriale Symptome wie z. B. Diabetes, Epilepsie oder Kardiomyopathie liegen nicht vor. Die Patientin hat aufgrund ihrer Muskelschwäche und damit verbundenen Einschränkungen mittlerweile die Pflegestufe 2 erhalten.

Die Mutter der Patientin ist gesund und es sind keine Muskelerkrankungen innerhalb der Familie bekannt. Geschwister und Kinder hat die Patientin nicht.

Der Ruhelaktatwert lag mit 2,0 mmol/l (normal: < 2,8) im Normbereich.

Die Kreatinkinase war mit 3,9 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$ (normal: < 2,4) erhöht.

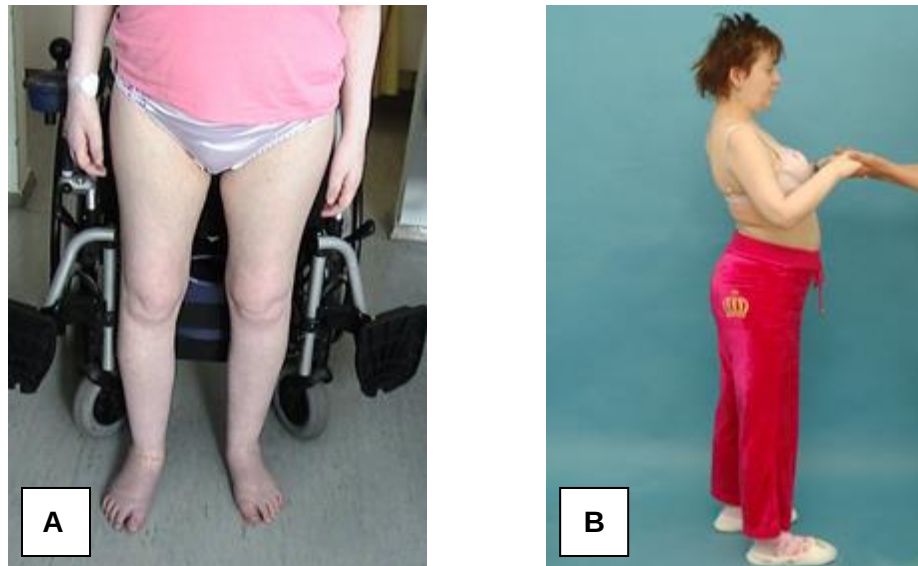


Abbildung 4: zeigt Patient 2 im Alter von 32 (A) und 38 Jahren (B) mit deutlicher Muskelatrophie an den Beinen und Armen. Der Stand ist nur durch Ausgleich mit einer lumbalen Hyperlordose und Unterstützung durch Festhalten möglich.

In der neurologisch-orientierten Untersuchung im Alter von 40 Jahren ließ sich eine schlaffe Tetraparese, an den Armen mit KG 2-3/5, an den Beinen proximal mit KG 2-3/5 und distal mit KG 4/5, nachweisen. Die Muskeleigenreflexe waren nur schwach auslösbar. Sensorische Ausfälle zeigten sich nicht. Der Muskeltonus und Babinski-Reflex stellten sich normal dar. Neben einer intakten Okulomotorik bestanden keine Doppelbilder und kein Nystagmus. Der Stand konnte nur mit Unterstützung durchgeführt werden. Die Sprache war normal und das Schlucken gut. In einer HNO-ärztlichen Untersuchung wurde jedoch der Verdacht einer möglicherweise beginnenden Dysphagie geäußert.

Die folgenden Untersuchungsergebnisse wurden im Alter von 38 Jahren der Patientin erhoben.

Die EMG der Musculi biceps brachii und des Musculus vastus medialis rechts zeigten ausgeprägte myopathische Veränderungen, teils mit pathologischer Spontanaktivität.

Die Elektroneurographie (ENG) des Nervus suralis links und der Nervi tibiales ergab einen Normalbefund.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) der Oberschenkel zeigte eine ausgeprägte, seitengleiche, fettige Degeneration aller Muskelgruppen mit teilweise nur noch einzeln abgrenzbaren Muskelfasern. Am stärksten betroffen waren der Musculus vastus lateralis, der Musculus biceps femoris Caput longum und der Musculus semimembranosus beidseits. Ödematöse Veränderungen fanden sich nicht.

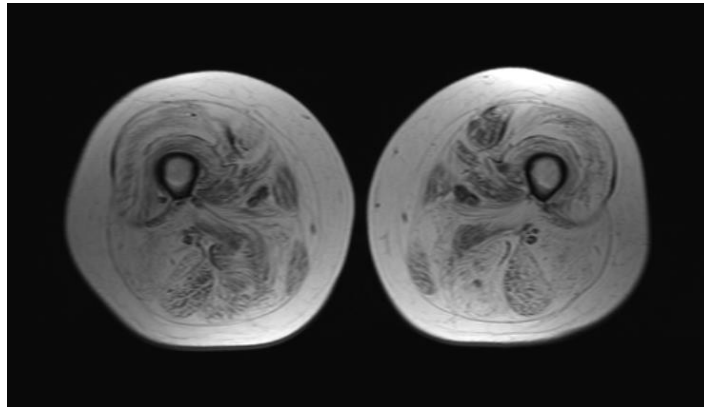


Abbildung 5: Die MRT der Oberschenkel von Patient 2 zeigt nur noch einzeln abgrenzbare Muskelfasern.

In der transthorakalen Echokardiographie zeigte sich eine normale systolische linksventrikuläre Funktion und eine diastolische Dysfunktion Stadium 3. Ein relevantes Vitium ließ sich nicht nachweisen.

Die kardiale MRT war altersentsprechend unauffällig.

In der cranialen MRT (cMRT) fand sich kein Hinweis für stattgehabte schlaganfallähnliche Episoden.

Patient 3

Hierbei handelt es sich um eine 53-jährige Frau, die seit dem 51. Lebensjahr über eine Muskelschwäche in den Armen und Beinen mit intermittierenden Schmerzen im Rücken und im rechten Oberschenkel klagt. Es ist anzunehmen, dass die Symptomatik seit einigen Jahren progredient ist. Dies ist jedoch aufgrund von kognitiven Defiziten der Patientin anamnestisch nicht zu erheben.

Es besteht ein beidseitiger Hörverlust. Die Patientin trägt seit über 10 Jahren linksseitig ein Hörgerät. Im Alter von 47 Jahren unterzog sie sich einer Katarakt-Operation auf beiden Augen. Sie leidet zeitweise unter Schluckbeschwerden, besonders nach der Aufnahme von großen Boli und unter Konzentrationsschwäche. Zudem besteht eine spinale Ataxie und eine Polyneuropathie. Kopfschmerzen bestehen anamnestisch seit ca. 10 Jahren, treten aktuell aber nur noch ab und zu ganz leicht auf.

Die Patientin hat aufgrund von kognitiven Defiziten eine Betreuerin und die Pflegestufe 1 erhalten.

Die Familiengeschichte ist in Bezug auf Muskelerkrankungen unauffällig. Die Mutter entwickelte im Alter von ca. 74 Jahren eine Demenz. Zudem liegt eine Altersschwerhörigkeit vor. Die 24 Jahre alte Tochter der Patientin ist gesund.

Es fanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Untersuchungen des Laktats und der Kreatinkinase im Blut statt. Der Ruhelaktatwert lag maximal bei 2,3 mmol/l (normal: < 2,2 mmol/l). Beim Fahrrad-Belastungstest im Alter von 51 Jahren zeigte sich ein grenzwertig pathologischer Laktatanstieg auf 3,9 mmol/l nach 10 Minuten Belastung mit 30 Watt. Der höchste gemessene Wert der Kreatinkinase betrug 15,2 $\mu\text{mol/l}\cdot\text{s}$ (normal: < 2,4), was für eine deutliche Erhöhung spricht.

Der neurologisch-orientierte Untersuchungsbefund im Alter von 51 Jahren ergab eine dysarthrische Sprache und psychomotorische Verlangsamung mit leichten Konzentrationsstörungen und reduzierter Auffassung. Eine Ptosis, Ophthalmoplegie, Doppelbildwahrnehmungen und Nystagmus zeigten sich nicht. Es ließen sich proximal betonte Paresen mit KG 4/5 nachweisen. Die Patientin hat Hammerzehen und Hohlfüße beidseits. Der Muskeltonus war normal, die Muskelkraft insgesamt aber abgeschwächt. Es zeigte sich eine hypotrophe Muskulatur ubiquitär. Eine Störung der Oberflächensensibilität und des Lagesinnes bestanden nicht. Es ließen sich jedoch Pallhypästhesie an der distalen unteren Extremität nachweisen. Die Armeigenreflexe zeigten sich seitengleich lebhaft mit verbreiteter Reflexzone. Die Beineigenreflexe waren ebenfalls seitengleich lebhaft auslösbar. Es bestand beidseits ein erschöpflicher Fußklonus. Pyramidenbahnzeichen fanden sich nicht.

Der Seiltänzerengang war unsicher, der Romberg zeigte sich mit Standverlust und der Unterberger-Tretversuch war aufgrund von starker ungerichteter Fallneigung nicht möglich. Beidseits wurden der Finger-Nase-Versuch sicher und der Knie-Hacke-Versuch leicht verlangsamt durchgeführt. Es zeigte sich beidseits eine leichte Bradydysdiadochokinese.

Die Echokardiographie im 51. Lebensjahr zeigte normal große Herzhöhlen. Der linke Ventrikel stellte sich normalwandig und normokinetisch dar. Die Ejektionsfraktion betrug 70%. Es ließen sich keine diastolischen Funktionsstörungen des linken Ventrikels und kein relevantes Vitium darstellen.

Im 52. Lebensjahr ließ sich in der EMG des Musculus brachioradialis links ein myopathisches Muster nachweisen.

Die im Alter von 50 Jahren durchgeführte ENG des Nervus medianus, Nervus ulnaris und Nervus tibialis zeigte eine deutliche und beinbetonte demyelinisierende und axonale sensomotorische Polyneuropathie. Im Alter von 51 Jahren fand sich in der ENG der Nervi tibialis beidseits der Hinweis auf eine gemischte motorische Neuropathie.

Die sensorisch evozierten Potentiale des Nervus ulnaris waren normal.

Die ophthalmologische Untersuchung im Alter von 50 Jahren zeigte eine stattgehabte Katarakt-Operation mit Pseudophakie beidseits. Es ließen sich ein Astigmatismus myopikus compositus rechts und eine Presbyopie nachweisen. Es fand sich kein Anhalt für eine Retinitis pigmentosa.

In der im 51. Lebensjahr durchgeführten otologischen Untersuchung stellte sich eine bilaterale Innenohrschwerhörigkeit dar.

Die cMRT im Alter von 50 Jahren zeigte eine ausgeprägte generalisierte Hirnvolumenminderung, sowohl vom Großhirn als auch vom Kleinhirn. Zudem fanden sich mehrere vornehmlich subkortikal bis paraventrikulär lokalisierte Marklagerläsionen, die keine Kontrastmittelanreicherung aufwiesen. Des Weiteren zeigten sich noch zwei ähnliche Läsionen im Ponsbereich.

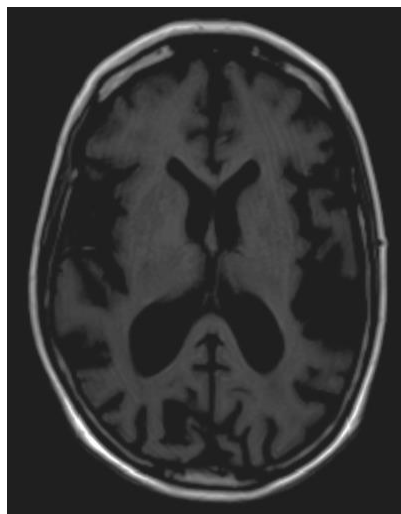


Abbildung 6: Die cMRT von Patient 3 zeigt eine generalisierte Hirnvolumenminderung.

3.1.3 Histologische Vorbefunde

Bei allen sieben Patienten wurde die Verdachtsdiagnose einer Mitochondriopathie gestellt und aus diagnostischen Gründen eine Muskelbiopsie durchgeführt.

Anschließend wurden am gefrorenen Muskelpräparat eine GT-Färbung zum Nachweis von RRF (Rifai et al. 1995) und eine COX/SDH-Färbung zur Untersuchung von CNF durchgeführt.

Die Patienten zeigten einen erhöhten Anteil an CNF im Muskelpräparat. Zudem ließen sich bei allen Patienten RRF nachweisen.

Tabelle 5: Histologische Charakterisierung der Patienten

Patient	CNF + CIF	RRF + SMA
Patient 1	40 %	5 %
Patient 2	33 %	2 %
Patient 3	44 %	5 %
Patient 4	55 %	40 %
Patient 5	81 %	10 %
Patient 6	41 %	9 %
Patient 7	10 %	2 %

Die kombinierte sequentielle COX/SDH-Färbung ermöglicht die Unterscheidung von CNF und CPF in einem Muskelpräparat. Dabei färben sich die CNF blau an, während die CPF an der braunen Farbe zu erkennen sind (Sciaccio et al. 1994). Es ist ebenfalls möglich, dass sich manche Muskelfasern sowohl braun als auch blau anfärben. Diese bezeichnet man als Cytochrom-c-Oxidase intermediäre Fasern (CIF). In den gefärbten Muskelpräparaten aller Patienten wurden neben der Anzahl an CNF auch die CIF mitgezählt.

Mit Hilfe der GT-Färbung werden die Mitochondrien im Muskelpräparat sichtbar gemacht. Ragged Red Fasern entstehen durch eine abnorme Proliferation dieser Zellorganellen. Die Akkumulation der Mitochondrien, das sarkoplasmatische Retikulum und das Sarkolemm zeigen sich in dieser Färbung rot, die Myofibrillen grün und der Kern rot bis rosa (Engel and Cunningham 1963). Eine typische RRF, die für eine massive Mitochondrienakkumulation steht, weist eine starke Rotfärbung und zudem eine zerrissene Struktur der Zelle auf. Wenn die Muskelfaser nur an den Rändern rot gefärbt ist und dazu eine glatte Struktur zeigt, spricht man von einer subsarkolemmalen Mitochondrienakkumulation (SMA). Auch diese Veränderungen wurden, falls vorhanden, bei den Patienten in die Zählung mit einbezogen.

Die Abbildungen 7 bis 12 zeigen die COX/SDH- und GT-Färbung von Patient 1 bis 3 mit Darstellung der entsprechenden Fasern in 5 bis 10-facher Vergrößerung.

Patient 1

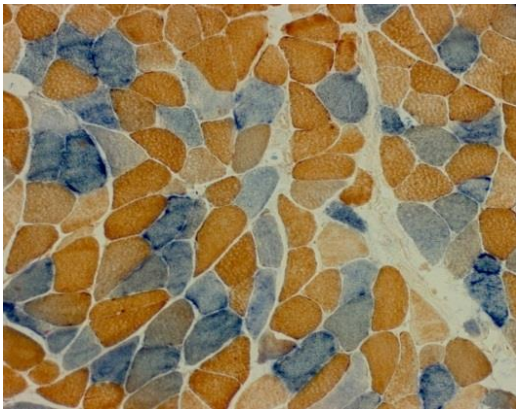


Abbildung 7: COX/SDH-Färbung (10x).

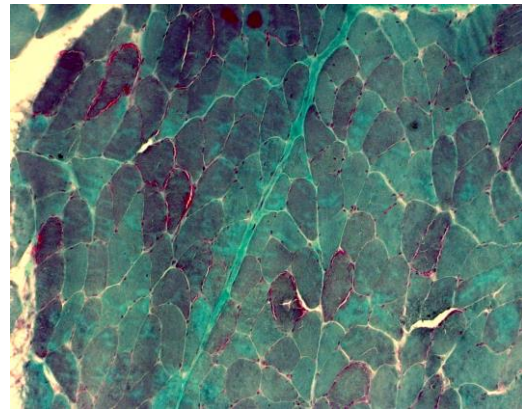


Abbildung 8: GT-Färbung (10x).

Patient 2

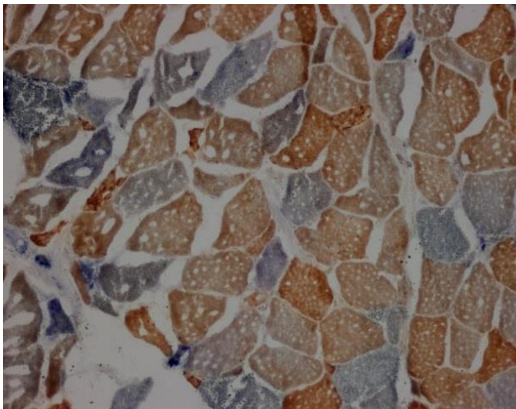


Abbildung 9: COX/SDH-Färbung (10x).

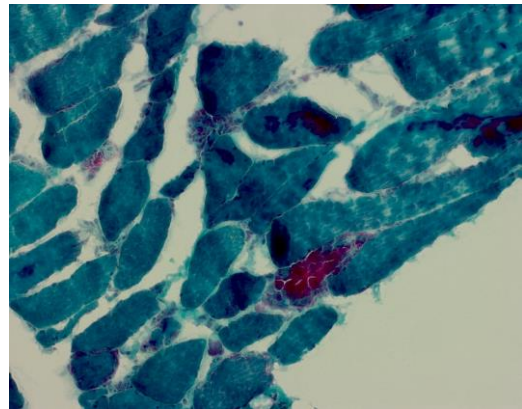


Abbildung 10: GT-Färbung (10x).

Patient 3

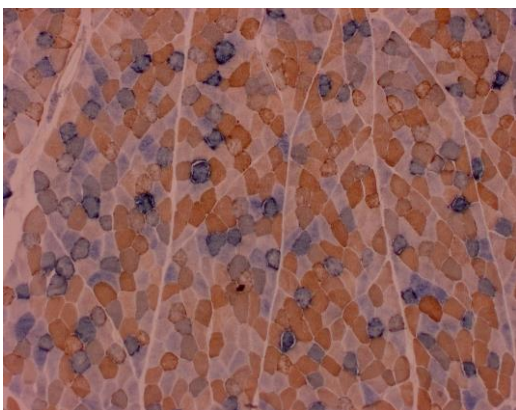


Abbildung 11: COX/SDH-Färbung (5x).

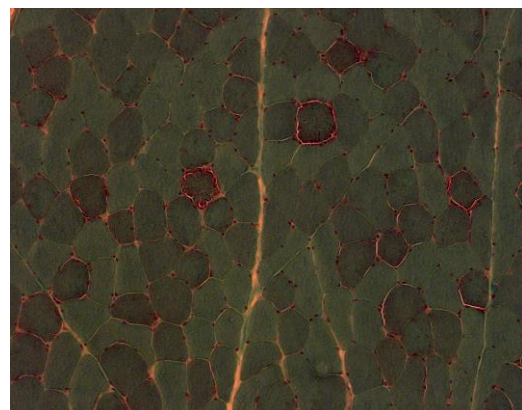


Abbildung 12: GT-Färbung (10x).

3.1.4 Biochemische Vorbefunde

Biochemisch wurde eine Messung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe mittels Spektrophotometrie durchgeführt (Gellerich et al. 2002).

Bei Patient 1 ließ sich eine verminderte Aktivität der Atmungskettenkomplexe I und IV mit kompensatorisch erhöhter Aktivität der Citratsynthase nachweisen. Patient 2 zeigte eine verringerte Aktivität der Atmungskettenkomplexe I, II/III und IV. Zudem bestand ebenfalls eine kompensatorische Erhöhung der Citratsynthaseaktivität.

Allein eine verminderte Aktivität des Atmungskettenkomplexes IV ohne kompensatorische Aktivitätssteigerung fand sich bei Patient 3.

Die Ergebnisse der Patienten 1 bis 5 können Tabelle 6 entnommen werden. Bei den übrigen zwei Patienten lagen keine biochemischen Analysen über die Aktivität der Atmungskettenkomplexe vor.

Tabelle 6: Biochemische Charakterisierung der Patienten

Enzym Patient	Atmungskettenkomplexe								
	Enzymaktivität [U/g Gewebe]				Enzymaktivität [U/g NCP]				Citratsynthase [U/g Gewebe]
	I	II	II+III	IV	I	II	II+III	IV	
1	↓ (8,6 % < NB)	n. d.	normal	↓ (49,6 % < NB)	↓ (10,9 % < NB)	n. d.	normal	↓ (17,8 % < NB)	↑ (7,9 % > NB)
2	↓ (55,7 % < NB)	normal	↓ (71,4 % < NB)	↓ (65,6 % < NB)	↓ (38,7 % < NB)	↑ (26,7 % > NB)	↓ (62,5 % < NB)	↓ (48,5 % < NB)	↑ (43,0 % > NB)
3	normal	n. d.	normal	↓ (64,4 % < NB)	↑ (84,9 % > NB)	n. d.	normal	↓ (46,0 % < NB)	normal
4	normal	↑ (111,1 % > NB)	normal	↓ (75,6 % < NB)	normal	↑ (134,8 % > NB)	normal	↓ (60,7 % < NB)	↑ (190,2 % > NB)
5	normal	↑ (68,6 % > NB)	↓ (78,6 % < NB)	↓ (53,9 % < NB)	normal	↑ (130,7 % > NB)	↓ (71,5 % < NB)	↓ (29,9 % < NB)	↑ (167,0 % > NB)
6	nicht durchgeführt								
7	nicht durchgeführt								

Legende:

< NB: unterhalb des Normbereiches (↓)

> NB: oberhalb des Normbereiches (↑)

3.1.5 Molekulargenetische Vorbefunde

Es fanden molekulargenetische Untersuchungen zum Ausschluss häufiger Veränderungen im Rahmen von Mitochondriopathien statt. Die Mutation m.3243A>G (Yamamoto 1996) konnte bei keinem der Patienten nachgewiesen werden.

Zum Ausschluss von multiplen Deletionen der mtDNA wurde eine Long-Range-PCR durchgeführt (Deschauer et al. 2003). Diese führte ebenfalls zu keinem Nachweis von molekulargenetischen Veränderungen bei allen sieben Patienten.

3.2 Material

3.2.1 DNA-Extraktion

DNA-Extraktionskits: GeneMatrix Tissue DNA Purification Kit (50), Roboklon (EURx Ltd. Polen); peqGOLD MicroSpin Tissue DNA Kit, PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen); QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50), QIAGEN GmbH (Hilden); QIAamp DNA Blood Midi Kit (100), QIAGEN GmbH (Hilden).

Lysis Puffer A, SDS-Puffer (20%), Proteinase K (10%), SE-Puffer, 5M Natriumchlorid, reiner Alkohol, Alkohol (70%), TE-Puffer.

3.2.2 Amplifikation und Sequenzierung der mtDNA

PCR Primers (Invitrogen), dNTP Mix, PCR-Puffer (Qiagen), Taq Polymerase (Qiagen), Q-Solution (Qiagen), Ampuwa® (Fresenius Kabi Deutschland GmbH), Agarosepulver (PeqGOLD Universal-Agarose), 6 x DNA Loading Dye (Fermentas), DNA Marker 100 (Fermentas), Ethidiumbromid, GeneJet PCR Purification Kit (Fermentas), Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), HPLC-Wasser (Fluka), 125mM EDTA (pH 8,0), 3M Natriumacetat (pH 5,2), Ethanol (96%), Ethanol (70%).

PCR Cycler: Eppendorf Mastercycler Gradient und Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400.

Zentrifuge: Biofuge Fresco, Heraeus.

Agarose-Gelkammer: Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH.

3.2.3 PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen

PCR Primers (Invitrogen): Mito 7539C>T, Mito 5610G>A, Mismatch-Primer Mito 5631G>A (siehe Tabelle 13). Restriktionsenzym LweI (SfaNI) (Fermentas), Restriktionsenzym BlnI (BioLabs), Restriktionsenzym AatI (PstI) (Thermo Scientific), Restriktionsenzym StuI (BioLabs), Ampuwa® (Fresenius Kabi Deutschland GmbH), 6 x DNA Loading Dye (Fermentas), DNA Marker 100 (Fermentas), DNA Marker 50 (Fermentas), DNA Marker 25-700 bp (Fermentas), Agarosepulver (PeqGOLD Universal-Agarose), 1x TAE Puffer, 10x TBE Puffer, Aquadest, Acrylamidgel 40 (Carl Roth GmbH), TEMED (Carl Roth GmbH), 10% APS, Ethidiumbromid.

Gelanalyse-Software: Gene Tools, version 3.05.03 (Syngene, Synoptics Ltd, USA).

PCR Cycler: Eppendorf Mastercycler Gradient und Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400.

Agarose-Gelkammer: Angewandte Gentechnologische Systeme GmbH.

Polyacrylamid-Gelkammer: Model 45-1614, PeqLab, Biotechnologie GmbH.

3.3 Methodik

3.3.1 DNA-Extraktion

Bei allen sieben Patienten wurde DNA aus dem Muskelgewebe gewonnen. Von den Patienten 1, 2, 3 und 5 wurde zudem DNA aus EDTA-Blut und bei den Patienten 2, 3 und 5 zusätzlich DNA aus Mundschleimhautepithelzellen, Urothelzellen und Haarwurzelzellen extrahiert.

Außerdem erfolgten die Präparation von DNA aus EDTA-Blut von sieben Familienmitgliedern von Patient 1 sowie die Gewinnung von DNA aus EDTA-Blut, Urothelzellen und Mundschleimhautepithelzellen von den Müttern von Patient 2 und 5. Von der Mutter von Patient 5 konnte zusätzlich DNA aus Haarwurzelzellen extrahiert werden.

Tabelle 7 gibt an, welches DNA-Extraktionskit jeweils für die Präparation verwendet wurde.

Tabelle 7: Übersicht über die DNA-Extraktion

Person	Gewebe	Extraktionskit	Datum der Präparation
Patient 1	Muskel	Qiagen-Tissue	20.04.2007
	Blut	Qiagen-Blood	20.07.2011
Familie von Patient 1	Blut	Qiagen-Blood	19.09.2013
Patient 2	Muskel	Qiagen-Tissue	04.11.2005/08.11.2006
	Blut	Qiagen-Blood	20.06.2011
	Urothel	PeqLab	21.06.2011
	Mundschleimhautepithel	PeqLab	21.06.2011
	Haarwurzel	PeqLab	21.06.2011
Mutter von Patient 2	Blut	Qiagen-Blood	20.06.2011
	Urothel	PeqLab	21.06.2011
	Mundschleimhautepithel	PeqLab	21.06.2011
Patient 3	Muskel	Roboklon	20.09.2012
	Blut	Qiagen-Blood	25.06.2012
	Urothel	PeqLab	12.11.2013
	Mundschleimhautepithel	PeqLab	12.11.2013
	Haarwurzel	PeqLab	12.11.2013
Patient 4	Muskel	Roboklon	21.06.2011
Patient 5	Muskel	Qiagen-Tissue	04.04.2000
	Blut	PeqLab	26.01.2012
	Urothel	PeqLab	26.01.2012
	Mundschleimhautepithel	PeqLab	26.01.2012
	Haarwurzel	PeqLab	26.01.2012
Mutter von Patient 5	Blut	PeqLab	26.01.2012
	Urothel	PeqLab	26.01.2012
	Mundschleimhautepithel	PeqLab	26.01.2012
	Haarwurzel	PeqLab	26.01.2012
Patient 6	Muskel	Qiagen-Tissue	12.11.2008
Patient 7	Muskel	Roboklon	21.07.2011
Kontrolle 1	Muskel	Qiagen-Tissue	04.11.2005
Kontrolle 2	Muskel	Qiagen-Tissue	30.08.2007

3.3.2 Amplifikation und Sequenzierung der mtDNA

Durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte die Amplifikation des gesamten mitochondrialen Genoms unter Verwendung von 28 überlappenden Primerpaaren (Tabelle 8) ohne Hinzufügen der M13-Sequenz (Taylor et al. 2001). Die Größe dieser 28 DNA-Fragmente variiert von 446-739 Basenpaaren (bp). Die amplifizierten Fragmente ergaben insgesamt eine Größe von 18757 bp. Das sind 13,2% mehr als die Größe der mt-DNA mit 16569 bp, was durch die überlappenden Regionen zu erklären ist.

Tabelle 8: Primerpaare der Sequenzierungs-PCR (Taylor et al. 2001)

<i>Vorwärts-Primer</i>	<i>Nukleotid-positionen</i>	<i>Rückwärts-Primer</i>	<i>Nukleotid-positionen</i>	<i>Produktlänge (bp)</i>
1F	516-534	1R	1190-1172	675
2F	1138-1156	2R	1801-1782	664
3F	1756-1776	3R	2444-2426	689
4F	2395-2415	4R	3074-3054	680
5F	2995-3013	5R	3645-3627	651
6F	3536-3553	6R	4239-4219	704
7F	4184-4202	7R	4869-4852	686
8F	4832-4849	8R	5570-5551	739
9F	5526-5545	9R	6188-6171	663
10F	6115-6134	10R	6781-6761	667
11F	6730-6750	11R	7398-7279	669
12F	7349-7369	12R	8009-7990	661
13F	7960-7979	13R	8641-8621	682
14F	8563-8581	14R	9231-9212	669
15F	9181-9198	15R	9867-9848	687
16F	9821-9841	16R	10516-10497	696
17F	10394-10414	17R	11032-11013	639
18F	10985-11004	18R	11708-11689	724
19F	11633-11651	19R	12361-12341	729
20F	12284-12302	20R	13005-12987	722
21F	12951-12969	21R	13614-13595	664
22F	13568-13587	22R	14276-14258	709
23F	14227-14246	23R	14928-14911	702
24F	14732-14752	24R	15419-15400	688
25F	15372-15391	25R	16067-16048	696
D1F	15879-15897	D1R	16545-16526	667
D2F	16495-16514	D2R	389-370	446
D3F	315-332	D3R	803-786	489

Das PCR-Protokoll und das Temperaturprofil wurden nach Taylor et al. 2001 modifiziert.

PCR-Protokoll:

2,0 µl DNA
 2,5 µl Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
 2,5 µl Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
 2,5 µl PCR-Puffer
 0,5 µl dNTP (0,4 mM)
 9,8 µl H₂O (Ampuwa®)
 0,2 µl Taq-Polymerase
 5,0 µl Q-Solution

Temperaturprofil

		35 Zyklen				
Temperatur (°C)	95	94	60	72	72	4
Zeit	10 Min.	45 Sek.	55 Sek.	1 Min.	10 Min.	∞

Unter Verwendung von 2%-igen Agarose-Gelen (Tabelle 9) wurden die DNA-Amplifikate kontrolliert und anschließend unter Verwendung des GeneJet PCR Purification Kits gereinigt.

Tabelle 9: Herstellung 2%-iges Agarose-Gel

Material	Menge
Agarose	3,0 g
1x TAE Puffer	150 ml
Die Materialien gut mischen und für 4 Minuten erhitzen.	

Aufreinigung mit GeneJet PCR Purification Kit:

20 µl PCR-Produkt
 20 µl Bindungspuffer
 700 µl Waschpuffer
 30 µl Elutionspuffer

PCR-Produkt und Bindungspuffer wurden auf die GeneJet Säule pipettiert und anschließend mit 12000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Alle Vorgänge liefen bei Raumtemperatur ab. Anschließend wurde der Waschpuffer hinzugegeben und erneut unter den gleichen Bedingungen eine Zentrifugation durchgeführt. Danach erfolgte das Abgießen des Überstandes und die Säule wurde mit 13000 U/min für 1 Minute trocken

zentrifugiert. Nun erfolgte das Einsetzen der Säule in ein 1,5 ml Tube und das Hinzufügen des Elutionspuffers. Abschließend wurde eine Zentrifugation bei 10000 U/min für 1 Minute durchgeführt. Das Tube wurde bis zum Ansatz der Sequenzierungs-PCR bei 4°C gelagert.

Danach wurde eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt, wobei entweder ein Primer für die Vorwärts- oder die Rückwärtssequenz des jeweiligen Fragmentes verwendet wurde. Welche Fragmente jeweils sequenziert wurden, ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Sequenzierte Fragmente aller Patienten

Patient	Fragmente vorwärts	Fragmente rückwärts
1	1-25 D1-D3	2-4, 7-16,18-19, 25, D3
2	1-25 D1-D3	2-4, 7-13, 15, 19, 25
3	1-25 D1-D3	3, 8, 12-14, 16-21, 25, D2-D3
4	1-25 D1-D3	2, 4, 6, 8-13, 15-16, 18-19, 21-23, 25
5	1-25 D1-D3	2, 4, 7-13, 15-16, 18-19, 22, 25
6	1-25 D1-D3	1-4, 8-9, 11-13, 16, 21-22, 25, D2
7	1-25 D1-D3	8-11, 15, 18, 22-23, D3

Protokoll Sequenzierungs-PCR:

2,0 µl amplifizierte und vorgereinigte DNA

0,5 µl Vorwärtsprimer oder Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)

1,0 µl 5 x Puffer

4,5 µl H₂O (Ampuwa®)

2,0 µl Big Dye Terminator v.1.1

Temperaturprofil

		25 Zyklen			
Temperatur (°C)	96	96	50	60	4
Zeit	1 Min.	10 Sek.	5 Sek.	4 Min.	∞

Anschließend wurde die DNA nach folgendem Protokoll gereinigt:

- 10 µl Sequenzierungs-PCR-Produkt
- 37 µl HPLC-Wasser
- 5 µl 125mM EDTA (pH 8,0)
- 8 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2)
- 125 µl Ethanol (96%)

Der Ansatz wurde hergestellt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 6000 U/min bei 4°C für 30 Minuten. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und 150 µl 70%-iger Ethanol auf das Pellet gegeben. Dann erfolgte die Zentrifugation des Ansatzes mit 4600 U/min bei 4°C für 15 Minuten. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das Pellet über Nacht an der Luft getrocknet.

Das Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg übernahm die nachfolgenden Schritte:

- Lösen des Pellets in 12 µl Formamid (Applied Biosystems), 10 Sek. vortexen, 10 Min. stehen lassen und anschließend 3 Sek. zentrifugieren
- Auftragen der Proben auf 96-Well-Mikrotiterplatten
- Analyse der Proben mit dem Kapillarsequenzier (16 Kapillaren, 50 cm Länge) Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems) bei 60°C und 8500 V für 2,5 Stunden unter Verwendung des POP-7 Polymers (Applied Biosystems)
- die Sammlung der Rohdaten vom Laser erfolgte mit dem Programm Foundation Data Collection Version 3.1.1.
- Analyseprogramm zur Verarbeitung der Rohdaten: Sequencing Analysis v.5.4 (Applied Biosystems).

Abschließend erfolgte anhand von Elektropherogrammen die eigenhändige Überprüfung jeder einzelnen Base auf eine Abweichung von der bekannten mitochondrialen Abfolge hin. Als Vorlage diente dafür die auf MITOMAP zur Verfügung gestellte Revised Cambridge Reference Sequence der menschlichen mtDNA (<http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/HumanMitoSeq>).

3.3.3 PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen

Bei den Patienten 1 bis 3, bei denen eine Punktmutation in der mtDNA gefunden wurde, erfolgte die DNA-Amplifikation im Bereich der Mutation mittels PCR wie oben beschrieben (siehe 3.3.2). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 13 dargestellt. Anschließend wurde eine Restriktionsspaltung vorgenommen, die für jede Punktmutation neu konzipiert werden musste. Die einzelnen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) -Analysen sind ebenfalls in Tabelle 13 zusammengefasst.

Zunächst erfolgte die Herstellung des jeweiligen Restriktionsspaltungsansatzes.

Tabelle 11: Herstellung der Restriktionsspaltungsansätze

	Patient 1 (m.5610G>A)	Patient 2 (m.5631G>A)	Patient 3 (m.7539C>T)
DNA-Amplifikat	8,0 µl	8,0 µl	8,0 µl
Puffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
Enzym	1,0 µl	0,75 µl	1,0 µl
H ₂ O (Ampuwa®)	9,0 µl	9,25 µl	9,0 µl

Anschließend wurden die Restriktionsspaltungsansätze über Nacht bei 37°C inkubiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Nach der Restriktionsspaltung wurde die DNA auf 8 oder 12%-igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt.

Tabelle 12: Herstellung Polyacrylamid-Gel

Material	Menge	
	<i>Polyacrylamid 8%</i>	<i>Polyacrylamid 12%</i>
10x TBE Puffer	3,0 ml	3,0 ml
Aquadest	21,0 ml	18,0 ml
Acrylamidgel 40	6,0 ml	9,0 ml
TEMED	12,0 µl	12,0 µl
10% APS	300,0 µl	300,0 µl

Mit Hilfe der Software Gene Tools, Version 3.05.03 (Syngene, Synoptics Ltd, USA) wurde die Breite der einzelnen Banden auf den Gelen gemessen und somit der Heteroplasmiegrad der Punktmutationen in unterschiedlichen Geweben ermittelt.

Tabelle 13: Übersicht über die PCR-RFLP-Analysen von Patient 1 bis 3

	Patient 1 (m.5610G>A)	Patient 2 (m.5631G>A)	Patient 3 (m.7539C>T)
Primernamen	Mito 5610G>A	Mismatch-Primer Mito 5631G>A	Mito 7539C>T
Primersequenzen	Vorwärtsprimersequenz: 5'TTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGC ^{3'} Rückwärtsprimersequenz: 5'TTCTTCGAATTTGCAATTCAA ^{3'}	Vorwärtsprimersequenz: 5'GCATCAACTGAACGCAGCTC ^{3'} Rückwärtsprimersequenz: 5'AAAAAGAGGCCTAACCCCTG ^{3'}	Vorwärtsprimersequenz: 5'CACATTCGAAGAACCCGTAT ^{3'} Rückwärtsprimersequenz: 5'CCTTTTCCTAACACTCACAACAAA ^{3'}
Amplifikationslänge	289 Basenpaare	240 Basenpaare	320 Basenpaare
Restriktionsenzym	LweI (SfaNI)	BlpI	AanI (PstI)
Restriktionssequenz	5'...GCATC(N) ₅ ↓(N) ₄ ... ^{3'}	5'...GC↓TNAGC... ^{3'} Mismatch: 5'...AA↓TNAGC... ^{3'}	5'...TTA↓TAA... ^{3'}
Mutation	5'...ACATC(N) ₅ ↓(N) ₄ ... ^{3'}	5'...AA↓TNAAC... ^{3'}	5'...TTA↓TAA... ^{3'}
Spaltungsprodukte	Wildtyp: 103 bp + 186 bp Mutante: 289 bp	Wildtyp: 18 bp + 19 bp + 53 bp + 150 bp Mutante: 37 bp + 53 bp + 150 bp	Wildtyp: 320 bp Mutante: 129 bp + 191 bp
Gel zur Auftrennung	Polyacrylamid 12%	Polyacrylamid 8%	Polyacrylamid 12%

Bei Patient 5 fand sich eine molekulargenetische Veränderung (m.5839C>T), die zunächst für eine pathogene Mutation gehalten wurde. Darum wurden ebenfalls eine Restriktionsspaltung (Tabelle 14) und eine RFLP-Analyse (Tabelle 15) nach dem gleichen Protokoll wie bei den Patienten 1 bis 3 durchgeführt.

Tabelle 14: Restriktionsspaltungsansatz Patient 5

Material	Menge
DNA-Amplifikat	8,0 µl
Puffer	2,0 µl
Enzym	1,0 µl
H ₂ O (Ampuwa®)	9,0 µl

Tabelle 15: PCR-RFLP-Analyse Patient 5

Primername	Mito 9
Primersequenzen	Vorwärtsprimersequenz: 5'AATACAGACCAAGAGCCTTC ^{3'} Rückwärtsprimersequenz: 5'CCCGATATGGCGTTTCCC ^{3'}
Amplifikatslänge	663 Basenpaare
Restriktionsenzym	StuI
Restriktionssequenz	5'...AGG↓CCT... ^{3'}
Mutation	5'...AGG↓TCT... ^{3'}
Spaltungsprodukte	Wildtyp: 313 bp + 350 bp Mutante: 663 bp
Gel zur Auftrennung	Agarose 2%

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzierung der mtDNA

Bei drei Patienten ergab die Sequenzierung der mtDNA neben einigen Polymorphismen (Tabelle 21 bis 23, im Anhang) das Vorliegen jeweils einer Punktmutation, die bisher in keiner Datenbank (MITOMAP, mt-DB) beschrieben wurden. Jede Mutation wurde in einer Vorwärts- und Rückwärtssequenz bestätigt.

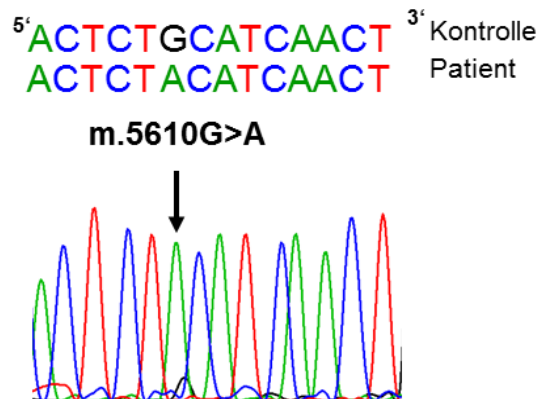


Abbildung 13: Ausschnitt des Elektropherogramms der Vorwärtssequenz von Fragment 9 bei Patient 1 zeigt die Punktmutation m.5610G>A.

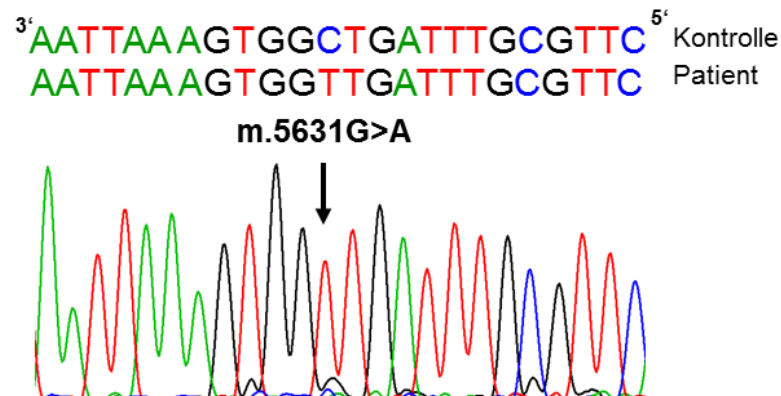


Abbildung 14: Ausschnitt des Elektropherogramms der Rückwärtssequenz von Fragment 9 bei Patient 2 zeigt die Punktmutation m.5631G>A.

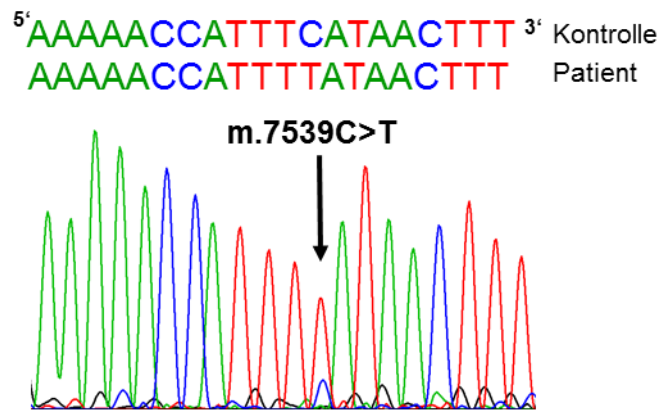


Abbildung 15: Ausschnitt des Elektropherogramms der Vorwärtssequenz von Fragment 12 bei Patient 3 zeigt die Punktmutation m.7539C>T.

Die neu identifizierten Mutationen m.5631G>A und m.5610G>A befinden sich beide im codierenden Teil für die tRNA^{Ala}. Dieses tRNA-Gen ist in der mtDNA durch die Basen an Position 5587-5655 verschlüsselt. Die Punktmutation m.5631G>A liegt im Anticodonstamm und die Punktmutation m.5610G>A im T-Stamm dieser tRNA (Pütz et al. 2007).

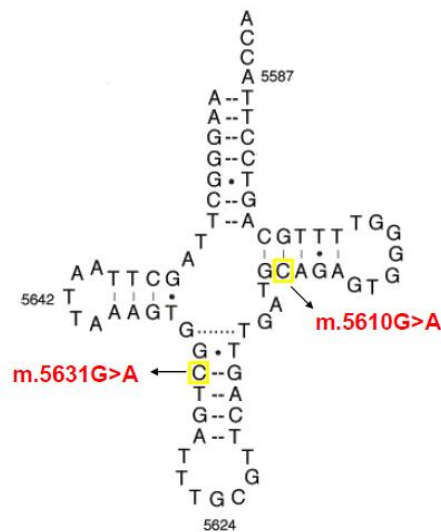


Abbildung 16: Schematische Darstellung der mtDNA-Sequenz für das tRNA^{Ala}-Gen zeigt die Lokalisation der neu identifizierten Punktmutationen m.5610G>A und m.5631G>A (modifiziert nach Mamit-tRNA).

Die Punktmutation m.7539C>T befindet sich im codierenden Bereich für die tRNA^{Asp} (Basen 7518-7585) im D-Stamm (Pütz et al. 2007).

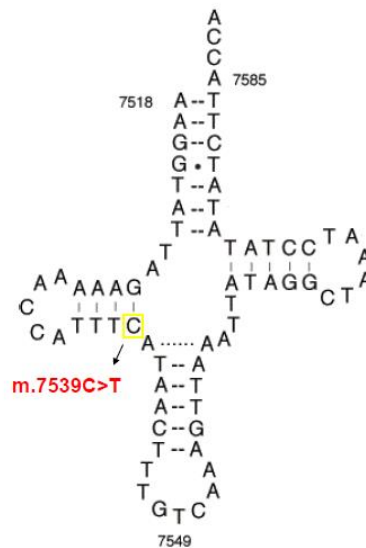


Abbildung 17: Schematische Darstellung der mtDNA-Sequenz für das tRNA^{Asp}-Gen zeigt die Lokalisation der neu identifizierten Punktmutation m.7539C>T (modifiziert nach Mamit-tRNA).

Bei den Patienten 4, 6 und 7 fanden sich ausschließlich Veränderungen, die sich im Abgleich mit den mitochondrialen Datenbanken (MITOMAP, mt-DB) als Polymorphismen herausstellten (Tabelle 24 bis 27, im Anhang).

Bei Patient 5 fand sich u. a. der Basenaustausch m.5839C>T, der zunächst für eine pathogene Mutation gehalten wurde. Diese Veränderung ließ sich in Muskel, Blut-, Urothel-, Haarwurzel- und Mundschleimhautepithelzellen von Patient 5 in Homoplasmie nachweisen und zeigte sich gleichermaßen in allen untersuchten Geweben bei der Mutter. Daraufhin wurde auf weitere Untersuchungen bezüglich einer Pathogenität verzichtet. Zu einem späteren Zeitpunkt war die Mutation m.5839C>T dann auch in den mitochondrialen Datenbanken als Polymorphismus gelistet.

(http://mitomap.org/cgi-bin/print_ref_list?refs=90264,99016;title=Coding+Polymorphism+C-T+at+5839).

4.2 PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen

Zur Überprüfung, ob die drei neu identifizierten Punktmutationen in Heteroplasmie vorliegen, wurden PCR-RFLP-Analysen durchgeführt. Zudem sollte untersucht werden, ob die Mutationen auch bei Familienmitgliedern der Patienten nachzuweisen sind. Sowohl die Mutter als auch die klinisch gesunde Tochter von Patient 3 lehnten eine genetische Untersuchung ab, so dass uns keine Gewebematerialien für eine Analyse zur Verfügung standen. Bei Patient 2 war die Mutter mit einer molekulargenetischen Untersuchung einverstanden und gab Ihre schriftliche Einwilligung zur Verwendung Ihrer DNA aus Blut-, Urothel- und Mundschleimhautepithelzellen zu wissenschaftlichen Analysen. In der Familie von Patient 1 erklärten sich freundlicherweise sieben Familienmitglieder dazu bereit eine Blutprobe zur genetischen Untersuchung abzugeben, wobei das Einverständnis ebenfalls schriftlich dokumentiert wurde. Der nachfolgende Stammbaum stellt die Verwandtschaftsbeziehung der untersuchten Personen in Bezug auf Patient 1 dar.

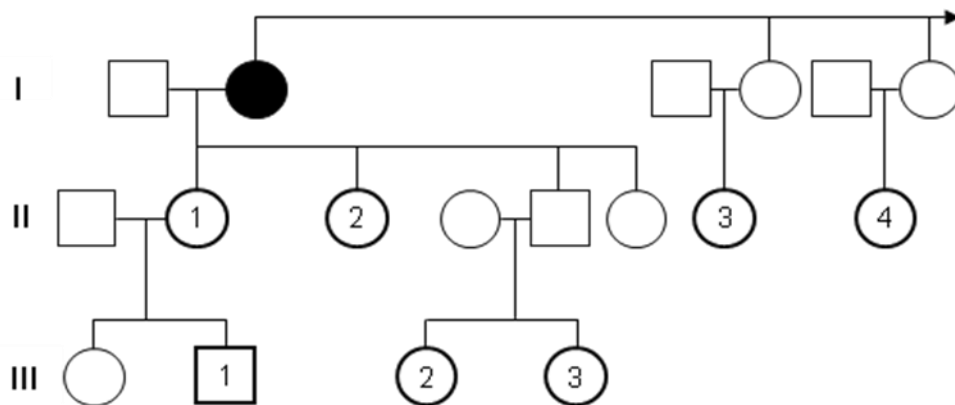


Abbildung 18: Stammbaum von Patient 1 (modifiziert aus Lehmann et al. 2015b).

Mit Hilfe der PCR-RFLP-Analysen (Abbildungen 19 bis 23) konnte bei den Patienten 1 bis 3 sowie bei den untersuchten Familienmitgliedern das gleichzeitige Vorliegen von Mutant- und Wildtyp-DNA in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden.

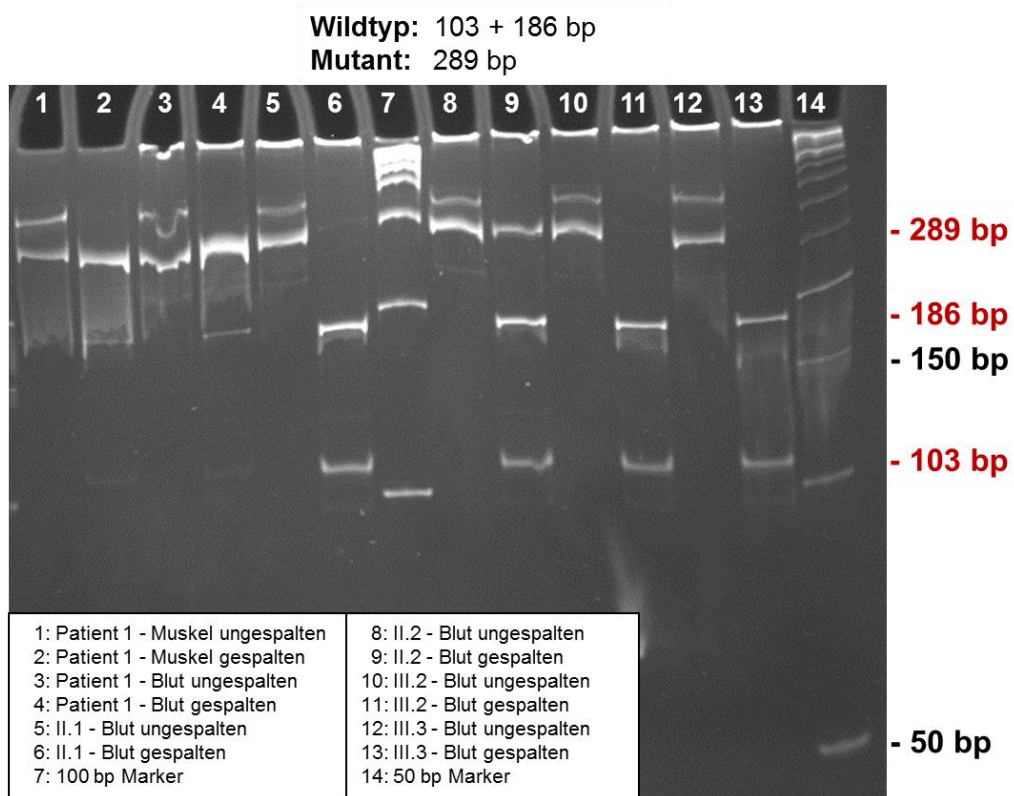


Abbildung 19: Die PCR-RFLP-Analyse zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.5610G>A bei Patient 1 und einem Teil der Familienmitglieder.

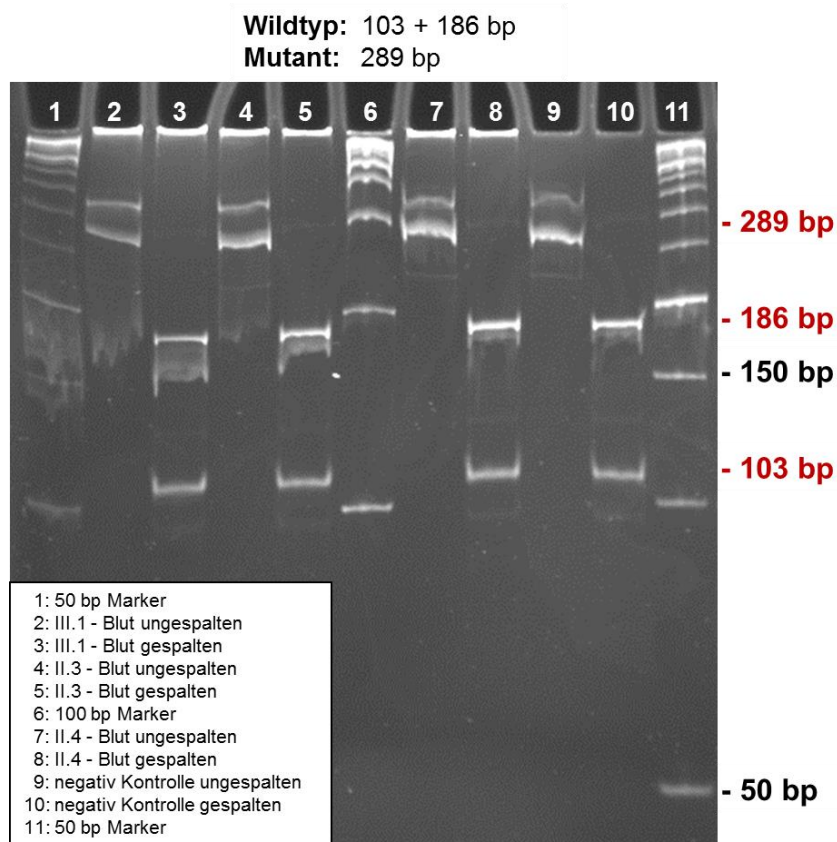


Abbildung 20: Die PCR-RFLP-Analyse zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.5610G>A bei einem Teil der Familienmitglieder von Patient 1.

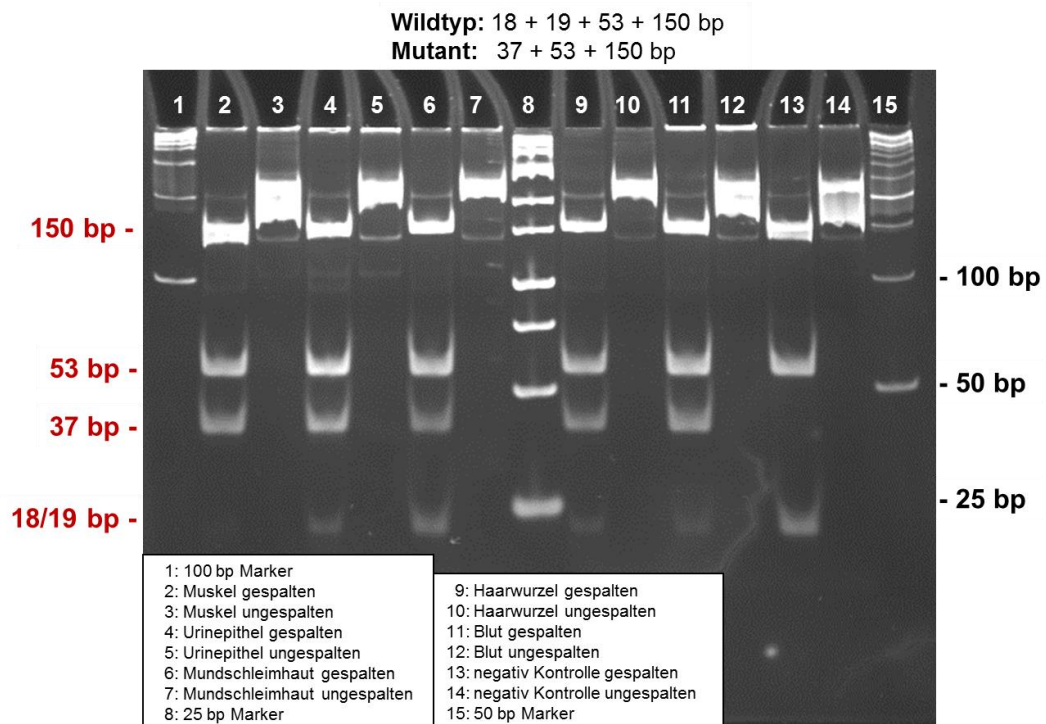


Abbildung 21: Die PCR-RFLP-Analyse zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.5631G>A bei Patient 2.

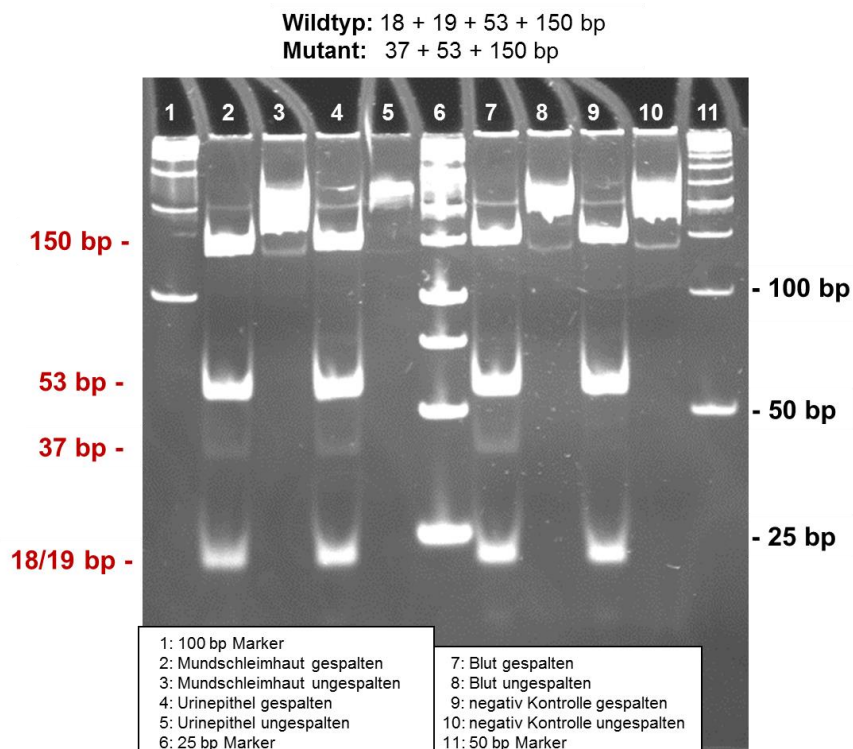


Abbildung 22: Die PCR-RFLP-Analyse zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.5631G>A bei der Mutter von Patient 2.

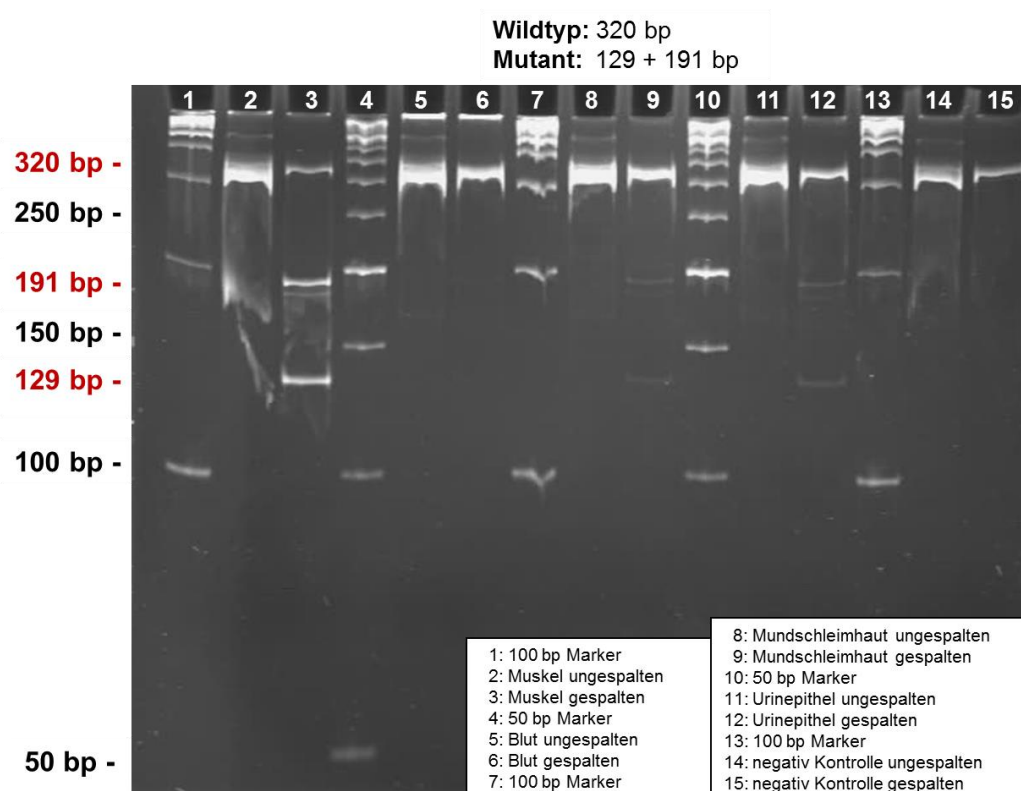


Abbildung 23: Die PCR-RFLP-Analyse zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.7539C>T bei Patient 3

Die PCR-RFLP-Analysen zeigen, dass die drei Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T heteroplasmisch sind.

Mit Hilfe der Gene Tools-Analyse-Software wurde die Breite der einzelnen Banden ausgemessen und so der Heteroplasmiegrad der einzelnen Proben ermittelt (Tabelle 16). Der Anteil mutierter DNA im Muskel ist bei den Patienten 1 bis 3 höher als im Blut und den anderen untersuchten Geweben wie Urothel-, Haarwurzel- und Mundschleimhautepithelzellen. Bei der Mutter von Patient 2 ließ sich die Mutation m.5631G>A in Blut-, Urothel- und Mundschleimhautepithelzellen ebenfalls in Heteroplasmie nachweisen, wobei sie asymptomatisch ist.

Die Familienmitglieder von Patient 1 weisen einen geringeren Anteil mutierter DNA im Blut auf als die Indexpatientin. Zudem waren alle Verwandten zum Zeitpunkt der Blutabnahme im August 2013 asymptomatisch.

Tabelle 16: Ergebnisse der Heteroplasmiebestimmung durch PCR-RFLP-Analyse

Person	Genotyp und Anteil mutierter DNA in %	
<i>Patient 1</i>	m.5610G>A	
	Muskelzellen:	86 %
	Blutzellen:	81 %
	<i>II.1</i>	Blutzellen: 1 %
	<i>II.2</i>	Blutzellen: 28 %
	<i>II.3</i>	Blutzellen: 5 %
	<i>II.4</i>	Blutzellen: 3 %
	<i>III.1</i>	Blutzellen: 1 %
<i>Patient 2</i>	m.5631G>A	
	Muskelzellen:	97 %
	Blutzellen:	85 %
	Urothelzellen:	85 %
	Haarwurzelzellen:	84 %
	Mundschleimhautepithel:	59 %
<i>Mutter von Patient 2</i>	Blutzellen:	21 %
	Urothelzellen:	17 %
	Mundschleimhautepithel:	15 %
<i>Patient 3</i>	m.7539C>T	
	Muskelzellen:	70 %
	Blutzellen:	22 %
	Urothelzellen:	33 %
	Mundschleimhautepithel:	29 %

Die Heteroplasmie der neu identifizierten Punktmutationen in den verschiedenen Geweben der Patienten wurde freundlicherweise zusätzlich im Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research der Universität Newcastle durch Pyrosequenzierung (White et al. 2005) untersucht. Es zeigten sich insgesamt vergleichbare Ergebnisse mit einer maximalen Abweichung von 16% (Tabelle 17).

Tabelle 17: Ergebnisse der Heteroplasmiebestimmung durch PCR-RFLP-Analyse und Pyrosequenzierung

Person	Genotyp PCR-RFLP-Analyse		Genotyp Pyrosequenzierung		maximale Abweichung
<i>Patient 1</i>	m.5610G>A		m.5610G>A		
	Muskelzellen:	86 %	Muskelzellen:	91%	5 %
	Blutzellen:	81 %	Blutzellen:	87 %	6 %
	<i>II.1</i>	Blutzellen:	1 %	0 %	1 %
	<i>II.2</i>	Blutzellen:	28 %	26 %	2 %
	<i>II.3</i>	Blutzellen:	5 %	1 %	4 %
	<i>II.4</i>	Blutzellen:	3 %	1 %	2 %
	<i>III.1</i>	Blutzellen:	1 %	1 %	0 %
<i>III.2</i>	Blutzellen:	0 %	Blutzellen:	0 %	/
<i>III.3</i>	Blutzellen:	0 %	Blutzellen:	0 %	/
<i>Patient 2</i>	m.5631G>A		m.5631G>A		
	Muskelzellen:	97 %	Muskelzellen:	92 %	5 %
	Blutzellen:	85 %	Blutzellen:	77 %	8 %
	Urothelzellen:	85 %	Urothelzellen:	69 %	16 %
	Haarwurzelzellen:	84 %	Haarwurzelzellen:	77 %	7 %
	Mundschleimhautepithel:	59 %	Mundschleimhautepithel:	44 %	15 %
	<i>Mutter von Patient 2</i>	Blutzellen:	21 %	8 %	13 %
		Urothelzellen:	17 %	4 %	13 %
		Mundschleimhautepithel:	15 %	6 %	9 %
<i>Patient 3</i>	m.7539C>T		m.7539C>T		
	Muskelzellen:	70 %	Muskelzellen:	85 %	15 %
	Urothelzellen:	33 %	Urothelzellen:	27 %	6 %
	Mundschleimhautepithel:	29 %	Mundschleimhautepithel:	15 %	14 %
	Blutzellen:	22 %	Blutzellen:	8 %	14 %
	Haarwurzelzellen:	n. d. ¹⁾	Haarwurzelzellen:	10 %	/

¹⁾ nicht durchgeführt aufgrund von zu wenig Probenmaterial

5 Diskussion

5.1 Pathogenitätsnachweis für mt-tRNA-Punktmutationen

Die drei identifizierten Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T waren in den mitochondrialen Datenbanken nicht gelistet und konnten auch in der Literatur nirgends gefunden werden. Das bedeutet, dass sie bisher auch nicht als Einzelnukleotid-Polymorphismen beschrieben sind. Zudem wurden diese Veränderungen in über 980 durchgeführten hausinternen mtDNA Sequenzierungen nicht nachgewiesen.

Daraufhin wurden alle drei Punktmutationen auf ihre Pathogenität hin untersucht.

5.1.1 Heteroplasmie

Einen Hinweis auf die Pathogenität einer mt-tRNA-Punktmutation gibt u. a. der Nachweis von Heteroplasmie (McFarland et al. 2004). Die drei neu identifizierten Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und 7539C>T liegen alle in einer heteroplasmischen Verteilung vor.

Alle drei Patienten weisen in den Muskelzellen einen hohen Anteil mutierter DNA (70-97%) auf. Zudem lässt sich die jeweilige Mutation auch in anderen Geweben wie Blut, Urothel, Haarwurzeln und Mundschleimhautepithel nachweisen. Der höchste Anteil mutierter DNA findet sich aber bei allen Patienten in dem von den Beschwerden beeinträchtigten Muskelgewebe.

Patient 1 und 2 zeigen beide sehr hohe Mutationsanteile in allen untersuchten Geweben. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Schwellenwert für eine Schädigung der oxidativen Phosphorylierung für diese tRNA^{Ala} Mutationen sehr hoch ist. Die Punktmutationen m.5591G>A (Swalwell et al. 2006) und m.5650G>A (McFarland et al. 2008), die ebenfalls innerhalb des tRNA^{Ala}-Gens liegen, weisen ebenfalls einen sehr hohen Schwellenwert auf.

Bei Patient 3 fand sich ein höherer Anteil mutierter DNA in Urothelzellen als im Blut. Dies ist eher untypisch. Der vergleichsweise geringe Anteil mutierter DNA im Blut macht es wahrscheinlich, dass die Mutation sporadisch aufgetreten und nicht maternal vererbt ist (Elson et al. 2009).

Die Mutter von Patient 2 weist ebenfalls die Mutation m.5631G>A in Heteroplasmie auf, allerdings zu einem viel geringeren Anteil. Das entspricht den Erwartungen, da die Mutter asymptomatisch ist.

Bei der Verwandtschaft von Patient 1 ist die Mutation m.5610G>A bei fast allen untersuchten Familienmitgliedern vorhanden. Das Fehlen eines Nachweises der Mutation bei den Enkelinnen III.2 und III.3 bestätigt die maternale Vererbung der

mitochondrialen DNA. Auch hier ist der Anteil mutierter DNA bei der symptomatischen Patientin am höchsten. Bei allen anderen bisher gesunden Familienmitgliedern wurde die Mutation in Blutzellen in einem viel geringeren Anteil nachgewiesen. Auffällig ist jedoch der im Vergleich zu den anderen untersuchten Familienmitgliedern höhere Mutationsanteil im Blut der Tochter II.2 von Patient 1. Diese Tochter ist gesund und weist keine Anzeichen einer Muskelschwäche auf. Sie lehnte jedoch eine klinisch-neurologische Untersuchung sowie die Bestimmung von Laborparametern wie Laktat und Kreatinkinase ab.

Da alle drei Punktmutationen in Heteroplasmie vorliegen und zudem der Anteil mutierter DNA im Gewebe von Patient 1 und 2 höher ist als im gleichen Gewebe ihrer asymptomatischen Verwandten, ist eines der Kriterien, die für die Pathogenität der mt-tRNA Mutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T sprechen (McFarland et al. 2004).

5.1.2 Klinische Symptomatik

Alle drei Patienten weisen eine Myopathie auf. Bei Patient 1 zeigt sich diese in Form einer progressiven Schwäche im Bereich der Schulter- und Beckengürtelmuskulatur. Bei Patient 2 bestand dagegen in erster Linie eine progressive Schwäche zunächst der Hände und nachfolgend auch der Arme und Beine. Unter einer generalisierten Muskelschwäche mit intermittierenden Schmerzen im Rücken und im rechten Oberschenkel leidet Patient 3. Bei allen drei Patienten findet sich die bestehende Symptomatik in der Muskulatur. Zudem ist auch der Anteil mutierter DNA im betroffenen Muskelgewebe in allen drei Fällen am höchsten. Dies ist ein weiterer Faktor, der dafür spricht, dass die drei neu identifizierten Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T als pathogen zu werten sind (McFarland et al. 2004).

Patient 1 weist mit dem Einsetzen der Symptomatik im Alter von 69 Jahren einen sehr späten Krankheitsbeginn auf, was zeigt, dass eine mitochondriale Myopathie auch im fortgeschrittenen Erwachsenenalter auftreten kann.

Der Phänotyp von Patient 3 ist durch eine Myopathie mit multisystemischer Beteiligung (spinale Ataxie, Schwerhörigkeit, Katarakt, kognitive Beeinträchtigung) gekennzeichnet. Diese Symptomatik lässt sich jedoch keinem mitochondrialen Syndrom wie z. B. MELAS oder MERFF zuordnen. Die Tatsache, dass sowohl die Muskulatur als auch das Zentrale Nervensystem klinisch betroffen sind, spricht jedoch für die Diagnose einer mitochondrialen Erkrankung (Deschauer 2003). Schwerhörigkeit ist ein häufiges Symptom bei Mitochondriopathien, das mit einer Punktmutation in einem mt-tRNA-Gen assoziiert ist (Tuppen et al. 2012). Katarakte sind dagegen nur in

Einzelfällen beschrieben worden, u. a. bei den Mutationen m.1606G>A (Sacconi et al. 2002), m.3274A>G (Jaksch et al. 2001), m.12264C>T (Schrier et al. 2012) und m.14685G>A (Lax et al. 2013). Bei Patient 3 liegen somit mehrere typische Symptome vor, die mit Mitochondriopathien assoziiert sind.

Insgesamt erhärtet der Nachweis einer Punktmutation in der mtDNA bei vorhandener mitochondrialer Symptomatik bei allen drei Patienten den Verdacht, dass es sich um pathogene Veränderungen handelt.

5.1.3 Evolutionäre Konservation

Um die Pathogenität eines neuen Basenaustausches innerhalb eines mt-tRNA-Gens einschätzen zu können, muss auch die evolutionäre Konservation der betroffenen Base betrachtet werden. Der Erhalt einer Base in verschiedenen Spezies im Verlauf der Evolution weist auf die Wichtigkeit dieser Base hin und lässt vermuten, dass eine Veränderung an dieser Position eine pathogene Konsequenz hat (Yarham et al. 2012). Die Untersuchung der evolutionären Konservation der Basen der drei neuen Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T erfolgte unter Verwendung der Datenbanken Mamit-tRNA: „A compilation of mammalian mitochondrial tRNA genes“ der Universität Strasbourg (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr>), GenBank vom National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) und der mito-tRNA-Datenbank (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>). Zudem wurde für die Einschätzung der evolutionären Konservation das Scoring-System nach Yarham et al. 2012 genutzt. Dieses beinhaltet ein Verzeichnis von zehn Organismen, das für die Bewertung der evolutionären Konservation einer Punktmutation in einer mt-tRNA empfohlen wird. Anhand der Anzahl an Abweichungen der betroffenen Base in den verschiedenen Spezies wird eine Punktzahl von 0 bis 2 Punkten vergeben. Dabei fließt bei einer Lokalisation der Mutation im doppelsträngigen Bereich einer tRNA in die Bewertung auch mit ein, ob zusätzlich ein Austausch der korrespondierenden Base stattgefunden hat oder nicht.

Alle drei Punktmutationen sind im Bereich eines doppelsträngigen Stammes einer tRNA lokalisiert. Die betroffene Base ist dabei in keinem der Fälle bei allen zehn Spezies vorhanden. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Tabelle 18 gezeigt und zudem in den Abbildungen 24 bis 26 dargestellt.

Tabelle 18: Ergebnisse der evolutionären Konservierung der Basen

Position in der mtDNA	betroffene Base	Anzahl der Spezies, die die betroffene Base an der entsprechenden Position in der mtDNA aufweisen	erhaltene Punktzahl
5610	Guanin	5	0
5631	Guanin	5	1
7539	Cytosin	9	1

Bei fast allen der zehn ausgewählten Spezies ist an Position 7539 der mtDNA die Base Cytosin vorhanden. Nur beim Rind (*Bos taurus*) findet sich an dieser Stelle die Base Thymin. Die korrespondierende Base im D-Stamm wurde jedoch nicht durch Adenin ausgetauscht, sondern enthält weiterhin die Base Guanin. Da bei einer der Spezies eine andere Base ohne Austausch der komplementären Base im betroffenen tRNA-Stamm vorliegt, erhält die Punktmutation m.7539C>T im Scoring-System für die Bewertung der evolutionären Konservierung einen Punkt.

	D-Stamm										D-Stamm					
Patient	5'	G	A	A	A	A	A	C	C	A	-	T	T	T	T	3'
<i>Homo sapiens</i>		G	A	A	A	A	A	C	C	A	-	T	T	T	C	
<i>Pan troglodytes</i>		G	A	A	A	A	A	C	T	A	-	T	T	T	C	
<i>Pan paniscus</i>		G	A	A	A	A	A	C	T	A	-	T	T	T	C	
<i>Hylobates lar</i>		G	A	A	A	A	A	C	T	A	-	T	T	T	C	
<i>Mus musculus</i>		G	T	A	A	A	A	T	C	A	A	T	T	A	C	
<i>Rattus norvegicus</i>		G	T	A	A	A	A	T	A	A	-	T	T	A	C	
<i>Bos taurus</i>		G	T	A	A	A	A	C	A	-	-	T	T	A	T	
<i>Gallus gallus</i>		G	T	A	A	A	C	C	A	A	-	T	T	A	C	
<i>Gadus morhua</i>		G	T	G	A	A	A	T	A	-	-	T	C	A	C	
<i>Drosophila melanogaster</i>		G	T	T	A	A	A	A	T	C	A	T	A	A	C	

Abbildung 24: Die Base Cytosin an Position 7539 (rot) im D-Stamm der mt-tRNA^{Asp} ist evolutionär konserviert. Nur *Bos taurus* enthält hier die Base Thymin, wobei die korrespondierende Base Guanin (blau) nicht durch Adenin ausgetauscht ist (modifiziert aus Lehmann et al. 2015a).

Die Base Guanin an der Position 5631 der mtDNA findet sich bei fünf von zehn Spezies wieder. Bei den anderen Organismen zeigt sich an dieser Stelle die Base Adenin, wobei vier von ihnen auch einen Austausch der korrespondierenden Base im Anticodonstamm aufweisen, so dass keine Beeinträchtigung der Basenpaarung vorliegt. Beim Kabeljau (*Gadus morhua*) befindet sich jedoch an Position 5631 die Base Adenin ohne Austausch der komplementären Base. Da dies nur auf eine Spezies zutrifft, erhält die Punktmutation m.5631G>A im Scoring-System für die Bewertung der evolutionären Konservierung einen Punkt.

	Anticodonstamm										Anticodonstamm						
	3'															5'	
Patient	G	T	T	G	A	T	T	T	G	C	G	T	T	C	A	G	T
<i>Homo sapiens</i>	G	C	T	G	A	T	T	T	G	C	G	T	T	C	A	G	T
<i>Pan troglodytes</i>	G	C	T	G	A	T	T	T	G	C	G	T	T	C	A	G	T
<i>Pan paniscus</i>	G	C	T	G	A	T	T	T	G	C	G	T	T	C	A	G	T
<i>Hylobates lar</i>	A	C	T	G	A	T	T	T	G	C	G	T	T	C	G	G	T
<i>Mus musculus</i>	A	T	T	G	A	T	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	T
<i>Rattus norvegicus</i>	G	T	T	G	A	T	T	T	G	C	A	T	T	T	A	A	C
<i>Bos taurus</i>	G	T	T	G	A	T	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	T
<i>Gallus gallus</i>	T	C	T	G	A	T	T	T	G	C	A	T	T	C	A	G	G
<i>Gadus morhua</i>	T	T	T	G	T	T	T	T	G	C	A	T	A	C	A	G	A
<i>Drosophila melanogaster</i>	T	T	T	G	A	T	T	T	G	C	A	T	T	C	A	A	A

Abbildung 25: An Position 5631 (rot) im Anticodonstamm der mt-tRNA^{Ala} sind die Basen Guanin und Adenin vertreten. Alle Spezies weisen an dieser Stelle eine Watson-Crick-Basenpaarung auf. Nur *Gadus morhua* enthält die Base Adenin ohne Austausch der korrespondierenden Base Cytosin zu Thymin (blau) (modifiziert aus Lehmann et al. 2015b).

An der Position 5610 der mtDNA weisen ebenfalls fünf von zehn Spezies die Base Guanin auf. Die anderen fünf Organismen zeigen alle die Base Adenin, wovon bei drei von ihnen auch ein Austausch der komplementären Base zu Thymin stattgefunden hat. Bei insgesamt zwei Spezies (*Bos taurus* und *Gadus morhua*) findet sich neben der Base Adenin an Position 5610 kein Austausch der korrespondierenden Base Guanin. Da in diesem Fall gleich zwei Spezies keine Watson-Crick-Basenpaarung an der beschriebenen Stelle im T-Stamm der tRNA^{Ala} aufweisen, erhält die Punktmutation m.5610G>A im Scoring-System für die evolutionäre Konservation 0 Punkte.

	T-Stamm						T-Stamm										
Patient	3'													5'			
	G	T	A	G	A	G	T	G	G	G	G	T	T	T	G	C	
<i>Homo sapiens</i>	G	C	A	G	A	G	T	G	G	G	G	T	T	T	G	C	
<i>Pan troglodytes</i>	G	C	A	G	A	G	T	G	G	G	G	T	T	T	G	C	
<i>Pan paniscus</i>	G	C	A	G	A	G	T	G	G	G	G	T	T	T	G	C	
<i>Hylobates lar</i>	G	C	A	A	A	G	T	G	G	G	-	C	T	T	T	G	C
<i>Mus musculus</i>	G	T	A	G	G	A	T	G	A	A	G	T	C	T	T	A	C
<i>Rattus norvegicus</i>	G	T	A	A	G	A	T	A	T	A	G	T	C	T	T	A	C
<i>Bos taurus</i>	G	T	A	A	G	G	T	G	T	A	G	T	C	T	T	G	C
<i>Gallus gallus</i>	A	C	A	G	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	T	G	T
<i>Gadus morhua</i>	G	T	G	G	G	G	T	A	G	T	G	T	C	C	T	G	C
<i>Drosophila melanogaster</i>	A	T	T	G	A	A	T	A	T	-	-	-	T	C	A	A	T

Abbildung 26: An Position 5610 (rot) im T-Stamm der mt-tRNA^{Ala} sind die Basen Guanin und Adenin vertreten. Nur *Bos taurus* und *Gadus morhua* enthalten hier die Base Adenin ohne Austausch der korrespondierenden Base Cytosin zu Thymin (blau) (modifiziert aus Lehmann et al. 2015b).

5.1.4 Einzelfaserstudie und mt-tRNA^{Ala} Steady-State-Level-Analyse

Um die Pathogenität einer Mutation innerhalb einer mt-tRNA einschätzen zu können, zählen die Durchführung einer Einzelfaserstudie, eine trans-mitochondriale Cybrid-Studie sowie die Analyse des mt-tRNA Steady-State-Levels zum Goldstandard (Yarham et al. 2011). Diese Methoden waren im Muskellabor der Neurologischen Universitätsklinik Halle nicht etabliert. Darum erfolgte eine Einzelfaserstudie der drei neu identifizierten Punktmutationen im Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research der Universität Newcastle. Ebenso wurde dort eine Steady-State-Level-Analyse der mt-tRNA^{Ala} bei Patient 1 und 2 veranlasst. Eine trans-mitochondriale Cybrid-Studie wurde bei keinem der Patienten durchgeführt.

Einzelfaserstudie

Zur Bestimmung der Heteroplasmie der drei Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T in einzelnen COX-negativen und COX-positiven Muskelfasern erfolgte jeweils eine Einzelfaserstudie (Lehmann et al. 2015a, 2015b).

Bei Patient 1 zeigte sich ein statistisch signifikant ($p=0,0002$) höherer Anteil der Punktmutation m.5610G>A in den CNF ($98,00\% \pm 0,46$), verglichen mit den CPF ($78,86\% \pm 4,81$) (Lehmann et al. 2015b).

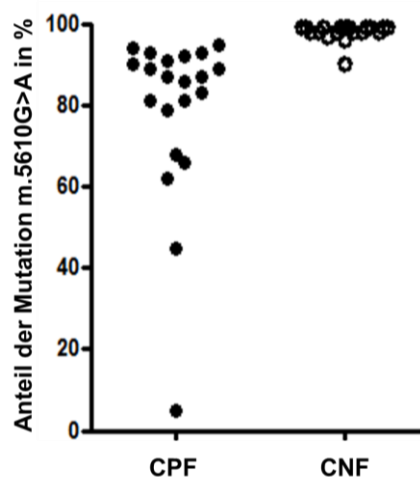


Abbildung 27: Die Einzelfaserstudie von Patient 1 zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.5610G>A mit einem höheren Anteil mutierter mtDNA in CNF ($n = 20$) als in CPF ($n = 21$) (modifiziert aus Lehmann et al. 2015b).

Bei Patient 2 zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikant ($p=0,0005$) größerer Anteil der Punktmutation m.5631G>A in den CNF ($95,06\% \pm 0,45$) im Vergleich zu den CPF ($83,82\% \pm 3,38$) (Lehmann et al. 2015b).

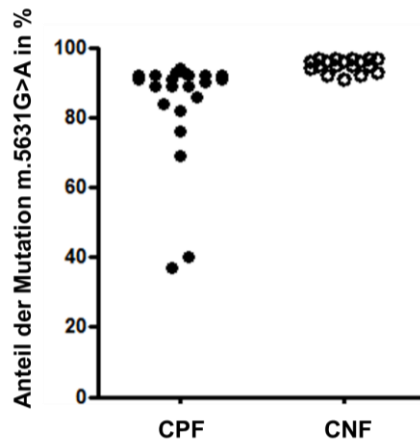


Abbildung 28: Die Einzelfaseranalyse von Patient 2 zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.5631G>A mit einem höheren Anteil mutierter mtDNA in CNF (n = 18) als in CPF (n = 22) (modifiziert aus Lehmann et al. 2015b).

Auch bei Patient 3 ließ sich ein statistisch signifikant ($p < 0,0001$) höherer Anteil der Punktmutation m.7539C>T in den CNF ($96,05\% \pm 0,38$) im Vergleich zu den CPF ($69,12\% \pm 2,98$) nachweisen (Lehmann et al. 2015a).

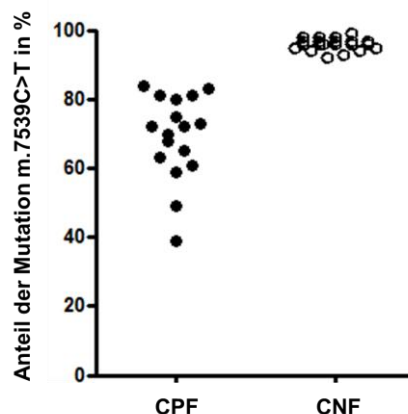


Abbildung 29: Die Einzelfaseranalyse von Patient 3 zeigt die Heteroplasmie der Punktmutation m.7539C>T mit einem höheren Anteil mutierter mtDNA in CNF (n = 21) als in CPF (n = 17) (modifiziert aus Lehmann et al. 2015a).

Der Anteil mutierter mtDNA variiert zwischen einzelnen Muskelfasern. Nur Fasern, bei denen die Menge mutierter mtDNA den individuellen Schwellenwert übersteigt, zeigen eine verminderte Aktivität von Komplex IV der Atmungskette, was sich histochemisch durch den Nachweis von CNF nachweisen lässt (Rossignol et al. 2003).

Alle drei Patienten zeigen eine höhere Mutationslast in den CNF verglichen mit den CPF. Dabei ist der Schwellenwert für eine Schädigung der oxidativen Phosphorylierung bei allen drei Punktmutationen sehr hoch.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die drei Genotypen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T zu einer Aktivitätsminderung von Komplex IV der Atmungskette führen. Dies unterstreicht die Pathogenität aller drei neu identifizierten Punktmutationen (McFarland et al. 2004).

mt-tRNA^{Ala} Steady-State-Level-Analyse

Um den Effekt der Mutationen m.5610G>A und m.5631G>A auf die mt-tRNA^{Ala} zu untersuchen, wurde das Steady-State-Level dieser tRNA im Muskelgewebe durch Northernblot Hybridisation bei Patient 1 und 2 ermittelt (Taylor et al. 2003).

Die Analyse zeigte einen beträchtlichen Abfall des mt-tRNA^{Ala}-Steady-State-Levels bei beiden Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 30).

Dieses Ergebnis demonstriert die direkte Konsequenz der Punktmutationen m.5610G>A und m.5631G>A auf die Funktionalität der mt-tRNA^{Ala} und spricht im hohen Maße für ihren pathogenen Charakter (McFarland et al. 2004).

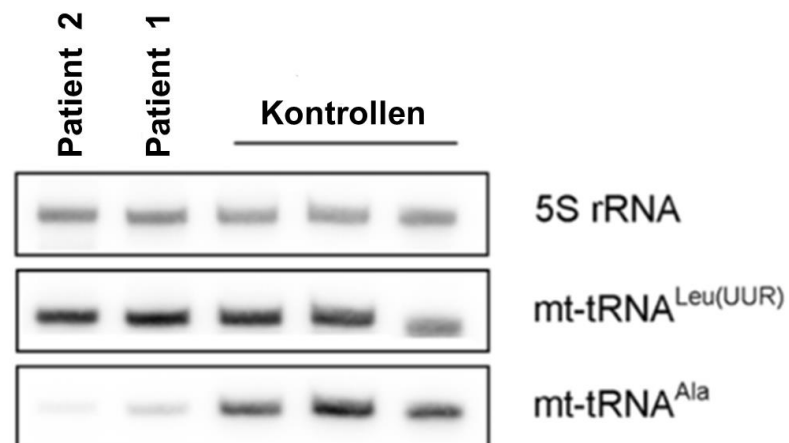


Abbildung 30: Die Northernblot-Hybridisation zeigt einen beträchtlichen Abfall der mt-tRNA^{Ala} Steady-State-Levels im Muskelgewebe von Patient 1 und 2 (modifiziert aus Lehmann et al. 2015b).

5.1.5 Zusammenfassung

Mit Hilfe des Scoring-Systems für mt-tRNA-Punktmutationen (Yarham et al. 2011) kann die Pathogenität der drei neu identifizierten Punktmutationen eingeschätzt werden.

Tabelle 19: Scoring-System zur Beurteilung der Pathogenität

Kriterium	m.5610G>A	m.5631G>A	m.7539C>T
mehr als ein unabhängiger Bericht	0	0	0
evolutionäre Konservation einer Base oder eines Basenpaares	0	1	1
Nachweis von Heteroplasmie	2	2	2
Einhergehen der Mutation mit klinischer Symptomatik	2	2	2
Histochemische Hinweise auf eine mitochondriale Erkrankung	2	2	2
biochemischer Defekt in Komplex I, III oder IV der Atmungskette	2	2	2
Einzelfaserstudie mit dem Nachweis höherer Anteile mutierter DNA in CNF als in CPF	3	3	3
Nachweis einer mutierten mt-tRNA durch Steady-State-Level-Analyse	5	5	n. d. = 0
Gesamtscore	16/20	17/20	12/20

Bei einem Score ≥ 11 Punkte, wobei eine Einzelfaserstudie, eine mt-tRNA-Steady-State-Level-Analyse oder eine trans-mitochondriale Cybrid-Studie mit dem Hinweis auf Pathogenität durchgeführt worden sein muss, kann die betrachtete Punktmutation als definitiv pathogen eingestuft werden.

Alle drei neu identifizierten Punktmutationen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, erreichten einen Score von über 11 Punkten. Da auch mindestens eine der geforderten Goldstandard-Untersuchungen erfolgt war, gelten die Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T als definitiv pathogen (Yarham et al. 2011).

5.2 mt-tRNA Mutationen bei isolierter mitochondrialer Myopathie

Eine IMM ist durch einen Defekt der Atmungskette gekennzeichnet, der ausschließlich im Skelettmuskel symptomatisch wird. Eine externe Ophthalmoplegie oder Multisystembeteiligung liegen definitionsgemäß nicht vor. Die klinischen Beschwerden resultieren häufig in einer belastungsabhängigen muskulären Symptomatik. Es können bspw. Myalgien, Rhabdomyolysen oder ein Gliedergürtelsyndrom auftreten (Kornblum 2012). Molekulargenetische Veränderungen, die zu einer IMM führen, sind zum einen Mutationen, die proteinkodierende Gene (Andreu et al. 1999, Meulemans et al. 2007) oder tRNA-Gene der mtDNA betreffen (Tabelle 20). Es können aber auch

Veränderungen der nDNA ursächlich sein (Gempel et al. 2007, Giordano et al. 2010, Leshinsky-Silver et al. 2008, Saada et al. 2001).

Eine IMM ist insgesamt eine seltene Manifestation einer Mitochondriopathie. Innerhalb der mt-tRNA-Gene sind bisher 16 Punktmutationen beschrieben worden, die mit diesem Krankheitsbild assoziiert sind.

Tabelle 20: mt-tRNA Punktmutationen bei isolierter mitochondrialer Myopathie

Punktmutation	tRNA-Gen	Referenz
m.618T>C	Phe	Kleinle et al. 1998
m.3250T>C	Leu (UUR)	Goto et al. 1992
m.3288A>G	Leu (UUR)	Hadjigeorgiou et al. 1999
m.3302A>G	Leu (UUR)	Bindoff et al. 1993
m.4409T>C	Met	Vissing et al. 1998
m.5521G>A	Trp	Silvestri et al. 1998
m.5543T>C	Trp	Anitori et al. 2005
m.5567T>C	Trp	Valente et al. 2009
m.5591G>A	Ala	Swalwell et al. 2006
m.5650G>A	Ala	McFarland et al. 2008
m.5888insA	Tyr	Meulemans et al. 2007
m.7497G>A	Ser (UCN)	Jaksch et al. 1998 Grafakou et al. 2003 Müller et al. 2005
m.7526A>G	Asp	Seneca et al. 2005
m.8362T>G	Lys	Sternberg et al. 2001
m.12320A>G	Leu (CUN)	Weber et al. 1997
m.15990G>A	Pro	Moraes et al. 1993

Im Bereich des tRNA-Gens für Alanin sind bisher zwei Punktmutationen bekannt - m.5650G>A (McFarland et al. 2008) und m.5591G>A (Swalwell et al. 2006) - die zu einer IMM führen können. In beiden Fällen sind die Extremitäten von der Muskelschwäche betroffen. Die Familie, bei der die Transition m.5650G>A beschrieben wurde, zeigt proximale Paresen, wobei die Indexpatientin zudem eine milde beidseitige Ptosis ohne Ophthalmoplegie aufweist. Die Mutation m.5591G>A wurde bei einem 47-jährigen Mann identifiziert, der unter einem Gliedergürtelsyndrom mit proximalen Paresen der Arme und Beine sowie einer milden distalen Parese beider Arme leidet. Eine Ptosis war nicht nachweisbar.

Beide Punktmutationen liegen auf dem Akzeptorarm der tRNA^{Ala}. Zusammen mit den neu identifizierten Punktmutationen m.5610G>A und m.5631G>A ist bei allen vier Veränderungen jeweils eine G-C Basenpaarung betroffen, wodurch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen diesen Basen gestört ist.

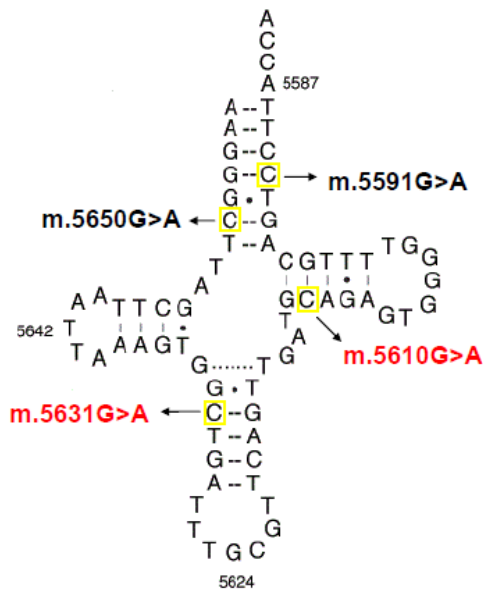


Abbildung 31: Schematische Darstellung der mtDNA-Sequenz für das tRNA^{Ala}-Gen zeigt die Lokalisation der bekannten (schwarz) und neu identifizierten (rot) Punktmutationen bei IMM (modifiziert nach Mamit-tRNA).

Innerhalb des tRNA^{Ala}-Gens sind noch zwei weitere Mutationen, m.5628T>C (Spagnolo et al. 2001) und m.5636T>C (Pinós et al. 2011), mit einer mitochondrialen Myopathie assoziiert. Die Patienten weisen jedoch zusätzlich eine CPEO auf, womit keine IMM vorliegt.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass mt-tRNA-Punktmutationen bei einer IMM möglicherweise bevorzugt im tRNA^{Ala}-Gen zu finden sind. Die anderen in Tabelle 20 genannten Punktmutationen liegen alle in mt-tRNA-Genen, die mit sehr unterschiedlichen Phänotypen, u. a. mit MELAS oder MERRF, assoziiert sind. Es ist möglich, dass eine Genotyp-Phänotyp-Beziehung zwischen einer Punktmutation im mt-tRNA^{Ala}-Gen und einer isolierten mitochondrialen Myopathie besteht.

5.3 mt-tRNA Mutationen bei Mitochondriopathie mit Multisystembeteiligung

Zahlreiche Punktmutationen in verschiedenen mt-tRNA-Genen wie z. B. tRNA^{Ile} (Taylor et al. 2002), tRNA^{Leu(UUR)} (Campos et al. 2003) oder tRNA^{Ser(UCN)} (Bidooki et al. 2004) sind mit dem Auftreten einer Mitochondriopathie mit multisystemischer Beteiligung assoziiert.

In der tRNA^{Asp} sind bisher nur drei Punktmutationen publiziert, die sicher pathogen sind. Die Punktmutation m.7526A>G ist bei einer Patientin mit einer IMM nachgewiesen worden (Seneca et al. 2005). Die Transition m.7543A>G ist mit dem Auftreten von myoklonischen Anfällen, Entwicklungsverzögerungen und psychomotorischen Verhaltensauffälligkeiten beschrieben (Shtilbans et al. 1999), derweil die Mutation m.7520G>A bei einem Patienten mit sporadisch bilateral optischer

Neuropathie identifiziert wurde (Bosley et al. 2008). Als möglicherweise pathogen wurde die Mutation m.7554G>A publiziert, die zu einer Myopathie mit Ataxie, Nystagmus und Migräne führt (Blakely et al. 2013). Die neu identifizierte Mutation m.7539C>T zeigt sich mit dem klinischen Bild einer Myopathie, spinaler Ataxie, sensorineuralen Hörverlust, Katarakt und kognitiver Beeinträchtigung.

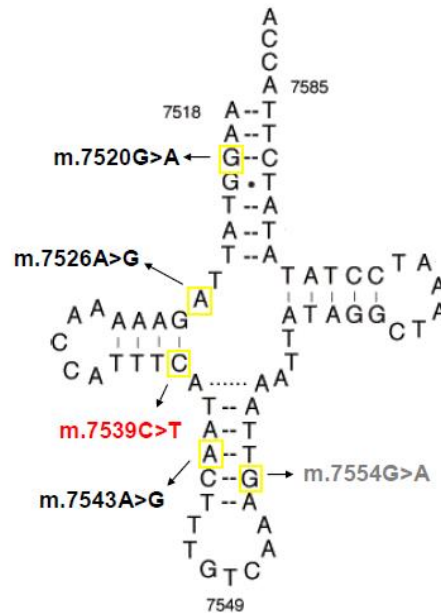


Abbildung 32: Schematische Darstellung der mtDNA-Sequenz für das tRNA^{Asp}-Gen zeigt die Lokalisation der bekannten pathogenen (schwarz) Punktmutationen, der möglicherweise pathogenen (grau) Punktmutation und der neu identifizierten (rot) Punktmutation (modifiziert nach Mamit-tRNA).

Durch die Mutation m.7539C>T wird das Spektrum der pathogenen Veränderungen in der tRNA^{Asp} erweitert. Es lässt sich vermuten, dass Punktmutationen innerhalb der mt-tRNA^{Asp} am ehesten bei einer Mitochondriopathie mit multisystemischer Beteiligung zu finden sind.

5.4 Fazit und Ausblick

Es wurde eine heterogene Gruppe von Patienten untersucht. Diese zeigten alle eine mosaikartige Verteilung von CNF und CPF im Muskelpräparat, was typisch für eine pathogene molekulargenetische Veränderung der mtDNA ist. Dennoch konnte nicht bei allen Patienten ein Gendefekt in der mtDNA nachgewiesen werden. Bei drei Patienten wurde jedoch eine neue Punktmutation in der mtDNA als genetische Ursache des vorhandenen Phänotyps identifiziert.

Die Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms ist zeitaufwändig, arbeitsintensiv und kostspielig (Wong et al. 2002). Aus diesen Gründen ist es nicht sinnvoll bei jedem Patienten, bei dem eine mitochondriale Erkrankung vermutet wird, standardmäßig solch eine molekulargenetische Analyse durchzuführen. Es stellt sich zudem die Frage wie aussichtsreich eine Sequenzierung der mtDNA aus diagnostischer Sicht überhaupt ist. Bei ca. 50% der Erwachsenen und etwa 30% der Kinder mit klinisch, biochemisch und histologisch gesicherter Mitochondriopathie wird der verantwortliche nukleäre oder mitochondriale Gendefekt nicht gefunden (Kleist-Retzow und Kornblum 2009). Es gibt bisher auch keine sicheren Kriterien, anhand derer man abschätzen kann, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer pathogenen Mutation in der mtDNA bei Patienten mit Mitochondriopathie ist. Somit ist es auch nicht möglich vorherzusagen, ob sich eine Sequenzierung des mitochondrialen Genoms lohnt oder völlig überflüssig ist. Dass es jedoch wichtig ist eine Sequenzierung der mtDNA in Betracht zu ziehen und diese nicht vollkommen in den Hintergrund zu stellen, zeigt u. a. die Arbeit von Blakely et al. 2013.

Doch bei welchen Patienten ist nun die Wahrscheinlichkeit am höchsten mittels Sequenzierung der mtDNA einen Gendefekt zu finden? Wichtige Informationen liefert in erster Linie die Klinik des Patienten, insbesondere das Vorliegen extramuskulärer mitochondrialer Symptome. Diese können einen Hinweis darauf geben, ob ein mitochondriales Syndrom wie bspw. MELAS oder MERRF vorliegt, so dass es sinnvoll ist zunächst häufige Mutationen dieser Erkrankungsbilder wie m.3243A>G bzw. m.8344A>G (Kleist-Retzow und Kornblum 2009) zu überprüfen. Wenn der Phänotyp keine Eingrenzung auf ein mitochondriales Syndrom erlaubt, können myohistologische und biochemische Analysen den Verdacht auf eine Mitochondriopathie verstärken und zudem Hinweise darauf geben, ob ein Gendefekt der mtDNA wahrscheinlich ist. Dazu zählen u. a. die mosaikartige Verteilung von CNF und CPF in der histologischen Untersuchung oder der Nachweis eines kombinierten Defektes der Atmungskettenkomplexe in der biochemischen Analyse des Muskelgewebes. Wie diese Arbeit jedoch zeigt, erfüllten zwar alle sieben Patienten die Kriterien des

Vorliegens einer Klinik, die auf eine Mitochondriopathie hinweist sowie typische Veränderungen in der myohistologischen Untersuchung, dennoch konnte nur bei drei Patienten eine pathogene Mutation der mtDNA identifiziert werden. War es Zufall, dass sich ausgerechnet bei diesen Patienten ein mitochondrialer Gendefekt finden ließ? Im Vergleich der biochemischen Analysen fällt auf, dass bei Patient 3 ein isolierter Defekt von Komplex IV nachweisbar war. Die Aktivität von Komplex IV ist sowohl pro Gramm Gewebe als auch in Bezug auf den Proteingehalt und die Aktivität des mitochondrialen Markerenzym Citratsynthase vermindert. Dies ist keine typische Veränderung bei mitochondrialen Defekten, sondern lässt eher einen nukleären Defekt im Bereich der nDNA kodierten Untereinheiten von Komplex IV vermuten. Dennoch ließ sich bei Patient 3 eine bisher unbekannte mt-tRNA-Punktmutation identifizieren. Das zeigt, dass man bei der Auswahl der Patienten, die für eine Sequenzierung der mtDNA in Frage kommen, eine zu strenge Eingrenzung vermeiden sollte.

Wenn man sich die Ergebnisse der histologischen Untersuchung aller Patienten anschaut und miteinander vergleicht, fällt auf, dass sich bspw. bei Patient 5 eine sehr hohe Anzahl an CNF(+CIF) und RRF(+SMA) nachweisen ließ. Bei den Patienten 1 bis 3, bei denen eine pathogene Mutation in der mtDNA identifiziert werden konnte, fanden sich vergleichsweise geringere Anteile dieser Fasern im Muskelpräparat.

Durch die Zusammenschau der Vorbefunde ließ sich also nicht abschätzen, dass sich ausgerechnet bei den Patienten 1 bis 3 eine mtDNA-Punktmutation nachweisen lässt und bei den anderen Patienten keine pathogene Veränderung in der mtDNA zu finden ist.

Schädigungen der mtDNA führen zu molekulargenetischen Veränderungen, die eine Störung der oxidativen Phosphorylierung sowie eine zelluläre Fehlfunktion verursachen, welche in einem mitochondrialen Erkrankungsbild resultieren (DiMauro und Schon 2003). Zusätzlich können Mutationen im nukleären Genom zu sekundären Veränderungen der mtDNA führen, was man als Störung der intergenomischen Kommunikation bezeichnet (Deschauer und Zierz 2003).

So sind bspw. bei der PEO, neben Defekten in der mtDNA, nukleäre Veränderungen in verschiedenen Genen beschrieben, die mit einem autosomalen Erbgang assoziiert sind. Dabei handelt es sich um nukleäre Gene, die Proteine kodieren, welche vorwiegend für die Replikation der mtDNA benötigt werden (Pinós et al. 2011). Mutationen in diesen Genen, zu denen die Polymerase Gamma 1 (POLG1) (Van Goethem et al. 2001), Polymerase Gamma 2 (POLG2) (Longley et al. 2006), C10orf2/Twinkle (Spelbrink et al. 2001), der Adenin-Nukleotid-Translokator 1 (ANT1) (Kaukonen et al. 2000, Deschauer et al. 2005), RRM2B (Tynismaa et al. 2009), OPA1

(Hudson et al. 2008) und die Thymidin-Phosphorylase (TYMP) (Nishino et al. 1999) zählen, führen zum Nachweis von multiplen Deletionen der mtDNA.

Auch Depletionen der mtDNA können durch Mutationen in verschiedenen nukleären Genen verursacht werden. Beispielsweise sind Veränderungen in der mitochondrialen Thymidin-Kinase 2 (TK2) (Saada et al. 2001, Mancuso et al. 2002) und in der Deoxyguanosin-Kinase (DGUOK) (Mandel et al. 2001, Salviati et al. 2002), die myopathische und hepatozerebrale Erkrankungsbilder hervorrufen, mit einer mtDNA Depletion assoziiert (DiMauro und Schon 2003). Auch Veränderungen im POLG-Gen wurden mit einer mtDNA-Depletion in Verbindung gebracht und sind besonders oft beim Alpers-Huttenlocher-Syndrom beschrieben. Es wurden jedoch auch bei anderen Erkrankungsbildern wie bspw. der PEO, Ataxie, sensorineuraler Neuropathie, Epilepsie und Morbus Parkinson Mutationen im POLG-Gen nachgewiesen (Müller-Höcker et al. 2011).

Aufgrund dieser Erkenntnisse bei mitochondrialen Erkrankungsbildern ist es denkbar, dass bei den Patienten 4 bis 7 eine sekundäre Schädigung der mtDNA vorliegt. Es könnte dabei primär ein nukleärer Defekt in sogenannten mtDNA „maintenance“-Genen, die für die fehlerfreie Replikation und Integrität der mtDNA wichtig sind (DiMauro 2013), für die jeweilige Symptomatik verantwortlich sein.

Defekte der „mtDNA maintenance“ können in zwei Gruppen unterteilt werden:

- a) mtDNA Depletionssyndrome, die sich im jungen Lebensalter manifestieren und durch Myopathie, hepatozerebrale Störungen oder Enzephalomyopathie gekennzeichnet sind und
- b) multiple mtDNA Deletionen, die normalerweise mit dem Erkrankungsbild einer PEO oder PEO-Plus assoziiert sind (DiMauro 2013).

Da multiple Deletionen der mtDNA bei keinem der Patienten nachweisbar waren, lässt sich ein Defekt am ehesten in den nukleären Genen POLG1, C10orf2, TYMP, DGUOK, TK2, SUCLA2, SUCLG1, MPV17 und RRM2B vermuten, die zu einer mtDNA-Depletion führen können (Suomalainen and Isohanni 2010).

Depletionen der mtDNA und nukleäre Veränderungen wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, so dass die möglicherweise ursächliche Mutation in der Kern-DNA der vier Patienten unbekannt bleibt.

Bei Kindern mit mitochondrialer Erkrankung finden sich grundsätzlich häufiger nukleäre Mutationen als bei Erwachsenen (Freisinger und Sperl 2012), so dass eine Untersuchung der nDNA vor allem bei den Patienten 4 und 5 erfolgversprechend scheint.

6 Zusammenfassung

Mitochondriopathien zeigen eine ausgeprägte Heterogenität sowohl beim Phänotyp als auch bei ihren molekulargenetischen Ursachen. Seit im Jahre 1988 die ersten pathogenen Veränderungen im mitochondrialen Genom (Holt et al. 1988, Wallace et al. 1988) veröffentlicht wurden, sind zahlreiche weitere Mutationen der mtDNA beschrieben. Dennoch sind bis heute längst nicht alle molekulargenetischen Veränderungen bekannt. Eine Schwierigkeit besteht darin, die Genotyp-Phänotyp-Beziehungen mitochondrialer Erkrankungen zu verstehen. Das liegt u. a. an den Besonderheiten der mitochondrialen Genetik, vor allem an der Möglichkeit der Heteroplasmie und dem Schwellenwert-Effekt (DiMauro and Schon 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei insgesamt sieben Patienten eine Sequenzierung des mitochondrialen Genoms vorgenommen, mit dem Ziel eine molekulargenetische Ursache für die klinische und anhand der Muskelbiopsie diagnostizierte Mitochondriopathie zu finden. Bei drei Patienten gelang es eine bislang nicht beschriebene mt-tRNA-Punktmutation zu identifizieren. In der tRNA^{Ala} fanden sich die Punktmutationen m.5610G>A und m.5631G>A jeweils bei einem Patienten mit isolierter mitochondrialer Myopathie. Die Punktmutation m.7539C>T liegt in der tRNA^{Asp} und wurde bei einem Patienten mit dem Phänotyp einer multisystemischen mitochondrialen Myopathie identifiziert. Die übrigen vier Patienten wiesen lediglich Polymorphismen auf. Es wurde demnach keine seltene Punktmutation, die bereits anderswo identifiziert wurde, gefunden. Die Pathogenität der drei bisher unbekannten mt-tRNA-Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T konnte anhand der Kriterien nach Yarham et al. 2011 nachgewiesen werden. Dabei wurden alle drei Mutationen als sicher pathogen klassifiziert.

Aus den Ergebnissen lassen sich in Zusammenschau der bisher bekannten Punktmutationen in der tRNA^{Ala} und tRNA^{Asp} zwei Genotyp-Phänotyp-Korrelationen vermuten. Isolierte mitochondriale Myopathien scheinen mit Punktmutationen im tRNA^{Ala}-Gen assoziiert zu sein. Mutationen im tRNA^{Asp}-Gen führen dagegen am ehesten zu einer Mitochondriopathie mit einer multisystemischen Beteiligung.

7 Literaturverzeichnis

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* 290:457-465.

Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S (1999) Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 341:1037-1044.

Anitori R, Manning K, Quan F, Weleber RG, Buist NRM, Shoubridge EA, Kennaway NG (2005) Contrasting phenotypes in three patients with novel mutations in mitochondrial tRNA genes. *Mol Genet Metab* 84:176-188.

Auré K, Fayet G, Leroy JP, Lacène E, Romero NB, Lombès A (2006) Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* 129:1249-1259.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemie*. 7. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, korrigierter Nachdruck 2014, S. 529-530.

Bidooki S, Jackson MJ, Johnson MA, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Taylor RW, Venables G, Lightowlers RN, Turnbull DM, Bindoff LA (2004) Sporadic mitochondrial myopathy due to a new mutation in the mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} gene. *Neuromuscul Disord* 14:417-420.

Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowlers RN, Turnbull DM, Weber K (1993) Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA: A potential disease mechanism. *J Biol Chem* 268:19559-19564.

Birky CW Jr (1978) Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Ann Rev Genet* 12:471-512.

Birky CW Jr (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11331-11338.

Blakely EL, Yarham JW, Alston CL, Craig K, Poulton J, Brierley C, Park SM, Dean A, Xuereb JH, Anderson KN, Compston A, Allen C, Sharif S, Enevoldson P, Wilson M, Hammans SR, Turnbull DM, McFarland R, Taylor RW (2013) Pathogenic mitochondrial tRNA point mutations: nine novel mutations affirm their importance as a cause of mitochondrial disease. *Hum Mutat* 34:1260-1268.

Bosley TM, Brodsky MC, Glasier CM, Abu-Amero KK (2008) Sporadic bilateral optic neuropathy in children: the role of mitochondrial abnormalities. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:5250-5256.

Bourgeois JM, Tarnopolsky MA (2004) Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 4:441-452.

Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM (2006) Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet* 79:469-480.

Campos Y, García A, del Hoyo P, Jara P, Martín MA, Rubio JC, Berbel A, Barberá JR, Ribacoba R, Astudillo A, Cabello A, Ricoy JR, Arenas J (2003) Two pathogenic mutations in the mitochondrial DNA tRNA^{Leu(UUR)} gene (T3258C and A3280G) resulting in variable clinical phenotypes. *Neuromuscul Disord* 13:416-420.

Chariot P, Ruet E, Authier FJ, Labes D, Poron F, Gherardi R (1996) Cytochrome c oxidase deficiencies in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 91:530-536.

Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, and Griffin JL (1990) Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *New Engl J Med* 322:1098-1105.

Deschauer M (2003) Mitochondriale Enzephalomyopathien. *Psychoneuro* 29:108-112.

Deschauer M (2012) Mitochondriale Erkrankungen im Erwachsenenalter. *Med Genet* 24:169-175.

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. *Neuromuscul Disord* 15:311-315.

Deschauer M, Kiefer R, Blakely EL, He L, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW (2003) A novel twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13:568-572.

Deschauer M, Zierz S (2003) Defekte der intergenomischen Kommunikation: Mutationen der Kern-DNA und multiple Deletionen der mitochondrialen DNA bei chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie. *Akt Neurol* 30:103-106.

DiMauro S (2013) Mitochondrial encephalomyopathies - fifty years on: the Robert Wartenberg lecture. *Neurology* 81:281-291.

DiMauro S, Andreu AL, Musumeci O, Bonilla E (2001) Diseases of oxidative phosphorylation due to mtDNA mutations. *Semin Neurol* 21:251-260.

DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC (1985) Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 17:521-538.

DiMauro S, Schon EA (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 106:18-26.

DiMauro S, Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668.

Elson JL, Swalwell H, Blakely EL, McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM (2009) Pathogenic mitochondrial tRNA mutations – which mutations are inherited and why? *Hum Mutat* 30:E984-992.

Engel WK, Cunningham GG (1963) Rapid examination of muscle tissue: an improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 13:919-923.

Filosto M, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vattermi G, Rizzuto N, Padovani A, Simonati A (2007) Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep* 27:23-30.

Florentz C, Sohm B, Tryoen-Tóth P, Pütz J, Sissler M (2003) Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 60:1356-1375.

Freisinger P, Sperl W (2012) Mitochondriale Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter. *Med Genet* 24:162-168.

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.

Gempel K, Topaloglu H, Talim B, Schneiderat P, Schoser BGH, Hans VH, Pálmafy B, Kale G, Tokatli A, Quinzii C, Hirano M, Naini A, DiMauro S, Prokisch H, Lochmüller H, Horvath R (2007) The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain* 130:2037-2044.

Giordano C, Pichiorri F, Blakely EL, Perli E, Orlandi M, Gallo P, Taylor RW, Inghilleri M, d'Amati G (2010) Isolated distal myopathy of the upper limbs associated with mitochondrial DNA depletion and polymerase gamma mutations. *Arch Neurol* 67:1144-1146.

Goto Y, Tojo M, Tohyama J, Horai S, Nonaka I (1992) A novel point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in a family with mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 31:672-675.

Grafakou O, Hol FA, Otfried Schwab K, Siers, MH, Ter Laak H, Trijbels F, Ensenauer R, Boelen C, Smeitink J (2003) Exercise intolerance, muscle pain and lactic acidemia associated with a 7497G>A mutation in the tRNA^{Ser(UCN)} gene. *J Inherit Metab Dis* 26:593-600.

Hadjigeorgiou GM, Kim SH, Fischbeck KH, Andreu AL, Berry GT, Bingham P, Shanske S, Bonilla E, DiMauro S (1999) A new mitochondrial DNA mutation (A3288G) in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with familial myopathy. *J Neurol Sci* 164:153-157.

Helm M, Brulé H, Friede D, Giegé R, Pütz D, Florentz C (2000) Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA* 6:1356-1379.

Herbst A, Pak JW, McKenzie D, Bua E, Bassiouni M, Aiken JM (2007) Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:235-245.

Hoefs SJG, Rodenburg RJ, Smeitink JAM, van den Heuvel LP (2012) Molecular base of biochemical complex I deficiency. *Mitochondrion* 12:520-532.

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331:717-719.

Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen 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.

Human Mitochondrial Genome Database

<http://www.mtodb.igp.uu.se> (zuletzt aufgerufen mit letztem Update vom 01.03.2007)

Jaksch M, Klopstock T, Kurlermann G, Dörner M, Hofmann S, Kleinle S, Hegemann S, Weissert M, Müller-Höcker J, Pongratz D, Gerbitz KD (1998) Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the tRNA^{Ser(UCN)} gene. *Ann Neurol* 44:635-640.

Jaksch M, Lochmüller H, Schmitt F, Volpel B, Obermaier-Kusser B, Horvath R (2001) A mutation in mt tRNA^{Leu(UUR)} causing a neuropsychiatric syndrome with depression and cataract. *Neurology* 57:1930-1931.

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.

Kleinle S, Schneider V, Moosmann P, Brandner S, Krähenbühl S, Liechti-Gallati S (1998) A novel mitochondrial tRNA^{Phe} mutation inhibiting anticodon stem formation associated with a muscle disease. *Biochem Biophys Res Commun* 247:112-115.

Kleist-Retzow JC, Kornblum C (2009) Mitochondriale Erkrankungen: Eine klinische und diagnostische Herausforderung. *Med Genet* 21:358-366.

Kornblum C: Mitochondriale Erkrankungen. In: Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Hrsg) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2012.

<http://www.dgn.org/leitlinien/2385-II-20-2012-mitochondriale-erkrankungen>

Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Müller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S (2005) Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain* 128:1870-1876.

Lax NZ, Gnanapavan S, Dowson SJ, Alston CL, He L, Polvikoski TM, Jaros E, O'Donovan DG, Yarham JW, Turnbull DM, Dean AF, Taylor RW (2013) Early-onset cataracts, spastic paraparesis, and ataxia caused by a novel mitochondrial tRNA^{Glu} (MT-TE) gene mutation causing severe complex I deficiency: a clinical, molecular, and neuropathologic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:164-175.

Lehmann D, Schubert K, Joshi PR, Baty K, Blakely EL, Zierz S, Taylor RW, Deschauer M (2015a) A novel m.7539C>T point mutation in the mt-tRNA^{Asp} gene associated with multisystemic mitochondrial disease. *Neuromuscul Disord* 25:81-84.

Lehmann D, Schubert K, Joshi PR, Hardy SA, Tuppen HAL, Baty K, Blakely EL, Bamberg C, Zierz S, Deschauer M, Taylor RW (2015b) Pathogenic mitochondrial mt-tRNA^{Ala} variants are uniquely associated with isolated myopathy. *Eur J Hum Genet* 12:1735-1738.

Leshinsky-Silver E, Michelson M, Cohen S, Ginsberg M, Sadeh M, Barash V, Lerman-Sagie T, Lev D (2008) A defect in the thymidine kinase 2 gene causing isolated mitochondrial myopathy without mtDNA depletion. *Eur J Paediatr Neurol* 12:309-313.

Longley MJ, 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 gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 78:1026-1034.

Mamit-tRNA: Compilation of mammalian mitochondrial tRNA genes. Human mt tRNAs & Pathologies.

<http://mamit-trna.u-strasbg.fr/mutations.asp?idAA=7> (10.10.2013, 11.52 Uhr)

<http://mamit-trna.u-strasbg.fr/mutations.asp?idAA=11> (10.10.2013, 11.53 Uhr)

Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camaño P, Marina A, Bacman S, Moraes CT, Carlo JR, Garcia M, Garcia-Alvarez M, Monzon L, Naini AB, Hirano M, Bonilla E, Taratuto AL, DiMauro S, Vu TH (2002) Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology* 59:1197-1202.

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.

Mao CC and Holt IJ (2009) Clinical and Molecular Aspects of Diseases of Mitochondrial DNA instability. *Chang Gung Med J* 32:354-369.

Mayr JA, Haack TB, Freisinger P, Karall D, Makowski C, Koch J, Feichtinger RG, Zimmermann FA, Rolinski B, Ahting U, Meitinger T, Prokisch H, Sperl W (2015) Spectrum of combined respiratory chain defects. *J Inherit Metab Dis* 38:629-640.

McFarland R, Elson JL, Taylor RW, Howell N, Turnbull DM (2004) Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when 'definitely maybe' is not good enough. *Trends Genet* 20:591-596.

McFarland R, Swalwell H, Blakely EL, He L, Groen EJ, Turnbull DM, Bushby KM, Taylor RW (2008) The m.5650G>A mitochondrial tRNA^{Ala} mutation is pathogenic and causes a phenotype of pure myopathy. *Neuromuscul Disord* 18:63-67.

Meulemans A, De Paepe B, De Bleecker J, Smet J, Lissens W, Van Coster R, De Meirleir L, Seneca S (2007) Two novel mitochondrial DNA mutations in muscle tissue of a patient with limb-girdle myopathy. *Arch Neurol* 64:1339-1343.

MITOMAP: a human mitochondrial genome database.

<http://www.mitomap.org/MITOMAP> (zuletzt aufgerufen mit Stand vom 09.01.2015)

Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Ionasescu V, Schon EA, DiMauro S (1993) A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat Genet* 4:284-288.

Müller T, Deschauer M, Neudecker S, Zierz S (2005) Late-onset mitochondrial myopathy with dystrophic changes due to a G7497A mutation in the mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} gene. *Acta Neuropathol* 110:426-430.

Müller-Höcker J, Horvath R, Schäfer S, Hessel H, Müller-Felber W, Kühr J, Copeland WC, Seibel P (2011) Mitochondrial DNA depletion and fatal infantile hepatic failure due to mutations in the mitochondrial polymerase γ (POLG) gene: a combined morphological/enzyme histochemical and immunocytochemical/biochemical and molecular genetic study. *J Cell Mol Med* 15:445-456.

Nishino I, Spinazzola A, Hirano M (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283:689-692.

Oldfors A, Larsson NG, Lindberg C, Holme E (1993) Mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. *Brain* 116:325-336.

Petty RK, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1986) The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain* 109:915-938.

Pinós T, Marotta M, Gallardo E, Illa I, Díaz-Manera J, Gonzalez-Vioque E, García-Arumí E, Andreu AL, Martí R (2011) A novel mutation in the mitochondrial tRNA^{Ala} gene (m.5636T>C) in a patient with progressive external ophthalmoplegia. *Mitochondrion* 11:228-233.

Pütz J, Dupuis B, Sissler M, Florentz C (2007) Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. *RNA* 13:1184-1190.

Rifai Z, Welle S, Kamp C, Thornton CA (1995) Ragged red fibers in normal aging and inflammatory myopathy. *Ann Neurol* 37:24-29.

Rokicka A (2011) Long-Range-Polymerasekettenreaktion-Untersuchungen bei Patienten mit chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie und unterschiedlicher Multisystembeteiligung. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* 370:751-762.

Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 29:342-344.

Sacconi S, Salviati L, Gooch C, Bonilla E, Shanske S, DiMauro S (2002) Complex neurologic syndrome associated with the G1606A mutation of mitochondrial DNA. *Arch Neurol* 59:1013-1015.

Salviati L, Sacconi S, Mancuso M, Otaegui D, Camaño P, Marina A, Rabinowitz S, Shiffman R, Thompson K, Wilson CM, Feigenbaum A, Naini AB, Hirano M, Bonilla E, DiMauro S, Vu TH (2002) Mitochondrial DNA depletion and dGK gene mutations. *Ann Neurol* 52:311-316.

Santorelli FM, Sciacco M, Tanji K, Shanske S, Vu TH, Golzi V, Griggs RC, Mendell JR, Hays AP, Bertorini TE, Pestronk A, Bonilla E, DiMauro S (1996) Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: a study of 56 patients. *Ann Neurol* 39:789-795.

Schon EA, DiMauro S, Hirano M (2012) Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 13:878-890.

Schon EA, Manfredi G (2003) Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 111:303-312.

Schrier SA, Wong LJ, Place E, Ji JQ, Pierce EA, Golden J, Santi M, Anninger W, Falk MJ (2012) Mitochondrial tRNA-serine (AGY) m.C12264T mutation causes severe multisystem disease with cataracts. *Discov Med* 13:143-150.

Schwartz M, Vissing J (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347:576-580.

Sciacco 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.

Seneca S, Goemans N, Van Coster R, Givron P, Reybrouck T, Sciote R, Meulemans A, Smet J, Van Hove JLK (2005) A mitochondrial tRNA aspartate mutation causing isolated mitochondrial myopathy. *Am J Med Genet A* 137:170-175.

Shtilbans A, El-Schahawi M, Malkin E, Shanske S, Musumeci O, DiMauro S (1999) A novel mutation in the mitochondrial DNA transfer ribonucleic acid^{Asp} gene in a child with myoclonic epilepsy and psychomotor regression. *J Child Neurol* 14:610-613.

Silvestri G, Rana M, DiMuzio A, Uncini A, Tonali P, Servidei S (1998) A late-onset mitochondrial myopathy is associated with a novel mitochondrial DNA (mtDNA) point mutation in the tRNA^{Trp} gene. *Neuromuscul Disord* 8:291-295.

Spagnolo M, Tomelleri G, Vattermi G, Filosto M, Rizzuto N, Tonin P (2001) A new mutation in the mitochondrial tRNA^{Ala} gene in a patient with ophthalmoplegia and dysphagia. *Neuromuscul Disord* 11:481-484.

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, Croxen 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.

Sternberg D, Chatzoglou E, Laforêt P, Fayet G, Jardel C, Blondy P, Fardeau M, Amselem S, Eymard B, Lombès A (2001) Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain* 124:984-994.

Sundaralingam M: The Structure, Conformation and Interaction of tRNA. In: Schimmel P et al. (eds): *Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1979, pp. 115-132.

Suomalainen A, Isohanni P (2010) Mitochondrial DNA depletion syndromes: many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord* 20:429-437.

Swalwell H, Deschauer M, Hartl H, Strauss M, Turnbull DM, Zierz S, Taylor RW (2006) Pure myopathy associated with a novel mitochondrial tRNA gene mutation. *Neurology* 66:447-449.

Taanman JW (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410:103-123.

Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, d'Amati G, Bain H, Hayes CM, Leonard H, Barron MJ, Casali C, Santorelli FM, Hirano M, Lightowlers RN, DiMauro S, Turnbull DM (2003) A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 41:1786-1796.

Taylor RW, Schaefer AM, McFarland R, Maddison P, Turnbull DM (2002) A novel mitochondrial DNA tRNA^{Ile} (A4267G) mutation in a sporadic patient with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 12:659-664.

Taylor RW, Taylor GA, Durham SE, Turnbull DM (2001) The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *Nucleic Acids Res* 29:E74-4.

Tuppen HAL, Naess K, Kennaway NG, Al-Dosary M, Lesko N, Yarham JW, Bruhn H, Wibom R, Nennesmo I, Weleber RG, Blakely EL, Taylor RW, McFarland R (2012) Mutations in the mitochondrial tRNA^{Ser(AGY)} gene are associated with deafness, retinal degeneration, myopathy and epilepsy. *Eur J Hum Genet* 20:897-904.

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.

Valente L, Piga D, Lamantea E, Carrara F, Uziel G, Cudia P, Zani A, Farina L, Morandi L, Mora M, Spinazzola A, Zeviani M, Tiranti V (2009) Identification of novel mutations in five patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1787:491-501.

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.

Vissing J, Salamon MB, Arlien-Soborg P, Norby S, Manta P, DiMauro S, Schmalbruch H (1998) A new mitochondrial tRNA^{Met} gene mutation in a patient with dystrophic muscle and exercise intolerance. *Neurology* 50:1875-1878.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas II LJ, Nikoskelainen EK (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242:1427-1430.

Weber K, Wilson JN, Taylor L, Brierley E, Johnson MA, Turnbull DM, Bindoff LA (1997) A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60:373-380.

White HE, Durston VJ, Seller A, Fratter C, Harvey JF, Cross NCP (2005) Accurate detection and quantitation of heteroplasmic mitochondrial point mutations by pyrosequencing. *Genet Test* 9:190-199.

Wittenhagen LM, Kelley SO (2003) Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci* 28:605-611.

Wong LJC, Liang MH, Kwon H, Park J, Bai RK, Tan DJ (2002) Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. *Clin Chem* 48:1901-1912.

Yamamoto M (1996) Did de novo MELAS common mitochondrial DNA point mutation (mtDNA 3243, A→G transition) occur in the mother of a proband of a Japanese MELAS pedigree? *J Neurol Sci* 135:81-84.

Yarham JW, Al-Dosary M, Blakely EL, Alston CL, Taylor RW, Elson JL, McFarland R (2011) A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations. *Hum Mutat* 32:1319-1325.

Yarham JW, Elson JL, Blakely EL, McFarland R, Taylor RW (2010) Mitochondrial tRNA mutations and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1:304-324.

Yarham JW, McFarland R, Taylor RW, Elson JL (2012) A proposed consensus panel of organisms for determining evolutionary conservation of mt-tRNA point mutations. *Mitochondrion* 12:533-538.

Yikrazuul, The tRNA cloverleaf general, 15.07.2015, 20.00 Uhr.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_tRNA_cloverleaf_general.svg

Zifa E, Giannouli S, Theotokis P, Stamatis C, Mamuris Z, Stathopoulos C (2007) Mitochondrial tRNA mutations: clinical and functional perturbations. *RNA Biol* 4:38-66.

8 Thesen

1. Die drei neu identifizierten Punktmutationen m.5610G>A, m.5631G>A und m.7539C>T sind sicher pathogen.
2. Nur bei einem Teil der Patienten, die das charakteristische myohistologische Bild einer mosaikartigen Verteilung von Cytochrom-c-Oxidase negativen Fasern und Cytochrom-c-Oxidase positiven Fasern für eine Mitochondriopathie mit mtDNA-Defekt aufweisen, finden sich pathogene Mutationen der mtDNA.
3. Eine mitochondriale Myopathie kann einen sehr späten Krankheitsbeginn aufweisen und erst im fortgeschrittenen Erwachsenenalter symptomatisch werden.
4. Punktmutationen im mt-tRNA^{Ala}-Gen sind vorwiegend mit einer isolierten mitochondrialen Myopathie assoziiert.
5. Punktmutationen im mt-tRNA^{Asp}-Gen finden sich am ehesten bei einer Mitochondriopathie mit multisystemischer Beteiligung.
6. Der Schwellenwert für eine Schädigung der oxidativen Phosphorylierung für die Punktmutationen m.5610G>A und m.5631G>A in der tRNA^{Ala} ist sehr hoch.
7. Der Schwellenwert für eine Schädigung der oxidativen Phosphorylierung für die Punktmutationen m.7539C>T in der tRNA^{Asp} ist sehr hoch.

9 Anhang

Tabelle 21: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 1

	Fragment	Polymorphismus
Patient 1	1	750 A>G
	2	1438 A>G
	4	2706 A>G 3010 G>A
	6	4216 T>C
	7	4769 A>G
	11	7028 C>T
	14	8839 G>A 8860 A>G
	16	10398 A>G
	18	11251 A>G
	19	11719 G>A
	20	12612 A>G
	22	13708 G>A
	23	14766 C>T 14798 T>C
	24	15326 A>G
	25	15452 C>A
	D1	16069 C>T 16126 T>C
	D2	73 A>G 189 A>G 228 G>A 263 A>G 295 C>T
	D3	462 C>T 489 T>C
Gesamt:		27

Tabelle 22: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 2

	Fragment	Polymorphismus
Patient 2	1	750 A>G
	2	1438 A>G
	4	2706 A>G 3010 G>A
	6	4216 T>C
	7	4769 A>G
	11	7028 C>T
	14	8860 A>G
	16	10398 A>G
	18	11251 A>G
	19	11719 G>A
	20	12612 A>G 12768 A>G
	22	13708 G>A
	23	14766 C>T 14798 T>C
	24	15326 A>G
	25	15452 C>A
	D1	16069 C>T 16126 T>C
	D2	73 A>G 185 G>A 188 A>G 228 G>A 234 A>G 263 A>G 295 C>T
	D3	462 C>T 489 T>C
Gesamt:		29

Tabelle 23: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 3

	Fragment	Polymorphismus
Patient 3	1	750 A>G
	2	1438 A>G 1721 C>T
	4	2706 A>G
	5	3197 T>C
	7	4732 A>G 4769 A>G
	11	7028 C>T
	12	7768 A>G
	18	11467 A>G
	19	11719 G>A 12196 C>T 12308 A>G
	20	12372 G>A 12879 T>C
	22	13617 T>C 13637 A>G 14182 T>C
	23	14766 C>T
	24	15326 A>G
	25	15511 T>C
	D1	16148 C>T 16192 C>T
	D2	73 A>G 150 C>T 263 A>G
Gesamt:		26

Tabelle 24: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 4

Patient 4	Fragment	Polymorphismus
	1	709 G>A 750 A>G
	2	1438 A>G 1719 G>A
	3	1888 G>A
	4	2706 A>G
	6	4216 T>C
	7	4418 T>C 4769 A>G
	8	4917 A>G
	11	7028 C>T
	14	8697 G>A 8860 A>G
	16	9899 T>C 10463 T>C
	18	11251 A>G
	19	11719 G>A 12239 C>T
	20	12633 C>A
	21	13368 G>A
	23	14766 C>T 14905 G>A
	24	15326 A>G
	25	15452 C>A 15607 A>G 15928 G>A
	D1	16126 T>C 16186 C>T 16188 T>C 16294 C>T 16519 T>C
	D2	73 A>G 152 T>C 195 T>C 263 A>G
	D3	576 A>AA 709 G>A
	Gesamt:	37

Tabelle 25: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 5

Patient 5	Fragment	Polymorphismus
	1	750 A>G
	2	1438 A>G
	7	4336 T>C 4769 A>G
	9	5839 C>T
	14	8860 A>G
	24	15326 A>G
	D1	16126 T>C 16213 G>A 16304 T>C
	D2	263 A>G 303 C>CC 311 C>CC
	D3	456 C>T
Gesamt:		14

Tabelle 26: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 6

Patient 6	Fragment	Polymorphismus
	1	750 A>G
	2	1438 A>G 1719 G>A
	4	2706 A>G 2849 G>A
	7	4529 A>T 4769 A>G
	11	7028 C>T
	13	8251 G>A
	14	8860 A>G
	16	10034 T>C 10238 T>C 10398 A>G
	19	11719 G>A
	20	12501 G>A 12705 C>T
	22	13780 A>G
	23	14766 C>T
	24	15043 G>A 15326 A>G
	25	15924 A>G
	D1	16086 T>C 16129 G>A 16223 C>T 16391 G>A 16519 T>C
	D2	42 T>TG 73 A>G 152 T>C 199 T>C 204 T>C 207 G>A 239 T>C 250 T>C 263 A>G 303 C>CC 311 C>CC
	D3	518 C>CACACAC 573 C-C(6)
	Gesamt:	39

Tabelle 27: identifizierte Polymorphismen in der mtDNA von Patient 7

Patient 7	Fragment	Polymorphismen
	1	750 A>G
	2	1438 A>G
	7	4769 A>G 4793 A>G
	8	5046 G>A
	14	8860 A>G
	24	15326 A>G
	D1	16519 T>C
	D2	152 T>C 263 A>G
Gesamt:		10

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Schubert
Vorname: Kathrin
Geburtsdatum: 18.09.1989
Geburtsort: Potsdam
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

2000 - 2008 Romain-Rolland-Gymnasium Dresden, Abschluss: Abitur
1996 - 2000 124. Grundschule Dresden

Hochschulausbildung:

Aktuell Promotionsstudium
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

seit April 2011 Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. med. Marcus Deschauer
*Klinik und Poliklinik für Neurologie des
Universitätsklinikums Halle/Saale*

29.06.2015 Ärztliche Approbation

10/2008-05/2015 Studium der Humanmedizin
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

Ort, Datum

Unterschrift: Kathrin Schubert

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit „Molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit Mitochondriopathie mittels Sequenzierung des mitochondrialen Genoms“ 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. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.2009).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift: Kathrin Schubert

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit Mitochondriopathie mittels Sequenzierung des mitochondrialen Genoms“ zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) erstmalig einreiche und keine früheren Promotionsversuche von mir, Kathrin Schubert, mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es liegt nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens vor.

Ort, Datum

Unterschrift: Kathrin Schubert

Danksagung

Zunächst möchte ich Allen einen Dank aussprechen, die mir die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Marcus Deschauer für die Überlassung des spannenden Themas und seine stetige Beratung, Unterstützung und zahlreichen Hilfestellungen bei der experimentellen Arbeit im Labor sowie bei der Verfassung dieser Dissertation.

Vielen Dank für die sehr angenehme Zusammenarbeit und Betreuung, und dass Sie mir bei all meinen Fragen immer hilfreich zur Seite standen.

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

Besonders möchte ich mich bei Pushpa für seine durchgehende Zuarbeit bei der praktischen Ausführung im Labor und seine tatkräftige Unterstützung während des Schreibens dieser Arbeit bedanken. Deine Hilfe vor Ort hat mir vieles erleichtert.

Frau Dr. Darmer und allen Beteiligten aus dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Unterstützung bei der Sequenzierung der mtDNA aller Patienten, wodurch das Auffinden neuer Mutationen überhaupt erst möglich wurde.

Einen großen Dank möchte ich den Mitarbeitern aus dem Muskellabor, vor allem Thekla Wangemann und Kathleen Zietz, für Ihre Arbeit, Hilfestellungen, Ratschläge und Beantwortung vieler Fragen aussprechen. Bis zuletzt konnte ich auf eure Hilfe zählen.

Ich danke auch Diana Lehmann für Ihre Arbeit in Newcastle sowie allen beteiligten Mitarbeitern des Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research der Universität Newcastle, insbesondere Herrn Prof. Taylor, für Ihre Zusammenarbeit und zusätzlich durchgeführten Analysen.

Bei Herrn Dr. med. Bamberg bedanke ich mich für die klinische Beurteilung seiner Patientin und für die Unterstützung bei der Gewinnung von DNA-Material der Familienmitglieder, wodurch weitere molekulargenetische Analysen möglich wurden. Zudem gilt mein Dank allen Kollegen, die zur klinischen Beurteilung und Einschätzung der Patienten beigetragen haben.

Ich danke auch allen beteiligten Patienten und Ihren Familien für Ihre Teilnahme und Zustimmung zur Verwendung Ihrer DNA für wissenschaftliche Analysen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich weder das Medizinstudium noch diese Dissertation hätte verwirklichen können. Danke, dass ihr mir bei all meinen Vorhaben uneingeschränkt zur Seite steht und ich mich immer auf eure Hilfe verlassen kann.

Meinem Freund Matthias möchte ich für seine Anregungen beim Verfassen dieser Arbeit und für seine großartige Hilfestellung bei der Formatierung danken. Du hast mir damit viel Ärger erspart.

Danken möchte ich auch für allen Zuspruch und die Motivation, die ich von vielen Seiten in der gesamten Zeit erhalten habe.