

**Muskulärer Beschwerdekomples mit  
Nachweis multipler Deletionen der mitochondrialen DNA –**

**Eigene mitochondriale Krankheitsentität, „Altersmyopathie“ oder alters-  
assoziierter Normalbefund ?**

**Eine systematische Analyse**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Jana Carina Litschko  
aus Heilbronn

2012

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Cornelia Kornblum
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.Juni 2012

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. Thomas Klockgether

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>- 8 -</b>
1.1 Allgemeine Funktion der Mitochondrien .....	- 8 -
1.2 Die mitochondriale DNA.....	- 8 -
1.3 Mutationen der mitochondrialen DNA .....	- 10 -
1.4 Mutationen der nukleären DNA mit Einfluss auf die mitochondriale Funktion.....	- 12 -
1.5 Klassische mitochondriale Krankheitsbilder .....	- 14 -
1.6 Isolierte mitochondriale Myopathie (IMM) .....	- 16 -
1.7 Rolle der Mitochondrien im Rahmen des Alterungsprozesses .....	- 18 -
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	- 20 -
<b>2 Methoden und Materialien.....</b>	<b>- 22 -</b>
2.1 Probenauswahl.....	- 23 -
2.2 Histologische Aufarbeitung .....	- 25 -
2.3 Biochemische Messung der Atmungskettenenzymaktivität .....	- 28 -
2.4 DNA-Extraktion .....	- 30 -
2.5 Konzentrationsmessung .....	- 30 -
2.6 PCR Analyse multipler Deletionen .....	- 31 -
2.6.1 Long range PCR.....	- 31 -
2.6.2 Single molecule PCR .....	- 32 -
2.7 Genetische Analyse der Polymerase $\gamma$ (POLG1) .....	- 35 -
2.7.1 PCR .....	- 35 -
2.7.2 Restriktionsverdau.....	- 36 -
2.8 Gelelektrophorese .....	- 37 -
2.8.1 Agarosegel.....	- 37 -
2.8.2 Polyacrylamidgel .....	- 37 -

<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>- 38 -</b>
3.1 Klinische Darstellung der Patienten .....	- 38 -
3.2 Analyse des muskulären Phänotyps bei Patienten mit isoliertem muskulären Beschwerdekomplex.....	- 40 -
3.2.1 Histologische Auswertung der Skelettmuskelbiopsien .....	- 40 -
3.2.2 Mitochondriale Enzymaktivität im Skelettmuskel.....	- 43 -
3.3 Long range PCR-Analyse bei Patienten und Kontrollen .....	- 44 -
3.3.1 Qualitative Analyse der IrPCR-Ergebnisse .....	- 44 -
3.3.2 Software gestützte quantitative Auswertung der IrPCR-Ergebnisse.....	- 46 -
3.4 smPCR-Analyse bei Patienten und Kontrollen .....	- 46 -
3.4.1 Ergebnisse der smPCR .....	- 47 -
3.4.2 Kalibrierung der IrPCR-Ergebnisse mittels smPCR .....	- 50 -
3.5 Endergebnisse der Deletionsanalyse.....	- 52 -
3.6 Analyse des Polymerase- $\gamma$ Gens (POLG1) .....	- 54 -
3.7 Einfluss des Lebensalters auf Phänotyp und Genotyp .....	- 55 -
3.7.1 Beeinflussung der histochemischen und biochemischen Befunde durch das Alter.....	- 55 -
3.7.2 Einfluss des Lebensalters auf multiple Deletionen .....	- 56 -
3.8 Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Beziehung.....	- 61 -
3.8.1 Einfluss multipler Deletionen der mtDNA auf histologische Befunde.....	- 61 -
3.8.2 Einfluss multipler Deletionen der mtDNA auf OXPHOS-Enzymaktivitäten .....	- 62 -
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>- 65 -</b>
4.1 Klinische, histologische und biochemische Analysen.....	- 65 -
4.1.1 Gegenüberstellung von Patientenbefunden, Normwerten und Kontrollbefunden aus der Literatur .....	- 65 -
4.1.2 Gegenüberstellung der Patientenbefunde und Befunde anderer mitochondrialer und muskulärer Erkrankungen.....	- 67 -
4.2 Analyse der multiplen Deletionen.....	- 67 -
4.2.1 Gegenüberstellung von Patienten- und Kontrollbefunden.....	- 67 -
4.2.2 Gegenüberstellung der Patientenbefunde und Befunde anderer mitochondrialer Erkrankungen.....	- 69 -
4.3 Beeinflussung der histologischen, biochemischen und molekulargenetischen Befunde durch das Lebensalter .....	- 69 -

4.4 Funktionelle Relevanz der multiplen Deletionen .....	- 71 -
4.4.1 Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Korrelation .....	- 71 -
4.4.2 Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse .....	- 72 -
4.5 Erkenntnisse dieser Studie und Ausblick .....	- 74 -
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>- 76 -</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 78 -</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare ( <i>basepairs</i> )
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CPEO	chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CS	Citratsynthase
DAB	Diaminobenzidinetetrahydrochlorid
D-loop	Kontrollregion der mtDNA u.a. mit Replikationsinitiation ( <i>displacement-loop</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETC	Elektronentransportkette ( <i>electron transport chain</i> )
IMM	isolierte mitochondriale Myopathie
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
lrPCR	Polymerasekettenreaktion für große DNA-Abschnitte ( <i>long range PCR</i> )
MH	maligne Hyperthermie
MNGIE	mitochondriale neurogastrointestinale Encephalomyopathie
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
O <sub>H</sub>	Replikationsursprung des H-Strangs
O <sub>L</sub>	Replikationsursprung des L-Strangs
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase-chain-reaction</i> )
ROC	Bewertung von Analysekrterien ( <i>receiver operating characteristic</i> )
ROS	Sauerstoffradikale ( <i>reactive oxygen species</i> )
RRF	<i>ragged red fibers</i>
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDH	Succinatdehydrogenase
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
s-IBM	sporadische Einschlusskörperchenmyositis ( <i>sporadic inclusion body myositis</i> )
smPCR	Polymerasekettenreaktion von Einzelmolekülen ( <i>single molecule PCR</i> )
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

# 1 Einleitung

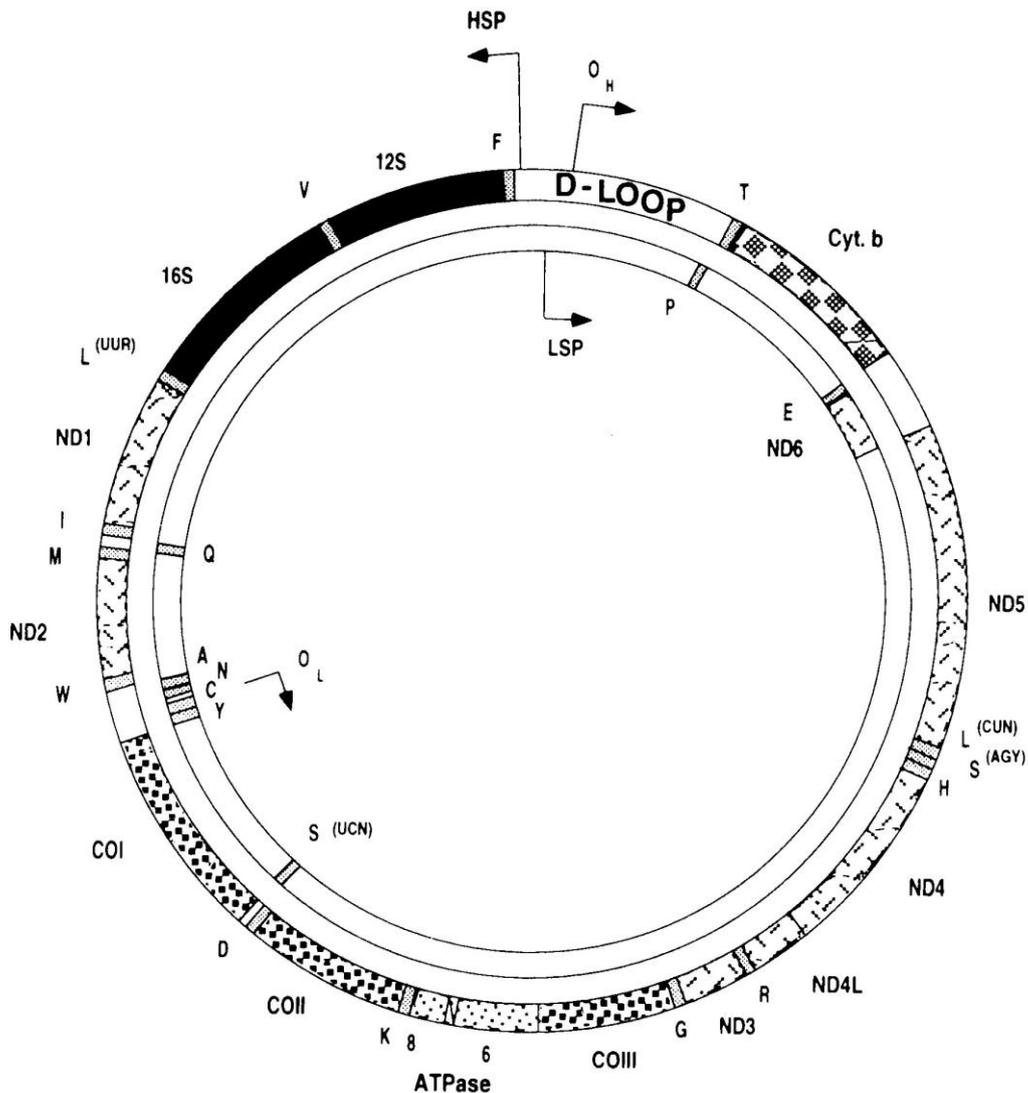
## 1.1 Allgemeine Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryontischer Zellen. Laut der Endosymbiontentheorie entwickelten sie sich aus einer Symbiose zwischen eukaryontischen Vorläuferzellen und aeroben prokaryontischen Bakterien, weshalb sie auch heute noch im Zytosol von einer Doppelmembran umgeben vorliegen (Gray et al., 1999; Wallace, 2005). Ihre zentrale Funktion ist die zelluläre Energieproduktion sowohl über die  $\beta$ -Oxidation und den Zitratzyklus, die beide in der mitochondrialen Matrix ablaufen, als auch über die in der inneren mitochondrialen Membran eingebettete Atmungskette, mit deren Hilfe die Produktion von ATP durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) stattfindet. Das OXPHOS-System besteht aus der Elektronentransportkette (ETC), aufgebaut aus den Multienzymkomplexen I bis IV sowie der ATP-Synthase (Komplex V). An der Funktion der ETC sind außerdem zwei Elektronentransportmoleküle, das Coenzym  $Q_{10}$  und Cytochrom-*c* beteiligt (Wallace, 1999). Daneben spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle in zahlreichen anderen essentiellen Zellstoffwechselfvorgängen, der zellulären Calcium-Homöostase und in den pathways des programmierten Zelltods (Apoptose). Eukaryontische Zellen enthalten in Abhängigkeit vom Gewebetyp und dem daraus resultierenden Energiebedarf eine unterschiedliche Anzahl an Mitochondrien (Schapira, 2006).

## 1.2 Die mitochondriale DNA

Mitochondrien besitzen ein in mehrfacher Kopie vorliegendes eigenes Genom (Polyploidie) und sind damit Träger der einzigen extrachromosomalen DNA innerhalb einer menschlichen Zelle (Taylor and Turnbull, 2005). Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist ein zirkuläres, doppelsträngiges Molekül bestehend aus 16.569 Basenpaaren (bp) (Anderson et al., 1981). Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der beiden DNA-Stränge unterscheidet man zwischen dem H-Strang (heavy) und dem L-Strang (light). Die mtDNA weist eine sehr hohe Gendichte auf. Sie kodiert 13 Proteine der Atmungskette (mitochondrial kodierte Untereinheiten der Multienzymkomplexe), sowie wichtige Bestandteile der mitochondrialen Translation (22 mitochondriale tRNAs und 2 rRNAs). Einzige längere nichtkodierende Region der mtDNA ist der *displacement loop* (D-loop), auf dem essentielle Sequenzen für die Initiation der Replikation sowie der Transkription der mtDNA lokalisiert sind (Taylor and Turnbull, 2005).

Trotz der wichtigen Funktion der mtDNA wird ein Großteil der mind. 4000 mitochondrialen Proteine im Nukleus kodiert. Diese werden im Zytosol synthetisiert und über spezifische Transporter in das Mitochondrium geschleust (Lang et al., 1999). Somit stehen Mitochondrien unter der dualen Kontrolle von mitochondrialer und nukleärer DNA.



**Abb. 1: Das menschliche mitochondriale Genom.** Gezeigt ist der H-Strang (äußerer Kreis) und der L-Strang (innerer Kreis) mit den Genen für die Untereinheiten der Komplexe I (ND1-6), III (Cyt. B), IV (COI-III) und V (6, 8), sowie den Genen für die 12S und 16S rRNAs. Die Gene für die 22 tRNAs sind durch einzelne Großbuchstaben gekennzeichnet, diese stehen für die jeweilige Aminosäure. O<sub>H</sub>: Replikationsursprung des H-Strangs, O<sub>L</sub>: Replikationsursprung des L-Strangs, HSP: H-Strang Promotor, LSP: L-Strang Promotor (Zeviani and Antozzi, 1997)

### 1.3 Mutationen der mitochondrialen DNA

#### Vererbungsmodi und funktionelle Folgen von mtDNA-Mutationen

Im Gegensatz zur nukleären DNA ist das mitochondriale Genom wesentlich häufiger von Mutationen betroffen (Pesole et al., 1999). Dies liegt unter anderem daran, dass im Rahmen der OXPHOS an der ETC regelmäßig reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Durch die Nähe zur ETC ist die mtDNA der Schädigung durch ROS in besonders hohem Maße ausgesetzt. Zudem weist die mtDNA im Vergleich zur nukleären DNA möglicherweise keine hinreichend schützenden Histone und ein wahrscheinlich vergleichsweise ineffizientes Reparatursystem auf. Somatische *de-novo* mtDNA Mutationen entstehen im Laufe des Lebens in zahlreichen Geweben und akkumulieren über die Zeit v.a. in postmitotischen Geweben wie Hirn, Skelettmuskel- oder Herzmuskel.

Bei mitochondrialen Erkrankungen können mtDNA Mutationen als Rearrangements, z.B. als singuläre Deletionen, als multiple Deletionen oder als Duplikationen der mtDNA, aber auch als mtDNA Punktmutationen in die mitochondriale Proteinsynthese *in toto* betreffenden Genen (z.B. tRNA-Genen) oder in direkt Protein-kodierenden Genen (wie den mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe) vorliegen. Singuläre Deletionen der mtDNA treten sporadisch auf oder werden zu 4 % maternal vererbt (Chinnery et al., 2004). Punktmutationen werden meist maternal vererbt oder treten selten sporadisch auf. Multiple mtDNA Deletionen sind meist Folge primär nukleärer Mutationen, die zu einer sekundären Instabilität der mtDNA führen (siehe unten), hier liegen autosomal dominante oder rezessive Erbgänge vor, auch ein sporadisches Auftreten wird vereinzelt beschrieben. MtDNA Punktmutationen und multiple Deletionen können jedoch auch bei Gesunden, in diesem Falle nicht als Folge primär nukleärer Mutationen, akkumulieren. Dies zeigt sich v.a. auf Einzelzellniveau in postmitotischen Geweben im Laufe des Lebens in geringerem Maße. Die Akkumulation entsteht einerseits durch fortlaufende somatische *de-novo* Mutationen, aber v.a. auch durch das Hochsegregieren einzelner Mutationen durch klonale Expansion bis zum Erreichen der methodischen Detektionsschwelle.

Während der Oogenese kommt es zu einer starken Reduzierung des Mitochondriengehalts in den Vorläuferzellen der Oozyten (genetischer mitochondrialer „*Bottleneck*“), nach einer nachfolgenden massiven Proliferationsphase der zunächst quantitativ reduzierten Mitochondrien und mtDNA haben die Oozyten selbst dann einen besonders großen Mitochondriengehalt und tragen bis zu 100.000 mtDNA Moleküle pro Zelle. Durch diesen „*Bottleneck*“ kann die Menge der übertragenen mutierten mtDNA von der Großmutter mütterlicherseits und der Mutter an die Nach-

kommen sehr variabel sein (Schapira, 2006). Eine eukaryontische Zelle kann bis zu mehreren tausend mtDNA-Moleküle enthalten. Sind in einer Zelle alle mtDNA-Kopien identisch, so spricht man von Homoplasmie. Liegen dagegen normale (Wildtyp-) und mutierte mtDNA-Moleküle in einer Zelle oder einem Gewebe nebeneinander vor, so bezeichnet man dies als Heteroplasmie (Taylor and Turnbull, 2005). Während der Zellteilung werden Wildtyp- und mutierte mtDNA zufällig auf die Tochterzellen verteilt, wodurch es zu unterschiedlichen quantitativen Ansammlungen der mutierten mtDNA in verschiedenen Zellen kommen kann (replikative Segregation). Mit der Zeit können Mutationen in verschiedenen Zelltypen akkumulieren, was bei Erreichen und Überschreiten eines spezifischen Schwellenwertes an Mutationslast zur funktionellen Beeinträchtigung der Zelle führt (Threshold-Effekt) (Hayashi et al., 1991; Porteous et al., 1998). Dieser Schwellenwert ist sowohl von der Mutationsform als auch vom Gewebetyp beeinflusst und ist dabei häufig umso niedriger, je stärker das Gewebe vom oxidativen Metabolismus abhängig ist. Obwohl Mitochondrien ubiquitär vorkommen, kann es aufgrund der replikativen Segregation und dem Threshold-Effekt zu einer gewebespezifischen klinischen Manifestation kommen (DiMauro and Schon, 2003).

### **Deletionen der mitochondrialen DNA**

Entsprechend ihrer Form unterscheidet man unter den mtDNA-Mutationen zwischen Rearrangements (Deletionen und Duplikationen) und Punktmutationen. Bei Erwachsenen haben bezüglich mitochondrialer Krankheitsbilder singuläre mtDNA Deletionen, primär nukleäre Mutationen und mitochondriale tRNA Punktmutationen die größte pathogenetische Relevanz (Kornblum, 2008).

Spricht man von einer Deletion der mtDNA, so fehlt ein bestimmter Teil des zirkulären mitochondrialen Genoms, was von einzelnen Basen bis zu mehreren Kilobasen reichen kann. Deletionen können aufgrund einer seltenen maternalen Vererbung (siehe oben) oder eines frühen somatischen Mutationsevents in verschiedenen Zellen und Geweben in gleicher Form auftreten (singuläre Deletion). Unterscheiden sich die Deletionen in Größe und Lokalisation innerhalb des mtDNA Moleküls hingegen von Zelle zu Zelle und Gewebe zu Gewebe, so spricht man von multiplen Deletionen, welche sporadisch oder auf Basis von nukleären Mutationen entstehen können (siehe auch Abschnitt 1.4) (Wallace, 2005). Die am häufigsten vorkommende Deletion ist die sogenannte *common deletion*, eine Deletion mit der Länge von 4977 bp, welche durch zwei 13 bp lange homologe *direct repeat*-Sequenzen flankiert ist (Zeviani et al., 1988). Im Allgemeinen befinden sich die meisten Deletionen auf dem *major arc*, dem Bereich zwischen dem Replikationsursprung des L-Strangs ( $O_L$ ) und des H-Strangs ( $O_H$ ) (siehe Abbildung 1) (Bua et al., 2006).

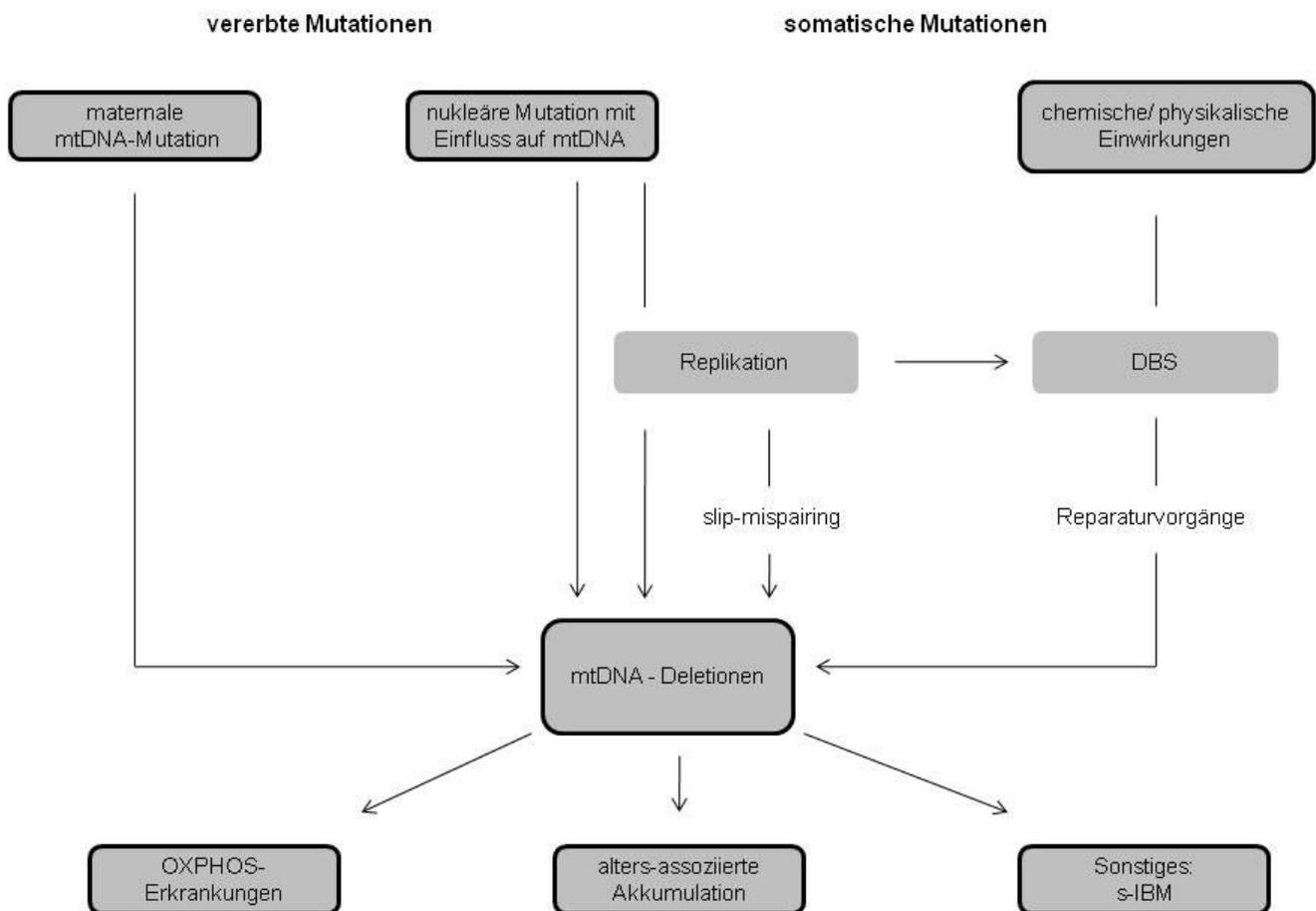
Bezüglich der Entstehung der mtDNA-Deletionen werden aktuell vor allem zwei Mechanismen diskutiert (siehe Abb. 2). Zum einen ist die Deletionsentstehung während der Replikation der mtDNA auf Basis eines *slip-mispairing* möglich. Dies wäre bei einer asynchronen Replikation aufgrund eines frei liegenden mtDNA-Strangs denkbar (Shoffner et al., 1989). Ein zweiter Mechanismus, der die Entstehung der Deletionen erklären könnte, basiert auf spezifischen Reparaturvorgängen von Doppelstrang-Brüchen der mtDNA (Srivastava and Moraes, 2005). Diese Doppelstrangbrüche können entweder durch Replikationsfehler oder aufgrund chemischer und physikalischer Einwirkungen wie UV-Strahlung, ionisierender Strahlung und ROS entstehen (Imlay and Linn, 1988; Krishnan et al., 2004; Murphy et al., 2005). Vor allem in Neuronen der Substantia nigra wurde eine starke ROS-Produktion sowie das Vorliegen von hohen Deletionslasten festgestellt (Bender et al., 2006). Der genaue Mechanismus der Deletionsentstehung konnte jedoch bis heute nicht eindeutig aufgeklärt werden, zumal nach wie vor unklar ist, ob in verschiedenen Geweben sowie im Rahmen von verschiedenen Pathogenesen die gleichen oder doch verschiedene Deletionsmechanismen eine Rollen spielen (Reeve et al., 2008; Guo et al., 2010).

#### **1.4 Mutationen der nukleären DNA mit Einfluss auf die mitochondriale Funktion**

Aufgrund der dualen Kontrolle der Mitochondrien existieren neben den primären Mutationen der mtDNA auch primär nukleäre, autosomal vererbte Mutationen, die pathogenetisch eine zunehmend bedeutende Rolle als Ursache mitochondrialer Erkrankungen spielen. Die nukleäre DNA kodiert nicht nur für einen Großteil der für die Atmungskette essentiellen Proteine wie nukleär kodierte Untereinheiten der Multienzymkomplexe oder OXPHOS-Assemblierungsproteine, sondern ist auch maßgeblich an Prozessen wie der intergenomischen Kommunikation sowie der mitochondrialen Replikation, Transkription und Proteinbiosynthese beteiligt (Schapira, 2006). Bei Mutationen in nukleären Genen kann es folglich zu sekundären Veränderungen der mtDNA kommen, welche sich qualitativ in Form von multiplen Deletionen oder quantitativ durch eine mtDNA-Depletion (reduzierte mtDNA-Kopien-Zahl pro Mitochondrium/Zelle oder Gewebe) zeigen (DiMauro and Schon, 2003). Bekannte nukleäre Gene, die für die quantitative Integrität der mtDNA verantwortlich sind und an der Aufrechterhaltung des mitochondrialen dNTP-Pools, dem Citratzyklus und der Replikation mitwirken und somit bei Mutation zu mtDNA-Depletion führen, sind: POLG1, PEO1 (Twinkle), ECGF1/TYMP, TK2, MPV17, SUCLG1, SUCLA2, RRM2B und DGUOK (Copeland, 2008; McFarland et al., 2010; Wong et al., 2010). Nukleäre Gene, die für die Integrität der mtDNA verantwortlich sind, und die im Mutationsfall zu sekundären multiplen mtDNA Deletionen führen, sind POLG1, POLG2, PEO1 (Twinkle), ANT1, OPA1, RRM2B und

ECGF1/TYMP. Diese Gene kodieren u.a. Proteine mit einer zentralen Funktion bei Replikations- und Reparaturvorgängen der mtDNA (Hirano et al., 2001; Spelbrink et al., 2001; Van Goethem et al., 2001; Tynismaa et al., 2009).

Einen Überblick über die verschiedenen Entstehungsmechanismen von mt-DNA Deletionen sowie damit assoziierte Phänotypen gibt die folgende Abbildung.



**Abb. 2: Mögliche Entstehungsmechanismen der mtDNA-Deletionen sowie Deletions-assoziierte Phänotypen (eigene Darstellung).** mtDNA: mitochondriale DNA, DBS: Doppelstrangbruch, OXPHOS: oxidative Phosphorylierung, s-IBM: sporadische Einschlusskörperchenmyositis

## 1.5 Klassische mitochondriale Krankheitsbilder

### Charakteristika mitochondrialer Krankheitsbilder

Mitochondriale Erkrankungen sind klinisch, biochemisch und genetisch heterogen und präsentieren sich häufig mit einer neurologischen Symptomatik. Mitochondriale Erkrankungen im eigentlichen, eng definierten Sinne umfassen klinische Syndrome, die mit einer Störung der OXPHOS einher gehen (OXPHOS-Erkrankungen). Das klinische Spektrum reicht von milden monosymptomatischen Verläufen im Erwachsenenalter bis zu schweren Multiorganaffektionen im frühen Kindesalter (Kornblum, 2008). Aktuelle Studien zeigen, dass mitochondriale Erkrankungen häufiger auftreten als bislang angenommen, so rechnet man mit einer minimalen Prävalenz von 13,1/ 100.000 (Skladal et al., 2003).

Als Korrelat einer mitochondrialen Funktionsstörung lassen sich häufig charakteristische histopathologische und histochemische Befunde in der Skelettmuskelbiopsie darstellen. Einen Hinweis auf eine massive Proliferation und Akkumulation von Mitochondrien, oft subsarkolemmal, geben beispielsweise die so genannten *ragged red fibers* (RRF), die in der Gomori-Trichromfärbung zu sehen sind.

Durch gezielte histochemische Enzymreaktionen lassen sich außerdem Cytochrom-c-Oxidase (COX)-negative Fasern darstellen, die auf eine verminderte Komplex IV Aktivität hinweisen. Die COX-negative Färbung einer Muskelfaser tritt auf wenn die Mutationslast die Schwelle zur biochemischen phänotypischen Expression überschreitet (Threshold-Effekt der Mutationen). Für heteroplasmische mtDNA Mutationen ist eine mosaikartige Verteilung von COX-positiven und COX-negativen Muskelfasern im Gewebe charakteristisch, da die Akkumulation der Mutationen sich von Zelle zu Zelle unterscheidet und somit die Überschreitung der Schwelle und damit die phänotypische Expression in den einzelnen Muskelfaser unabhängig von benachbarten Muskelfasern stattfindet (Johnson et al., 1983).

Mit Hilfe biochemischer Untersuchungen können darüber hinaus die Aktivität der einzelnen Atmungskettenkomplexe im Gewebshomogenat bestimmt und sowohl isolierte als auch komplexe Defekte der OXPHOS diagnostiziert werden (Taylor et al., 2004; Kleist-Retzow and Kornblum, 2009; McFarland et al., 2010).

## **Mitochondriale Erkrankungen auf dem Boden von mtDNA-Deletionen**

Wie oben bereits erwähnt stellen Deletionen die häufigste pathogenetische Grundlage von mitochondrialen Erkrankungen bei Erwachsenen dar (Wiesner et al., 2006). Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über häufige Krankheitsbilder auf Basis verschiedener Formen mitochondrialer Deletionen.

### **Chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO)**

Patienten mit CPEO oder *CPEOplus*, dem im Erwachsenenalter häufigsten mitochondrialen Krankheitsbild, zeigen als Leitsymptom eine meist bilaterale, oft asymmetrische Ptosis sowie eine progrediente Lähmung der äußeren Augenmuskeln. Bei der *CPEOplus* treten zusätzlich multisystemische Symptome auf, wobei muskuläre Belastungsintoleranz und/oder beinbetonte milde Paresen besonders häufig vorkommen (Kornblum, 2008). Während die Mehrzahl der CPEO-Patienten (ca. 50%) sporadische Erkrankungsfälle auf Basis von singulären mtDNA-Deletionen darstellen, sind zweithäufigste Ursachen nukleäre Mutationen in den Genen PEO1 (Twinkle) oder RRM2B. Seltener findet man mtDNA-Punktmutationen oder nukleäre Mutationen in den Genen POLG1, POLG2 oder ANT1, die zu sekundären multiplen mtDNA-Deletionen führen (Holt et al., 1988; Longley et al., 2006; Tynismaa et al., 2009). Beim OPA1-plus Syndrom auf Basis einer Mutation im OPA1-Gen mit sekundären mtDNA-Deletionen ist der Phänotyp der *CPEOplus* meist mit einer autosomal dominanten Optikusatrophie kombiniert (Ferraris et al., 2008).

### **Kearns-Sayre-Syndrom (KSS)**

Zu den obligaten Symptomen des KSS zählen das Vorliegen einer externen Ophthalmoplegie mit Ptosis, eine Retinopathie, sowie ein Krankheitsbeginn vor dem 20. Lebensjahr. Zusätzlich muss mindestens eines der folgenden Symptome vorhanden sein: kardiale Reizleitungsstörung, zerebelläre Ataxie, Liquoreiweißerhöhung. Das KSS tritt fast ausschließlich sporadisch auf und ist in 80% der Fälle auf singuläre mtDNA-Deletionen in Form der *common deletion* zurückzuführen (Kottlors, 2009).

### **Mitochondriale neurogastrointestinale Encephalomyopathie (MNGIE)**

Patienten mit MNGIE zeigen eine Kombination aus folgenden Symptomen: (1) gastrointestinale Motilitätsstörungen bei viszeraler Neuropathie, (2) externe Ophthalmoplegie und Ptosis, (3) sensomotorische Polyneuropathie und (4) asymptomatischer Leukenzephalopathie (Hirano et al., 2004). Die viszeralen Beschwerden zeigen dabei die schwerste Symptomatik. Sie reichen von wechselnden Phasen mit Diarrhoe und Obstipation über intestinale Pseudoobstruktion bis

zu Gastroparesen, was zu chronischer Malnutrition und Kachexie führt. Genetisch lässt sich die Erkrankung oft auf eine nukleäre, autosomal rezessiv vererbte Mutation im Thymidin-Phosphorylase-Gen ECGF1/TYMP zurückführen, wodurch es sekundär zu multiplen Deletionen und zur Depletion der mtDNA kommt (Nishino et al., 1999).

Neben den hier dargestellten Erkrankungen können Deletionen jedoch auch in Zusammenhang mit anderen mitochondrialen Enzephalomyopathien auftreten (Schapira, 2006). Desweiteren sind sekundäre mtDNA Deletionen im Rahmen von entzündlichen Muskelerkrankungen wie der sporadischen Einschlusskörperchenmyositis (s-IBM) beschrieben worden (siehe Abb. 2). Die hier exemplarisch aufgeführten mitochondrialen Krankheitsbilder machen deutlich, dass sich mitochondriale Erkrankungen in der Regel als Multisystemerkrankungen darstellen. Hingegen sind isolierte muskuläre Beschwerden im Rahmen von mitochondrialen Erkrankungen des Erwachsenenalters relativ selten.

## **1.6 Isolierte mitochondriale Myopathie (IMM)**

Die Isolierte Mitochondriale Myopathie (IMM) definiert sich durch einen Defekt der Atmungskette, der sich ausschließlich im Skelettmuskel zeigt. Klinisch äußert sich die IMM durch eine isolierte Muskelsymptomatik, eine muskuläre Belastungsintoleranz, häufig (oft milde) proximal und beinbetonte Paresen (Gliedergürtelsyndrom), Myalgien, Muskelcrampi und nach Belastung auftretende Rhabdomyolysen. Die myopathischen Symptome können schon seit der frühen Kindheit bestehen oder erst im Erwachsenenalter auftreten. In den letzten Jahren ist eine deutlich wachsende Zahl an beschriebenen IMM-Fällen in Zusammenhang mit sehr unterschiedlichen Mutationen zu verzeichnen.

Für die Entstehung gewebespezifischer mitochondrialer Mutationen liegen verschiedene Erklärungsansätze vor. Eine Möglichkeit ist das Auftreten von Mutationen in der Oozyte der Großmutter, in einer primordialen Keimzelle der Mutter oder im frühen Embryonalstadium mit in der Folge bevorzugter Segregation im Skelettmuskel. Andererseits kann eine mtDNA-Mutation auch erst nach erfolgter Keimblattdifferenzierung in den Myoblasten auftreten (Andreu et al., 1999; DiMauro and Gurgel-Giannetti, 2005). Darüber hinaus wurden auch nukleäre Mutationen als Auslöser der IMM identifiziert. Die folgenden zwei Abschnitte geben eine Übersicht über bislang identifizierte Mutationen, die entsprechenden Gene sind in Klammer aufgeführt.

### **Die IMM auf Basis von mtDNA-Mutationen**

Die für die IMM verantwortlichen mtDNA-Mutationen können im Cytochrom-b Gen des Komplexes III (MT-CYB) und in mitochondrialen Genen für Untereinheiten des Komplexes IV vorliegen (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3). Im Vergleich dazu treten Komplex I – Mutationen (MT-ND1, MT-ND2, MT-ND4, MT-ND5, MT-ND6) eher selten als Ursache einer IMM auf (Keightley et al., 1996; Andreu et al., 1999; Musumeci et al., 2000).

Neben den Mutationen, die spezifische proteinkodierende Gene der mtDNA betreffen, können dagegen auch zahlreiche Mutationen der mitochondrialen tRNAs die gesamte Proteinbiosynthese *in toto* stören und zu einer IMM führen. Klinisch zeigen sich die oben beschriebenen typischen Symptome, wobei der Krankheitsbeginn hier stark variiert und in einzelnen Fällen auch sehr milde Zeichen einer multisystemischen Beteiligung gefunden wurden (Anitori et al., 2005; Swalwell et al., 2006). Ob singuläre oder multiple mtDNA Deletionen zu einer IMM führen, ist nicht bekannt und bisher nicht beschrieben.

### **Die IMM auf Basis nukleärer Mutationen**

Unter den nukleären Mutationen wurde kürzlich eine Mutation im ETFDH-Gen als Ursache der isolierten myopathischen Form des sekundären Coenzym Q<sub>10</sub>-Mangels charakterisiert (Gempel et al., 2007). Da das Coenzym Q<sub>10</sub> eine essentielle Rolle bei der Übertragung der Elektronen innerhalb der OXPHOS spielt, kommt es so ebenfalls zu einer Störung der mitochondrialen Funktion. Therapeutisch sollte daher eine Coenzym Q<sub>10</sub>-Substitution durchgeführt werden. Bei Nachweis einer ETFDH-Mutation kann Riboflavin (Coenzym von ETFDH) ergänzend in die Therapie mit aufgenommen werden (Lalani et al., 2005; Horvath et al., 2006).

Eine andere nukleäre Mutation betrifft das für die Thymidin-Kinase 2 (TK2) kodierende Gen, welches eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des mitochondrialen dNTP-Pools spielt und somit bei Mutation zu einer Depletion führt. Das klinische Spektrum der IMM ist hier äußerst variabel und reicht von schwerer frühkindlicher Myopathie mit frühem Tod über kongenitale Myopathien mit *rigid spine*-Syndrom und Krankheitsbildern, die einer spinalen Muskelatrophie ähneln, bis hin zu infantilen subakuten Formen mit längerer Überlebenszeit (Saada et al., 2001; Mancuso et al., 2003; Oskoui et al., 2006).

Kürzlich wurden rezessive Mutationen im nukleären *POLG1*-Gen beschrieben, die mit einer isolierten mitochondrialen Myopathie des Erwachsenenalters und mtDNA-Depletion im Muskel einhergingen (Giordano et al.).

## 1.7 Rolle der Mitochondrien im Rahmen des Alterungsprozesses

Wie bereits ausführlich dargelegt, stellen Deletionen der mtDNA eine häufige Ursache von mitochondrialen Krankheiten dar. Multiple Deletionen treten jedoch auch regelmäßig im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses auf (siehe auch Abb.2).

Die *mitochondrial theory of ageing* wurde schon sehr früh von Harman et al. (1972) postuliert. Wie oben erwähnt geht man davon aus, dass ROS u.a. als Nebenprodukt der ETC zur Bildung von mtDNA-Mutationen beitragen kann. Durch die im Laufe des Lebens stattfindende Akkumulation der somatischen *de-novo* Mutationen kommt es dann zur Minderung der bioenergetischen Zellaktivität. Somit nehmen Mitochondrien eine Schlüsselrolle im Alterungsprozess ein.

Der genaue Akkumulationsmechanismus der alters-assoziierten Mutationen ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Zum einen existiert die Hypothese, dass mutierte mtDNA zu einer Fehlfunktion der ETC führt und eine daraus resultierende gesteigerte ROS-Produktion zu einer fortlaufenden *de-novo* Entstehung von mtDNA-Mutationen führt (*vicious cycle-Theorie*) (Chan, 2006). Dem gegenüber steht die Annahme, dass früh auftretende Mutationen durch klonale Expansion akkumulieren (Khrapko et al., 2003). Diese klonale Expansion könnte einerseits durch einen Replikationsvorteil kürzerer, deletierter mtDNA Moleküle im postmitotischen Gewebe erklärt werden (Diaz et al., 2002). Andererseits wurde nachgewiesen, dass rein stochastische Vorgänge zu einem intrazellulären Gendrift während der Replikation führen können (Elson et al., 2001). Für die Theorie der klonalen Expansion sprechen Studien, die nachgewiesen haben, dass einzelne Zellen desselben Gewebes hohe Anteile an jeweils unterschiedlichen zellspezifischen Mutation tragen (Bua et al., 2006; Kraysberg et al., 2006).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Mausmodelle mitochondrialer Erkrankungen etabliert, u.a. die mtDNA-*mutator*-Mäuse, bei denen es durch eine homozygote *knock-in* Mutation in der Exonuklease-Domäne der mitochondrialen DNA Polymerase  $\gamma$  (POLG1) zu gestörter *proof reading* -Fähigkeit und zur Akkumulation von Mutationen, mtDNA Punktmutationen und Deletionen kommt. So konnte ein Zusammenhang von gesteigerter mtDNA-Mutationslast, einem frühzeitig alternden Phänotyp und reduzierter Lebenserwartung gezeigt werden (Trifunovic et al., 2004; Kujoth et al., 2005; Vermulst et al., 2008).

Trotz einiger noch offener Fragen auf diesem Gebiet ist unumstritten, dass multiple Deletionen mit zunehmendem Alter akkumulieren, wobei postmitotische Gewebe mit besonders hoher oxidativer Aktivität, wie Gehirn, Herz und Skelettmuskel im Vergleich zu Leber, Milz, Haut, Niere wesentlich mehr Deletionen aufweisen (Cortopassi et al., 1992).

Da Skelettmuskelgewebe gut für Biopsien zugänglich ist, eignet es sich besonders für die Untersuchung von alters-assoziierten multiplen Deletionen. Der ermittelte Anteil an deletierten mtDNA Molekülen liegt in entsprechenden Studien um die 0,1% im Muskelgewebe (Cortopassi and Arnheim, 1990; Cooper et al., 1992; Simonetti et al., 1992; Brierley et al., 1998). Parallel zu diesen molekulargenetischen Befunden zeigen sich auch auf histologischer Ebene mitochondriale Auffälligkeiten in postmitotischen Geweben, wie die im Laufe des Lebens zunehmende Anzahl COX-negativer Fasern im Skelettmuskel (Brierley et al., 1996; Chariot et al., 1996).

Bei der geringen Menge an deletierten mtDNA-Molekülen im Gesamtgewebe ist eine bioenergetische Einschränkung des gesamten Gewebes fraglich. Andererseits ist eine funktionelle Relevanz durch einen Ausfall strategisch wichtiger Zellen durch Hochsegregieren einzelner Mutationen auf Einzelzellniveau über die Schwelle gut vorstellbar. Die funktionelle Relevanz dieser altersabhängigen Phänomene wird deshalb seit vielen Jahren stark diskutiert. Vor diesem Hintergrund ist eine Differenzierung zwischen „physiologischen“ altersabhängigen mtDNA Veränderungen mit alterstypischen Beschwerden und pathologischen mtDNA Veränderungen mit Beschwerden im Sinne einer mitochondrialen Erkrankung in Grenzgebieten schwierig.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der Praxis von Muskelambulanzen findet sich eine Vielzahl von Patienten, deren isolierte Muskelbeschwerden einer metabolischen Myopathie, z.B. einer mitochondrialen Myopathie, gleichen, die jedoch insbesondere in höherem Alter nicht von altersbedingten Beschwerden zu differenzieren sind. Eine Skelettmuskelbiopsie zeigt bei diesen Patienten meist einen unauffälligen Befund, nur unspezifische myopathologische Veränderungen oder (milde) mitochondriale Veränderungen, die häufig ebenfalls nicht sicher von altersbedingten Veränderungen abzugrenzen sind. Untersucht man nach Ausschluss anderer Muskelerkrankungen und anderer metabolischer Myopathien bei diesen Patienten die mtDNA mit sensitiven Methoden (long range PCR, lrPCR), findet man nach unserer Erfahrung aus der Routinediagnostik häufig multiple mtDNA Deletionen im Skelettmuskel. Die pathogenetische Relevanz dieser Deletionen ist jedoch in einem solchen Patientenkollektiv ohne Hinweise auf eine primäre Mutation der nukleären DNA mit entsprechenden typischen klinischen Syndromen völlig unklar und kann bisher kaum von altersassoziierten Befunden abgegrenzt werden.

In unserer Studie wurden daher Patienten mit einem isolierten muskulären Beschwerdekomples, der klinisch gut mit einer mitochondrialen Myopathie vereinbar wäre, der aber nicht in jedem Fall sicher von rein alters-assoziierten Beschwerden differenziert werden konnte, nach Ausschluss anderweitiger Myopathien, insbesondere metabolische Myopathien, eingehend analysiert. Ziel der Arbeit war es, zusätzlich zu den klinischen Befunden, weitere diagnostische Merkmale für die Identifikation dieses Patientenkollektivs im Vergleich zu Muskelgesunden zu definieren. Wir stellten uns die Frage, ob genetische, aber auch histologische Surrogatmarker zu identifizieren sind, die „genuine“ Patienten von Gesunden und pathologische von unspezifischen, möglicherweise rein alters-assoziierten Befunden unterscheiden könnten.

In einem ersten Schritt wurden dazu detaillierte histologische, biochemische und molekulargenetische Analysen durchgeführt. Im Rahmen der molekulargenetischen Analyse wurden dabei multiple Deletionen der aus dem Skelettmuskelgewebe der Patienten isolierten mtDNA analysiert. Anschließend wurde in einem zweiten Schritt untersucht, ob sich die Ergebnisse der Patienten als pathologisch einstufen lassen. Hierzu wurden die ermittelten genetischen Befunde mit denen gesunder gematchten Kontrollen verglichen. Die histologischen Befunde der Patienten wurden mit Normwerten gesunder Muskelproben aus der Literatur verglichen. Die Ergebnisse der biochemischen Analyse wurden mit Hilfe laboreigener Referenzwerte ausgewertet.

Von besonderem Interesse und im Fokus der Analysen lag der genetische Befund (multiple mtDNA Deletionen), da sich die Differenzierung von pathologischem und physiologischem, alters-assoziierten Befund vor allem in höherem Lebensalter wie beschrieben als schwierig erweist.

Folgende Fragen sollten somit geklärt werden:

- Repräsentiert das „Syndrom“ isolierter muskulärer Beschwerden eine eigenständige(mitochondriale) Krankheitsentität, insbesondere wenn in der Muskulatur multiple mtDNA Deletionen nachweisbar sind?
- Oder handelt es sich bei diesem Syndrom um eine „Altersmyopathie“? Eine „Altersmyopathie“ wäre zu diskutieren, wenn die pathologischen Befunde, d.h. die Befunde, die die rein alters-assoziierten Befunde überschreiten (z.B. die Menge multipler Deletionen), nur in höherem Lebensalter nachweisbar wären. Hier könnte es sich um einen übersteigerten Alterungsprozess der Muskulatur in höheren Lebensjahren handeln. Alternativ könnte es sich auch um einen generell übersteigerten Alterungsprozess der Muskulatur handeln. Dies wäre anzunehmen, wenn man bei den Patienten die gleichen Veränderungen wie bei den gematchten Kontrollen findet, jedoch –entsprechend der Altersgruppen- in jeweils höherem Ausmaß.
- Ein alters-assoziiertes Normalbefund läge vor, wenn sich die Patienten und gematchten Kontrollen in keiner Weise, insbesondere nicht in dem Vorhandensein oder der Menge multipler mtDNA Deletionen im Skelettmuskel, unterscheiden.

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, wurde in einem weiteren Schritt eine Quantifizierung der multiplen Deletionen im Muskel in beiden Kollektiven, Patienten und Kontrollen, durchgeführt. In Bezug auf etwaige Unterschiede (z.B. der Menge multipler Deletionen) zwischen den Kollektiven planten wir einen „cut-off“-Wert zu identifizieren, der möglicherweise „genuin“ Kranke von Gesunden unterscheiden kann.

Zur Beurteilung der Pathogenität waren jedoch nicht nur die Quantität der multiplen Deletionen, sondern auch ihre möglichen funktionellen Auswirkungen entscheidend. Daher wurde in einem weiteren Schritt der Genotyp mit dem entsprechenden histologischen und biochemischen Phänotyp der Patienten korreliert.

## 2 Methoden und Materialien

### Primäre Ziele der Untersuchungen:

- Analyse klinischer Daten, histologischer, biochemischer und genetischer (mtDNA Deletionen?) mitochondrialer Veränderungen im Skelettmuskel (M. vastus lateralis) bei Patienten.
- Analyse klinischer Daten und genetischer (mtDNA Deletionen?) mitochondrialer Veränderungen im Skelettmuskel (M. vastus lateralis) bei Kontrollen.
- Vergleich histologischer Befunde von Patienten mit der Literatur.
- Vergleich biochemischer Befunde mit Normwerten unseres Labors.
- Vergleich genetischer Befunde von Patienten und Kontrollen.

### Einen orientierenden Überblick über den Studienablauf gibt folgendes Schema:

- **Klinische Charakterisierung der Kollektive**
- **Offene Skelettmuskelbiopsie des M. vastus lateralis:**
  - **Histologie, Immunhistochemie, Enzym-Histochemie,**  
**Patientenkollektiv:**  
Quantifizieren der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern in einem gesamten Muskelquerschnitt (Handauszählung), Angabe in %
  - **Biochemie mit Atmungskettenenzymanalysen im Muskelhomogenat,**  
**Patientenkollektiv:**  
Analyse Komplex I, IV (COX), Citratsynthase (CS), Normalisierung der Komplexaktivitäten auf CS-Aktivität
  - **Molekulargenetische Analysen aus Skelettmuskel isolierter mtDNA,**  
**Patienten und Kontrollkollektiv:**  
IrrPCR, single-molecule PCR (smPCR) der mtDNA zur Deletionsquantifizierung

**Problem:** IrrPCR nur semiquantitativ, Überschätzung des tatsächlichen Deletionsanteils

**Lösung:** Anwendung der smPCR zur Quantifizierung und Kalibrierung der IrrPCR-Resultate

## **2.1 Probenauswahl**

Für die Studie liegt ein positives Ethikvotum der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn vor (304/2008). Alle Untersuchungen im Rahmen dieser Studie sind für das Patientenkollektiv wie für das Kontrollkollektiv auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt worden.

### **Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv stammt aus der neuromuskulären Spezialsprechstunde der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Bonn. Hier stellten sich im Zeitraum von 2000-2009 eine Vielzahl von Patienten mit isoliertem muskulärem Beschwerdekomples vor.

### **Einschlusskriterien des Patientenkollektivs:**

1. Muskulärer Beschwerdekomples mit IMM gut vereinbar
2. Muskelhistologie unauffällig oder nur leichte unspezifische myopathologische oder (milde) mitochondriale Veränderungen

### **Ausschlusskriterien des Patientenkollektivs:**

Andere Myopathie, externe Ophthalmoplegie, Polyneuropathie, Erkrankung/Medikation mit möglicher primärer oder sekundärer mitochondrialer Funktionsstörung (z.B. Amyotrophe Lateralsklerose/ALS, M. Parkinson, Diabetes mellitus, HIV-Infektion, Patienten mit einer antiviralen Medikation aus der Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, etc.).

Die Studie umfasste 14 Patienten im Alter von 37 bis 76 Jahren (MW  $58,57 \pm 10,76$ ). Insgesamt waren drei Patienten jünger als 50 Jahre, bzw. elf Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie älter als 50 Jahre alt. Es wurden acht weibliche sowie sechs männliche Patienten untersucht. Alle Patienten erteilten nach vollständiger Aufklärung schriftlich ihre Zustimmung zur Teilnahme an muskulären Forschungsprojekten der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Bonn.

### **Kontrollkollektiv**

Das Kontrollkollektiv wurde zum einem aus dem Probenbestand des Muskellabors ausgewählt. Diese Biopsien waren aufgrund einer familienanamnestisch indizierten Malignen Hyperthermie (MH)-Abklärung entnommen worden, wobei die Patienten keinerlei klinische Beschwerden aufwiesen und der MH-Test negativ ausgefallen war. Die Muskelproben stammen aus dem Zeitraum 1995–1997 und wurden bei -80° C gelagert. Weitere Kontrollproben wurden in Zusammenarbeit mit der Unfallchirurgie und Orthopädie der Uniklinik Bonn im Zeitraum von August-Oktober 2009 gesammelt. Die Biopsien stammen von Patienten mit rein orthopädischen Beschwerden und wurden unter Voraussetzung der schriftlichen Einwilligung im Rahmen von geplanten Operationen der Hüfte oder des Kniegelenkes entnommen. Um repräsentative Befunde zu erzielen, wurden innerhalb des Kontrollkollektivs Erkrankungen, die einen Einfluss auf das Muskelgewebe haben könnten sowie Erkrankungen, die mit potentieller mitochondrialer Funktionsminderung einher gehen könnten, ausgeschlossen.

### **Einschlusskriterien des Kontrollkollektivs:**

1. Keine neuromuskulären Beschwerden
2. Muskelhistologie des M. vastus lateralis als altersentsprechend unauffällig befundet

### **Ausschlusskriterien des Kontrollkollektivs:**

Neuromuskuläre Symptome, Polyneuropathie, Erkrankung/Medikation mit möglicher primärer oder sekundärer mitochondrialer Funktionsstörung (z.B. ALS, M. Parkinson, Diabetes mellitus, HIV-Infektion, Patienten mit einer antiviralen Medikation aus der Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, etc.).

Insgesamt wurden zwölf Kontrollprobanden im Alter von 38 bis 73 Jahren (MW 54,07 ± 13,19) in die Studie mit einbezogen. Zum Zeitpunkt der Biopsie waren sechs Probanden jünger als 50 Jahre, bzw. sieben Probanden älter als 50 Jahre alt. Die Studie umfasste sechs weibliche sowie sieben männliche Kontrollprobanden. Alle Probanden wurden vollständig aufgeklärt und erteilten schriftlich ihre Zustimmung zur Teilnahme am Projekt.

## 2.2 Histologische Aufarbeitung

Alle Muskelproben der Patienten und Kontrollen wurden der routinemäßigen, standardisierten histologischen, enzymhistochemischen und immunhistochemischen Aufarbeitung des Muskellabors der Neurologischen Universitätsklinik Bonn unterzogen. Die Muskelproben wurden sofort nach Biopsieentnahme mit einem speziellen Einbettmedium (Jung, Leica, Heidelberg, Deutschland) in flüssigen Stickstoff schockgefroren, dann bei -25° C in einem Kryostaten (CM 3050, Leica) geschnitten und anschließend bei -18° C gelagert. Die im Folgenden dargestellten Färbemethoden erfolgten alle in Anlehnung an Dubowitz et al. (2007). Nach erfolgter Färbung wurden die Schnitte mikroskopisch ausgewertet (Olympus BX61, Olympus, Hamburg, Deutschland).

Die standardisierte Aufarbeitung im Muskellabor umfasste folgende Färbungen:

H&E, Gomori-Trichrom, NADH, myofibrilläre ATPase (pH 9,4/4,6/4,2), Oil-Red-O, PAS, Saure Phosphatase, Myoadenylatdeaminase, Phosphofruktokinase, Kongo-Rot; Cytochrom-c-Oxidase (COX), Succinat-Dehydrogenase (SDH);

Untersuchung der Reaktivität mit Antikörpern gegen CD3, CD68, MHC-I, MAC;

Untersuchung der Reaktivität mit Antikörpern gegen Dystrophin (Dys 1 – 3), alpha-, beta-, gamma-, delta-Sarcoglycan, Caveolin 3, Desmin, Merosin, Dysferlin und alpha-Dystroglycan.

Andere als mitochondriale Myopathien und Neuropathien wurden sorgfältig ausgeschlossen.

Die im Folgenden dargestellte histologische und enzymhistochemische Aufarbeitung wurde im Rahmen der Studie für das Patientenkollektiv erneut durchgeführt, um für alle Proben gleiche Voraussetzungen zu schaffen und den Skelettmuskel der Patienten speziell auf mitochondriale Auffälligkeiten hin zu untersuchen.

Alle im Folgenden verwendeten, nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma (St.Louis, MO) in Analysequalität bezogen.

### **Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Färbung**

Die Schnitte wurden auf einen HistoBond-Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) gelegt und mit einem Fettkreis umrandet. Anschließend wurde das Inkubationsmedium aufgetragen und 40-60 min auf 37° C erhitzt. Nach sorgfältiger Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte schließlich entwässert und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Die Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität zeigt sich durch feine braune Färbung. Aufgrund unterschiedlicher Anzahl der Mitochondrien sind Typ I-Fasern am dunkelsten, Typ II-Fasern am hellsten und Typ IIa-Fasern mittelstark angefärbt. Bei Minderung der COX-Aktivität erscheinen die Fasern blass, bzw. weiß. Die COX-Färbung gibt folglich Auskunft über Anzahl, Verteilung und Aktivität der Mitochondrien (Dubowitz et al., 2007).

#### COX-Inkubationsmedium

10 ml	Na-Phosphatpuffer/NaOH (50 mM, pH 7,4)
2 µl	Katalase (20 mg/ml) (Serva, Heidelberg, Deutschland)
10 mg	DAB
20 mg	Cytochrom-c
750 mg	Saccharose

### **Succinatdehydrogenase (SDH)-Färbung**

Nach kurzem Antrocknen wurden die Schnitte mit einem Fettkreis umrandet und das Inkubationsmedium aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37° C. Abschließend wurden die Schnitte abgespült und mit Kaisers-Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Der Schnitt zeigt nach der SDH-Färbung ein blau-graues Endprodukt. Typ I-Fasern und Areale mit mitochondrialen Aggregationen weisen dabei höhere Färbeintensitäten auf. Im Kontrast dazu findet man Typ IIb-Fasern am schwächsten und Typ IIa Fasern mittelstark angefärbt.

#### SDH-Inkubationsmedium (wird bei -20° C gefroren gelagert)

5 ml	Tris /HCl (50 mM, pH 7,4)
5 ml	Na-Succinat (0,2 M)
50 µl	MgCl <sub>2</sub> (1 M)
9 ml	NBT (20 mg) in destilliertem H <sub>2</sub> O mit Ultraschall gelöst

### **COX-SDH-Doppelfärbung**

Zunächst wurde die COX-Färbung wie oben beschrieben durchgeführt. Daraufhin wurden die Schnitte mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) gespült und mit dem SDH-Inkubationsmedium für 1 h bei 37° C inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte abgespült, getrocknet und mit Glyceringelatine eingedeckt. Normale Fasern zeigen sich in der COX-SDH-Doppelfärbung braun-blau bis grau. Bei fehlender oder reduzierter COX-Aktivität und gleichzeitiger (Hyper-) Reaktionsfähigkeit der rein nukleär kodierten SDH färben sich Fasern blau an (COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern). Die Doppelfärbung identifiziert pathologische Fasern sicherer als die COX-Einzelfärbung, da die COX-Aktivität durch die gleichzeitige Färbung der rein nukleär kodierten, von Mutationen der mtDNA nicht betroffenen SDH (Komplex II der Atmungskette) gewissermaßen auf den Mitochondriengehalt bezogen wird.

### **Modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung**

Die kurz angetrockneten Schnitte wurden 5 min in Harris Hämatoxylin getaucht. Danach wurden sie erst mit Leitungswasser abgespült und dann 10 min in dem selbigen stehen gelassen. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser folgte eine 1-stündige Inkubation in der Gomori-Färbung. Im Anschluss daran erfolgten die Differenzierung mit 0,2 % Essigsäure sowie die Entwässerung und das Eindecken mit Entellan. In der modifizierten Gomori-Trichromfärbung erscheinen die Kerne rot und die Muskelfasern grün-blau mit Mitochondrien als rote fleckförmige Punkte. Das Bindegewebe färbt sich schwach blau-grün und das Myelin der Nerven rot. Die modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung wird bevorzugt verwendet, um Nematinkörper (rot), rimmed vacuoles (rot), tubuläre Aggregate (rot) und mitochondriale Akkumulationen (rot) zu detektieren.

#### Gomori-Trichrom-Inkubationsmedium

Harris Hämatoxylin (Sigma, St.Louis, MO)

0,2 % Essigsäure

Gomori-Lösung: 0,6 g Chromotrop 2R (Roth, Karlsruhe, Detschland)

0,3 g Fast Green FCF (Merk, Darmstadt Deutschland)

0,6 g Wolframatophosphorsäure (Merk)

1 ml Eisessig

100 ml NaOH (pH 3,4)

### 2.3 Biochemische Messung der Atmungskettenenzymaktivität

Alle Skelettmuskelproben der Patienten wurden ebenfalls biochemisch analysiert. Mit Hilfe der Aktivitätsmessung von Komplex I und IV konnten Rückschlüsse auf eventuell vorliegende Funktionsdefizite geschlossen werden. Die analysierten Skelettmuskelhomogenate enthielten 20-50 mg Muskel in 1 ml Puffer (0,1 M K-Phosphat, pH 7,4). Für die einzelnen Messungen wurden jeweils 10 - 40 µl dieses Homogenates verwendet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte spektralphotometrisch mittels DW-2000 UV-Vis-Spektrophotometer (SLM AMINCO, Inc., Urbana, USA) bei 30° C in einer Quarz Mikroküvette. Aus der zu Reaktionsbeginn beobachteten Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wurde dann die Aktivität berechnet (Bergmeyer and Gawehn, 1977). Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte dabei mittels der im Folgenden dargestellten Formel.

$$\frac{\Delta E / \text{min} * V_m * F_v}{\epsilon * V_p} \quad [U / g_{FG}]$$

$\Delta E / \text{min}$  : Extinktionsänderung pro Minute (Anfangsgeschwindigkeit)

$V_m$  : Messvolumen in der Küvette (µl)

$F_v$  : Verdünnungsfaktor

$\epsilon$  : molarer Extinktionskoeffizient ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$V_p$  : Probenvolumen (µl)

$U / g_{FG}$  : units/ g Feuchtgewicht

#### Komplex I (NADH:CoQ<sub>1</sub>-Oxidoreduktase)

Der Komplex I der Atmungskette ist mit 46 Untereinheiten der größte Enzymkomplex. Die mtDNA kodiert hier für 7 Untereinheiten. Durch die NADH:CoQ<sub>1</sub>-Oxidoreduktase wird NADH oxydiert und nach mehreren Zwischenschritten Coenzym-Q reduziert. Nach Zugabe des Homogenats zum Testansatz wurde die Aktivität der NADH:CoQ<sub>1</sub>-Oxidoreduktase photometrisch bei 340-380 nm bestimmt ( $\epsilon = 5,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). NADH-Oxidase-Aktivität zeigt sich jedoch nicht nur in der OXPHOS, sondern auch in Plasmamembranen und Mikrosomen. Diese Enzymaktivität ist nicht durch Rotenon zu hemmen ist (Wiedemann et al., 2000).

Der nicht zu hemmende Anteil wurde deshalb bestimmt, indem nach 1 min Rotenon hinzugegeben und die Enzymaktivität erneut gemessen wurde. Die Differenz der totalen NADH-Oxidationsrate und der rotenon-unsensiblen Aktivität entsprach somit der gesuchten mitochondriale NADH:CoQ<sub>1</sub>-Oxidoreductase- Aktivität (Schröder et al., 2000).

#### Komplex I-Testansatz

460 µl Tris/KCl Puffer (10 mM Tris/Cl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA; pH 7,4)

5 µl Coenzym Q<sub>1</sub> (10 mM, Sigma, Steinheim, Deutschland)

5 µl KCN (0,2 M)

5 µl NADH (15 mM)

Zugabe von 5 µl Rotenon (2 µM) erfolgte nach 1 min

#### **Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase)**

In der Cytochrom-c-Oxidase (COX) sind 3 der insgesamt 13 Untereinheiten durch die mtDNA kodiert. Im Komplex IV der Atmungskette wird das durch Komplex III reduzierte Cytochrom-c oxidiert und molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert. Die Extinktionsänderung von Cytochrom-c wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm für 5 min gemessen ( $\epsilon=5,9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Zur Herstellung des reduzierten Cytochrom-c wurden 20 mg in 1 ml Phosphatpuffer (20 mM; pH 7,4) gelöst und mit Ascorbat-Lösung (10 mg/ml) reduziert. Die Trennung des Reduktionsmittels vom reduzierten Cytochrom-c erfolgte mittels einer Sephadex-G25-Säule und einem Bettvolumen von 17,6 ml. Schließlich wurde das Eluat in Aliquote aufgeteilt und bis zur Verwendung in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert.

#### Komplex IV-Testansatz

460 µl Tris/KCl Puffer (10 mM Tris/Cl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA; pH 7,4)

5 µl Dodecylmaltosid (10 %)

10 µl Cytochrom-c (reduziert)

### **Citratsynthase (CS)**

Die Citratsynthase ist ein Enzym des Citronensäurezyklus, es wird nukleär kodiert und ist somit unabhängig von mtDNA-Defekten in den Mitochondrien vorhanden. Der OXPHOS-Enzymaktivität/CS-Aktivitäts-Quotient ermöglicht somit den Vergleich von Enzymaktivitäten unabhängig von adaptiver mitochondrialer Proliferation und Fasertypvariationen (Schröder et al., 2000; Zsurka et al., 2008). Das durch die CS aus Acetyl-CoA gebildete Coenzym A bildet mit DTNB (Dithionitrobenzoesäure) einen photometrisch detektierbaren Farbkomplex. Die Enzymaktivität wurde bei 412 nm für 5 min in einer Einmalküvette gemessen ( $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

#### CS-Testansatz

800  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

100  $\mu\text{l}$  DNTB (0,2 mg DTNB in 1 M Tris/Cl, pH 8,1)

30  $\mu\text{l}$  Acetyl-CoA (10 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ )

50  $\mu\text{l}$  Oxalacetat (6,6 mg/ml in Triethanolamin/EDTA (0,5 M TRA, 5mM NaEDTA))

### **2.4 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion erfolgte aus Muskelgewebe der Patienten und Kontrollen, welches direkt nach erfolgter Biopsie bei  $-20^\circ \text{C}$  eingefroren wurde. Die Isolation wurde mittels QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

### **2.5 Konzentrationsmessung**

Der DNA-Gehalt der frisch isolierten Proben wurde durch Extinktionsmessung mit Hilfe des Cary 50 UV-Vis-Spektrophotometers (Varian, Palo Alto, CA) bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer DNA Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Zusätzlich wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen, um etwaige Verunreinigungen der Probe durch Proteine auszuschließen (Sambrook and Russell, 2001). Auf Basis der ermittelten Konzentrationen wurde von jeder Probe eine Verdünnung von 25  $\text{ng}/\mu\text{l}$  angesetzt.

## 2.6 PCR Analyse multipler Deletionen

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) besteht gewöhnlich aus 3 Schritten. Im ersten Schritt wird die DNA auf 90-98° C stark erhitzt, sodass sie danach nur noch einzelsträngig vorliegt (1. Denaturierung). Nach Abkühlen auf 55-70° C lagern sich dann zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) auf spezifische Weise an, indem sie den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, wobei ihre 3'-Enden zueinander orientiert sind (2. Hybridisierung). Der dritte Schritt besteht in der DNA-Synthese, die bei 72-74° C durch komplementären Anbau von Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) an den 3'-Enden der Primer mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase erfolgt. Von entscheidender Bedeutung ist die Tatsache, dass das Syntheseprodukt im folgenden Zyklus ebenfalls als Matrizenstrang dient. So kann durch mehrfaches Wiederholen der 3 Schritte eine exponentielle Vervielfachung des gewählten Abschnittes erreicht werden (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1986).

In Ergänzung zu dem soeben beschriebenen Ablauf können auch modifizierte Versionen für die DNA-Amplifikation genutzt werden. Für die Amplifikation von großen DNA-Abschnitten (long range PCR) wird meist ein zweistufiges Protokoll gewählt. Hierbei laufen Hybridisierung und DNA-Synthese gleichzeitig bei Temperaturen von 65-70° C ab (Grunenwald, 2003).

### 2.6.1 Long range PCR

Mit Hilfe der long range PCR wurde die mtDNA des kompletten Patienten- und Kontrollkollektivs auf das Vorliegen von multiplen Deletionen hin überprüft. Hierbei wurde JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma, St. Louis, MO) als Enzym verwendet. Dies ist ein Gemisch aus DNA-Polymerasen mit und ohne 3'- 5' Exonukleaseaktivität, sodass fehlerhaft eingebaute Basen wieder entfernt werden können. Damit ist die JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase gut für die genaue Amplifikation von längeren Abschnitten geeignet. Deletionen befinden sich üblicherweise auf dem *major arc*, dem Bereich zwischen den beiden Replikationsursprüngen (Bua et al., 2006). Es wurden daher Primer verwendet, die den entsprechenden Abschnitt der mtDNA umspannen.

Bei jedem Versuch wurde eine negative Kontrolle sowie eine Leerprobe mitgeführt. Die PCR wurde mit dem Thermocycler PTC-200 (MJ Research, Bio-Rad, Hercules, CA) durchgeführt. Ein typischer Reaktionszyklus begann mit der Vorinkubation bei 95° C für 2:30 min, um die vollständige Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Darauf folgten 10 Zyklen von jeweils 2 Schritten bei 92° C für 0:20 min (Denaturierung) und 68° C für 10:00 min (Hybridisierung/DNA-Synthese) sowie 20 Zyklen von jeweils 2 Schritten bei 92° C für 0:25 min (Denaturierung) und 68° C für

12:00 min (Hybridisierung/DNA-Synthese). Abschließend wurde nochmals für 11:00 min auf 72 °C erhitzt, um bis zu diesem Zeitpunkt unvollständig synthetisierte DNA-Stränge zu vervollständigen. Nach erfolgter Agarosegelelektrophorese wurde die DNA mittels Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht, anschließend fotografiert und mit Hilfe der Image J Software (Imageprocessing and analysis in Java) ausgewertet.

#### Verwendete Primer für IrPCR

ND1up 3137 5' GAGAAATAAGGCCTACTTCACAAAGC 3'  
DL1low 45 5' TGGAGAGCTCCCGTGAGTGGTT 3'

#### Reaktionsansatz von 25 µl pro Probe

2,5 µl aller vier dNTP (2 mM)  
2,5 µl Accutaq Puffer (10x mit 25 mM MgCl<sub>2</sub>)  
0,2 µl Forward Primer (25 pmol/µl)  
0,2 µl Reverse Primer (25 pmol/µl)  
0,25 µl JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase (2,5 u/µl)  
2 µl DNA (25 ng/µl)  
17,35µl H<sub>2</sub>O

### **2.6.2 Single molecule PCR**

Die single molecule PCR (smPCR) wurde für die Quantifizierung der deletierten mtDNA-Moleküle verwendet. Die smPCR entspricht im Wesentlichen einer gewöhnlichen PCR, wobei die Matrizen-DNA hier in einer sehr niedrigen und dNTPs, Primer und Polymerase in einer sehr hohen Konzentration vorliegen. Ausgangsbasis aller Versuchteile war eine auf 4 ng/µl verdünnte DNA-Probe und die daraus entstandenen Verdünnungsreihen.

Die Quantifizierung der Deletionsanteile erfolgte in zwei Schritten:

**Einzel-Molekül-Bestimmung.** Als erstes wurde die Quantität aller vorhandenen mtDNA-Moleküle in einer Probe bestimmt. Hierzu wurde die Matrizen-DNA soweit verdünnt, bis nur noch ca. 30 % der identischen Reaktionsansätze ein PCR-Produkt zeigten (optimale Verdünnungsstufe). Unter diesen Versuchsbedingungen wird angenommen, dass ein PCR-Produkt einem vorhandenen mtDNA-Molekül entspricht. Für die Einzel-Molekül-Bestimmung aller vorhandenen mtDNA-Moleküle wurden spezifische Primer gewählt, die den D-Loop sowie einen Teil des klei-

nen Bogens umspannen. Da dieser mtDNA-Abschnitt für gewöhnlich von Deletionen verschont bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass pro vorhandenem mtDNA-Molekül ein Amplifikationsprodukt entsteht, unabhängig davon, ob einzelne mtDNA-Kopien Deletionen aufweisen oder nicht (Zsurka et al., 2008).

**Einzel-Deletions-Bestimmung.** In einem zweiten Schritt wurden dann die deletierten mtDNA-Moleküle quantifiziert. Hierbei wurden die DNA-Proben soweit verdünnt, dass nach Amplifikation zusätzlich zu dem langen Wild-Typ-Produkt nur noch eine, zwei, oder gar keine spezifische Deletionsbande nachweisbar war (optimale Verdünnungsstufe). Unter diesen Versuchsbedingungen kann davon ausgegangen werden, dass jede spezifische Deletionsbande von einem einzelnen deletierten mtDNA-Molekül abstammt (Zsurka et al., 2008). Für die Einzel-Deletions-Bestimmung wurde ein Abschnitt amplifiziert, der den *major arc* umfasst. Dabei kamen die Primer der IrPCR (Kap. 2.6.1) zum Einsatz. Anschließend wurden die Ergebnisse der beiden Versuchsteile in Relation zueinander gesetzt und so der relative Anteil an deletierten mtDNA-Molekülen bestimmt. Eine detaillierte Darstellung der Berechnungen folgt in Abschnitt 3.4.1.

Zur systematischen Ermittlung der optimalen Verdünnungsstufe wurde folgendes Stufenschema für die Einzel-Molekül-Bestimmung sowie die Einzel-Deletions-Bestimmung angewendet.

### **Stufenschema der smPCR zur Ermittlung der optimalen Verdünnungsstufe**

#### **I). Abschätzung der geeigneten DNA-Konzentration**

- Multiple PCR-Reaktionen der verschiedenen Verdünnungsstufen
- pro Verdünnungsstufe wurden 5 Reaktionen angesetzt
- Ziel: die letzte positive Verdünnungsstufe enthält eine oder wenige amplifizierbare DNA-Matrizen, die erste negative Verdünnungsstufe enthält keinerlei PCR-Produkte

#### **II). Abschätzung der optimalen DNA-Konzentration**

- erweiterte Verdünnungen der letzten positiven Verdünnungsstufe
- pro erweiterte Verdünnung wurden 15 Reaktionen angesetzt
- falls nötig weitere kleinere Verdünnungsschritte
- Ziel: bei optimal gewählter Verdünnungsstufe zeigen ca. 30% der Reaktionen ein PCR-Produkt
- mit einer neu angesetzten Verdünnungsreihe wurden ermittelte Ergebnisse bestätigt

Für die smPCR wurde JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase oder TaKaRa LA Taq (TaKaRa Biotechnology, Shiga, Japan) verwendet. Bei allen Versuchen wurden eine Kontrolle aus  $10^{-1}$  sowie 3 Leerproben mitgeführt. Ein typischer Reaktionszyklus der Einzel-Molekül-Bestimmung wurde mittels des Thermocyclers PTC-200 (MJ Research, Bio-Rad, Hercules, CA) durchgeführt und begann mit einer Vorinkubation bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 2:30 min. Es folgten 42 Zyklen von jeweils 2 Schritten bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 0:20 min (Denaturierung) und  $68^{\circ}\text{C}$  für 3:00 min (Hybridisierung/DNA-Synthese). Schließlich wurde bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 7:00 min inkubiert. Die Amplifikation im Rahmen der Einzel-Deletions-Bestimmung begann ebenfalls bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 2:30 min, gefolgt von 10 Zyklen von jeweils 2 Schritten bei  $92^{\circ}\text{C}$  für 0:20 min (Denaturierung) und  $68^{\circ}\text{C}$  für 14:00 min (Hybridisierung/DNA-Synthese) sowie 32 Zyklen von jeweils 2 Schritten bei  $92^{\circ}\text{C}$  für 0:25 min (Denaturierung) und  $68^{\circ}\text{C}$  für 16:00 min (Hybridisierung/DNA-Synthese). Abschließend wurde auf  $72^{\circ}\text{C}$  für 10:00 min erhitzt.

#### Verwendete Primer für Einzel-Molekül-Bestimmung

DL2up	16520	5` CATAAAGCCTAAATAGCCCACACG 3`
12SAlow	1144	5` AGTGTCTGGCGAGCAGTTTTG 3`

#### Reaktionsansatz der smPCR von 12,5 $\mu\text{l}$ pro Probe

0,25 $\mu\text{l}$	dNTPs (25 mM)
1,25 $\mu\text{l}$	AccuTaq Puffer (10x mit 25 mM $\text{MgCl}_2$ )
0,1 $\mu\text{l}$	1:1 Gemisch der beiden Primer (je 50 pmol)
0,25 $\mu\text{l}$	JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase(2,5 u/ $\mu\text{l}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	DNA (Konzentration abhängig von Versuchsstufe)
10,15 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$

## 2.7 Genetische Analyse der Polymerase $\gamma$ (POLG1)

Zum Ausschluss von nukleären Mutationen der Polymerase  $\gamma$  (POLG1) wurden alle Proben auf in der Population häufig vorkommende Punktmutationen („hot spots“) im POLG1-Gen untersucht. Dazu wurde in einem ersten Schritt ein gewisser Genabschnitt mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Hilfe sequenzspezifischer Restriktionsendonukleasen verdaut.

### 2.7.1 PCR

Für die p.W748S- Analyse wurde eine mismatch-PCR durchgeführt. Dabei enthielt einer der Primer ein inkongruentes Nukleotid (in Primer-Auflistung unterstrichen), wodurch eine neue artifiziell eingeführte Spaltstelle für den im Anschluss durchgeführten Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstand. Die anderen möglichen Mutationsorte wurden durch gewöhnliche PCR amplifiziert. Die PCR wurde mit Hilfe des Thermocyclers PTC-200 (MJ Research, Bio-Rad, Hercules, CA) umgesetzt. Die Amplifikation begann mit einer Vorinkubation bei 95° C für 3 min. Darauf folgten 35 Zyklen von jeweils 2 Schritten bei 95° C für 0:15 min (Denaturierung) und 70° C für 1:30 min (Hybridisierung/DNA-Synthese). Schließlich wurde für 7:00 min auf 72° C erhitzt.

#### Spezifische Primer für die jeweilige Sequenz

p.A467T Mutation	PG467F	5 ′ CCAGAACTGGGAGCGTTACC 3 ′
	PG467R	5 ′ CTAGATCCTGCCCACCCAAG 3 ′
p.P587L Mutation	PG587F	5 ′ GCTAGACGACCCTGCATGGA 3 ′
	PG587R	5 ′ GTGCCATGAGTTTAGGTGTGAC 3 ′
p.W748S Mutation	PG748F	5 ′ GTGGACATCCCTGGC <u>AG</u> CT 3 ′
	PG748R	5 ′ CACTCTGAAGCCTGCTGTG 3 ′
p.R1096C Mutation	PG1096F	5 ′ AGCTCCCTGTGGACCTTACC 3 ′
	PG1096R	5 ′ ACCAGTCTGGCCCAAGGAA 3 ′
p.G848S Mutation	PG848F	5 ′ GGTGGGATGTGGGATAGATTTC 3 ′
	PG848R	5 ′ CCCTCAGAGCCCAGTTTCTAC 3 ′

Reaktionsansatz von 25 µl pro Probe

0,3 µl	DMSO
2,5 µl	PCR-Puffer (10x)
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
2 µl	dNTPs
0,2 µl	Forward Primer (25pmol/ µl)
0,2 µl	Reverse Primer (25pmol/ µl)
0,2 µl	JumpStart AccuTaq
2,0 µl	DNA
14,6 µl	H <sub>2</sub> O

**2.7.2 Restriktionsverdau**

Im Anschluss an die PCR wurde das Amplifikationsprodukt zusammen mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease für 1 h bei 37° C im Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert und danach mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Lag die mtDNA als Wildtyp vor, so konnten die Restriktionsendonukleasen die mtDNA an spezifischer Stelle schneiden, wodurch nach Gelelektrophorese mehrere Banden zu sehen waren. Bei Mutation konnte dieser Prozess hingegen nicht erfolgen. Anhand des entstandenen Bandenmusters auf dem Gel konnte so nachvollzogen werden, ob eine Mutation vorlag oder nicht.

Reaktionsansatz von 30 µl pro PCR-Produkt

0,5 µl	Enzym
3 µl	Puffer der Firma NEB (New England Biolabs, Ipswich, MA)
23,5 µl	H <sub>2</sub> O
3 µl	PCR-Produkt

Spezifische Enzyme für jeweilige Sequenzen

PG 467	Hae III (NEB)
PG 587	Hpa II (Roche, Mannheim, Deutschland)
PG 748	Pvu II (NEB)
PG 1096	Pvu II (NEB)
PG 848	Ban I (NEB)

## 2.8 Gelelektrophorese

### 2.8.1 Agarosegel

Für die Auswertung der IrPCR sowie der Einzel-Molekül-Bestimmung durch smPCR wurde ein 1 %-iges Agarosegel verwendet. Hierzu wurden 100 ml TBE-Puffer (1 M Tris-Borat; pH 8,3; EDTA 20 mM; destilliertes H<sub>2</sub>O) sowie 1 mg Agarose (Seakem LE Agarose, Lonza, Rocker, ME) vermischt und gekocht. Für die Einzel-Deletions-Bestimmung der smPCR wurde ein 0,75–0,8 %-iges Gel hergestellt. Nach Abkühlung auf ca. 60° C wurde 10 µl Ethidiumbromid [Ethidiumbromid aqueous solution 1 % (w/v), Serva, Heidelberg, Deutschland] hinzugegeben. Im Rahmen der IrPCR-Analyse wurden das PCR-Produkt pro Probe mit 5 µl des Auftragspuffers [6x Mass Ruler Loading dye (10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,03 % Bromophenol blue; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA; Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland] versehen und 10 µl des Gemischs aufgetragen. Bei der smPCR wurde das Gel mit dem kompletten PCR-Produkt (12 µl) und zusätzlich 8 µl Auftragspuffer beladen. Die Gelelektrophorese lief in allen Versuchsteilen bei 120 V. Die Laufzeiten variierten je nach Fragmentgröße zwischen 35 min und 1 h 15 min. Da das Ethidiumbromid im Gel an den vorhandenen DNA-Fragmenten bindet, konnten die Ergebnisse mit Hilfe des UV-Transilluminators (Geldoc XR, Bio-Rad) im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 2.8.2 Polyacrylamidgel

Mit diesen Gelen ist es möglich, sehr kleine DNA-Fragmente (5- 500 bp) voneinander zu trennen und wurden zur Auswertung der POLG1-Analyse nach Enzymverdau angewandt. Zum Beladen des Gels wurden 7 µl Auftragspuffer zu den 30 µl des Enzymverdaus hinzugegeben und schließlich 7 µl des Gemischs aufgetragen. Bei der Elektrophorese wurden stets eine Positiv- sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TBE (TRIS-Borat-EDTA) Puffer. Die Laufzeit betrug 1h bei 20 mA. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel für 12-15 min mit SYBR-GREEN I (35 ml TBE, 5 µl SYBR-GREEN I) gefärbt und danach am UV-Transilluminator (Geldoc XR, Bio-Rad) ausgewertet.

#### Ansatz für 10 %-iges Polyacrylamidgel (100-130 bp)

2,5 ml	Acrylamid/ BISacrylamid (40 %, Bio-Rad)
2,0 ml	TBE-Puffer (5x)
5,4 ml	H <sub>2</sub> O
0,1 ml	APS(Ammoniumpersulfat) (10 %)
0,01ml	TEMED (Tetramethylethyldiamin)

## **3 Ergebnisse**

Mitochondriale Erkrankungen zeigen ein sehr heterogenes Bild an klinischen Symptomen. Die im Rahmen von OXPHOS-Erkrankungen auftretenden funktionellen Einschränkungen betreffen dabei besonders Gewebe, die einen hohen Energiebedarf aufweisen und somit in hohem Maße vom oxidativen Metabolismus abhängig sind. Muskuläre Beschwerden sind deshalb ein häufiges Symptom von Mitochondriopathien und lassen sich pathogenetisch sowohl auf nukleäre als auch mitochondriale Mutationen zurückführen (siehe Einleitung). In den folgenden Versuchen wurden das klinische Beschwerdebild und das Skelettmuskelgewebe eines speziellen Patientenkollektivs differenziert untersucht.

### **3.1 Klinische Darstellung der Patienten**

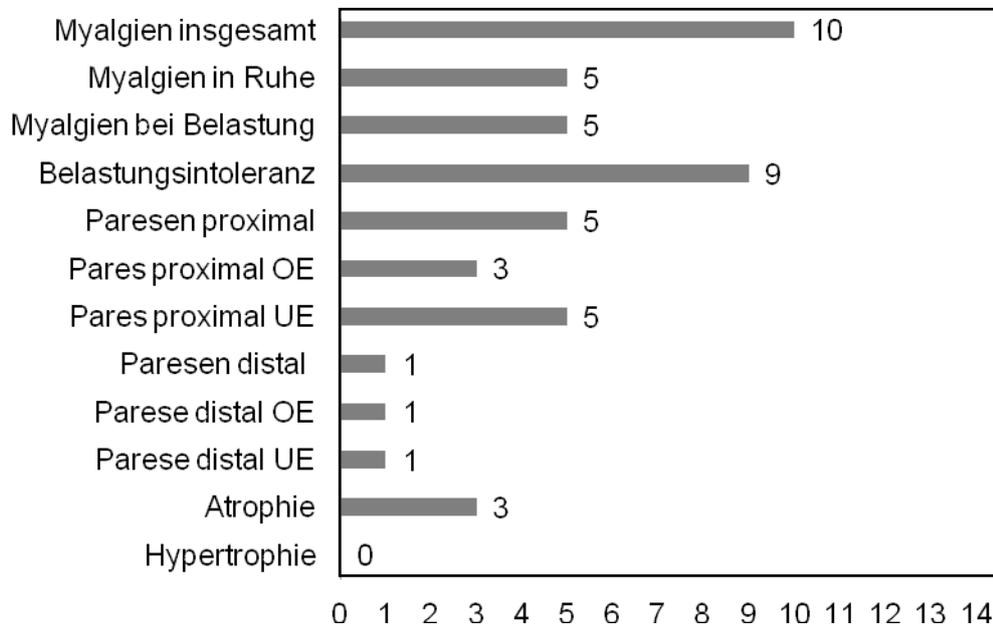
Die in dieser Studie untersuchten 14 Patienten im Alter von 37 bis 76 Jahren (MW 58,57 Jahre  $\pm$  10,76 Jahre; m/w 6/8) zeigten alle isolierte muskuläre Beschwerden, die mit einer mitochondrialen Myopathie vereinbar wären, aber nicht in jedem Fall sicher von unspezifischen oder altersassoziierten Symptomen unterschieden werden konnten (Tab. 1).

In der Laboruntersuchung hatten 8 Patienten einen erhöhten, 4 Patienten einen normwertigen Creatinkinase (CK)-Wert (minimal: 54 U/l, maximal 357,3 U/l). Bei 2 Patienten konnten keine Angaben ermittelt werden (Tab.1).

Als häufigstes klinisches Symptom traten Myalgien auf, wovon 10 Patienten betroffen waren, wobei Myalgien bei Belastung und solche bei Ruhe gleichhäufig festgestellt wurden (jeweils 5 Patienten). Zudem klagten 9 Patienten über muskuläre Belastungsintoleranz. Weitere muskuläre Beschwerden waren Paresen, hierbei überwogen proximale Paresen (obere Extremität: 3 Patienten, untere Extremität: 5 Patienten) gegenüber distalen Paresen (nur Patient p7 betroffen). Alle diagnostizierten Paresen waren nur mild ausgeprägt (BMRC 4/5 bis 4+/5). Muskuläre generalisierte Atrophien traten bei 3 Patienten auf, Hypertrophien wurden hingegen nicht diagnostiziert. Generell wurde festgestellt, dass sämtliche Symptome in den unteren Extremitäten betont auftraten. Insgesamt wurde keine spezifische Altersabhängigkeit der Beschwerden ermittelt. Die detaillierte Übersicht der klinischen Beschwerden wird in Tabelle 1 und Abbildung 3 dargestellt.

Individuum	Alter (Jahre)	Geschlecht	CK-Werte	Myalgien insgesamt	Myalgien in Ruhe	Myalgien bei Belastung	Belastungsintoleranz	Paresen proximal OE	Paresen proximal UE	Paresen distal OE	Paresen distal UE	Atrophie	Hypertrophie
p1	37	m	>	+	+	+							
p2	42	m	>	+		+	+						
p3	46	w	n				+					+	
p4	55	w	>	+		+							
p5	58	w	n				+						
p6	59	w	>	+		+	+	+	+				
p7	59	m	n	+	+		+	+	+	+	+	+	
p8	60	w	>	+	+		+					+	
p9	63	w	k.A.	+		+	+	+					
p10	63	w	k.A.				+	+					
p11	64	m	>	+	+	+							
p12	68	m	>	+									
p13	70	m	>	+	+								
p14	76	w	n				+	+					

**Tab. 1: Darstellung der isolierten muskulären Beschwerden der Patienten.** +: Symptom vorhanden, -:Symptom nicht vorhanden, CK: Creatinkinase, k.A.: keine Angaben, n: Normbereich.



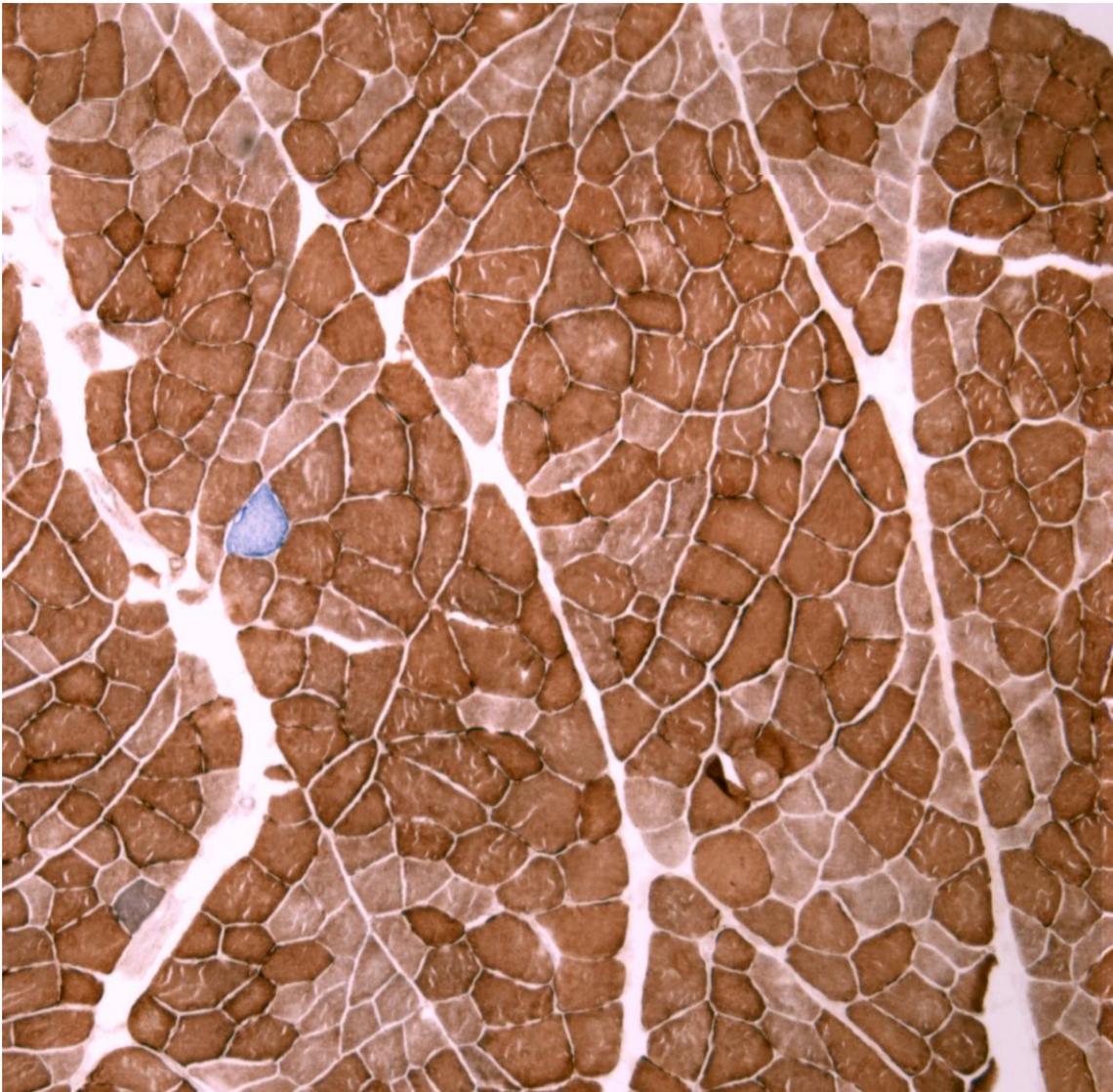
**Abb. 3: Muskuläre Beschwerden der Patienten (n=14),** Daten wurden anamnestisch erhoben, OE: obere Extremität, UE: untere Extremität.

## **3.2 Analyse des muskulären Phänotyps bei Patienten mit isoliertem muskulären Beschwerdekomples**

### **3.2.1 Histologische Auswertung der Skelettmuskelbiopsien**

Alle Patientenbiopsien wurden im Rahmen der Studie histologisch und enzymhistochemisch ausführlich analysiert. Die Biopsien stammten hierfür vorwiegend aus dem M. vastus lateralis. Ausnahmen waren Patient p3 (M. deltoideus), Patient p10 (M. gluteus maximus) sowie Patient p11 (M. biceps brachii). Im Rahmen der histologischen Beurteilung konnten neuromuskuläre Erkrankungen wie eine Myositis, andere metabolische Myopathien, Strukturmyopathien, ein dystrophes Gewebssyndrom oder ein neurogenes Gewebssyndrom ausgeschlossen werden. Im Zentrum der histologischen und enzymhistochemischen Auswertung stand die Untersuchung auf mitochondriale Auffälligkeiten. Dabei wurden zum einen mit Hilfe einer kombinierten COX/SDH-Färbung die Biopsien auf mitochondriale Enzymaktivitätsminderungen untersucht (siehe Abschnitt 2.2). Fasern mit defizitärer COX-Aktivität, aber vorhandener SDH-Aktivität (COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>) sind durch das Nitrobluetetrazolium der SDH-Färbung im Zytoplasma blau angefärbt, was die Detektion der COX-negativen Fasern erleichtert (Abb. 4) (Taylor and Turnbull, 2005).

Zur Quantifizierung der histochemischen Auffälligkeiten wurden hier sowohl die Gesamtfaseranzahl als auch die Anzahl COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern eines gesamten Muskelschnittes manuell gezählt und in Relation (%-Angabe) gesetzt. Im Rahmen der Auswertung zeigten die Patienten insgesamt leichte mitochondriale Auffälligkeiten der Muskulatur, die nach Datenlage und unserer Erfahrung jedoch nicht hinreichend sicher als pathologisch gewertet werden konnten. Es konnte eine fokale Minderung der COX-Aktivität mit einzelnen COX-negativen Fasern bei fast allen Patienten festgestellt werden. Einzige Ausnahme war der jüngste Patient p1, in dessen Biopsie keine COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern detektiert wurden. Der Großteil der Patientenbiopsien (10 Patienten) zeigte mitochondrial auffällige Faseranteile von 0,20 % bis 0,76 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern im Querschnitt (Tab.2). Patient p2 hatte einen äußerst ausgeprägten histochemischen Befund mit 1,91 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern.



**Abb. 4: Histochemischer Befund der Skelettmuskelbiopsie von Patient p12.** COX(braun)/ SDH(blau) – Doppelfärbung. Eine COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Faser entspricht einer verminderter COX-Aktivität (mitochondrial kodiert), bei erhaltener SDH-Aktivität (nukleär kodiert). COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern zeigen entsprechend eine pathologischen mitochondrialen Aktivität und färben sich blau. Um einen möglichst exakten Gesamteindruck zu erhalten, wurden für jeden Muskelschnitt die gesamte Faseranzahl, sowie die Anzahl aller COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern gezählt. Bei Patient p12 wurden insgesamt 0,30 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern ermittelt. COX: Cytochrom-c-Oxidase, SDH: Succinatdehydrogenase.

Außerdem wurde für jede Patientenbiopsie eine modifizierte Gomori-Trichrom-Färbung angefertigt, um spezielle Fasern, die sogenannten *ragged red fibers* (RRF), detektieren zu können (siehe Abschnitt 2.2). Diese RRF zeichnen sich durch eine starke, meist kompensatorische Proliferation und folgend Akkumulation von Mitochondrien aus. Auch bei der Gomori-Trichrom-Färbung wurde der gesamte Muskelschnitt ausgewertet. Dabei wurden bei 7 Patientenbiopsien RRF gefunden. Der Anteil der RRF reichte insgesamt von 0 % bis 0,19 % (Tab. 2). Patient p2 zeigte auch hier die stärksten mitochondrialen Auffälligkeiten (0,19 % RRF).

Die Kontrollbiopsien hatten einen unauffälligen histomorphologischen Befund mit altersentsprechend keinen bis allenfalls sehr leichten unspezifischen histologischen Veränderungen. Folgende neuromuskuläre Erkrankungen oder Gewebsveränderungen wurden gezielt ausgeschlossen: Strukturmyopathien, neurogene Gewebssyndrome, Myositiden, metabolische und mitochondriale Myopathien und dystrophe Gewebssyndrome.

Patienten	COX <sup>-</sup> /SDH <sup>+</sup>	RRF
p1	0,000%	0,000%
p2	1,914%	0,191%
p3	0,058%	0,000%
p4	0,199%	0,003%
p5	0,711%	0,010%
p6	0,196%	0,000%
p7	0,428%	0,020%
p8	0,295%	0,000%
p9	0,613%	0,000%
p10	0,759%	0,138%
p11	0,299%	0,080%
p12	0,305%	0,000%
p13	0,089%	0,089%
p14	0,588%	0,000%
MW	0,461%	0,038%
± SD	± 0,48%	± 0,06%

**Tab. 2: Histologische Auswertung der Skelettmuskelbiopsien.** Ergebnisse der COX/SDH-Doppelfärbung sowie der modifizierten Gomori-Trichrom-Färbung. Prozentuale Anteile der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern, bzw. der RRF an Gesamtfaseranzahl. COX<sup>-</sup>: Cytochrom-c-Oxidase, SDH: Succinatdehydrogenase, RRF: ragged red fiber.

### 3.2.2 Mitochondriale Enzymaktivität im Skelettmuskel

Zur weiteren Phänotypisierung wurde anschließend eine biochemische Analyse der Atmungskettenenzymaktivität im Muskelhomogenat durchgeführt. Hierzu wurden die Aktivitäten der OXPHOS-Komplexe I und IV (COX) für die verfügbaren Patientenproben ermittelt und wie in Abschnitt 2.3 beschrieben mit Hilfe der Citratsynthase-Aktivität korrigiert (Tab. 3). Die Analysen von Komplex I zeigten für die meisten Patienten normale Enzymaktivitäten, wobei der spezifische Normbereich bei 0,124 - 0,193 U/gFG lag. Auch die Ergebnisse der COX-Messung ergaben bei laborspezifischen Referenzwerten für den Normbereich von 0,92 - 1,602 U/gFG normale Enzymaktivitäten. Bei zwei Patienten (p9, p10) war die Enzymaktivität von Komplex I und IV leicht erniedrigt.

Patienten	Komplex I/ CS (U/gFG)	COX / CS (U/gFG)
p1	-	-
p2	-	-
p3	0,23	1,33
p4	0,22	1,26
p5	0,12	0,92
p6	0,13	1,35
p7	-	-
p8	0,18	1,25
p9	0,08	0,78
p10	0,07	0,64
p11	-	-
p12	-	-
p13	0,17	1,57
p14	0,13	0,83
MW	0,15	1,1
SD	0,06	0,3

**Tab. 3: Atmungskettenenzymaktivitäten der Patienten im Skelettmuskelhomogenat.** Die Aktivitäten wurden durch eine biochemische Untersuchung bestimmt und mittels CS-Aktivität korrigiert. Bindestriche symbolisieren Proben, die für die Untersuchung nicht verfügbar waren. COX: Cytochrom-c-Oxidase, CS, Citratsynthase, U/gFG: units pro Gramm Feuchtgewicht.

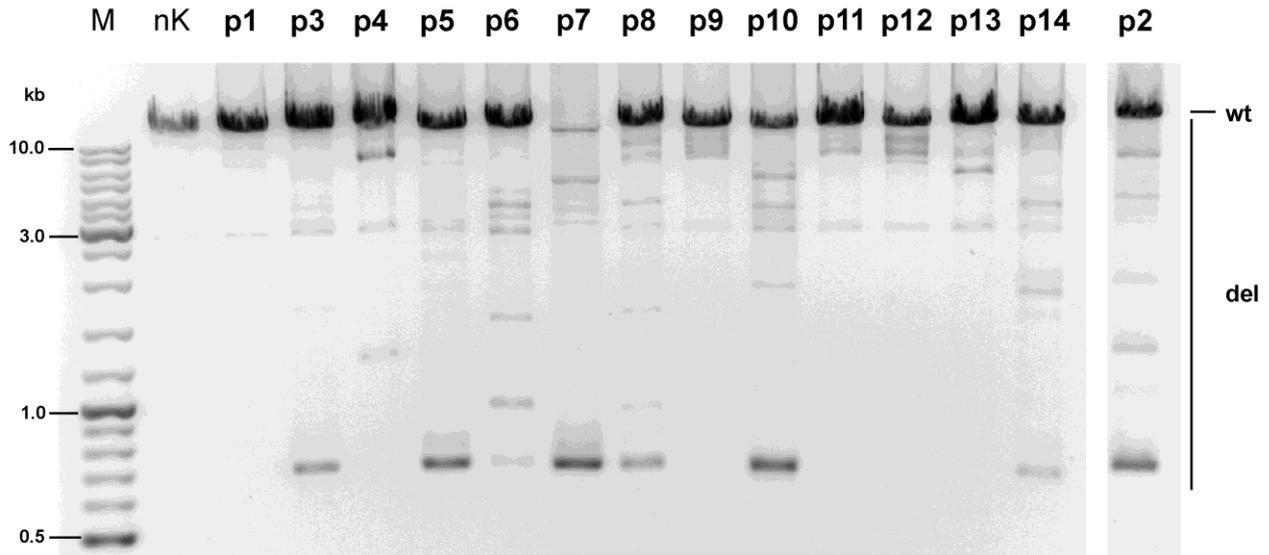
### **3.3 Long range PCR-Analyse bei Patienten und Kontrollen**

Klinisch zeigten die Patienten Symptome vereinbar mit einer isolierten mitochondrialen Myopathie. Im Rahmen der histologischen Aufarbeitung waren zudem leichte mitochondriale Auffälligkeiten in den Muskelbiopsien der meisten Patienten gefunden worden. Auf der Suche nach möglichen Ursachen für diese Beschwerden und die histologischen Befunde wurde daher in einem weiteren Schritt eine molekulargenetische Untersuchung der mtDNA durchgeführt. Da Rearrangements der mtDNA grundsätzlich eine sehr häufige Ursache für mitochondriale Störungen darstellen, wurde das Patientenkollektiv auf das Vorliegen von multiplen Deletionen der mtDNA hin überprüft. Zur Detektion der multiplen Deletionen wurde die lrPCR verwendet (siehe Abschnitt 2.6.1). Diese Analyse wurde nicht nur in dem Patientenkollektiv, sondern auch in dem altersentsprechenden Kontrollkollektiv durchgeführt.

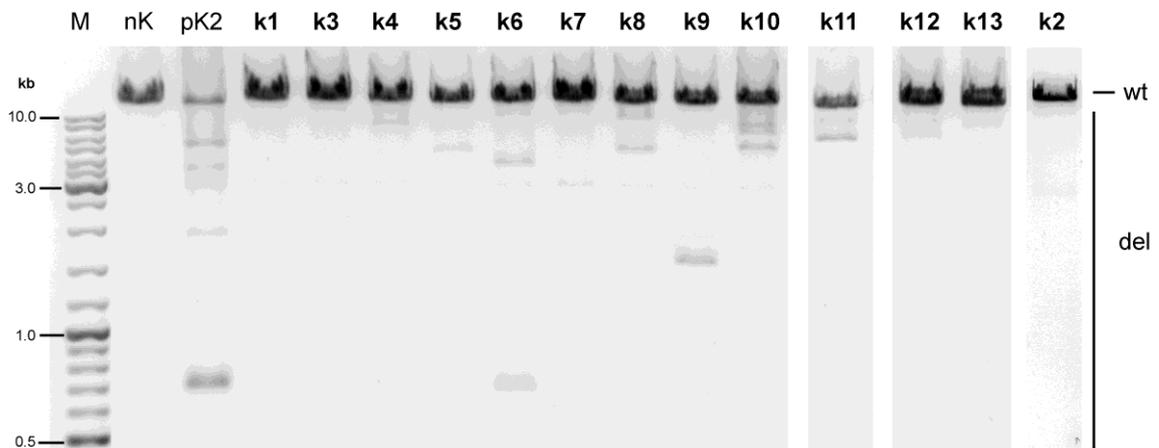
#### **3.3.1 Qualitative Analyse der lrPCR-Ergebnisse**

In Abbildung 5 ist die Analyse des Patientenkollektivs dargestellt. Hier ist das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese, die im Anschluss an die lrPCR durchgeführt worden war, zu sehen. Das entsprechende Experiment wurde auch mit den Kontrollproben durchgeführt (Abb.6). Die jeweiligen lrPCR-Versuche liefen für beide Kollektive unter identischen Bedingungen ab. Mittels der lrPCR wurden in beiden Kollektiven Patienten, bzw. Probanden mit multiplen mtDNA Deletionen nachgewiesen. Beim Vergleich der beiden Gele fiel dennoch ein deutlicher Unterschied zwischen dem Patientenkollektiv und dem Kontrollkollektiv auf.

Unter den durchgeführten PCR-Bedingungen konnte mit dem bloßen Auge bei 13 von 14 Patientenproben multiple Deletionsbanden erkannt werden. Dabei wurden pro Probe 2 bis 7 spezifische Deletionsbanden detektiert. Dies verdeutlichte zum einen die sehr hohe Prävalenz von multiplen Deletionen im Patientenkollektiv, zum anderen bildete die hohe Anzahl von unterschiedlichen Deletionsbanden ein sehr breites Deletionsspektrum innerhalb einer untersuchten Probe ab. Das Amplifikationsprodukt der Wildtyp-mtDNA hatte eine Größe von 13.478 bp. Die Größe der Deletionsbanden lag zwischen 750 bp und 10.000 bp. So konnte auf Deletionsgrößen von bis zu ca. 12.730 bp im untersuchten mtDNA-Abschnitt geschlossen werden. Im Gegensatz dazu wurden innerhalb des Kontrollkollektivs bei nur 7 von insgesamt 13 Kontrollproben Deletionen nachgewiesen. Die 7 positiv getesteten Proben hatten 1-2 Deletionsbanden mit relativ schwacher Intensität, wovon die meisten im Größenbereich von 4.000-10.000 bp lagen.



**Abb. 5: Multiple Deletionen der mitochondrialen DNA im Patientenkollektiv (p1-p14).** Das IrPCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die obersten Banden repräsentieren nichtdeletiertes mitochondriales Genom (wt); darunter liegende Banden zeigen die Präsenz von kürzeren, deletierten mitochondrialen DNA Molekülen (del). Mit Hilfe der Primer ND1 up/ DL1 low wurde ein 13,5 kb Produkt amplifiziert. Die Elektrophorese von p2 lief auf einem anderen Gel. IrPCR: long range polymerase chain reaction, nK: negativ Kontrolle, M: DNA-Marker, kb: Kilobasenpaare.



**Abb. 6: Multiple Deletionen der mitochondrialen DNA im Kontrollkollektiv.** Agarosegelelektrophorese nach IrPCR der Kontrollproben (k1-k13). Die obersten Banden repräsentieren nichtdeletiertes mitochondriales Genom (wt); darunter liegende Banden zeigen die Präsenz von kürzeren mitochondrialen DNA Molekülen mit Deletionen an (del). Mit Hilfe der Primer ND1 up/ DL1 low wurde ein 13,5 kb Produkt amplifiziert. Die Proben k11, k12 und k13 liefen auf demselben Gel, jedoch in anderer Reihenfolge als dargestellt. k2 lief auf einem anderen Gel. IrPCR: long range polymerase chain reaction, kb: Kilobasenpaare, M: DNA-Marker, nK: negativ Kontrolle, pK2: positiv Kontrolle.

### **3.3.2 Software gestützte quantitative Auswertung der IrPCR-Ergebnisse**

Die Intensitäten der Wildtyp- und Deletionsbanden wurden nach Agarosegelelektrophorese mittels der Image J Software bestimmt. Hierzu wurden die Intensitäten aller einzelnen Banden gemessen, wobei das jeweilige Hintergrundsignal abgezogen wurde. Anschließend wurde die Summe der Deletionsbandenintensitäten in Relation zu der Gesamtsumme aus Wildtypbanden- und Deletionsbandenintensität gesetzt. Auf diese Weise konnten die quantitativen Proportionen von Wildtyp- und deletierten mtDNA-Molekülen abgeschätzt werden. Die im Rahmen dieser Methode berechneten Relationen schwankten innerhalb des Patientenkollektivs zwischen 2,7 % und 79,1 % (MW 32,2 %  $\pm$  19,4 %). Somit waren bei allen Patientenproben multiple Deletionen nachgewiesen worden. Auch die Probe bei der mit bloßem Auge keine Deletionsbande erkannt worden war (siehe Abschnitt 3.3.1), zeigte nun in dem hier verwendeten, sensitiveren Verfahren 2,7 % Deletionen. Die Auswertung des Kontrollkollektivs ergab mit 0 % - 24,8 % (MW 8,5 %  $\pm$  9,2 %) wesentlich geringere Werte.

### **3.4 smPCR-Analyse bei Patienten und Kontrollen**

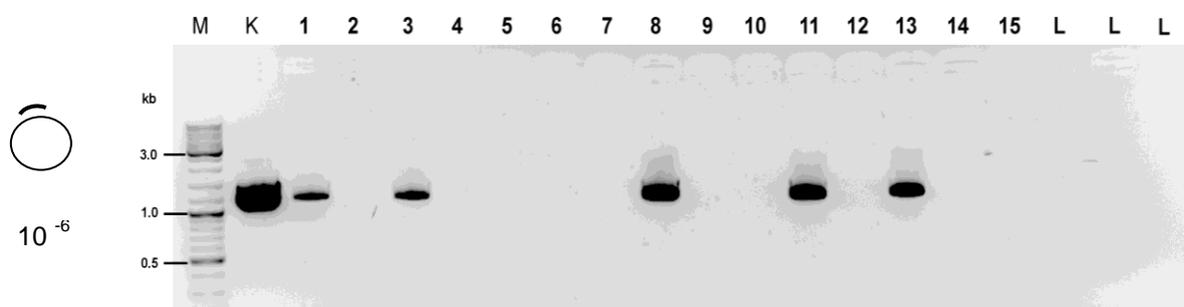
Da multiple Deletionen sowohl bei zahlreichen mitochondrialen Erkrankungen als auch im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses auftreten (siehe Abschnitt 1.7), war die Beurteilung der hier nachgewiesenen multiplen Deletionen sehr schwierig. Zur Differenzierung zwischen einem pathologischen und einem physiologischen, alters-assoziierten Befund war deshalb in einem weiteren Schritt die Quantifizierung der multiplen Deletionen für beide Kollektive nötig. Mit Hilfe der IrPCR kann der Anteil an deletierten mtDNA Molekülen lediglich semiquantitativ ermittelt werden, da durch diese Methode der tatsächlich vorliegenden Deletionsanteil in hohem Maße überschätzt wird.

Durch die zusätzliche Anwendung der smPCR sollte deshalb eine Kalibrierung der IrPCR-Ergebnisse erreicht werden. Die smPCR ist eine äußerst zuverlässige Quantifizierungsmethode, frei von PCR-assoziierten Fehlern, wie Einbau von artifiziellen Mutationen, begünstigte Amplifizierung von speziellen Mutationen und kurzen Molekülen und dem möglichen Matritzen-Wechsel der Polymerase während der DNA-Synthese (jumping PCR) (Kraytsberg and Khrapko, 2005).

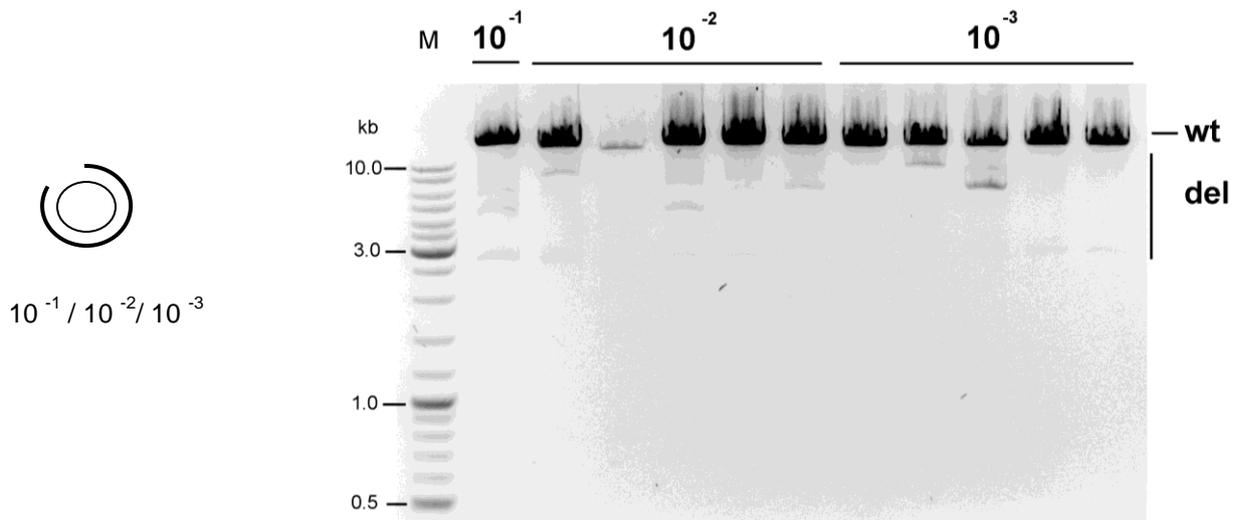
### 3.4.1 Ergebnisse der smPCR

Für die smPCR wurden exemplarisch zwei Patienten sowie zwei Kontrollen ausgewertet. Um die gesamte Bandbreite zu erfassen, wurden innerhalb eines Kollektivs gezielt jeweils eine Probe mit möglichst hohem und eine Probe mit möglichst geringem Anteil an multiplen Deletionen ausgewählt. Ergänzend wurde die smPCR für eine weitere Probe (X) aus dem Kollektiv der Standarddiagnostik des Muskellabors durchgeführt. Wie bereits in Abschnitt 2.6.2 ausführlich erläutert, wurden die mtDNA-Proben für die smPCR soweit verdünnt, dass bei der Einzel-Molekül-Bestimmung nur noch wenige Reaktionsansätze ein PCR-Produkte enthielten, bzw. bei der Einzel-Deletions-Bestimmung nur noch vereinzelt spezifische Deletionsbanden auftraten. Unter diesen Voraussetzungen kann dann davon ausgegangen werden, dass jede Bande von einem einzigen mtDNA Molekül abstammt (Zsurka et al., 2008).

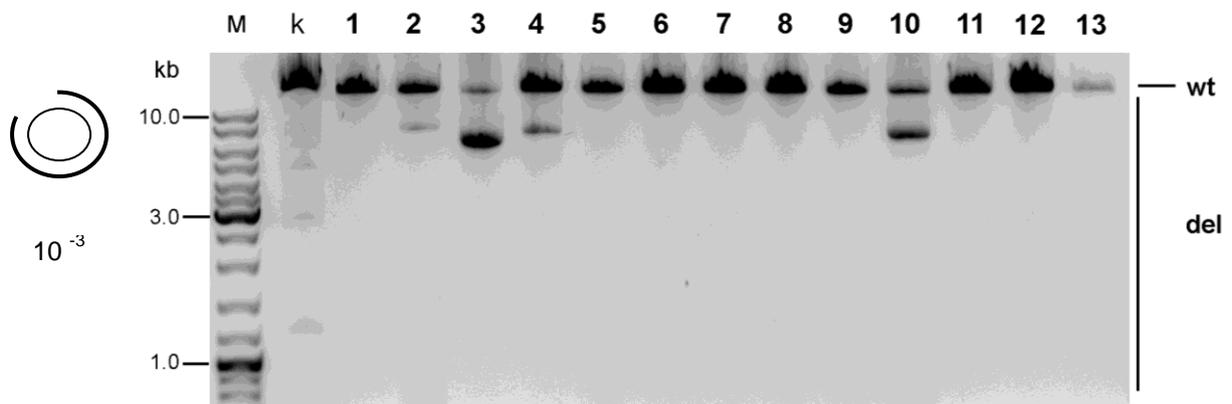
Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Ergebnisse der smPCR für Kontrolle k10 (Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9).



**Abb. 7: Einzel-Molekül-Bestimmung der Kontrollprobe k10: Abschätzung der optimalen DNA-Konzentration.** Agarosegelelektrophorese nach smPCR. Diese wurde mit einer DNA-Verdünnungsstufe von  $10^{-6}$  sowie den Primern DL2 up/12sa low durchgeführt. Eine Bande entspricht einem mitochondrialen DNA Molekül in der Region 16520-1144. In 1 – 15 zeigen 5 (33 %) der insgesamt 15 identischen smPCR-Reaktionsansätze ein Amplifikationsprodukt. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, kb: Kilobasenpaare, M: DNA-Marker, K: Kontrolle (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  der Probe k10), L: Leerwert.



**Abb. 8: Einzel-Deletions-Bestimmung der Kontrollprobe k10: Abschätzung der geeigneten DNA-Konzentration.** Die smPCR wurde mit den DNA-Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$ , sowie den Primern ND1 up/ DL1 low durchgeführt und das Produkt mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die oberste Bande entspricht jeweils einem vorhandenen mitochondrialen DNA Molekül (wt) von 13,5 kb, darunter liegende Banden entsprechen deletierten und damit kürzeren mtDNA Molekülen (del). Es ist deutlich zu sehen, dass die Anzahl der spezifischen Deletionsbanden mit zunehmender Verdünnung abnimmt. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, kb: Kilobasenpaare, M: DNA-Marker.



**Abb. 9: Einzel-Deletions-Bestimmung der Kontrollprobe k10: Abschätzung der optimalen DNA-Konzentration.** Die smPCR wurde mit einer DNA-Verdünnungsstufe von  $10^{-3}$  sowie den Primern ND1 up/ DL1 lo durchgeführt und das Produkt mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die obere Bande entsprechen undeletierten Amplifikationsprodukten (wt) mit einer Länge von 13,5 kb, darunter liegende Banden stellen deletierte und damit kürzere Amplifikationsprodukte dar (del). In 1-13 zeigen 5 (38 %) der insgesamt 13 identischen Reaktionsansätze zusätzlich zum Wildtyp-Produkt spezifische Deletionsbanden. Ein Reaktionsansatz von k10 in Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  diente als Kontrolle (k) und zeigte entsprechend der geringeren Verdünnungsstufe mehrere spezifische Deletionsbanden. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, kb: Kilobasenpaare, L: Leerwert.

Nach Ermittlung der optimalen Verdünnungsstufe erfolgte dann die Berechnung des jeweiligen Deletionsanteils. Hierzu wurde das Ergebnis von k10 in der Einzel-Deletions-Bestimmung (Verdünnung  $10^{-3}$ : 4 PCR-Produkte bei 13 Reaktionsansätzen) zu dem Ergebnis der Einzel-Molekül-Bestimmung (Verdünnung  $10^{-6}$ : 5 PCR-Produkte bei 13 Reaktionsansätzen) in Relation gesetzt.

In Tabelle 4 wird die Berechnung exemplarisch für Probe k10 dargestellt.

Versuchsteil	Verdünnung	smPCR-Ergebnis
Einzel-Deletions-Bestimmung entsprechend	$10^{-3}$	5 von 13 Reaktionen mit spez. Deletions-Bande
	$10^{-3}$	5,8 von 15 Reaktionen mit spez. Deletions-Bande
Einzel-mtDNA-Molekül-Bestimmung entsprechend	$10^{-6}$	5 von 15 Reaktionen mit spez. mtDNA-Bande
	$10^{-3}$	5000 spez. mtDNA-Banden
<b>Relativer Deletionsanteil</b>	$10^{-3}$	5,8/ 5000 = <b>0,116%</b>

**Tab. 4: Beispiel der Auswertung der Agarosegelelektrophorese nach smPCR für die Kontrollprobe k10** (siehe auch Abb. 7 und Abb. 9). smPCR: single molecule polymerase chain reaction, spez: spezifisch.

Entsprechend dem hier dargestellten Prozedere für Kontrolle k10 wurde auch für die anderen 4 Proben verfahren. Die Endergebnisse der smPCR-Analyse zeigt Tabelle 5. Die kalkulierten Anteile an deletierten mtDNA-Molekülen lagen alle unter 1 %. In der Kontrollprobe k13 wurden keine deletierten mtDNA Moleküle nachgewiesen. Für die Patientenprobe p10 wurde mit 0,46 % der höchste Anteil an Deletionen analysiert.

Bei der Gegenüberstellung der smPCR-Resultaten und den Ergebnissen der IrPCR (Tab. 5) viel auf, dass sich die Ergebnissen der IrPCR bezüglich der Relationen zwischen den einzelnen Proben deutlichen glichen. Diese Ergebnisse bestätigten uns in unserem Ansatz, weshalb wir in einem nächsten Schritt die Kalibrierung der IrPCR-Ergebnisse mit Hilfe der smPCR vornahmen.

Individuum	multiple Deletionen in IrPCR	multiple Deletionen in smPCR
X	9,70%	0,08%
p10	54,50%	0,46%
p13	17,40%	0,12%
k10	20,90%	0,10%
k13	0%	0%

**Tab. 5: IrPCR-Ergebnisse und smPCR-Endergebnisse.** Dargestellt sind speziell ausgewählte Individuen mit spezifischem Anteil der multiplen Deletionen. Die dargestellten Endergebnisse entstanden aus dem Durchschnittswert von mehreren Experimenten. Um das gesamte Spektrum abzudecken, wurden für die smPCR aus jedem Kollektiv eine Probe mit möglichst niedrigem, sowie eine Probe mit möglichst hohem Deletionsanteil ausgewählt. X, Probe aus der Routinediagnostik des Muskellabors, IrPCR: long range polymerase chain reaction, smPCR: single molecule polymerase chain reaction.

### 3.4.2 Kalibrierung der IrPCR-Ergebnisse mittels smPCR

Auf Basis der smPCR-Ergebnisse sollte nun in einem nächsten Schritt die Kalibrierung der IrPCR-Ergebnisse mit Hilfe einer Eichgeraden erfolgen.

Die Ergebnisse der IrPCR zeigen normalerweise leichte Schwankungen. Aus diesem Grund wurden für die fünf, für die smPCR ausgewählten Patienten, zunächst mehrere IrPCRs unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

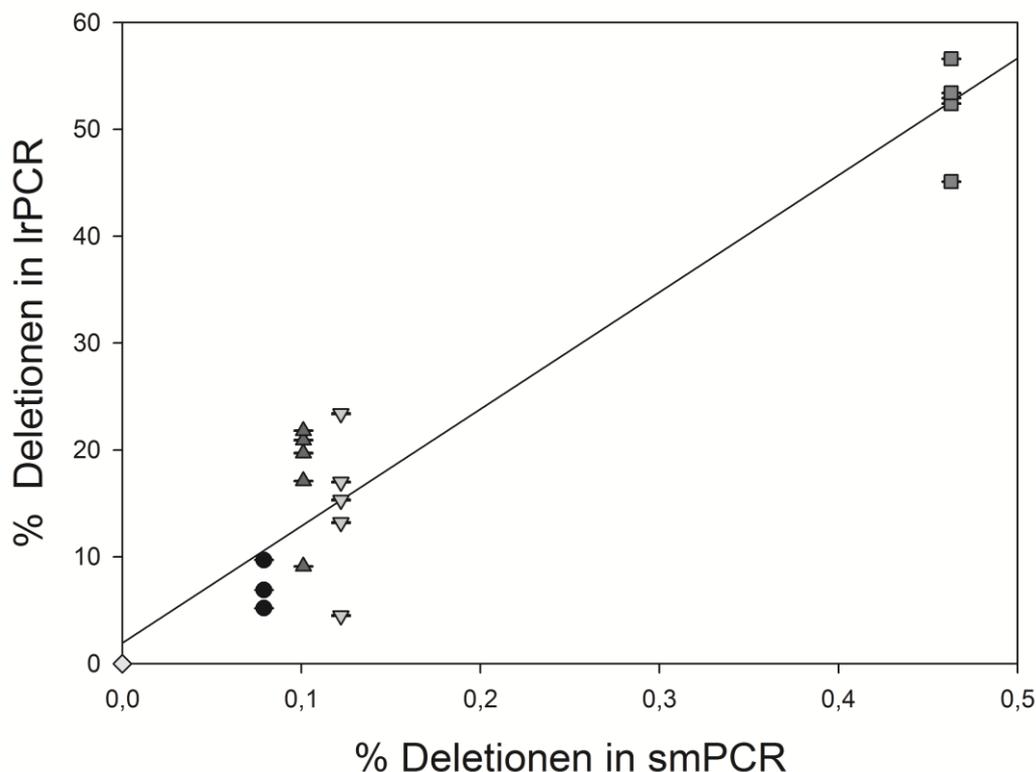
Anschließend wurden die Proportionen von Wildtyp- und Deletionsbandenintensität mit Hilfe der Image J Software wie in Abschnitt 3.3.1.2. beschrieben ausgewertet. Diese semiquantitative Methode überschätzte den tatsächlichen Anteil der deletierten mtDNA im Mittel um den Faktor 123,6. Dennoch war die Streuung der IrPCR-Ergebnisse in Bezug auf eine spezifische Probe gering. Somit war die Bestimmung des Deletionsanteils mittels IrPCR reproduzierbar (Tab. 6).

Method	Versuch	X	p13	p10	k10	k13
smPCR	Endergebnis	0,08%	0,12%	0,46%	0,10%	0%
lrPCR	1.	6,90%	13,20%	52,90%	-	-
	2.	9,70%	17,00%	56,60%	-	-
	3.	5,20%	4,50%	45,10%	-	-
	4.	-	15,30%	52,40%	9,10%	0%
	5.	-	-	-	19,70%	0%
	6.	-	23,40%	53,40%	17,10%	-
	7.	-	-	-	20,92%	0%
	8.	-	-	-	21,80%	0%
	MW	7,27%	14,68%	52,08%	17,72%	0%
	±SD	± 2,27%	± 6,85%	± 4,23%	± 5,14%	± 0%

**Tab. 6: Anteile der deletierten mtDNA Moleküle in smPCR und lrPCR.** Dargestellt sind Endergebnisse der smPCR sowie die semiquantitativen Ergebnisse von acht identischen lrPCRs (1.-8.). Bindestriche symbolisieren Proben, die für jeweilige Analyse nicht verfügbar waren. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, lrPCR: long range polymerase chain reaction, mtDNA: mitochondriale DNA, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

Die smPCR-Analyse der fünf ausgewählten Proben konnten nun zur Kalibrierung der gesamten lrPCR-Ergebnisse genutzt werden. Hierzu wurde für jeden der fünf Patienten der Zusammenhang von mehreren lrPCR- und dem entsprechenden smPCR-Ergebnis untersucht. Dabei konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden ( $r = 0,964$ ;  $p < 0,0001$ ) (Abb. 10). Die daraus resultierende Regressionsgerade ( $f(x) = 109,38x + 1,963$ ;  $r^2 = 0,93$ ) wurde als Eichgerade für alle lrPCR-Ergebnisse des Patienten- und Kontrollkollektivs angewandt.

Auch bei dieser Methode traten geringe Ungenauigkeiten auf. Da diese Studie auf den Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv, bzw. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen abzielte und der Fokus somit auf den jeweiligen Relationen lag, konnten diese jedoch vernachlässigt werden. Die im Folgenden verwendeten prozentualen Angaben der deletierten Anteile der mtDNA entsprechen somit mit Hilfe der smPCR kalibrierten lrPCR-Ergebnissen (lrPCR kal).



**Abb. 10: Vergleich der Deletionsanalyse mittels IrPCR und smPCR.** Die Abbildung zeigt die Korrelationsuntersuchung für 5 speziell ausgewählte Proben ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,001$ ). Anteile der mtDNA Moleküle mit multiplen Deletionen wurden einerseits durch single molecule polymerase chain reaction (smPCR) bestimmt. Andererseits wurden im Rahmen der long range polymerase chain reaction (IrPCR)- Analyse Proportionen von Wildtyp- und deletierten mtDNA-Molekülen semiquantitativ mit Hilfe der Image J –Software abgeschätzt. X (schwarzer Kreis), p10 (dunkel-graues Quadrat), p13 (hell-graues Dreieck), k10 (dunkel-graues Dreieck), k13 (hell-graues Quadrat)

### 3.5 Endergebnisse der Deletionsanalyse

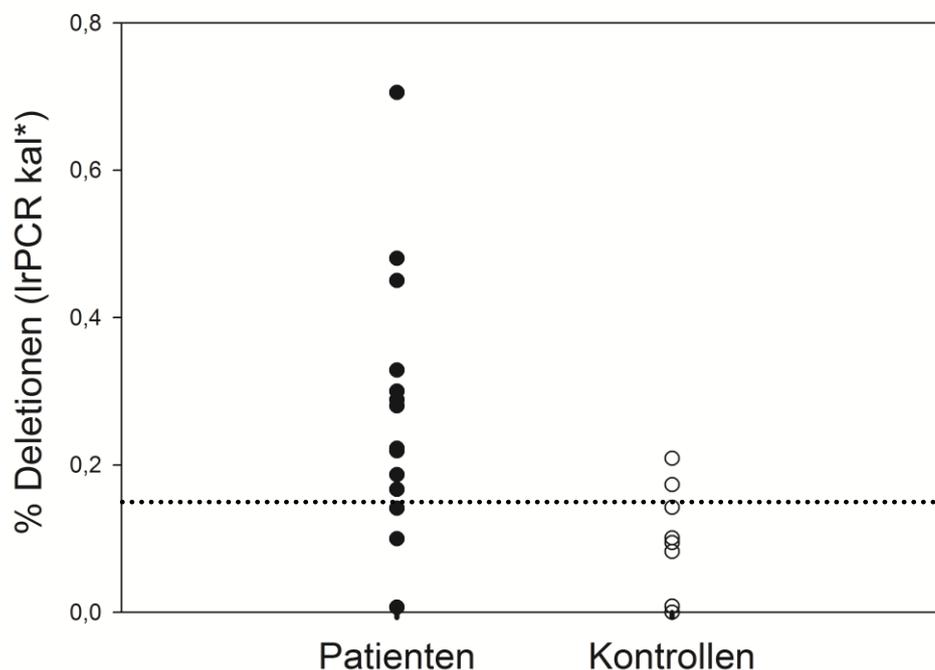
Nach entsprechender Kalibrierung wurden die IrPCR-Ergebnisse detailliert ausgewertet. Die endgültigen Ergebnisse der quantifizierten Deletionsanteile beider Kollektiven zeigt Tabelle 7. Im Patientenkollektiv wurden im Mittel multiple Deletionen von 0,28 % bestimmt. Dabei fiel eine relativ weite Streuung von 0,01 % bis 0,78 % deletierter mtDNA auf. Das Kontrollkollektiv zeigte hingegen mit einem Mittelwert von 0,06 % geringere Deletionsanteile. Im Vergleich zeigten somit 8 Patienten höhere Werte als der höchste ermittelte Deletionsanteil unter den gesunden Kontrollen. Auch der Schwankungsbereich fiel unter den Kontrollen geringer aus (0 %-0,21 %).

Beim Gesamtvergleich der beiden Kollektive wurde deutlich, dass bei 11 Patienten ein Anteil an multiplen Deletionen von über 0,15 % vorlag. Im Gegensatz dazu erreichten nur 2 Kontrollproben Werte im Bereich über 0,15 % (Abb. 11).

In Übereinstimmung mit der qualitativen Analyse der Gelelektrophorese konnte auf Basis der kalibrierten IrPCR-Auswertung bei den Patienten ein hochsignifikant höheres Maß an multiplen Deletionen ermittelt werden ( $p = 0,0006$ ).

Patientenkollektiv			Kontrollkollektiv		
Patienten	Alter	multiple Deletionen	Kontrollen	Alter	multiple Deletionen
p1	37	0,01%	k1	38	0%
p2	42	0,45%	k2	39	0%
p3	46	0,19%	k3	39	0%
p4	55	0,17%	k4	43	0,08%
p5	58	0,33%	k5	43	0,01%
p6	59	0,30%	k6	48	0,10%
p7	59	0,71%	k7	57	0%
p8	60	0,28%	k8	57	0,14%
p9	63	0,22%	k9	59	0,09%
p10	63	0,48%	k10	65	0,17%
p11	64	0,10%	k11	70	0,21%
p12	68	0,29%	k12	72	0%
p13	70	0,14%	k13	73	0%
p14	76	0,22%			
MW	58,6	0,28%	MW	54,1	0,06%
± SD	10,8	± 0,18%	± SD	13,2	± 0,08%

**Tab. 7: Anteil der multiplen Deletionen der mtDNA-Moleküle bei Patienten- und Kontrollproben.** Dargestellt sind das Alter sowie die kalibrierten Ergebnisse der long range polymerase chain reaction (IrPCR kal). MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; mtDNA: mitochondriale DNA.



**Abb. 11: Quantitativer Vergleich der multiplen Deletionen bei Patienten und Kontrollen.** Entsprechend zeigen 11 Patienten (n=14) Deletionsanteile von über 0,15 % und sind damit insgesamt deutlich stärker betroffen als die Kontrollgruppe (n=13), in der nur 2 Proben Deletionsanteile oberhalb des 0,15 %-Deletionslevels (gestrichelte Linien) aufweisen. \*der Anteil der deletierten mtDNA-Moleküle entspricht dem durch smPCR kalibrierten IrPCR-Ergebnis. IrPCR: long range polymerase chain reaction.

### 3.6 Analyse des Polymerase- $\gamma$ Gens (POLG1)

Nukleäre Mutationen der Polymerase  $\gamma$  POLG1 sind nicht selten und können ebenfalls multiple mtDNA-Deletionen hervorrufen (siehe Abschnitt 1.4) (Van Goethem et al., 2001). Um diese Pathogenese für die hier nachgewiesenen multiplen Deletionen weitestgehend ausschließen zu können, wurden beide Kollektive auf die häufigen Mutationen p.A467T, p.P587L, p.W748S, p.G848S und p.R1096C im Polymerase  $\gamma$  - Gen (POLG1) untersucht (siehe Abschnitt 2.7). Der Restriktionsverdau zeigte bei Kontrollprobe k12 eine heterozygote p.G848S - Mutation. Diese Mutation wurde zu 0,5% in der holländischen Normal-Bevölkerung nachgewiesen (Blok et al., 2009). Da überdies in der im Folgenden beschriebenen Deletionsanalyse für die Kontrollprobe k12 keine multiplen Deletionen detektiert wurden, konnte dieses Resultat hier als pathogenetisch irrelevant eingestuft werden. Die Untersuchungen der restlichen Kontrollproben und aller Patienten fielen negativ aus.

### **3.7 Einfluss des Lebensalters auf Phänotyp und Genotyp**

Im weiteren Verlauf sollten nun mögliche Ursachen der Befunde analysiert werden. Leichte mitochondriale Veränderungen kommen auch bei Gesunden in höherem Lebensalter vor (siehe Abschnitt 1.7). Daher wurden die erarbeiteten Daten als nächstes in Bezug auf eine mögliche Beeinflussung durch das Alter genauer beleuchtet.

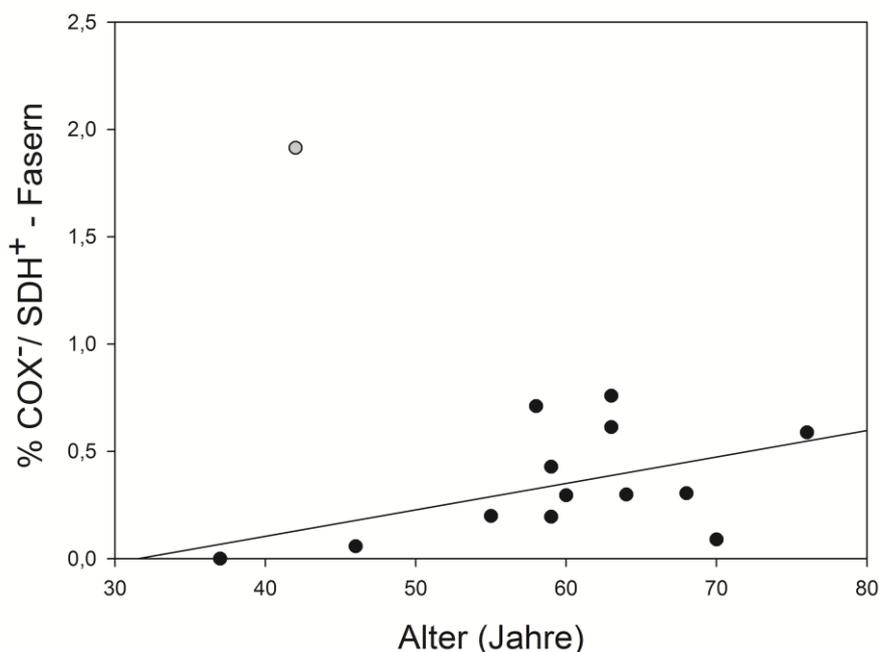
#### **3.7.1 Beeinflussung der histochemischen und biochemischen Befunde durch das Alter**

Die histochemischen und biochemischen Analysen der Patientenbiopsien zeigten insgesamt leichte mitochondriale Auffälligkeiten. In einem ersten Schritt wurde der Zusammenhang zwischen dem Lebensalter der Patienten und den biochemischen Ergebnissen untersucht. Bei der entsprechenden Analyse konnte eine geringe Korrelation ( $r = -0,271$ ;  $p = 0,480$ ) ermittelt werden. Somit zeigte sich in unserem Kollektiv mit steigendem Lebensalter eine abnehmende biochemische Aktivität.

Im Anschluss daran wurden die histochemischen Befunde auf mögliche Altersabhängigkeit hin überprüft. Durchschnittlich zeigten sich bei Patienten bis 55 Jahre 0,54 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern. Bei Patienten im Alter von 56 bis 76 Jahren wurde jedoch ein leicht geringerer COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasergehalt erhoben (0,43 %). Bei der entsprechenden Korrelationsanalyse wurde folglich kein Zusammenhang zwischen Alter und Anzahl der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern bei den Patienten gefunden.

Innerhalb des Patientenkollektivs fiel allerdings ein relativ junger Patient mit besonders hoher Anzahl von COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern auf (p2/ 42 Jahre/ 1,914 %). Dieser Patient hatte auch klinisch den auffälligsten Befund. Um auch eine Aussage über die anderen, klinisch weniger stark betroffenen Patienten treffen zu können, wurde eine weitere Analysen des Patientenkollektiv ohne Berücksichtigung von Patient p2 durchgeführt.

Unter Ausschluss von Patient p2 zeigten die Patienten unter 55 Jahren im Mittel 0,08 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern. Bei der entsprechenden Korrelationsanalyse wurde jetzt im Patientenkollektiv ein statistischer Trend zum positiven Zusammenhang von Lebensalter und Anzahl der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern ermittelt ( $r = 0,491$ ;  $p = 0,088$ ) (Abb.12).



**Abb. 12: Altersabhängigkeit des histologischen Befundes der COX-/SDH+ - Fasern bei Patienten zwischen 37 und 76 Jahren** ( $r = - 0,16$ ;  $p = 0,577$  bzw. unter Ausschluss von p2  $r = 0,49$ ;  $p = 0,088$ ). grauer Punkt: Patient p2, schwarze Punkte: restliches Patientenkollektiv ( $n = 13$ ). COX-/SDH+ - Fasern wurden mittels COX/SDH-Doppelfärbung detektiert. Die Regressionsgerade wurde unter Ausschluss von p2 ermittelt. COX: Cytochrom-c-Oxidase, SDH: Succinatdehydrogenase.

### 3.7.2 Einfluss des Lebensalters auf multiple Deletionen

Innerhalb dieser Studie konnten durch die molekulargenetische Analyse bei den Patienten multiple Deletionen der mtDNA nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.3). Da multiple Deletionen wie bereits erläutert auch bei gesunden Menschen im Rahmen des Alterungsprozesses auftreten, sollte nun nach der Quantifizierung der Zusammenhang von multiplen Deletionen und dem Lebensalter in den hier untersuchten Kollektiven analysiert werden.

In Tabelle 7 wurden bereits die kalibrierten Anteile an deletierter mtDNA und das entsprechende Alter dargestellt. Im Rahmen der folgenden Untersuchung wurden die beiden Kollektive nun jeweils in eine Fraktion unter 55 Jahre (I) und eine Fraktion über 55 Jahre (II) unterteilt (Tab. 8).

multiple Deletionen	Patienten		Kontrollen	
	I ≤ 55 Jahre	II > 55 Jahre	I ≤ 55 Jahre	II > 55 Jahre
Minimum	0,01%	0,10%	0%	0%
Maximum	0,45%	0,71%	0,10%	0,21%
MW ± SD	0,20% ± 0,18%	0,31% ± 0,18%	0,03% ± 0,5%	0,09% ± 0,089%

**Tab. 8: Altersspezifischer Anteil der deletierten mitochondrialen DNA Moleküle in Prozent.** Patienten- und Kontrollkollektive wurden für diese Darstellung in Fraktion I (< 50 Jahre) und Fraktion II (>50 Jahre) eingeteilt. Die Deletionsanteile entsprechen kalibrierten IrPCR-Ergebnissen (IrPCR kal). IrPCR: long range polymerase chain reaction, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung.

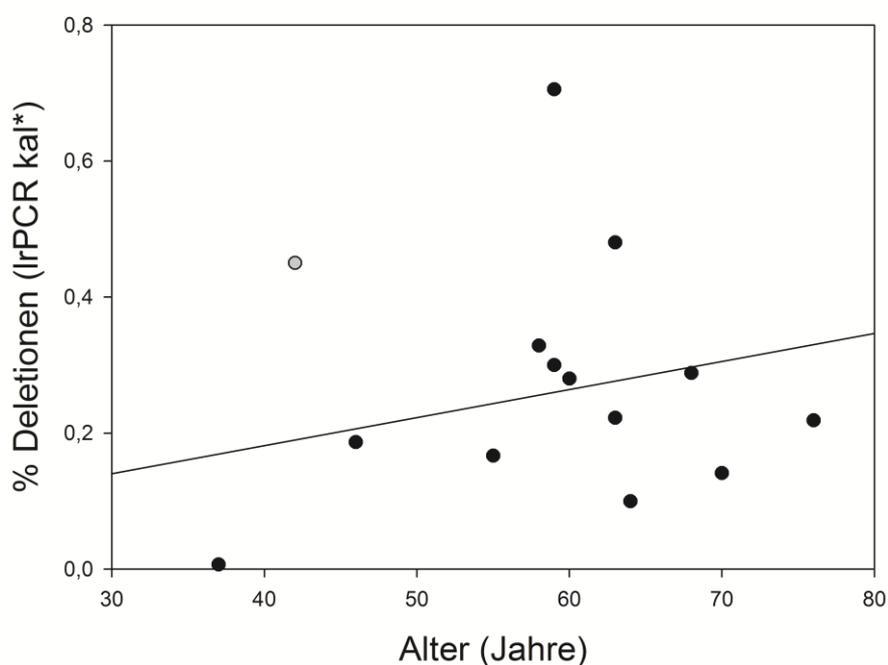
Bei der Analyse der altersabhängigen Fraktionen wurden deutliche Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv ermittelt.

Das Patientenkollektiv zeigte eine durchschnittliche Zunahme der multiplen Deletionen von 0,20 % in (I) auf 0,31 % in (II) (Tab. 8). Die meisten multiplen Deletionen (0,71 %) wurden bei dem 59-jährigen Patient p7 gefunden. Allerdings hatten auch zwei ältere Patienten relativ wenige multiple Deletionen (p11: 64 Jahre/ 0,1 % Deletionen; p13: 70Jahre/ 0,14 %Deletionen) (Tab. 7). Parallel zu der Auffälligkeit im Rahmen der histologischen Untersuchung zeigte Patient p2 auch hier eine für sein Alter beachtliche Quantität an multiplen Deletionen (42 Jahre/ 0,45 %). Unter Ausschluss von p2 wurde eine stärkere, aber auch hier nicht signifikante Altersabhängigkeit der multiplen Deletionen im Patientenkollektiv verzeichnet ( $r = 0,234$ ;  $p = 0,441$ ).

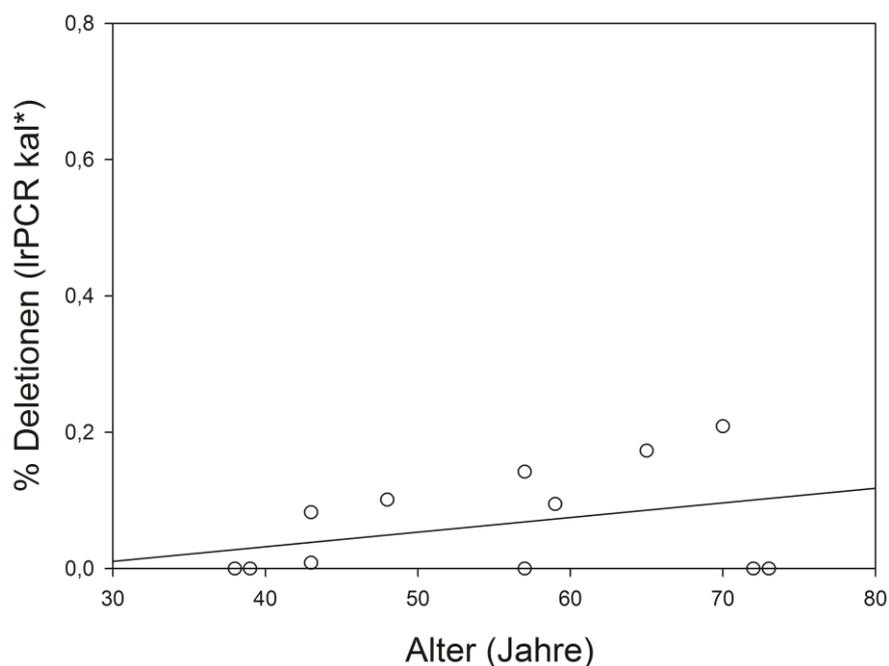
Bei Betrachtung des gesamten Kollektivs inklusive p2 konnte keine altersabhängige Zunahme der multiplen Deletionen festgestellt werden (Abb. 13)

Die Analyse des Kontrollkollektivs zeigte im Gegensatz dazu eine stärkere durchschnittliche Zunahme der Deletionen von 0,03% in Fraktion (I) auf 0,09 % in Fraktion (II) (Tab. 8). Das höchste Maß an multiplen Deletionen zeigte die 70-jährige Kontrolle k11 mit 0,21 % deletierter mtDNA. Allerdings wurden bei den zwei ältesten Kontrollproben keinerlei Deletionsbanden detektiert (k12: 72 Jahre, 0 %; k13: 73 Jahre, 0 %) (Tab. 7).

Demzufolge waren Kontrollproben ohne Deletionen über alle Altersklassen verteilt. Insgesamt konnte innerhalb des Kontrollkollektivs ein größerer Zusammenhang ( $r = 0,372$ ;  $p = 0,211$ ) zwischen steigendem Alter und multiplen Deletionen gezeigt werden, der Zusammenhang war im gesamten Kontrollkollektiv aber nicht statistisch signifikant. Statistisch war jedoch bei den Proben, bei denen multiple Deletionen detektiert wurden, eine signifikante Altersabhängigkeit der Deletionen nachweisbar ( $r = 0,886$ ;  $p < 0,05$ ) (Abb. 14).



**Abb. 13: Altersabhängigkeit der multiplen Deletionen bei Patienten zwischen 37 und 76 Jahre** ( $r = 0,08$ ;  $p = 0,795$  bzw. unter Ausschluss von p2:  $r = 0,23$ ;  $p = 0,441$ ). \*der Anteil der deletierten mtDNA-Moleküle entspricht dem durch smPCR kalibrierten IrPCR-Ergebnis. Die Regressionsgerade wurde unter Ausschluss von p2 ermittelt. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, IrPCR: long range polymerase chain reaction, grauer Punkt: Patient p2, schwarze Punkte: restliches Patientenkollektiv ( $n = 13$ ).



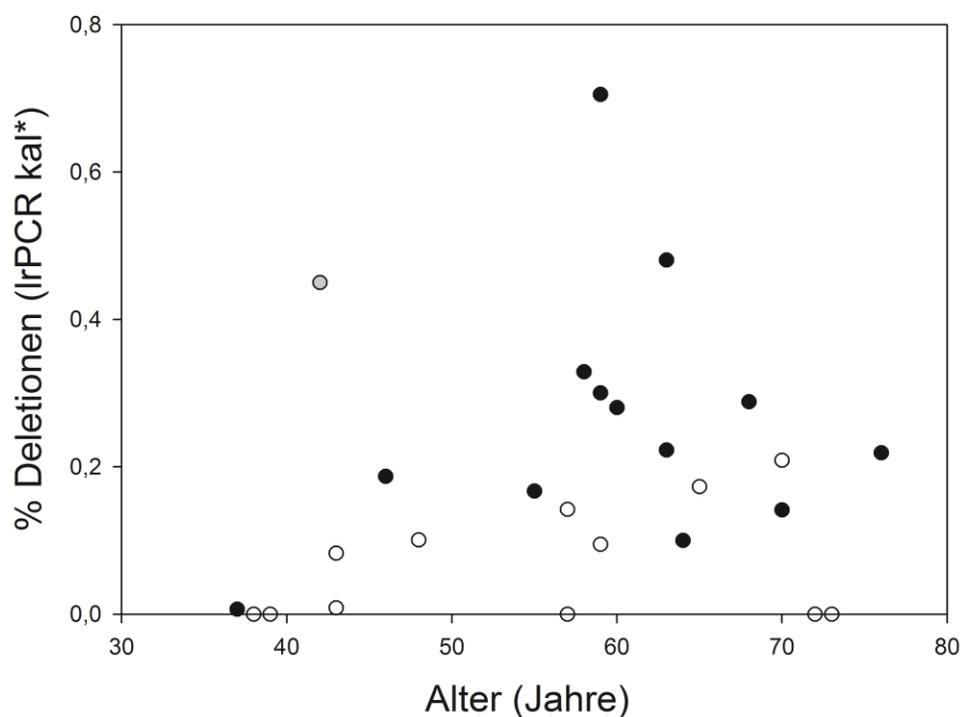
**Abb. 14: Altersabhängigkeit der multiplen Deletionen bei Kontrollproben zwischen 38 und 73 Jahre** ( $r = 0,37$ ;  $p = 0,211$ ). \*der Anteil der deletierten mtDNA-Moleküle entspricht dem durch smPCR kalibrierten IrPCR-Ergebnis. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, IrPCR: long range polymerase chain reaction, weiße Punkte: gesamtes Kontrollkollektiv ( $n=13$ ).

Bei dem direkten Vergleich der beiden Kollektive konnte festgestellt werden, dass die Patienten auch in höherem Lebensalter stärker von multiplen Deletionen betroffen waren. Einzige Ausnahme stellten zwei Patienten dar (p11/ 64 Jahre; p13/ 70 Jahre). Beim Vergleich der beiden Kollektive lagen die Deletionsanteile dieser Patienten leicht unter dem entsprechenden Kontrollwert (Abb. 15). Wie bereits erwähnt wurde, hatten diese Patienten mit 0,1 % und 0,14 % ein eher geringes Maß an multiplen Deletionen. Somit liegt bei nur niedrigem Anteil an multiplen Deletionen eine gewisse Überschneidung von Patientenbefunden und alters-assoziertem Normalbefunden vor.

Zur Bewertung des Diagnosekriteriums „multiple Deletionen der mtDNA“ für das hier untersuchte Patientenkollektiv wurde im Rahmen der statistischen Auswertung außerdem eine *receiver operating characteristic*-Analyse (ROC-Kurvenanalyse) durchgeführt. Diese zeigte, dass es in der Tat bei nur leicht erhöhtem Deletionsanteil (niedriger Deletionslast) schwierig ist, von einem pathologischen Befund zu sprechen. So konnte bei 0,1 % deletierter mtDNA eine Zuordnung zum Patientenkollektiv nur mit einer Spezifität von 0,692 erfolgen. Bei höheren Deletionsanteilen war

die Differenzierung jedoch wesentlich erfolgreicher. Dem entsprechend konnte schon bei einem Anteil von 0,15 % deletierter mtDNA mit einer Sensitivität von 0,786 und einer Spezifität von 0,846 eine Zuordnung zum „genuinen“ Patientenkollektiv erfolgen.

Somit konnte für den im Vorfeld häufig schwierig einzuordnenden Befund der multiplen Deletionen ein „cut-off“-Wert der Differenzierung zwischen pathologischem Befund und nur altersbedingter Akkumulationen von multiplen Deletionen bestimmt werden.



**Abb. 15: Altersabhängige Verteilung der multiplen Deletionen.** Gemeinsame Darstellung von Patienten (n=14; schwarze Punkte und grauer Punkt) und Kontrollproben (n=13; weiße Punkte). \*der Anteil der deletierten mtDNA-Moleküle entspricht dem durch smPCR kalibrierten IrPCR-Ergebnis. smPCR: single molecule polymerase chain reaction, IrPCR: long range polymerase chain reaction.

### **3.8 Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Beziehung**

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse konnten die multiplen Deletionen der meisten Patienten als pathologischer Befund eingestuft werden. Um eine Aussage über die pathogenetische Relevanz der multiplen Deletionen treffen zu können, war jedoch nicht nur die Quantifizierung, sondern auch die Überprüfung der funktionellen Auswirkungen der Deletionen entscheidend.

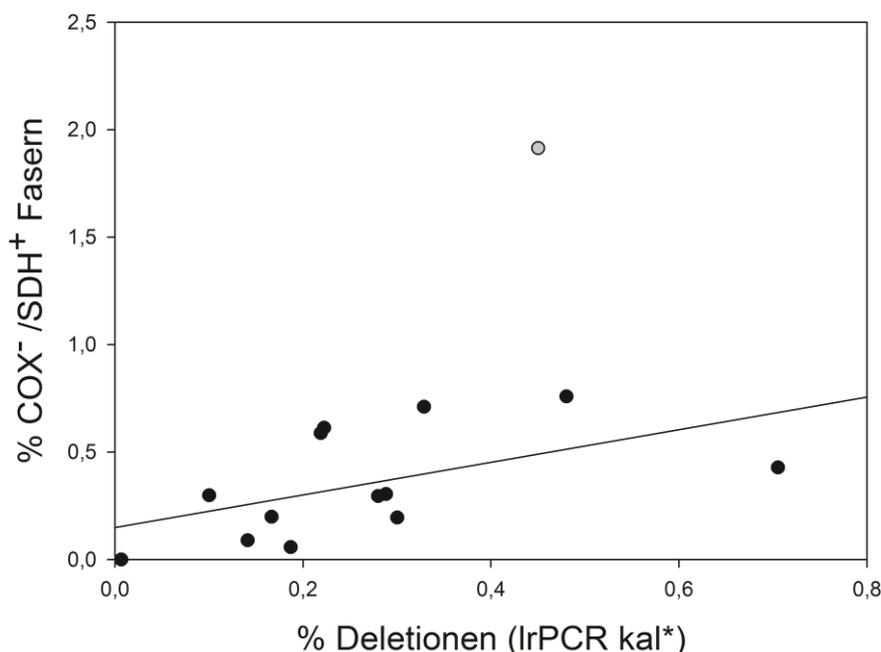
In einem nächsten Schritt sollten daher die genauen Zusammenhänge der Ergebnisse von unterschiedlichen Untersuchungen des Skelettmuskelgewebes betrachtet werden. Im Vordergrund stand dabei die Fragestellung, welche möglichen Auswirkungen die nachgewiesenen multiplen Deletionen auf histologischer und biochemischer Ebene zeigen.

#### **3.8.1 Einfluss multipler Deletionen der mtDNA auf histologische Befunde**

Bei der histologischen Aufarbeitung waren im Patientenkollektiv häufig leichte mitochondriale Auffälligkeiten gefunden worden (siehe Abschnitt 3.2.1). Im Rahmen der Genotyp-Phänotyp-Analyse wurde deshalb als erstes der Zusammenhang von multiplen Deletionen und histochemischem Befund untersucht. Die entsprechende Korrelationsanalyse wird in Abbildung 16 dargestellt.

Durch die Korrelationsanalyse konnte mit zunehmendem Deletionsanteil ein Anstieg der Menge COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern ermittelt werden ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,069$ ). Obwohl Patient p2 auch in dieser Untersuchung auffiel, war sein Befund für die Korrelationsanalyse nicht ausschlaggebend (ohne p2  $r = 0,53$ ). Patient p1 war der einzige Patient ohne COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern, er hatte allerdings auch die wenigsten Deletionen (0,01 %). Alle anderen Patienten mit höheren Deletionsanteilen präsentierten eine deutlich höhere Anzahl an COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern (Abb. 16).

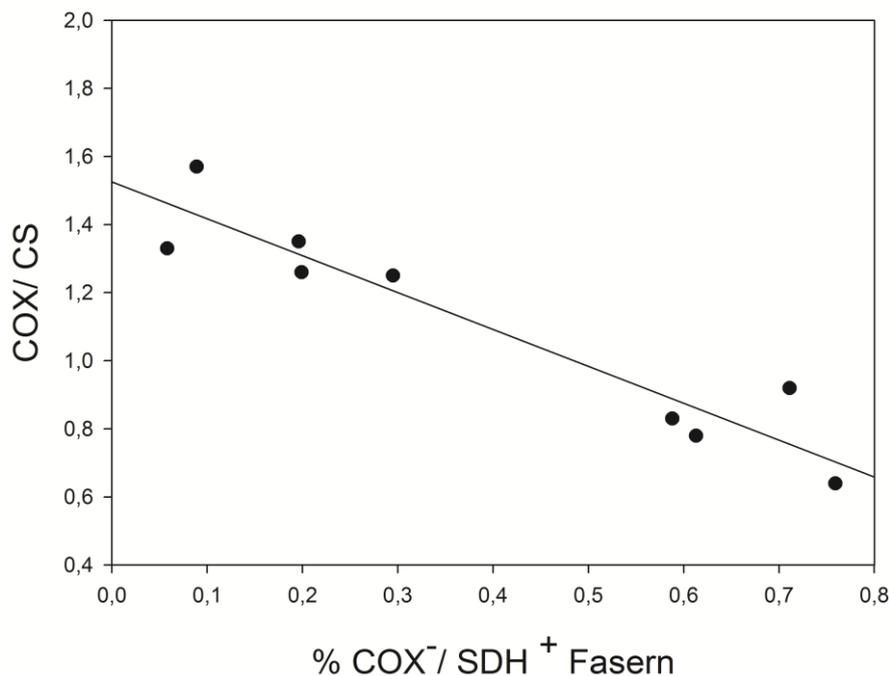
Es zeigte sich somit ein statistischer Trend zur Assoziation der Menge COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern mit der Deletionslast des Gewebes.



**Abb. 16: Zusammenhang von multiplen Deletionen und COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>- Fasern im Patientenkollektiv (n=14) ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,069$ ). \*der Anteil der deletierten mtDNA-Moleküle entspricht dem durch smPCR kalibrierten IrPCR-Ergebnis. COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>- Fasern wurden mittels COX/SDH Doppelfärbung ermittelt. grauer Punkt: p2, schwarze Punkte: restlichen Patienten. Die Regressionsgerade wurde unter Ausschluss von p2 erstellt. COX: Cytochrom-c-Oxidase, SDH: Succinatdehydrogenase, smPCR: single molecule polymerase chain reaction, IrPCR: long range polymerase chain reaction.**

### 3.8.2 Einfluss multipler Deletionen der mtDNA auf OXPHOS-Enzymaktivitäten

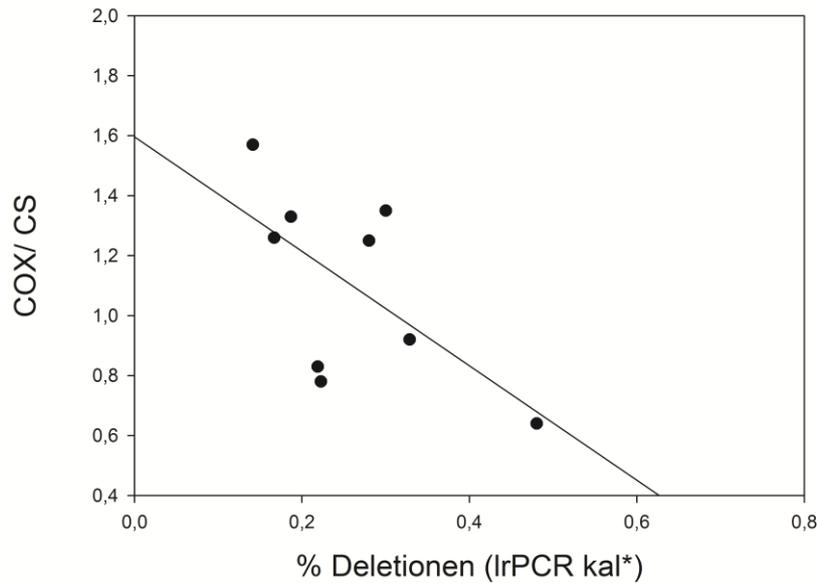
Im Rahmen der Genotyp-Phänotyp-Analyse wurde anschließend die biochemisch bestimmte mitochondriale Atmungskettenaktivität der Patienten in Beziehungen zu den genetischen und histologischen Befunden untersucht. Die CS-normalisierten Enzymaktivitäten lagen im gesamten Patientenkollektiv innerhalb des Normbereichs, bzw. vereinzelt leicht darunter (siehe Abschnitt 3.2.2). Bei der Korrelationsanalyse von biochemischen und histochemischen Befunden konnte nun ein klarer signifikanter Zusammenhang von Enzymaktivität im Gewebe und Anzahl COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern festgestellt werden ( $r = -0,95$ ;  $p < 0,001$ ) (Abb. 17). Die Menge der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern war mit der Enzymaktivität negativ korreliert. Histologische und biochemische Befunde lagen damit im Einklang miteinander.



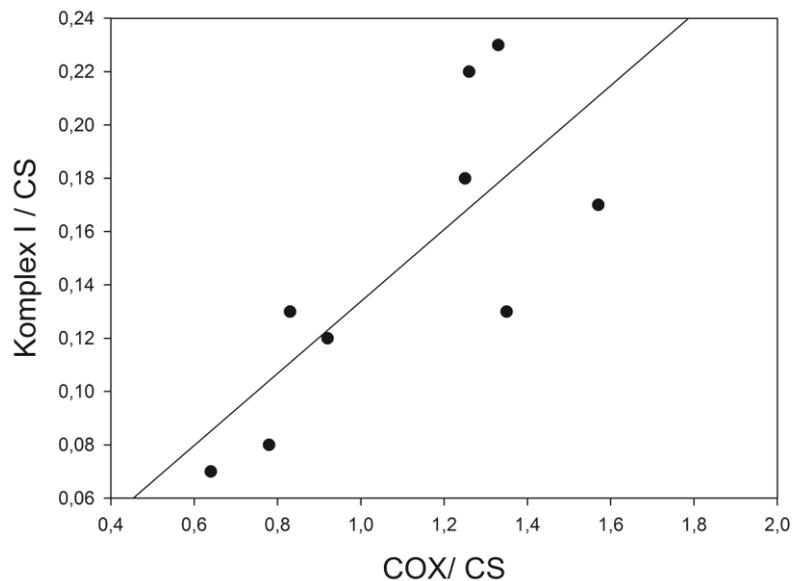
**Abb. 17: Zusammenhang des histologischen Befunds der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern und biochemisch messbarer Enzymaktivität der COX im Patientenkollektiv (n = 9) (r = - 0,95; p < 0,001). Die Enzymaktivitäten wurden wie in Kap. 2.4 beschrieben ermittelt und durch den Citratsynthese (CS)-Wert korrigiert. COX: Cytochrom-c-Oxidase, SDH: Succinatdehydrogenase.**

Anschließend wurde die Beziehung von biochemischen und genetischen Ergebnissen analysiert. Mit Hilfe der Korrelationsanalyse konnte ermittelt werden, dass sich die genetisch nachgewiesenen multiplen Deletionen ebenfalls auf biochemischer Ebene widerspiegeln. Es zeigte sich, dass mit steigender Quantität der multiplen Deletionen die Enzymaktivität von Komplex IV (COX) erheblich abnahm (r = - 0,63; p = 0,071) (Abb. 18). Auch für die Aktivität von Komplex I konnte dieser Zusammenhang festgestellt werden (r = 0,66; p = 0,051; keine Abbildung).

Ergänzend wurde geprüft, ob sich die mtDNA Defekte auf die beiden Komplexe in gleichem Maß auswirken. Bei der entsprechenden Korrelation konnte nachgewiesen werden, dass die Schädigung der Atmungskettenenzyme in beiden Komplexen in ähnlicher Ausprägung vorlag (r = 0,76; p < 0,05) (Abb. 19). Es handelt sich somit um eine kombinierte Atmungskettendefizienz bei den Patienten, wie bei mtDNA Deletionen zu erwarten.



**Abb. 18: Beziehung zwischen multiplen Deletionen und Enzymaktivität der COX bei Patienten** (n=9)( $r = - 0,62$ ;  $p = 0,071$ ). \*der Anteil der deletierten mtDNA-Moleküle entspricht dem durch smPCR kalibrierten IrPCR-Ergebnis. Die Enzymaktivitätsmessung erfolgte wie in Kap. 2.4 beschrieben und wurde mit Hilfe des Citratsynthase (CS)-Werts korrigiert. COX: Cytochrom-c-Oxidase, smPCR: single molecule polymerase chain reaction, IrPCR: long range polymerase chain reaction.



**Abb. 19: Korrelation der Enzymaktivitäten von Komplex I und Komplex IV (COX)** ( $r = 0,76$ ;  $p = 0,018$ ). Die Enzymaktivitätsmessung erfolgte wie in Kap. 2.4 beschrieben und wurde durch den Citratsynthase (CS)-Wert korrigiert. COX: Cytochrom-c-Oxidase.

## **4 Diskussion**

Mitochondrien verfügen über eine eigene zirkuläre DNA (mtDNA) und sind somit Träger der einzigen extrachromosomalen DNA der menschlichen Zelle. Diese mtDNA kodiert neben Proteinen der Atmungskette auch essentielle Bestandteile der mitochondrialen Proteinbiosynthese wie mt tRNAs (Schapira, 2006). Demzufolge ist die Integrität der mtDNA von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der oxidativen zellulären Energieproduktion. Die mtDNA ist jedoch oft von Mutationen betroffen, wobei unter den pathogenen Mutationen Deletionen der mtDNA besonders häufig auftreten (Wiesner et al., 2006; Kornblum, 2008). Deletionen der mtDNA kommen in der Skelettmuskulatur sowohl bei zahlreichen mitochondrialen Erkrankungen, aber auch im Rahmen von entzündlichen Myopathien und dem physiologischen Alterungsprozess vor. In Bezug auf eine isolierte mitochondriale Myopathie (IMM) ist in der wissenschaftlichen Literatur bisher jedoch kein kausaler Zusammenhang mit multiplen mtDNA Deletionen beschrieben.

Die hier vorgestellte Studie analysierte ein Patientenkollektiv mit isoliertem muskulärem Beschwerdekomples unter der Fragestellung einer eigenen (mitochondrialen) Krankheitsentität. Dazu wurden detaillierte histologische, biochemische und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Zur Beurteilung der Pathogenität der Befunde wurden ein Vergleich mit gesunden Kontrollen sowie eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ausgeführt.

### **4.1 Klinische, histologische und biochemische Analysen**

#### **4.1.1 Gegenüberstellung von Patientenbefunden, Normwerten und Kontrollbefunden aus der Literatur**

In der muskulären Spezialsprechstunde des Universitätsklinikums Bonn stellten sich eine Vielzahl an Patienten mit isolierten muskulären Beschwerden vor, die klinisch einer metabolischen Myopathie ähnelten. Die häufigsten Beschwerden waren Myalgien (10 Patienten) und muskuläre Belastungsintoleranz (9 Patienten), wobei diese vor allem beinbetont auftraten (siehe Abschnitt 3.1). Da diese Symptome typischerweise bei mitochondrialen Myopathien auftreten, wurde das Patientenkollektiv im Hinblick auf eine mögliche mitochondriale Krankheitsursache untersucht.

Im Rahmen der von uns durchgeführten histologischen Diagnostik der Skelettmuskelbiopsien wurden leichte mitochondriale Auffälligkeiten in der COX/SDH-Doppelfärbung nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.2.1). Dementsprechend wurden für das gesamten Patientenkollektiv durchschnittlich 0,46 % COX/SDH<sup>+</sup>-Fasern ermittelt. Unter Berücksichtigung des Alters zeigten die Biopsien von Patienten im Alter von 37 bis 55 Jahren 0,54 % COX/SDH<sup>+</sup>-Fasern. Im Alter von

56 bis 76 Jahren wurden 0,43 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern ermittelt. Diese vorgefundenen histologischen Auffälligkeiten waren jedoch v.a. in höherem Alter nach unserer Erfahrung nicht in jedem Fall als pathologisch einzustufen.

Vergleicht man unsere Ergebnisse des Patientenkollektivs mit anderen Studien, welche gezielt gesunde Probanden histologisch untersucht haben, so fallen quantitative Unterschiede bezüglich der COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern auf. In einer großen Studie von Müller-Höcker (1990) wurden beispielsweise bei 109 gesunden Probanden im Alter von 0 bis 97 Jahren maximal 0,37 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern gefunden (unser Vergleichswert: 0,46 %). Unter Berücksichtigung des Alters durchgeführte Studien von Brierley et al. (1996) und Chariot et al. (1996) fanden bei gesunden Probanden im Alter von unter 60 Jahren sogar keinerlei Auffälligkeiten bezüglich der COX-Aktivität (unser Vergleichswert: 0,54 %). Somit besteht vor allem zwischen unseren jüngeren Patienten und gesunden Kontrollen nach Datenlage der Literatur ein deutlicher Unterschied. Bei älteren gesunden Kontrollen ermittelten Rifai et al. (1995) durchschnittlich 0,33 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern, was eine leichte Differenz zu unseren Patientenresultaten in derselben Altersgruppe darstellt (durchschnittlich 0,43 % COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern).

Im Allgemeinen lässt sich somit festhalten, dass ein Unterschied zwischen unseren Patientenbiopsien und gesunden Kontrollproben nach Datenlage vorliegt. Dieser ist jedoch v.a. bei Älteren nicht signifikant. Folglich kann die Histologie nicht generell als ausreichend zuverlässiger Parameter zur Diagnostizierung der hier vorgestellten Patienten gewertet werden.

Die im Rahmen der biochemischen Analyse ermittelten Atmungskettenaktivitäten lagen bei nahezu allen Patienten in unserem laborspezifischen Referenzbereich (siehe Abschnitt 3.2.2). Dennoch konnten die histologischen Ergebnisse durch die biochemische Analyse der Atmungskettenenzymaktivitäten bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.8.2). So wurde eine signifikante Korrelation zwischen COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern und der Aktivität von Komplex IV ermittelt. Da jedoch kein eindeutiger Unterschied zum Referenzbereich, d.h. Normbereich feststellbar war, kann auch die biochemische Analyse nicht zur Differenzierung zwischen unserem Patientenkollektiv und Gesunden genutzt werden.

#### **4.1.2 Gegenüberstellung der Patientenbefunde und Befunde anderer mitochondrialer und muskulärer Erkrankungen**

Zur Einordnung unserer Patientenergebnisse ist außerdem ein Vergleich mit Befunden von Patienten mit anderen mitochondrialen Erkrankungen, die ebenfalls Deletionen der mtDNA aufweisen, sinnvoll. Bei diesem Vergleich kann ein Unterschied festgestellt werden. Demnach wurden in anderen Studien bei Patienten mit KSS und CPEO deutlich stärkere Anteile (1,1 % - 48 %) an mitochondrial auffälligen Fasern gefunden (Goto et al., 1990; Schröder et al., 2000). Eine im Vergleich zu unseren Ergebnissen nur geringfügig höhere Anzahl an COX-negativen Fasern finden sich hingegen bei Patienten mit „Late-onset-Myopathy“ (1,67 %) und s-IBM (3,5 % – 4,6 %) (Johnston et al., 1995; Oldfors et al., 1995; Rifai et al., 1995). Folglich wird deutlich, dass andere mitochondriale und auch andere muskuläre Erkrankungen mit mitochondrialen Funktionsstörungen im Vergleich zu unseren Ergebnissen meistens stärkere histochemische Auffälligkeiten im Skelettmuskel aufweisen.

## **4.2 Analyse der multiplen Deletionen**

### **4.2.1 Gegenüberstellung von Patienten- und Kontrollbefunden**

Mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen wurden multiple Deletionen der mtDNA im Skelettmuskel der Patienten nachgewiesen. Die Interpretation dieses Befundes war jedoch aufgrund der großen Bandbreite an Phänotypen, die mit multiplen Deletionen assoziiert sind, vor allem bei höherem Lebensalter nicht eindeutig. Zur genaueren Analyse der pathogenetischen Relevanz war deshalb eine Quantifizierung der multiplen Deletionen nötig. Die quantitative Analyse der multiplen Deletionen erfolgte mit Hilfe einer Kombination von IrPCR und smPCR (siehe Abschnitt 3.3. und 3.4). Die IrPCR eignet sich gut zur Identifikation von multiplen Deletionen, eine Quantifizierung der deletierten mtDNA-Moleküle ist hiermit jedoch nur bedingt möglich. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der smPCR in einem zweiten Schritt eine Eichgerade erstellt, was die Kalibrierung der semiquantitativen IrPCR Ergebnisse ermöglichte. Die angewandte smPCR ist eine effektive und sehr zuverlässige Quantifizierungsmethode (Kraytsberg et al., 2009). Sie ist jedoch sehr aufwändig und kostenintensiv und daher im klinischen Alltag (noch) nicht als Routinediagnostik einsetzbar. In der vorliegenden Studie konnte selbst für geringe durch smPCR bestimmte Deletionsanteile von 0 % bis 0,46 % eine signifikante Korrelation zu den semiquantitativen Ergebnissen der IrPCR bescheinigt werden (siehe Abschnitt 3.4.2)

Diese Arbeit zeigt demzufolge, dass nach laborspezifischer Kalibrierung mittels smPCR eine quantitative Aussage auf Basis der im Klinikalltag wesentlich praktikableren IrPCR möglich ist.

Die qualitative und quantitative Analyse multipler Deletionen der mtDNA wurde im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit sowohl für das Patientenkollektiv als auch für ein alters-entsprechendes Kontrollkollektiv durchgeführt. Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen unserem Patientenkollektiv und gesunden Kontrollproben nachwiesen werden (siehe Abschnitt 3.5). Die durchschnittlichen Anteile an deletierter mtDNA lagen bei den Patienten hochsignifikant höher als bei den Kontrollen (0,28 % zu 0,06 %). Demnach konnte in unserer Studie ein signifikanter quantitativer Unterschied zwischen multiplen Deletionen bei Patienten mit isoliertem muskulären Beschwerdekomples und der rein alters-assozierten Akkumulation von Deletionen gezeigt werden.

Das Ergebnis unserer Kontrollgruppenanalyse von durchschnittlich 0,06 % Deletionsanteil stimmt dabei mit Ergebnisse von anderen vorangegangenen Studien überein. So wiesen mehrere Studien Deletionen im gesunden alternden Skelettmuskel mit Anteilen um 0,1 % nach (Cortopassi and Arnheim, 1990; Cooper et al., 1992; Simonetti et al., 1992).

Darüber hinaus konnte ein quantitativer Grenzbereich definiert werden, wodurch die Einordnung der molekulargenetisch analysierten multiplen Deletionen in den physiologischen alter-assozierten Bereich, bzw. den pathologischen Bereich ermöglicht wurde. Somit konnte bei einem Anteil an deletierter mtDNA von 0,15 % mit einer Sensitivität von 0,786 und einer Spezifität von 0,846 eine Zuordnung zum „genuinen“ Patientenkollektiv erfolgen.

Zusammenfassend wurde also deutlich, dass die quantitative Molekulargenetik einen äußerst validen Parameter zur Diagnostizierung des hier dargestellten Patientenkollektivs in Abgrenzung zu alters-entsprechenden Kontrollen darstellt und somit „genuine“ Patienten von Gesunden mit altersbedingten oder unspezifischen Befunden unterscheiden hilft.

#### **4.2.2 Gegenüberstellung der Patientenbefunde und Befunde anderer mitochondrialer Erkrankungen**

Vergleicht man die Anteile an multiplen Deletionen der in unserer Studie untersuchten Patienten mit den Befunden anderer Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen fällt ein quantitativer Unterschied auf. Die ermittelten Anteile an deletierter mtDNA erreichten bei unserem Patientenkollektiv maximal einen Wert von 0,71 %. Muskelgewebe von CPEO- und KSS-Patienten enthält jedoch einen Heteroplasmiegrad von 16 % - 90 %, allerdings handelt es sich hier um singuläre „large-scale“ Deletionen (Goto et al., 1990; Schröder et al., 2000). Auch bei Patienten mit s-IBM wurden mit einem durchschnittlichen Anteil an deletierter mtDNA von 18,5 % höhere Werte ermittelt (Santorelli et al., 1996). Im Rahmen der Untersuchungen von Patienten mit MNGIE wurden Anteile von 2 % - 20 % multiple Deletionen nachgewiesen (Carrozzo et al., 1998; Nishigaki et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass einerseits die untersuchte mtDNA des Patientenkollektivs im Vergleich zu alters-entsprechenden gesunden Kontrollen deutlich stärkere Deletionsanteile aufweist. Vergleicht man jedoch andererseits unsere Resultate dieses speziellen Patientenkollektivs mit Befunden von Patienten mit anderen, gut definierten mitochondrialen Erkrankungen teils auf dem Boden nukleärer Mutationen, so haben unsere Patienten weniger starke genetische Auffälligkeiten.

#### **4.3 Beeinflussung der histologischen, biochemischen und molekulargenetischen Befunde durch das Lebensalter**

Im Rahmen des Alterungsprozesses sind regelmäßig Veränderungen der mitochondrialen Funktion zu verzeichnen (siehe Abschnitt 1.7). Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der Atmungskettenaktivitätsmessung in einem weiteren Schritt auf eine mögliche Beeinflussung durch das Alter untersucht. In unserer Arbeit konnte mit zunehmendem Alter eine geringe Abnahme der Atmungskettenaktivität analysiert werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einigen vorausgegangen Studien (Trounce et al., 1989; Boffoli et al., 1994; Greco et al., 2003). Es gibt jedoch auch Studien, die keinen Zusammenhang nachweisen (Allen et al., 1997).

Auch das alters-assozierte Auftreten von COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Skelettmuskelfasern sowie die Akkumulation von multiplen Deletionen im Muskel wurde bereits vielfach beschrieben (Cortopassi and Arnheim, 1990; Müller-Höcker, 1990; Rifai et al., 1995; Brierley et al., 1996). In Analogie zu diesen Ergebnissen wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit unter den Kontrollen, die multiple Deletionen aufwiesen, eine signifikante Korrelation zwischen Quantität der Deletionen und dem Lebensalter festgestellt (siehe Abschnitt 3.7).

Unser Patientenkollektiv wurde dementsprechend ebenfalls untersucht, wobei sowohl die histologischen als auch molekulargenetischen Befunde bezüglich der Beeinflussung durch das Lebensalter ausgewertet wurden. Hier konnte jedoch keine Altersabhängigkeit der Befunde gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden sowohl bei der histologischen als auch bei der molekulargenetischen Analyse durch Patient p2 beeinflusst, der trotz relativ jungen Alters an einer stärker ausgeprägter Myopathie litt. Jedoch auch in Analysen unter Ausschluss von Patient p2 zeigte sich keine signifikante Altersabhängigkeit der histologischen und molekulargenetischen Befunde, sondern lediglich eine Tendenz bei der histologischen Analyse (siehe Abschnitt 3.7).

Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass ein hoher Anteil deletierter mtDNA-Moleküle, bzw. eine große Anzahl von COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern vor allem bei jungen Patienten einen deutlich pathologischen Wert haben und hier die altersbedingten mitochondrialen Schädigungen in den Hintergrund treten. Zumindest bei der Histologie, weniger in Bezug auf die genetischen Analysen, zeigte sich bei unseren Patienten ein Trend zu einer altersabhängigen Steigerung der mitochondrialen Auffälligkeiten. Daraus könnte abgeleitet werden, dass bei den hier untersuchten Patienten vermutlich ein additiver Effekt auftritt, der dazu führt, dass die Akkumulation von multiplen Deletionen im Alter noch ausgeprägter ist und somit auch ausgeprägtere histologische Auffälligkeiten auftreten.

Insgesamt lag die Deletionslast bei unseren Patienten in allen Altersklassen weit über den altersentsprechenden Kontrollen. Die Ätiologie der multiplen mtDNA Deletionen ist in unseren Kollektiven jedoch unklar. Auf Basis der in Abschnitt 1.3 genannten Entstehungsmechanismen lässt sich daher aktuell nur vermuten, welche Effekte bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv und den Kontrollen eine Rolle spielen könnten. Denkbar ist bei den Patienten eine schnellere Segregation der regelhaft anfallenden mtDNA-Mutationen durch eine geringere Anzahl von mtDNA-Molekülen oder eine reduzierte Anzahl an Mitochondrien selbst. Dagegen sprechen jedoch die histochemisch bzw. biochemisch erhobenen Befunde, die keinen Hinweis auf eine mtDNA Depletion aufweisen. Bei einer generell niedrigen mtDNA-Anzahl hätte die COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Färbung homogen schwach ausfallen müssen und bei stark reduzierter Mitochondrien-Anzahl hätte eine erniedrigte CS in der Biochemie auftreten müssen. Dies war jedoch beides nicht der Fall (siehe Abschnitt 3.2). Eine andere Erklärung für die höhere Deletionslast im Patientenkollektiv könnte eine verstärkte Schädigung der mtDNA beispielsweise durch früh im Leben aufgetretene erhöhte ROS-Produktion z.B. auf Grund einer Viruserkrankung oder eines Infekts mit Fieber bzw. durch UV-Strahlung oder ionisierender Strahlung sein. Auch ein defizitär ausgebildetes mitochondriales Reparatursystem ist in Erwägung zu ziehen. Häufige POLG1-Mutationen konn-

ten im Rahmen dieser Arbeit als Auslöser der multiplen Deletionen ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 3.6). Es könnten jedoch andere, aktuell noch unbekannte nukleäre Gendefekte eine Rolle spielen. Im Speziellen könnte es sich beispielsweise um Heterozygoteneffekte rezessiver nukleärer Mutationen handeln, was sekundär zur Instabilität der mtDNA und so zu leicht erhöhten Deletionsanteilen führen könnte.

#### **4.4 Funktionelle Relevanz der multiplen Deletionen**

##### **4.4.1 Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Korrelation**

Pathogene mitochondriale DNA-Mutationen liegen in Zellen für gewöhnlich in Heteroplasmie vor. Die pathogenetische Relevanz einer mtDNA-Mutation hängt damit entscheidend von ihrer Quantität, aber auch von der möglichen daraus resultierenden funktionellen Beeinträchtigung ab. Ein zentrales Ziel dieser Studie war es daher, nach der Quantifizierung der multiplen Deletionen die Korrelation von molekulargenetischen Befunden und histologischen sowie biochemischen Auffälligkeiten der Patienten detailliert zu untersuchen.

Im Rahmen der Genotyp-Phänotyp-Analyse zeigte sich in unserer Arbeit bei steigender Quantität der deletierten mtDNA-Moleküle sowohl auf histochemischer als auch biochemischer Ebene eine Zunahme der mitochondrialen Auffälligkeiten (siehe Abschnitt 3.8). Aufgrund dieser Korrelationen, die nahe am Signifikanzniveau lagen, ist eine funktionelle Relevanz der multiplen Deletionen in unserem Patientenkollektiv durchaus wahrscheinlich.

Ähnliche Korrelationen konnten auch in anderen Studien durch die Untersuchung von Patienten mit der *common deletion* ermittelt werden. Dort zeigte sich beispielsweise ein deutlicher Zusammenhang von mtDNA-Deletionen und *ragged red fibers* bzw. biochemischer Aktivitätsminderung von Komplex I im Gesamtmuskel (Goto et al., 1990; Schröder et al., 2000).

Darüber hinaus stehen unsere Ergebnisse auch im Einklang mit weiteren Studien, die auf Einzelfaser-Niveau arbeiteten und eine signifikante Korrelation von COX-negativen Muskelfasern und dem Vorliegen von Deletionen in einzelnen Muskelfasern nachwiesen (Johnston et al., 1995; Lopez et al., 2000; Fayet et al., 2002; Bua et al., 2006).

Ein weiterer interessanter Befund der hier dargelegten Arbeit war die Tatsache, dass die ermittelten Atmungskettenaktivitäten von Komplex I und Komplex IV signifikant korrelierten. Liegen in verschiedenen Komplexen ähnliche Funktionsdefizite vor, so spricht man von einer komplexen Atmungskettenschädigung. Der Befund mag im ersten Moment verwundern, da der mitochond-

rial kodierte Anteil der einzelnen Komplexe unterschiedlich ist (Komplex I - 7 Untereinheiten, Komplex IV - 3 Untereinheiten). Dies lässt sich jedoch damit erklären, dass die meisten Deletionen, unabhängig von Lage und Ausmaß, mindestens 1 tRNA-Gen betreffen und so einen generellen Translationsdefekt für alle mtDNA-kodierten Proteine auslösen (Wiedemann et al., 2000). Der Befund der komplexen Atmungskettenschädigung lässt sich somit gut durch mtDNA-Deletionen erklären und unterscheidet sich folglich deutlich von isolierten Atmungskettendefekten, die u.a. im Rahmen der IMM bei Mutationen in Komplex I, III und IV auftreten (siehe Abschnitt 1.6).

#### 4.4.2 Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich auch gering ausgeprägte multiple Deletionen auf histochemischer und biochemischer Ebene auswirken. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von Studien, die einen phänotypischen Schwellenwert bei anderen mitochondrialen Krankheiten untersucht haben. So ergab die Analyse von tRNA-Mutationen Schwellenwerte von 80% - 95% auf Einzelzellniveau (Boulet et al., 1992; Chomyn et al., 1992; Bentlage and Attardi, 1996). Im Rahmen von transmitochondrialen Zellhybrid-Studien von Hayashi et al. (1991) und Porteous et al. (1998), die den Schwellenwert bei Zellen mit *common deletion* untersuchten, zeigte sich eine mitochondriale Dysfunktion ab einem deletierten mtDNA-Anteil von 50 % - 55 % auf Einzelzellniveau. Diese Ergebnisse liegen somit deutlich über dem von uns ermittelten Patientenwert von 0,28 % im Gewebe.

In Bezug auf unsere Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass die in unserer Arbeit dargestellten Befunde auf der molekulargenetischen Untersuchung von mtDNA aus Gesamtmuskelgewebe basieren. Auf histologischer Ebene zeigte sich die mitochondriale Funktionsstörung jedoch in Form eines mosaikartigen Verteilungsmusters von COX-positiven und COX-negativen Muskelfasern. Daher muss man vermuten, dass der Anteil an deletierten mtDNA-Molekülen zwischen unterschiedlichen Zellen stark variiert und in einzelnen Muskelfasern sehr hohe Deletionsanteile vorliegen, die eine funktionelle Relevanz aufweisen. In diesen Fasern segregieren wahrscheinlich einzelne Deletionen über die Schwelle der phänotypischen Expression hoch.

Entsprechende Einzelfaser-Untersuchungen haben diesen Zusammenhang im Rahmen der Analyse von alters-assoziierten multiplen Deletionen aktuell untersucht. Vorhergehende Studien hatten bereits gezeigt, dass der alters-assoziierte Deletionsanteil im Gesamtmuskel mit Werten

um 0,1 % niedrig ist (Cortopassi and Arnheim, 1990; Cooper et al., 1992; Simonetti et al., 1992). Mit Hilfe der Untersuchung von einzelnen Muskelfasern konnte jedoch in Studien von Brierley et al. (1998) und Bua et al. (2006) gezeigt werden, dass in COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern mindestens 85% der mtDNA-Moleküle in deletierter Form vorlagen. Somit konnte eindeutig belegt werden, dass trotz eines geringen Deletionsanteils im Gesamtgewebe auf zellulärer Ebene ein physiologisch hochrelevantes Ausmaß an Deletionen vorlag.

Im Rahmen von Arbeiten zur Sarcopenie-Pathogenese stießen verschiedene Studien außerdem auf interessante Korrelationen von Deletionen, histochemischen und morphologischen Eigenschaften einzelner Zellen. Es zeigte sich, dass einzelne COX<sup>-</sup>/SDH<sup>+</sup>-Fasern im alternden Skelettmuskel nicht nur mit einem hohen Deletionsanteil, sondern auch mit morphologischen Veränderungen wie Faseratrophie und Fasersplitting assoziiert sind. Diese lokalen Prozesse können zwar nicht direkt zu dem klinischen Bild der Muskelatrophie führen, es wurde jedoch vermutet, dass sie den Prozess von Faserdysfunktion zu Faserverlust repräsentieren, was letzten Endes zu der Entstehung einer Muskelatrophie führen könnte (Cao et al., 2001; Wanagat et al., 2001; Bua et al., 2006).

Überträgt man diese Erkenntnisse auf die Ergebnisse unserer Arbeit wird deutlich, dass die ermittelten Befunde der hier analysierten Patienten keineswegs im Gegensatz zu den oben genannten Schwellenwert-Analysen stehen. Vielmehr kann man davon ausgehen, dass die mosaikartige Verteilung von COX-negativen und COX-positiven Fasern Fasern mit Deletionsanteilen über und unter dem Schwellenwert repräsentiert. Durch dieses Verteilungsmuster können bei der Analyse von mtDNA aus Gesamtmuskelgewebe lokal vorliegende hohe Schwellenwerte maskiert werden, da die Untersuchung lediglich Durchschnittswerte des gesamten Gewebes liefert. Folglich können auch geringe Deletionsanteile des Gesamtgewebes einen pathologischen Phänotyp im Skelettmuskel auslösen und funktionell relevant werden.

Wie in Abschnitt 4.3 bereits erläutert, können die bei unseren Analysen erhobenen molekulargenetischen Befunde der Patienten als eigenständige mitochondriale Schädigung, evtl. jedoch im Sinne eines verstärkten Alterungsprozesses interpretiert werden. Dies kann die klinische Symptomatik von Myalgien, Belastungsintoleranz und proximalen betonten milden Paresen erklären.

#### **4.5 Erkenntnisse dieser Studie und Ausblick**

Zentrales Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob es sich bei dem Patientenkollektiv mit isoliertem muskulärem Beschwerdekomples um eine eigene (mitochondriale) Krankheitsentität handelt. Bei unseren Patienten konnten in hohem Maße multiple mtDNA Deletionen nachgewiesen werden. Somit stellte sich die Frage, ob das „Syndrom“ isolierter muskulärer Beschwerden mit multiplen mtDNA Deletionen eine eigenständige mitochondriale Krankheitsentität, eine „Altersmyopathie“ oder einen alters-assoziierten Normalbefund darstellt.

Bei der Quantifizierung der Deletionen wurden im Patientenkollektiv im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe signifikant höhere Deletionsanteile bestimmt. Dies konnte insgesamt sowohl bei jüngeren als auch bei Patienten mit höherem Lebensalter nachgewiesen werden. Aufgrund der ermittelten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen kann außerdem angenommen werden, dass die multiplen Deletionen der mtDNA die molekulare Basis der klinischen Beschwerden darstellen. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem hier beschriebenen Krankheitsbild der isolierten Myopathie mit multiplen mtDNA Deletionen um eine eigene mitochondriale Krankheitsentität handelt. Diese „neue“ Krankheitsentität könnte damit als eine weitere, noch nicht beschriebene Unterform der IMM angesehen werden.

Zukünftiges Ziel dieser Studie wäre nun der Transfer des wissenschaftlichen Projekts auf die klinische Patientenversorgung. Im Bereich der quantitativen molekulargenetischen Untersuchungen kann unsere Arbeit einen wichtigen Beitrag zur klinischen Routinediagnostik leisten. Denn wie hier gezeigt, stellt die Kombination von lrPCR und smPCR eine alltagstaugliche und äußerst zuverlässige Methode zur Quantifizierung von multiplen Deletionen dar. Diese Vorgehensweise ist eine gute Alternative zu anderen, häufig aufwändigeren und kostenintensiveren Quantifizierungsmethoden.

Des Weiteren wurden wichtige Erkenntnisse zur Quantität von multiplen Deletionen bei gesunden Menschen erarbeitet. Im Rahmen unserer Studie konnte ein spezifischer altersunabhängiger Grenzbereich definiert werden, der die Zuordnung von molekulargenetisch analysierten multiplen Deletionen in den physiologischen, bzw. pathologischen Bereich ermöglicht. Der im Vorfeld häufig schwierig zu interpretierende Befund von schwach vorhandenen multiplen Deletionen im Muskelgewebe lässt sich damit nun erfolgreich klassifizieren. Dieser Grenzbereich ist nicht nur in Bezug auf die isolierte mitochondriale Myopathie anzuwenden, sondern ist durchaus auch auf andere muskuläre Erkrankungen übertragbar.

Um die funktionelle Relevanz der multiplen Deletionen bei diesem Patientenkollektiv genauer zu untersuchen, sollten im Anschluss weitere Studien mit größeren Kollektiven durchgeführt werden. Außerdem sollten auch für dieses Kollektiv Einzelfaser-Studien angestrebt werden. Dadurch könnten spezifische Aussagen über die Akkumulation der Deletionen und eventuell vorliegende morphologische Veränderungen in einzelnen Fasern getroffen werden.

Andere Studien haben bereits mehrfach mtDNA mit multiplen Deletionen sequenziert und so die jeweilige Basenabfolge an Beginn und Ende (*breakpoints*) der verschiedenen Deletionen analysiert (Samuels et al., 2004; Reeve et al., 2008; Guo et al., 2010). Auf Basis dieser Erkenntnisse konnten die Lage der Deletionen innerhalb des mtDNA-Moleküls gewebespezifisch dargestellt werden (Deletionsspektren). Dadurch waren Rückschlüsse auf die jeweiligen Entstehungsmechanismen der Deletionen möglich. In Bezug auf unsere Arbeit könnten mittels einer *breakpoint*-Analyse auch hier die Eigenschaften der multiplen Deletionen sowohl bei unserem Patientenkollektiv als auch bei unseren gesunden Kontrollproben untersucht werden. Ein Vergleich der Deletionsspektren könnte so Aufschluss darüber geben, ob ähnliche oder unterschiedliche Mechanismen bei der Deletionsentstehung bei IMM-Patienten, bzw. im Alterungsprozess eine Rolle spielen. Des Weiteren könnte man mit einer *breakpoint*-Analyse aus verschiedenen Geweben der Patienten (beispielsweise Mundschleimhaut, Blut, Urothel, Haut) den Entstehungsmechanismus und den Entstehungszeitpunkt der Deletionen genauer untersuchen. Entsprechend würde man dann bei früh entstanden Mutationen in unterschiedlichen Geweben dieselben Deletionsspektren erwarten.

Der weitere Krankheitsverlauf der in dieser Arbeit beschriebenen IMM-Patienten bleibt aktuell unklar. Die klinische Symptomatik könnte sich progredient verschlechtern, es könnten jedoch auch andere Symptome hinzukommen. Insofern ist es auch denkbar, dass die hier beschriebene isolierte mitochondriale Myopathie ein Vorbote einer noch nicht vollständig ausgeprägten anderen Erkrankung darstellt. Aus diesem Grund wäre eine longitudinale Untersuchung der Patienten von höchstem Interesse.

## 5 Zusammenfassung

Multiple Deletionen der mtDNA treten in vielfältiger Weise bei mitochondrialen Erkrankungen, aber auch im Rahmen von entzündlichen Muskelerkrankungen und dem physiologischen Alterungsprozesse auf. Bei Patienten mit isolierter mitochondrialer Myopathie (IMM) wurde jedoch bislang kein kausaler Zusammenhang mit singulären oder multiplen Deletionen beschrieben.

In dieser Studie wurde ein Patientenkollektiv (n=14) mit isolierten muskulären Beschwerden, die einer metabolischen, bzw. mitochondrialen Myopathie ähnelten, aber nicht sicher von altersbedingten Symptomen oder unspezifischen Befunden differenziert werden konnten, detailliert analysiert. Die zentrale Frage war dabei, ob es sich hier um eine eigene (mitochondriale) Krankheitsentität, eine „Altersmyopathie“ oder einen alters-assoziierten Normalbefund handelt.

Ein Ziel der Studie war es neben der klinischen Auswertung weitere diagnostische Parameter zur Identifikation „genuiner“ Patienten zu definieren. In einem ersten Schritt wurden die Patienten ausführlich untersucht. Anamnestisch konnten bei den Patienten für mitochondriale Myopathien typische Symptome erhoben werden, wobei Myalgien und muskuläre Belastungsintoleranz am häufigsten auftraten. Die darauf folgende histologische Analyse des Patientenkollektivs zeigte leichte mitochondriale Auffälligkeiten im Sinne erhöhter COX/SDH<sup>+</sup>-Faseranteile. Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen nach Datenlage der Literatur zeigte sich hierbei vor allem bei den jüngeren Patienten eine deutliche Differenz, bezüglich der älteren Patienten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die im Rahmen der biochemischen Analyse ermittelten Atmungskettenaktivitäten lagen bei nahezu allen Patienten in unserem laborspezifischen Referenzbereich. Somit kann weder die histologische noch die biochemische Analyse als ausreichend zuverlässiger Parameter zur Diagnostizierung des hier vorgestellten Patientenkollektivs in Abgrenzung zu Gesunden gewertet werden.

Im Rahmen der weiteren Diagnostik wurden mittels molekulargenetischer Untersuchungen multiple Deletionen der mtDNA im Skelettmuskel der Patienten qualitativ nachgewiesen. Dieser Befund war jedoch nur schwer zu beurteilen, da multiple Deletionen auch alters-assoziiert regelmäßig auftreten. Zur Differenzierung von pathologischen und physiologischen, alters-assoziierten Befunden wurden die multiplen Deletionen daher sowohl bei unseren Patienten als auch bei einem speziell für diese Arbeit konzipierten alters-entsprechenden Kontrollkollektiv (n=13) quantifiziert und miteinander verglichen. Dabei zeigten die Patienten in allen Altersklassen signifikant höhere Deletionsanteile. In Folge dessen eignet sich die quantitative Molekular-

genetik sehr gut als diagnostischer Parameter zur Unterscheidung zwischen „genuinen“ Patienten und gesunden Kontrollen.

Aufgrund von Korrelationsanalysen mit dem Alter der Patienten wurde außerdem angenommen, dass die physiologisch auftretende alters-abhängige Akkumulation multipler mtDNA Deletionen auch bei unserem Patientenkollektiv eine zusätzliche Rolle spielt. Eine alters-abhängige Akkumulation trat in dem hier untersuchten Kollektiv jedoch vermutlich eher in Form eines marginalen additiven Effekts auf.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die detaillierte Untersuchung der Ätiologie der muskulären Beschwerden. Nachdem nachgewiesen worden war, dass die multiplen Deletionen der mtDNA im Patientenkollektiv überwiegend als pathologisch eingestuft werden können, wurde daher in einem weiteren Schritt die pathogenetische Relevanz der multiplen Deletionen genauer untersucht. Hierfür waren neben der Quantität die phänotypischen muskulären Auswirkungen der multiplen Deletionen entscheidend. In entsprechenden Korrelationsanalysen fand sich ein nahe am Signifikanzniveau stehender Zusammenhang von Genotyp und biochemischem und histologischem Phänotyp. Vor dem Hintergrund aktueller Forschungsergebnisse ist es folglich durchaus denkbar, dass die hier nachgewiesenen multiplen Deletionen die molekulare Basis einer isolierten Myopathie darstellen.

Zusammenfassend kann folglich angenommen werden, dass es sich bei dem hier beschriebenen Krankheitsbild des isolierten muskulären Beschwerdekompleses mit multiplen mtDNA Deletionen um eine eigene mitochondriale Krankheitsentität handelt. Diese Krankheitsentität könnte damit als eine weitere, noch nicht beschriebene Unterform der IMM angesehen werden.

## Literaturverzeichnis

Allen RG, Keogh BP, Tresini M, Gerhard GS, Volker C, Pignolo RJ, Horton J, Cristofalo VJ. Development and age-associated differences in electron transport potential and consequences for oxidant generation. *J Biol Chem* 1997; 272: 24805-24812

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. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 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. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1999; 341: 1037-1044

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

Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 2006; 38: 515-517

Bentlage HA, Attardi G. Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 197-205

Bergmeyer HU, Gawehn K. *Grundlagen der enzymatischen Analyse*. Weinheim - New York: Verlag Chemie, 1977

Blok MJ, van den Bosch BJ, Jongen E, Hendrickx A, de Die-Smulders CE, Hoogendijk JE, Brusse E, de Visser M, Poll-The BT, Bierau J, de Coo IF, Smeets HJ. The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *J Med Genet* 2009; 46: 776-785

Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Solarino G, Santacroce G, Papa S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1226: 73-82

Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1187-1200

Brierley EJ, Johnson MA, James OF, Turnbull DM. Effects of physical activity and age on mitochondrial function. *QJM* 1996; 89: 251-258

Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James OF, Turnbull DM. Role of mitochondrial DNA mutations in human aging: implications for the central nervous system and muscle. *Ann Neurol* 1998; 43: 217-223

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

Cao Z, Wanagat J, McKiernan SH, Aiken JM. Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 4502-4508

Carrozzo R, Hirano M, Fromenty B, Casali C, Santorelli FM, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA, Miranda AF. Multiple mtDNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogeneses. *Neurology* 1998; 50: 99-106

Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006; 125: 1241-1252

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

Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, Carrara F, Lombes A, Laforet P, Ogier H, Jaksch M, Lochmuller H, Horvath R, Deschauer M, Thorburn DR, Bindoff LA, Poulton J, Taylor RW, Matthews JN, Turnbull DM. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 2004; 364: 592-596

Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4221-4225

Cooper JM, Mann VM, Schapira AH. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol Sci* 1992; 113: 91-98

Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med* 2008; 59: 131-146

Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 6927-6933

Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7370-7374

Diaz F, Bayona-Bafaluy MP, Rana M, Mora M, Hao H, Moraes CT. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4626-4633

DiMauro S, Gurgel-Giannetti J. The expanding phenotype of mitochondrial myopathy. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 538-542

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

Dubowitz V, Sewry CA, Lane R. Muscle Biopsy. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007

Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF. Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 802-806

Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi AR, Blondy P, Lombes A, Fardeau M, Oldfors A. Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: 484-493

Ferraris S, Clark S, Garelli E, Davidzon G, Moore SA, Kardon RH, Bienstock RJ, Longley MJ, Mancuso M, Gutierrez Rios P, Hirano M, Copeland WC, DiMauro S. Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in POLG2 and OPA1. *Arch Neurol* 2008; 65: 125-131

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

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

Goto Y, Koga Y, Horai S, Nonaka I. Chronic progressive external ophthalmoplegia: a correlative study of mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression in muscle biopsies. *J Neurol Sci* 1990; 100: 63-69

Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 1999; 283: 1476-1481

Greco M, Villani G, Mazzucchelli F, Bresolin N, Papa S, Attardi G. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J* 2003; 17: 1706-1708

Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett JMSS, D., HRSG. *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, 2003: 89-100

Guo X, Popadin KY, Markuzon N, Orlov YL, Kraytsberg Y, Krishnan KJ, Zsurka G, Turnbull DM, Kunz WS, Khrapko K. Repeats, longevity and the sources of mtDNA deletions: evidence from 'deletional spectra'. *Trends Genet* 2010; 26: 340-343

Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10614-10618

Hirano M, Marti R, Ferreira-Barros C, Vila MR, Tadesse S, Nishigaki Y, Nishino I, Vu TH. Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 417-427

Hirano M, Nishigaki Y, Marti R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* 2004; 10: 8-17

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

Horvath R, Schneiderat P, Schoser BG, Gempel K, Neuen-Jacob E, Ploger H, Muller-Hocker J, Pongratz DE, Naini A, DiMauro S, Lochmuller H. Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy. *Neurology* 2006; 66: 253-255

Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1988; 240: 1302-1309

Johnson MA, Turnbull DM, Dick DJ, Sherratt HS. A partial deficiency of cytochrome c oxidase in chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol Sci* 1983; 60: 31-53

Johnston W, Karpati G, Carpenter S, Arnold D, Shoubridge EA. Late-onset mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1995; 37: 16-23

Keightley JA, Hoffbuhr KC, Burton MD, Salas VM, Johnston WS, Penn AM, Buist NR, Kennaway NG. A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet* 1996; 12: 410-416

Khrapko K, Nekhaeva E, Kravtsov Y, Kunz W. Clonal expansions of mitochondrial genomes: implications for in vivo mutational spectra. *Mutat Res* 2003; 522: 13-19

Kleist-Retzow J-C, Kornblum C. Mitochondriale Erkrankungen. *Medizinische Genetik* 2009; 3: 358-366

Kornblum C. Mitochondriale Erkrankungen. In: Diener HC, Putzki N, Berlit P, Deuschl G, Elger C, Gold R, Hacke W, Hufschmidt A, Mattle H, Meier U, Oertel WH, Reichmann H, Schmutzhard E, Wallesch CW, Weller M, HRSG. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Stuttgart: Thieme, 2008: 221-232

Kottlors M. Mitochondriale Erkrankungen. In: Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S, HRSG. *Neurologie compact*. Stuttgart: Thieme, 2009: 363-368

Kravtsov Y, Bodyak N, Myerow S, Nicholas A, Ebralidze K, Khrapko K. Quantitative Analysis of Somatic Mitochondrial DNA Mutations by Single-Cell Single-Molecule PCR. In: Stuart JA, HRSG. *Mitochondrial DNA*. New York: Humana Press, 2009: 329-370

Kravtsov Y, Khrapko K. Single-molecule PCR: an artifact-free PCR approach for the analysis of somatic mutations. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 809-815

Kravtsov Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 2006; 38: 518-520

Krishnan KJ, Harbottle A, Birch-Machin MA. The use of a 3895 bp mitochondrial DNA deletion as a marker for sunlight exposure in human skin. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 1020-1024

Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; 309: 481-484

Lalani SR, Vladutiu GD, Plunkett K, Lotze TE, Adesina AM, Scaglia F. Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Arch Neurol* 2005; 62: 317-320

Lang BF, Gray MW, Burger G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 351-397

Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, Hudson G, Durham SE, Taylor RW, Nightingale S, Turnbull DM, Copeland WC, Chinnery PF. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 1026-1034

Lopez ME, Van Zeeland NL, Dahl DB, Weindruch R, Aiken JM. Cellular phenotypes of age-associated skeletal muscle mitochondrial abnormalities in rhesus monkeys. *Mutat Res* 2000; 452: 123-138

Mancuso M, Filosto M, Bonilla E, Hirano M, Shanske S, Vu TH, DiMauro S. Mitochondrial myopathy of childhood associated with mitochondrial DNA depletion and a homozygous mutation (T77M) in the TK2 gene. *Arch Neurol* 2003; 60: 1007-1009

McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet Neurol* 2010; 9: 829-840

Müller-Höcker J. Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: an age-related alteration. *J Neurol Sci* 1990; 100: 14-21

Murphy JE, Nugent S, Seymour C, Mothersill C. Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells. *Mutat Res* 2005; 585: 127-136

Musumeci O, Andreu AL, Shanske S, Bresolin N, Comi GP, Rothstein R, Schon EA, DiMauro S. Intragenic inversion of mtDNA: a new type of pathogenic mutation in a patient with mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1900-1904

Nishigaki Y, Marti R, Hirano M. ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 91-101

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

Oldfors A, Moslemi AR, Fyhr IM, Holme E, Larsson NG, Lindberg C. Mitochondrial DNA deletions in muscle fibers in inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 581-587

Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna S, Bonilla E, De Vivo DC, Shanske S, DiMauro S. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol* 2006; 63: 1122-1126

Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J Mol Evol* 1999; 48: 427-434

Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, Melton JV, Pang CY, Wei YH, Murphy MP. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Eur J Biochem* 1998; 257: 192-201

Reeve AK, Krishnan KJ, Elson JL, Morris CM, Bender A, Lightowlers RN, Turnbull DM. Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 228-235

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

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

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324: 163-166

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

Samuels DC, Schon EA, Chinnery PF. Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet* 2004; 20: 393-398

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. Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: a study of 56 patients. *Ann Neurol* 1996; 39: 789-795

Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006; 368: 70-82

Schröder R, Vielhaber S, Wiedemann FR, Kornblum C, Papassotiropoulos A, Broich P, Zierz S, Elger CE, Reichmann H, Seibel P, Klockgether T, Kunz WS. New insights into the metabolic consequences of large-scale mtDNA deletions: a quantitative analysis of biochemical, morphological, and genetic findings in human skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 353-360

Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 7952-7956

Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon EA. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1180: 113-122

Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003; 126: 1905-1912

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. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 2001; 28: 223-231

Srivastava S, Moraes CT. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 893-902

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

Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 237-245

Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 389-402

Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; 429: 417-423

Trounce I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* 1989; 1: 637-639

Tynismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A. A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 290-295

Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001; 28: 211-212

Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* 2008; 40: 392-394

Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-1488

Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407

Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J* 2001; 15: 322-332

Wiedemann FR, Vielhaber S, Schroder R, Elger CE, Kunz WS. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal Biochem* 2000; 279: 55-60

Wiesner RJ, Zsurka G, Kunz WS. Mitochondrial DNA damage and the aging process: facts and imaginations. *Free Radic Res* 2006; 40: 1284-1294

Wong LJ, Scaglia F, Graham BH, Craigen WJ. Current molecular diagnostic algorithm for mitochondrial disorders. *Mol Genet Metab* 2010; 100: 111-117

Zeviani M, Antozzi C. Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 133-148

Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346

Zsurka G, Baron M, Stewart JD, Kornblum C, Bos M, Sassen R, Taylor RW, Elger CE, Chinnery PF, Kunz WS. Clonally expanded mitochondrial DNA mutations in epileptic individuals with mutated DNA polymerase gamma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 857-866

## **Danksagung**

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Kornblum. Durch ihre Spezialambulanz für mitochondriale Erkrankungen an der Klinik für Neurologie des Uniklinikums Bonn hat sie mir den Zugang zu dieser Thematik ermöglicht. Ich danke Frau PD Dr. Kornblum für ihre wegweisenden Impulse, ihre kritische Begleitung und ihre stets zuverlässige und persönliche Unterstützung.

Ich danke Karin Kappes-Horn und Manuela Stepin-Mering für die sehr wertvolle Zusammenarbeit und Hilfestellung.

Während des langen Weges des Studiums und dieser Arbeit war die emotionale Unterstützung jedoch nicht minder wichtig, daher möchte ich zu guter Letzt meinen Freunden für ein immer offenes Ohr danken sowie meiner Familie, die mir auf diesem Weg sehr viel Kraft und Mut gegeben hat. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und mich in all meinen Vorhaben bestärkt habt.