

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

## **Molekulargenetische Untersuchung metabolischer Myopathien**

H a b i l i t a t i o n  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med. habil.

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

von  
Dr. med. Marcus Deschauer  
geboren am 4.4.1967 in Nürnberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. K.V. Toyka
2. Prof. Dr. H. Reichmann
3. Prof. Dr. S. Zierz

Datum der Verteidigung: 30.3.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000006879**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006879>]

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Definitionen	1
1.2	Mitochondriale Enzephalomyopathien	1
1.3	Myophosphorylase-Mangel	4
1.4	Carnitin-Palmityl-Transferase II-Mangel	4
2.	Methoden	6
2.1	Gewebeproben	6
2.2	PCR zur Sequenzierung	6
2.3	PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen	7
2.4	Long-Range-PCR der mtDNA	8
2.5	Southern-Blot-Analyse	8
2.6	Real-time-PCR	9
3.	Ergebnisse	10
3.1	Gendefekte bei mitochondrialen Enzephalomyopathien	10
3.1.1	Mutation A3243G der mtDNA	10
3.1.2	Deletionen der mtDNA	10
3.1.3	Mutation C11777A der mtDNA	12
3.1.4	Mutation K319T im Twinkle-Gen	12
3.2	Mutationen im Myophosphorylase-Gen	14
3.3	Mutationen im Carnitin-Palmityl-Transferase II-Gen	14
4.	Diskussion	18
4.1	Mitochondriale Enzephalomyopathien	19
4.2	Myophosphorylase-Mangel	20
4.3	Carnitin-Palmityl-Transferase II-Mangel	20
5.	Zusammenfassung	22
6.	Abkürzungen	23
7.	Literaturverzeichnis	24

8.	Liste der Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsschrift	30
9.	Thesen	32
10.	Curriculum Vitae	33
11.	Erklärung	34
12.	Danksagung	35

# **1. Einleitung**

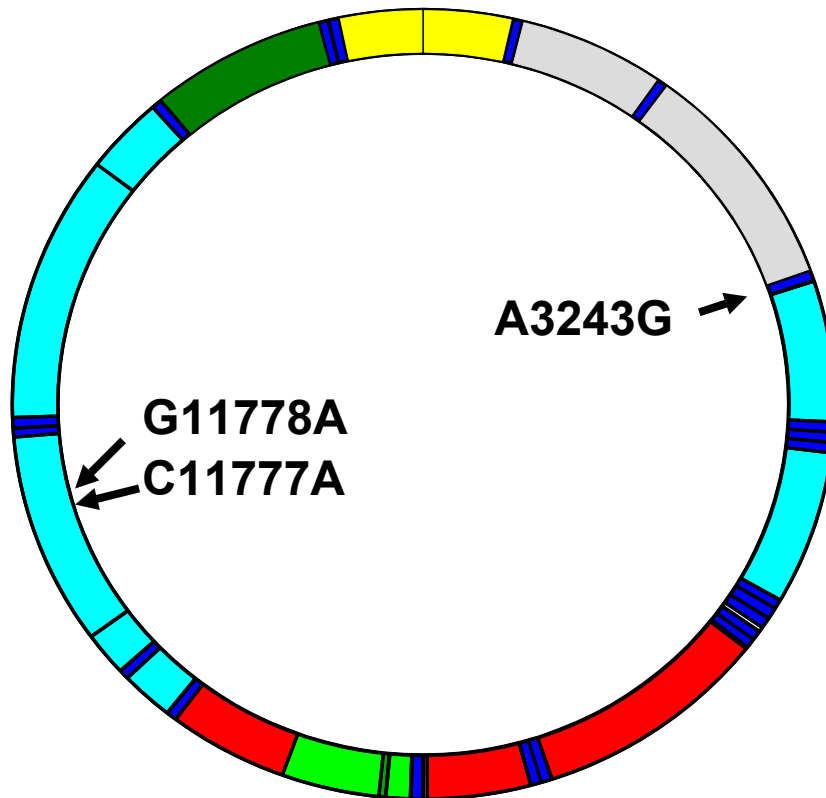
## **1.1 Definitionen**

Metabolische Myopathien werden durch Störungen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) sowie der Glukose- und Fettsäure-Utilisation hervorgerufen. OXPHOS-Defekte werden auch als mitochondriale Enzephalomyopathien bezeichnet, da Gehirn und Muskel bei diesen Störungen der Mitochondrienfunktion besonders betroffen sind. Häufig findet man Veränderungen der mitochondrialen DNA. Glukosestoffwechselstörungen des Muskels werden als Glykogenosen bezeichnet. Durch eine hereditäre Abbaustörung des Glykogens bzw. Störungen der Glykolyse kommt es zu Glykogenspeicherungen besonders in Muskel und Leber. Da manche Enzyme im Glykogenabbau gewebspezifisch sind, kann die Symptomatik auch z.B. auf den Muskel beschränkt sein, wie dies beim autosomal rezessiv vererbten Myophosphorylasemangel der Fall ist, der als die häufigste Glykogenose mit muskulärer Symptomatik gilt. Die muskuläre Form des Carnitin-Palmityl-Transferase II-Mangels ist eine häufige hereditäre Störung des Fettsäure-Stoffwechsels im Muskel (Lipidmyopathie). Die Carnitin-Palmityl-Transferase II vermittelt den Transport langkettiger Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran.

## **1.2 Mitochondriale Enzephalomyopathien**

Mitochondriale Enzephalomyopathien sind durch Defekte der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien bedingt. Die oxidative Phosphorylierung erfolgt in der Atmungskette, die aus fünf Komplexen besteht. Der Großteil der Untereinheiten dieser fünf Komplexe ist kernkodiert und wird in die Mitochondrien importiert, 20% der Untereinheiten werden jedoch durch die mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert. Mitochondrien sind die einzigen subzellulären Organellen, die eine eigene DNA besitzen. Das mitochondriale Genom besteht aus einer ringförmigen, doppelsträngigen DNA von 16,5 kB Länge (Abb. 1), die in mehreren tausend Kopien in jeder Zelle vorliegt. 13 Strukturproteine, alle Untereinheiten der Atmungskette, zwei rRNA und 22 tRNA werden durch die mtDNA kodiert, die maternal vererbt wird. Der maternale Vererbungsmodus stellt eine spezifische Eigenschaft der mitochondrialen Genetik dar. Die Oozyte enthält einige hunderttausend mtDNA, die

Abb. 1: Schematische Darstellung der mtDNA mit Lokalisation der untersuchten Punktmutationen sowie der verschiedenen Gene (dunkelblau tRNA-Gene, grau tRNA-Gene, hellblau Komplex I-Gene, rot Komplex-IV-Gene, grün Komplex V-Gene) sowie des D-Loop-Bereiches in gelb.



Spermien hingegen nur rund einhundert, mit der Konsequenz, dass der geringe Anteil paternaler mtDNA kaum einen Einfluss auf den Genotyp hat. So vererben Mütter ihre mtDNA allen ihren Nachkommen, wogegen nur die Töchter die mtDNA an die nächste Generation weitergeben. Neben dem maternalen Erbgang können mitochondriale Enzephalomyopathien jedoch auch autosomal vererbt werden, wenn kernkodierte Proteine, die für die Mitochondrienfunktion wichtig sind, verändert sind.

Treten Mutationen der mtDNA auf, so sind diese innerhalb einer Zelle nur bei einem Teil der mtDNA-Kopien zu finden. Dieser Zustand mit einem Gemisch von mutierter DNA und Wildtyp-DNA wird als Heteroplasmie bezeichnet. Der Anteil mutierter DNA kann von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich sein und ist meist in betroffenen Organen am höchsten. Man vermutet, dass mutierte DNA-Moleküle neben normalen Molekülen bereits in der

Eizelle oder Zygote vorliegen und nach dem Zufallsprinzip auf die folgenden Zellgenerationen verteilt werden (mitotische Segregation). Dadurch entstehen Stammzellen mit viel bzw. wenig mutierter DNA, was zu einem unterschiedlichen Heteroplasmiegrad in verschiedenen Geweben führt. Man nimmt an, dass ein bestimmter Schwellenwert an mutierter DNA erreicht werden muss, damit Mutationen der mtDNA wirksam werden. Eine Mutation kann daher auch bei klinisch nicht betroffenen Familienangehörigen in geringerem Ausmaß gefunden werden. Allerdings korreliert der Heteroplasmiegrad nicht eng mit der klinischen Ausprägung.

Bisher sind weit über 100 Punktmutationen und Deletionen der mtDNA nachgewiesen worden, die mit mitochondrialen Enzephalomyopathien assoziiert sind. Jedoch ist die Genotyp-Phänotyp-Korrelation häufig gering. Einerseits kann eine Mutation der mtDNA verschiedene Syndrome bedingen, andererseits ein Syndrom durch verschiedene Mutationen hervorgerufen werden. Punktmutationen fanden sich insbesondere in den tRNA-Genen der mtDNA. Als häufige Punktmutation gilt die Mutation A3243G im tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)-Gen, die initial beim MELAS-Syndrom (Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Episoden) identifiziert wurde. Darüber hinaus wurden aber auch andere Phänotypen bei dieser Mutation beschrieben. Die Ursache der breiten phänotypischen Variabilität der A3243G Mutation ist noch weitgehend ungeklärt. Ein anderes häufiges klinisches Syndrom ist eine chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO), die sich durch eine Bewegungseinschränkung der Augen sowie Ptosis auszeichnet. Häufig weisen Patienten auch eine Schwäche der Extremitätenmuskulatur auf, aber auch Multisystembeteiligungen mit z.B. Retinopathie, kardialen Reizleitungsstörungen, Ataxie, Polyneuropathie, Hörstörung oder Demenz kommen vor (CPEO plus). Bei der Mehrzahl der Patienten tritt die Erkrankung sporadisch auf, und es finden sich singuläre Deletionen der mtDNA. Darüber hinaus gibt es jedoch autosomal dominant oder rezessiv vererbte CPEO-Fälle, bei denen sich multiple Deletionen der mtDNA zeigten. Es wurden aber auch CPEO mit der maternal vererbten Punktmutation A3243G beschrieben (Chinnery&Turnbull 2000; DiMauro et al. 2001; Deschauer 2003).

Ein autosomaler Erbgang lässt auf einen Gendefekt in der nukleären DNA schließen, der sekundär zu den multiplen Deletionen der mtDNA führt. In den vergangenen Jahren wurden bei CPEO-Patienten mit multiplen Deletionen der mtDNA Mutationen in vier nukleären Genen gefunden, denen bei der Replikation der mtDNA eine Rolle zugeschrieben wird: Thymidine-Phosphorylase (Nishino et al. 1999), Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) 1 (Kaukonen et al. 2000), Polymerase Gamma (POLG) 1 (Van Goethem et al. 2001) und

Twinkle (Spelbrink et al. 2001). Nicht in allen Familien wurden jedoch Mutationen in diesen Genen gefunden, so dass man annimmt, dass es noch weitere Gene geben könnte. Im Gegensatz zur nuklären DNA repliziert die mtDNA kontinuierlich, auch in sich nicht teilenden (postmitotischen) Zellen. Zur Replikation der mtDNA sind Proteine notwendig, die kernkodiert sind und in die Mitochondrien importiert werden. Der genaue Mechanismus, wie Defekte in diesen Genen zu Replikationsstörungen und multiplen Deletionen der mtDNA führen, ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Da Mutationen im nukleären Genom zu Veränderungen des mitochondrialen Genoms führen, spricht man von Defekten der intergenomischen Kommunikation (Suomalainen&Kaukonen 2000; Deschauer&Zierz 2003).

### **1.3 Myophosphorylase-Mangel**

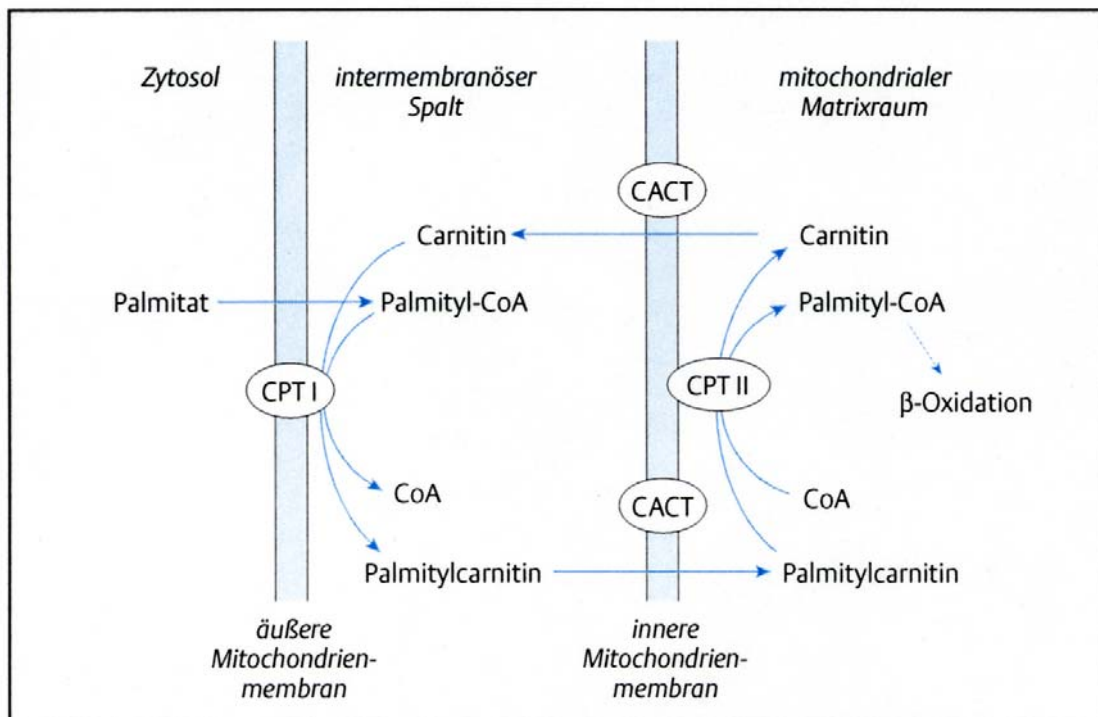
Glykogenosen werden aufgrund von unterschiedlichen Enzymdefekten im Glykogen- und Glykolysestoffwechsel in 13 Typen unterteilt, die sich teilweise nur als Myopathie manifestieren. Der Erbgang ist meist autosomal rezessiv, bei zwei Typen X-chromosomal rezessiv. Die Glykogenose Typ V wird nach ihrem Erstbeschreiber auch als McArdle-Erkrankung bezeichnet (McArdle 1951) und ist durch einen Mangel der muskelspezifischen Glykogen-Phosphorylase (Myophosphorylase) bedingt, die für den Abbau von Glykogen zu Glucose-1-Phosphat mitverantwortlich ist. Diese autosomal rezessiv vererbte Glykogenose führt zu Belastungsintoleranz, Myalgien, Muskelkrämpfen und rezidivierender Myoglobinurie. Im Verlauf kann sich auch eine permanente Muskelschwäche entwickeln. Das Myophosphorylase-Gen ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert. Bei kaukasischen McArdle-Patienten findet sich auf etwa der Hälfte der Allele die Mutation R49X, darüber hinaus sind eine Reihe von seltenen Mutationen beschrieben (DiMauro&Lamperti 2001).

### **1.4 Carnitin-Palmityl-Transferase II Mangel**

Die CPT II ist für den Transport langkettiger Fettsäuren durch die innere Mitochondrienmembran verantwortlich, um diese Fettsäuren dann in den Mitochondrien der Beta-Oxidation zuführen zu können (Abb. 2). Der CPT II-Mangel wird autosomal rezessiv vererbt und man kann drei verschiedene Phänotypen unterschieden, obwohl nur eine

Isoform der CPT II existiert. Eine mildere muskuläre Form ist durch Attacken mit Myalgien, Muskelschwäche und Myoglobinurie gekennzeichnet, die erstmals im Kindes- oder Erwachsenenalter auftreten und wird daher auch adulte Form genannt. Eine schwerere multisystemische Form führt zu Attacken mit Lebersversagen und hypoketotischer Hypoglykämie sowie Kardiomyopathie und muskulärer Hypotonie, die im frühen Kindesalter auftreten und wird auch infantile Form genannt. Diese multisystemische Symptomatik kann besonders schwer ausgeprägt sein und mit Missbildungen als neonatale letale Form auftreten. Das CPT II-Gen ist auf Chromosom 1p32 lokalisiert. Bei Patienten mit CPT II-Mangel findet man auf etwa 60% der Allele die Mutation S113L, darüber hinaus ist eine Reihe von seltenen Mutationen bekannt (Zierz 1994; Bonnefont et al. 1999).

Abb. 2: Schematische Darstellung des Fettsäure-Transports in die Mitochondrien: Die langkettigen Fettsäure-CoA-Ester werden durch die Carnitin-Palmityl-Transferase I (CPT I) unter Freisetzung von CoA zu Acyl-Carnitin verestert. Dieses wird im Austausch gegen freies Carnitin mit Hilfe der Carnitin/Acyl-Carnitin-Translokase (CACT) durch die innere Mitochondrienmembran transportiert. An der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran wird das Acyl-Carnitin durch die CPT II zu Acyl-CoA rückverestert. Acyl-CoA kann dann in der Beta-Oxidation unter Energiegewinn abgebaut werden.





## **2. Methoden**

### **2.1 Gewebeproben**

Es wurden 834 Patienten untersucht, bei denen zwischen Januar 1996 und Juni 2003 unter dem Verdacht auf eine metabolischen Myopathie eine diagnostische Muskelbiopsie bzw. EDTA-Blut entnommen wurde. Dabei gaben die Patienten auch ihr Einverständnis zu einer molekulargenetischen Untersuchung. Es erfolgte eine gezielte molekulargenetische Untersuchung in Abhängigkeit von klinischer Symptomatik, Familienanamnese sowie den Ergebnissen der myohistologischen und biochemischen Untersuchungen. Zur histologischen Diagnostik einer mitochondrialen Enzephalomyopathie wurde mittels modifizierter Trichrom-Gomori-Färbung nach Ragged-Red-Fasern gesucht und eine sequentielle COX/SDH-Färbung zum Nachweis von COX-negativen Fasern durchgeführt. Biochemisch wurden die Aktivitäten der Komplexe der Atmungskette bestimmt und eine Respirometrie durchgeführt (Gellerich et al. 2002). Ein Myophosphorylase-Mangel wurde histochemisch und biochemisch im Muskelhomogenat gemessen (Bergmeyer 1989). Ein CPT II-Mangel wurde biochemisch im Muskelhomogenat bestimmt (Zierz&Engel 1985).

### **2.2 PCR zur Sequenzierung**

Aus EDTA-Blut bzw. Muskelgewebe wurde DNA mittels Standardmethoden präpariert. Auch aus formalinfixiertem Autopsie-Hirngewebe wurde DNA gewonnen (Deschauer et al. 2003b). Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden für eine nachfolgende direkte Sequenzierung sowohl des gesamten mitochondrialen Genoms als auch die kodierenden Regionen (einschließlich Exon-Intron-Grenzen) verschiedener nukleärer Gene amplifiziert. Die PCR-Amplifikation wurde auf Agarose-Gelen überprüft und nach Reinigung wurde eine automatische Sequenzierung vorgenommen.

In Tabelle 1 sind die Referenzen der verschiedenen PCRs zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht über die PCRs zur Sequenzierung

<b>Gen</b>	<b>Referenz</b>
Gesamtes mitochondriales Genom in 28 Fragmenten	Taylor et al. 2001
CPT II-Gen in 5 Fragmenten	Deschauer et al. 2002
Myophosphorylase-Gen in 14 Fragmenten	Kubisch et al. 1998
Twinkle-Gen in 4 Fragmenten	Spelbrink et al. 2001
Adenin-Nukleotid-Translokator-Gen in 4 Fragmenten	Kaukonen et al. 2000

### **2.3 PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analysen**

Zum Nachweis von Punktmutationen wurde im Bereich der Mutation DNA mittels PCR amplifiziert und der Mutationsnachweis mittels geeigneter Restriktionsspaltung geführt. Wenn durch die Mutation keine natürliche Schnittstelle entstanden oder verloren gegangen ist, so wurde diese durch sog. Mismatch-Primer künstlich erzeugt. Die einzelnen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analysen mit Enzym und Referenz sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Zur Quantifizierung der Mutation C11777A der mtDNA wurde die DNA im letzten Zyklus der PCR radioaktiv markiert (Last-Hot-Cycle-PCR), um eine Unterschätzung des Heteroplasmiegrades durch Heteroduplexbildung zu vermeiden (Deschauer et al. 2003b). Nach der Restriktionsspaltung wurde die DNA auf Polyacrylamid-Gelen oder Agarose-Gelen aufgetrennt.

Tabelle 2: Übersicht über die PCR-RFLP-Analysen

	<b>Mutation</b>	<b>Enzym</b>	<b>Referenz</b>
MtDNA	A3243G	<i>ApaI</i>	Yamamoto et al. 1996
	C11777A	<i>HinfI</i>	Deschauer et al. 2003b
CPT II	S113L	<i>BstXI</i>	Taroni et al. 1993
	P50H	<i>DraIII</i>	Verderio et al. 1995
	515del4	<i>StuI</i>	Deschauer et al. 2002
	M214T	<i>MaeII</i>	Wieser et al. 2003
	413delAG-F448L	<i>Eco57I</i>	Wieser et al. 2003
	Y479F	<i>RsaI</i>	Wieser et al. 2003
	IVS3+5G->A	<i>Hyp8I</i>	Deschauer et al. 2003c
Myophosphorylase	R49X	<i>NlaIII</i>	Tsujino et al. 1993
	R269X	<i>AvaII</i>	Deschauer et al. 2001c
	Y84X	<i>Tru9I</i>	Deschauer et al. 2003a
	R93W	<i>FokI</i>	Deschauer et al. 2003a
Twinkle	K319T	<i>MaeIII</i>	Deschauer et al. 2003d

## 2.4 Long-Range-PCR der mtDNA

Zum Nachweis von Deletionen der mtDNA, die mehrere tausend Basen umfassen, wurde aus Muskel-DNA eine Long-range-PCR nach Herstellerangaben des Expand Long Template PCR Systems (Roche, Mannheim, Germany) durchgeführt. Der Vorwärts-Primer lag an Nukleotidposition 6222 – 6239, der Rückwärts-Primer an Nukleotidposition 16133 – 16153. Die Annealing-Temperatur betrug 55°C.

## 2.5 Southern-Blot-Analyse

Die ringförmige mtDNA wurde mittels Restriktionsspaltung mit *Pvu II* linearisiert und ein Southern-Blot nach Standardprotokoll durchgeführt. Zur Hybridisierung wurde eine Sonde von 16252 bp Länge mittels Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim,

Germany) nach Herstellerangaben generiert. Der Vorwärts-Primer lag an Nukleotidposition 15149-15174, der Rückwärts-Primer an Nukleotidposition 14831-14811. Die Annealing-Temperatur betrug 62°C. Mit Hilfe des ECL Kits (Amersham Life Science) wurde die DNA markiert und die Chemolumineszenz mittels Autoradiographie detektiert (Biomax-Film, Kodak).

## **2.6 Real-time-PCR**

Zur Identifikation und Quantifikation von Deletionen der mtDNA in einzelnen COX-negativen Muskelfasern, wurden von einem 20µm dicken Schnitt, bei dem eine sequentielle histochemische COX- und SDH-Färbung durchgeführt wurde, zehn Fasern mikrodiseziert. Aus jeder einzelnen Faser wurde DNA präpariert und es wurde eine Real-time-PCR durchgeführt mit Primerpaaren und fluorescein-markierten Sonden, die in der ND1- bzw. ND4-Region der mtDNA binden. Die ND4-Primer sind in einem Abschnitt der mtDNA (Position 12087 bis 12170) lokalisiert, der bei der großen Mehrzahl der beschriebenen Deletionen deletiert ist (>82%), im Gegensatz zu den ND1-Primern, die in einem Abschnitt (Position 3485-3553) lokalisiert sind, der bei der Mehrzahl nicht deletiert ist (> 94%). Beide Abschnitte wurden parallel amplifiziert. In Zellen mit deletierter DNA wurde eine größere Menge des ND1-Produktes im Vergleich zum ND4-Produkt amplifiziert (He et al. 2002).

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Gendefekte bei mitochondrialen Enzephalomyopathien**

#### **3.1.1 Mutation A3243G der mtDNA**

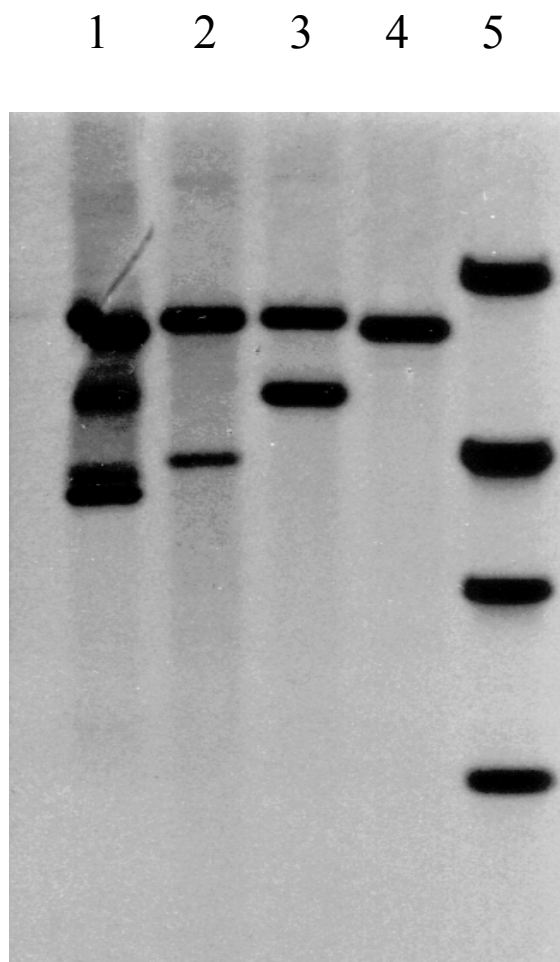
Die A3243G Punktmutation wurde bei 16 Index-Patienten sowie 5 symptomatischen Familienmitgliedern nachgewiesen. Die Phänotypen waren sehr variabel, beispielsweise bot ein Patient eine schmerzhafte Muskelsteife als im Vordergrund stehende Symptomatik (Deschauer et al. 1999). Aber auch eine CPEO war mit der A3243G Mutation assoziiert (Deschauer et al. 2001a). Die Analyse der klinischen Symptomatik dieser Patienten zeigte, dass eine über das Altersmaß hinausgehende Hörstörung das häufigste Symptom war, die bei 11/16 klinisch und bei 15/16 Patienten klinisch oder subklinisch zu finden war. Nur die Hälfte der Patienten bot den klassischen Phänotyp eines MELAS-Syndroms (Deschauer et al. 2001b). Der Heteroplasmiegrad war bei einem Patienten im Blut höher als im Muskel (Deschauer et al. 2000), sonst jedoch stets im Blut niedriger.

#### **3.1.2 Deletionen der mtDNA**

Bei 43 Index-Patienten mit histologisch nachgewiesener Mitochondriopathie fanden sich im Southern-Blot Deletionen der mtDNA, in 29 Fällen singuläre Deletionen und in 14 Fällen multiple Deletionen (Abb. 3). Darüber hinaus gab es zwei weitere Index-Patienten, bei denen multiple Deletionen nur in der Long-PCR, nicht jedoch in der Southern-Blot-Analyse identifiziert wurden. Bei einem dieser beiden Patienten wurde auch eine Real-time-PCR durchgeführt, die das Vorliegen von multiplen Deletionen der mtDNA bestätigte. Mit Ausnahme von zwei Patienten wiesen alle 45 Patienten mit Deletionen der mtDNA den Phänotyp einer CPEO bzw. CPEO plus auf. Diese beiden Patienten boten Ptosis und Myalgien bzw. Ptosis und Polyneuropathie. Die häufigeren singulären Deletionen der mtDNA fanden sich nur bei sporadischen Fällen, multiple Deletionen sowohl bei sporadischen als auch bei autosomal rezessiv oder dominant vererbten Fällen. (Deschauer et al. 2001a). Häufiges Symptom von Patienten mit Mitochondriopathien ist eine Belastungsintoleranz. Bei Patienten mit Deletionen konnte eine abnorme

Muskelermüdbarkeit gemessen werden, nicht jedoch bei Patienten mit der A3243G Mutation (Schulte-Mattler et al. 2003). Der Heteroplasmiegrad der Deletionen korrelierte mit dem Ausmaß der Reduktion der Atmungskettenaktivitäten im Muskel sowie dem histochemischen Anteil COX-negativer Fasern. Die Länge und Lokalisation der Deletion spielte dabei keine Rolle (Gellerich et al. 2002).

Abb. 3: Southernblot-Analyse zum Nachweis von Deletionen der mtDNA:  
Spur 1 multiple Deletionen, Spur 2 singuläre Deletion 7 kb, Spur 3  
singuläre Deletion 5 kb, Spur 4 Kontrolle, Spur 5 Marker



### **3.1.3 Mutation C11777A der mtDNA**

Bei einem 67-jährigen Patienten wurde eine Punktmutation C11777A der mtDNA nachgewiesen, die im ND4-Gen von Komplex I lokalisiert ist. Die Mutation lag in Heteroplasmie vor, wobei der Heteroplasmiegrad im Muskel (93%) höher lag als im Gehirn (67% Zerebellum und Mittelhirn, 81% Hippocampus, 69% Frontalhirn). Klinisch trat bei dem Patienten ein akutes Psychosyndrom mit Kopfschmerzen auf, es kam zu einem Status epilepticus und einer linksseitigen Hemiparese. Der Patient entwickelte einen Ileus und verstarb. Laborchemisch bestand eine ausgeprägte Laktatazidose. In einer Muskelbiopsie fand sich histologisch eine subsarkolemmale Akkumulationen von Mitochondrien und biochemisch eine verminderte Komplex I-Aktivität. Im Schädel-MRT zeigte sich rechts frontal ein Infarktareal, das sich autoptisch bestätigte. Die Familienanamnese ergab keinen Hinweis auf eine maternale Vererbung der Erkrankung (Deschauer et al. 2003b).

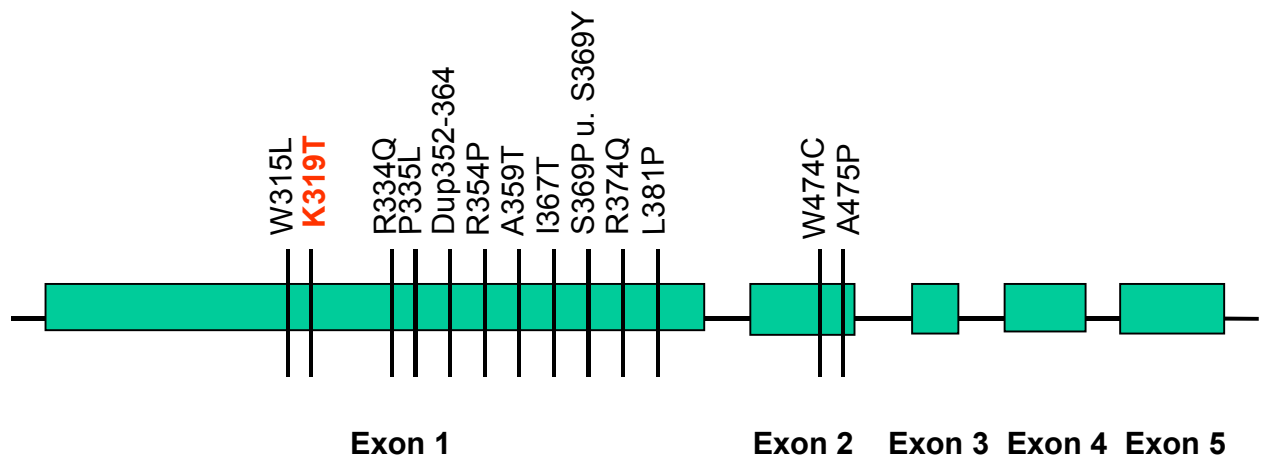
### **3.1.4 Mutation K319T im Twinkle-Gen**

Bei Patienten mit multiplen Deletionen bzw. autosomal vererbter CPEO wurden zwei nukleäre Gene untersucht: ANT1 und Twinkle.

ANT1-Mutationen fanden sich nach Sequenzierung der gesamten kodierenden Region des Gens in keinem der vier untersuchten Index-Patienten (Gellerich et al. 2002).

Bei einem von sechs untersuchten Index-Patienten wurde eine neue Mutation im Twinkle-Gen identifiziert. Diese Mutation K319T fand sich in einer Familie mit autosomal dominant vererbter CPEO. Sie liegt außerhalb des Hot-Spots des 3'-Endes von Exon 1 (Abb. 4). Multiple Deletionen der mtDNA zeigten sich beim Index-Patienten nur mittels Long-PCR und Real-time-PCR, nicht jedoch im konventionellen Southern-Blot. Histochemisch zeigte die Muskelbiopsie des Index-Patienten 3% COX-negative Fasern. Die Mutation wurde bei insgesamt sechs betroffenen Familienmitgliedern nachgewiesen. Alle zeigten eine CPEO ohne Extremitätenschwäche oder andere multisystemische Symptome. Dabei war die Symptomatik bei den beiden Schwestern des Index-Patienten nur milde ausgeprägt, so dass subjektiv keine Beschwerden bestanden (Deschauer et al. 2003d).

Abb. 4: Mutationen im Twinkle-Gen. Die neu identifizierte Mutation ist in rot beschriftet





### **3.2 Mutationen im Myophosphorylase-Gen**

Sechs Index-Patienten mit Myophosphorylase-Mangel wurden molekulargenetisch untersucht. Bei drei Patienten ließ sich die häufige Mutation R49X nachweisen, zwei trugen sie homozygot, ein Patient heterozygot. Durch Sequenzierung konnten bei zwei Patienten drei neue Mutationen nachgewiesen werden. Ein Patient zeigte homozygot eine Stop-Mutation R269X (Deschauer et al. 2001c). Der andere Patient war compound heterozygot für die Mutationen Y84X und R93W (Deschauer et al. 2003a) (Abb. 5). Bei zwei Patienten wurde noch keine Sequenzierung vorgenommen. Alle Patienten boten klinisch eine belastungsabhängige Muskelschwäche und Muskelschmerzen bzw. Muskelkrämpfe. Eine statistische Genotyp-Phänotyp-Korrelation ließ sich aufgrund der geringen Patientenanzahl nicht durchführen. Bei allen vier genetisch komplett charakterisierten Patienten und der R49X-heterozygoten Patientin fand sich biochemisch ein vollständiger Aktivitätsverlust der Myophosphorylase. Von den beiden Patienten, bei denen der Genotyp noch nicht geklärt wurde, war die Aktivität der Myophosphorylase in einem Fall deutlich erniedrigt, im anderen bestand ein vollständiger Aktivitätsverlust.

### **3.3 Mutationen im Carnitin-Palmityl-Transferase II-Gen**

Insgesamt wurden 37 Patienten mit muskulärem CPT II-Mangel untersucht, von denen 24 (65%) Männer waren. Bei 28 Index-Patienten mit biochemisch nachgewiesenem CPT II-Mangel fand sich die Mutation S113L homozygot in 13 Fällen und heterozygot in 14 Fällen. Ein Patient trug die Mutation S113L auf keinem der beiden Allele. Er wies die Mutation P50H homozygot auf. Durch Sequenzierung wurden bei Patienten, die auf einem Allel die Mutation S113L trugen, fünf neue Mutationen auf dem zweiten Allel identifiziert. Dabei handelt es sich um zwei Missense-Mutationen (M214T und Y479F) und eine kombinierte Deletion und Missense-Mutation 413delAG-F448L (Wieser et al. 1997; Wieser et al. 2003), eine 4-Basen-Deletion 515del4 (Deschauer et al. 2002) und eine Mutation in einer Splice-Site IVS3+5G->A (Deschauer et al. 2003c). Bei vier S113L-heterozygoten Patienten konnte bislang noch keine weitere Mutation gefunden werden. Die Genotypen sind in Tabelle 3 zusammengefasst und die Lokalisation der Mutationen in Abb. 6. Für die Mutation S113L berechnete sich eine Allelfrequenz von 71%. Die Mutation P50H fand sich bei einem Patienten homozygot und zwei Patienten heterozygot (Allelfrequenz 8% bei 25 Patienten).

Vier Patienten trugen die Mutation 413delAG-F448L heterozygot (Allelfrequenz 8% bei 25 Patienten). Die anderen Mutationen fanden sich nur bei einzelnen Patienten.

Alle biochemisch untersuchten Patienten zeigten im Muskelhomogenat eine normale Gesamt-CPT-Aktivität, jedoch eine abnorm verstärkte Hemmbarkeit der CPT II. Von 27 Patienten konnten die klinischen Daten ausgewertet werden. 70% der Patienten erlitten erste Attacken in der Kindheit, aber auch späte Erstmanifestation bis zum 61. Lebensjahr wurde beobachtet. Die Attacken waren bei 96% der Patienten mit Myalgien assoziiert (jedoch nur bei zwei Patienten mit Muskelkrämpfen) und bei 78% mit Myoglobininurie. Ausgelöst wurden sie bei 96% durch körperliche Belastung, bei 44% durch Infekte und bei 19% durch Fasten. Zwischen den Attacken war die CK nur bei 12% der Patienten erhöht. Myohistologisch zeigten sich bei 48% unspezifische myopathische Veränderungen und bei 17% eine geringe Lipidspeicherung. Nur Patienten, die compound heterozygot für eine trunkierende Mutation und eine Missense-Mutation waren, berichteten über Auslösung der Attacken durch Fasten. Bei S113L-homozygoten Fällen war Erstmanifestation im Kindesalter häufiger als bei anderen Genotypen.

Tabelle 3: Patienten mit biochemisch nachgewiesenem CPT II-Mangel

<b>Genotyp</b>	<b>Anzahl der Index-Patienten</b>
S113L / S113L	13
S113L / P50H	2
P50 / P50H	1
S113L / 413delAG-F448L	4
S113L / M214T	1
S113L / Y479F	1
S113L / 515del4	1
S113L / IVS3+5G->A	1
S113L / ?	4

Abb. 5: Mutationen in Myophosphorylase-Gen. Die häufige R49X Mutation ist in blau beschriftet, die neu identifizierten Mutationen sind in rot beschriftet.

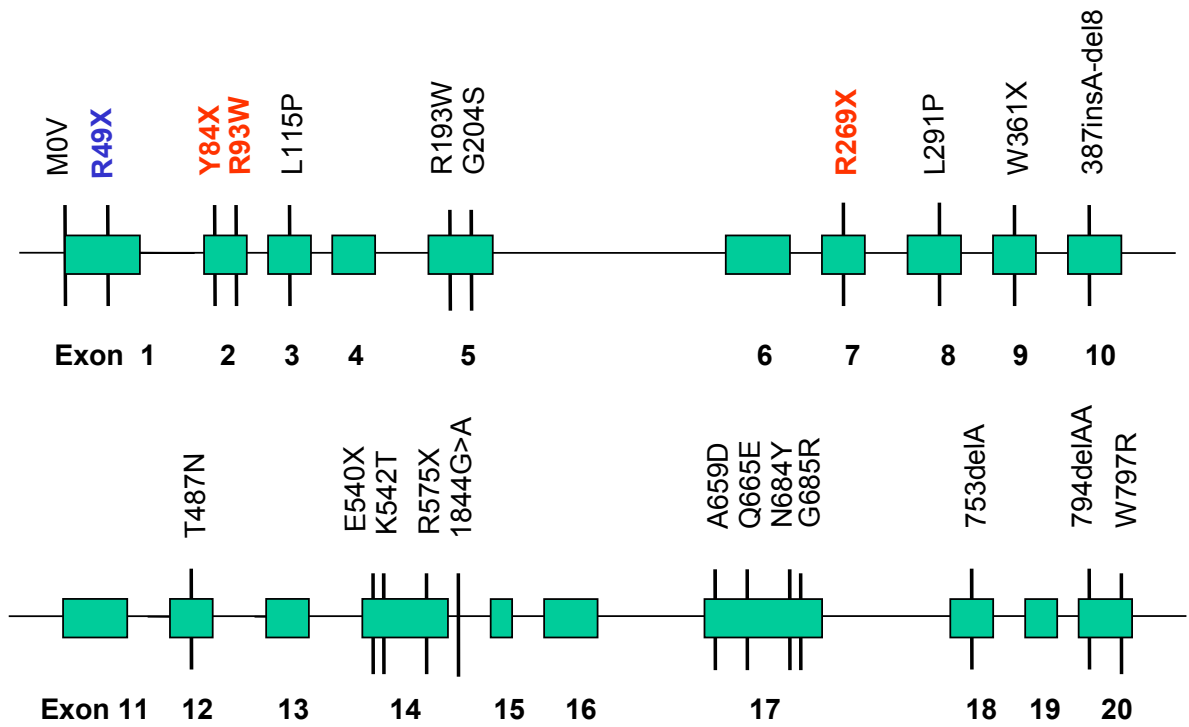
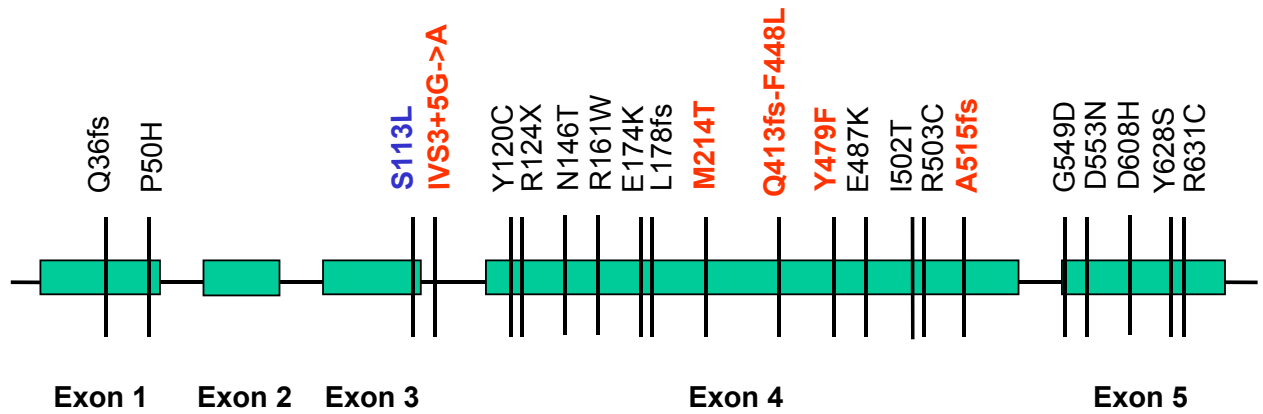


Abb. 6: Mutationen, die mit dem muskulären CPT II-Mangel assoziiert sein können. Die häufige Mutation S113L ist in blau beschriftet, die neu identifizierten Mutationen sind in rot beschriftet.



## 4. Diskussion

### 4.1 Mitochondriale Enzephalomyopathien

Bei mitochondrialen Enzephalomyopathien lassen sich Punktmutationen oder Deletionen (singuläre oder multiple) der mtDNA nachweisen, denen unterschiedliche Vererbungsmodi zugrunde liegen. Punktmutationen werden maternal vererbt. Die Mutation A3243G gilt als die häufigste Punktmutation der mtDNA. Sie ist nicht nur mit dem MELAS-Syndrom assoziiert, sondern zeigt einen sehr variablen Phänotyp (Deschauer et al. 2001b). So kann auch eine schmerzhafteste Muskelsteife Phänotyp der Mutation A3243G sein (Deschauer et al. 1999). Aber auch eine CPEO, die meist mit Deletionen assoziiert ist, kann selten durch die Mutation A3243G hervorgerufen werden (Deschauer et al. 2001a). Besonders empfindlich hinsichtlich einer durch die A3243G Mutation bedingten Funktionsstörung scheint das Gehör zu sein, dass bei über 90% der Betroffenen klinisch oder subklinisch affiziert war (Deschauer et al. 2001b). Dabei scheint die Ursache der Hörstörung eher cochleär als retrocochleär zu liegen (Chinnery et al. 2000). Die Ursache der phänotypischen Variabilität ist noch weitgehend ungeklärt. Unterschiedliche Heteroplasmiegrade in verschiedenen Geweben können die phänotypische Variabilität allein nicht erklären. Der Heteroplasmiegrad ist meist, aber nicht ausschließlich in sich rasch replizierenden Zellen, wie z.B. Blutzellen niedriger als in postmitotischem Gewebe wie z.B. Muskel (Deschauer et al. 2000).

Manifestationsalter der mitochondrialen Enzephalomyopathien ist meist das Kindes- oder frühe Erwachsenenalter. Der Fallbericht eines Patienten mit Erstmanifestation im 67. Lebensjahr bei Nachweis der Punktmutation C11777A belegt, dass auch bei älteren Patienten an eine mitochondriale Enzephalomyopathie gedacht werden muss (Deschauer et al. 2003b), auch wenn es bislang nur wenige Fallberichte über Erstmanifestation einer Mitochondriopathie im höheren Lebensalter gibt, z.B. über einen Patienten mit MELAS im 60. Lebensjahr (Kimata et al. 1998). Interessanterweise wurde die Mutation C11777A kürzlich auch bei zwei Kindern mit Leigh-Syndrom gefunden (Komaki et al. 2003). Dem unterschiedlichen Manifestationsalter könnte ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Mutation T8993G zugrunde liegen, indem ein hoher Heteroplasmiegrad zu früher Manifestation führt (Tatuch et al. 1992).

Ein faszinierender Aspekt ist der bemerkenswerte Unterschied des Phänotyps zwischen der Mutation C11777A und der Mutation G11778A, die mit der Leber'schen Optikusneuropathie assoziiert ist und das gleiche Kodon betrifft. Möglicherweise ist der Unterschied dadurch bedingt, dass die Mutation G11778A das geladene Arginin an Position 340 in eine ebenfalls geladene Aminosäure tauscht (Histidin), wohingegen die Mutation C11777A zu einer ungeladenen Aminosäure (Serin) an dieser Position führt.

Deletionen der mtDNA sind meist mit einer CPEO assoziiert. 43 der 45 Patienten mit Deletionen wiesen eine CPEO auf, zwei Patienten boten jedoch nur eine Ptosis ohne Augenbewegungsstörung. Es sind nur wenige weitere Fälle mit singulären Deletionen ohne CPEO beschrieben (Campos et al. 1996; Campos et al. 2000). Singuläre Deletionen treten in der Regel sporadisch auf und sind häufiger als multiple Deletionen, die autosomal dominant oder rezessiv vererbt werden können.

Der Nachweis einer Mutation im Twinkle-Gen bei einem Patienten mit autosomal dominant vererbter CPEO ohne multiple Deletionen im Southern-Blot (jedoch in der Long-PCR und Real-Time-PCR) und nur 3% COX-negativen Fasern im Muskel illustriert die diagnostischen Schwierigkeiten der CPEO (Deschauer et al. 2003d). Der Fall zeigt, dass bei unauffälligem Southern-Blot bei Patienten mit Verdacht auf CPEO sensitive molekulargenetische Methoden wie Long-PCR oder Real-Time-PCR zum Einsatz kommen sollten. Das Twinkle-Gen auf Chromosom 10q24 kodiert für eine mitochondriales Protein, dem die Funktion einer DNA-Helikase zugeschrieben wird. DNA-Helikasen sind für die Auftrennung der Doppelhelix in Einzelstränge verantwortlich und spielen bei der Replikation, Reparatur und Transkription der DNA eine Rolle. Es ist daher naheliegend, dass Defekte einer mitochondrialen Helikase zu multiplen Deletionen der mtDNA führen können (Spelbrink et al. 2001).

Der fehlende Nachweis von ANT1-Mutationen bei vier Index-Patienten bestätigt die Beobachtung der Arbeitsgruppe um Zeviani, dass Mutationen im Twinkle und POLG1-Gen im Vergleich zu ANT1-Mutationen häufiger sind (Lamantea et al. 2002; Agostino et al. 2003). Die fehlende multisystemische Beteiligung in der Familie mit der Twinkle Mutation K319T (Deschauer et al. 2003d) ist in Übereinstimmung mit anderen Berichten über Patienten mit Twinkle-Mutationen (Lewis et al. 2002; Suomolainen et al. 1997; Li et al. 1999) im Gegensatz zu Patienten mit POLG1-Mutationen, die häufig eine Multisystembeteiligung aufwiesen (Lamantea et al. 2002).

Die bei Patienten mit Deletionen nachgewiesene Korrelation zwischen Heteroplasmiegrad und Ausmaß der Reduktion verschiedener Atmungskettenaktivitäten im Muskel unabhängig

von Länge und Lokalisation der Deletion weist darauf hin, dass der biochemische Phänotyp eher durch eine Reduktion der tRNA-Funktion als durch eine verminderte Expression von Strukturproteinen bedingt ist (Gellerich et al. 2002).

#### **4.2 Myophosphorylase-Mangel**

Auch in der kleinen Fallzahl von 6 Patienten mit Myophosphorylase-Mangel zeigte sich, dass die häufige Mutation R49X vergleichbar mit bisherigen Untersuchungen (DiMauro&Lamperti 2001) etwa auf der Hälfte der Allele zu finden war (Allelfrequenz 42%). Es wurden 3 neue Mutationen identifiziert (Y84X, R93W und R269X) (Deschauer et al. 2001c; Deschauer et al. 2003a). Zwei davon sind wie die Mutation R49X trunkierende Mutationen, die zum Kettenabbruch führen. Die genetische Variabilität der McArdle-Erkrankung konnte dadurch erweitert werden. Insgesamt wurden bislang über 30 Mutationen identifiziert (DiMauro & Lamperti 2001). Bei trunkierenden Mutationen auf beiden Allelen ist ein komplettes Fehlen der Myophosphorylase-Aktivität gut erklärbar, aber auch die Patientin mit der Missens-Mutation R93W auf einem Allel wies einen kompletten Verlust der Phosphorylase-Aktivität auf, was darauf hinweist, dass ein funktionell besonders wichtiges Zentrum durch die Mutation R93W beeinträchtigt sein dürfte. Es gibt auch andere Patienten mit Missense-Mutationen auf einem oder beiden Allelen, die einen kompletten Aktivitätsverlust haben (Rubio et al. 2000a; Rubio et al. 2000b). Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnte bei der kleinen Fallzahl nicht etabliert werden, allerdings fand sich auch in einer großen Serie von 54 McArdle-Patienten aus 40 Familien keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation (Martin et al. 2001).

#### **4.3 Carnitin-Palmityl-Transferase II-Mangel**

Es fand sich eine Allelhäufigkeit der häufigen Mutation S113L von 71% in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen (Taroni et al. 1993; Zierz et al. 1994). Es wurden fünf neue Mutationen identifiziert und so die genetische Heterogenität des CPT II-Mangels erweitert (Deschauer et al. 2002; Wieser et al. 2003; Deschauer et al. 2003c). Erstmals wurde eine Splice-Site-Mutation bei muskulärem CPT II-Mangel identifiziert (Deschauer et al. 2003c). Bislang sind über 40 Mutationen im CPT II-Gen

beschrieben, wovon die Mehrzahl mit der muskulären Form eines CPT II-Mangels assoziiert ist (Bonfont et al. 1999; Deschauer et al. 2003c; Thuillier et al. 2003). Die Allelhäufigkeiten von jeweils 8% für die Mutationen P50H and Q413fs-F448L legen nahe, dass bei der molekularen Routine-Diagnostik neben der Untersuchung der häufigen S113L Mutation die zusätzliche Suche nach diesen beiden Mutationen sinnvoll ist. Für die Diagnosestellung des muskulären CPT II-Mangels sind biochemische und molekulargenetische Untersuchungen notwendig, da myohistologisch keine wegweisenden Veränderungen beobachtet werden können. Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurde nicht gefunden, jedoch war Fasten als Auslöser der Attacken nur bei Patienten mit einer trunkierenden Mutation relevant.

Die Analyse der klinischen Symptomatik der Patienten zeigte, dass der muskuläre CPT II-Mangel typischerweise durch Attacken mit Myalgien und Myoglobinurie charakterisiert ist, die meist durch körperliche Belastung ausgelöst werden. Es gibt jedoch auch Patienten, bei denen in den Attacken nur Myalgien auftreten und andere Auslösemechanismen vorliegen.. In der Mehrzahl der Patienten traten erste Beschwerden bereits in der Kindheit auf. Andererseits kann beim muskulären CPT II-Mangel auch eine Erstmanifestation im späten Erwachsenenalter vorliegen. Die häufig gebrauchte Unterscheidung zwischen infantilem und adultem CPT II-Mangel kann daher missverständlich sein, da auch die „adulte“ Form häufig im Kindesalter beginnt. Besser ist es, zwischen muskulärer und multisystemischer (mit Herz-, Leber und Muskelbeteiligung) Form zu trennen. Im Gegensatz zu den Patienten mit McArdle-Erkrankung, bei denen in 93% der Fälle Muskelkrämpfe auftreten (Martin et al. 2001), klagten die Patienten mit CPT II-Mangel nur selten über Muskelkrämpfe. Fehlt die typische Myoglobinurie, so ist klinisch die Verdachtsdiagnose eines muskulären CPT II-Mangels schwer zu stellen. Biochemische und molekulargenetische Untersuchungen hinsichtlich eines muskulären CPT II-Mangels sind daher auch bei Patienten, die nur über belastungsabhängige Myalgien klagen, sinnvoll.



## 5. Zusammenfassung

Die Arbeit fasst molekulargenetische Untersuchungen zu den wichtigsten metabolischen Myopathien (mitochondriale Enzephalomyopathien, Myophosphorylase-Mangel und muskulärer CPT II-Mangel) zusammen.

Bei 21 Patienten mit mitochondrialen Enzephalomyopathien fand sich die Mutation A3243G der mtDNA, die eine große phänotypische Variabilität zeigte. Das häufigste Symptom war eine Hörstörung, die bei fast alle Patienten klinisch oder subklinisch vorlag. Schmerzhaftes Muskelsteife wurde als neuer Phänotyp erkannt. Die Identifikation einer neuen Mutation C11777A der mtDNA bei einem Patienten mit Erstmanifestation einer Enzephalopathie im 67. Lebensjahr zeigte, daß auch bei älteren Patienten an eine Mitochondriopathie gedacht werden muß. Diese Mutation betrifft das gleiche Kodon wie die Mutation G11778A, die mit der Leber'schen Optikusneuropathie assoziiert ist, zeigte jedoch bemerkenswerterweise einen sehr differenten Phänotyp.

Deletionen der mtDNA, die in der Regel mit einer CPEO assoziiert waren, fanden sich bei 43 Index-Patienten im Southern-Blot. Dabei zeigte sich, daß singuläre Deletionen häufiger sind und mit sporadischem Auftreten assoziiert sind, im Vergleich zu multiplen Deletionen, die sowohl autosomal vererbt als auch sporadisch auftreten können.

Bei einem Patienten mit autosomal dominant vererbter CPEO wurde eine neue Mutation (K319T) im nukleären Twinkle-Gen identifiziert. Bei diesem Patienten zeigten sich die für diese Erkrankung wegweisenden multiplen Deletionen der mtDNA nur mittels Long-PCR und Real-time-PCR, nicht jedoch mittels Southern-Blot-Technik, die bislang als Methode der Wahl galt, was die diagnostischen Schwierigkeiten illustriert.

Bei sechs Patienten mit Myophosphorylase-Mangel wurden drei neue Mutationen (Y84X, R93W und R269X) identifiziert und so die Kenntnis der genetische Variabilität dieser Erkrankung erweitert.

Bei 37 Patienten mit muskulärem CPT II-Mangel, wurden fünf neuen Mutationen (M214T, Y479F, 413delAG-F448L, 515del4 und IVS3+5G->A) identifiziert. Erstmals wurde bei muskulärem CPT II-Mangel eine Mutation in einer Splice-Site nachgewiesen. Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation fand sich nicht, jedoch war Fasten als Auslöser der Attacken nur bei Patienten mit einer trunkierenden Mutation relevant. Eine Allelhäufigkeit von jeweils 8% für die Mutationen P50H and Q413fs-F448L legte nahe, dass bei der molekularen Routine-Diagnostik neben der Untersuchung der häufigen Mutation S113L auch die Suche nach diesen beiden Mutationen sinnvoll ist.

## 6. Abkürzungen

ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
CACT	Carnitin/Acyl-Carnitin-Translokase
CK	Creatin-Kinase
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CPT	Carnitin-Palmityl-Transferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und schlaganfall-ähnlichen Episoden
MtDNA	mitochondriale DNA
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
POLG	Polymerase Gamma
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SDH	Succinat-Dehydrogenase

## 7. Literaturverzeichnis

Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, Ferrari G, Carrara F, Taylor RW, Schaefer AM, Turnbull DM, Tiranti V, Zeviani M: Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* 60 (2003) 1354-1356

Bergmeyer HU: Phosphorylase a. In: Bergmeyer HU (Ed.) *Methods of enzymatic analysis* Third edition 1989, volume II, VCH Weinheim, pp 293-295

Bonnefont JP, Demaugre F, Prip-Buus C, Saudubray JM, Brivet M, Abadi N, Thuillier L: Carnitine Palmitoyltransferase Deficiencies. *Mol Genet Metab* 86 (1999) 424-440

Campos Y, Martin MA, Navarro C, Gordo P, Arenas J: Single large-scale mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy associated with multiple symmetric lipomatosis. *Neurology* 47 (1996) 1012-1014

Campos Y, Martin MA, Caballero C, Rubio JC, de la Cruz F, Tunon T, Arenas J: Single large-scale mitochondrial DNA deletion in a patient with encephalopathy, cardiomyopathy, and prominent intestinal pseudo-obstruction. *Neuromuscul Disord* 10 (2000) 56-58

Chinnery PF, Turnbull DM : Clinical features, investigation, and management of patients with defects of mitochondrial DNA. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63 (1997) 559-563

Chinnery PF, Turnbull DM: Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* 6 (2000) 425-432

Chinnery PF, Elliott C, Green GR, Rees A, Coulthard A, Turnbull DM, Griffiths TD: The spectrum of hearing loss due to mitochondrial DNA defects. *Brain* 123 (2000) 82-92

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

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

Deschauer M, Wieser T, Neudecker S, Lindner A, Zierz S: Mitochondrial 3243A→G mutation (MELAS mutation) associated with painful muscle stiffness. *Neuromuscul Disord* 9 (1999) 305-307

Deschauer M, Neudecker S, Müller T, Gellerich FN, Zierz S: Higher proportion of mitochondrial A3243G mutation in blood than in skeletal muscle in a patient with cardiomyopathy and hearing loss. *Mol Genet Metabol* 70 (2000) 235-237

Deschauer M, Müller T, Dreha S, Zierz S: Familiäre mitochondriale chronisch progressive externe Ophthalmoplegie - Fünf Familien mit unterschiedlicher Genetik. *Nervenarzt* 72 (2001a) 122-129

Deschauer M, Müller T, Wieser T, Schulte-Mattler W, Kornhuber M, Zierz S: Hearing impairment is common in various phenotypes of the mitochondrial DNA A3243G mutation. *Arch Neurol* 58 (2001b) 1885-1888

Deschauer M, Opalka JR, Lindner A, Zierz S: A novel nonsense mutation (R269X) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Mol Genet Metabol* 74 (2001c) 489-491

Deschauer M, Wieser T, Schröder R, Zierz S: A novel nonsense mutation (515del4) in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metabol* 75 (2002) 181-185

Deschauer M, Hertel K, Zierz S: Two novel mutations in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Muscle Nerve* 27 (2003a) 105-107

Deschauer M, Bamberg C, Claus D, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW: Late-onset encephalopathy associated with a C11777A mutation of mitochondrial DNA. *Neurology* 60 (2003b) 1357-1359

Deschauer M, Chrzanowska-Lightowlers Z, Biekmann E, Taylor RW, Turnbull DM, Zierz S: A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metabol* 79 (2003c) 124-128

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

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

DiMauro S, Lamperti C: Muscle Glycogenoses. *Muscle Nerve* 24 (2001) 984-999

Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M, Martin AL, Colombo I, Tarelli GT, DiDonato S: cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localisation of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 661-665

Gellerich FN, Deschauer M, Müller T, Chen Y, Opalka JR, Zierz S: Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta* 1556(1) (2002) 41-52

He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM: Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) e68

Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A: Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289 (2000) 782-785

Kimata KG, Gordan L, Ajax ET, Davis PH, Grabowski T: A case of late-onset MELAS. *Arch Neurol* 55 (1998) 722-725

Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I, Goto YI: A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. *Mitochondrion* 2 (2003) 293-304

Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ: Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat* 12 (1998) 27-32

Li FY, Tariq M, Croxen R, Morten K, Squier W, Newsom-Davis J, Beeson D, Larsson C: Mapping of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia to a 7-cM critical region on 10q24. *Neurology* 53 (1999) 1265-1271

Martin MA, Rubio JC, Buchbinder J, Fernandez-Hojas R, del Hoyo P, Teijeira S, Gamez J, Navarro C, Fernandez JM, Cabello A, Campos Y, Cervera C, Culebras JM, Andreu AL, Fletterick R, Arenas J: Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 50 (2001) 574-581

McArdle B: Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci* 10 (1951) 13-33

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

Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Cabello A, Arenas J: A missense mutation T487N in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 10 (2000a) 138-140

Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Auciello R, Cabello A, Arenas J: A missense mutation W797R in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's. *Muscle Nerve* 23 (2000b) 129-131

Schulte-Mattler WJ, Müller T, Deschauer M, Gellerich FN, Iazzoi PA, Zierz S: Increased metabolic muscle fatigue is caused by some but not by all mitochondrial mutations. *Arch Neurol* 60 (2003) 50-58

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* 28 (2001) 223-231

Suomalainen A, Kaukonen J: Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability. *Am J Med Genet (Sem Med Genet)* 106 (2001) 53-61

Suomalainen A, Majander A, Wallin M, Setälä K, Kontula K, Leinonen H, Salmi T, Paetau A, Haltia M, Valanne L, Lonnqvist J, Peltonen L, Somer H: Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology* 48 (1997) 1244-1253

Taroni F, Verderio E, Dworzak F, Willems PJ, Cavadini P, DiDonato S: Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nat Genet* 4 (1993) 314-320

Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, Rudd N, Petrova-Benedict R, Robinson BH: Heteroplasmic mtDNA mutation (T->G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 50 (1992) 852-858

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

Thuillier L, Rostane H, Droin V, Demaugre F, Brivet M, Kadhom N, Prip-Buus C, Gobin S, Saudubray JM, Bonnefont JP: Correlation between genotype, metabolic data, and clinical

presentation in carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2) deficiency. *Hum Mutat* 21 (2003) 493-501

Tsujino S, Shanske S, DiMauro S: Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *N Engl J Med* 329 (1993) 241-245

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* 28 (2001) 211-212

Verderio E, Cavadini P, Montermini L, Wang H, Lamantea E, Finocchiaro G, DiDonato S, Gellera C, Taroni F: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* 4 (1995) 19-29

Wieser T, Deschauer M, Zierz S: Carnitine Palmitoyltransferase II deficiency: three novel mutations. *Ann Neurol* 42 (1997) 414

Wieser T, Deschauer M, Olek K, Hermann T, Zierz S: Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency: Molecular and Biochemical Analysis of 32 Patients. *Neurology* 60 (2003) 1354-1356

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

Zierz S: Carnitine palmitoyltransferase deficiency. In *Myology* 2d ed. 1994 (Engel AG, Franzini-Armstrong C, Ed.), McGraw-Hill, New York, pp 1577-1586

Zierz S, Engel AG, Olek K: The Ser113Leu mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Muscle Nerve* 1994; Suppl 1 S129

Zierz S, Engel AG: Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur J Biochem* 149 (1985) 207-214



## 8. Liste der Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsschrift<sup>1</sup>

1. **Deschauer M**, Wieser T, Neudecker S, Lindner A, Zierz S: Mitochondrial 3243A→G mutation (MELAS mutation) associated with painful muscle stiffness. *Neuromuscul Disord* 9 (1999) 305-307
2. **Deschauer M**, Neudecker S, Müller T, Gellerich FN, Zierz S: Higher proportion of mitochondrial A3243G mutation in blood than in skeletal muscle in a patient with cardiomyopathy and hearing loss. *Mol Genet Metabol* 70 (2000) 235-237
3. **Deschauer M**, Müller T, Dreha S, Zierz S: Familiäre mitochondriale chronisch progressive externe Ophthalmoplegie - Fünf Familien mit unterschiedlicher Genetik. *Nervenarzt* 72 (2001a) 122-129
4. **Deschauer M**, Müller T, Wieser T, Schulte-Mattler W, Kornhuber M, Zierz S: Hearing impairment is common in various phenotypes of the mitochondrial DNA A3243G mutation. *Arch Neurol* 58 (2001b) 1885-1888
5. **Deschauer M**, Opalka JR, Lindner A, Zierz S: A novel nonsense mutation (R269X) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Mol Genet Metabol* 74 (2001c) 489-491
6. **Deschauer M**, Wieser T, Schröder R, Zierz S: A novel nonsense mutation (515del4) in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metabol* 75 (2002) 181-185
7. Gellerich FN, **Deschauer M**, Müller T, Chen Y, Opalka JR, Zierz S: Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta* 1556(1) (2002) 41-52

---

<sup>1</sup> Aus urheberrechtlichen Gründen sind die Arbeiten in der Online-Version der Habilitationsschrift nicht enthalten

8. **Deschauer M**, Hertel K, Zierz S: Two novel mutations in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Muscle Nerve* 27 (2003a) 105-107
9. Schulte-Mattler WJ, Müller T, **Deschauer M**, Gellerich FN, Iazzoi PA, Zierz S: Increased metabolic muscle fatigue is caused by some but not by all mitochondrial mutations. *Arch Neurol* 60 (2003) 50-58
10. **Deschauer M**, Chrzanowska-Lightowlers Z, Biekmann E, Taylor RW, Turnbull DM, Zierz S: A splice junction mutation in muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metabol* 79 (2003c) 124-128
11. Wieser T, **Deschauer M**, Olek K, Hermann T, Zierz S: Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency: Molecular and Biochemical Analysis of 32 Patients. *Neurology* 60 (2003) 1354-1356
12. **Deschauer M**, Bamberg C, Claus D, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW: Late-onset encephalopathy associated with a C11777A mutation of mitochondrial DNA. *Neurology* 60 (2003b) 1357-1359
13. **Deschauer M**, Kiefer R, Blakely EL, He L, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW: A novel Twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13 (2003d) 568-572

## 9. Thesen

1. Metabolische Myopathien werden durch Störungen der oxidativen Phosphorylierung (mitochondriale Enzephalopathien) sowie der Glukose-Utilisation (Glykogenosen) und Fettsäure-Utilisation (Lipidmyopathien) hervorgerufen.
2. Bei mitochondrialen Enzephalomyopathien, finden sich häufig Veränderungen der mitochondrialen DNA (mtDNA). Dabei kann es sich um singuläre bzw. multiple Deletionen sowie Punktmutationen (insbesondere Mutation A3243G) handeln. Eine häufige Glykogenose ist der autosomal rezessiv vererbte Myophosphorylase-Mangel, eine häufige Lipidmyopathie ist der autosomal rezessiv vererbte muskuläre Carnitin-Palmityl-Transferase (CPT) II-Mangel.
3. Es wurden Gewebeproben von 834 Patienten molekulargenetisch untersucht, bei denen der Verdacht auf eine metabolische Myopathie bestand. Dabei wurden Veränderungen der mitochondrialen DNA sowie im CPT II-Gen und im Myophosphorylase-Gen untersucht.
4. Die Punktmutation A3243G der mtDNA, die bei 16 Index-Patienten und fünf symptomatischen Familienmitgliedern nachgewiesen wurde, zeigte eine große phänotypische Variabilität. Als häufigstes Symptom fand sich eine Hörstörung, die bei fast allen Patienten klinisch oder subklinisch vorlag. Schmerzhafteste Muskelsteife wurde als neuer Phänotyp erkannt. Der Heteroplasmiegrad war meist, aber nicht ausschließlich in sich rasch replizierenden Zellen, wie z.B. Blutzellen niedriger als in postmitotischem Gewebe wie z.B. Muskel.
5. Die Identifikation einer neuen Punktmutation C11777A der mtDNA bei einem Patienten mit Erstmanifestation einer Enzephalopathie im 67. Lebensjahr zeigte, daß auch bei älteren Patienten an eine mitochondriale Enzephalomyopathie gedacht werden muß. Diese Mutation betrifft das gleiche Kodon wie die Mutation G11778A, die mit der Leber'schen Optikusneuropathie assoziiert ist, zeigte jedoch bemerkenswerterweise einen sehr differenten Phänotyp.

6. Bei 43 Index-Patienten fanden sich im Southern-Blot Deletionen der mtDNA. Dabei zeigte sich, daß singuläre Deletionen (29 Fälle) häufiger sind und mit sporadischem Auftreten assoziiert sind, im Vergleich zu multiple Deletionen (14 Fälle), die sowohl autosomal vererbt als auch oder sporadisch auftreten können. Deletionen der mtDNA waren in der Regel mit einer chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO) assoziiert.
7. Bei einem Patienten mit autosomal dominant vererbter CPEO wurde eine neue Mutation (K319T) im nukleären Twinkle-Gen identifiziert. Bei diesem Patienten zeigten sich die für diese Erkrankung wegweisenden multiplen Deletionen der mtDNA nur mittels Long-PCR und Real-time-PCR, nicht jedoch mittels Southern-Blot-Technik, die bislang als Methode der Wahl galt, was die diagnostischen Schwierigkeiten illustriert.
8. Bei sechs untersuchten Index-Patienten mit Myophosphorylase-Mangel wurden drei neue Mutationen (Y84X, R93W und R269X) identifiziert und so die Kenntnis der genetischen Variabilität dieser Erkrankung erweitert.
9. Insgesamt wurden 37 Patienten mit muskulärem CPT II-Mangel untersucht. Bei 28 Index-Patienten mit biochemisch nachgewiesenem CPT II-Mangel wurden fünf neue Mutationen (M214T, Y479F, 413delAG-F448L, 515del4 und IVS3+5G->A) identifiziert und so das Wissen über die genetische Variabilität vergrößert. Erstmals wurde bei muskulärem CPT II-Mangel eine Mutation in einer Splice-Site nachgewiesen.
10. Eine Allelhäufigkeit von jeweils 8% für die Mutationen P50H and Q413fs-F448L legte nahe, dass bei der molekularen Routine-Diagnostik des muskulären CPT II-Mangels neben der Untersuchung der häufigen S113L Mutation auch die Suche nach diesen beiden Mutationen sinnvoll ist.
11. Myohistologisch zeigten sich bei den Patienten mit CPT II-Mangel unspezifische Veränderungen, so dass für die Diagnosestellung biochemische und molekulargenetische Untersuchungen notwendig sind.
12. Von 27 Patienten mit CPT II-Mangel konnten die klinischen Daten ausgewertet werden: 70% der Patienten erlitten erste Attacken in der Kindheit, aber auch späte Erstmanifestation bis zum 61. Lebensjahr wurde beobachtet. Die häufig gebrauchte Bezeichnung „adulter“

CPT II-Mangel kann daher missverständlich sein, da bei der Mehrzahl der Patienten der Symptombeginn in der Kindheit lag. Besser ist es, vom muskulären CPT II-Mangel zu sprechen. Die Attacken waren bei 96% der Patienten mit Myalgien assoziiert (jedoch im Gegensatz zur McArdle-Glykogenose nur bei zwei Patienten mit Muskelkrämpfen) und bei 78% mit Myoglobinurie. Ausgelöst wurden sie bei 96% durch körperliche Belastung, bei 44% durch Infekte und bei 19% durch Fasten.

13. Es fand sich bei Patienten mit CPT II-Mangel keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation, jedoch war Fasten als Auslöser der Attacken nur bei Patienten mit einer trunkierenden Mutation relevant. Bei S113L-homozygoten Fällen war Erstmanifestation im Kindesalter häufiger als bei anderen Genotypen.

## 10. CURRICULUM VITAE

4.4.1967	in Nürnberg geboren
Sept. 1973 – Juli 1977	Grundschule Wendelstein
Sept. 1977 – Juli 1986	Staatliches Gymnasium Roth mit Abitur abgeschlossen
Okt. 1986 – Sept. 1987	Wehrpflicht
<b>Hochschulausbildung</b>	
Nov. 1987 – April 1994	Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg. Abschluss: sehr gut
15.12.1994	Promotion zum Dr. med. an der Universität Erlangen-Nürnberg (Doktorvater Prof. Fleckenstein, Institut für klinische und molekulare Virologie: Molekulargenetische Diagnostik der Hepatitis C Infektion. Beurteilung: Magna cum laude)
<b>Beruflicher Werdegang</b>	
Juli 1994 – Dez. 1994	Arzt im Praktikum an der Neurologischen Abteilung Krankenhaus Rummelsberg (Prof. Glötzner)
Jan. 1995 – Dez. 1995	Arzt im Praktikum an der Klinik für Neurologie Universität Erlangen-Nürnberg (Prof. Neundörfer)
Jan.1996 – Jan. 2001	Assistenzarzt/Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Neurologie Universität Halle-Wittenberg (Prof. Zierz), Schwerpunkt der wissenschaftlichen Tätigkeit im molekulargenetischen Labor des Muskellabors
Febr. 2001 – Jan. 2002	Assistenzarzt an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Universität Halle-Wittenberg (Prof. Marneros)
Febr. 2002 – Aug. 2002	Forschungsstipendium der European Neurological Society (ENS) am Dept. of Neuroscience University Newcastle upon Tyne, UK (Prof. Turnbull) zum Thema “Relationship between genotype and phenotype in patients with mitochondrial DNA point mutations“
Seit Sept. 2002	wieder an Klinik für Neurologie Universität Halle-Wittenberg (Prof. Zierz) als Funktionsoberarzt
27.11.2002	Anerkennung zum Facharzt für Neurologie, seitdem Oberarzt
Seit Aug. 2003	Leiter des drittmittelgeförderten Projekts „Molekulare Charakterisierung der autosomal vererbten chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie“ im Roux-Programm der Universität Halle-Wittenberg an der Klinik für Neurologie

## **11. Erklärung**

Ich erkläre, dass frühere Habilitationsversuche nicht stattfanden, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren im Gange ist und dass die Habilitationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Halle, 18.8.2003

Dr. med. Marcus Deschauer

## 12. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Zierz für seine großzügige Förderung und Unterstützung.

Ohne die Unterstützung durch die Mitarbeiter aus dem Muskellabor der Neurologischen Universitätsklinik Halle wäre die Arbeit nicht möglich geworden. Ich bin allen Mitarbeitern dafür sehr dankbar. Besonderer Dank gilt dabei Frau Heinz und Frau Zietz sowie Dr. Thomas Wieser und Dr. Tobias Müller, mit denen ich im molekulargenetischen Labor zusammenarbeitete.

Aber auch allen klinisch tätigen Kollegen danke ich für die Untersuchung und Identifizierung von Patienten. Dabei denke ich nicht nur an meine Kollegen in Halle, sondern auch an Ärzte aus auswärtigen Kliniken, die Proben eingeschickt haben.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. Lindner dafür, dass er mich ans wissenschaftliche Arbeiten herangeführt hat.

Den Kollegen aus dem Department of Neuroscience der University of Newcastle upon Tyne bin für die freundliche Aufnahme und Unterstützung in England sehr dankbar, insbesondere Dr. Rob Taylor und Prof. Doug Turnbull.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben. Corinna bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mir immer hilfreich zur Seite stand.