

**HETEROPLASMIE UND SEGREGATIONSMUSTER MITOCHONDRIALER  
MUTATIONEN DER LEBERSCHEN HEREDITÄREN OPTIKUSNEUROPATHIE**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Mitochondriale Genetik .....	2
1.1.1	Maternale Vererbung .....	3
1.1.2	Erhöhte Mutationsrate mitochondrialer DNA.....	3
1.1.3	Segregation mitochondrialer DNA .....	3
1.2	Pathogenetisches Prinzip mitochondrialer Erkrankungen.....	5
1.3	Klinik der LHON.....	5
1.4	Genetik der LHON .....	7
1.4.1	Primärmutationen .....	7
1.4.2	Sekundärmutationen .....	9
1.4.3	Vom Genotyp zum Phänotyp.....	9
1.5	Quantitative Mutationsanalyse .....	12
1.5.1	Verfahren zur quantitativen Heteroplasmiebestimmung bei der LHON.....	13
1.6	Aufgabenstellung.....	16
<b>2</b>	<b>PATIENTEN UND PROBANDEN.....</b>	<b>17</b>
2.1	Patienten und gesunde Anlagenträger in der Vererbungsanalyse .....	17
2.1.1	Patienten und gesunde Anlagenträger in der Langzeitbeobachtung.....	17
2.2	Homoplasmatischer Patient und gesunder Proband zwecks Assay-Validierung .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>19</b>
3.1	Verbrauchsmaterial.....	19
3.2	Chemikalien.....	19
3.3	Enzyme .....	20
3.4	Antibiotika .....	20
3.5	Längenstandards .....	20
3.6	Bakterienstämme .....	21
3.7	Plasmide .....	21
3.8	Oligonukleotide .....	21

---

3.9	Nährmedien .....	21
3.10	Medienzusätze .....	22
3.11	Puffer und Lösungen .....	22
3.12	Software .....	25
3.13	Geräte .....	25
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>26</b>
4.1	DNA-Extraktion .....	26
4.1.1	Isolierung von Gesamt-DNA .....	26
4.1.2	Isolierung von Plasmiden .....	26
4.2	Präzipitieren von DNA .....	27
4.2.1	Ethanol-Fällung .....	27
4.3	DNA-Quantifizierung .....	27
4.4	Restriktionsverdau .....	28
4.5	Gel-Extraktion von PCR-Produkten .....	28
4.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	29
4.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	29
4.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
4.9	Fluorophormarkierte Primerextensionsreaktion .....	30
4.10	Anzucht und Stammhaltung von Bakterien .....	31
4.11	Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation .....	31
4.12	Klonierung .....	32
4.13	Automatische Fragmentanalyse .....	32
4.14	Konstrukt homologer Standard-DNA .....	34
4.15	Erstellung von künstlicher Heteroplasmie und Standardkurven .....	36
4.16	Multiple Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse .....	36
4.17	Schätzung der Anzahl segregierender mtDNA-Einheiten nach der Wright-Solignac Gleichung .....	37
4.18	Bestimmung der Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen .....	38
4.19	Statistische Auswerteverfahren .....	38

---

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
5.1	Fluorophormarkierte Primerextension/RFLP-Analyse .....	40
5.1.1	Prinzip der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse .....	40
5.1.2	Relative Quantifizierung mutanter mtDNA.....	43
5.1.3	Validierung der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse .....	44
5.2	Bestimmung des Heteroplasmiegrades an Leukozyten-DNA von LHON-Patienten und gesunden Anlageträgern der G3460A Mutation.....	50
5.2.1	Variabilität und Zunahme des Heteroplasmiegrades in Folgegenerationen.....	50
5.2.2	Segregation mitochondrialer DNA in der Langzeitbeobachtung .....	52
5.2.3	Schätzung der Anzahl segregierender mtDNA-Einheiten nach Transmissionsanalyse der LHON-Familie 124 .....	57
5.3	Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen.....	58
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>59</b>
6.1	Fluorophormarkierte Primerextensionsreaktion/RFLP-Analyse .....	59
6.2	Untersuchungen der Heteroplasmie der G3460A LHON Mutation.....	61
6.3	Variabilität und Zunahme des Heteroplasmiegrades in Folgegenerationen.....	61
6.4	Konstanz und Abnahme des Heteroplasmiegrades in der Langzeitbeobachtung.....	64
6.5	Zusammenfassung der Untersuchungen der Heteroplasmie der G3460A LHON Mutation .....	69
6.6	Unterschied in der Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen.....	69
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>88</b>

---

## 1 Einleitung

Fortschritte in der molekularen Biologie und Genetik der letzten zwei Jahrzehnte haben einen grundlegenden Wandel in der klinischen Medizin eingeleitet, der im Begriff ist, das zukünftige Krankheitsverständnis von der klinisch-deskriptiven Betrachtungsweise auf eine molekulare Grundlage zu stellen. An neue Erkenntnisse über krankheitsspezifische Genotypen, ihre Expressionsmuster bis hin zu Gen-Umwelt-Interaktionen werden in Zukunft hohe Erwartungen einer besseren Prävention, Diagnostik und Therapie genetisch bedingter Erkrankungen geknüpft. Die molekulargenetische Erforschung monogener Augenerkrankungen hat wesentlich zu dieser Entwicklung und zur Aufklärung wichtiger molekularer Pathomechanismen beigetragen, was nicht zuletzt in der besonderen Bedeutung des Sehsystems für den Menschen und dem relativ leichten Nachweis seiner Funktionsstörungen begründet ist. Neben den chromosomal vererbten Erkrankungen kommt den über die mitochondriale DNA vererbten Krankheiten, wie der Leberschen hereditären Optikusneuropathie (LHON, MIM 535000) und dem Kearns-Sayre Syndrom (MIM 530000) in der molekularen Ophthalmogenetik eine besondere, wegweisende Rolle zu. Im Gegensatz zum Kerngenom ist die komplette mitochondriale Genomsequenz des Menschen bereits seit 1981 bekannt (Anderson *et al.*, 1981). Mit der Entschlüsselung des „24. Chromosoms“ des Menschen eröffneten sich rasch neue Forschungsgebiete in der Molekularbiologie und Genetik wie sie heute, wenn auch von unvergleichbar größerer Dimension, von der Entschlüsselung des Kerngenoms erwartet werden. Die „post-genomische Phase“ der „mitochondrialen Genomik“ konnte so gewissermaßen bereits vor 20 Jahren eingeläutet werden. Geprägt war sie vor allem durch die Etablierung und zunehmende Ausweitung der „mitochondrialen Medizin“ als eine neue Spezialdisziplin. Seit der Erstbeschreibung einer „mitochondrialen Erkrankung“ 1962 durch Luft sind heute mehr als 70 Mutationen des mitochondrialen Genoms (mtGenom) bekannt, die mit verschiedensten Erkrankungen ursächlich in Zusammenhang gebracht werden. Erkenntnisse der pathobiologischen Grundlagenforschung der letzten Jahre lassen zudem eine unerwartet bedeutende Rolle des mitochondrialen Systems in der Krebsentstehung und im zellulären Alterungsprozess vermuten (Wallace *et al.*, 1999).

Die LHON war die erste Erkrankung, für die 1988 eine Punktmutation im mtGenom als Krankheitsursache erkannt wurde (Wallace *et al.*, 1988). Keine andere molekulargenetisch

als Entität definierte Augenerkrankung war so häufig Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen wie die LHON. Neben der Bemühung um ein besseres Krankheitsverständnis und der Aussicht auf eine effektive Behandlungsmöglichkeit besteht das wissenschaftliche Interesse an mitochondrialen Erkrankungen wie der LHON insbesondere darin, grundlegende Mechanismen der mitochondrialen Genetik, Physiologie und Biochemie des Menschen zu erforschen. Trotz ihrer geradezu paradigmatischen Bedeutung in der mitochondrialen Forschung sind einige wichtige klinische Fragen der LHON heute noch weitgehend ungeklärt. So ist z. B. die Rolle von Umweltfaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum oder epigenetischer Faktoren ebenso unklar, wie die Ursache der unvollständigen Penetranz und des überwiegenden Auftretens der Erkrankung bei Männern. Es wird wahrscheinlich den mittelbaren und unmittelbaren Fortschritten aus Erkenntnissen der Kerngenomforschung vorbehalten sein, diese wichtigen klinischen Fragen zum Krankheitsbild der LHON in Zukunft zu beantworten.

## **1.1 Mitochondriale Genetik**

Mitochondrien sind Zellorganellen, deren Hauptfunktion in der Energiebereitstellung der Zelle in Form von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung besteht. Neben dem Aminosäure- und Fettstoffwechsel spielen die Mitochondrien weiter eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose (Kroemer *et al.*, 1998). Jede Zelle besitzt je nach Energiebedarf circa 100-1000 Mitochondrien. Entstanden sind diese Zellorganellen vermutlich aus einer Symbiose früher Eukaryonten mit sauerstoffproduzierenden Bakterien vor 1.5-2 Billionen Jahren, woran die typische Doppelmembran, die eigenständige Erbsubstanz und der Proteinsyntheseapparat der Mitochondrien erinnern. Jedes Mitochondrium enthält zwischen 2 und 10 Kopien des mtGenoms. Bestehend aus einem ringförmig geschlossenen, superhelikalen, doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Gesamtlänge von 16569Bp, ist es äußerst kompakt aufgebaut, d.h. nahezu nur aus kodierenden Abschnitten bestehend. Es kodiert 22 mitochondriale tRNAs und zwei rRNAs, die die Mitochondrien in die Lage versetzen, die Produkte der restlichen 13 Gene, sämtlich Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und VII, selber zu synthetisieren (Abb. 1.2). Normalerweise ist der mitochondriale Genotyp (mtGenotyp), d.h. die Gesamtheit aller mtGenome eines Organismus identisch (Homo-

plasmie). Unterscheiden sich nur zwei mtGenome an nur einer Basenposition, so liegt ein gemischter mtGenotyp (Heteroplasmie) vor, unabhängig davon, ob sich dieser Zustand auf ein Mitochondrium, eine Zelle oder einen gesamten Organismus bezieht.

Die Vererbung der mtGenome weist aufgrund ihrer hohen Kopienzahl und ihrer zytoplasmatischen Lage einige Besonderheiten auf.

### **1.1.1 Maternale Vererbung**

Die Vererbung der mtGenome erfolgt ausschließlich von der Mutter auf ihre Nachkommen. Grund hierfür ist der etwa tausendfache Überschuss an Mitochondrien und Molekülen mitochondrialer DNA (mtDNA) der reifen Eizelle gegenüber der Spermienzelle, die wenige Hundert Mitochondrien besitzt. Über welchen Mechanismus die wenigen väterlichen mtGenome verloren gehen, ist bislang unklar. Grundsätzlich kommt der paternalen Vererbung jedoch in der Mitochondriengenetik des Menschen keine Rolle zu, was wiederholt in Studien zur Vererbung von mtDNA-Polymorphismen und Mutationen gezeigt werden konnte. (Giles *et al.*, 1980 ; Wallace *et al.*, 1988).

### **1.1.2 Erhöhte Mutationsrate mitochondrialer DNA**

Der kompakte Aufbau, das ineffiziente DNA-Reparatursystem, die häufigen Replikationszyklen und der hohe Fluss von Sauerstoffradikalen entlang der benachbarten Atmungskette machen das mtGenom besonders anfällig für Mutationen, deren Entstehungsrate 10-20 mal höher ist als im Kerngenom (Merriwether *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 1987). Die Auswirkungen einer Mutation auf die Mitochondrienfunktion hängen von der Mutationsart, dem Grad der phylogenetischen Konservierung des betroffenen Gens und davon, ob es sich um ein RNA- oder proteinkodierendes Gen handelt, ab.

### **1.1.3 Segregation mitochondrialer DNA**

Die mitochondriale Genetik weist in ihren Grundzügen viele Parallelen zur Populationsgenetik auf (Birky *et al.*, 1983). Betrachtet man die Gesamtheit der mtDNA-Moleküle einer Zelle oder eines Organismus als eine Art „Bakterienkultur“, so wird verständlich,

dass Mechanismen des genetischen Drifts und der natürlichen Selektion auch auf den mtGenotyp prinzipiell einen Einfluss nehmen können. Tatsächlich scheinen Replikation und Degradation von mtDNA-Molekülen im Rahmen des natürlichen *turn-overs* (*relaxed replication*) ebenso wie die Replikation und Aufteilung der mtDNA-Moleküle im Rahmen der Zellteilung (mitotische Segregation, *random segregation*) quasi zufällig stattzufinden, d.h. nicht getreu eines jeden mtDNA-Moleküls. Beide Phänomene sind experimentell schwer voneinander zu trennen, so dass unter dem Begriff *replicative segregation* üblicherweise beide impliziert werden. Durch *replicative segregation*, im Folgenden einfach als Segregation bezeichnet, erklärt sich, wie mtDNA-Mutationen, die stets als spontane Einzelereignisse in einer Population von mtGenomen auftreten, sich durch klonale Expansion in einem Zellverband oder Organismus etablieren können. Die mitochondriale Vererbung gehorcht somit in ihrem grundlegenden Prinzip einer Binominalverteilung, wobei Heteroplasmie einen Intermediärzustand darstellt, der mit zunehmender Anzahl der Zellteilungen zunächst zu einer Varianzzunahme der mtDNA-Allelhäufigkeit führt und schließlich in homoplasmatische Zellpopulationen übergeht (Vilkki *et al.*, 1990; Bolhuis *et al.*, 1990). Bei heteroplasmatischen Individuen wird die Segregation in der Embryonalphase dafür verantwortlich gemacht, dass es in verschiedenen Geweben zu unterschiedlicher quantitativer Zusammensetzung von mtDNA-Allelen, beispielsweise einem Wildtyp- und mutantern mtDNA-Allel kommen kann („somatisches Mosaik“). Die extrem rasche Segregation, bei der es zu einem vollständigen Wechsel zweier nahezu homoplasmatischer mtGenotypen entlang der maternalen Linie in wenigen oder nur einer Generation kommt, wird dem so genannten *bottleneck*-Phänomen zugeschrieben (Wright, 1969; Hauswirth & Laipis, 1985; Koehler *et al.*, 1991). Durch drastische Reduktion der mtDNA-Molekülzahl auf wenige Hundert während der embryonalen Entwicklung primordialer Keimzellen, Segregation und klonale Expansion entstehen aus einer heteroplasmatischen primordialen Keimzelle reife Eizellen mit ganz unterschiedlichen Ausprägungen des Heteroplasmiegrades, d.h. relativem Anteil der mutanten mtDNA an der Gesamt-mtDNA. Im extremen Fall kann ein mtDNA-Allel, das im heteroplasmatischen Mutterorganismus in geringer Kopienzahl vorhanden ist, in der Zygote in homoplasmatischer Form vorliegen.

Während das Zufallssprinzip oder so genannte *random drift*-Modell im Allgemeinen für die „Dynamik“ des mtGenotyps verantwortlich gemacht wird, ist die Rolle selektiver

Mechanismen weniger eindeutig. Aufgrund der Ergebnisse klinischer Untersuchungen und von in vitro-Untersuchungen gibt es Hinweise, dass unter gewissen Bedingungen auch selektive Mechanismen den genetischen Drift des mtGenotyps beeinflussen können (Yoneda *et al.*, 1992; Attardi *et al.*, 1995).

## **1.2 Pathogenetisches Prinzip mitochondrialer Erkrankungen**

Unter dem Begriff der mitochondrialen Erkrankung wird im allgemeinen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, denen ein Defekt im oxidativen Stoffwechsel, insbesondere der Atmungskettenenzyme gemein ist. Die Störung im Energiestoffwechsel kann genetisch bedingt, d.h. durch chromosomale oder mtDNA-Mutationen, oder durch Einwirken von Umweltgiften oder Pharmaka ausgelöst sein. Grundlegend im pathogenetischen Konzept der durch mtDNA-Mutationen verursachten, d.h. mitochondrial vererbten Erkrankungen ist, dass das phänotypische Erscheinungsbild von der Schwere der Mutation, dem relativen Anteil mutanter mtDNA-Genome und dem spezifischen ATP-Bedarf des betroffenen Gewebes oder Organs abhängt. Ein typisches Kennzeichen der mitochondrialen Erkrankungen ist der Schwellenwerteffekt (*threshold expression*), dem zu Folge ein bestimmter prozentualer Anteil mutanter mtGenome in einem Gewebe überschritten sein muss, bevor es zu einer pathologischen Funktionsstörung kommt. Dieser Wert liegt für die besonders deletären, den Translationsapparat betreffenden mtDNA-Mutationen bei circa 85% (Shoffner *et al.*, 1990; Moraes *et al.*, 1989; Chomyn *et al.*, 1992), was gleichermaßen bedeutet, dass circa 15% normaltypische mtGenome für eine Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels ausreichend sind.

## **1.3 Klinik der LHON**

Die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (LHON) ist eine relativ seltene degenerative Erkrankung retinaler Ganglienzellen, die für 0.42-2% aller Erblindungen verantwortlich gemacht wird (Mackey & Buttery, 1992). Unter den erblichen Augenerkrankungen zählt sie mit einer Prävalenz von 3.3/100000 Einwohnern jedoch vermutlich zu den häufigsten Erkrankungen (Chinnery *et al.*, 2000a).

---

Klinisch ist das Krankheitsbild, das erstmals detailliert durch Theodor Leber 1871 beschrieben wurde, gekennzeichnet durch einen akuten bis subakuten, schweren Sehverlust, der meist ohne weitere Symptome nacheinander beide Augen befällt. Weitere Leitsymptome sind ein absolutes Zentral- bis Zökozentralskotom, eine Rot-Grüschwäche sowie ein erhaltener Pupillarreflex (Nikoskelainen *et al.*, 1996; Newman, 1993; Wakakura & Yokoe, 1995), wobei letzteres nicht unumstritten ist (Lüdtke *et al.*, 1999). Charakteristisch ist die geringfügige Papillenschwellung mit peripapillärer Mikroangiopathie im Akutstadium (Abb. 1.1), die im weiteren Krankheitsverlauf in eine Optikusatrophie übergeht. Die Erkrankung, die grundsätzlich in jedem Lebensalter auftreten kann, weist einen Häufigkeitsgipfel in der zweiten bis dritten Lebensdekade auf. Sie zeigt ein gehäuftes Auftreten bei Männern mit einem Geschlechterverhältnis von etwa 5:1 (Tab. 1.1). Eine weitere Besonderheit der LHON ist die spontane Visusbesserung in einzelnen Fällen. Sie kann typischerweise noch Monate bis Jahre nach dem Sehverlust eintreten (Stone *et al.*, 1992) und ist dann meist permanent. Nicht-okuläre Symptome, wie Herzrhythmusstörungen oder peripher-sensorische Störungen, Ataxie und andere leichte neurologische Störungen scheinen im Zusammenhang mit der LHON gehäuft aufzutreten (Newman *et al.*, 1991; Nikoskelainen *et al.*, 1995; Riordan-Eva *et al.*, 1995), wenn auch ihre klinische Zuordnung zum Krankheitsspektrum der LHON nicht eindeutig geklärt ist (Howell *et al.*, 1995; Nikoskelainen *et al.*, 1995).

Dagegen sind vereinzelte LHON-Fälle, die mit schweren neurologischen Störungen einhergehen, vermutlich durch seltene mtDNA-Mutationen verursacht (Novotny *et al.* 1986; Howell *et al.*, 1991a).



Abb. 1.1. LHON im akuten Stadium mit diskreter Papillenschwellung und peripapillär dilatierten Gefäßen als Ausdruck einer Mikroangiopathie.

## 1.4 Genetik der LHON

Es war bereits Leber in seinen Studien aufgefallen, dass das Erkrankungsrisiko in LHON-Familien ausschließlich von der Mutter auf ihre Nachkommen vererbt wird. Erst die Entdeckung der mtDNA 1963 durch Nass & Nass, die Aufklärung der Prinzipien maternaler Vererbung und die vollständige Sequenzierung der mtDNA Ende der 70er bzw. Anfang der 80er Jahre jedoch ließen eine Rolle der mtDNA in der Pathogenese der LHON vermuten.

### 1.4.1 Primärmutationen

Der Nachweis der ersten LHON-Mutation, der Guanin? Adenin Transition an Position 11778 des mtGenoms durch Wallace und Mitarbeiter 1988 markierte einen weiteren Wendepunkt in der Mitochondrienforschung. Bis heute sind 18 *missense*-Mutationen der mtDNA beschrieben, die entweder isoliert oder im Zusammentreffen Auslöser der LHON sein können (<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>; Howell *et al.*, 1998a; Jun *et al.*, 1994; Wissinger *et al.*, 1997; Besch *et al.*, 2000). Viele der Mutationen wurden nur in einzelnen Fällen in Zusammenhang mit dem typischen LHON-Bild beobachtet. Allen gemein ist ein Aminosäureaustausch in einer mehr oder weniger gut konservierten Eiweißuntereinheit eines Atmungskettenkomplexes. Mehr als 95% der LHON-Fälle

werden jedoch auf eine von drei mtDNA-Mutationen, den so genannten kanonischen Mutationen oder Primärmutationen an Position 3460, 11778 und 14484 des mtGenoms zurückgeführt. Weltweit die häufigste mtDNA-Mutation ist die G11778A Transition (50-70%), während die G3460A und T14484C Mutationen etwa je 15% ausmachen. Alle drei Primärmutationen betreffen Gene, die verschiedene Untereinheiten des Komplexes I kodieren (Abb. 1.2).

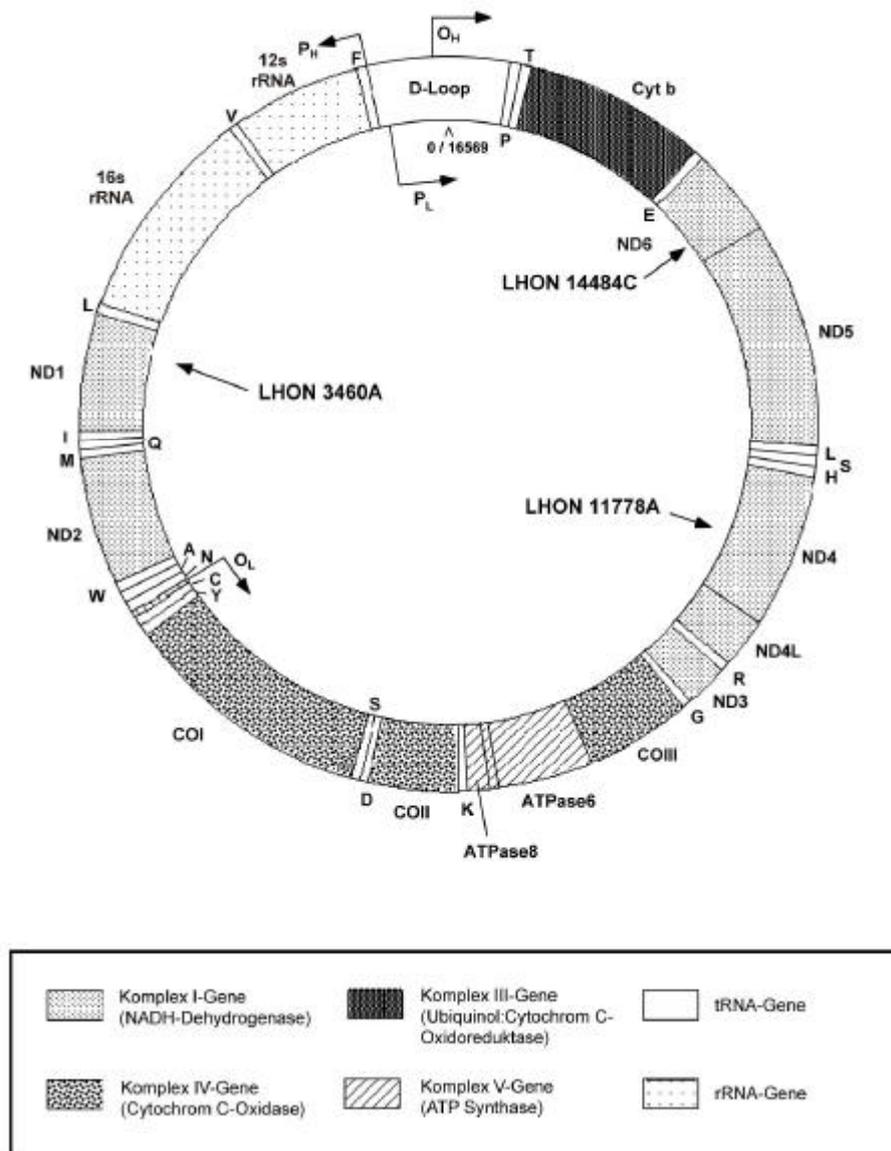


Abb. 1.2 Schemazeichnung des mtGenoms mit Genorten der drei primären LHON-Mutationen. Typisch ist der kompakte, intronlose Aufbau mit tRNA-Genen (1-Buchstaben-Aminosäurencode), die zerstreut zwischen proteinkodierenden Genen liegen.

### 1.4.2 Sekundärmutationen

Neben den drei Primärmutationen, deren pathogene Bedeutung für die LHON gesichert ist, werden eine Reihe weiterer mtDNA-Basenaustausche im Zusammenhang mit LHON gefunden. Da sie auch in einem geringen Prozentsatz in Kontrollpopulationen vorliegen und zu keinem Austausch konservierter Aminosäuren führen, werden sie als so genannte Sekundärmutationen bezeichnet (Johns & Berman, 1991). Eine Ausnahme stellt die G15257A Transition des Cytochrom B-Gens dar, die von einigen Autoren den Primärmutationen zugerechnet wird (Wallace, 1995; Johns, 1995), während andere das isolierte Auftreten der G15257A Mutation bei LHON-Patienten nicht bestätigen konnten (Mackey *et al.*, 1996; Oostra *et al.*, 1994b). Das gemeinsame Auftreten der Sekundärmutationen T4216C, G13708A und teilweise auch G15257A findet sich in einer phylogenetisch alten, kaukasoid-spezifischen mtDNA-Stammlinie, der Haplogruppe J, die bei etwa 9% der europäischen Bevölkerung vorliegt. Die besondere Bedeutung der Haplogruppe J besteht darin, dass 80% der LHON-Fälle mit der Primärmutation T14484C und 37% mit der G11778A Mutation vor dem Hintergrund dieser mtDNA-Stammlinie gefunden werden (Brown *et al.*, 1997).

### 1.4.3 Vom Genotyp zum Phänotyp

Obwohl die genetischen und klinischen Grundlagen der LHON in vielfachen Studien eingehend untersucht wurden, ist das Verständnis ihrer Pathophysiologie heute noch sehr lückenhaft. Zwei wesentliche Gründe dafür sind, dass die betroffene retinale Ganglienzellschicht keiner direkten molekulargenetischen oder biochemischen Untersuchung zugänglich ist und bislang kein natürliches oder experimentelles Tiermodell der LHON existiert. Daher stützen sich heutige Vorstellungen der LHON-Pathogenese vorwiegend auf die Ergebnisse klinisch-genetischer Studien und von *in vitro*-Untersuchungen, bei denen meist die aus Blutproben gewonnene DNA der Leukozytenfraktion als Untersuchungsmaterial dient. Da jedoch zwischen dem untersuchten und dem funktionsgestörten Gewebe erhebliche Unterschiede im zellulären Energiemetabolismus sowie in der quantitativen Zusammensetzung von normaltypischem und mutantern mtDNA-Allel bestehen können (Lott *et al.* 1990; Yen *et al.*, 1992; Howell *et al.*, 1994; Mazat *et al.*, 2001), sind Schlussfolgerungen aufgrund solcher Untersuchungen immer indirekter Art und nicht unkritisch zu beurteilen.

In der heterogenen Gruppe mitochondrialer Erkrankungen nimmt die LHON eine Sonderstellung ein, weil sie ausschließlich auf Punktmutationen proteinkodierender Gene beruht, und Merkmals- sowie Anlagenträger meist einen homoplasmatischen mtGenotyp aufweisen. Konkrete Angaben zur Häufigkeit der Heteroplasmie bei LHON liegen nur für die G11778A Mutation vor. Danach wird Heteroplasmie bei 7% der LHON-Patienten (Smith *et al.*, 1993) und 14% der untersuchten LHON-Stammbäume gefunden (Newman *et al.*, 1991; Nikoskelainen *et al.*, 1996). Die geringe Häufigkeit heteroplasmatischer LHON-Stammbäume deutet auf eine rasche Segregation der mutanten mtGenome in einen homoplasmatischen Zustand (Bolhuis *et al.*, 1990) bzw. ein wenige Generationen zurückliegendes Mutationsereignis hin (Lott *et al.*, 1990). Quantitative Bestimmungen des relativen Anteils mutanter mtDNA bei heteroplasmatischen LHON-Patienten haben einen Schwellenwerteffekt bei 75-80% mutanter mtGenome postulieren lassen (Smith *et al.*, 1993; Harding *et al.* 1995). Das Überschreiten dieses Schwellenwertes ist für die LHON-Entstehung vermutlich ebenso erforderlich wie für andere mitochondrial vererbte Erkrankungen, aber im Gegensatz zu diesen alleine nicht hinreichend. Darauf deutet die geringe Penetranz der LHON von 30-50% bei männlichen und 5-15% bei weiblichen Anlagenträgern bei gleichzeitig vorwiegend homoplasmatisch mutantem mtGenotyp hin (Mackay, 1994; Nikoskelainen *et al.*, 1987).

Die häufige Beobachtung der Homoplasmie bei LHON-Patienten und gesunden Anlagenträgern lässt auf eine im Vergleich zu anderen mtDNA-Mutationen geringe Pathogenität der LHON-Mutationen schließen. Alle drei primären LHON-Mutationen betreffen hydrophobe, membranständige Untereinheiten des Atmungskettenenzymkomplexes I, von denen nur für die NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 1 (ND1) die mutmaßliche Funktion als terminaler Bindungspartner zur Quinonreduktion bekannt ist (Robinson, 1998; Singer & Ramsay, 1994). In biochemischen Untersuchungen an isolierten Mitochondrien (Larsson *et al.*, 1991), Lymphozyten (Majander *et al.*, 1991), Thrombozyten (Smith *et al.*, 1994; Carelli *et al.*, 1999) und durch Fusion von Thrombozyten mit mtDNA-losen Zellen generierten „transmitochondrialen“ Zelllinien (Vergani *et al.*, 1995) konnten zwar Atmungskettendefekte und eine verminderte Komplex I-Aktivität für die drei Primärmutationen der LHON nachgewiesen werden. Aufgrund der erheblich variablen und teilweise widersprüchlichen Ergebnisse haben sich biochemische Analysen in der Klärung der LHON-Pathogenese jedoch als wenig aufschlussreich erwiesen. Zudem scheinen Ergeb-

nisse biochemischer Untersuchungen schlecht mit Ergebnissen von in vivo-Funktionsstudien und klinischen Befunden zu korrelieren. So etwa wurde von Brown und Mitarbeitern (2000) eine Verminderung der Atmungskettenfunktion und Komplex I-Aktivität in der Reihenfolge der T14484C, G11778A und G3460A Mutation gefunden, während Untersuchungen der <sup>31</sup>P-Magnetresonanztomographie die stärkste Störung im Energiemetabolismus bei Patienten mit der G11778A Mutation zeigten (Lodi *et al.*, 1997). Den mildesten Krankheitsverlauf und die höchste spontane Remissionsrate zeigt die LHON typischerweise bei Patienten mit der T14484C Mutation, gefolgt von der G3460A und der G11778A (Tab. 1.1; Johns *et al.*, 1993).

Weiter erschwert wird das Krankheitsverständnis der LHON durch zusätzliche Faktoren, die scheinbar genotypspezifisch den Krankheitsverlauf beeinflussen, wie die überzufällig häufige Assoziation der Haplogruppe J mit der T14484C und G11778A Mutation im Gegensatz zum haplogruppenunabhängigen Auftreten der G3460A Mutation (Johns *et al.*, 1992) oder der krankheitsfördernde Effekt von Nikotin- und Alkoholabusus bei Trägern der G3460A oder T14484C Mutation im Gegensatz zur G11778A (Chalmers & Schapira, 1999).

Neben diesen vielen unstimmgigen Untersuchungsergebnissen sind es im Besonderen drei typische klinisch-genetische Kennzeichen der LHON, die geringe Penetranz, die hohe Männerlastigkeit und das plötzliche Auftreten der Erkrankung im jungen Erwachsenenalter, die das Krankheitsbild weiterhin rätselhaft erscheinen lassen. Zusammen deuten die Befunde auf ein komplexes Krankheitsgeschehen der LHON, das neben spezifischen mtDNA-Mutationen durch weitere genetische und gewebespezifische Faktoren sowie Umweltfaktoren maßgebend bestimmt wird.

Primäre LHON-Mutation	Erkrankungsrisiko (Nikoskelainen <i>et al.</i> , 1994; Macmillan <i>et al.</i> , 1998)		Erkrankungsalter in Jahren (Median) (Harding <i>et al.</i> , 1995)	Geschlechterverhältnis Männer:Frauen (Harding <i>et al.</i> , 1995)	spontane Remissionsrate (Johns <i>et al.</i> , 1993)
	Männer	Frauen			
G11778A	39%	14%	24	3.7:1	5%
G3460A	32%	15%	20	7.7:1	22%
T14484C	32%	15%	20	4.3:1	37%

Tab. 1.1. Risikoprofil der LHON bei verschiedenen primären Mutationen.

## 1.5 Quantitative Mutationsanalyse

Hochsensitive, präzise und schnell durchführbare Methoden der DNA-Analyse spielen in der molekularen Diagnostik und Wissenschaft eine zunehmend bedeutende Rolle. Während für den Nachweis unbekannter Genmutationen die direkte DNA-Sequenzierung der Goldstandard ist, existieren eine Reihe von Verfahren, die zum Screening und zur quantitativen Analyse von Mutationen eingesetzt werden. Viele Verfahren der quantitativen Mutationsanalyse wurden zur Diagnostik onkologischer und infektiöser Erkrankungen entwickelt. So etwa kann die quantitative Bestimmung mutanter Onkogene oder virusspezifischer DNA-Sequenzen in einem Gewebe einen wertvollen Parameter zur Verlaufskontrolle der Erkrankung liefern (Simmonds *et al.*, 1990; Roux *et al.*, 1992). Eine besondere Bedeutung haben quantitative Methoden der Mutationsanalyse in der mitochondrialen Genetik erlangt. Bei mitochondrialen Erkrankungen, die auf mtDNA-Mutationen beruhen, liegen diese zumeist in heteroplasmatischer Form mit dem Wildtyp-mtDNA-Allel vor, wobei Schweregrad und Erkrankungsrisiko häufig mit dem Anteil mutanter mtDNA im betroffenen Gewebe korrelieren (Larsson ? Clayton, 1995). In genealogischen Studien und in vitro-Untersuchungen werden quantitative Mutationsanalysen verwendet, um anhand der Veränderungen des Heteroplasmiegrades in Generationenfolgen und Zellpassagen Einblicke in Mechanismen mitochondrialer Vererbung zu gewinnen (Lehtinen *et al.*, 2000).

### **1.5.1 Verfahren zur quantitativen Heteroplasmiebestimmung bei der LHON**

Ziel der Heteroplasmieanalyse bei der LHON ist die relative Quantifizierung des mutanten mtDNA-Allels, d.h. eine Bestimmung des prozentualen Anteils mutanter mtDNA-Allele an der Gesamtheit der mtDNA einer Probe. Hierzu wurden eine Anzahl von Verfahren beschrieben, die sich in ihrer Schnelligkeit, Handhabbarkeit, Messgenauigkeit und Sensitivität unterscheiden. Da Analyseverfahren, die zum Nachweis anderer, nicht LHON-spezifischer mitochondrialer Punktmutationen entwickelt wurden, prinzipiell auch in der LHON-Diagnostik anwendbar sind, seien diese im folgenden mitaufgeführt. Sie umfassen verschiedene Varianten der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse (Holt *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1993; Howell *et al.*, 1990; Pallotti *et al.*, 1996) und der Alleldiskriminierung mittels basenspezifischer Kettenabbruchreaktion nach dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung (Juvonen *et al.*, 1994; Fahy *et al.*, 1997), die Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (Tanno *et al.*, 1995; Mashima *et al.*, 1995), die allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden (Norby, 1991; Huoponen *et al.*, 1994; Fauser & Wissinger, 1997) und den einfachen Amplitudenvergleich im Sequenzchromatogramm (Olsson *et al.*, 1998). Trotz grundsätzlicher Unterschiede in Detektionsprinzip und -technologie arbeiten alle genannten Verfahren mit Ausnahme der Southern-Blot-Analyse (Holt *et al.*, 1989) auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), d.h. auf der Grundlage einer kompetitiven Amplifikation von Wildtyp- und mutantern mtDNA-Allel aus Gesamt-DNA als initialen Analyseschritt.

Allgemeine Einschränkungen vieler der genannten Verfahren sind, dass sie technisch schwierig, zeitaufwendig, kostenintensiv sind und einer sorgfältigen Anpassung an optimale Reaktionsbedingungen bedürfen. Verfahren, bei denen Wildtyp- und mutantes Allel in getrennten Probenansätzen analysiert werden, haften die Fehlermöglichkeit durch probenabhängige Schwankungen der Reaktionseffizienz an.

#### **1.5.1.1 PCR/RFLP-Analyse zur quantitativen Heteroplasmiebestimmung bei der LHON**

Verfahren, die wie die PCR/RFLP-Analyse auf allelspezifischem Restriktionsverdau beruhen, kommen in der quantitativen Mutationsanalyse verbreitet zur Anwendung. Ihr

Vorteil ist, dass ihre grundlegenden Methoden, die PCR und RFLP-Analyse zu molekularbiologischen Standardverfahren gehören und daher weite Bekanntheit besitzen. Prinzip der PCR/RFLP-Analyse ist die Differenzierung zweier Allele einer DNA-Mischung aufgrund einer allelspezifischen Verdaureaktion mit einer Restriktionsendonuklease. Die PCR-Amplifikate der Ziel-DNA werden einem Restriktionsverdau mit einem Enzym unterzogen, das spezifisch entweder die PCR-Amplifikate des Wildtyp- oder des mutanten Allels in zwei Fragmente spaltet. Die Quantifizierung der allelspezifischen Fragmente erfolgt üblicherweise nach gelelektrophoretischer Auftrennung entweder mit Hilfe der Laserdensitometrie nach einfacher Ethidiumbromidfärbung (Yoneda *et al.*, 1992) oder quantitativer Autoradiographie (Zhu *et al.*, 1992). In der quantitativen Mutationsanalyse weist die PCR/RFLP-Analyse jedoch drei methodische Nachteile und mögliche Fehlerquellen auf:

1. die Notwendigkeit des Vorliegens natürlicher allelspezifischer Restriktionsschnittstellen,
2. die Heterodimerbildung aus wildtyp- und mutationsspezifischer Einzelstrang-DNA im Rahmen der PCR.
3. die Variabilität der Effizienz des Restriktionsverdau.

Während bei Fehlen einer natürlichen allelspezifischen Restriktionsschnittstelle diese durch Verwendung eines so genannten Fehlpaarungsprimers in der PCR generiert werden kann, lässt sich der Einfluss von Heterodimerbildung und Schwankungen der Verdaueffizienz weniger mühelos kontrollieren.

Heterodimere sind PCR-Amplifikate, die an der Position der Punktmutation eine Fehlpaarung aufweisen. Sie entstehen durch Aneinanderlagerung synthetisierter Einzelstrang-DNA des Wildtyp- und mutanten Allels während der Renaturierungsphase der PCR. Die Heterodimerbildung kommt v.a. in der Plateauphase der PCR bei sinkender Reaktions-effizienz und maximal erreichter Produktkonzentration zum Tragen. Da Restriktionsendonukleasen nur doppelsträngige DNA-Moleküle mit absoluter Basenkomplementarität der Erkennungssequenz spalten, bleiben Heterodimere im Restriktionsverdau der PCR/RFLP-Analyse unbeeinflusst. Sie werden in der Gelelektrophorese nicht vom Anteil des enzymatisch nicht spaltbaren Allels getrennt, so dass ihre Formation stets eine Überschätzung

dieses Allelanteils zur Folge hat. Im Idealfall kommt es dabei zu einer Binomialverteilung von Homo- und Heterodimerprodukten (Abb. 1.3).

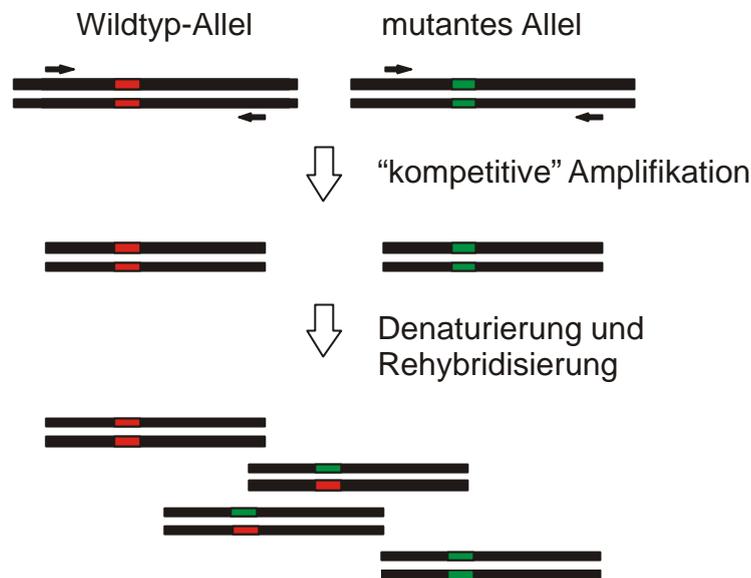


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Heterodimerbildung in der Plateauphase der PCR bei heterogener Ausgangs-DNA. Durch Denaturierung und Rehybridisierung der PCR-Produkte kommt es idealerweise zu einer Binomialverteilung von Homo- und Heterodimerprodukten. 25 % der entstandenen PCR-Produkte sind mit einer für das Wildtyp- oder mutante Allel spezifischen Restriktionsendonuklease spaltbar, 75% sind nicht spaltbar.

Um diesen systematischen Messfehler in der quantitativen Mutationsanalyse zu berücksichtigen, wird allgemein eine von zwei Korrekturmaßnahmen vorgeschlagen. Die eine sieht die Messwertkorrektur anhand von zwei Standardkurven vor, die aus Analysen von Gesamt-DNA (*mixed template*) und PCR-Amplifikaten (*mixed product*) definierten Mischungsverhältnisses von mutantern und Wildtyp-Allel ermittelt werden (Yoneda *et al.*, 1992). Bei der zweiten Korrekturmaßnahme, der so genannten *last hot cycle PCR* wird vor dem letzten PCR-Zyklus ein radioaktiv markierter Primer dem Reaktionsansatz hinzugefügt (Tanno *et al.*, 1991). Aufgrund des einmaligen DNA-Syntheseschrittes liegen die radioaktiv markierten PCR-Amplifikate als Homodimere vor.

Geringfügige Schwankungen der Reaktionseffizienz sind ein inhärentes Problem eines Restriktionsverdau wie jeder enzymatischen Reaktion und erfordern in der quantitativen Mutationsanalyse üblicherweise eine Endpunktkontrolle mit einer adäquaten Standard-DNA (Fuchs ? Blakesley, 1983).

## 1.6 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung der Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte:

1. Entwicklung und Etablierung eines validen und praktikablen Detektionsassays zur Bestimmung des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation. Das Detektionsassay soll auf dem Prinzip der PCR/RFLP-Analyse aufbauen, aber Modifikationen enthalten, die Fehlermöglichkeiten durch Heterodimerbildung und unvollständigen Restriktionsverdau korrigieren.
2. Untersuchung des Vererbungs- und Segregationsmusters der G3460A Mutationen an LHON-Familien aus dem Patientenkollektiv der Tübinger Universitäts-Augenklinik mit Hilfe des entwickelten Detektionsassays. Durch Bestimmung des Heteroplasmiegrades an Leukozyten-mtDNA von Angehörigen verschiedener Generationen sollen die Fragestellungen untersucht werden, ob ein genetischer Drift, d.h. einer Änderung der mutanten mtDNA-Allelhäufigkeit in der vertikalen Transmission der LHON-Mutation zu beobachten ist, und ob zufällige und/oder selektive Mechanismen wirksam sind. Die gleichen Mechanismen sollen in bezug auf die Segregation untersucht werden, indem an einzelnen Patienten und Anlageträgern der Heteroplasmiegrad über einen längeren Zeitraum bestimmt wird.
3. Bestimmung der Heteroplasmieprävalenz in LHON-Familien des Tübinger Patientenkollektivs. Es soll an LHON-Familien, die im Rahmen der klinischen Diagnostik molekulargenetisch analysiert wurden und eine der drei Primärmutationen aufweisen, die Heteroplasmieprävalenz als Hinweis auf mögliche genotypspezifische Unterschiede ermittelt werden.

## **2 Patienten und Probanden**

### **2.1 Patienten und gesunde Anlagenträger in der Vererbungsanalyse**

Untersucht wurden 10 LHON-Patienten und 13 gesunde Anlagenträger von vier Familien. Alle Patienten wurden aus dem Kollektiv von LHON-Familien, die im molekulargenetischen Labor der Universitäts-Augenklinik Tübingen registriert sind, ausgewählt. Auswahlkriterium war das Vorliegen von Heteroplasmie der G3460A Mutation bei mindestens einem Mitglied einer Familie. Heteroplasmie wurde mit Hilfe konventioneller PCR/RFLP-Analyse und Auftrennung der DNA-Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese im Rahmen der routinemäßigen molekulargenetischen LHON-Diagnostik festgestellt. Die Patienten wurden über die Ziele, die wissenschaftliche Bedeutung sowie über die Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen ausführlich informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

#### **2.1.1 Patienten und gesunde Anlagenträger in der Langzeitbeobachtung**

An einer Familie (LHON-Familie 124), bestehend aus der Mutter, ihren drei Söhnen und einer Tochter, wurde die Heteroplasmie über einen Zeitraum von 5½ Jahren beobachtet.

Bei zwei Söhnen war Mitte der 80er Jahre die LHON aufgetreten, während die anderen Familienmitglieder zu keinem Zeitpunkt erkrankt waren. Einer der beiden betroffenen Söhne (124-II:2) hatte über einen Zeitraum von fünf Jahren beidseitig die volle Sehschärfe wiedererlangt, während der andere Sohn (124-II:1) eine beidseitige Optikusatrophie entwickelte.

Blutproben von den drei Söhnen und der Tochter wurden erstmals im April 1994 und von der Mutter im April 1996 gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt wurde von einem betroffenen und einem gesunden Sohn eine zweite Blutprobe gewonnen. Weitere Blutproben wurden von allen Familienmitgliedern im Dezember 1999 gewonnen.

## **2.2 Homoplasmatischer Patient und gesunder Proband zwecks Assay-Validierung**

Die von einem homoplasmatischen Patienten mit der G3460A Mutation und einem gesunden Probanden aus Leukozyten gewonnenen DNA-Proben dienen als Ausgangsmaterial zur Herstellung definierter Mischungsverhältnisse von mutanter und normaltypischer mtDNA.

### 3 Material

Die bei der praktischen Durchführung verwendeten Materialien sind nachfolgend mit der jeweiligen Bezugsfirma aufgeführt.

#### 3.1 Verbrauchsmaterial

Invitrogen, Carlsbad, USA	TA Cloning Kit
Qiagen GmbH, Hilden, D	Qiaquick Gel Extraction Kit
Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA	ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit GeneScan Standard 500 TAMRA

#### 3.2 Chemikalien

Biorad Laboratories, Richmond, USA	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) Ammoniumpersulfat (APS) Bromphenol Blue Ficoll 400 Xylencyanol FF
Boehringer, Mannheim, Mannheim, D	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> ) Glykogen
FMC Bioproducts, Rockland, USA	Seakem GTG Agarose NuSieve GTG Agarose
Fluka Chemika, Fluka Chemie AG, Buchs, H	Natriumacetat (NaOAc) Kaliumacetat (KAc)
Gibco BRL Life Technology Inc., Gaithersburg, USA	Glycerol Agarose Electrophoresis Grade, Ultra Pure Borsäure EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Tris
ICN Biomedical Inc., Aurora, USA	Urea X-GAL (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid)

Kodak Eastman Chemical Company, Rochester, USA	Formamid TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethyle ndiamin) Ammoniumpersulfat
MERCK, E. Merck, Darmstadt, D	Kaliumchlorid Salzsäure Gelatine
Promega Corp., Madison, USA	IPTG (Isopropyl-1-β-D-galactosid) EDTA
Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg, D	Ethidiumbromid Ethanol (EtOH) Isopropanol
Sigma-Aldrich Vertriebs GmbH, Deisenhofen, D	Tris-Base

### 3.3 Enzyme

Perkin-Elmer, Weiterstadt, D	AmpliTaq
New England Biolabs, Schwalbach, D	Vent (exo-)-DNA Polymerase T4 DNA-Ligase
Boehringer, Mannheim	Proteinase K
New England Biolabs, Schwalbach, D	<i>Bsa</i> HI

### 3.4 Antibiotika

Roth & Co, Karlsruhe, D	Ampicillin
-------------------------	------------

### 3.5 Längenstandards

Eurogentec, Seraing, BL	FX 174DNA/ <i>Hae</i> III ? DNA ( <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III)
New England Biolabs, Schwalbach, D	lambda DNA/ <i>Eco</i> RI+ <i>Hind</i> III 1kb ladder

### 3.6 Bakterienstämme

Stratagene, La Jolla, USA	E. coli SCS110: <i>rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44? (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>Z?M15]</i>
---------------------------	--

### 3.7 Plasmide

Stratagene, La Jolla, USA	pBluescript IISK+/-
Invitrogen, Carlsbad, USA	pCR2.1

### 3.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech, München synthetisiert und lagen in Arbeitslösungen von 10pmol/μl in ¼TE gelöst vor.

Primer	Primer-Sequenz (5´-3´)	Nukleotidposition	mtDNA-Strang (guaninreich = H, <i>heavy</i> , cytosinreich = L, <i>light</i> )
mt3393s*	CTATATACAACTACGCAAAGGC	3393–3414	L
mt4203	TGCTAGGGTGAGTGGTAG	4203–4186	H
mt3662opl†	GATCAGAGGATTGAGTAAACGC	3662–3640	H

\*Die Zahlen beziehen sich auf die Nukleotidposition in der Cambridge Referenzsequenz (Anderson *et al.*, 1981). †fluorophormarkiert mit JOE (2´,7´-dimethoxy-4´,5´-dichloro-6-carboxy-fluorescein).

### 3.9 Nährmedien

Nährmedien wurden 20min bei 121°C und 1000hPa autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% Agar hinzugefügt.

#### LB-Medium

Bacto-Trypton 10g

Hefeextrakt 5g

NaCl 10g

ad 1l ddH<sub>2</sub>O

pH7.2

### 3.10 Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Konzentration im Medium
Ampicillin (Amp)	100mg/ml	100µg/ml
IPTG	100mM	0,2mM
X-Gal	2%	0,004%

### 3.11 Puffer und Lösungen

#### DNA-Puffer

1x TE-Puffer

10mM Tris-HCl pH7.5

1mM EDTA

#### Lyse-Puffer

155mM NH<sub>4</sub>Cl

10mM KHCO<sub>3</sub>

0.1mM EDTA pH8.0

#### SE-Puffer

75mM NaCl

25mM EDTA pH8.0

#### Polyacrylamidlösungen für Gele der Fragmentlängenanalyse

30g Urea

9ml 40% Polyacrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1)

12ml 5x TBE-Puffer

17.5ml ddH<sub>2</sub>O

180µl 10% APS

24µl TEMED

10x Auftragspuffer für Agarosegele:

20% Ficoll 400

100mM EDTA pH8.0

0.2% Bromphenol Blau

0.2% Xylencyanol

Auftragspuffer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Formamid 80% : 10mM EDTA : Dextranblau = 5 : 1 : 0.5

Lösungen zur Bakterienlyse nach Birnboim-Doly (1979)

Lösung I: 50mM Glucose/25mM Tris-HCl pH8.0/10mM EDTA pH8.0/RNase A  
400µg/ml

Lösung II: 1% SDS/0.1M NaOH

Lösung III: 3M KAc/2M Eisessig

Elektrophorese-Puffer

In je 1l ddH<sub>2</sub>O gelöst:

50x TAE-Puffer

242g Tris-Base

57.1ml Eisessig

200ml 0.25M EDTA pH8.0

10x TBE-Puffer

108g Tris-Base

55g Borsäure

8ml 0.25M EDTA pH8.0

PCR-Lösungen

dNTP-Lösung

5mM dATP

5mM dCTP

5mM dGTP

5mM dTTP

5mM Tris-HCl pH7.0

Puffer (1x)

50mM KCl

10mM Tris-HCl pH8.6

0.001% Gelatine

Puffer der Primerextensions-Reaktion (1x ThermoPol Reaction Buffer):

10mM KCl

10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

20mM Tris-HCl (pH 8.8)

2mM MgSO<sub>4</sub>

---

0.1% Triton X-100

### 3.12 Software

PE Biosystems, Weiterstadt, D	GeneScan Analysis Software, 2.01
SPSS GmbH Software, München, D	SPSS 8.0 for Windows

### 3.13 Geräte

Herolab Wiesloch, D	Geldokumentation mit Enhanced Analysis System (E.A.S.Y.)
PE Biosystems, Weiterstadt, D	GeneAmp PCR system 9600 Thermocycler ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencer
DuPont, Boston, USA	Sorvall RC24 Zentrifuge GSA- und SS34-Rotor
UVP, San Gabriel, USA	UV-Transilluminator (302nm)

---

## 4 Methoden

### 4.1 DNA-Extraktion

#### 4.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA

Als Ausgangsmaterial aller Untersuchungen diene Gesamt-DNA, welche aus EDTA-Blut nach der Methode von Miller isoliert wurde (1988). Zunächst wurden 10ml EDTA-Blut mit 40ml Lysepuffer versetzt und 20min auf Eis inkubiert, anschließend 10min bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Der Rückstand wurde in 5ml SE-Puffer aufgenommen und nach Zusatz von 250µl 20% SDS und 130µl 1% Proteinase K übernacht bei 37°C inkubiert. Dem Lysat wurden 1ml SE-Puffer und 1.75ml 5M NaCl hinzugegeben. Nach 10min Zentrifugieren bei 4500rpm und 4°C wurde der Überstand dekantiert und mit 100% Isopropanol auf 15ml aufgefüllt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mit einer Pipettenspitze herausgefischt und in 2ml 80% Ethanol gewaschen, 5min bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewonnene DNA wurde in 250µl -1500µl TE-Puffer aufgelöst und bei 4°C gelagert.

#### 4.1.2 Isolierung von Plasmiden

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA im Rahmen der Heteroplasmieanalyse mittels multipler Einklonierung von PCR-Produkten/RFLP-Analyse wurde eine Mini-Präparation verwendet, die auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht (Birnboim & Doly, 1979):

1.5ml einer Übernacht-Bakterienkultur wurden 1min bei 4000rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 100µl Lösung I über 5min bei Raumtemperatur resuspendiert und anschließend mit 100µl Lösung II gemischt. Nach 5min wurde die Lösung III hinzugegeben und die Mischung 20min auf Eis gestellt. Danach wurde das Präzipitat pelletiert (10min, 4°C, 14000rpm), der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit dreifachem Volumen Ethanol abs. über 10min bei Raumtemperatur ausgefällt. Nach Abzentrifugieren (10min, 4°C, 14000rpm) wurde das Pellet mit Ethanol 70% gewaschen, getrocknet und in 30µl ¼TE gelöst.

---

## 4.2 Präzipitieren von DNA

### 4.2.1 Ethanol-Fällung

Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen NaOAc und 3 Volumen Ethanol abs.. Die Proben wurden 30min bei 13000rpm zentrifugiert, das Präzipitat mit Ethanol 70% gewaschen und luftgetrocknet.

### 4.3 DNA-Quantifizierung

Konzentrationsbestimmungen von Gesamt-DNA und Oligonucleotiden erfolgten durch Messung der spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm. Zusätzlich erfolgte eine Qualitätskontrolle auf Proteinverunreinigungen durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm. Als Maß für die vollständige Abtrennung von Proteinen galt ein Quotient zwischen der Absorption bei 260 nm und 280nm von mehr als 1.6 (Optimum 1.8-2.0). Bei Werten unter 1.6 wurde die DNA-Extraktion wiederholt.

Die Messergebnisse wurden als A260 -, bzw. A280 -Einheiten (Absorption) ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz

$A_{260} = e \times c$  mit  $c = \text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]}$

$e = \text{Extinktionskoeffizient:}$

$\sim 1/33 \text{ [}\mu\text{l/ng]}$  (einzelsträngige DNA)

$\sim 1/50 \text{ [}\mu\text{l/ng]}$  (doppelsträngige DNA)

Eine Einheit Optische Dichte (OD) ist die Menge an Substanz gelöst in 1ml, die in einem Spektrophotometer bei einer optischen Schichtdicke von 1cm eine Absorption von 1 hat.

1 OD 260 -Einheit = 50ng/ $\mu\text{l}$  (doppelsträngige DNA)

= 33ng/ $\mu\text{l}$  (einsträngige DNA)

DNA- Konzentrationsbestimmung:

OD 260 Verdünnungsfaktor 50 = ng DNA/ $\mu\text{l}$

---

#### 4.4 Restriktionsverdau

Alle Restriktionsverdaue wurden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen für mindestens 3 Stunden durchgeführt. Der Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von 3µl 250mM EDTA pH 8.0.

Die analytische Verdaureaktion im Rahmen der multiplen Einklonierung von PCR-Produkten/RFLP-Analyse wurden in einem Volumen von 20µl nach folgendem Reaktionsansatz vorgenommen:

3µl Plasmid-DNA (500ng)

2µl 10x Reaktionspuffer

0.5µl *Bsa*HI (2U)

1µl BSA

ddH<sub>2</sub>O ad 20µl.

Der Restriktionsverdau im Rahmen des Detektionsassays wurde direkt im Reaktionsgemisch der Primerextensionsreaktion durchgeführt, da *Bsa*HI laut Herstellerangaben in dieser Mischung keine Verminderung der enzymatischen Aktivität erfährt. Entsprechend setzte sich der Verdauansatz von 50µl folgendermaßen zusammen:

20µl Primerextensionsreaktionsansatz

0.5µl *Bsa*H I (2U)

5µl 10x Reaktionspuffer

ddH<sub>2</sub>O ad 50µl.

#### 4.5 Gel-Extraktion von PCR-Produkten

Zur Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen wurden die DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte mit 50µl 10mM Tris-HCl, pH8.5.

#### 4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle von Plasmidpräparationen sowie zur Auftrennung von Restriktionsverdauen und PCR-Produkten wurden die Proben mit 0.1 Volumen Agaroseauftragspuffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch Elektrophorese in 0.8 – 2.5%igen Agarosegelen nach gängigem Protokoll (Sambrook *et al.*, 1989) in TBE-Puffer bei Raumtemperatur und maximal 10V/cm. Bei analytischen Agarose-Gelelektrophoresen diente 1x TAE als Laufpuffer. Die Gele wurden in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden am UV-Transilluminator durch Anregung bei 254nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems E.A.S.Y. als Thermoausdruck oder Datenfile.

#### 4.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der fluorophormarkierten Produkte der Primerextension/RFLP-Analyse erfolgte in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese am ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencer nach einem Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Fragmentlängenanalyse wurden 6% denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Nach Lösen der entsprechenden Menge Harnstoff in ddH<sub>2</sub>O und Mischen mit dem entsprechenden Volumen 40% Polyacrylamidlösung und 10x TBE, wurde die Gellösung entgast, mit TEMED und 10% APS-Lösung versetzt und sofort zwischen die Glasplatten der Elektrophorese-Apparatur gegossen. Das verwendete Gelsystem hatte eine Plattengröße von 36cm und eine Geldicke von 0.2mm. Die Gele wurden mit 36 Gelspuren gegossen, indem ein entsprechender "Haifischzahn-Kamm" eingesetzt wurde. Nach Polymerisierung des Gels wurde ein 15-minütiger Vorlauf bei 40W durchgeführt. Die Proben der Sequenz- bzw. Verdaureaktion wurden vorbereitet, indem sie mit Ethanol gefällt, durch Abzentrifugieren (30min; 13000rpm, Raumtemperatur) pelletiert und nach dem Trocknen im Heizblock bei 37°C in 3µl Formamid-Auftragspuffer gelöst wurden. Vor dem Laden wurden die Proben 4min bei 94°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Es wurde 1.5µl des Probenvolumens auf das mit 36 Taschen versehene Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40W mit 1x TBE als Laufpuffer.

#### **4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit PCR aus Gesamt-DNA in dünnwandigen 200µl-Reaktionsgefäßen auf einem GeneAmp PCR System 9600 Thermozykler nach einem Standardprotokoll:

##### 50µl Reaktionsansatz:

50ng Gesamt-DNA

10pmol der Primer mt3393s und mt4203

50mM KCl

10mM Tris-HCl (pH 8.6)

0.001% Gelatine

200µM dNTP

0.25U AmpliTaq DNA-Polymerase

ddH<sub>2</sub>O ad 50µl

Die Reaktionsbedingungen bestanden in einer initialen Denaturierung von 5min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen à 94°C für 1min, 53°C für 1min und 72°C für 1min sowie einer terminalen Extension von 5 min bei 72°C.

Um den Einfluss möglicher Synthesefehler im Rahmen der PCR auf das Messergebnis zu minimieren, wurde jede DNA-Probe in 8 getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert und gepoolt.

#### **4.9 Fluorophormarkierte Primerextensionsreaktion**

In der Primerextensionsreaktion wurden aufgereinigte PCR-Produkte der Probe und der Standard-DNA in einem Reaktionsansatz gemischt und einem einmaligen DNA-Syntheseschritt unterworfen. Als Primer diente ein fluorophormarkiertes Oligonukleotid (JOE; 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxy-fluorescein; 3.8). Zunächst wurden die Vent (exo-) und die AmpliTaq DNA-Polymerase zur DNA-Synthese verwendet. In der Mutationsanalyse wurde schließlich nur die Vent (exo-)-DNA-Polymerase eingesetzt, deren

---

besondere Eigenschaften in einer hohen Hitzebeständigkeit und Kopiergenauigkeit bestehen. Die Primerextensions-Reaktion erfolgte auf einem GeneAmp PCR System 9600 Thermozykler in einem 20µl Reaktionsansatz:

je 4µl (50-100ng) aufgereinigte PCR-Produkte der Probe und der Standard-DNA

0.25pmol 5'-JOE-markierter Primer

100µM dNTP

0.2U Vent (exo-) DNA Polymerase

10mM KCl

10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

20mM Tris-HCl pH8.8

2mM MgSO<sub>4</sub>

0.1% Triton X-100

Die Reaktionsbedingungen waren eine Denaturierung von 2min bei 96°C, gefolgt 2min bei 58°C sowie einem terminalen Extensionsschritt von 6min bei 72°C.

#### **4.10 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien**

E. coli Stämme und Klone wurden in Flüssigkultur übernacht bei 37°C auf einem Rundschüttler gezüchtet. Transformierte Bakterien wurden unter Selektionsdruck gehalten.

#### **4.11 Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation**

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation wurde die Calciumchlorid-Methode nach einem Standardprotokoll angewandt (Sambrook *et al.* 1989).

100ml LB-Medium wurden mit 1ml einer 5ml Übernachtskultur von E. coli SCS110 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0.3 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde 10min in Eiswasser gekühlt und anschließend abzentrifugiert (5min, 4°C, 4000rpm). Das Pellet wurde in 100ml 50mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 10ml

---

CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 5ml 50% Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 200µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 100µl kompetenter Zellen mit 1µl Ligationsansatz (0.1-0.5µg DNA) gemischt und 30min auf Eis gekühlt. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 90sec im Wasserbad inkubiert, für 1min auf Eis gestellt und mit 1ml LB-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 45min bei 37°C wurde die Kultur (150µl/LB/Amp-Agarplatte) ausplattiert und übernacht bei 37°C inkubiert.

#### **4.12 Klonierung**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen entsprechend den Angaben des Herstellers. Das System beruht auf dem Prinzip der TA-Klonierung, welches die terminale Transferaseaktivität der Taq DNA Polymerase ausnutzt, um an beiden 3'-Enden des PCR-Produktes ein Desoxy-Adenosin anzuhängen. Diese 3'-A-Überhänge paaren sich mit den 3'-T-Überhängen des Vektors pCR2.1 in der Ligationsreaktion. Die Identifizierung von Bakterienzellen nach erfolgreicher Klonierung und anschließender Transformation erfolgte mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion.

#### **4.13 Automatische Fragmentanalyse**

Die relative Quantifizierung der spezifischen Restriktionsfragmente nach Primerextension/RFLP-Analyse erfolgte nach Auftrennung in einem 6% Polyacrylamidgel mittels automatischer Fluoreszenzdetektion am ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencer und mit Hilfe der GeneScan 2.01 Analysesoftware am Apple G3 Power Macintosh. Im Auswertemodus wurde jede Gelspur in Form eines Elektropherogramms dargestellt und die Fluoreszenzeinheiten der den DNA-Fragmentmengen korrespondierenden Peakflächen notiert. Die abschließende Quantifizierung erfolgte durch Auswertung der Peakflächendaten mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel.

Standardmäßig wurde die Hälfte eines Probenvolumens (1.5µl ? 6-20fmol) auf das Gel aufgetragen, womit die Signale im linearen Bereich der Fluoreszenzdetektion von 30-4000 Fluoreszenzeinheiten für die Peakhöhe lagen. Für die Fluoreszenzwerte der Peakflächen besteht keine Obergrenzung des linearen Messwertbereiches (laut persönlicher Mitteil-

ung von Herrn Selders, Fa. PE Biosystems, Weiterstadt). Die Einstellung der GeneScan-Analyse-Parameter sah eine Schwelle der Amplitudendetektion von 20 Fluoreszenzeinheiten vor (Abb. 4.1). Bei zu geringem oder hohem Probenauftrag, sichtbar durch ein zu schwaches Signal oder eine Überlagerung des Hauptsignals durch eine andere Farbe, wurde die aufgetragene Menge entsprechend angepasst.

Jedem Gel wurde zur Kontrolle der Fragmentlängen in einer getrennten Spur der Längensstandard GeneScan-500 TAMRA (0.3µl) mitgeführt, der folgende Längen (Bp) beinhaltet: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500.

In der softwaremäßigen Einstellung der Trenn- und Analysebedingungen der Detektionstechnologie über die so genannte Matrix wurde das Filterset A der CCD-Kamera des ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencers gewählt, welche den Fluorophor JOE in der Farbe gelb darstellt.

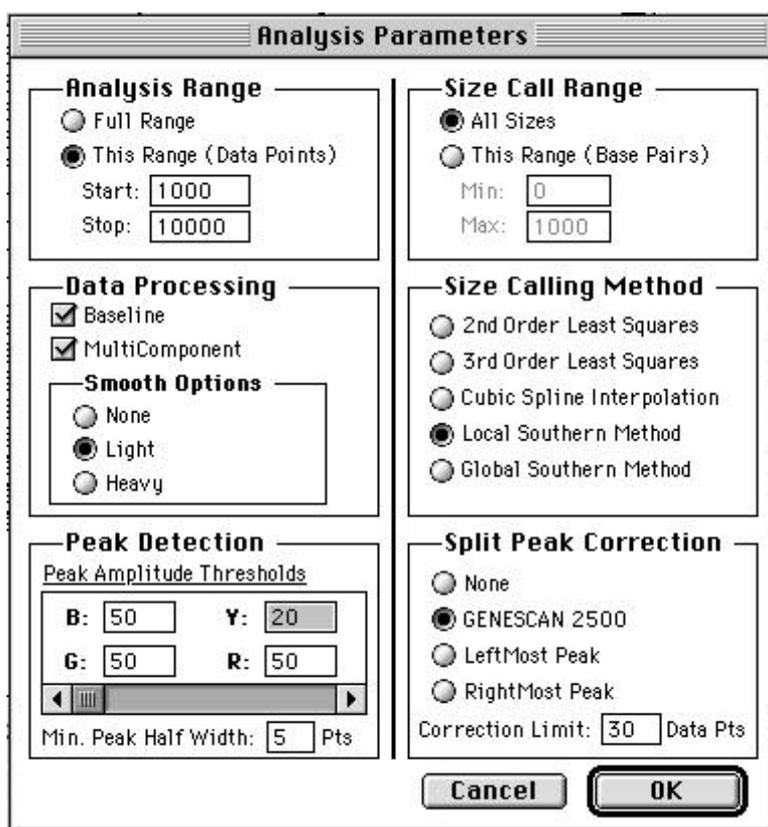


Abb. 4.1 Fenster der GeneScan-Software zur Eingabe der Analyse-Parameter.

---

#### 4.14 Konstrukt homologer Standard-DNA

Das Konstrukt homologer Standard-DNA, zum Zweck die Effizienz der Verdaureaktion im Rahmen der Primerextension/RFLP-Analyse zu kontrollieren, wurde freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. B. Wissinger zur Verfügung gestellt. Die Generierung des Konstruktes war durch einfache *site-directed* Insertionsmutagenese erfolgt. Hierzu wurde zunächst ein Wildtyp-mtDNA-Fragment, dessen Enden durch die Nucleotide an Position 2769 und 4534 des mtGenoms gekennzeichnet sind, aus Gesamt-DNA mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Amplifikat wurde nach Aufreinigung einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *ApaI* und *XhoII* unterzogen, um an den Nukleotidpositionen 2973 und 4213 entsprechend dem mtGenom Schnittstellen zu erzeugen. Die Einklonierung erfolgte in den Vektor pBlueskript II SK, nachdem dieser durch Doppelverdau mit den beiden o.g. Enzymen behandelt worden war. Das rekombinante Plasmid wurde durch Restriktionsverdau mit *HincII* an Position 3594 linearisiert und ein 12Bp *BamHI* Linker mittels Ligation eingeführt (Abb. 4.2). Die Identität des Konstruktes wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

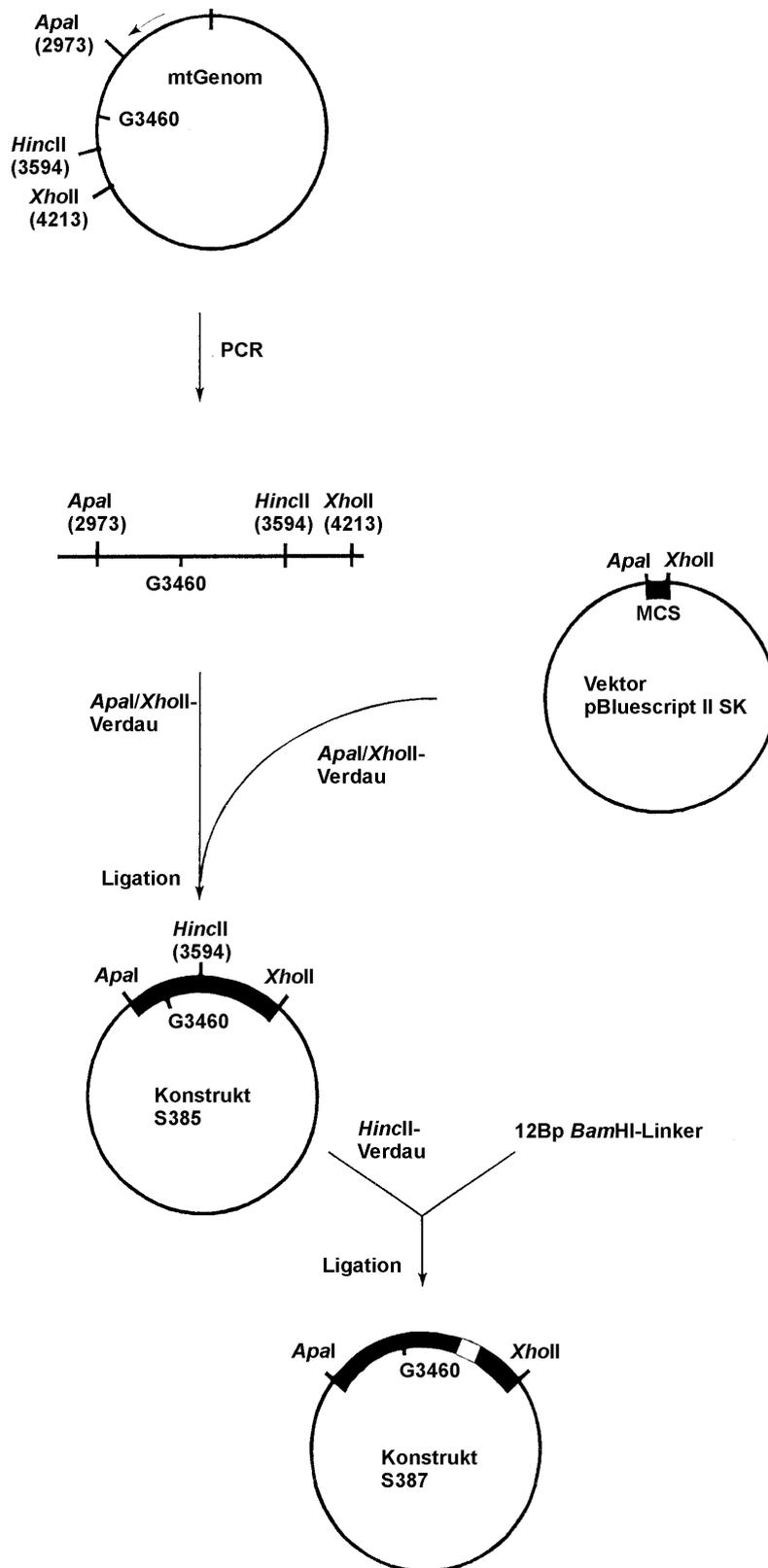


Abb. 4.2 Schema der Generierung homologer Standard-DNA.

#### 4.15 Erstellung von künstlicher Heteroplasmie und Standardkurven

Die Validierung des Assays erfolgte durch Mehrfachmessungen von Standard-DNA-Proben. Hierzu wurden definierte Mischungsverhältnisse von Gesamt-DNA homoplasmatisch normaltypischen und mutanten mtGenotyps der G3460A Mutation dem Verfahren unterzogen. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration wurden Verdünnungen mit 1x TE und einer Konzentration von 10ng/µl hergestellt. Definierte Mischungsverhältnisse entsprechend den Heteroplasmiegraden 0%, 5%, 25%, 50%, 75%, 95% und 100% wurden in 100µl Ansätzen folgendermaßen hergestellt:

Heteroplasmiegrad (Anteil mutanter mtDNA in %)	Gesamt-DNA mit homoplasmatischer Wildtyp-mtDNA in µl (10ng/µl)	Gesamt-DNA homoplasmatisch mutanter mtDNA in µl (10ng/µl)
0	0	100
5	5	95
25	25	75
50	50	50
75	75	25
95	95	5
100	100	0

Jede Mischung wurde in 5 getrennten Ansätzen dem Detektionsverfahren unterzogen.

#### 4.16 Multiple Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse

Das Verfahren der multiplen Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse zur Bestimmung des Heteroplasmiegrades beruht auf dem Prinzip der Fraktionierung heterogener DNA-Populationen im Rahmen der Transformation prokaryotischer Empfängerzellen. Ein die 3460-Mutationsstelle enthaltendes DNA-Fragment von 810Bp wurde mittels der PCR mit dem Primerpaar mt3393s und mt4203 aus Gesamt-DNA amplifiziert. Um den Einfluss möglicher Synthesefehler im Rahmen der PCR auf das Messergebnis zu minimieren, wurde jede DNA-Probe in 8 getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert und gepoolt. Nach Gelextraktion wurden die gepoolten PCR-Produkte jeder Probe mit Hilfe des TA Cloning Kits in den Vektor pCR2.1 kloniert, die rekombinante DNA aus den Bakterienzellklonen isoliert und je 500ng Plasmid-DNA einem Restriktionsverdau übernacht mit *BsaH* I unterworfen. Die Differenzierung der Klone in solche mit Wildtyp- und mutante mtDNA-Sequenz Tragende erfolgte in der Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurde die Hälfte des Verdauansatzes (10µl) auf ein 1.5% Agarosegel aufgetragen.

Plasmide mit Wildtyp- und mutanter mtDNA-Sequenz sollten ein Bandenmuster von 3 (248Bp, 931Bp, 3538Bp) bzw. 4 Fragmenten (248Bp, 931Bp, 1626Bp, 1912Bp) liefern. Je Probe wurden mindestens 40 Klone ausgezählt und der Heteroplasmiegrad als prozentualer Anteil der Klone mit mutanter mtDNA-Sequenz aus der Gesamtheit auswertbarer Klone bestimmt (Anteil „mutanter Klone“/Gesamtheit auswertbarer Klone  $\times$  100 = Heteroplasmiegrad in %). Klone, die im Sinne einer „intra-klonalen Heteroplasmie“ bzw. eines unvollständigen Restriktionsverdau sowohl wildtypspezifische Banden als auch solche des mutanten mtDNA-Allels aufzeigten, wurden von der Auszählung ausgeschlossen. Als Längenstandard wurden die 1kb DNA *ladder* und der lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker verwendet.

#### 4.17 Schätzung der Anzahl segregierender mtDNA-Einheiten nach der Wright-Solignac Gleichung

Die Gleichung nach Wright-Solignac beruht auf einem von Wright 1967 entwickelten mathematischen Modell zur Beschreibung des genetischen Drifts in definierten Populationen. Von Solignac und Mitarbeitern wurde dieses Modell 1986 zur Beschreibung der Transmissioneigenschaften von mtGenomen bei der Tauf liege angewandt. Unter der Annahme einer primär zufallsabhängigen mtDNA-Vererbung beschreibt die Wright-Solignac Gleichung die Varianz der mutanten mtDNA-Allelfrequenz in der n-ten Generation ( $V_n$ ) in Abhängigkeit von der Anzahl segregierender Einheiten ( $N$ ), der mutanten mtDNA-Allelfrequenz der Mutter ( $p_0$ ) und der Zahl ( $n$ ) von Zellteilungen in der weiblichen Keimbahn ( $g$ ).

$$V_n = p_0(1 - p_0) \left[ 1 - \frac{1 - p_0^{2g}}{N} \right]$$

Durch Umformung wird die Anzahl segregierender Einheiten ( $N$ ) geschätzt.

$$N = \frac{1}{\left( 1 - \frac{V_n}{p_0(1 - p_0)} \right)^{1/g}}$$

Die Schätzung der Anzahl segregierender mtDNA-Einheiten liefert einen quantitativen Parameter zum direkten Vergleich von Vererbungsanalysen von mtDNA-Mutationen.

---

#### **4.18 Bestimmung der Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen**

Zur Bestimmung der Heteroplasmieprävalenz in Familien mit einer der drei primären LHON-Mutationen wurden die Ergebnisse der seit 1992 im Rahmen der klinischen Diagnostik durchgeführten PCR/RFLP-Analyse ausgewertet. Diese erfolgt routinemäßig mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Färbung mit Ethidiumbromid. LHON-Familien wurden als heteroplasmatisch identifiziert, wenn mindestens ein Familienangehöriger sowohl ein für den Wildtyp- als auch das mutante mtDNA-Allel spezifisches Bandenmuster in der Agarosegel-Elektrophorese aufwies. Die Heteroplasmie wurde anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

#### **4.19 Statistische Auswerteverfahren**

Zur Prüfung der Vorhersagbarkeit des tatsächlichen Heteroplasmiegrades einer Probe aus den Messwerten des Detektionsassays wurde für eine Messreihe definierter Mischungsverhältnisse eine lineare Regressionsanalyse vorgenommen und der Korrelations-Koeffizient nach Pearson ermittelt.

Die Veränderungen des Heteroplasmiegrades in der Longitudinalbeobachtung wurden anhand repräsentativer Einzelmessungen von Patienten-Proben mit dem Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test auf statistische Signifikanz geprüft.

Der Unterschied in der Heteroplasmieprävalenz in LHON-Familien mit einer der drei primären LHON-Mutationen wurde mit dem Mehrfelder-Chi-Quadrat-Test (2x3 Wertetabelle) auf statistische Signifikanz geprüft.

Zur quantitativen Vererbungsanalyse der G3460A Mutation wurden die Differenzen aus dem Heteroplasmiegrad der Nachkommen und deren Mütter ermittelt. Die Differenzwerte wurden in 10 Klassen eingeteilt und die Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Die Prüfung der Differenzwerte auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Shapiro-Wilks-Korrektur. Für den Fall normalverteilter Differenzwerte wurde die signifikante Abweichung ihres Mittelwertes von Null mit dem Einstichproben-t-Test geprüft.

Für alle statistischen Analysen wurde das Statistikprogramm SPSS 8.0 for Windows verwendet.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Fluorophormarkierte Primerextension/RFLP-Analyse**

#### **5.1.1 Prinzip der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse**

Das Prinzip des entwickelten Detektionsassays zur präzisen Heteroplasmiebestimmung der G3460A Mutation beruht auf drei Verfahrensschritten (Abb. 5.1):

1. RFLP-Analyse fluorophormarkierter Primerextensions-Produkte,
2. Messung der Fluoreszenzintensität allelspezifischer DNA-Banden,
3. Anwendung einer einfachen mathematischen Gleichung zur Korrekturberechnung bei unvollständigem Restriktionsverdau.

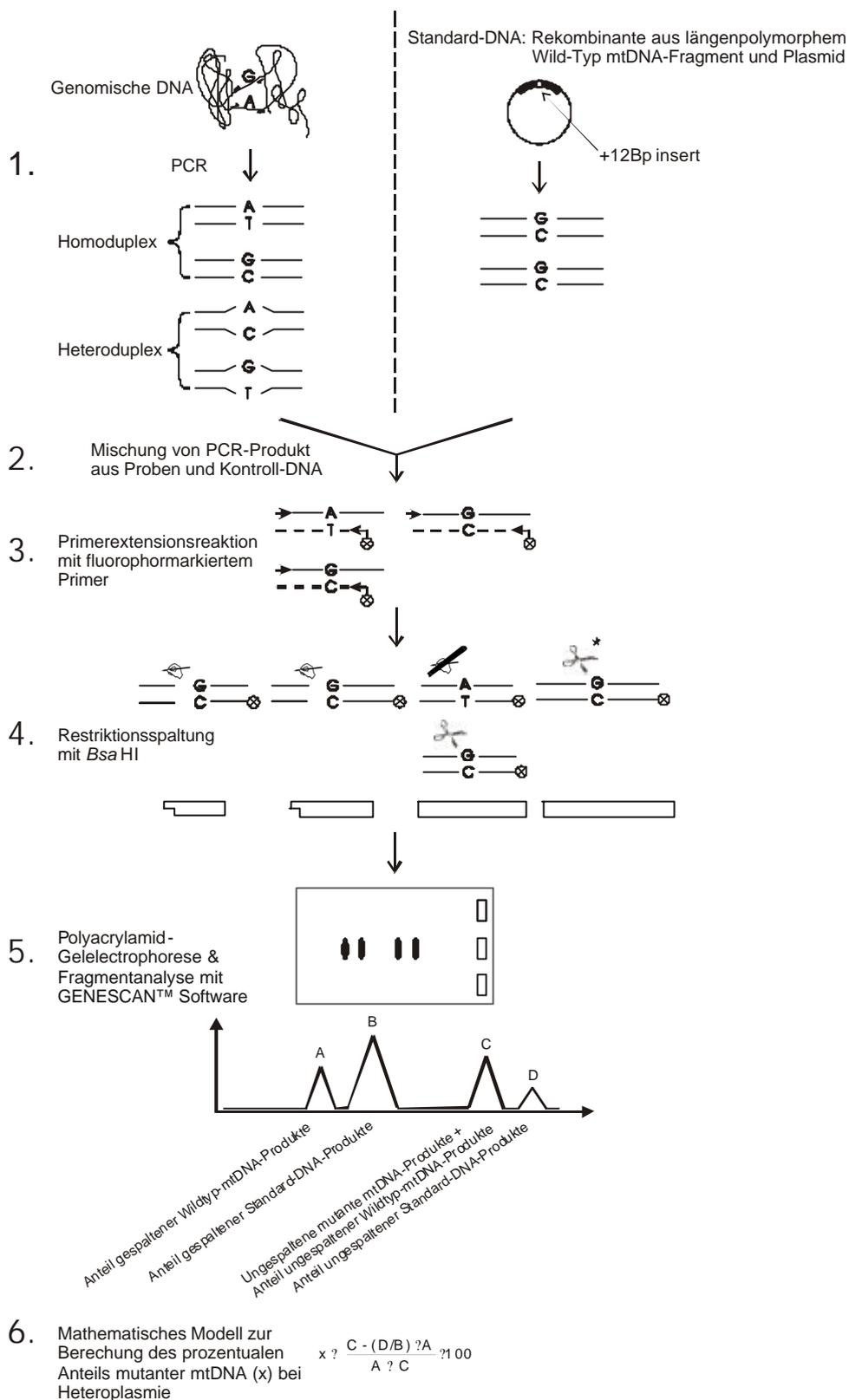


Abb. 5.1 Ablaufdiagramm der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse zur relativen Quantifizierung der G3460A Mutation. \*Schraffierte Scheren kennzeichnen ungespaltene DNA-Fragmente infolge unvollständigen Restriktionsverdau.

---

Zunächst werden PCR-Amplifikate von 810Bp und 822Bp (entsprechend mtDNA Nukleotidposition 3393-4203 bzw. 3393-4203 + 12Bp Insert) aus Proben-DNA bzw. Standard-DNA getrennt hergestellt. Je 50-100ng beider PCR-Produkte werden zusammen der Primerextensionsreaktion mit dem fluorophormarkierten Primer zugeführt. Das Primerextensions-Produkt von 269Bp und 281Bp der Proben- bzw. Standard-DNA wird anschließend dem Restriktionsverdau mit der Endonuklease *Bsa*HI unterzogen, welche das Produkt der Wildtyp-mtDNA in ein 204Bp und 65Bp und das der Standard-DNA in ein 216Bp und 65Bp langes DNA-Fragment spaltet. Das Produkt des mutanten mtDNA-Allels bleibt unverändert ebenso wie bei unvollständigem Restriktionsverdau ein Anteil der Standard-DNA und Wildtyp-mtDNA-spezifischen Produkte. Letztere komigrieren in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem DNA-Fragment des mutanten mtDNA-Allels von 269Bp. Die Probenauftragung erfolgte so, dass zwischen jeder Probe eine Gelspur freigelassen wurde, um die Messfehlermöglichkeit durch Ineinanderüberlaufen der Proben zu vermeiden. Der Einsatz der Vent (exo-) DNA-Polymerase lieferte distinkte Banden in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, während sich unter Verwendung der Taq DNA Polymerase unscharfe Banden und eine hohe Hintergrundfluoreszenz als Zeichen einer Produktinhomogenität der Primerextensionsreaktion zeigten (Abb. 5.2).

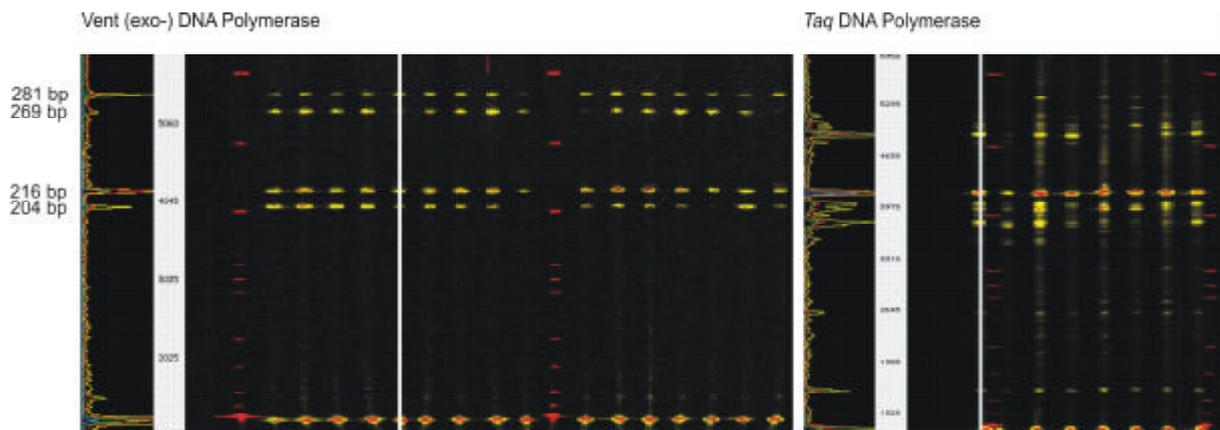


Abb. 5.2 Gelbilder der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse unter Verwendung von Vent (exo-) DNA-Polymerase und Taq DNA-Polymerase in der Primerextensionsreaktion. Jedes Gelbild zeigt die parallelen Läufe mehrerer Proben, von denen jeweils eine durch die *tracking lane* markiert ist. Die aufgetrennten DNA-Fragmente lassen sich in der Laufrichtung von oben nach unten den vier Signalen im Gelbild folgendermaßen zuordnen: Anteil ungespaltener Standard-DNA-Produkte (281Bp), ungespaltene mutante mtDNA-Produkte und Anteil ungespaltener Wildtyp-mtDNA-Produkte (269Bp), Anteil gespaltener Standard-DNA-Produkte (216Bp) und Anteil gespaltener Wildtyp-mtDNA-Produkte (204Bp).

### 5.1.2 Relative Quantifizierung mutanter mtDNA

Die relative Quantifizierung beginnt mit der Speicherung der von der Elektrophoreseeinheit generierten Rohdaten durch die *Data Collection*-Software und einer ersten Bewertung des Analyselaufes am Gelbild (Abb. 5.2). Im Gelbild der Genescan-Software folgt das *lane tracking*, das die Messpunkte für die Datenanalyse im Maximum der aufgetrennten DNA-Banden festlegt. In der folgenden Datenanalyse werden die aufgetrennten DNA-Fragmente jeder Gelspur einzeln in Form eines Elektropherogramms mit Datentabelle dargestellt (Abb. 5.4, Abb. 5.5). Durch Anklicken der einzelnen Peaks werden die Fluoreszenzwerte der korrespondierenden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Peakhöhen bzw. -flächen in der Tabelle farblich unterlegt angezeigt. Die Werte der Peakflächen, die für die relative Quantifizierung der Heteroplasmie herangezogen wurden, werden als Textdaten zur weiteren Berechnung in eine Excel-Tabelle exportiert. Im Fall eines vollständigen Restriktionsverdaus, angezeigt durch ein Fehlen des Fluoreszenzsignals ungespaltener Standard-DNA-Produkte, errechnet sich der Anteil mutanter mtDNA-Allele  $x$  (%) aus dem Peakflächen-Quotienten (1)

$$(1) \quad x = \frac{C}{C + A} \cdot 100 ,$$

wobei A den Anteil gespaltener Wildtyp-mtDNA-Produkte und C den Anteil ungespaltener mutanter mtDNA-Produkte in Fluoreszenzeinheiten angibt (Abb. 5.3, Abb. 5.4). Der Restriktionsverdau der Primerextensionsprodukte erwies sich in der Regel jedoch als unvollständig, was teilweise durch die hohe Sensitivität der Fluoreszenzdetektion, mit welcher sich DNA-Mengen bis in den Attomolbereich nachweisen lassen, begründet ist. Die Schwankungsbreite der Restriktionseffizienz lag zwischen 72% und 100%. Als Maß für die Effizienz des Restriktionsverdaus dient der Peakflächen-Quotienten (2) aus gespaltenen Standard-DNA-Produkten  $y$  (%) und gesamtem Standard-DNA-Produkten

$$(2) \quad y = \frac{B}{D + B} \cdot 100 ,$$

wobei B den Anteil gespaltener und D den Anteil ungespaltener Standard-DNA-Produkte anzeigt. Bei unvollständigem Restriktionsverdau erfolgt die Berechnung des Anteils mutanter mtDNA-Allele (%) nach Abwandlung des Peakflächen-Quotienten (1), indem zusätzlich der Anteil ungespaltener Wildtyp-mtDNA-Produkte von den Produkten des mutanten mtDNA-Allelanteils im Zähler subtrahiert wird. Ersterer drückt sich aus durch das Produkt aus dem Verhältnis von ungespaltenen zu gespaltenen Standard-DNA-Produkten und gespaltenen Produkten des Wildtyp- mtDNA-Allels. Der Peakflächen-Quotient (3) zur Berechnung von  $x$  lautet dann:

$$(3) \quad x = \frac{C - \frac{D}{B} \cdot A}{C + A} \cdot 100$$

### 5.1.3 Validierung der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse

Zur Untersuchung der Messgenauigkeit des Detektionsassays wurden definierte Mischungsverhältnisse von Gesamt-DNA homoplasmatisch normaltypischen und mutanten mtGenotyps dem Messverfahren unterzogen. Abb. 5.3 zeigt das Gelbild und Abb. 5.4 und Abb. 5.5 die entsprechenden Elektropherogramme und tabellarische Zusammenstellung der Fluoreszenzwerte einer repräsentativen Analyse der sieben Standardproben (Tab. 5.1).

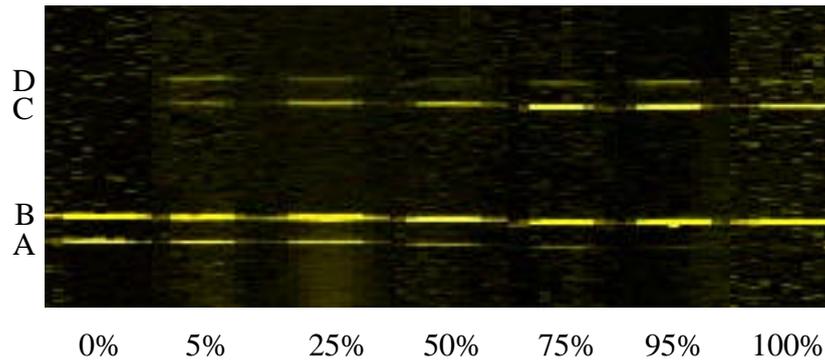
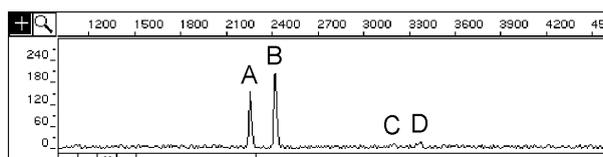


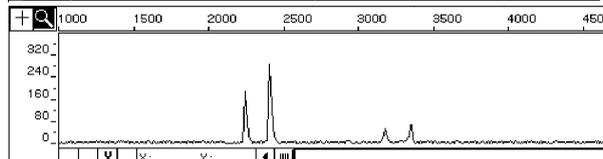
Abb. 5.3 Gelbild der Heteroplasmieanalyse definierter Mischungsverhältnisse von Gesamt-DNA homoplasmatisch normaltypischen und mutanten mtGenotyps. Die Kennzeichnung der Fragmente (A-D) ist entsprechend Abb. 5.1. Mit zunehmendem Heteroplasmiegrad nimmt die Fluoreszenzintensität der wildtypspezifischen Bande A ab und die der Bande C zu. Die höhere Fluoreszenzintensität der Bande C gegenüber der Bande A am Beispiel des 50%igen Mischungsverhältnis spiegelt die Komigration ungespaltener Anteile der Wildtyp-mtDNA-Produkte mit den mutanten mtDNA-Produkten infolge unvollständigen Restriktionsverdau wieder. Der Bildkontrast einzelner Gelspuren wurde angepasst, um den Schwankungen in aufgetragener Probenmenge Rechnung zu tragen.



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
Y_1	60.00	122.52	157	2050	2250
Y_2	64.37	138.90	205	3298	2414
Y_3	85.17	206.24	16	84	3194
Y_4	89.04	218.76	15	65	3339
Y_5	89.92	221.60	18	165	3372

A=2050  
B=3298  
C= 84  
D= 230

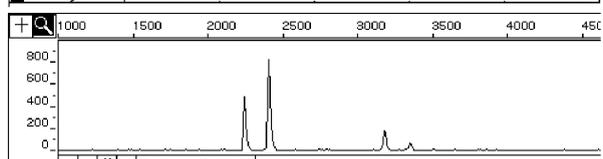
$$x = \frac{84 - 230/3298 \cdot 2050}{2050 + 84} \cdot 100 = -2.8\%$$



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
Y_1	59.71		193	1996	2239
Y_2	60.03		91	1084	2251
Y_3	64.03		288	5174	2401
Y_4	84.67		54	839	3175
Y_5	88.83		24	133	3331
Y_6	88.99		23	137	3337
Y_7	89.25		68	924	3347

A=3080  
B=5174  
C= 839  
D=1194

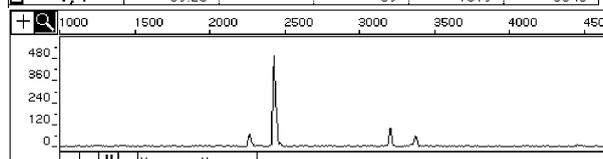
$$x = \frac{839 - 1194/5174 \cdot 3080}{3080 + 839} \cdot 100 = 3.3\%$$



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
Y_1	59.68	139.00	492	6351	2238
Y_2	63.68	149.13	30	222	2388
Y_3	64.03	150.00	832	12826	2401
Y_4	84.24	198.82	26	278	3159
Y_5	84.69	199.88	181	2948	3176
Y_6	88.80		31	359	3330
Y_7	89.23		69	1019	3346

A= 6351  
B=13048  
C= 3226  
D= 1378

$$x = \frac{3226 - 1378 / 13048 \cdot 6351}{6351 + 3226} \cdot 100 = 26.7\%$$



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
Y_1	60.29		70	629	2261
Y_2	60.64		28	328	2274
Y_3	64.64		497	5026	2424
Y_4	64.99		222	2637	2437
Y_5	85.36		105	1394	3201
Y_6	89.55		28	277	3358
Y_7	89.87		64	909	3370

A= 957  
B=7663  
C=1394  
D=1186

$$x = \frac{1394 - 1186 / 7663 \cdot 957}{957 + 1394} \cdot 100 = 53\%$$

Abb. 5.4 Elektropherogramme und tabellarische Zusammenstellung der Fluoreszenzwerte der Analyse von Standardproben mit 0%, 5%, 25% und 50%igem Anteil des mutanten 3460 mtDNA-Allels. Die Peaks des obersten Elektropherogramms sind entsprechend Abb. 5.1 und Abb. 5.3 mit A-D beschriftet.

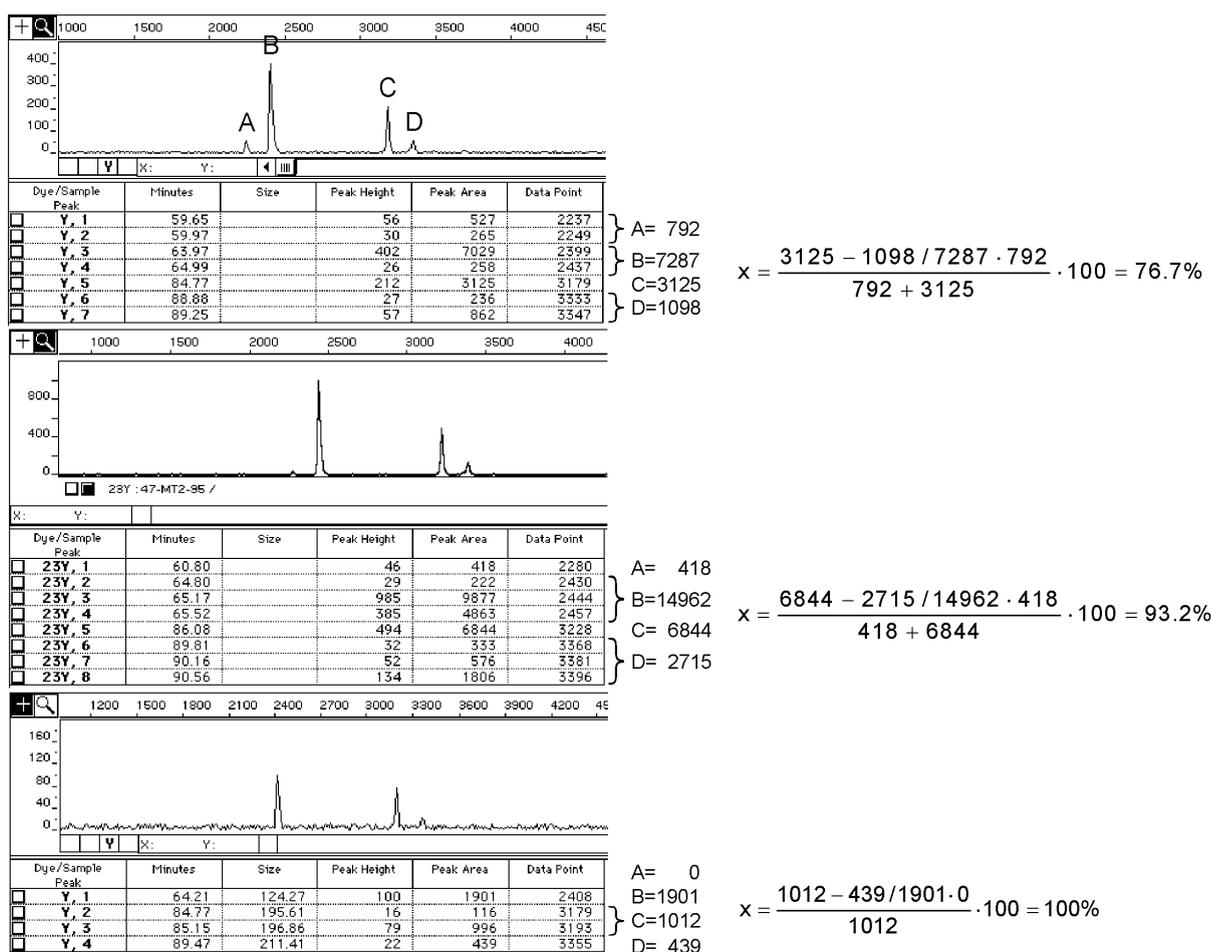


Abb. 5.5 Elektropherogramme und tabellarische Zusammenstellung der Fluoreszenzwerte einer Analyse von Standardproben mit 75%, 95% und 100%igem Anteil des mutanten 3460 mtDNA-Allels. Die Peaks des obersten Elektropherogramms sind entsprechend Abb. 5.1 und Abb. 5.3 mit A-D beschriftet.

Die Bestimmung des Heteroplasmiegrades wies keine deutlichen Unterschiede in der Berechnung auf Grundlage der Fluoreszenzwerte der Peakhöhen oder -flächen auf. Die Regressionsgerade der repräsentativen Analyse von sieben Standardproben (Abb. 5.3, Abb. 5.4, Abb. 5.5) ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.999 und 0.997, was auf eine hohe Messgenauigkeit hindeutet (Abb. 5.6, Abb. 5.7).

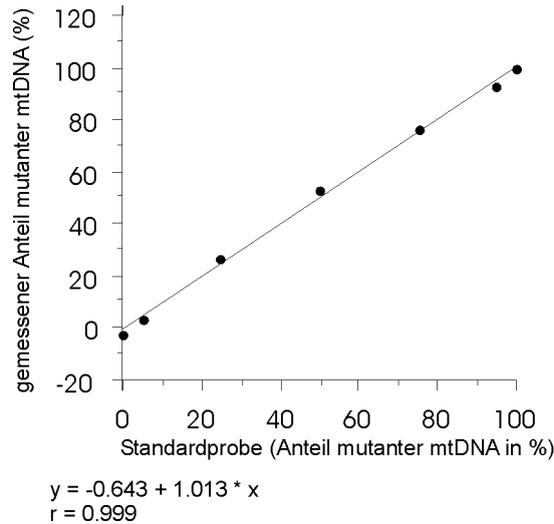


Abb. 5.6 Lineare Regressionanalyse der relativen Quantifizierung der G3460A Mutation an sieben Standardproben. Als Berechnungsgrundlage dienten die Fluoreszenzwerte der Peakflächen.

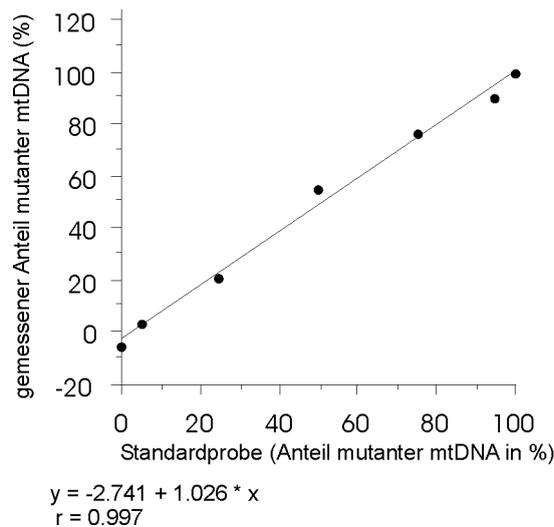


Abb. 5.7 Lineare Regressionanalyse der relativen Quantifizierung der G3460A Mutation an sieben Standardproben. Als Berechnungsgrundlage dienten die Fluoreszenzwerte der Peakhöhen.

Zur Prüfung auf Reproduzierbarkeit wurden die Standardproben mehrfachen Messungen in getrennten Ansätzen unterworfen (Tab. 5.1). Die Variationsbreite der sieben Standardproben betrug im Mittel 7.74% (Tab. 5.2). Die Messungen der Probe mit einem Mischungsverhältnis entsprechend einem Anteil mutanter mtDNA von 95% ergaben eine deutlich geringere Variationsbreite von 2.65% gegenüber der mittleren Variationsbreite. Die

Bestimmungen der Proben mit homoplasmatisch mutanter mtDNA lieferten stets einen Messwert von 100%.

Messung	Standardprobe (Anteil mutanter mtDNA in %)	Fluoreszenzwerte der Peakfläche				Effizienz des Restriktions- verdau (%)	Messwert (Anteil mutanter mtDNA in %)
		A	B	C	D		
1.	0	2050	3298	84	230	93	-2,76
2.	0	1610	9577	451	3681	72	-8,14
3.	0	13205	29413	3322	8786	77	-3,77
4.	0	1569	2672	205	379	88	-0,99
5.	0	2895	4320	810	1020	81	3,41
1.	5	3080	5174	839	1194	81	3,27
2.	5	1042	8192	247	1080	88	8,50
3.	5	13089	26055	1333	1174	96	5,15
4.	5	1838	11190	796	4350	93	3,09
5.	5	973	7475	195	1427	84	0,79
1.	25	6351	13048	3226	1378	90	26,68
2.	25	13498	37219	6127	2171	94	27,21
3.	25	5024	50541	2671	3235	94	30,53
4.	25	2558	5474	1242	904	86	21,57
5.	25	786	5879	409	930	86	23,82
1.	50	957	7663	1394	1186	87	52,99
2.	50	1120	10007	1483	915	92	53,04
3.	50	1407	14627	2296	1296	92	58,64
4.	50	688	5091	819	599	89	48,97
5.	50	7368	5057	8434	426	92	49,45
1.	75	792	7287	3125	1098	87	76,73
2.	75	509	4295	1847	832	84	74,21
3.	75	795	13098	4163	1453	90	82,19
4.	75	2173	16412	16272	5466	75	84,30
5.	75	1940	13557	13495	4205	76	83,53
1.	95	418	14962	6844	2715	85	93,20
2.	95	314	15946	4530	1491	91	92,91
3.	95	157	4564	3980	1148	80	95,25
4.	95	91	6245	2176	654	91	95,57
5.	95	389	9460	8362	3693	72	93,82
1.	100	0	1901	1112	439	81	100,00
2.	100	0	53890	29586	8381	87	100,00
3.	100	0	40355	35048	7893	84	100,00

Tab. 5.1 Wiederholungsmessungen von Standardproben mit der fluorophormarkierten Primerextension/RFLP-Analyse. Grau unterlegte Messungen kennzeichnen Bestimmungen eines Gellaufs, deren Werte in die lineare Regressionsanalyse eingegangen sind (s. Abb. 5.6, Abb. 5.7).

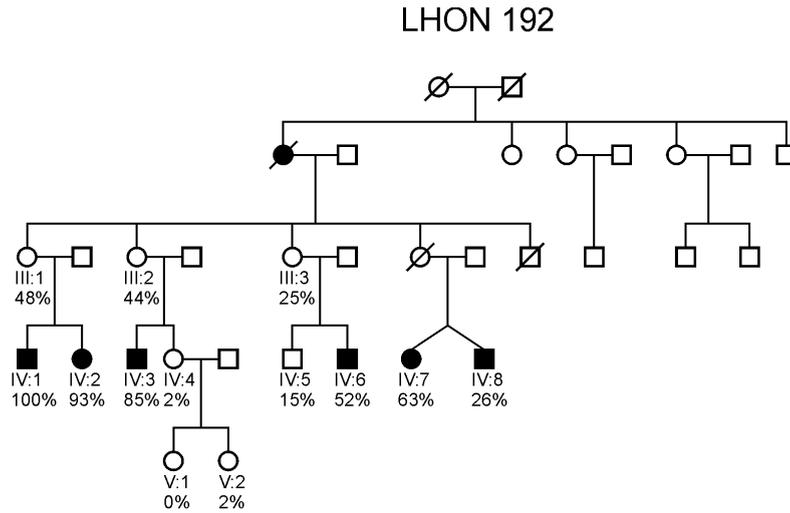
Standardprobe (Anteil mutanter mtDNA in %)	0	5	25	50	75	95	100
MW	-2,45	4,16	25,96	52,62	80,19	94,15	100,00
SD	4,21	2,88	3,42	3,87	4,46	1,20	0,00
Variationsbreite	11,56	7,71	8,96	9,66	10,08	2,65	0,00

Tab. 5.2 Interassay-Varianz des Assays zur relativen Quantifizierung der G3460A Mutation.

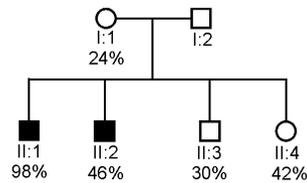
## 5.2 Bestimmung des Heteroplasmiegrades an Leukozyten-DNA von LHON-Patienten und gesunden Anlageträgern der G3460A Mutation

### 5.2.1 Variabilität und Zunahme des Heteroplasmiegrades in Folgegenerationen

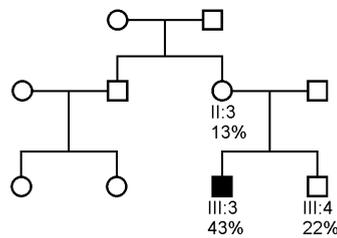
Die Analyse von 15 Transmissionsereignissen der G3460A Mutation bei vier LHON-Familien zeigte eine ausgeprägte Schwankungsbreite der Heteroplasmiedifferenz zwischen Nachkommen und ihren Müttern von -42% bis 74% bei einem Mittelwert von 21,8 % (SD 29,8%; Abb. 5.8). Im Kolmogorov-Smirnov-Test mit Shapiro-Wilks-Korrektur waren die Heteroplasmiedifferenzen signifikant normalverteilt ( $p=0,990$ ). Der Mittelwert war signifikant größer als Null ( $p=0,013$ ; Abb. 5.9).



**LHON 124**



**LHON 179**



**LHON 24**

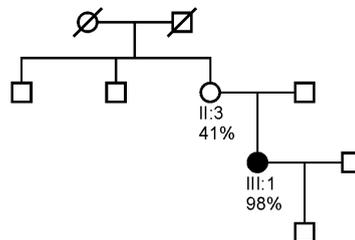


Abb. 5.8 Stammbäume von vier LHON-Familien mit Heteroplasmie der G3460A Mutation. Eckige und runde Symbole kennzeichnen Männer bzw. Frauen, schwarze Symbole erkrankte und weisse gesunde Anlagenträger, durchgestrichene Symbole verstorbene Familienangehörige. Der Heteroplasmiegrad in % ist unterhalb der Symbole angegeben.

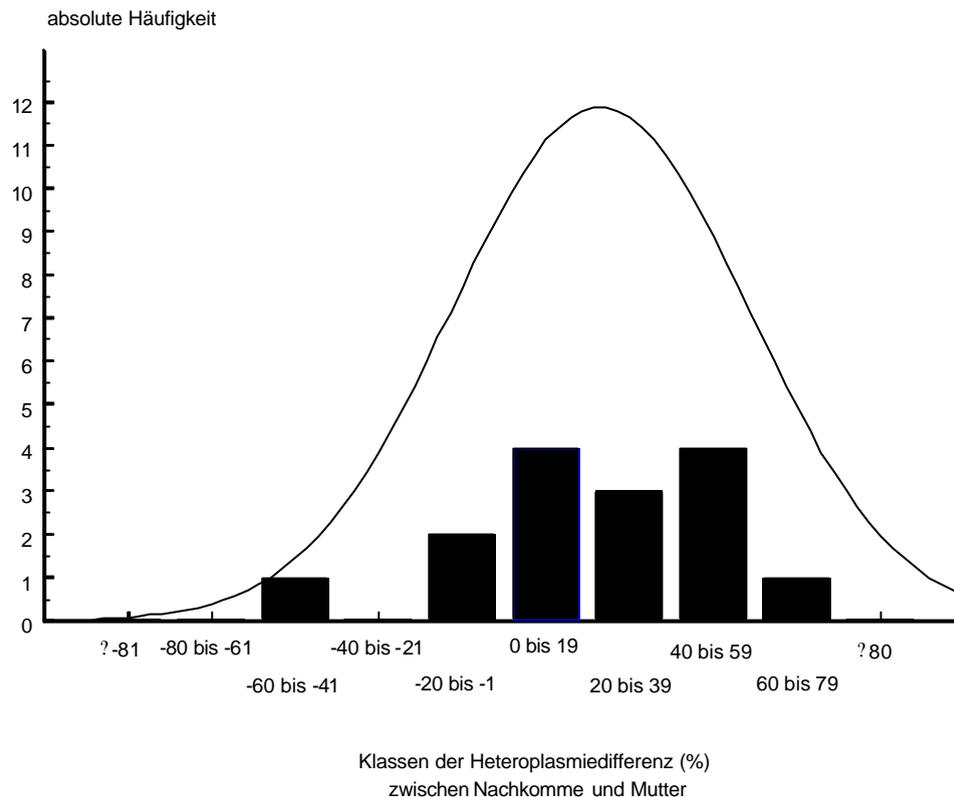


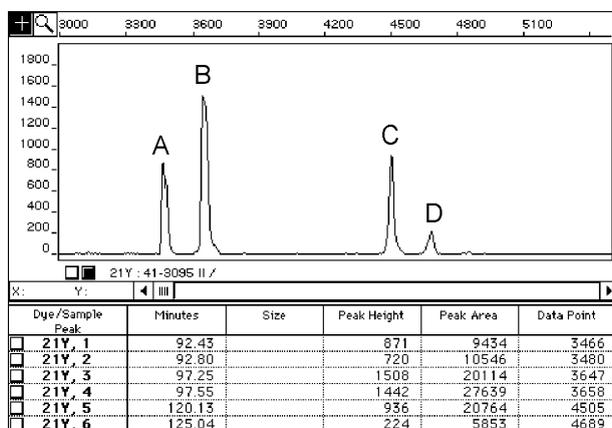
Abb. 5.9 Häufigkeitsverteilung der Heteroplasmiedifferenzen zwischen Nachkommen und ihren Müttern aus vier LHON-Familien.

Die LHON-Manifestation war häufiger bei höherem Grade der Heteroplasmie, d.h. hohem Anteil mutanter mtDNA-Allele zu beobachten. Im Mittel betrug der Heteroplasmiegrad bei Patienten 69.3% (SD 28.8%) gegenüber 22.4% (SD 16.5%) bei gesunden Anlagenträgern. Die hohe Standardabweichung deutet darauf hin, dass die Erkrankung in einigen Fällen bei geringen Grad der Heteroplasmie manifest wird (Familie 192-IV:8; Familie 124-II:2).

### 5.2.2 Segregation mitochondrialer DNA in der Langzeitbeobachtung

In der Longitudinalstudie an fünf heteroplasmatischen Mitgliedern der LHON-Familie 124 zeigte sich bei 4 Angehörigen über einen Beobachtungszeitraum von 5½ bzw. 3½ Jahren (I:1) eine Abnahme des Anteils mutanter mtDNA-Moleküle in Leukozyten. Bei einem betroffenen (II:2; Abb. 5.10) und einem gesunden Familienangehörigen (II:3) betrug die

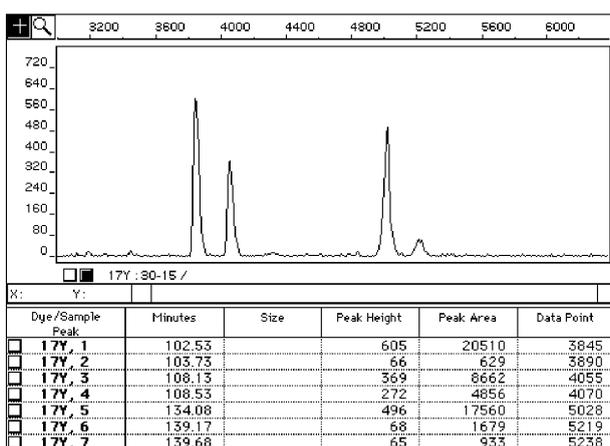
Abnahme der Heteroplasmie 11% bzw. 12% gegenüber 3% bei zwei Angehörigen (Tab. 5.3, Tab. 5.4).



Patient 124-II:2 - 4/1994

$$x = \frac{C-D/B \cdot A}{A+C} \cdot 100 = \frac{20764 - 2443}{40744} \cdot 100 = 45\%$$

A=19980  
 B=47753  
 C=20764  
 D= 5853



Patient 124-II:2 - 12/1999

$$x = \frac{C-D/B \cdot A}{A+C} \cdot 100 = \frac{17560 - 4085}{38699} \cdot 100 = 35\%$$

A=21139  
 B=13518  
 C=17560  
 D= 2612

Abb. 5.10 Zwei repräsentative Messungen aus dem Longitudinalvergleich des Heteroplasmiegrades (Anteil des mutanten 3460 mtDNA-Allels in %) bei einem betroffenen Mitglied (II:2) der LHON-Familie 124 (Tab. 5.3).

Bei zwei Familienmitgliedern (II:1, II:3) standen DNA-Proben von drei Zeitpunkten (4/1994, 4/1996 und 12/1999) zur Verfügung. Der ebenfalls erkrankte Sohn (II:1) wies bei allen drei Messungen einen Wert um 98% auf, während der gesunde Sohn (II:3) zwischen 4/1994 und 4/1996 eine Abnahme des Heteroplasmiegrades von 1% und zwischen 1996 und 12/1999 eine von 11% zeigte (Tab. 5.3, Tab. 5.4).

Patient/Proband	Messwerte der fluophormmarkierten Primerextension/RFLP-Analyse															
	Messung	DNA-Probe von 4/1994 Fluoreszenzwerte der Peakfläche					DNA-Probe von 4/1996 Fluoreszenzwerte der Peakfläche					DNA-Probe von 12/1999 Fluoreszenzwerte der Peakfläche				
		A	B	C	D	Anteil mutanter mtDNA in %	A	B	C	D	Anteil mutanter mtDNA in %	A	B	C	D	Anteil mutanter mtDNA in %
I:1	1.						18296	45318	9151	6684	23.51	5862	9177	3295	2486	18.64
	2.						17483	30303	10246	5163	26.21	15021	38228	5888	1887	24.61
	3.						20744	15586	11792	3339	22.58	36694	65079	15476	8395	20.59
	MW (SD)										24.10 (1.88)					21.28 (3.04)
II:1	1.	693	34386	36142	5687	97.81	846	58052	45886	10003	97.88	843	28316	46495	5537	97.87
	2.	485	39232	35771	8269	98.38	566	55806	30497	9486	97.87	635	35973	33960	7042	97.81
	MW					98.09					97.87					97.84
II:2	1.	3536	7076	4714	1687	46.92						10710	24926	8890	4840	34.75
	2.	12510	10256	12324	965	44.89						37236	23288	38535	5063	40.17
	3.	7368	5057	8434	426	49.45						4282	20209	2923	3739	29.57
	4.	19980	47753	20764	5853	44.95						21139	13518	17560	2612	34.82
	5.	15614	11424	14607	961	43.99						16279	11797	14663	2743	35.16
	MW (SD)					46.04 (2.18)										34.76 (3.77)

Tab. 5.3 Ergebnisse der fluorophormmarkierten Primerextension/RFLP-Analyse zur longitudinalen Bestimmung des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation bei Angehörigen I:1, II:1 und II:2 der LHON-Familie 124. Die hell- und dunkelgrau unterlegten Messwerte kennzeichnen repräsentative Werte, die in den Paarvergleich (Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test) eingegangen sind.

Patient/Proband	Messwerte der fluophormmarkierten Primerextension/RFLP-Analyse															
	Messung	DNA-Probe von 4/1994 Fluoreszenzwerte der Peakfläche					DNA-Probe von 4/1996 Fluoreszenzwerte der Peakfläche					DNA-Probe von 12/1999 Fluoreszenzwerte der Peakfläche				
		A	B	C	D	Anteil mutanter mtDNA in %	A	B	C	D	Anteil mutanter mtDNA in %	A	B	C	D	Anteil mutanter mtDNA in %
II:3	1.	20756	51149	14057	10438	28.21	24236	44791	15432	7255	29.01	37602	57072	17261	8378	21.40
	2.	20873	35885	15399	6858	31.46	4190	3819	1633	0	28.04	28136	18214	14514	4227	18.72
	3.	4021	20348	2131	2341	27.12	9539	9394	5068	755	29.45	17641	12198	9925	3425	18.04
	4.											7500	23949	2753	3907	14.92
	MW (SD)					29.93 (2.26)					28.83 (0.72)					18.27 (2.66)
II:4	1.	6139	19906	6320	3672	41.64						14834	37842	13188	6550	37.90
	2.	12398	36810	14924	5370	48.00						15906	20766	16594	4082	41.44
	3.	37236	23288	38535	5063	40.17						17368	24060	15568	3516	39.56
	MW (SD)					43.27 (4.16)										39.63 (1.77)

Tab. 5.4 Ergebnisse der fluorophormmarkierten Primerextension/RFLP-Analyse zur longitudinalen Bestimmung des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation bei Angehörigen II:3 und II:4 der LHON-Familie 124. Die hell- und dunkelgrau unterlegten Messwerte kennzeichnen repräsentative Werte, die in den Paarvergleich (Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test) eingegangen sind.

In der Prüfung auf statistische Signifikanz anhand repräsentativer Einzelmesswerte jedes Familienangehörigen wurde keine Veränderung des Heteroplasmiegrades festgestellt ( $p = 0.1441$ ). Bestätigt wird die deutliche Abnahme des Heteroplasmiegrades bei den Familienmitgliedern II:2 und II:3 durch die Ergebnisse der multiplen Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse (Abb. 5.11, Abb. 5.12). Sie zeigten bei den Familienmitgliedern II:2 und II:3 eine Abnahme von 49% (18/37) zu 28% (11/39) bzw. von 32% (11/34) zu 21% (8/37). Abb. 5.13 fasst die Ergebnisse der Longitudinalstudie zusammen.

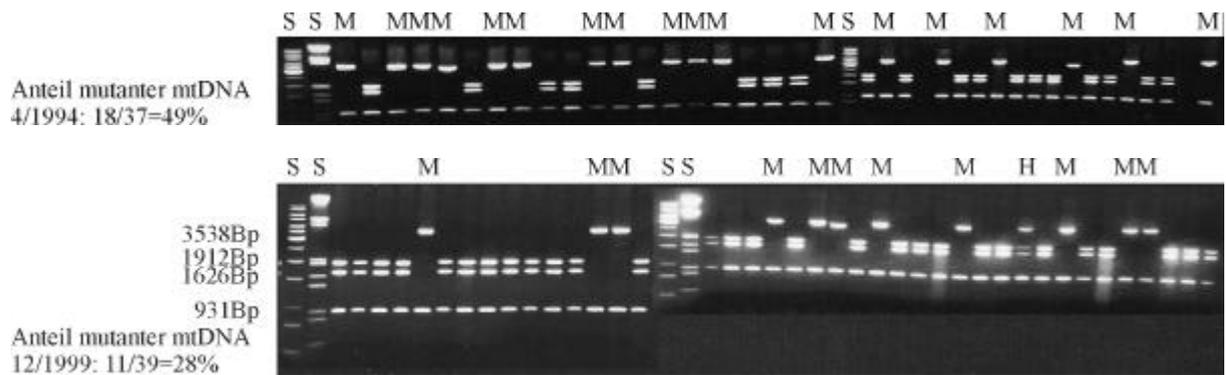


Abb. 5.11 Ergebnis der multiplen Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse zur longitudinalen Bestimmung des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation an Patient II:2 der LHON-Familie 124. Die Bande entsprechend dem Restriktionsfragment von 248Bp ist im Gelbild nicht sichtbar (s. 4.16). S = Längenstandard, M = „mutante Klone“, H = „heteroplasmatische Klone“; Anteil „mutanter Klone“/Gesamtheit auswertbarer Kbone ? 100 = Heteroplasmiegrad in %.

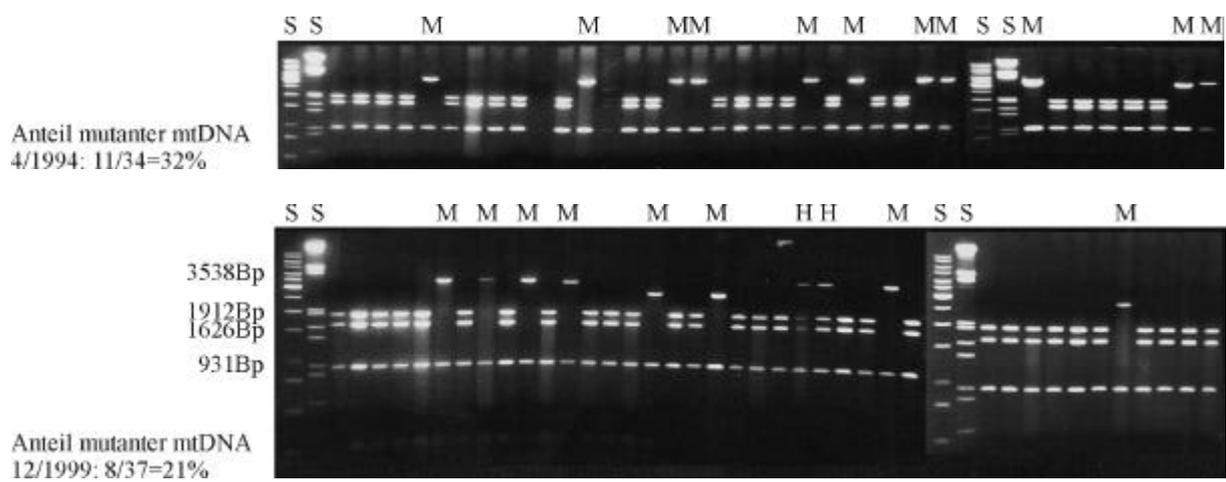


Abb. 5.12 Ergebnis der multiplen Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse zur longitudinalen Bestimmung des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation an Proband II:3 der LHON-Familie 124. Die Bande entsprechend dem Restriktionsfragment von 248Bp ist im Gelbild nicht sichtbar (s. 4.16). S = Längenstandard, M = „mutante Klone“, H = „heteroplasmatische Klone“; Anteil „mutanter Klone“/-Gesamtheit auswertbarer Klone ? 100 = Heteroplasmiegrad in %.

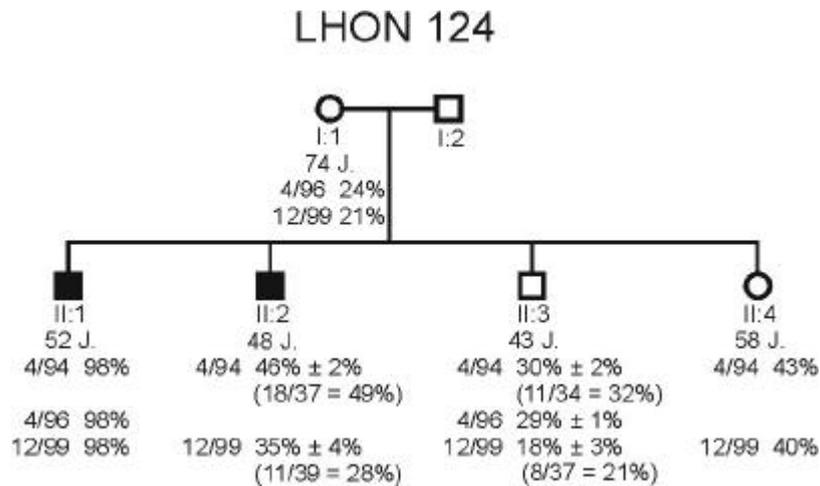


Abb. 5.13 Stammbaum der LHON-Familie 124 mit Heteroplasmie der G3460A Mutation. Die Altersangaben der untersuchten Patienten und Probanden beziehen sich auf den Zeitpunkt der ersten Blutentnahme. Mittelwert und Standardabweichung der bestimmten Heteroplasmiegrade sind den jeweiligen Daten der Blutentnahme zugeordnet. Bei zwei Angehörigen (II:2, II:3) mit ausgeprägter Abnahme des Heteroplasmiegrades sind die Anzahlen mutanter Klone nach multipler Einklonierung von PCR-Fragmenten und RFLP-Analyse in Klammern angegeben.

### 5.2.3 Schätzung der Anzahl segregierender mtDNA-Einheiten nach Transmissionsanalyse der LHON-Familie 124

Die Schätzung der Anzahl segregierender mtDNA-Einheiten in der LHON-Familie 124 wurde sowohl anhand der Heteroplasmiegradbestimmungen der älteren DNA-Proben (4/1994 bzw. 4/1996 für I:1) als auch anhand derjenigen der neueren DNA-Proben durchgeführt (s. 4.17). Nach Umformung der Wright-Solignac Gleichung gemäß

$$N \approx \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{V_n}{p_0(1 - p_0)}}}$$

ergibt sich für die bestimmten Heteroplasmiegrade von 98%, 46%, 30% und 42% der Nachkommen (Abb. 5.13) ein Schätzwert

$$N \approx \frac{1}{\sqrt{1 - \frac{0.09066667}{0.24(1 - 0.24)}}} \approx 35.4$$

Unter Zugrundelegen der für die neueren DNA-Proben bestimmten Heteroplasmiegrade von 98%, 35%, 18% und 40% ergibt sich

---

$$N = \frac{1}{1 + \sqrt[24]{\frac{0.12109167}{0.24(1 + 0.24)}}} = 22.5$$

### 5.3 Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen

Die Auswertung des Tübinger Kollektivs von LHON-Familien mit der Fragestellung der unterschiedlichen Heteroplasmieprävalenz in Familien, die eine der drei primären LHON-Mutationen aufweisen, zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0.0001$ ). Die 167 untersuchten LHON-Familien teilten sich in 125 Familien mit der G11778A Mutation, 22 mit der T14484C Mutation und 20 mit der G3460A Mutation auf. Bei sieben Familien (5.6%) mit der G11778A Mutation zeigte sich Heteroplasmie gegenüber jeweils acht Familien mit der G3460A Mutation (40%) und T14484C Mutation (36.4%).

---

## 6 Diskussion

### 6.1 Fluorophormarkierte Primerextensionsreaktion/RFLP-Analyse

Verfahren zur Bestimmung des Grades der Heteroplasmie von mtDNA-Mutationen gewinnen in der Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen zunehmend eine bedeutende Rolle. Neben den klassischen mitochondrial vererbten Erkrankungen wie der LHON und einer wachsenden Zahl neuentdeckter Erkrankungen, mehren sich die Hinweise, dass auch häufige, erworbene Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer (Shoffner, 1997), Diabetes mellitus (Graff *et al.*, 1997) und männliche Infertilität (Hargreave *et al.*, 1998) mit mtDNA-Mutationen ursächlich in Zusammenhang stehen. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen dem Anteil mutanter mtGenome und dem klinischen Phänotyp sowie der ausgesprochenen Dynamik des mtGenotyps besteht die Notwendigkeit eines sensitiven, spezifischen und praktikablen Detektionsassays für die klinische Anwendung. Diese Anforderungen werden weitgehend durch die entwickelte Modifikation der konventionellen PCR/RFLP-Analyse erfüllt.

Wie in den Messungen an Standardproben gezeigt, weist das Verfahren eine Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit mit einer mittleren Schwankungsbreite der Wiederholungsmessungen von 8% auf. Diese Parameter des entwickelten Detektionsassays sind ähnlich anderen, aufwendigeren Verfahren der Heteroplasmiebestimmung (Nollau & Wagener, 1997). Eine besonders hohe Sensitivität zeigte sich in der Heteroplasmiebestimmung von Proben mit hohem Anteil mutanter mtDNA, was auf die vorliegende Konfiguration des Assays mit Restriktionsverdau des Wildtyp- mtDNA-Allels zurückzuführen ist. Die Heteroplasmiegradbestimmung bei Proben von homoplasmatisch mutanter mtDNA lieferte stets einen Messwert von 100%. Ein abweichendes Resultat hätte bedeutet, dass das Restriktionsenzym *star*-Aktivität, d.h. eine aufgehobene Enzymspezifität besitzt, die das Assay unbrauchbar machen würde. Bei der Heteroplasmiebestimmung von Proben homoplasmatischer Wildtyp-mtDNA erhielten wir Messwerte im Bereich von -8 bis 3%. Dieses Ergebnis zeigt gleichsam die Grenzen der PCR/RFLP-basierten Verfahren in der quantitativen Mutationsanalyse auf, die auf Abschätzung des prozentualen Anteils mutanter mtDNA durch Korrekturberechnung wie im vorliegenden Assay oder durch Endpunktkontrolle der Verdaureaktion bauen (1.5.1.1). Beiden Varianten liegt die Annahme

eines linearen Zusammenhangs von Verdaueffizienz der Standard- und Proben-DNA zugrunde. Die höheren Messwertschwankungen bei Mischungen mit hohem Anteil gegenüber solchen mit geringem Anteil spaltbarer Wildtyp-mtDNA sind am wahrscheinlichsten auf Schwankungen im Verhältnis der Verdaueffizienzen zurückzuführen.

Von entscheidender Bedeutung für die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Detektionssassays ist die Verwendung der Vent (exo-) DNA-Polymerase in der Primerextensionsreaktion. Diese exonukleasefreie Variante einer thermostabilen DNA-Polymerase mit ausgesprochener Korrekturaktivität (*proofreading*) besitzt eine 1-2fach höhere Kopiergenauigkeit als die Taq DNA-Polymerase. Eine weitere Eigenschaft ist ihre hohe Aktivität, DNA-Einzelstränge zu verdrängen (*strand displacement*), die vermutlich für die Homogenität der Primerextensionsprodukte und damit für die Schärfe der Fluoreszenzbanden verantwortlich ist. *Strand displacement* bezeichnet die Fähigkeit der DNA-Polymerase einen Primerextensionsschritt bei Zusammentreffen mit einem in 3'-Richtung angelagerten Oligonukleotid fortzusetzen, indem dieses von der DNA-Matrize verdrängt wird. Die vorzeitige Aneinanderlagerung komplementärer DNA-Einzelstränge im Rahmen der Primerextensionsreaktion stellt möglicherweise ein kritisches Hindernis für die DNA-Strangsynthese dar, wenn hierfür eine DNA-Polymerase mit fehlender oder ungenügender *strand displacement*-Aktivität verwendet wird. Der Versuch der Primerextensionsreaktion mit einer Taq DNA-Polymerase führte zu verbreiterten, ungleichmäßigen Allelpeaks im Sinne so genannter Stotterbanden, die durch den „*slippage*-Effekt“ der Taq DNA-Polymerase erklärt werden.

Schließlich hat das entwickelte Verfahren durch die Verwendung fluoreszenzbasierter anstelle radioaktiver DNA-Markernsysteme den Vorzug, die Nachteile in der Handhabung und Entsorgung radioaktiver Substanzen zu vermeiden und gleichzeitig moderne Detektionstechnologie in Form eines automatischen DNA-Sequenziersystems zu nutzen. Weiterentwicklungen in der automatischen DNA-Analyse haben in den letzten Jahren eine Reihe neuer Technologien und methodischer Verbesserungen hervorgebracht, die in Zukunft auch in die quantitative Mutationsanalyse im Rahmen klinischer Diagnostik Eingang finden werden. An vorderster Stelle stehen hier Echtzeit-PCR- und Fluoreszenz-Detektionsverfahren unter Einsatz von Reporter-Farbstoffen wie dem TaqMan (Loeb *et al.*, 2000), den *molecular beacons* (Tyagi & Kramer, 1996) und *scorpions* (Thelwell *et al.*, 2000), die jedoch allesamt eine neue Hardware erfordern im Gegensatz zu dem von uns

---

entwickelten Verfahren, das mit der Standardausstattung eines modernen molekulargenetischen Labors auskommt.

## 6.2 Untersuchungen der Heteroplasmie der G3460A LHON Mutation

Die quantitativen und stochastischen Prinzipien der mitochondrialen Genetik sind in der Pathogenese und Vererbung mitochondrial vererbter Erkrankungen von großer Bedeutung. Bei der LHON, die durch relativ gering pathogene mtDNA-Mutationen, inkomplette Penetranz und einen vorwiegend homoplasmatischen mtGenotyp gekennzeichnet ist, wirkt sich der Anteil mutanter mtDNA-Allele weniger determinierend auf die Krankheitsentstehung als auf ihre Prädisposition aus. Da das Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren am Pathomechanismus der LHON ebenso wie effektive Therapiemöglichkeiten bis heute nicht bekannt sind, ist es wichtig das dynamische Vererbungs- und Segregationsmuster der LHON-Mutationen zu untersuchen. Familien mit der G3460A Mutation haben sich für diese Fragestellung als sehr geeignet erwiesen, da sie im Tübinger LHON-Kollektiv den größten Anteil heteroplasmatischer Stammbäume darstellen.

## 6.3 Variabilität und Zunahme des Heteroplasmiegrades in Folgegenerationen

Das Vererbungsmuster mitochondrial vererbter Erkrankungen kann quantitativ untersucht werden, indem man die Häufigkeitsverteilung der Differenzen des Heteroplasmiegrades zwischen Nachkommen und ihren jeweiligen Müttern ermittelt. Eine Zu- oder Abnahme des Anteils mutanter mtDNA-Allele bei den Nachkommen entlang einer maternalen Linie kann Ausdruck eines zufallsabhängigen Drifts oder einer Selektion eines mtDNA-Allels während der Transmission sein. Im Fall eines ausschließlich zufallsabhängigen Drifts ist eine symmetrische Abweichung vom Mittelwert Null zu erwarten, d.h. für eine ausreichend hohe Anzahl von Transmissionsereignissen ebenso Zu- wie Abnahmen des Heteroplasmiegrades. Unterliegt die mtDNA-Vererbung maßgeblich dem Einfluss von Selektionsmechanismen, so ist eine Verlagerung des mittleren Heteroplasmiegrades in der Nachkommenschaft zu erwarten (Chinnery *et al.*, 2000b; Abb. 5.9).

Die Untersuchung von 15 Transmissionsereignissen der G3460A Mutation bei vier LHON-Familien zeigte eine ausgeprägte Schwankungsbreite von -42% bis 74% bei einer

---

mittleren Differenz des Heteroplasmiegrades von 21.8% (SD 29.8%). Unter der Prämisse einer primär zufallsabhängigen mtDNA-Vererbung (1.1.3) erlaubt das Ausmaß der Schwankungsbreite einen Rückschluss auf die Breite des genetischen *bottlenecks*, d.h. der Anzahl segregierender mtDNA-Moleküle bzw. Einheiten eines vielfachen derselben (*segregating units*). Um diese zu ermitteln, wurde von Solignac und Mitarbeitern (1986) eine Formel (Wright-Solignac Gleichung) aufgestellt, die einem von Wright entwickelten mathematischen Modell zur Beschreibung des genetischen Drifts in definierten Populationen zugrunde liegt (Wright, 1967). Nach dieser Formel wird die Anzahl segregierender Einheiten (N) aus der Varianz der mutanten mtDNA-Allelfrequenz in der n-ten Generation ( $V_n$ ), der mutanten mtDNA-Allelfrequenz der Mutter ( $p_0$ ) und der Zellteilungszahl in der weiblichen Keimbahn (g) berechnet (4.17).

Das Modell hat den Nachteil, dass es eine grobe Vereinfachung des mtDNA-Vererbungsprozesses darstellt und auf einer vagen Schätzung wichtiger Parameter, wie z.B. der Zahl der Zellteilungen in der Keimbahn zwischen 10 und 50 beruht (Ashley *et al.*, 1989). So ergaben Schätzungen der Zahl segregierender Einheiten auf Grundlage der Wright-Solignac Gleichung einen Wert zwischen 1 und einigen Hundert (Ashley *et al.*, 1989; Howell *et al.*, 1992; Bendall *et al.*, 1996). Trotz dieser erheblichen Schwankungen wird die prinzipielle Gültigkeit dieses mathematischen Modells und somit die Hypothese des *random drift*-Modells gerade durch neuere Studienergebnisse weiter gestützt, die eine exaktere Schätzung der Zahl segregierender Einheiten erlauben. So fanden Jenuth und Mitarbeiter (1996) in Transmissionsstudien an heteroplasmatischen Mäusen eine hohe Übereinstimmung zwischen der errechneten Zahl von 185 segregierenden Einheiten und der geschätzten Zahl von 200 mtDNA-Molekülen pro primordialer Keimzelle. Dass auch die Vererbung humanpathogener mtDNA-Mutationen mit der Hypothese des *random drift*-Modells vereinbar ist, zeigt die Untersuchung von Brown und Mitarbeitern (2001). Sie bestimmten den Heteroplasmiegrad der A3243G mtDNA-Mutation an 82 primären Oozyten einer Patientin mit MELAS-Syndrom (MIM 540000) und fanden annähernd eine Binominalverteilung der mutanten mtDNA-Allelfrequenz.

Die Anwendung der Wright-Solignac Gleichung auf die in der vorliegenden Studie erhobenen Messwerte der Heteroplasmie ergibt für Familie 124 einen Wert von 35 segregierenden Einheiten unter der Annahme von 24 Zellteilungen bis zur reifen Eizelle (Jenuth *et al.*, 1996). Für eine andere LHON-Familie mit heteroplasmatischer G3460A Mutation

---

wurde ein Wert von 89 berechnet (Howell *et al.*, 1992). Werden die Heteroplasmiewerte der jüngsten DNA-Proben in Familie 124 zugrundegelegt, d.h. geht die Abnahme der mutanten mtDNA-Allelfrequenz mit zunehmendem Lebensalter in die Berechnung mit ein (5.2.2), so erhalten wir eine um mehr als ein Drittel geringere Schätzung der Anzahl segregierender Einheiten von 22. Der Effekt der longitudinalen Heteroplasmieabnahme bzw. negativen Selektion führt folglich zu einer Unterschätzung von  $p_0$ , d.h. des mütterlichen Heteroplasmiegrades bzw. einer Überschätzung des genetischen *bottlenecks*. Dieses Phänomen erklärt, weshalb für manche heteroplasmatischen Stammbäume kein logischer Wert der Anzahl segregierender Einheiten ermittelt werden kann (z.B. Stammbaum in Fig.1 in Ghosh *et al.*, 1996). Der Effekt von Selektionsmechanismen stellt neben gewebespezifischem Segregationsmuster, geringer Fallzahl humaner Stammbäume und spontaner Mutationsrate eine weitere systematische Fehlermöglichkeit in der Berechnung des genetischen *bottlenecks* nach der Wright-Solignac Gleichung dar.

Die hohe Schwankungsbreite der mutanten mtDNA-Allelhäufigkeit bei Nachkommen ist Ausdruck des primär zufallsabhängigen Vererbungsprozesses und somit konsistent mit der derzeitig vorherrschenden Vorstellung des *random drift* als dominierendes Prinzip in der mitochondrialen Genetik (Howell *et al.*, 2000b).

Im Gegensatz dazu, ist der Anstieg des mittleren Heteroplasmiegrades in Folgegenerationen als Hinweis auf einen möglichen selektiven Vorteil in der Vererbung mutanter mtGenome weniger eindeutig (Chinnery *et al.*, 2000b). Eine Zunahme der Häufigkeit mutanter mtDNA-Allele wurde bei in vitro-Untersuchungen und vereinzelt bei Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen berichtet (Yoneda *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1997). Sie wird ferner beim gesunden Menschen mit zunehmendem Alter beobachtet und gilt als ein Kennzeichen der „mitochondrialen Theorie des Alterungsprozess“ (Kadenbach *et al.*, 1995). Denkbar wäre demnach, dass es bei heteroplasmatischen Anlageträgerinnen zu einer selektiven Zunahme der mutanten mtDNA-Allelfrequenz in Eizellen kommt, die über mehrere Jahrzehnte in der Meiose I fixiert sind. Gegen eine solche Annahme sprechen jedoch bisherige Untersuchungsergebnisse der Heteroplasmiebestimmung an Eizellen (Brown *et al.*, 2001; Blok *et al.*, 1997). Der Einfluss positiver Selektionsmechanismen auf das mutante mtDNA-Allel bei LHON wurde bisher nicht festgestellt und steht im Gegensatz zu Beobachtungen einer Abnahme der mutanten mtDNA-Allelhäufigkeit in

---

mitotisch aktiven Geweben (tHart *et al.*, 1996; Howell *et al.*, 2000a), was nicht zuletzt durch unsere Langzeitbeobachtung der G3460A Mutation bestätigt werden konnte.

Eine alternative Deutung der Zunahme des mittleren Heteroplasmiegrades in Folge generationen ist ein zufälliger Sammlungsfehler infolge einer ungenügenden Zahl beobachteter Transmissionen. Tatsächlich wurden in früheren Heteroplasmieanalysen LHON-Stammbäume identifiziert, die sowohl ein Fehlen eines genetischen Drifts als auch eine rasche Fixierung in Richtung des normaltypischen oder mutanten mtDNA-Allels aufzeigten (Vilkki *et al.*, 1990; Black *et al.*, 1996). In anderen Untersuchungen überwiegt dagegen unseren Ergebnissen entsprechend der Drift zum mutanten mtGenotyp, so dass vielmehr ein systematischer Sammlungsfehler hierfür verantwortlich gemacht wird (Ghosh *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1993; Howell *et al.*, 1994). Dieser wird darin vermutet, dass in Vererbungsanalysen allein solche LHON-Familien erfasst werden, die einen im Mittel hohen Anteil mutanter mtDNA-Allele aufweisen, der infolge des genetischen Drifts zu einer weiteren Zunahme des Heteroplasmiegrades prädisponiert. Der Grund für diesen Erhebungsfehler ist, dass die Identifizierung von Familien, in denen LHON-Mutationen segregieren, an die Krankheitsmanifestation mindestens eines Angehörigen gebunden ist, was wiederum aufgrund des Schwellenwerteffektes (s. 1.4.3) mit einem höheren Heteroplasmiegrad assoziiert ist. Eine zusätzliche Möglichkeit eines systematischen Fehlers entsteht durch die Abnahme der Heteroplasmie mit zunehmendem Lebensalter (s. 5.2.2). Ähnlich der Berechnung der Anzahl segregierender Einheiten nach der Wright-Solignac Gleichung wirkt sich dieser Effekt verhältnismäßig stärker auf die zum Zeitpunkt der DNA-Probengewinnung ältere Eltern generation aus. Die Folge ist eine Überschätzung des Ausmaßes des genetischen Driftes.

#### **6.4 Konstanz und Abnahme des Heteroplasmiegrades in der Langzeitbeobachtung**

Da die Bestimmung der Heteroplasmie beim Menschen üblicherweise anhand von Leukozyten-DNA erfolgt, gehen bei der Vererbungsanalyse von mtDNA-Mutationen die Segregationseigenschaften von mindestens drei Zellsystemen mit ein, und zwar die des hämatopoetischen Systems der Mutter und des Nachkommen sowie der Keimbahn der Mutter. Im Gegensatz dazu stellt die Heteroplasmiebestimmung über einen längeren Beobachtungszeitraum die Möglichkeit einer direkten Segregationsanalyse von LHON-Mutationen in

---

nur einem Zellsystem dar. Wir führten eine solche Longitudinalstudie an fünf heteroplasmatischen Mitgliedern der LHON-Familie 124 durch. Diese zeigte keine statistisch signifikante Veränderung des Heteroplasmiegrades. Die geringe Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0.1441$  lässt jedoch die Annahme einer signifikanten Abnahme der mutanten mtDNA-Allelfrequenz bei Untersuchung eines größeren Kollektivs zu. Bemerkenswert ist die ausgeprägte Verminderung des Heteroplasmiegrades bei einem betroffenen und einem gesunden Familienangehörigen, während bei den anderen eine nur geringe Abnahme festgestellt wurde. Die Beobachtung einer hohen Abnahme des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation ist ein wichtiges Ergebnis, da sie in früheren Untersuchungen nicht beobachtet worden war und eine negative Selektion der G3460A Mutation in den hämatopoetischen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen anzeigt. Über Jahre galt die Meinung einer stabilen Segregation von LHON-Mutationen als vorherrschend (Ghosh *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1994) bis Howell und Mitarbeiter Anfang 2000 in einer Nachuntersuchung ihre früheren Untersuchungsergebnisse revidierten und erstmals den Hinweis auf eine longitudinale Heteroplasmieabnahme lieferten (Howell *et al.*, 2000a). Da zum Zeitpunkt unserer Beobachtung der Heteroplasmieabnahme Howells Ergebnisse noch nicht veröffentlicht und uns daher unbekannt waren, wendeten wir zusätzlich zur quantitativen Heteroplasmiebestimmung mittels des entwickelten Primerextension/RFLP-Assays das aufwendige Verfahren der multiplen Einklonierung von PCR-Fragmenten mit anschließender RFLP-Analyse an (Howell & McCullough, 1990). Die mit diesem Verfahren erhobenen Heteroplasmiewerte lagen im Mittel bei  $\pm 3.75\%$  der mittels Primerextension/RFLP-Assay bestimmten Werte und bestätigten somit diese Ergebnisse (Abb. 5.13). Die möglichen Gründe, weshalb eine deutliche Abnahme der mutanten mtDNA-Allelfrequenz nicht bereits in früheren LHON-Studien festgestellt wurde, sind vielfältig. Die negative Selektion der G3460A Mutation kann ein seltenes, unstetig wirksames Ereignis darstellen, die Nachbeobachtungszeit früherer Untersuchungen zu kurz, oder die verwendeten Verfahren der Heteroplasmiebestimmung können zu ungenau gewesen sein. Bei Proband II:3 der LHON-Familie 124 bestimmten wir eine geringe Abnahme des Heteroplasmiegrades von 30% auf 29% zwischen April 1994 und April 1996, jedoch eine weitere Verminderung der mutanten mtDNA-Allelhäufigkeit um 11% bis zum Dezember 1999. Dieser Verlauf spricht eher für eine unstetige denn stetige Abnahme des Anteils mutanter mtDNA-Allele in Leukozyten, was mit der Bestimmung geringer, im Bereich des Messwertfehlers

---

liegender Abnahmen des Heteroplasmiegrades bei der nicht betroffenen Mutter (124-I:1) und Schwester (124-II:4) vereinbar ist. Bei einem erkrankten Sohn (124-II:1) bestimmten wir in drei DNA-Proben, entnommen zwischen 1994 und 1999, konstant eine Heteroplasmie von 98%. Aufgrund der hohen Messgenauigkeit unseres Assays im Bereich hoher Heteroplasmiewerte (s. Tab. 5.2) ist bei diesem Patienten tatsächlich von einem heteroplasmatischen mtGenotyp mit hohem Anteil mutanter mtDNA als von einem vermeintlich homoplasmatisch mutantem mtGenotyp auszugehen. Die Konstanz des Heteroplasmiegrades ist in diesem Fall am ehesten durch die fehlende Wirkung des negativen Selektionsmechanismus auf das mutante mtDNA-Allel bei sehr geringem Anteil normaltypischer mtDNA zu erklären. Die in unserer Longitudinalstudie beobachtete unstetige Abnahme des mutanten mtDNA-Allelanteils lässt die Berechnung einer mittleren Reduktionsrate des Heteroplasmiegrades pro Jahr, wie von anderen Untersuchern unternommen (Howell *et al.*, 2000a; 'tHart *et al.*, 1996), nicht sinnvoll erscheinen. In der Longitudinalstudie von Howell und Mitarbeitern (2000a) zeigten mindestens zwei von acht untersuchten Probanden eine eher unstetige als stetige Abnahme des Heteroplasmiegrades der G3460A Mutation. Bei keinem LHON-Anlagenträger wurde bislang eine longitudinale Zunahme der Häufigkeit des mutanten mtDNA-Allels festgestellt. Ebenso bemerkenswert ist, dass kein Anlagenträger mit einer longitudinalen Heteroplasmieabnahme initial eine mutante mtDNA-Allelhäufigkeit von mehr als 50% aufwies.

Während die Einflussmöglichkeit einer negativen Selektion auf die G3460A Mutation in Leukozyten durch die in der vorliegenden Untersuchung und die von Howell und Mitarbeitern (2000a) gefundenen Abnahmen des Heteroplasmiegrades belegt wird, kann über Art und Ort möglicher Mechanismen nur spekuliert werden. Denkbar ist eine bevorzugte Replikation normaltypischer mtDNA-Moleküle, die das Verhältnis von mutantem zu Wildtyp-mtDNA-Allel zugunsten des letzteren verschiebt. Ein Replikationsvorteil des Wildtyp-mtDNA-Allels könnte entsprechend der unterschiedlichen Ebenen, auf denen Heteroplasmie vorliegen kann, auf inter- oder subzellulärer Ebene oder einer Kombination davon wirksam sein. Geht man von einem vorwiegend interzellulär wirksamen Selektionsmechanismus aus, so könnte der beobachtete genetische Drift zum Wildtyp-mtDNA-Allel aus einer höheren mitotischen Aktivität hämatopoetischer Stammzellen mit hohem Wildtyp-mtDNA-Allelanteil resultieren. Diese Hypothese hat den Vorteil, dass sie einfach ist und keine Spekulationen über unbestimmte genotypspezifische Regulationsmechanismen

---

der mtDNA-Replikation auf subzellulärer Ebene bemüht. Howell und Mitarbeiter (2000a) vermuten weitergehend, dass einem interzellulären Selektionsmechanismus vorwiegend Heteroplasmie infolge von Mischpopulationen homoplasmatisch mutanter und normaltypischer Stammzellen zugrunde liegt. Unter dieser Annahme wäre die Möglichkeit einer gerichteten mtDNA-Segregation als weiterer Selektionsmechanismus ausgeschlossen. Gestützt wird Howells Hypothese indirekt durch Studien, in welchen anhand von Einzelzellanalysen hohe Anteile homoplasmatischer Zellen bei Heteroplasmie der G11778A Mutation und natürlichen Polymorphismen nachgewiesen werden konnten (Kobayashi *et al.*, 1994; Bendall *et al.*, 1996; Jenuth *et al.*, 1996). Andere Befunde stehen hierzu jedoch im Widerspruch und weisen eher auf eine vorwiegend intra- denn interzelluläre Heteroplasmie bei mischerbigen Anlageträgern der G11778A Mutation hin (Matthews *et al.*, 1995).

Ein anderer, möglicherweise eher auf subzellulärer Ebene wirksamer Selektionsmechanismus könnte in einer selektiven Degradation von Mitochondrien mit mutanten mtDNA-Molekülen bestehen. Der Abbau von Mitochondrien ist neben ihrer Synthese wichtigster Prozess im natürlichen Lebenszyklus der Mitochondrien. Dabei spielt vermutlich die Ausbildung so genannter *permeability transition*-Poren eine zentrale Rolle, wobei es sich um eine plötzliche Permeabilitätszunahme der inneren Mitochondrienmembran für Moleküle eines bestimmten Größebereichs handelt (Lemasters *et al.*, 1998). Eine Schlüsselfunktion wird der Ausbildung der *permeability transition*-Poren auch bei der Apoptose zugeschrieben, die neben anderen Ursachen durch reaktive Sauerstoffradikale ausgelöst werden kann. Da die primären LHON-Mutationen mit erhöhter Bildung von Sauerstoffradikalen einhergehen, könnte dieser Mechanismus für eine selektive Degradation von Mitochondrien mit überwiegend mutanten mtDNA-Molekülen verantwortlich sein. Eine physiologische Bedeutung dieses Mechanismus wird im Abbau von Mitochondrien, bei denen sich mtDNA-Defekte infolge des insuffizienten mtDNA-Reparaturmechanismus akkumuliert haben, vermutet.

Die Hypothese intrazellulär wirksamer Selektionsmechanismen ist besonders reizvoll in bezug auf die mögliche Bedeutung, die sich hieraus für die Stabilität des mtGenotyps retinaler Ganglienzellen ergibt. Von besonderem Interesse ist diese Frage vor dem Hintergrund spontaner Visusremissionen, die in einzelnen LHON-Fällen noch einige Jahre nach dem initialen Sehverlust auftreten. Die Beobachtung von Visusremissionen gibt einen

---

wichtigen Hinweis auf die Pathophysiologie der LHON, da sie bedeutet, dass der Atmungskettendefekt beim LHON-Patienten nicht unweigerlich zu einem irreversiblen Ganglienzellschaden führen muss (Howell, 1998b). Mögliche Ursachen einer spontanen Visusremission sind hormonale, gewebespezifische und bisher unbekannt genetische Einflussfaktoren bei homoplasmatischen Patienten. Ein zusätzlich denkbarer Mechanismus der Visusremission heteroplasmatischer Patienten wäre die Verbesserung der Atmungskettenfunktion in retinalen Ganglienzellen durch negative Selektion mutanter mtDNA. Tatsächlich war es bei einem Patienten (124-II:2) mit einer deutlichen Heteroplasmieabnahme in der Langzeitbeobachtung zu einer spontanen Visusremission gekommen, während der ebenfalls betroffene Bruder (124-II:1) beständig einen mutanten mtDNA-Allelanteil von 98% aufwies und stark sehbehindert blieb. Bemerkenswert ist die häufigere Beobachtung von Sehverbesserungen bei hetero- gegenüber homoplasmatischen Patienten (Leo-Kottler *et al.*, 2000).

Das Verständnis der grundlegenden Regulationsmechanismen des mitochondrialen genetischen Systems ebenso wie ihre zelltyp- und gewebespezifischen Unterschiede ist heute noch sehr unvollständig (Shadel & Clayton 1997). In Zellkulturstudien und an Patienten mit verschiedenen heteroplasmatischen mtDNA-Mutationen wurden in Langzeitbeobachtungen sowohl Zu- als auch Abnahmen der mutanten mtDNA-Allelfrequenz ebenso wie eine Stabilität des mtGenotyps festgestellt (Weber *et al.*, 1997; Kawakami *et al.*, 1994; 'tHart *et al.*, 1997; Dahl *et al.*, 2000). Die Analysen an Patienten deuten tendenziell auf einen Unterschied zwischen mitotischem und postmitotischem Gewebe hin (Howell *et al.*, 2000b). Während an Leukozyten-mtDNA in einigen Untersuchungen über eine Abnahme der Heteroplasmie berichtet wird, weisen andere Studien in Muskelgewebe eher auf eine Zunahme der mutanten mtDNA-Allelhäufigkeit hin. Im Fall eines Patienten mit einem MELAS-Syndrom und der 3243 mtDNA-Mutation dagegen wurde eine Zunahme der Muskelkraft in Beziehung zur beobachteten Abnahme der mutanten mtDNA-Allelhäufigkeit im Muskelgewebe gesetzt (Kawakami *et al.*, 1994). Diese teilweise gegensätzlichen Ergebnisse der Veränderungen des Heteroplasmiegrades im Langzeitvergleich sprechen für die Bedeutung mutations- und gewebespezifischer Faktoren, womit eine longitudinale Heteroplasmieabnahme der G3460A Mutation in retinalen Ganglienzellen nicht auszuschließen ist.

---

## **6.5 Zusammenfassung der Untersuchungen der Heteroplasmie der G3460A LHON Mutation**

Kernaussage der Querschnitts- (5.2.1) und Longitudinalstudie (5.2.2) der Heteroplasmie der G3460A Mutation ist, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl zufallsabhängige als auch negative Selektionsmechanismen in der Segregation und Vererbung der LHON-Mutation eine Rolle spielen. Eine besondere Bedeutung des Phänomens der negativen Selektion liegt in ihrer möglichen Relevanz für den Krankheitsverlauf. Die Fragen der genauen Wirkungsweise dieser Mechanismen, ob einzeln oder wechselseitig, und ihrer zugrundeliegenden, möglicherweise gewebe- und genotypspezifischen Einflussfaktoren zu beantworten, wird zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

## **6.6 Unterschied in der Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen**

Die Analyse der Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen stellt eine ergänzende Untersuchung zur Heteroplasmieanalyse in LHON-Familien mit der G3460A Mutation dar. Während die Querschnitts- und Longitudinalstudie Aufschluss über das dynamische Segregationsverhalten der G3460A Mutation gibt, eröffnet der Vergleich der Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen die Möglichkeit, die Bedeutung des Heteroplasmiephänomens unter Berücksichtigung genotypspezifischer Faktoren und zwar der besonderern phänotypischen, biochemischen und genetischen Eigenschaften zu analysieren (s. 1.4.3).

Die Vergleich der Heteroplasmieprävalenz anhand des Tübinger LHON-Kollektivs ergab eine siebenfach höhere Prävalenz bei LHON-Familien mit einer G3460A (40%) oder T14484C (36.4%) Mutation gegenüber der G11778A (5.6%) Mutation. Obwohl prinzipiell ein systematischer Erhebungsfehler als Ursache dieses signifikanten Heteroplasmieunterschiedes nicht ausgeschlossen werden kann, etwa durch unterschiedlich umfangreiche Analysen von gesunden Familienangehörigen, ist diese Fehlermöglichkeit praktisch zu vernachlässigen, da sie grundsätzlich unabhängig vom Mutationstyp erfolgten.

Die Literaturangaben zur Heteroplasmieprävalenz beziehen sich meist auf die häufigste der primären LHON-Mutationen, die G11778A Mutation, für die eine Prävalenz von 7% bei

---

LHON-Patienten (Smith *et al.*, 1993) und 14% der LHON-Familien (Newman *et al.*, 1991; Nikoskelainen *et al.*, 1996) angegeben wird. Der Unterschied der Heteroplasmieprävalenz in LHON-Familien mit der G11778A Mutation zwischen unserem Patientenkollektiv (5.6%) und den Literaturangaben (14%) könnte durch unterschiedlich umfangreiche Analysen von gesunden Familienangehörigen oder durch phylogenetisch ältere G11778A Mutationen in unserem Kollektiv zu erklären sein (s.1.1.3).

Im Gegensatz zur G11778A Mutation sind die Angaben zur Heteroplasmieprävalenz der G3460A und T14484C Mutationen in der Literatur weniger eindeutig. Harding und Mitarbeiter (1995) berichteten über eine Häufigkeit der Heteroplasmie von 7.6% (5/66) bei LHON-Familien mit der G11778A Mutation, 25% (2/8) bei der G3460A Mutation und 18% (11/18) bei der T14484C Mutation. Die Autoren stellten in ihrer Studie ebenfalls eine höhere Heteroplasmieprävalenz bei LHON-Patienten mit der G3460A oder T14484C Mutation gegenüber solchen mit der G11778A Mutation fest, jedoch auf vergleichsweise niedrigem Niveau (4%). Howell und Mitarbeiter (1991b) fanden Heteroplasmie der G3460A Mutation bei 33% (2/6) untersuchter LHON-Familien und bei 22% (2/9) der LHON-Patienten. Im Gegensatz hierzu konnten Huoponen und Mitarbeiter (1991) Heteroplasmie bei 10 betroffenen und gesunden Trägern der G3460A Mutation dreier Familien ausschließen. Oostra und Mitarbeiter (1994a) fanden Heteroplasmie bei zwei LHON-Familien mit der G3460A Mutation (100%) und nur in 13% (2/15) von LHON-Familien mit der G11778A Mutation. Die unterschiedlichen Angaben zur Heteroplasmieprävalenz der G3460A und T14484C Mutation sind am ehesten auf die geringe Anzahl untersuchter LHON-Familien zurückzuführen. Eine Tendenz zu höherer Heteroplasmieprävalenz in LHON-Familien mit G3460A bzw. T14484C Mutation gegenüber der G11778A Mutation in den Literaturangaben wird durch die vorliegenden Ergebnisse der bislang umfangreichsten Untersuchung bestätigt.

Als Ursache der unterschiedlichen Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen können zunächst genotypspezifische Vererbungs- und Segregationseigenschaften vermutet werden. Solche Unterschiede sind jedoch bis heute nicht bekannt. Die ausgesprochene Schwankungsbreite des Heteroplasmiegrades zwischen Familienangehörigen, sowie die Tendenz der Zunahme des Anteils mutanter mtDNA-Allele in Folgegenerationen sind Phänomene, die sowohl in Zusammenhang mit der G11778A als auch der G3460A Mutation beobachtet wurden (Lott *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993; Ghosh *et*

---

*al.*, 1996). Die Segregation mutanter mtDNA-Moleküle unter dem Einfluss negativer Selektionsmechanismen wurde bislang nur für die G3460A Mutation beobachtet (Howell *et al.*, 2000a; vorliegende Studie). Dass diesem Mechanismus eine Bedeutung im Segregationsverhalten der G11778A Mutation zukommt ist unwahrscheinlich, da er der Tendenz einer höheren Homoplasmierate der G11778A Mutation gegensinnig ist. Die Arbeitsgruppe von Huoponen (2001) konnte in Longitudinalstudien an heteroplasmatischen Individuen mit der G11778A Mutation keine signifikanten Veränderungen des Heteroplasmiegrades finden. Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied zwischen den drei primären LHON-Mutationen ist der hohe Anteil an Einzelfällen von LHON-Patienten mit der G11778A Mutation von 58% (Newman *et al.*, 1991), was zusammen mit der hohen Homoplasmierate für die rasche Segregation der G11778A mutanten mtDNA-Allele zu einem homoplasmatischen mtGenotyp spricht.

Als weitere, indirekte Ursachen der unterschiedlichen Heteroplasmieprävalenz zwischen den primären LHON-Mutationen kommen Unterschiede in der Assoziation mit bestimmten mtDNA-Haplogruppen und in der Schwere des biochemischen Defektes der einzelnen LHON-Mutationen in Frage (s. 1.4.2). Das von bestimmten Haplogruppen unabhängige Auftreten und der relativ schwere Atmungskettendefekt der G3460A Mutation lassen auf eine höhere Pathogenität und größere Bedeutung der Heteroplasmie als determinierender Faktor im Vergleich zur G11778A Mutation schließen. Die im Allgemeinen schwache Korrelation zwischen mutanter mtDNA-Allelfrequenz und dem Krankheitsrisiko der LHON (s. 1.4.3) steht dabei nicht im Widerspruch zu dieser Annahme, da sie allein auf gewebespezifische Unterschiede im Heteroplasmiegrad zurückgeführt werden kann. Howell und Mitarbeiter (1994) fanden in einer post mortem-Studie einer Patientin mit der G11778A Mutation einen Anteil mutanter mtDNA-Allele von 33% in Leukozyten, jedoch 95% und 100% in Sehnerven- und Retinagewebe. Ein Patient unseres LHON-Kollektivs mit der G3460A Mutation wies einen Anteil mutanter mtDNA-Allele von 26% auf (192-VI:8), während bei einem Patienten in den Untersuchungen von Black und Mitarbeitern (1996) ein Heteroplasmiegrad von 15% bestimmt wurde. Nach Huoponen (2001) korreliert ein hoher Heteroplasmiegrad in Leukozyten mit einem hohem Anteil mutanter mtDNA-Allele in anderen Geweben, während ein niedriger Heteroplasmiegrad mit einer höheren Variabilität zwischen verschiedenen Geweben einhergeht.

---

Paradoxerweise zeigen die geltend gemachten Faktoren einer höheren Heteroplasmieprävalenz der G3460A Mutation in LHON-Familien mit der T14484C Mutation eine genau gegensätzliche Ausprägung. Die T14484C Mutation weist biochemisch den mildesten Defekt und die häufigste Assoziation mit der Haplogruppe J (80%) auf. Den Sekundärmutationen dieser Haplogruppe wurde ein Synergismus auf den Schwellenwerteffekt bei heteroplasmatischen Anlageträgern zugeschrieben (Johns *et al.*, 1992). In bezug auf die G11778A Mutation ist die Bedeutung der Sekundärmutationen an der Krankheitsentstehung der LHON jedoch umstritten (Nikoskelainen *et al.*, 1996; Howell *et al.*, 1998b; Lodi *et al.* 2000).

Zusammenfassend weist das Ergebnis der unterschiedlichen Heteroplasmieprävalenzen auf genotypspezifische Unterschiede im Segregationsverhalten und in der Einflussmöglichkeit pathogenetischer Co-Faktoren hin. Die hierdurch angedeuteten Unterschiede in der LHON-Pathogenese der primären LHON-Mutationen spiegeln sich in unterschiedlichem Krankheitsverlauf und –prognose wieder und bedürfen der Berücksichtigung in der Entwicklung zukünftiger präventiver oder therapeutischer Verfahren.

---

## 7 Zusammenfassung

Die LHON gilt als Prototyp einer mitochondrial vererbten Erkrankung, deren Hauptmerkmale die maternale Vererbung, der durch eine mtDNA-Mutation verursachte Atmungskettendefekt und die Bedeutung quantitativ-stochastischer Prinzipien der Mitochondriengenetik für die Krankheitsmanifestation sind (Schwellenwerteffekt). Von anderen mitochondrialen Erkrankungen unterscheidet sich die LHON durch einige besondere Merkmale wie das vorwiegende Auftreten bei jungen Männern, die geringe Penetranz und ihr oligosymptomatisches Krankheitsbild. Diese Besonderheiten weisen daraufhin, dass in der LHON-Pathogenese gewebespezifische, umweltbedingte und andere genetische Faktoren eine wichtige Rolle spielen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Vererbungs- und Segregationseigenschaften von LHON-Mutationen als wichtigsten pathogenetischen Faktor am Beispiel von LHON-Familien mit Heteroplasmie G3460A Mutation. Die Vererbung wurde untersucht, indem quantitative Änderungen des Heteroplasmiegrades zwischen Angehörigen verschiedener Generationen einer Familie analysiert wurden. Hierzu konnten die Ergebnisse von 15 Transmissionsereignissen bei 23 Patienten und gesunden Anlagenträgern aus vier unverwandten LHON-Familien herangezogen werden. Die Analyse der Segregationseigenschaften erfolgte in einer Longitudinalstudie über 5½ Jahre an fünf Patienten und gesunden Anlagenträgern einer LHON-Familie. Zur Durchführung der Heteroplasmieanalysen diente ein Detektionsassay, das auf der Grundlage einer fluorophormarkierten Primerextensionsreaktion und PCR/RFLP-Analyse entwickelt wurde. Die Validität und Messgenauigkeit des Verfahrens konnten in Wiederholungsmessungen von Standardproben nachgewiesen werden. Das entwickelte Detektionsassay zeichnet sich durch seine Einsatzmöglichkeit als routinemäßiges Verfahren und Modifikationsfähigkeit zur Analyse weiterer Punktmutationen aus. Die Ergebnisse der Heteroplasmieanalysen zeigten tendenziell eine Zunahme des Heteroplasmiegrades in der Folgegeneration, während sich in der Longitudinalbeobachtung der mtGenotyp entweder quantitativ nicht veränderte oder aber eine deutliche Abnahme des relativen Anteils mutanter mtDNA-Allele zeigte. Die Befunde deuten darauf hin, dass in der Vererbung der G3460A Mutation vermutlich vorwiegend zufallsabhängige Mechanismen zu einem genetischen Drift führen, während negative Selektionsmechanismen des mutanten mtDNA-Allels in der Segregation auf der Ebene der hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle spielen.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Heteroplasmieprävalenz der drei primären LHON-Mutationen anhand von Ergebnissen der molekulargenetischen Diagnostik an 167 Familien des Tübinger LHON-Kollektivs ermittelt. Sie ergab eine siebenfach höhere Prävalenz bei LHON-Familien mit einer G3460A (40%) oder T14484C (36.4%) Mutation gegenüber der G11778A (5.6%) Mutation. Diese Ergebnisse sprechen für genotypspezifische Unterschiede im Vererbungsmuster, Segregationsverhalten und Einfluss pathogenetischer Co-Faktoren der drei primären LHON-Mutationen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben neue Einsichten in die Dynamik des mtGenotyps und die Bedeutung genotypspezifischer Faktoren in der Krankheitsentstehung. Unter diesem Eindruck entwickelt sich die LHON zunehmend zu einem in seinen molekularen Ursachen heterogenen Krankheitsbild oder wie Harding und Mitarbeiter (1995) festgestellt haben "*LHON, in many ways the prototype of mitochondrial inheritance, may well turn out to be more etiologically complex than other human diseases associated with defects of mtDNA*".

.

---

## 8 Literatur

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981). Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

Attardi, G., Yoneda, M., Chomyn, A. (1995). Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271: 241-248.

Ashley, M. V., Laipis, P. J., Hauswirth, W. W. (1989). Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 17: 7325-7331.

Bendall, K. E., Macaulay, V. A., Baker, J. R., Sykes, B. C. (1996). Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1276-1287.

Besch, D., Wissinger, B., Zrenner, E., Leo-Kottler, B. (2000). Ein Fall von Leberscher Optikusneuropathie (LHON) mit einer neuen Punktmutation im Cytochrom-b-Gen. *Ophthalmologie* 97: 22-26.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Birky, C. W. J., Maruyama, T., Fuerst, P. (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103: 513-527.

Black, G. C., Morten, K., Laborde, A., Poulton, J. (1996). Leber's hereditary optic neuropathy: heteroplasmy is likely to be significant in the expression of LHON in families with the 3460 ND1 mutation. *Br. J. Ophthalmol.* 80: 91-97.

Blok, R. B., Gook, D. A., Thorburn, D. R., Dahl, H. H. (1997). Skewed segregation of the mtDNA nt 8993 (T>G) mutation in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1495-1501.

- 
- Bolhuis, P. A., Bleeker-Wagemakers, E. M., Ponne, N. J., Van Schooneveld, M. J., Westerveld, A., Van den Bogert, C., Tabak, H. F. (1990). Rapid shift in genotype of human mitochondrial DNA in a family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 994-997.
- Brown, M. D., Sun, F., Wallace, D. C. (1997). Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 381-387.
- Brown, M. D., Trounce, I. A., Jun, A. S., Allen, J. C., Wallace, D. C. (2000). Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J. Biol. Chem.* 275: 39831-39836.
- Brown, D. T., Samuels, D. C., Michael, E. M., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F. (2001). Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 533-536.
- Carelli, V., Ghelli, A., Bucchi, L., Montagna, P., De Negri, A., Leuzzi, V., Lenaz, G., Lugaresi, E., Degli Esposti, M. (1999). Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol.* 45: 320-328.
- Chalmers, R. M., Schapira, A. H. (1999). Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1410: 147-158.
- Chinnery, P. F., Johnson, M. A., Wardell, T. M., Singh-Kler, R., Hayes, C., Brown, D. T., Taylor, R. W., Bindoff, L. A., Turnbull, D. M. (2000a). The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.* 48: 188-193.
- Chinnery, P. F., Thorburn, D. R., Samuels, D. C., White, S. L., Dahl, H. M., Turnbull, D. M., Lightowlers, R. N., Howell, N. (2000b). The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 16: 500-505.
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S. T., Nonaka, I., Angelini, C., Attardi, G. (1992). MELAS mutation in mtDNA binding site for

---

transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 4221-4225.

Dahl, H. H., Thorburn, D. R., White, S. L. (2000). Towards reliable prenatal diagnosis of mtDNA point mutations: studies of nt8993 mutations in oocytes, fetal tissues, children and adults. *Hum. Reprod.* 15: 246-255.

Fahy, E., Nazarbahi, R., Zomorodi, M., Herrstadt, C., Parker, W. D., Davis, R. E., Ghosh, S. S. (1997). Multiplex fluorescence-based primer extension method for quantitative mutation analysis of mitochondrial DNA and its diagnostic application for Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 25: 3102-3109.

Fausser, S., Wissinger, B. (1997). Simultaneous detection of multiple point mutations using fluorescence-coupled competitive primer extension. *Biotechniques* 22: 964-968.

Fuchs, R., Blakesley, R. (1983). Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* 100: 30-38.

Ghosh, S. S., Fahy, E., Bodis-Wollner, I., Sherman, J., Howell, N. (1996). Longitudinal study of a heteroplasmic 3460 Leber hereditary optic neuropathy family by multiplexed primer-extension analysis and nucleotide sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 325-334.

Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 77: 6715-6179.

Graff, C., Clayton, D. A., Larsson, N. G. (1999). Mitochondrial medicine recent advances. *J. Intern. Med.* 246: 11-23.

Harding, A. E., Sweeney, M. G., Govan, G. G., Riordan-Eva, P. (1995). Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 77-86.

Hargreave, T. B., Ghosh, C., Cooke, H. (1998). Genetics of male infertility. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145: 143-151.

---

't Hart, L. M., Jansen, J. J., Lemkes, H. H., de Knijff, P., Maassen, J. A. (1996). Heteroplasmy levels of a mitochondrial gene mutation associated with diabetes mellitus decrease in leucocyte DNA upon aging. *Hum. Mutat.* 7: 193-197.

Hauswirth, W. W., Laipis, P. J. (1985). In: Quagliariello, E. (ed.) *Achievements and Perspectives of Mitochondrial Research*. Elsevier. pp. 49-59.

Holt, I. J., Miller, D. H., Harding, A. E. (1989). Genetic heterogeneity and mitochondrial DNA heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *J. Med. Genet.* 26: 739-743.

Howell, N., McCullough, D. (1990). An example of Leber hereditary optic neuropathy not involving a mutation in the mitochondrial ND4 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 629-634.

Howell, N., Kubacka, I., Xu, M., McCullough, D. A. (1991). Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 935-942.

Howell, N., Bindoff, L. A., McCullough, D. A., Kubacka, I., Poulton, J., Mackey, D., Taylor, L., Turnbull, D. M. (1991). Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 939-950.

Howell, N., Halvorson, S., Kubacka, I., McCullough, D. A., Bindoff, L. A., Turnbull, D. M. (1992). Mitochondrial gene segregation in mammals: is the bottleneck always narrow? *Hum. Genet.* 90: 117-120.

Howell, N., Xu, M., Halvorson, S., Bodis-Wollner, I., Sherman, J. (1994). A heteroplasmic LHON family: tissue distribution and transmission of the 11778 mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 203-206.

Howell, N. (1997). Leber hereditary optic neuropathy: mitochondrial mutations and degeneration of the optic nerve. *Vision Res.* 37: 3495-3507.

Howell, N., Bogolin, C., Jamieson, R., Marendra, D. R., Mackey, D. A. (1998). mtDNA mutations that cause optic neuropathy: how do we know? *Am. J. Hum. Genet.* 62: 196-202.

---

Howell, N. (1998). Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. *Vision Res.* 38: 1495-1504.

Howell, N., Ghosh, S. S., Fahy, E., Bindoff, L. A. (2000a). Longitudinal analysis of the segregation of mtDNA mutations in heteroplasmic individuals. *J. Neurol. Sci.* 172: 1-6.

Howell, N., Chinnery, P. F., Ghosh, S. S., Fahy, E., Turnbull, D. M. (2000b). Transmission of the human mitochondrial genome. *Hum. Reprod.* 15: 235-245.

Huoponen, K., Vilkki, J., Aula, P., Nikoskelainen, E. K., Savontaus, M. L. (1991). A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1147-1153.

Huoponen, K., Juvonen, V., Iitia, A., Dahlen, P., Siitari, H., Aula, P., Nikoskelainen, E., Savontaus, M. L. (1994). Time-resolved fluorometry in the diagnosis of Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Hum. Mutat.* 3: 29-36.

Huoponen, K. (2001). Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. *Neurogenetics* 3: 119-125.

Jenuth, J. P., Peterson, A. C., Fu, K., Shoubridge, E. A. (1996). Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 14: 146-151.

Johns, D. R., Berman, J. (1991). Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 1324-1330.

Johns, D. R., Neufeld, M. J., Park, R. D. (1992). An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1551-1557.

Johns, D. R., Heher, K. L., Miller, N. R., Smith, K. H. (1993). Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 14484 mutation. *Arch. Ophthalmol.* 111: 495-498.

- 
- Johns, D. R. (1995). The ophthalmologic manifestations of mitochondrial disease. *Semin. Ophthalmol.* 10: 295-302.
- Juvonen, V., Huoponen, K., Syvänen, A. -C., Nikoskelainen, E., Savontaus, M. -L. (1994). Quantification of point mutations associated with Leber hereditary optic neuropathy by solid-phase minisequencing. *Hum. Genet.* 93: 16-20.
- Kadenbach, B., Munscher, C., Frank, V., Muller-Hocker, J., Napiwotzki, J. (1995). Human aging is associated with stochastic somatic mutations of mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* 338: 161-172.
- Kawakami, Y., Sakuta, R., Hashimoto, K., Fujino, O., Fujita, T., Hida, M., Horai, S., Goto, Y., Nonaka, I. (1994). Mitochondrial myopathy with progressive decrease in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutant genomes. *Ann. Neurol.* 35: 370-373.
- Kobayashi, Y., Sharpe, H., Brown, N. (1994). Single-cell analysis of intercellular heteroplasmy of mtDNA in Leber hereditary optic neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 206-209.
- Koehler, C. M., Lindberg, G. L., Brown, D. R., Beitz, D. C., Freeman, A. E., Mayfield, J. E., Myers, A. M. (1991). Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* 129: 247-255.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 619-642.
- Larsson, N. G., Andersen, O., Holme, E., Oldfors, A., Wahlstrom, J. (1991). Leber's hereditary optic neuropathy and complex I deficiency in muscle. *Ann. Neurol.* 30: 701-708.
- Larsson, N. G., Clayton, D. A. (1995). Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu. Rev. Genet.* 29: 151-178.
- Leber, T. (1871). Ueber hereditäre und congenital-angelegte Sehnervenleiden. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2: 249-291.

- 
- Lehtinen, S. K., Hance, N., El Meziane, A., Juhola, M. K., Juhola, K. M., Karhu, R., Spelbrink, J. N., Holt, I. J., Jacobs, H. T. (2000). Genotypic stability, segregation and selection in heteroplasmic human cell lines containing np 3243 mutant mtDNA. *Genetics* 154: 363-380.
- Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Nieminen, A.L. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366: 177-196.
- Leo-Kottler, B., Jacobi, F., Christ-Adler, M. (2000). Lebersche Optikusatropie mit klinischer Besserung. *Ophthalmologie* 97: 849-854.
- Lodi, R., Taylor, D. J., Tabrizi, S. J., Kumar, S., Sweeney, M., Wood, N. W., Styles, P., Radda, G. K., Schapira, A. H. (1997). In vivo skeletal muscle mitochondrial function in Leber's hereditary optic neuropathy assessed by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. *Ann. Neurol.* 42: 573-579.
- Lodi, R., Montagna, P., Cortelli, P., Iotti, S., Cevoli, S., Carelli, V., Barbiroli, B. (2000). 'Secondary' 4216/ND1 and 13708/ND5 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations do not further impair in vivo mitochondrial oxidative metabolism when associated with the 11778/ND4 mitochondrial DNA mutation. *Brain* 123: 1896-1902.
- Loeb, K., Jerome, K., Goddard, J., Huang, M., Cent, A., Corey, L. (2000). High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 32: 626-629.
- Lott, M. T., Voljavec, A. S., Wallace, D. C. (1990). Variable genotype of Leber's hereditary optic neuropathy patients. *Am. J. Ophthalmol.* 109: 625-631.
- Lüdtke, H., Kriegbaum, C., Leo-Kottler, B., Wilhelm, H. (1999). Pupillary light reflexes in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 237: 207-211.
- Mackey, D. A., Buttery, R. G. (1992). Leber hereditary optic neuropathy in Australia. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 20: 177-184.

- 
- Mackey, D. (1994). Misconceptions about Leber hereditary optic neuropathy. *Med. J. Aust.* 160: 763-766.
- Mackey, D. A., Oostra, R. J., Rosenberg, T., Nikoskelainen, E., Bronte-Stewart, J., Poulton, J., Harding, A. E., Govan, G., Bolhuis, P. A., Norby, S. (1996). Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 481-485.
- Macmillan, C., Kirkham, T., Fu, K., Allison, V., Andermann, E., Chitayat, D., Fortier, D., Gans, M., Hare, H., Quercia, N. (1998). Pedigree analysis of French Canadian families with T14484C Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology* 50: 417-422.
- Majander, A., Huoponen, K., Savontaus, M. L., Nikoskelainen, E., Wikstrom, M. (1991). Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Lett.* 292: 289-292.
- Mashima, Y., Saga, M., Hiida, Y., Oguchi, Y., Wakakura, M., Kudoh, J., Shimizu, N. (1995). Quantitative determination of heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy by single-strand conformation polymorphism. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36: 1714-1720.
- Matthews, P. M., Brown, R. M., Morten, K., Marchington, D., Poulton, J., Brown, G. (1995). Intracellular heteroplasmy for disease-associated point mutations in mtDNA: implications for disease expression and evidence for mitotic segregation of heteroplasmic units of mtDNA. *Hum. Genet.* 96: 261-268.
- Mazat, J. P., Rossignol, R., Malgat, M., Rocher, C., Faustin, B., Letellier, T. (2001). What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions...that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1504: 20-30.
- Merriwether, D. A., Clark, A. G., Ballinger, S. W., Schurr, T. G., Soodyall, H., Jenkins, T., Sherry, S. T., Wallace, D. C. (1991). The structure of human mitochondrial DNA variation. *J. Mol. Evol.* 33: 543-555.

---

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database.

<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>.

Moraes, C. T., Schon, E. A., DiMauro, S., Miranda, A. F. (1989). Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 765-771.

Nass, S., Nass, M. M. K. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics, II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J. Cell. Biol.* 19: 613-629.

Newman, N. J., Lott, M. T., Wallace, D. C. (1991). The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. *Am. J. Ophthalmol.* 111: 750-762.

Newman, N. J. (1993). Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. *Arch. Neurol.* 50: 540-548.

Nikoskelainen, E. K., Savontaus, M. L., Wanne, O. P., Katila, M. J., Nummelin, K. U. (1987). Leber's hereditary optic neuroretinopathy, a maternally inherited disease. A genealogic study in four pedigrees. *Arch. Ophthalmol.* 105: 665-671.

Nikoskelainen, E. K. (1994). Clinical picture of LHON. *Clin. Neuroscience* 2: 115-120.

Nikoskelainen, E. K., Marttila, R. J., Huoponen, K., Juvonen, V., Lamminen, T., Sonninen, P., Savontaus, M. L. (1995). Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 59: 160-164.

Nikoskelainen, E. K., Huoponen, K., Juvonen, V., Lamminen, T., Nummelin, K., Savontaus, M. L. (1996). Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. *Ophthalmology* 103: 504-514.

Nollau, P., Wagener, C. (1997). Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin. Chem.* 43: 1114-1128.

---

Norby, S., Lestienne, P., Nelson, I., Rosenberg, T. (1991). Mutation detection in Leber's hereditary optic neuropathy by PCR with allele-specific priming. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 631-636.

Novotny, E. J. J., Singh, G., Wallace, D. C., Dorfman, L. J., Louis, A., Sogg, R. L., Steinman, L. (1986). Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease. *Neurology* 36: 1053-1060.

Olsson, C., Zethelius, B., Lagerstrom-Fermer, M., Asplund, J., Berne, C., Landegren, U. (1998). Level of heteroplasmy for the mitochondrial mutation A3243G correlates with age at onset of diabetes and deafness. *Hum. Mutat.* 12: 52-58.

Oostra, R. J., Bolhuis, P. A., Wijburg, F. A., Zorn-Ende, G., Bleeker-Wagemakers, E. M. (1994). Leber's hereditary optic neuropathy: correlations between mitochondrial genotype and visual outcome. *J. Med. Genet.* 31: 280-286.

Oostra, R. J., Bolhuis, P. A., Zorn-Ende, I., de Kok-Nazaruk, M. M., Bleeker-Wagemakers, E. M. (1994). Leber's hereditary optic neuropathy: no significant evidence for primary or secondary pathogenicity of the 15257 mutation. *Hum. Genet.* 94: 265-270.

Pallotti, F., Chen, X., Bonilla, E., Schon, E. A. (1996). Evidence that specific mtDNA point mutations may not accumulate in skeletal muscle during normal human aging. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 591-602.

Pääbo, S. (1996). Mutational hot spots in the mitochondrial microcosm. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 493-496.

Riordan-Eva, P., Sanders, M. D., Govan, G. G., Sweeney, M. G., Da Costa, J., Harding, A. E. (1995). The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain.* 118: 319-337.

Robinson, B. H. (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364: 271-286.

---

Roux, E., Helg, C., Chapuis, B., Jeannet, M., Roosnek, E. (1992). Evolution of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction. *Blood* 79: 2775-2783.

Shadel, G. S., Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 409-435.

Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M., Seibel, P., Ballinger, S. W., Wallace, D. C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61: 931-937.

Shoffner, J. M. (1997). Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 1: 13-19.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74: 5463-5467.

Simmonds, P., Balfe, P., Peutherer, J. F., Ludlam, C. A., Bishop, J. O., Brown, A. J. (1990). Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* 64: 864-872.

Singer, T. P., Ramsay, R. R. (1994). The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187: 198-202.

Smith, K. H., Johns, D. R., et al (1993). Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch. Ophthalmol.* 111: 1486-1490.

Smith, P. R., Cooper, J. M., Govan, G. G., Harding, A. E., Schapira, A. H. (1994). Platelet mitochondrial function in Leber's hereditary optic neuropathy. *J. Neurol. Sci.* 122: 80-83.

Solignac, M., Monnerot, M., Mounolou, J. C. (1986). Mitochondrial DNA evolution in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* 23: 31-40.

---

Stone, E. M., Newman, N. J., Miller, N. R., Johns, D. R., Lott, M. T., Wallace, D. C. (1992). Visual recovery in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and the 11778 mutation. *J. Clin. Neuroophthalmol.* 12: 10-14.

Tanno, Y., Yoneda, M., Tanaka, K., Tanaka, H., Yamazaki, M., Nishizawa, M., Wakabayashi, K., Ohama, E., Tsuji, S. (1995). Quantitation of heteroplasmy of mitochondrial tRNA (Leu(UUR)) gene using PCR-SSCP. *Muscle Nerve* 18: 1390-1397.

Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., Brown, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28: 3752-3761.

Tyagi, S., Kramer, F. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14: 303-308.

Vergani, L., Martinuzzi, A., Carelli, V., Cortelli, P., Montagna, P., Schievano, G., Carozzo, R., Angelini, C., Lugaresi, E. (1995). MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 880-888.

Vilkki, J., Savontaus, M. L., Nikoskelainen, E. K. (1990). Segregation of mitochondrial genomes in a heteroplasmic lineage with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 95-100.

Wakakura, M., Yokoe, J. (1995). Evidence for preserved direct pupillary light response in Leber's hereditary optic neuropathy. *Br. J. Ophthalmol.* 79: 442-446.

Wallace, D. C., Ye, J. H., Neckelmann, S. N., Singh, G., Webster, K. A., Greenberg, B. D. (1987). Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr. Genet.* 12: 81-90.

Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J. 2nd, Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-1430.

Wallace, D. C. (1995). Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 201-223.

---

Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488.

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

Wissinger, B., Besch, D., Baumann, B., Fauser, S., Christ-Adler, M., Jurklies, B., Zrenner, E., Leo-Kottler, B. (1997). Mutation analysis of the ND6 gene in patients with Lebers hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 511-515.

Wright, S. (1969) Theory of gene frequencies. In: *Evolution and the genetics of populations*. Vol 2. University of Chicago Press, Chicago.

Yen, M. Y., Yen, T. C., Pang, C. Y., Liu, J. H., Wei, Y. H. (1992). Mitochondrial DNA mutation in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33: 2561-2566.

Yoneda, M., Chomyn, A., Martinuzzi, A., Hurko, O., Attardi, G. (1992). Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 11164-11168.

Zhu, D. P., Economou, E. P., Antonarakis, S. E., Maumenee, I. H. (1992). Mitochondrial DNA mutation and heteroplasmy in type I Leber hereditary optic neuropathy. *Am. J. Med. Genet.* 42: 173-179.

.

---

**9 Abkürzungen**

Bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
Min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGenom	mitochondriales Genom
mtGenotyp	mitochondrialer Genotyp
MW	Mittelwert
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	<i>rounds per minute</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rRNA	ribosomale RNA
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
tRNA	<i>transfer</i> RNA
U	Einheiten ( <i>units</i> )