

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Kinderklinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Schwabing SKM GmbH
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. St. Burdach)

**Mitochondriale hepatozerebrale Syndrome im Kindesalter –
mtDNA Depletion und Mutationen im *POLG1*- bzw. *DGUOK*-Gen
als mögliche Pathogenese**

Nancy Fütterer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. P. J. K. Freisinger
2. Univ.-Prof. Dr. St. Burdach
3. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 27.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 Mitochondriale hepatozerebrale Syndrome (Hepatoenzephalopathien) ..	9
1.2 Häufigkeit mitochondrialer Erkrankungen	11
1.3 Aufbau des Mitochondriums und der Atmungskette.....	11
1.4 Genetik der mitochondrialen DNA	15
1.5 Hepatozerebrale Funktionsstörungen verursacht durch Atmungskettendefekte.....	17
1.5.1 Biochemisch isolierte Defekte einzelner Atmungskettenenzyme.....	19
1.5.1.1 Punktmutationen der mtDNA.....	19
1.5.1.2 nDNA Mutationen in Genen von Strukturuntereinheiten der Atmungskette	20
1.5.1.3 nDNA Mutationen in Assemblierungsgenen der Atmungskette	20
1.5.1.4 Translationsdefekte	21
1.5.2 Biochemisch kombinierte Defekte der Atmungskettenenzyme.....	22
1.5.2.1 Punktmutationen der mtDNA.....	22
1.5.2.2 Singuläre Deletionen der mtDNA	22
1.5.2.3 nDNA Mutationen in Genen von Strukturuntereinheiten der Atmungskette	23
1.5.2.4 Mutationen im Biosyntheseweg des Koenzyms Q10.....	23
1.5.2.5 nDNA Mutationen - Defekte der intergenomischen Kommunikation.....	24
1.5.2.5.1 Translationsdefekte	24
1.5.2.5.2 Defekte der mtDNA-Synthese.....	25
1.5.2.5.2.1 Multiples mitochondriales DNA Depletionssyndrom.....	25
1.5.2.5.2.2 Mitochondriales DNA Depletionssyndrom.....	26
1.6 Mitochondriale hepatozerebrale Syndrome infolge von mtDNA Depletion	28
1.6.1 Alpers Syndrom	29
1.6.1.1 Hepatische Form des MDS	30

1.7	Angeborene hepatozerebrale Syndrome ohne Atmungskettendefekt	32
1.7.1	Fettsäureoxidationsstörungen	32
1.7.2	Morbus Wilson.....	33
1.7.3	Neonatale Hämochromatose.....	34
1.8	Erworbene mitochondriale Hepatopathien.....	35
1.8.1	NRTIs induzierte Hepatopathie	35
1.8.2	Valproinsäure induzierte Hepatopathie	35
2	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	37
3	MATERIALIEN.....	38
3.1	Chemikalien.....	38
3.2	Geräte	39
4	PATIENTEN UND METHODEN.....	40
4.1	Patientenkollektiv.....	40
4.2	Biochemische Analyse	42
4.3	DNA Analyse	42
4.3.1	mtDNA Depletionstest	42
4.3.2	Sequenzierung des <i>DGUOK</i> - bzw. <i>POLG1</i> -Gens.....	43
4.3.2.1	PCR	43
4.3.2.2	Gelelektrophorese und Reinigung.....	45
4.3.2.3	Sequenzier-PCR	46
4.3.2.4	Gelfiltration	47
4.3.2.5	Analyse der Basenabfolge	47
4.3.3	Sequenzierung der cDNA des <i>POLG1</i> - und <i>DGUOK</i> - Gens	48
4.3.3.1	RNA-Extraktion.....	48
4.3.3.2	Sequenzierung der cDNA.....	48
4.3.4	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	50
4.3.4.1	<i>POLG1</i> -Gen: p.A467T	50
4.3.4.2	<i>DGUOK</i> -Gen: p.S52F, p.Q170R, p.M1V und p.M1I	51
4.4	Statistische Auswertung	52

5	ERGEBNISSE	54
5.1	Klinische Analyse	54
5.1.1	Gesamtkollektiv	54
5.1.2	Patienten ohne Nachweis einer Mutation im <i>POLG1</i> -Gen oder <i>DGUOK</i> -Gen	56
5.1.3	Patienten mit der hepatischen Form des MDS und Mutationen im <i>DGUOK</i> -Gen	57
5.1.4	Patienten mit Alpers Syndrom und Mutationen im <i>POLG1</i> -Gen	59
5.1.5	Unterschiede der einzelnen Gruppen und Signifikanzen	61
5.2	Biochemische Analyse	62
5.3	Molekulargenetische Analyse	63
5.3.1	mtDNA Depletionstest	63
5.3.2	Mutationsanalyse	65
5.3.2.1	Mutationen im <i>DGUOK</i> -Gen	65
5.3.2.2	Mutationen im <i>POLG1</i> -Gen	68
6	DISKUSSION	72
6.1	Patienten mit hepatischer Form des Depletionssyndroms und Mutationen im <i>DGUOK</i>-Gen	74
6.2	Patienten mit Alpers Syndrom und Mutationen im <i>POLG1</i>-Gen	77
6.3	Weitere durch Mutationen im <i>POLG1</i>-Gen verursachte Krankheiten	79
6.4	Mutationen	81
6.4.1	Mutationen im <i>DGUOK</i> -Gen	81
6.4.2	Mutationen im <i>POLG1</i> -Gen	84
6.4.2.1	p.A467T – eine häufige Mutation beim Alpers Syndrom	86
6.4.2.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	88
6.5	Therapieansätze	89
6.5.1	Supportive Maßnahmen	89
6.5.2	Lebertransplantation	89
6.5.3	Experimentelle Ansätze	91
6.5.3.1	Supplementation von dGMP und dAMP in <i>DGUOK</i> -defizienten Zellen	91
6.5.3.2	Erhöhung des dNTP Pools	91
6.6	Schlussfolgerungen	92

7	ZUSAMMENFASSUNG	93
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
9	ANHANG	107
9.1	Abbildungsverzeichnis	107
9.2	Tabellenverzeichnis	108
9.3	Liste der Internetseiten.....	108
10	PUBLIKATIONEN.....	109
11	DANKSAGUNG	112

Abkürzungsverzeichnis

<i>ACADM</i> -Gen	mitochondriale, mittelkettenspezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase Gen
ADP	Adenosindiphosphat
adPEO	autosomal dominante progressive externe Ophthalmoplegie
AFP	Alpha-Fetoprotein
arPEO	autosomal rezessive progressive externe Ophthalmoplegie
AOA1	Ataxie mit okulomotorischer Apraxie
<i>APTX</i> -Gen	Aprataxin-Gen
ATP	Adenosintriphosphat
ATP 6,8,7B	Untereinheiten 6 bis 7 des Adenosintriphosphats
ATPAF2	mitochondriale ATP-Synthase-F1-Komplexassemblierungsfaktor 2
bp	Basenpaar (c)
BCS1L	Assemblierungsfaktor von Komplex III
CK	Kreatin-Kinase
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie
CoA	Koenzym A
CoQ	Koenzym Q10
COQ2	Koenzyme Q2 Homologon, Prenyltransferase
COX	Cytochrom-c-Oxidase
COX I, II, III	Untereinheit 1 bis 3 der Cytochrom-c-Oxidase
Cyt B	Cytochrom-b
dAMP	Deoxyadenosinmonophosphat
dGMP	Deoxyguanosinmonophosphat
DGUOK	Deoxyguanosinkinase
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
nDNA	nukleäre DNA
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
<i>ECGF1</i> -Gen	Endothelial cell growth factor 1-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EFG1</i> -Gen	mitochondrialer Elongationsfaktor 1- Gen
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
H ⁺	Protonen
HCC	hepatozelluläres Karzinom
<i>HFE</i> -Gen	Hämochromatose Gen
kb	Kilobasenpaare
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	<i>Leber</i> 's hereditäre optische Neuropathie

<i>LRPPRC</i> - Gen	Leucine-rich PPR motif-containing protein-Gen
LS	Leigh Syndrom
LSFC	Leigh Syndrom-French Canadian Typ
MCAD	Mittelkettige-Acyl-CoA-DH
MDS	mitochondriales DNA Depletionssyndrom
MELAS	mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Phasen
MERRF	myoklonische Epilepsie mit ragged-red fibres
MILS	maternal vererbtes Leigh Syndrom
MNGIE	Myo-neuro-gastro-intestinale Enzephalopathie
mRNA	Boten („messenger“)-Ribonukleinsäure
<i>MRPS16</i> - Gen	mitochondriale ribosomale Proteinuntereinheit 16- Gen
MRT	Magnetresonanztomographie
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa
ND 1-6	Untereinheit 1 bis 6 der NADH-Dehydrogenase
NDUFS1-6, NDUFA5	Untereinheiten des Eisen-Sulfat Komplexes der NADH-Dehydrogenase
NRTIs	Nukleosidanaloga Reverse Transkriptase Inhibitoren
nt	Nukleotid
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDHc	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PEO	progressive externe Ophthalmoplegie
PET	Positronenemissionstomographie
POLG	DNA Polymerase gamma
Q10	Koenzym Q 10
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
<i>RNR1</i> -Gen	ribosomale RNA 1 Gen
RRF	“ragged-red fibers”
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>RRM2B</i> -Gen	p53-kontrollierte Ribonukleotid Reduktase-Gen
SANDO	sensorische, ataktische Neuropathie, Dysarthrie und Ophthalmoparese
SCAE	spinozerebelläre Ataxia mit Epilepsie
SCO	Assemblierungsfaktor der Cytochrom-c-Oxidase
SLE	Stroke-like Episoden
SML1	Ribonucleotid Reductase Inhibitor

SU	Untereinheit eines Enzyms ("subunit")
<i>SUCLA2</i> -Gen	Succinyl- CoA Synthase (Beta Untereinheit)-Gen
<i>SUCLG1</i> -Gen	Succinyl-CoA Synthase (Alpha Untereinheit)-Gen
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TK2	Thymidinkinase 2
TP	Thymidinphosphorylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	"transfer"-Ribonukleinsäure
<i>UQCRB</i> -Gen	Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase bindendes Protein - Gen
VPA	Valproinsäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Mitochondriale hepatozerebrale Syndrome (Hepatoenzephalopathien)

Hepatozerebrales Syndrom ist einen Sammelbegriff für Erkrankungen, die mit Degeneration und Funktionsstörungen des Gehirns und der Leber einhergehen. Diese Erkrankungen können auf eine toxische, infektiöse oder metabolische Genese zurückgeführt werden. Metabolische Störungen spielen dabei eine bedeutende Rolle. Ein relativ großer Anteil der metabolischen Störungen geht mit Anomalien der mitochondrialen Funktion einher. Zu den mitochondrialen Funktionsstörungen werden unter anderem auch die Atmungskettendefekte gezählt.

Ernster und Kollegen beschrieben 1959 den ersten Patienten mit strukturellen und funktionellen Veränderungen von Mitochondrien im Skelettmuskel und leiteten auf diese Weise die Ära der klassischen mitochondrialen Atmungskettendefekte ein [37 S. 1851]. Atmungskettendefekte sind mitochondriale Erkrankungen, die einen primären zellulären Energiemangel (ATP-Mangel) nach sich ziehen und zu progredienten, meist neurodegenerativen Krankheitsbildern führen. Sie können sporadisch auftreten, maternal, autosomal-rezessiv, autosomal-dominant oder X-chromosomal vererbt werden. Atmungskettendefekte erscheinen klinisch, genetisch und pathologisch als heterogene Erkrankungen, die ein Organ oder multiple Organsysteme betreffen können. Bei einer Mehrzahl der mitochondrialen Erkrankungen steht die Beteiligung von Gehirn und Skelettmuskel im Vordergrund. Ein Teil der mitochondrialen Erkrankungen werden folglich auch als mitochondriale Enzephalomyopathien bezeichnet.

Während eine Beteiligung der Leber bei Erwachsenen mit primären mitochondrialen Erkrankungen selten beobachtet wird, stellt eine Hepatopathie ein häufiges Merkmal von Atmungskettenerkrankungen im Kindesalter, besonders in der neonatalen Periode, dar [22 S. 821]. Ein Leberversagen im Kleinkindesalter kann durch verschiedene Erkrankungen der mitochondrialen Atmungskette ausgelöst werden (Tab. 1). Zum einen können Leberfunktionsstörungen als ein spätes Zeichen von mitochondrialen Multisystemerkrankungen, wie dem Leigh Syndrom, entstehen [18 S. 207]. Zum anderen können Symptome einer hepatozellulären Insuffizienz primär als dominierendes Krankheitszeichen auftreten wie bei der hepatischen Form des

mitochondrialen DNA Depletionssyndroms (MDS) oder primär mit einer Enzephalopathie einhergehen wie beim Alpers Syndrom.

Tabelle 1 Mitochondriale Hepatoenzephalopathien

[modifiziert nach Chinnery 2005 S. 208]

Genetisch	Molekularer Defekt
Isolierte Defekte einzelner Atmungskettenenzyme	mtDNA Mutationen <ul style="list-style-type: none"> ○ z.B. <i>COXII</i>, <i>MTCYB</i> nDNA Mutationen <ul style="list-style-type: none"> ○ Gene der Strukturuntereinheiten z.B. <i>NDUFS1</i>, <i>UQCRB</i> ○ Assemblierungsgene z. B. <i>BCS1L</i>, <i>SCO1</i>, <i>ATPAF2</i> ○ Translationsdefekte z.B. <i>LRPPRC</i>
Kombinierte Defekte der Atmungskettenenzyme	mtDNA Mutationen <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>4977bp</i> mtDNA Deletion, <i>A8344G</i> tRNA nDNA Mutationen <ul style="list-style-type: none"> ○ Gene der Strukturuntereinheiten z. B. <i>NDUFS4</i> ○ Q10 Syntheseweg z. B. <i>COQ2</i>, <i>ATPX</i> ○ Translationsdefekte z. B. <i>EFG1</i>, <i>MRPS16</i> ○ Multiple mtDNA Deletionen z. B. <i>POLG1</i> ○ mtDNA Depletionen z. B. <i>DGUOK</i>, <i>POLG1</i>, <i>MPV17</i>

Erworben

Retrovirale Therapie mit Nukleosidanaloga
 Nicht-alkoholische Steatohepatitis
 Hepatitis B/C
 hepatozelluläres Karzinom

Phänotypisch fallen beim hepatozerebralen Syndrom frühzeitig eine Enzephalopathie durch Entwicklungsverzögerung und Krampfanfälle sowie eine muskuläre Hypotonie auf. Zu den frühen Anzeichen einer hepatischen Dysfunktion zählen Symptome wie Gedeihstörung, Erbrechen und Ernährungsprobleme, die häufig auch im Rahmen von Allgemeinerkrankungen auftreten. Eine Hypoglykämie zusammen mit einer milden bis moderaten Hepatomegalie kann ein weiterer Hinweis sein. Erhöhte Lebertransaminasen liefern oft den ersten laborchemischen Hinweis einer Leberbeteiligung, sie steigen jedoch selten mehr als das Zehnfache über die obere Normgrenze an [18 S. 207]. Bei einigen Kleinkindern kann sich die Leberdysfunktion spontan erholen oder in einem stabilen Zustand verharren, in anderen Fällen kommt es aber zu einer rasanten Progression zu Cholestase, Koagulopathie und Aszites.

Die Mitochondrien stellen die Hauptquelle für energiereiche Phosphatmoleküle wie Adenosintriphosphat (ATP) dar, das für alle aktiven intrazellulären Prozesse unerlässlich ist. Die biosynthetischen und entgiftenden Eigenschaften der Leber sind stark vom ATP abhängig. Dies erklärt, warum die Hepatozyten eine sehr hohe Anzahl von Mitochondrien zeigen und dass Störungen der mitochondrialen Funktion Lebererkrankungen verursachen können. Biochemische Messungen der Atmungskettenaktivität können einzelne oder kombinierte Defekte der Atmungskettenkomplexe zeigen (Tab. 1), die auf die Leber begrenzt sein können und im Skelettmuskel oder in Hautfibroblasten nicht zwingend feststellbar sind [18 S. 207]. In einigen Patienten kann im Leber-, Muskel- oder Hirngewebe ein deutlich verminderter Gehalt an mitochondrialer DNA (mtDNA) gemessen werden. Ein Phänomen, das als mitochondriale DNA Depletion klassifiziert wird. In der Leberhistologie kann anfangs als einziges Merkmal eine Steatose auffallen. Bei fortschreitender Hepatopathie können sich zusätzlich eine Fibrose, Cholestase und ausgedehnte hepatozelluläre Nekrosen entwickeln.

1.2 Häufigkeit mitochondrialer Erkrankungen

Die Prävalenz mitochondrialer Erkrankungen wird von Chinnery et al., 2001 auf 11,5:100.000 Personen geschätzt [17 S. 97]. Bezüglich der Häufigkeit mitochondrialer Erkrankungen im Kindesalter gibt es unterschiedliche Angaben. Fatal verlaufende mitochondriale Enzephalomyopathien des Neugeborenen und Kleinkindes werden mit einer Frequenz von 1:11.000 angegeben [24 S. 381]. Kürzliche Studien zeigten, dass mitochondriale Atmungskettenerkrankungen ungefähr ein Kind von 20.000 Kindern unter sechzehn Jahren betrifft [102 S. 1905]. Eine Leberbeteiligung kommt in rund einem Fünftel der betroffenen Kinder vor [24 S. 377]. In Anbetracht der Schwierigkeiten der Diagnosestellung scheinen diese Darstellungen, eher eine Unterschätzung zu sein. Im epidemiologischen Sinne sind die erworbenen mitochondrialen Hepatoenzephalopathien vermutlich bedeutender [18 S. 208].

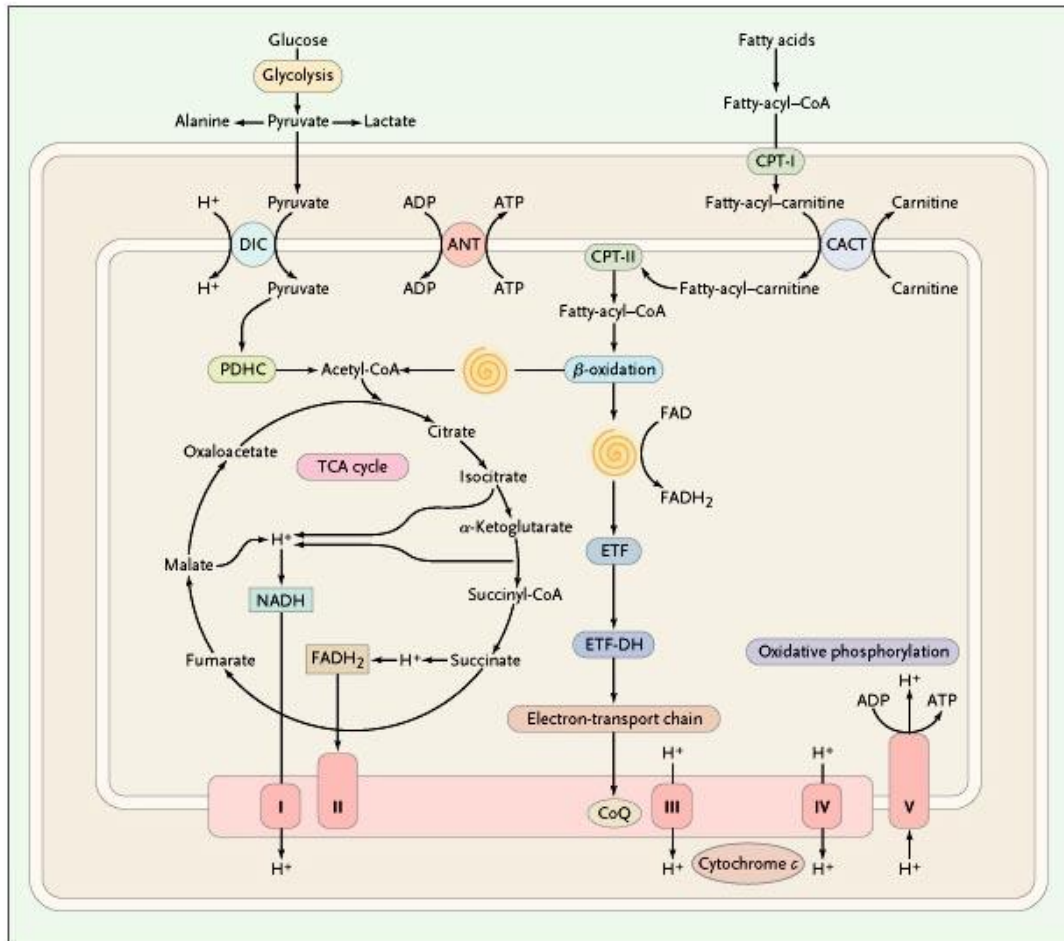
1.3 Aufbau des Mitochondriums und der Atmungskette

Das Mitochondrium, auch als Kraftwerk der Zelle bezeichnet, besteht aus vier Kompartimenten, die äußere Membran, die innere Membran, der Intermembranraum und die Matrix. Es erfüllt verschiedene Aufgaben wie Pyruvat-Oxidation, Zitratzyklus, Metabolismus von Aminosäuren, Fettsäuren und Steroiden. Die wichtigste Aufgabe

besteht aber in der Generation von Energie in Form von mitochondrialem ATP durch das Zusammenspiel von Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS), die „Atmungskette“ (Abb. 1).

Abbildung 1 Mitochondrialer Energiestoffwechsel

[modifiziert nach DiMauro und Schon, 2003 S. 2657]



Die Abbildung zeigt die Reaktionen der Pyruvat-Oxidation, β-Oxidation, des Zitratzyklus und der Generation von Energie in Form von mitochondrialem ATP durch das Zusammenspiel von Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS).

ADP bedeutet Adenosindiphosphat, ATP Adenosintriphosphat, ANT Adeninucleotidtranslokator, CACT Carnitin-Acylcarnitintransferase, CoQ Koenzym Q, CPT Carnitinpalmityltransferase, DIC Dicarboxylase Carrier, ETF Elektronentransfer Flavoprotein, ETF-DH Elektronentransfer Dehydrogenase, FAD Flavinadeninucleotid, FADH₂ reduziertes FAD, NADH reduziertes Nicotinadeninucleotid, PDHC Pyruvatdehydrogenase Komplex, TCA Tricarboxylsäure, I Komplex I, II Komplex II, III Komplex III, IV Komplex IV und V Komplex V.

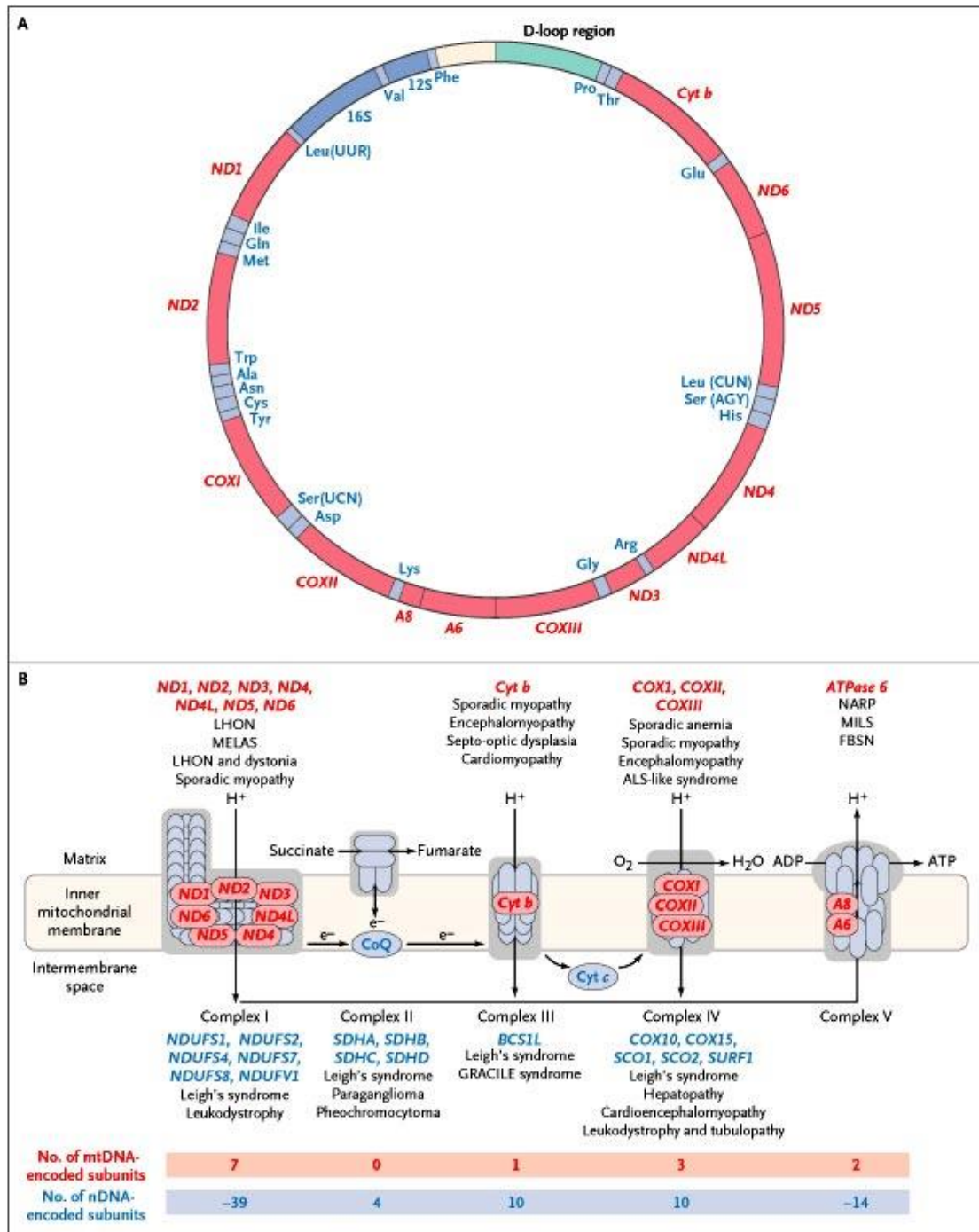
Die Atmungskette befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und besteht aus fünf multimeren Proteinkomplexen, die sich wiederum aus mehr als 80 Proteinuntereinheiten zusammensetzen: reduzierte Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Wasserstoff (NADH):Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I) besteht aus ungefähr 46 Untereinheiten, Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex II) besteht aus vier Untereinheiten, Ubiquinol:Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III) besteht aus elf Untereinheiten, Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) besteht aus dreizehn Untereinheiten und die ATP-Synthase (Komplex V) besteht aus ungefähr sechzehn Untereinheiten (Abb. 2B). Die Atmungskette benötigt außerdem zwei Elektronen-Carrier, das Ubiquinon (Coenzym Q10) und das Cytochrom c.

Reduzierte Wasserstoffübertragende Cofaktoren (NADH/H⁺ und FADH₂) werden durch die Oxidation von Substraten d.h. von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen in Glykolyse, Zitratzyklus und β -Oxidation erzeugt. Sie geben Elektronen zu den Komplexen I und II und werden ihrerseits mit Sauerstoff in einer exergonen Reaktion reoxidiert. Die Elektronen fließen entlang eines elektrochemischen Gradienten zu den Komplexen III und IV, währenddessen werden Protonen (H⁺) von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Daraus resultiert ein mitochondriales Membranpotential, das vom Komplex V genutzt wird um ATP aus ADP und P zu synthetisieren (Abb. 2B) [67 S. 225-234].

Störungen in jeder Stufe des mitochondrialen Substratabbaus können zu einem zellulären Energiemangel führen und mitochondriale Erkrankungen verursachen.

Abbildung 2 Mitochondriale DNA (mtDNA) und Atmungskette

[modifiziert nach DiMauro und Schon, 2003 S. 2659]



Feld A zeigt das menschliche mitochondriale Genom. Die Protein-kodierenden Gene – sieben Untereinheiten von Komplex I (ND), drei Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase (COX), die Cytochrom b Untereinheit von Komplex III (Cyt b) und zwei Untereinheiten der Adenosintriphosphat (ATP) Synthase (A6 und A8) – sind in rot dargestellt. Die Protein-synthetisierenden Gene – die 12 S und die 16 S ribosomalen RNAs und die 22 transfer RNAs (drei Buchstaben Aminosäuresymbole) – sind blau dargestellt. Die D-Loop Region kontrolliert die Initiation der Replikation und Transkription der mtDNA.

Feld B zeigt die Untereinheiten der Atmungskette, die von der nukleären DNA (nDNA) kodiert werden in blau und die Untereinheiten, die von der mtDNA kodiert werden in rot. Während Elektronen (e⁻) entlang der Elektronentransportkette fließen, werden Protonen (H⁺) von der Matrix in den Intermembranraum durch die Komplexe I, III und IV gepumpt und im Anschluss wieder zurück in die Matrix durch Komplex V, um ATP zu produzieren. Koenzym Q (CoQ) und Cytochrom c (Cyt c) sind Elektronentransporter. Gene, die für

Erkrankungen der Atmungsketten verantwortlich sind, werden ebenfalls gezeigt. *ATPase 6* bedeutet ATP Synthase 6; *BCS1L* Cytochrom *b-c* Komplex Assemblierungsprotein (Komplex III); *NDUF* NADH Dehydrogenase-Ubiquinon Oxidoreduktase; *SCO* Assemblierungsfaktor der Cytochrom-c Oxidase; *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* and *SDHD* Succinat Dehydrogenase Untereinheiten; *SURF1* Surfeit Gen 1; FBSN familiäre bilaterale striatale Nekrose; LHON Leber's hereditäre optische Neuropathie; MELAS mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und Schlaganfall ähnlichen Episoden; MILS maternal vererbtes Leigh Syndrom; NARP Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa; GRACILE Wachstumsretardierung, Aminoacidurie, Laktatazidose und früher Tod; ALS Amyotrophe Lateralsklerose.

1.4 Genetik der mitochondrialen DNA

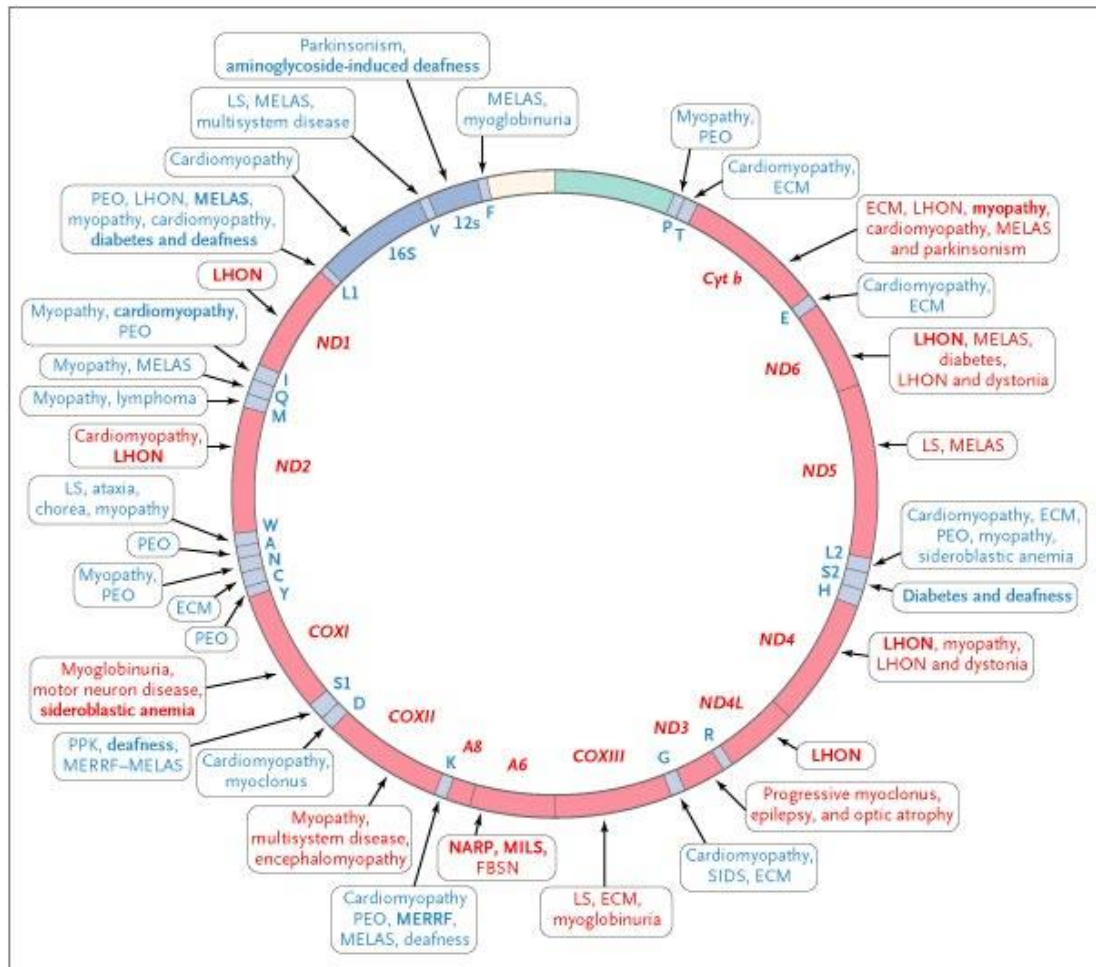
In einer Zelle gibt es hunderte bis tausende Mitochondrien. Jedes Mitochondrium besitzt ungefähr fünf bis zehn mitochondriale Genome und seine eigene Maschinerie für die Synthese von RNA und Proteinen.

Die mitochondriale DNA hat eine Größe von 16.569 Basenpaaren, liegt als doppelsträngiges, zirkuläres Molekül in der Zelle vor und besteht aus 37 Genen. Von diesen Genen werden 24 für die Translation der mitochondrialen DNA benötigt, bestehend aus zwei ribosomalen RNA's (12S and 16S rRNA's) und 22 transfer RNA's (tRNA's) [30 S. 2657]. Dreizehn Gene kodieren Untereinheiten der Atmungskette: sieben Untereinheiten von Komplex I (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 und 6 [ND steht für NADH-Dehydrogenase]), die Cytochrom b-Untereinheit von Komplex III, drei Untereinheiten von Komplex IV (Cytochrom c Oxidase [COX I, II und III]) und zwei Untereinheiten des ATP-Synthase-Komplexes V (ATP6 und ATP8) [30 S. 2658]. (Abb. 2A)

Die mtDNA wurde vor 40 Jahren entdeckt [86] und 1981 komplett sequenziert [3]. Die ersten pathogenen Mutationen der menschlichen mtDNA wurden vor 20 Jahren entdeckt [52; 121]. Bis heute konnten über 200 pathogene Punktmutationen identifiziert werden (Abb. 3).

Abbildung 3 Pathogene Mutationen im menschlichen mitochondrialen Genom

[modifiziert nach DiMauro und Schon, 2003 S. 2660]



Erkrankungen, die häufig und auffallend mit Mutationen in einem einzelnen Gen assoziiert sind, sind fettgedruckt dargestellt. Erkrankungen aufgrund von Mutationen, die die mitochondriale Proteinsynthese beeinträchtigen, sind in blau dargestellt. Erkrankungen aufgrund von Mutationen in Protein-kodierenden Genen werden in rot gezeigt.

ECM bedeutet Enzephalomyopathie; FBSN familiäre bilaterale striatale Nekrose; LHON Leber's hereditäre optische Neuropathie; LS Leigh's Syndrom; MELAS mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und Schlaganfall ähnlichen Episoden; MERRF myoklonische Epilepsie mit Ragged-Red Fibers; MILS maternal vererbtes Leigh's Syndrom; NARP Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa; PEO progressive externe Ophthalmoplegie; PPK palmoplantare Keratodermatose; SIDS plötzlicher Kindstod.

Die Genetik der mitochondrialen DNA unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von der Mendel'schen Genetik [31 S. 278]:

1. Die mtDNA wird von der Mutter vererbt, so werden Erkrankungen aufgrund pathogener Punktmutationen im mitochondrialen Genom durch die Mutter auf ihre Nachkommen weitergegeben (maternale Vererbung).
2. Die mtDNA-Moleküle kommen in multiplen Kopien vor (Polyplasmie). Bei gesunden Menschen sind alle mitochondrialen DNA Moleküle identisch, dies wird als

3. Homoplasmie bezeichnet. Die pathogenen Mutationen betreffen nur einen Teil der mtDNA Moleküle, dies wird als Heteroplasmie bezeichnet. Um die oxidative Phosphorylation zu schädigen, muss eine minimale kritische Prozentzahl mutanter mtDNAs vorhanden sein (Schwelleneffekt). Diese Schwelle ist in Geweben mit hohem Energieverbrauch, wie z. B. Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Leber, Retina, Niere und endokrinen Drüsen, niedriger. Aus diesem Grund sind diese Gewebe besonders vulnerabel gegenüber den Auswirkungen pathogener Mutationen in der mitochondrialen DNA.
4. Während den nachfolgenden Zellgenerationen kann sich der Grad der Heteroplasmie (die Mutationslast) verändern (replikative Segregation), so dass die klinische Expression (Phänotyp) der Erkrankung variieren kann. Dies erklärt die altersabhängige und sogar gewebeabhängige Variabilität der klinischen Merkmale mitochondrialer Erkrankungen.

1.5 Hepatozerebrale Funktionsstörungen verursacht durch Atmungskettendefekte

Bei der Beschreibung der Atmungskettendefekte beschränke ich mich auf diejenigen, die mit einer hepatozerebralen Funktionsstörung einhergehen.

Die Atmungskette steht unter der Kontrolle von zwei Genomen, dem mitochondrialen Genom (mtDNA) und dem nukleären Genom (nDNA). Dreizehn Untereinheiten der fünf Enzymkomplexe werden im Mitochondrium von der mitochondrialen DNA kodiert (rote Kästchen Abb. 2B), von einer eigenen Transkriptions- und Translationsmaschinerie hergestellt und in die mitochondriale Innenmembran inseriert. Es wird geschätzt, dass die humanen Mitochondrien weit über 1000 verschiedene Proteine enthalten, von denen viele entweder direkt oder indirekt an der Biogenese und Aufrechterhaltung der Atmungskette beteiligt sind [18 S. 207]. Dazu gehören über 70 nukleär kodierte Atmungskettenuntereinheiten (graue Kästchen Abb. 2B) und eine Reihe von Enzymen und Cofaktoren, die für die Biogenese der mitochondrialen DNA essentiell sind und die intramitochondriale Transkription und Translation ermöglichen. Diese Faktoren sind entscheidend, um eine normale Leber- und Gehirnfunktion zu gewährleisten.

Die Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V werden durch die mitochondriale und nukleäre DNA kodiert, Komplex II ausschließlich vom Kerngenom. Defekte, die durch

Mutationen in der mtDNA verursacht werden, vermindern in der Regel die Aktivität von Komplex II nicht.

Mitochondriale Erkrankungen werden in zwei Hauptklassen eingeteilt. Die erste Klasse umfasst mitochondriale Erkrankungen, die durch Defekte in der mitochondrialen DNA hervorgerufen und maternal vererbt werden. Die zweite Klasse bilden mitochondriale Erkrankungen, die durch Mutationen in der nukleären DNA (nDNA) verursacht werden und dementsprechend nach den Mendel'schen Gesetzen vererbt werden (Tab. 2). Krankheiten, die durch Mutationen in der mitochondrialen DNA verursacht werden, manifestieren sich in der Regel in der späteren Kindheit oder im Erwachsenenalter. Während mitochondriale DNA Depletionssyndrome und Translationsdefekte, die durch nukleäre Gendefekte verursacht werden, mit frühkindlichen und schweren Krankheitsbildern verknüpft werden.

Tabelle 2 Genetische Klassifikation mitochondrialer Krankheiten

[modifiziert nach DiMauro et al., 2005 S.277]

Defekte der mtDNA	Defekte der nDNA
Mutationen in proteinsynthetisierenden Genen tRNA, rRNA, Rearrangements	Mutationen in Strukturuntereinheiten Komplex I, Komplex II, Komplex III
Mutationen in proteinkodierenden Genen Multisystemisch (LHON, NARP/MILS) Gewebespezifisch	Mutationen in Hilfsproteinen Komplex IV, Komplex III, Komplex V Defekte der intergenomischen Kommunikation PEO mit multiple Δ -mtDNA mtDNA Depletion Defekte mtDNA Translation Defekte des Lipidmilieus Barth Syndrom Defekte der Motilität/Fusion/Fission Autosomal dominante Optikusatrophie CMT Typ 2A Autosomal dominante HSP

Abkürzungen: LHON-Lebersche hereditäre Optikus Neuropathie; NARP-Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa; MILS-Maternal vererbtes Leigh Syndrom; PEO-Progressive externe Ophthalmoplegie; CMT-Charcot-Marie-Tooth Erkrankung; HSP-hereditäre spastische Paraplegie; Δ bedeutet Large-Scale Deletion.

Mutationen der mtDNA oder nDNA können zur Aktivitätsminderung einzelner Atmungskettenenzymkomplexe führen oder die Aktivität mehrerer Enzymkomplexe gleichzeitig einschränken (Tab. 3).

Tabelle 3 Biochemische Diagnostik bei mitochondrialen Enzephalomyopathien

[modifiziert nach Horvath, 2005]

Isolierte Defekte einzelner Atmungskettenenzyme:	<ul style="list-style-type: none"> ○ mtDNA: ND, cyt b, CO I-III ○ nDNA: Defekte in Untereinheiten-Gene, Assemblierungsgene
Kombinierte Defekte der Atmungskettenenzyme:	<ul style="list-style-type: none"> ○ mtDNA: Deletion, tRNA Mutationen ○ nDNA: mtDNA Depletion, multiple Deletionen, Defekt der mt Translation, Coenzym Q10 Defekt
Normale Aktivitäten der Atmungskettenenzyme:	<ul style="list-style-type: none"> ○ mtDNA: Deletion, LHON, NARP ○ nDNA: multiple Deletionen, gewebespezifische Defekte, Defekte der mitochondrialen Motilität, Fusion und Fission

1.5.1 Biochemisch isolierte Defekte einzelner Atmungskettenenzyme

1.5.1.1 Punktmutationen der mtDNA

Vor kurzem wurde ein Kind mit Alpers-Huttenlocher ähnlicher progressiver zerebrohepatischer Erkrankung und verminderter Cytochrom c-Oxidase (COX) Aktivität beschrieben [112]. Der Phänotyp des Kindes zeigte Analogien zu einem isolierten COX-Defizit mit Gedeihstörung, Kardiomyopathie, Hepatomegalie, verzögerte psychomotorische Entwicklung, Ataxie, Tremor, Muskelschwäche, erhöhte Lebertransaminasen und Laktatazidose [112 S. e263]. Die postmortale histologische Untersuchung ergab eine Verfettung der Leber mit mikronodulärer Zirrhose und im Gehirngewebe einen Verlust von Neuronen [112 S. e264]. Eine neue heteroplasmische 7706G>A Punktmutation im COX II-Gen der mtDNA wurde identifiziert. Das COX II-Gen kodiert die Untereinheit II der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV).

Andreu und Kollegen beschrieben ein kleines Mädchen, das im Alter von vier Wochen an einem Herzstillstand verstarb und typische pathologische Merkmale einer histiozytoiden Kardiomyopathie zeigte [4]. Im Lebergewebe wurde eine hepatische Steatose und im Nierengewebe eine akute tubuläre Nekrose festgestellt [4 S. 311]. Bei

der molekulargenetischen Untersuchung wurde die Punktmutation Gly251Asp im *MTCYB*-Gen gefunden. Cytochrome b (*MTCYB*) ist die einzige Untereinheit von Komplex III, die von der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert wird.

1.5.1.2 nDNA Mutationen in Genen von Strukturuntereinheiten der Atmungskette

Die Arbeitsgruppe um Benit identifizierte eine 721C-T Transition im *NDUFS1*-Gen der nDNA in einem Kind mit einem Komplex I Defekt [8]. Diese Transition führt zu einer Arg241Trp (R241W) Substitution [8 S. 1349]. Das männliche Kind gesunder, nicht verwandter Eltern entwickelte sich bis zum zweiten Lebensmonat unauffällig. Danach fielen Wachstumsretardierung, axiale Hypotonie, Hepatomegalie und persistierende Hyperlaktatämie auf. Die zerebrale Kernspintomographie zeigte eine Hyperintensität der Basalganglien. Später entwickelte das Kind eine makrozytäre Anämie und Dystonie und verstarb im Alter von fünf Monaten. Seine ältere Schwester zeigte eine ähnliche Symptomatik im Alter von drei Monaten und verstarb kurze Zeit später [8 S. 1347].

Bei einem türkischen Mädchen konsanguiner Eltern mit einem Komplex III Mangel wurde eine homozygote 4-bp Deletion (Nucleotide 338-341) im Exon 4 des *UQCRB*-Gens identifiziert [48]. Beide Eltern waren gesund und heterozygot für die Deletion. Die Patientin litt an Hypoglykämien und einer Leberdysfunktion. Das nukleäre *UQCRB*-Gen kodiert ein Ubiquinon-bindendes Protein, das eine Untereinheit von Komplex III bildet und eine wichtige Rolle im Elektronentransfer spielt [48 S. 120].

1.5.1.3 nDNA Mutationen in Assemblierungsgenen der Atmungskette

Das *BCS1L*-Gen kodiert das BCS1-Protein, das an der Assemblierung von Komplex III beteiligt ist. Bei türkischen Kleinkindern mit kongenitaler Laktatazidose, renaler Tubulopathie, Leberversagen mit Hepatosiderose und Enzephalopathie mit psychomotorischer Retardierung wurden Mutationen im *BCS1L*-Gen gefunden [26 S. 57; 27 S. 126]. Biochemisch konnte ein isolierter Komplex III Mangel nachgewiesen werden [26 S. 57; 27 S. 128]. Neuroradiologisch zeigten sich bilaterale Hirnstamm-läsionen, die auf ein Leigh Syndrom hindeuteten [26 S. 59].

Die kongenitale und multisystemische Natur der Erkrankung, ihr fataler Verlauf und die Hepatosiderose wurden von Finnischen und Britischen Forschern unter dem Akronym GRACILE zusammengefasst (fetale Wachstumsretardierung, Fanconi Typ Aminoazidurie, Cholestase, vermehrte Eisenspeicherung [Leberhämosiderose,

Hyperferritinämie, Hypotransferritinämie, erhöhte Transferrineisensättigung und freies Plasmaeisen], Laktatazidose und früher Tod) [38 S. 490]. Visapaa und Kollegen identifizierten eine homozygote Ser78Gly Mutation im *BCS1L*- Gen in allen finnischen Patienten mit dem GRACILE Syndrom [120]. Die finnischen Patienten hatten weder neurologische Symptome noch Aktivitätsminderungen von Komplex III [120 S. 871]. Desweiteren identifizierten sie fünf verschiedene Mutationen im *BCS1L*-Gen bei drei britischen Kleinkindern, die die typischen Symptome des GRACILE Syndroms aufwiesen, aber zusätzlich einen Komplex III Mangel und neurologische Symptome hatten [120 S. 871].

In einer nicht konsanguinen Familie mit multiplen Fällen von neonatalem Leberversagen, ketoazidotischem Koma und schwerem Komplex IV Mangel wurden Mutationen im *SCO1*-Gen gefunden [114]. *SCO1* ist an der Assemblierung von Komplex IV (Cytochrom-c Oxidase) beteiligt. Die Kinder präsentierten zusätzlich Enzephalopathie, axiale Hypotonie, Hypoglykämie und Hyperlaktatämie [114 S. 1104, 1105].

Die mitochondriale ATP Synthase (ATPase) ist ein Enzym, das aus vielen Untereinheiten besteht und die ATP Synthese während der oxidativen Phosphorylierung katalysiert. Es besteht aus einem membrangebundenen, katalytischen F1 Teil und einem Wasserstoffprotonen transportierenden, die Membran durchziehenden F0 Teil. Der mitochondriale F1 Komplex Assemblierungsfaktor der ATP Synthase (ATPAF2) wird auch als ATP12 bezeichnet. In einem weiblichen Kleinkind mit einer verminderten Komplex V Aktivität im Lebergewebe und Skelettmuskel wurde eine homozygote Trp92Arg Substitution im *ATPAF2*-Gen identifiziert [28]. Die blutsverwandten, marokkanischen Eltern und ein gesundes Geschwisterkind sind heterozygot für diese Mutation. Das Kleinkind hatte Dysmorphiezeichen, muskuläre Hypertonie, Hepatomegalie, hypoplastische Nieren und erhöhte Laktatwerte im Urin, Plasma und Liquor. Zudem litt sie an einer schweren Entwicklungsverzögerung mit Epilepsie und Gedeihstörung. Sie verstarb im Alter von vierzehn Monaten an einer schweren Sepsis [28 S. 120].

1.5.1.4 Translationsdefekte

Das Bild eines Leigh Syndroms (LS) mit verminderter Komplex IV Aktivität und Leberbeteiligung wurde in zahlreichen Familien aus der Region Saguenay-Lac-Saint-Jean der kanadischen Provinz Quebec beschrieben [79]. Phänotypisch zeigten diese

34 Kinder Entwicklungsverzögerung, muskuläre Hypotonie, trunkale Ataxie, Intentionstremor und faziale Dysmorphien. Im Rahmen von Erkrankungen entwickelten einige azidotische Krisen, Stupor oder Koma, die in einzelnen Fällen zum Tod führten [79 S. 482]. Während die COX-Aktivität im Nieren- und Herzgewebe fast normal war, zeigte sich im Skelettmuskel und in Hautfibroblasten eine Aktivitätsminderung um 50%. Im Gehirn- und Lebergewebe konnte nur eine minimale COX-Aktivität nachgewiesen werden [79 S. 483]. Charakteristische ZNS-Veränderungen entsprechend dem Leigh Syndrom und eine mikrovesikuläre Steatose in der Leber wurden in den betroffenen Patienten postmortem gefunden [79 S. 485]. Homozygote wie auch compound heterozygote Mutationen im *LRPPRC*- Gen sind für dieses Leigh Syndrom French Canadian Typ (LSFC) verantwortlich. Das Produkt des *LRPPRC*-Gens ist ein mRNA-bindendes Protein, das spezifisch für die Translation und Stabilisierung der durch die mtDNA kodierten COX I-mRNA ist und deshalb mit einem isolierten Defekt der COX einhergeht [82 S. 610].

1.5.2 Biochemisch kombinierte Defekte der Atmungskettenenzyme

1.5.2.1 Punktmutationen der mtDNA

Die A8344G Mutation wird normalerweise in Patienten mit einem MERRF Syndrom (Myoklonische Epilepsie, Myopathie und RRF) nachgewiesen. Dennoch konnte in einem sporadischen Fall eines Kleinkindes mit Gedeihstörung und plötzlichem Versterben im Alter von elf Lebensmonaten exakt diese A8344G Mutation in der mtDNA im Herzmuskel- und Lebergewebe nachgewiesen werden [113 S.538]. Die Autopsie brachte eine Kardiomyopathie, diffuse Verfettung der Leber und bilaterale Retinahypoplasie zum Vorschein. Die Aktivitäten von Komplex I und IV waren im Herzmuskel vermindert [113 S. 539].

1.5.2.2 Singuläre Deletionen der mtDNA

Singuläre Deletionen der mtDNA werden häufig im Zusammenhang mit dem Kearns-Sayre Syndrom, der progressiven externen Ophthalmoplegie und dem Pearson's Syndrom gefunden. Multiple Atmungskettenkomplexdefekte bei Kindern mit einer Leberbeteiligung können ebenfalls auf Single Deletionen der mtDNA zurückgeführt werden.

McDonald und Kollegen beschrieben zwei Geschwisterkinder mit einer 4977bp mtDNA Deletion im Muskelgewebe [78]. Beide Kinder hatten eine prominente periphere

sensorimotorische Neuropathie. Der Junge zeigte mit dreizehn Monaten eine Gedeihstörung. Fünf Jahre später fiel ein Erguss am rechten Knie, ein vorgewölbtes Abdomen, eine Hepatosplenomegalie, eine normochrome normozytäre Anämie und eine abnormale Leberfunktion auf. Fortschreitend kam es zum Leberversagen. In der Leberbiopsie wurde eine portale und hepatische Fibrose mit Gallengangsproliferation und milder Cholestase nachgewiesen. In der Muskelbiopsie zeigte sich eine Typ 2 Faser Atrophie. Der Junge erhielt eine orthotope Lebertransplantation. Sieben Monate nach der Transplantation entwickelte er eine Gangataxie, Myoklonien, ein erhöhtes Liquorlaktat und Liquorprotein, eine schwere sensorimotorische Neuropathie, fortschreitende Muskelschwäche und ein Nierenversagen. Der Junge verstarb im Alter von zehn Jahren [78 S. 191, 192].

1.5.2.3 nDNA Mutationen in Genen von Strukturuntereinheiten der Atmungskette

Mutationen in nukleären Genen von Strukturuntereinheiten führen normalerweise zu einer isolierten Aktivitätsminderung des jeweiligen Atmungskettenkomplexes. Budde und Kollegen beschrieben Mutationen im *NDUFS4*-Gen, die zu einem kombinierten Atmungskettendefekt der Komplexe I+III führten [11 S. 63]. Das *NDUFS4*-Gen kodiert eine Untereinheit des Komplexes I. Ein Mädchen präsentierte im Alter von einer Woche eine muskuläre Hypotonie, fehlende Fixierung, Lethargie und Gedeihstörung. Im Alter von drei Monaten fielen eine Mikrozephalie und Laktatazidose auf. In der Magnetresonanztomographie wurden bilaterale Hypodensitäten der Basalganglien festgestellt. Das Kind verstarb im Alter von drei Monaten [11 S. 63].

1.5.2.4 Mutationen im Biosyntheseweg des Koenzyms Q10

Ein Koenzym Q10 (CoQ) Mangel kann zur mitochondrialen Enzephalomyopathie führen, die gewöhnlich durch Epilepsie, Muskelschwäche, Ataxie, Atrophie des Kleinhirns, Migräne, Myoglobinurie und Entwicklungsverzögerung charakterisiert ist.

In der Literatur wurde kürzlich ein Patient mit Koenzym Q10 Mangel und einem ungewöhnlichen Phänotyp beschrieben [66]. Kennzeichnend waren ein neonatales Leberversagen, Pankreasinsuffizienz, Tyrosinämie und Hyperammonämie. Im weiteren Verlauf entwickelte das Kind einen sensorineuralen Hörverlust und ein Leigh Syndrom. Im Lebergewebe des Patienten wurden verminderte Aktivitäten der Komplexe I+III und II+III gemessen. Diese Aktivitätseinschränkungen konnten nach Zugabe von CoQ zum biopsierten Leberhomogenat ausgeglichen werden, was auf eine CoQ Depletion

hindeutete [66 S. 88]. Ein Korrelat auf molekulargenetischer Ebene wurde bei diesem Patienten nicht identifiziert.

Insgesamt wurden bisher erst fünf Gene im Zusammenhang mit einer Koenzym Q10 Depletion beschrieben. Pathogene Mutationen in Genen der Koenzym Q-Biosynthese (*COQ2*, *PDSS1*, *PDSS2* und *CABC1*) führen zu einem primären Koenzym Q10 Mangel. Während ein sekundärer Koenzym Q10-Mangel durch pathogene Mutationen in Genen mit Einfluss auf die Koenzym Q-Biosynthese (*APTX* und *ETFDH*) verursacht wird.

1.5.2.5 mtDNA Mutationen - Defekte der intergenomischen Kommunikation

1.5.2.5.1 Translationsdefekte

Zu den Defekten der intergenomischen Kommunikation zählen die Translationsdefekte. Nukleär kodierte Defekte der mitochondrialen Translation sind selten beschriebene Fälle. Sie führen zu Erkrankungen, die entsprechend dem Mendel'schen Gesetz vererbt werden und durch einen defekten mitochondrialen Proteinsynthese- und kombinierten Atmungskettendefekt mit normaler Komplex II Aktivität gekennzeichnet sind.

Phänotypisch können die Betroffenen ein hepatozerebrales Syndrom zeigen. Die Arbeitsgruppe um Coenen untersuchte zwei Kinder blutsverwandter Eltern, die im Kleinkindesalter an einem hepatozerebralen Syndrom verstorben sind [20]. Die Southern Blot Analyse der mtDNA aus Fibroblasten, zeigte weder eine Depletion noch eine Deletion der mtDNA. Die biochemischen Messungen der Atmungskettenenzymaktivitäten in Fibroblasten und Skelettmuskel ergaben einen kombinierten partiellen Defekt in den von der mtDNA kodierten Komplexen [20 S. 2082]. Die Autoren fanden eine homozygote Mutation im *EFG1*-Gen. *EFG1* kodiert einen der vier Elongationsfaktoren, den der Mensch - zusammen mit zwei Initiationsfaktoren und einem Terminationsfaktor - für die Synthese von Proteinen benötigt, die durch die mtDNA kodiert werden [20 S. 2084].

Ein zweiter Bericht beschreibt ein neugeborenes Mädchen, das zweite Kind blutsverwandter Eltern beduiner Herkunft, mit Dysmorphiezeichen, Agenesie des Corpus callosum, generalisierter muskulärer Hypotonie, erhöhten Lebertransaminasen und schwerer Laktatazidose [80 S. 735]. Das Neugeborene verstarb im Alter von drei Tagen. Die biochemische Analyse der Muskelmitochondrien enthüllte eine deutlich

verminderte Aktivität der Enzymkomplexe I, II+III, IV und V mit erhaltener Aktivität von Komplex II. Im Lebergewebe waren die Aktivitäten in ähnlicher Weise vermindert [80 S. 735]. Die mitochondrialen Transkriptionslevel wurden aus Gesamt-RNA von Fibroblasten ermittelt. Die Menge an 12S rRNA war deutlich reduziert [80 S. 736]. Die Forschungsgruppe um Miller vermutete einen Defekt in einem der Proteine der mitochondrialen ribosomalen kleinen Untereinheit (SSU), der die Biogenese dieser Untereinheit stört [80 S. 737]. Die Analyse zeigte eine homozygote Punktmutation im *MRPS16*-Gen, das die mitochondriale ribosomale Proteinuntereinheit 16 kodiert.

1.5.2.5.2 Defekte der mtDNA-Synthese

Die mitochondriale DNA steht unter der Kontrolle von einer Vielzahl nukleär kodierter Faktoren, die für die Integrität und Replikation der mitochondrialen DNA zuständig sind. Mutationen in diesen Faktoren beeinflussen direkt die mitochondriale DNA, entweder quantitativ (mtDNA Depletionen) oder qualitativ (multiple Deletionen) und führen zu einer insuffizienten Synthese der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V und folglich zu mitochondrialen Erkrankungen, die nach den Mendel'schen Regeln vererbt werden [83 S. 492].

1.5.2.5.2.1 Multiples mitochondriales DNA Deletionssyndrom

Eine qualitative Veränderung der mtDNA ist durch multiple Deletionen gekennzeichnet. Multiple mitochondriale DNA Deletionen im Skelettmuskel treten charakteristischerweise bei der progressiven externen Ophthalmoplegie (PEO) auf. Die Betroffenen klagen über eine Schwäche der äußeren Augenmuskeln und Belastungsintoleranz. Die Erkrankung manifestiert sich im Erwachsenenalter und kann zusätzlich zu Katarakt, Hörverlust, sensorischen axonalen Neuropathie, Ataxie, Depression, Hypogonadismus und Parkinson führen. Sie wird autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt. [39; 69]. PEO mit multiplen Deletionen der mtDNA wurde bisher im Zusammenhang mit autosomal-dominanten Mutationen im *POLG1*-Gen (OMIM *174763) [115], *POLG2*-Gen (OMIM *604983) [69], *C10orf2*-Gen (OMIM *606075) [105], im *SLC25A4*-Gen (*ANT1*, OMIM +103220) [59], im *OPA1*-Gen (OMIM *605290) [54] und mit autosomal-rezessiven Mutationen im *POLG1*-Gen beschrieben.

Multiple mtDNA Deletionen, die durch autosomal-rezessive Mutationen im *ECGF1*-Gen (OMIM *131222) hervorgerufen werden, wurden bei der mitochondrialen neurogastro-

intestinalen Enzephalomyopathie (MNGIE; OMIM #603041) des jungen Erwachsenenalters beschrieben [90].

1.5.2.5.2.2 Mitochondriales DNA Depletionssyndrom

Eine häufige Ursache frühkindlicher kombinierter Atmungskettendefekte ist das mitochondriale DNA Depletionssyndrom (MDS; OMIM #251880). Es wurde erstmals von Moraes und Kollegen 1991 beschrieben. Das mtDNA Depletionssyndrom ist eine phänotypisch und genotypisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch eine stark reduzierte Anzahl der mtDNA Moleküle im Vergleich zu den nDNA Molekülen in den betroffenen Geweben charakterisiert sind und autosomal-rezessiv vererbt werden [83 S. 498]. In Nordspanien wird eine Prävalenz von 1,59:100.000 für das mtDNA Depletionssyndrom angegeben. In Deutschland ist die Häufigkeit noch unklar. Ungefähr 30% der frühkindlichen kombinierten Atmungskettendefekte werden durch mtDNA Depletion verursacht. Defekte im *DGUOK*- und *POLG1*-Gen scheinen in Deutschland, die häufigste Ursache der mtDNA Depletion zu sein (www.mgz-muenchen.de, Stand 01.04.2008).

Die Replikation und der Zusammenbau der mtDNA benötigen eine große Anzahl an nukleär kodierten Enzymen und einen ausgeglichenen Nukleotid-Pool. Die De-Novo-Enzyme zur Nukleotidsynthese stehen im Mitochondrium nicht zur Verfügung, deshalb hängt die Synthese der Nukleotide von der Reutilisierung ab. Die Konstanthaltung des mitochondrialen Deoxynukleotidtriphosphat (dNTP)-Pools ist für die Replikation der mtDNA essentiell. Defekte in der mitochondrialen DNA Synthese und Assemblierung können zu Depletionen des mitochondrialen Genoms führen und biochemisch als kombinierter Atmungskettendefekt imponieren.

Die mitochondriale DNA Depletion ist gewebespezifisch. Sie betrifft bevorzugt Muskel und Leber und führt zu einer insuffizienten Synthese von Komponenten der Atmungskette und folglich zu einer reduzierten Aktivität der Atmungskette [83 S. 498; 35 S. 393]. Es können aber auch besonders in einer späteren Phase der Erkrankung multiple Organe wie Herz, Gehirn und Nieren, begleitet von einer schweren Laktatazidose, betroffen sein [83 S. 498]. Die ersten Symptome manifestieren sich innerhalb des ersten Lebensjahres und die Mehrzahl der Patienten verstirbt im frühen Kindesalter. Als Ursache wurden bisher autosomal-rezessive Mutationen in acht nukleären Genen identifiziert, die die mitochondriale DNA Replikation kontrollieren und verschiedene Verlaufsformen des MDS verursachen.

Hepatische Form des MDS

Die hepatische Form des MDS (OMIM #251880) wird durch Mutationen in zwei verschiedenen Genen hervorgerufen.

Das Gen *DGUOK* (OMIM *601465) liegt auf Chromosom 2p13, besteht aus sieben kodierenden Exons und kodiert die mitochondriale Deoxyguanosinkinase. Die betroffenen Kinder zeigen eine Hepatopathie, Enzephalopathie, muskuläre Hypotonie und Nystagmus [77 S. 337].

Das Gen *MPV17* (OMIM *137960) liegt auf Chromosom 2p21-23 und besteht aus sieben kodierenden Exons. Mutationen im *MPV17*-Gen verursachen eine Störung der oxidativen Phosphorylierung und ein infantiles hepatozerebrales MDS. Die beschriebenen Kinder litten an Leberversagen, neurologischen Symptomen mit multiplen Hirnläsionen in der Kernspintomographie sowie einer Wachstumsretardierung bis unterhalb der fünften Perzentile. Das *MPV17*-Gen kodiert ein mitochondriales Innermembranprotein [107 S. 570].

Eine weitere Arbeitsgruppe fand Mutationen im *MPV17*-Gen bei Patienten mit der Navajo Neurohepatopathie (OMIM #256810) und mtDNA Depletion im Lebergewebe [58 S. 544]. Die Navajo Neurohepatopathie ist gekennzeichnet durch Hepatopathie, peripherer Neuropathie, Verstümmelung der Akren, zerebrale Leukoenzephalopathie, Gedeihstörung und metabolische Azidosen während Infektionen [53 S. 482].

Alpers Syndrom

In den letzten Jahren wurden bei Patienten mit einem Alpers Syndrom (OMIM #203700) autosomal-rezessive Mutationen im *Polymerase gamma-* (*POLG1*-) Gen (OMIM *174763) beschrieben [88 S. 706; 39 S. 723]. Das Gen *POLG1* liegt auf Chromosom 15q22-26 und besteht aus 23 Exons. Die Patienten leiden an einer therapieresistenten Epilepsie, Hepatopathie und kortikalen Blindheit. Die Atmungskettenenzyme im Muskel können nur leichte Aktivitätsverminderungen zeigen, da überwiegend Gehirn- und Lebergewebe betroffen sind.

(Enzephalo-)myopathischen Form des MDS

Bei der (Enzephalo-)myopathischen Form des MDS (OMIM #609560) dominieren eine angeborene oder in der Kindheit erworbene Myopathie und Enzephalopathie.

Pathogene Mutationen wurden im nukleären *TK2*-Gen (OMIM *188250), welches die mitochondriale Thymidinkinase kodiert, gefunden. Das Gen *TK2* liegt auf Chromosom 16 und besteht aus zehn kodierenden Exons. Häufig wird die Myopathie von erhöhten Kreatinkinase-Werten und einer renalen Tubulopathie begleitet [97 S. 342].

SUCLA2 (OMIM *603921) liegt auf Chromosom 13, besteht aus elf Exons und kodiert die Beta-Untereinheit der Succinyl-Koenzym A Synthase (SUCL). Die betroffenen Kleinkinder einer Familie litten an einer schweren psychomotorischen Retardierung, Epilepsie, Schwerhörigkeit, Leigh-ähnlichen Läsionen im MRI und Anämie [36 S. 1081].

Das Gen *SUCLG1* (OMIM *611224) liegt auf Chromosom 2 und besteht aus neun kodierenden Exons. Bei drei Kindern einer konsanguinen, pakistanischen Familie mit einer autosomal-rezessiven, fatalen, infantilen Laktatazidose wurde eine homozygote, zwei Basenpaar-große Deletion im *SUCLG1*-Gen gefunden. Das *SUCLG1*-Gen kodiert die Alpha-Untereinheit der Succinyl-Koenzym A Synthase (SUCL). Die Kinder fielen bereits am ersten Lebenstag durch Hepatomegalie, muskuläre Hypotonie und schwere Laktatazidose auf und verstarben drei bis fünf Tage später [92 S. 383].

Schwere früh-infantile Laktatazidose, muskuläre Hypotonie und Tubulopathie wurde kürzlich in Zusammenhang mit Mutationen im *RRM2B*-Gen (OMIM *604712) bei Patienten mit einer mtDNA Depletion im Muskelgewebe identifiziert. Das *RRM2B*-Gen liegt auf Chromosom 8q21.3-q22.3, besteht aus neun Exons und kodiert die zytosolische, p53 induzierende kleine Untereinheit der Ribonukleotid Reduktase [10 S. 776].

Mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie

Bei der mitochondrialen neurogastrointestinalen Enzephalomyopathie (MNGIE; OMIM #603041) bestehen multiple Deletionen und Depletion im Skelettmuskel oft nebeneinander. MNGIE ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des jungen Erwachsenenalters, die durch eine progressive externe Ophthalmoplegie, periphere Neuropathie, Leukoenzephalopathie und schwere gastrointestinale Dysmotilität charakterisiert ist und zu Kachexie und frühem Versterben führt. Das verantwortliche Gen *ECGF1* (OMIM *131222) kodiert das Enzym Thymidinphosphorylase (TP) [90 S. 689; 91 S. 792]. Obwohl die TP ein extramitochondriales Enzym ist, verändert sein Mangel das Gleichgewicht des intramitochondrialen Nukleotid-Pools.

1.6 Mitochondriale hepatozerebrale Syndrome infolge einer mtDNA Depletion

Im Folgenden möchte ich die hepatische Form des MDS und das Alpers Syndrom näher erläutern.

1.6.1 Alpers Syndrom

Die Klassifikation des Alpers Syndroms, die lange Zeit kontrovers blieb, umfasst therapieresistente Krampfanfälle, psychomotorische Entwicklungsverzögerung, kortikale Blindheit und Lebererkrankung mit mikronodulärer Zirrhose, die in einigen Fällen in Zusammenhang mit dem Antikonvulsivum Valproinsäure steht [88 S. 706; 39 S. 727; 25 S. 921].

Bernard Alpers beschrieb 1931 erstmals ein vier Monate altes Mädchen mit Entwicklungsverzögerung, therapieresistenten generalisierten Krampfanfällen und diffuser Degeneration der grauen Substanz des Gehirns [2]. Eine Beteiligung der Leber und die autosomal rezessive Vererbung des Alpers Syndroms, auch Alpers-Huttenlocher-Syndrom oder progressive infantile Poliodystrophie bezeichnet, wurden 1976 von Huttenlocher und Kollegen berichtet [55]. In einigen Fällen fehlte eine hepatische Manifestation [55 S. 188].

Eine verminderte mtDNA Polymerase gamma (POLG) Enzymaktivität im Mitochondrium sowie eine Depletion der mtDNA konnten Naviaux und Kollegen erstmals 1999 in einem Patienten mit Alpers Syndrom nachweisen [87 S. 54]. Innerhalb der letzten Jahre wurden in einer großen Anzahl der Fälle mit Alpers Syndrom Mutationen im nukleären DNA *Polymerase gamma-1 (POLG1-)* Gen beschrieben [88; 39; 25].

Das 16.569 bp große, humane mitochondriale Genom wird durch die nukleär kodierte DNA Polymerase gamma (POLG) [19] repliziert. Sie ist die einzige DNA-Polymerase im Mitochondrium und für die Elongation und Reifung der DNA-Tochterstränge verantwortlich [9 S. 3351; 35 S. 391]. Sie besteht aus zwei Untereinheiten. Die kleinere akzessorische Untereinheit p55 (POLG2) bindet spezifisch an die doppelsträngige DNA, erhöht dadurch die Affinität der POLG für die DNA und ist an der Primererkennung beteiligt [68 S. 3855; 35 S. 391]. P55 wird durch das *POLG2*-Gen (OMIM *604983) kodiert. Die größere katalytische Untereinheit p140 (POLG1) mit der 5'-3' Polymerisationsfähigkeit und 3'-5' Exonukleaseaktivität ist für die Biogenese der mtDNA von großer Bedeutung [104 S. 24818; 35 S. 391]. Die katalytische Untereinheit besitzt als zusätzliche Eigenschaften eine Nukleotidselektivität und exonukleolytische Kontrollleseaktivität, verbunden mit einer hohen Basensubstitutionstreue und einer relativen Präzision gegenüber einzelnen Baseninsertionen oder Basendeletionen [35 S. 391]. P140 wird durch das *POLG1*-Gen kodiert, dass auf Chromosom 15q22-26 liegt und aus 23 Exons besteht. Exon 1 ist nicht kodierend. Das POLG1-Protein kann in drei

Domänen unterteilt werden: Exonuklease-Domäne, Linker-Region und Polymerase-Domäne [89 S. 1494]. Mutationen im *POLG1*-Gen können eine mitochondriale DNA Depletion und ein Alpers Syndrom verursachen.

Patienten mit einem Alpers Syndrom sind zunächst bei Geburt asymptomatisch und können sich in den ersten Lebenswochen bis Jahren normal entwickeln. Sie fallen durch eine anfallsartige, häufig infektassoziierte, schwere neurologische Verschlechterung im Rahmen einer therapieresistenten Myoklonus-Epilepsie auf. Die Symptome können schubweise über Jahre hinweg verlaufen oder einen rapiden, fatalen Verlauf nehmen. Die Beteiligung der Leber kann über einen langen Zeitraum diskret verlaufen oder sich im Rahmen einer valproatbedingten Lebertoxizität dramatisch verschlechtern. Zu den Merkmalen der Leberpathologie zählen Fibrose, Regeneratknoten, Untergang von Hepatozyten, Gallengangsproliferation, mikrovesikuläre Verfettung und Zirrhose [88 S. 706]. Im Gehirnschnitt erkennt man nekrotische Läsionen des zerebralen Kortex und der Hirnkerne, einen schwerwiegenden Verlust von Neuronen im zerebellären Kortex und eine fokale sekundäre Beteiligung der weißen Substanz [25 S. 21; 41 S. 170].

1.6.1.1 Hepatische Form des MDS

Bei Kleinkindern mit mtDNA Depletion und hepatozerebralem Syndrom konnten vor einigen Jahren Mutationen im *Deoxyguanosinkinase- (DGUOK-)* Gen identifiziert werden [77]. Das *DGOUK*-Gen, das auf dem Chromosom 2p13 liegt, kodiert die mitochondriale Deoxyguanosinkinase (DGUOK).

Die Synthese der mtDNA wird nicht vom Zellzyklus reguliert, sondern erfordert einen konstanten Vorrat an Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) [123 S. 319]. Im Mitochondrium fehlen jedoch Enzyme für die De-Novo-Synthese von Nukleotiden für die mtDNA Replikation. Sie müssen deshalb von Enzymen des Reutilisierungsvorganges im Mitochondrium synthetisiert oder vom Zytosol ins Mitochondrium transportiert werden [123 S. 319].

Der mitochondriale dNTP Pool wird durch die mitochondriale Innenmembran vom zytosolischen Pool getrennt. Die mitochondriale Innenmembran ist nicht permeabel für geladene Moleküle. Ein Import von Deoxynukleotiden ins Mitochondrium ist somit nur über spezielle Carrier möglich. Der Deoxynukleotid-Carrier (DNC) transportiert die vier Deoxynukleosiddiphosphate (dNDPs) und in geringer Intensität die dNTPs [32 S.

2287]. Der zweite bekannte Carrier ist der Deoxycytidintriphosphat-Transporter, der Deoxycytidintriphosphate (dCTP) durch die mitochondriale Innenmembran ins Mitochondrium bringt [32 S. 2287].

Die mitochondriale Deoxyguanosinkinase initiiert neben der Thymidinkinase 2 (TK2) den Purin-Salvage-Pathway, der einen Vorrat an Deoxyribonukleotiden (dNTPs) für die mtDNA-Synthese liefert [123 S. 319; 77 S. 337]. Die Deoxyguanosinkinase phosphoryliert Deoxyguanosine und Deoxyadenosine zu den korrespondierenden Deoxynukleotidmonophosphaten und ist so für die Aufrechterhaltung der Balance des mitochondrialen dNTP-Pools zuständig, der für eine korrekte mtDNA Replikation erforderlich ist [77 S. 339]. Veränderungen im Vorrat der dNTP's stellen eine mögliche Ursache für mtDNA Depletionen dar. Eine dNTP-Diskrepanz ist mit einer hohen Mutationsrate, einer Schädigung der reifen DNA und einer Inhibition ihrer Reparatur assoziiert [35 S. 393]. Mutationen im nukleären *DGUOK*-Gen stören die Homöostase des Nukleotid-Pools und führen zu einer mtDNA Depletion [77 S. 339]. Diese Abnahme der mtDNA-Moleküle führt zu einer defekten oxidativen Phosphorylierung, die sich in kombinierten Atmungskettendefekten äußern kann und die hepatische Form des MDS verursachen kann. Diese Diskrepanz zwischen Deoxypurinen und Deoxypyrimidinen, sowie eine niedrige Replikationstreue der mtDNA konnte in den betroffenen Geweben bei Patienten mit einem *DGUOK*-Defekt nachgewiesen werden [35 S. 393].

Das *DGUOK*-Protein mit 260 Aminosäuren wird in allen Geweben exprimiert, am stärksten jedoch im Muskel, Gehirn, Leber und lymphatischen Gewebe [57 S. 7260; 123 S. 319; 77 S. 339]. Besonders Gehirn und Leber sind auf die präzise Aktivität der *DGUOK* angewiesen, da diese Gewebe einem hohen Energieverbrauch unterliegen. In diesen Geweben manifestieren sich die ersten Symptome eines Deoxyguanosinkinase-Defizits [35 S. 393].

Für das hepatozerebrale Syndrom sind das frühe Auftreten einer Leberzirrhose und eine mild bis schwer verlaufende Enzephalopathie kennzeichnend. Typischer Weise fallen die meisten Patienten innerhalb der ersten sechs Lebensmonate durch ein früh manifestes, progressiv verlaufendes Leberversagen, neurologische Störungen, Nystagmus, Gedeihstörung, Hypoglykämie und Laktaterhöhung im Blut auf. Die Lebererkrankung steht im Vordergrund und ist häufig für das frühe Versterben verantwortlich. Die Leberhistologie zeigt eine multifokale hepatozelluläre Zerstörung mit Gallengangsproliferation, mikrovesikulärer Steatose, kanalikulärer Cholestase und Fibrose. Im Gehirnschnitt findet sich eine Degeneration der weißen Substanz in den

zerebralen und zerebellären Hemisphären, welche mit einer milden Astrozytose assoziiert ist.

1.7 Angeborene hepatozerebrale Syndrome ohne Atmungskettendefekt

Wenn ein Atmungskettendefekt als Ursache eines hepatozerebralen Syndroms ausgeschlossen wurde, können unter anderem die nachfolgend aufgeführten Krankheiten in Frage kommen. Die folgende Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

1.7.1 Fettsäureoxidationsstörungen

Genetische Störungen der Fettsäureoxidation zeigen eine große klinische Variabilität und werden autosomal rezessiv vererbt (Tab. 4). Typischerweise treten hypoketotisch-hypoglykämisches Koma, infolge kataboler Zustände wie verlängertes Fasten, Operationen und Infektionen, eine Leberfunktionsstörung und eine Hyperammonämie auf. Die Betroffenen erkranken häufig im späten Säuglingsalter. Durch einen gestörten Abbau der Fettsäuren kommt es zur Akkumulation langkettiger Acylcarnitine, die eine schwere neonatale Laktatazidose, Kardiomyopathie und Hepatopathie verursachen. Das Krankheitsbild ähnelt einem Atmungskettendefekt. Milde Störungen der Oxidation langkettiger Fettsäure bzw. des Carnitin-Shuttles können auf die Skelettmuskulatur beschränkt bleiben. Sie treten erst in Jugend oder frühem Erwachsenenalter auf und verursachen eine chronische Muskelschwäche, Schmerzen oder rezidivierende Rhabdomyolyse oder eine akute oder chronische Kardiomyopathie [127 S. 94].

Die häufigste Fettsäureoxidationsstörung in Nordeuropa ist der Mittelkettige-Acyl-CoA-Dehydrogenase- (MCAD-) Mangel. Die Inzidenz beträgt in Nordeuropa bis zu 1:6000 [127 S. 96]. Ursächlich ist vor allem die Mutation K329E im *ACADM*- Gen (OMIM *607008). Die betroffenen Kinder fallen durch Reye-ähnliche, oft foudroyant verlaufende Entgleisungen auf, die nach Fastenzeiten von acht bis sechzehn Stunden, bei banalen Erkrankungen und nach Operationen auftreten können. Phänotypisch kommt es zu Lethargie, Übelkeit und Erbrechen. Innerhalb von ein bis zwei Stunden kann es zum Koma, Krampfanfällen und Herzstillstand führen. Der Manifestationsgipfel liegt zwischen vier Lebensmonaten und drei Jahren. Die Acylcarnitine C₈ und C₆ sind im Serum erhöht, ebenso der Quotient C₈/C₁₀. Im Urin liegen die organischen Säuren C₆-C₁₀-Dicarbonsäuren, Suberylglycin und

Hexanoylglycin vor. Diese Erkrankung wurde in das erweiterte Neugeborenen-screening aufgenommen.

Tabelle 4 Fettsäureoxidationsstörungen

[modifiziert nach Zschocke/Hoffmann, Vademecum Metabolicum, S. 95-97]

Defekt	Klinik
Carnitintransportermangel (primärer Carnitinmangel)	Kardiomyopathie, akutes Herzversagen, Muskelschwäche, Hepatopathie
Carnitin-Palmitoyltransferase-I- (CPT1-) Mangel	Schwere Hepatopathie, renale tubuläre Azidose
Carnitin-Translokase-(Carnitin-Acylcarnitin-Carrier, CAC-) Mangel	Schwere Kardiomyopathie, Arrhythmien, Hepatopathie
Carnitin-Palmitoyltransferase-II-(CPT2-) Mangel	Kardiomyopathie, Hepatopathie Milde Form (>15 Jahre) episodische Muskelschwäche, Myoglobinurie, Rhabdomyolyse
(Über-)Langkettige-Acyl-CoA-Dehydrogenase-(VLCAD-) Mangel	Kardiomyopathie, Hepatopathie, Hepatomegalie, SIDS Spätmanifestation: Rhabdomyolyse
Mitochondriales-Trifunktionales Protein-(MTP-) Mangel, Langkettige-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-(LCHAD-) Mangel	Kardiomyopathie, Hepatopathie, muskuläre Hypotonie, Neuropathie, Retinopathie Spätmanifestation: Rhabdomyolyse HELLP-Syndrom/Schwangerschaftssteatose der Mutter bei betroffenen Fetus
Kurzkettige-Acyl-CoA-Dehydrogenase (SCAD-) Mangel	Metabolische Azidose, progrediente psychomotorische Retardierung, Hypotonie, Myopathie
Kurzkettige-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-(SCHAD-) Mangel	Hyperinsulinämische Hypoglykämien
Multipler Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (Glutaracidurie Typ II)	Gesichts- und Hirnfehlbildungen, Zystennieren, Reye-Syndrom, metabolische Azidose, Hypoglykämie, progrediente Enzephalopathie, Epilepsie, (Kardio-) Myopathie
HMG-CoA-Synthase-Mangel	Akute hypoketotische Hypoglykämie bei relativ kurzer Fastentoleranz
HMG-CoA-Lyase-Mangel	Akute hypoketotische Hypoglykämie, metabolische Azidose, Hepatopathie

1.7.2 Morbus Wilson

Der Morbus Wilson (hepatolentikuläre Degeneration; OMIM #277900, www.dgn.org) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des hepatischen Kupfermetabolismus. Sie geht mit einer erhöhten Konzentration von freiem Kupfer und einer verminderten hepatischen Kupferausscheidung einher. Der Anstieg und die Akkumulation des freien Kupfers ruft toxische Erscheinungen an Leber, ZNS, Niere und Knochen hervor, die im

Gehirn zur Degeneration von Ganglienzellen, reaktiven Vermehrung abnormer Gliazellen in den Stammganglien und im Cortex und in der Leber zur multilobulären Leberzirrhose führen.

Die Krankheit zeigt eine große Heterogenität bezüglich des Schweregrades und der Ausbildung verschiedener Symptome. Das Manifestationsalter wird zwischen dem fünften und 45. Lebensjahr mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem dreizehnten und 24. Lebensjahr angegeben [70 S. 585]. Häufig tritt zwischen dem fünften und zehnten Lebensjahr eine transiente Lebersymptomatik mit Transaminasenanstieg, diskretem Ikterus, Leistungsminderung und Abgeschlagenheit auf. Das Ausmaß der Leberschädigung ist sehr variabel, auch ein plötzlich einsetzendes Leberversagen ist möglich. Unzureichende oder fehlende Behandlung führt zu progredienter Leberzirrhose. Erst später, meistens ab der Pubertät, kommt es zur neurologischen Manifestation. Pathognomisch ist der Kayser-Fleischer-Ring an der Kornea [93 S. 341]. Die weltweite Prävalenz Erkrankter wird mit etwa 1:30000 angegeben bei einer Inzidenz von 15-30 pro 1 Million [73 S. 493].

Mutationen im Wilson-Gen (*ATP7B*, OMIM *[606882](#)) als Ursache des Morbus Wilson wurden 1993 erstmals beschrieben [13]. Das siebeneinhalb Kilobasen lange Wilson-Gen liegt auf Chromosom 13q14.3 und kodiert 1411 Aminosäuren einer kupfertransportierenden ATPase vom P-Typ (*ATP7B*), die besonders in Leber und Niere, aber in geringerem Ausmaß auch in Gehirn, Lunge, Plazenta, Skelettmuskel und Pankreas gebildet wird [111 S. 343]. Über 200 verschiedene Mutationen des Wilson-Gens, meist Punktmutationen, wurden bis heute identifiziert.

1.7.3 Neonatale Hämochromatose

Die neonatale Hämochromatose (OMIM #231100) ist eine seltene, autosomal-rezessiv erbliche Eisenspeicherkrankheit. Die Manifestation der Erkrankung geschieht bereits in utero. Durch eine gesteigerte Eisenresorption und –speicherung in der Leber kommt es zum zirrhotischen Umbau und als Folge zum akuten Leberversagen bereits in der Neugeborenenperiode [33 S. A232]. Zusätzlich tritt eine Siderose in extrahepatischen Geweben, besonders in Pankreas, Herz und Endokrinen Drüsen auf [61 S. 77].

Die hepatozelluläre Syntheseinsuffizienz tritt bei Geburt auf und führt zu Hypoglykämien, Ikterus, hämorrhagischer Diathese, vermindertem Fibrinogen, Hypoalbuminämie und Hypotransferrinämie. Die Kinder imponieren durch die braune

Hautpigmentierung als „Bronzebabies“. Neben dem Leberversagen kann ein Nierenversagen beobachtet werden. Postmortem Untersuchungen zeigen exzessive Eisenablagerungen in den Hepatozyten, diffuse Leberzirrhose, hepatozelluläre Nekrose, Cholestase und Riesenzelltransformation. Laborchemisch können erhöhte Serumeisenwerte und hohe Transferrinsättigungen (80-90%) gemessen werden [85 S. 642].

In molekularen Untersuchungen wurden verschiedenen Gene auf Mutationen untersucht, unter anderem das *Beta-2 Mikroglobulin*- Gen (OMIM *109700), das *HFE*- Gen (+235200) sowie das *Hämoxxygenase-1* (OMIM *141250) und -2 Gen (OMIM +141251). Pathogene Mutationen wurden bisher im Zusammenhang mit diesem Phänotyp nicht gefunden [60 S. 599].

1.8 Erworbene mitochondriale Hepatopathien

1.8.1 NRTIs induzierte Hepatopathie

Neben den angeborenen mitochondrialen Hepatopathien mit genetischem Ursprung gibt es die Gruppe der erworbenen mitochondrialen Hepatopathien. In diese Gruppe gehören unter anderem Patienten, die mit Nucleosidanaloga Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs) behandelt werden. Eine fatale Hepatopathie mit Laktatazidose und mtDNA Depletion ist eine bekannte Komplikation der NRTI-Therapie. Die mitochondriale Toxizität der NRTIs wird durch deren Hemmung der DNA Polymerase gamma begründet. Die klinische Toxizität wird der mtDNA Depletion zugeschrieben, die zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt und die Atmungskette und die Fettsäure-Oxidation beeinträchtigt. Sie führt zur Laktatazidose, Leberverfettung, Myopathie, Kardiomyopathie, periphere Neuropathie und Pankreatitis [81 S. 492].

1.8.2 Valproinsäure induzierte Hepatopathie

Die Valproinsäure (VPA) ist ein Antiepileptikum, das seit über 30 Jahren zur Behandlung von fokalen und generalisierten Krampfanfällen angewandt wird und in der Regel gut verträglich ist. Selten treten unter der Therapie mit Valproinsäure schwerwiegende Nebenwirkungen wie Schädigungen der Leber und des Pankreas sowie Störungen der Blutgerinnung auf. Ein VPA-assoziiertes Leberversagen wurde bei zahlreichen verschiedenen Grundkrankheiten, wie Störungen der mitochondrialen Energiegewinnung, des Fettsäure- und Aminosäurestoffwechsels, des Harnstoffzyklus

sowie bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, beobachtet. Bei Krankheiten, die selbst zu einem Leberversagen führen, scheint VPA den Verlauf zu beschleunigen. Die Inzidenz der Hepatotoxizität unter Valproinsäure-Einnahme wird auf Werte zwischen 1:40000 bei Erwachsenen und 1:5000 bei Kindern geschätzt [62 S. 1013]. Es werden zwei Typen der VPA induzierten Hepatotoxizität beschrieben. Typ 1 umfasst die dosisabhängige toxische Reaktion mit Regression nach Absetzen der Therapie. Zum Typ 2 zählen dosisunabhängige, idiosynkratische Reaktionen, die meist mit Leberzellnekrosen in Verbindung stehen [63 S. 2027]. Zur Hochrisikogruppe gehören Kinder im Alter unter zwei Jahren, Patientin mit einer Polytherapie, mit Retardierung und metabolischen Erkrankungen [62 S. 1013].

Richtungsweisende Symptome einer Valproinsäure bedingten toxischen Hepatopathie sind zunächst klinischer (Übelkeit, Erbrechen, Apathie und vermehrte Krampfanfälle, meist im Zusammenhang mit einem fieberhaften Infekt), dann laborchemischer Natur (Anstieg der Transaminasen). Als histologisches Korrelat sind anfangs eine mikrovesikuläre Steatose und später zentrilobuläre Nekrosen erkennbar [12 S. 465]. Schädigungen der Leber treten fast ausschließlich in den ersten sechs Monaten der Behandlung auf, vorzugsweise zwischen dem Ende des ersten und des vierten Behandlungsmonats. In Einzelfällen wurde eine Leberdysfunktion erst nach mehr als sechs Monaten der Behandlung beobachtet. Betroffen sind vorwiegend Kinder in den ersten fünfzehn Lebensjahren, mit einem Maximum in den ersten beiden Lebensjahren. Jenseits des zwanzigsten Lebensjahres sind bedrohliche Nebenwirkungen nur in extremen Ausnahmefällen bekannt geworden [100 S. 101].

Das Auftreten der hepatozellulären Dysfunktion in Patienten, die Valproinsäure einnehmen, wird einer Veränderung verschiedener Stoffwechselwege zu geschrieben. Dazu gehören eine Hypocarnitinämie, ein Ungleichgewicht zwischen Beta- und Omega-Oxidation, die Akkumulation von 4-en VPA und ein Carnitindefizit [23 S. 7]. VPA wird in der Leber über die Glucuronsäure-Konjugation, mitochondriale Beta- und zytosolische Omega-Oxidation metabolisiert.

Therapeutisch entscheidend für einen günstigen Ausgang des Leberversagens sind ein frühzeitiges Absetzen von VPA und eine frühe intravenöse Substitution von Carnitin (100mg/kgKG).

2 Zielstellung der Arbeit

Mitochondriale Funktionsstörungen zeigen genetisch wie auch klinisch eine große Variationsbreite, die die Diagnosefindung erschwert. In den letzten Jahren wurden immer mehr Patienten, besonders Kleinkinder mit hepatozellulärer Insuffizienz und Enzephalopathie im Rahmen einer mitochondrialen Erkrankung beschrieben. Als vielfache Ursache der mitochondrialen Hepatoenzephalopathie im Kleinkindesalter wird das mitochondriale DNA Depletionssyndrom diskutiert. Kürzlich wurden zwei nukleäre Gene im Zusammenhang mit einem hepatozerebralem Syndrom und einer mtDNA Depletion beschrieben, zum einen das *POLG1*-Gen im Rahmen des Alpers Syndroms [88], zum anderen das *DGUOK*-Gen bei Patienten mit der hepatozerebralen Form des mitochondrialen DNA Depletionssyndroms [77].

An unserer Kinderklinik wurden im Jahr 2004 drei Säuglinge mit fulminanten Leberversagen, neurologischen Symptomen sowie dem Nachweis einer mitochondrialen DNA Depletion im Lebergewebe behandelt. Dies veranlasste uns, die Genese der mitochondrialen Hepatoenzephalopathie in einem größeren Patientengut mit mitochondrialer Dysfunktion näher zu erörtern.

Wir untersuchen ein Kollektiv von 44 Kindern mit neurologischen Symptomen und Leberinsuffizienz, bei denen andere Ursachen eines hepatozerebralen Syndroms ausgeschlossen wurden, hinsichtlich eines mitochondrialen DNA Depletionssyndroms und Mutationen im *DGUOK*- bzw. *POLG1*-Gen.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Aqua bidest:	Firma Promega GmbH, Deutschland
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide Hybri-Max sterile filtered, Summenformel: C ₂ H ₆ OS, Molekulargewicht: 78.13 AMU, Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
dNTP:	dNTP Set, Konzentration: 100 mM, 1:10 verdünnt, Firma Invitrogen GmbH, Deutschland
10xPuffer:	Firma Invitrogen GmbH, Deutschland; Firma Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH
POLG1-Primer:	Metabion GmbH, Deutschland
DGUOK-Primer:	Metabion GmbH, Deutschland
HotStarTaq® DNA Polymerase:	Konzentration 1000 Units, Firma Qiagen GmbH, Deutschland
Agarosegel 2%, 3%:	BMA Seakem ME Agarose, Firma Biozym Scientific GmbH, Deutschland Nusieve GTG Agarose, Firma Biozym Scientific GmbH, Deutschland
0,5xTBE-Puffer:	Tris-base (Tris-aminomethan) 890 mM 216 g Borsäure 890 mM 110 g EDTA 2 mM 16,6 g →mit Aqua dest ad 2000 ml, pH auf 8,2 einstellen, autoklavieren
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml, Firma Bio-Rad, München, Deutschland
BlueJuice:	6xAuftragspuffer für DNA, Firma Sigma, Deutschland Xylen Cyanol FF 0,1% 10 mg ad 10 ml Bromphenolblau 0,1% 10 mg ad 10 ml Ficoll 400 15% →10 mg Xylen Cyanol FF + 1,5 g Ficoll 400 in ein 10 ml Röhrchen einwiegen, mit Aqua bidest ad 10 ml →10 mg Bromphenolblau + 1,5 g Ficoll 400 in ein 10 ml Röhrchen einwiegen, mit Aqua bidest ad 10 ml Bei Bedarf werden gleiche Mengen Lösung 1 und 2 gepoolt
1kb Marker:	1Kb DNA Ladder: Konzentration 1.0 µg/µl, sizing linear double-

stranded DNA fragments from 500 bp to 12 kb, Firma Invitrogen GmbH, Deutschland

Storage Buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM NaCl
0.1 mM EDTA

QIAquick®Gel Extraktion Kit: Firma Qiagen GmbH, Deutschland

ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit:

Firma Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH,
enthält Dideoxynucleotide, Deoxynukleotide, Puffer, Polymerase
(Cycle Sequencing Mix
pGEM® - 3Z(+) Control Template, 0.2 µg/µl
21 M13 Control Primer (forward), 0.8 pmol/µl)

Dye Ex™ 2.0 Spin Kit: Firma Qiagen GmbH, Deutschland

Formamide: Firma Promega GmbH, Deutschland

RNeasy Kit Firma Qiagen GmbH, Deutschland

Bal I Firma Promega GmbH, Deutschland

Mly I Firma New England Biolabs GmbH, Deutschland

Fau I Firma Fermentas GmbH, Deutschland

Bcc I Firma New England Biolabs GmbH, Deutschland

3.2 Geräte

PCR-Gerät PTC-100™ Programmable Thermal Controller,
Firma Genetic Technologies, Inc., MJ Research, USA

Zentrifuge Centrifuge 5415 D, Firma Eppendorf, Deutschland
Gelkammer

UV-Lichtkammer: BioDocAnalyze Biometra Ti5, Firma Whatman Biometra,
Deutschland

Wasserbad: Schüttelwasserbad 1086, Firma GFL-Gesellschaft für
Labortechnik GmbH, Deutschland

Vortexer: Firma Heidolph Instruments, Deutschland

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer:

Firma Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH

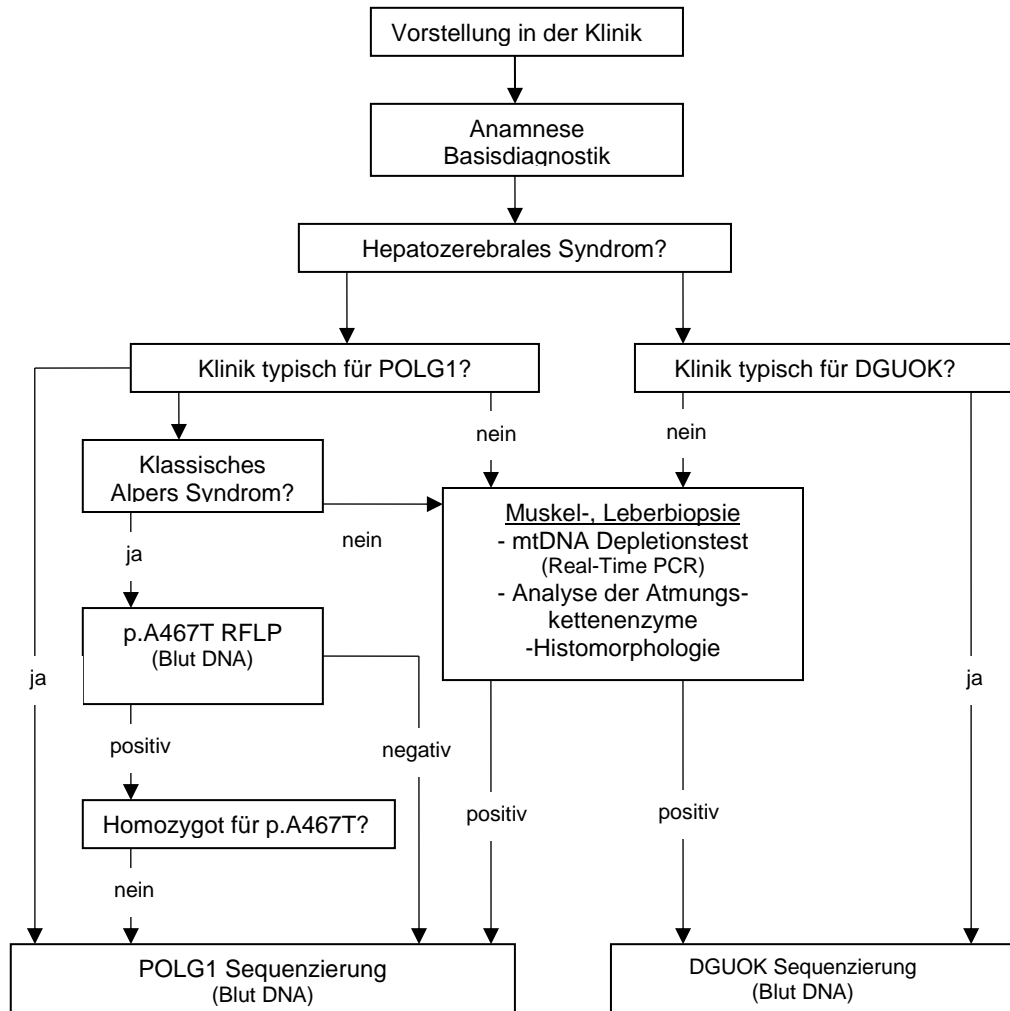
4 Patienten und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Wir untersuchten ein Kollektiv von Patienten mit klinischen, biochemischen und molekulargenetischen Anzeichen einer mitochondrialen Erkrankung. Die Grundlage dieser Arbeit bildete zum einen die Daten- und Gewebesammlung biochemisch analysierter Muskelgewebsproben am Institut für Klinische Chemie des Krankenhauses München-Schwabing im Zeitraum von 1990–2005. Aus dieser Sammlung rekrutierte ich Patienten im Alter unter sechzehn Jahren mit nachgewiesenem kombinierten Atmungskettendefekt, die sowohl neurologische Symptome (Epilepsie, psychomotorische Entwicklungsverzögerung, Nystagmus) als auch eine Leberbeteiligung im Sinne einer Leberinsuffizienz bis hin zum Leberversagen zeigten. Zum anderen schloss ich die im Zeitraum meiner experimentellen Arbeit eingesandten Proben mit der konkreten Fragestellung nach MDS in Patienten mit neurologischen und hepatischen Krankheitszeichen ein. Die Proben wurden hinsichtlich der Aktivität ihrer Atmungskettenenzyme, einer mtDNA Depletion und pathogener Mutationen im *POLG1*- bzw. *DGUOK*-Gen untersucht, um eine Aussage über die Häufigkeit und den kausalen Zusammenhang von *POLG1*- bzw. *DGUOK*-Mutationen mit dem hepatozerebralen Syndrom zu treffen.

Abbildung 4 Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf hepatozerebrales Syndrom mitochondrialer Genese

[modifiziert nach Horvath et al., 2006 S. 1682]



Für die Diagnostik eignen sich Biopsien, die aus Muskel und Leber entnommen werden. Die Muskelbiopsie kann mit der Biopsienadel oder durch eine offene Entnahme gewonnen werden. Es empfiehlt sich, gleichzeitig eine Fibroblastenkultur anzulegen. Aufgrund von Methoden-Optimierung unseres Analyselabors ist für die biochemische Untersuchung des mitochondrialen Energiestoffwechsels eine Nadelbiopsie (mindestens 20 mg reines Muskelgewebe) ausreichend. Zur molekulargenetischen Untersuchung eignet sich DNA extrahiert aus Gewebeproben oder aus EDTA-Blut (2 ml).

4.2 Biochemische Analyse

Die Muskel- und Lebergewebsproben wurden bei -80°C aufbewahrt. Die biochemische Analyse der Atmungskettenenzymaktivitäten I-IV erfolgte aus gefrorenem Muskel- oder Lebergewebe [42 S. 442, 443].

4.3 DNA Analyse

Die DNA-Extraktion erfolgte aus Muskel-, Lebergewebe, Fibroblasten und EDTA-Blut entsprechend den „Standard Purifikation“ Protokollen (Qiagen, Hildesheim, Germany).

4.3.1 mtDNA Depletionstest

Die Kopieanzahl der mtDNA und nDNA im Muskel- bzw. Lebergewebe wurde mithilfe der Quantitativen-PCR und des Fluoreszenz Temperatur Cyclers (LightCycler, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) gemessen. Dafür wurde ein LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) mit Primern (Abb. 5) benutzt, wie von Setzer et al., 2005 [S.846] beschrieben. Zur Quantifizierung der mtDNA wurde die Region zwischen den Nukleotidpositionen 8981 und 9061 des *ATP6*-Gens amplifiziert. Zur Bestimmung des Gehalts an nDNA wurde die Region zwischen den Nukleotidpositionen 4280 und 4342 des Exon 8 des *GAPDH*-Gens amplifiziert. Alle Proben liefen in dreifacher Ausführung. Die absolute Kopieanzahl der mtDNA und nDNA wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe von Plasmiden mit bekannter Kopieanzahl ausgerechnet.

Abbildung 5 Primer Depletionstest

[nach Setzer et al., 2005 S. 846]

mito-fw	5´ ACC AAT AGC CCT GGC CGT AC 3´
mito-rev	5´ GGT GGC GCT TCC AAT TAG GT 3´
nuklear-fw	5´ CGG GGC TCT CCA GAA CAT C 3´
nuklear-rev	5´ ATG ACC TTG CCC ACA GCC T 3´

4.3.2 Sequenzierung des *DGUOK*- bzw. *POLG1*-Gens

4.3.2.1 PCR

Die Sequenzierung der sieben kodierenden Exons (1-7) einschließlich der angrenzenden Intronbereiche des *DGUOK*-Gens erfolgte anlehnend an [77] (Abb. 6).

Abbildung 6 Primer *DGUOK*-Gen

[nach Mandel et al., 2001 S. 340 und www.genetics.nature.com Journal Volume 29, November 2001, Web Table A]

Exon1 upstream	Ex1 fw	5' TTA CGT CAA CGG TGC GCT GGA GCG 3'
Exon1 downstream	Ex1 rev	5' CGG CCG CAT CAG ACG CAG GCC ATT 3'
Exon2 upstream	Ex2 fw	5' CAA TGG TAC GGC TGC TGA GT 3'
Exon2 downstream	Ex2 rev	5' TGG TGT ATG TGG TCT GCT TT 3'
Exon3 upstream	Ex3 fw	5' TAA ACC TGT TTG GGG AGG TAG 3'
Exon3 downstream	Ex3 rev	5' CTC TGG ACA AAT CTG TAT AGT 3'
Exon4 upstream	Ex4 fw	5' GGT TAA GTG GTT TGA ACA GA 3'
Exon4 downstream	Ex4 rev	5' TGT GCT GCA GGT AAT GTC TAC 3'
Exon5 upstream	Ex5 fw	5' GCA AAG GCA TGG CTT GTA ATG 3'
Exon5 downstream	Ex5 rev	5' TGA CAT TTC CAA CCA TTT CCA G 3'
Exon6 upstream	Ex6 fw	5' AGA CTC GTT CTC TGA GTA AGA C 3'
Exon6 downstream	Ex6 rev	5' GTG TGA AAT GCA ATG TGA GAT G 3'
Exon7 upstream	Ex7 fw	5' TGC CCA CAT TTC TTC TCC ATG 3'
Exon7 downstream	Ex7 rev	5' CAG CTC TTG AGC GGC AGA G 3'

Die Analyse der 22 kodierenden Exons (2-23) mit anliegenden Intronbereichen des *POLG1*-Gens orientierte sich an [65] (Abb. 7). Exon 1 ist nicht kodierend.

Abbildung 7 Primer *POLG1*-Gen

[nach Lamantea et al., 2002 S. 214]

Exon2a upstream	Ex2a fw	5' CTC CAC GTC TTC CAG CCA GTA AAA 3'	413bp
Exon2a downstream	Ex2arev	5' TTC TGC AGG TGC TCG ACG CT 3'	
Exon2b upstream	Ex2b fw	5' GGG CTG CAC GAG CAA ATC TT 3'	509bp
Exon2b downstream	Ex2b rev	5' AGC ACG TAA CAG GAC CTC AGA AAA 3'	
Exon3 upstream	Ex3 fw	5' TAG GTG TGC AGT GGT TGT TG 3'	338bp
Exon3 downstream	Ex3 rev	5' AAC CAC TGA GAT TAG GGC TC 3'	
Exon4 upstream	Ex4 fw	5' TCC ACA CCA CCA AGC AGT GGT 3'	299bp
Exon4 downstream	Ex4 rev	5' AGA GGG GGT CCC AAG CAC TAT 3'	
Exon5/6 upstream	Ex5/6 fw	5' ATA GTG CTT GGG ACC CCC TCT 3'	506bp
Exon5/6 downstream	Ex5/6 rev	5' GTA CCA GGA ACA CAC TGA CC 3'	
Exon7/8 upstream	Ex7/8 fw	5' TCA GGG ATT GGG CCA GTC TT 3'	461bp
Exon7/8 downstream	Ex7/8rev	5' ATG GGC AAC TTG CTG GCT GT 3'	
Exon8/9 upstream	Ex8/9 fw	5' TGG AGT GGG ACC TGC AAG AA 3'	479bp
Exon8/9 downstream	Ex8/9 rev	5' CTG AGA ATG GAG CAA GGG TA 3'	
Exon10 upstream	Ex10 fw	5' GGG ACA TTG TGA GAG AGA GA 3'	401bp
Exon10 downstream	Ex10 rev	5' ACT CTT TCC ACT AGC CTG AG 3'	
Exon11/12 upstream	Ex11/12 fw	5' CAG AGT GGG CAT CTG GTA AT 3'	525bp
Exon11/12 downstream	Ex11/12 rev	5' AAG AGG AAG CCC TTT CCA CC 3'	
Exon13 upstream	Ex13 fw	5' ATG GCC CTT GCT GAA TGC AG 3'	224bp
Exon13 downstream	Ex13 rev	5' TGG GCC TTG AGC AGA ATG AG 3'	
Exon14 upstream	Ex14 fw	5' GCA GGT ACT CAC GTT GTG TC 3'	319bp
Exon14 downstream	Ex14 rev	5' CTG TGG GAA TCC AGG GTT AG 3'	
Exon15/16 upstream	Ex15/16 fw	5' GGA TGT GGG ATA GAT TCT GCT 3'	409bp
Exon15/16 downstream	Ex15/16 rev	5' CCT CAG AGC CCA GTT TCT ACA 3'	
Exon17/18 upstream	Ex17/18 fw	5' GTA GGA AGA GTC TCA TTT GGG 3'	574bp
Exon17/18 downstream	Ex17/18 rev	5' CCT GGG TGT TAA AGT GGA TG 3'	
Exon19/20 upstream	Ex19/20 fw	5' TGA ACA TTC CTT GCC AAG GC 3'	525bp
Exon19/20 downstream	Ex19/20 rev	5' TCT GCC CAT GCT CCA AAG GTA 3'	
Exon21 upstream	Ex21 fw	5' GCT TCT ACC CTG GAG TTA ATT G 3'	345bp
Exon21 downstream	Ex21 rev	5' CAA GGA ACG CTC ACC CAA AG 3'	
Exon22 upstream	Ex22 fw	5' GTC ATT GCT CCA GGA GTG AT 3'	306bp
Exon22 downstream	Ex22 rev	5' CTG TTC TCC AAG ACC CAC TT 3'	
Exon23 upstream	Ex23 fw	5' GCT CCT TTG CTC ACT TCT GA 3'	277bp
Exon23 downstream	Ex23 rev	5' CTA CTG AAA AAT GGC TGG CC 3'	

Die PCR-Reaktion wird in automatischen Thermocyclern durchgeführt, die über beheizbare Deckel verfügen, um Volumenschwankungen durch verdunstendes Wasser zu vermeiden. Zunächst wird die doppelsträngige DNA erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Denaturierungstemperatur beträgt 95°C und die Denaturierungszeit fünfzehn Minuten. Dann wird die Temperatur gesenkt, so dass sich die Primer an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur hängt dabei von den Primern ab und liegt normalerweise 25°C unter ihrem Schmelzpunkt. Die Annealingtemperatur liegt bei 57°C (*POLG1*) bzw. 55°C (*DGUOK*), die Annealingzeit beträgt eine Minute. Dann füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf, die Elongationstemperatur liegt bei 72°C für eine Minute. Es werden insgesamt 40 Zyklen durchlaufen.

Das Gesamtreaktionsvolumen beträgt 50,00 µl und setzt sich wie folgt zusammen:

PCR-Ansatz: 36,75 µl Aqua bidest
 5,0 µl DMSO (*POLG1*: Exon 2a, 2b; *DGOUK*: Exon 1, 2, 3, 5, 6)
 1,0 µl dNTP
 5,0 µl 10xPuffer (enthält MgCl²⁺)
 0,5 µl pro Primer forward/ reverse (Abb. 6 und 7)
 1,0 µl DNA
 0,25 µl Hot Start Taq

4.3.2.2 Gelelektrophorese und Reinigung

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht das Auftrennen von linearen DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die aufgrund ihrer Polyanion-Struktur stark negativ geladenen Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zum positiven Pol. Dabei ist ihre Laufgeschwindigkeit in weiten Bereichen umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Mit Hilfe von Agarosegelen wird die DNA der Größe nach zwischen ca. 50 bp bis ca. 16 kb aufgetrennt und das PCR-Produkt anhand seiner Größe identifiziert.

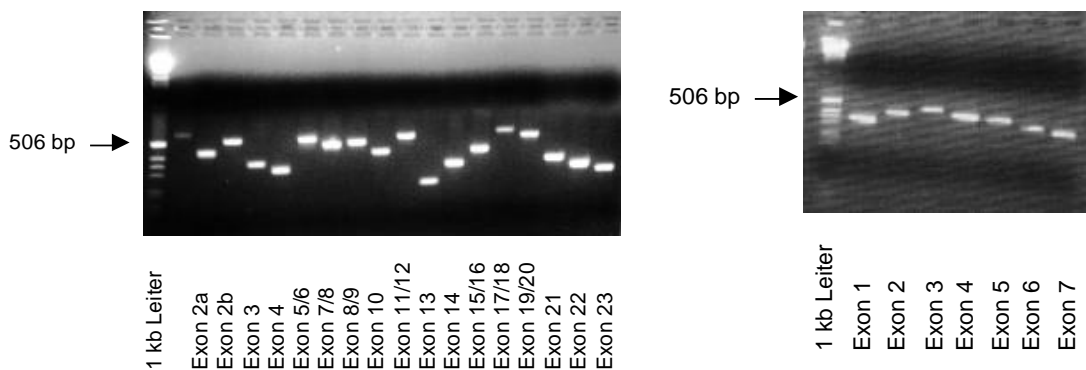
Das von uns verwendete zweiprozentige Agarosegel erhält man durch Aufkochen von 4 g Agarose in 200 ml 0,5xTBE-Puffer. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid zum Agarosegel, um die DNA sichtbar zu machen, wird die noch warme Lösung in die Gelkammer gegossen.

Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es in eine mit 5xTBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Proben werden mit einer Pipette in die Geltaschen gefüllt, nachdem sie mit

Blue Juice versetzt wurden. Um die Größe der Banden besser beurteilen zu können, wird immer ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen (1kb Marker der Firma Invitrogen). Die Kammern laufen mit 124 Volt. Der Lauf wird beendet, wenn das mitlaufende Bromphenolblau das letzte Drittel des Gels erreicht hat.

Unter UV-Licht werden die Banden dann sichtbar gemacht und als Foto festgehalten (Abb. 8).

Abbildung 8 Gelelektrophorese *POLG1* und *DGUOK* nach PCR



Um die Templates aus dem Agarosegel zurückzugewinnen, werden die Banden ausgeschnitten und in der Gelextraktion mithilfe des QIAquick® Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

4.3.2.3 Sequenzier-PCR

Nach der Reinigung des PCR-Produktes wird die Bandenstärke durch eine erneute Gelelektrophorese visualisiert, sie bestimmt die in der Sequenzierreaktion einzusetzende Menge an Gelextrakt-Produkt (Abb. 9).

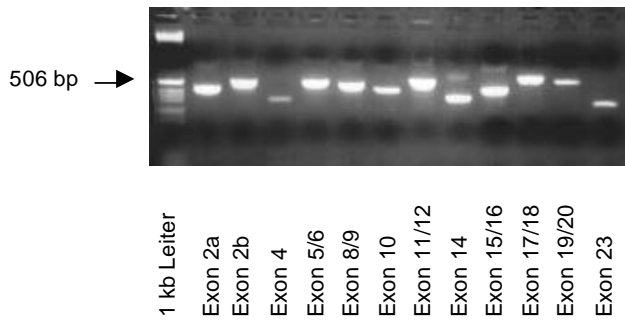


Abbildung 9

**Gelelektrophorese *POLG1* nach
Reinigung**

Als Reagenz für die Sequenzierreaktion beim automatischen Sequenzieren verwenden wir den ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems, der die vier markierten Dideoxynukleotide, Deoxynukleotide, Puffer und die Polymerase enthält.

Sequenzier-PCR-Ansatz: DNA + Aqua bidest → 7,5 µl
0,5 µl Primer
2 µl Big Dye

4.3.2.4 Gelfiltration

Nach der Sequenzierreaktion (Denaturierung 94°C 1min, Annealing 57°C bzw. 55°C 15 sec, Extension 60°C 4 min, 35 Zyklen) wird die Probe über das DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Firma Qiagen) gereinigt. Bei dieser Gelfiltration werden überschüssige Big Dye Moleküle und Salze durch die Säule zurückgehalten. Anschließend werden 20 µl Formamide dazugegeben. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C wird die Probe denaturiert und dann sofort auf Eis abgekühlt. Nun kann die Probe in Sequenziercups abgefüllt werden.

4.3.2.5 Analyse der Basenabfolge

Bei dem von uns verwendeten ABIPRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, PE) werden die sequenzierten Stränge in einer Kapillare getrennt und entsprechend ihrer Länge von einem automatischen Laserscanner detektiert. Der Rechner zeichnet dann die hintereinander erfassten Fluoreszenzsignale als farbige Peaks entsprechend der Basenabfolge auf.

Die POLG1-Sequenzen wurden mit der Genbank Referenz (GI: 4505936) verglichen, die DGUOK-Sequenzen mit der Genbank Referenz (GI: 18426966). (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

4.3.3 Sequenzierung der cDNA des *POLG1*- und *DGUOK*- Gens

4.3.3.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Quiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Zellen werden in 600 µl einer Lösung aus 1000 µl Puffer RLT und 10 µl β-ME lysiert und durch Ultrazentrifugation bei 1400 U zwei Minuten von Proteinen und DNA getrennt. Dann werden 600 µl Ethanol 70% dazugeben und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst. 600 µl dieser Lösung werden auf ein RNeasy mini colum pipettiert und bei 10000 U fünfzehn Sekunden zentrifugiert. Nun wird das Zentrifugat verworfen und der Vorgang wiederholt. 700 µl Puffer RW1 werden dann auf das RNeasy mini colum gegeben und bei 10000 U fünfzehn Sekunden zentrifugiert. Nachdem die Säule auf ein neues Colum gesetzt wurde, werden 500 µl Puffer RPE dazugegeben und bei 10000 U fünfzehn Sekunden zentrifugiert. Dann werden nochmals 500 µl Puffer RPE auf die Säule pipettiert und zwei Minuten bei 10000 U zentrifugiert. Im Anschluss wird die Säule auf ein Eppendorf Cup gesetzt, 50 µl RNase freies Wasser dazu gegeben und bei 10000 U über eine Minute gelöst. Die RNA ist als gläsernes Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens zu erkennen. Sie wird bei -70°C gelagert.

4.3.3.2 Sequenzierung der cDNA

In einer Reverse-Transkription wird eine RNA-Sequenz in die entsprechende cDNA-Sequenz umgeschrieben. Dazu sind eine RNA-Matrize, ein 3' Primer, eine Reverse-Transkriptase sowie die vier Nukleosidtriphosphate notwendig. Die Sequenzierung der cDNA erfolgte mit den entsprechenden cDNA Primerpaaren und dem One-step-RT-PCR Kit (Quiagen) entsprechend dem Standardprotokoll des Herstellers (Abb. 10).

Das Gesamtreaktionsvolumen beträgt 50,00 µl und setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz: 29 µl RNase freies Wasser
 10 µl 5xPuffer
 2 µl dNTP
 1 µl pro Primer forward/ reverse (Abb. 10)
 5 µl RNA
 2µl Enzym Mix

Annealingtemperatur: 55°C

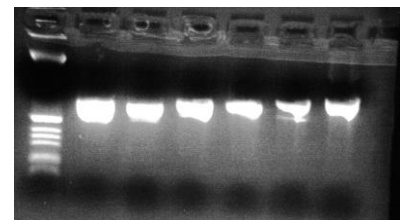
Die RT-PCR- und PCR-Produkte wurden anschließend mittels Elektrophorese auf einem Agarose-Gel sichtbar gemacht (Abb. 10), dann erfolgte die Reinigung und Sequenzier-PCR wie oben beschrieben.

Die cDNA-*POLG1*-Sequenzen wurden mit der Genbank Referenz (GI: 29791647) und die cDNA-*DGUOK*-Sequenzen mit der Genbank Referenz (GI: 18645173) verglichen.

Abbildung 10 cDNA-Primer *POLG1*- und *DGUOK*-Gen

POLG1-Gen

1 fw	5´ CCA GCC AGT AAA AGA AGC CAA G 3´	685 bp
1 rev	5´ CAA GCA GAC CTC CAC GTC GAA C 3´	
2 fw	5´ CAA CCT GGA CCA GCA CTT 3´	667 bp
2 rev	5´ CTG ACT GTT GAC ACT GCT GA 3´	
3 fw	5´ GCG CAG TCT GTG GAT AGC 3´	737 bp
3 rev	5´ CCC TTC AGC TTC TGC AAG 3´	
4 fw	5´ CAC AGC CAG CAA GTT GC 3´	741 bp
4 rev	5´ CTT GTG AGG CAG CTT GAT 3´	
5 fw	5´ AGG TCA ACC CCT AGC TCT G 3´	819 bp
5 rev	5´ GTA CAT CTG CTG GGC CTT C 3´	
6 fw	5´ GAG CAT GCC AAA ATC TTC AAC 3´	949 bp
6 rev	5´ CAC CCA CCC CGA TGA AGC 3´	



1 kb DNA Leiter
 Exon 1
 Exon 2
 Exon 3
 Exon 4
 Exon 5
 Exon 6

DGUOK-Gen

fw	5´ CTC TTT CTA AGT CGG CTT CG 3´
rev	5´ CTT TAC AAA GGT GTT TAC CT 3´

4.3.4 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

4.3.4.1 *POLG1*-Gen: p.A467T

Zum Screening der häufigsten Missense-Mutation im *POLG1*-Gen p.A467T führten wir die RFLP-Analyse durch. Die Region mit der Mutation im Exon 7 wurde wie oben beschrieben amplifiziert. Das Restriktionsenzym *Bal* I erkennt folgende DNA Sequenzen 5'...TGG▼CCA...3' und 3'...ACC▼GGT...5'. Als Negativkontrolle diente eine DNA Probe aus dem Blutspenderkollektiv. Als Positivkontrollen wurden DNA Proben mit bereits nachgewiesener heterozygoter bzw. homozygoter p.A467T Mutation hergenommen. Die RFLP Analyse wurde sowohl in DNA Proben des Patientenkollektivs als auch in 200 DNA Proben aus dem Blutspenderkollektiv deutscher Herkunft durchgeführt.

Verdau-Ansatz: 17,3 µl PCR-Produkt
 2,0 µl 10xPuffer G (Promega)
 0,2 µl BSA (Promega)
 0,5 µl *Bal* I (Promega)

Der Verdau wurde sechszehn Stunden bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym schneidet alle Fragmente mit entsprechender Sequenz. Durch Auftragen auf zweiprozentiges Agarosegel wurden die DNA Banden der Größe nach getrennt und mithilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Abb. 11 und 12).

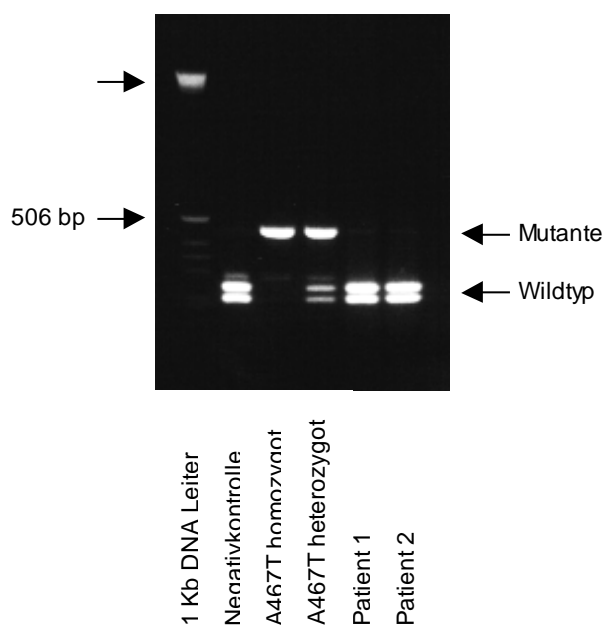


Abbildung 11 p.A467T-Verdau

Als Längenstandard wurden 2 µl der 1 kb-DNA Leiter (Marker) eingesetzt (Bande bei ca. 506m bp sichtbar). Die Mutante wird vom Restriktionsenzym *Bal* I nicht geschnitten. Der Wildtyp wird vom Restriktionsenzym *Bal* I geschnitten.

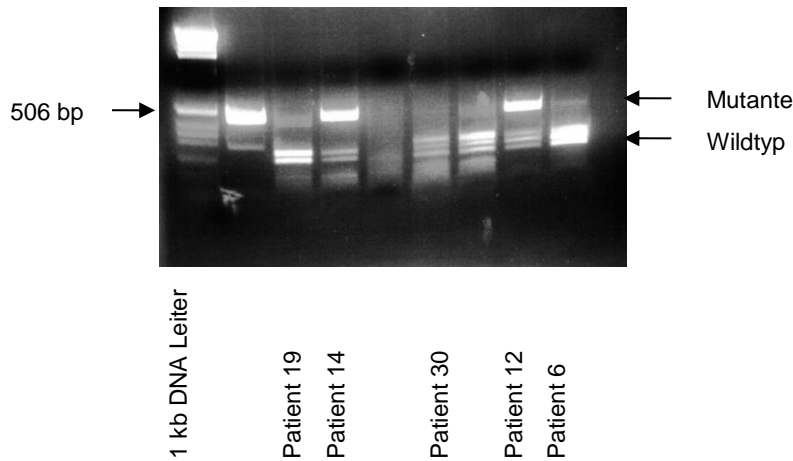


Abbildung 12

p.A467T-Verdau

Die Patienten 14 und 12 zeigen einen heterozygoten Status für die Missense-Mutation p.A467T.

4.3.4.2 *DGUOK*-Gen: p.S52F, p.Q170R, p.M1V und p.M1I

50 Kontroll-DNA Proben aus dem Blutspenderkollektiv wurden auf folgende *DGUOK*-Mutationen mittels RFLP getestet: p.M1V, p.M1I, p.S52F und p.Q170R [44 S. 1131]. Durch Auftragen auf dreiprozentiges Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid wurden die DNA Banden evident.

Die RFLP Analyse für die **p.S52F** Mutation wurde mithilfe des Forward-Mismatch-Primers 5′ - ATTTGCATTGCAGCTGTGGGAGAG - 3′, des Reverse-Primers von Exon 2 (Abb. 6) und des Restriktionsenzym *Mly* I durchgeführt. *Mly* I identifiziert die Sequenz 5′...GAGTC(N)₄▼...3′. Der Verdau wurde 16 Stunden bei 37°C inkubiert (Abb. 13).

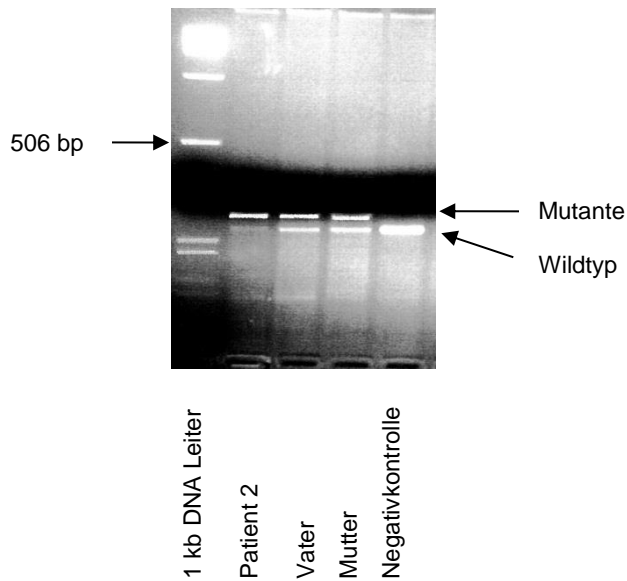


Abbildung 13

p.S52F-Verdau

Bei Patient 2 liegt die Missense-Mutation p.S52F homozygot vor. Vater und Mutter zeigen einen heterozygoten Status.

Für die RFLP Analyse der **p.Q170R** Mutation wurden ein Forward-Mismatch-Primer mit der Basenabfolge 5´ - AGTGACATCGAGTGGCATATCTAG - 3´ zusammen mit dem Reverse-Primer von Exon 4 und dem Restriktionsenzym Fau I benutzt. Fau I erfasst die Sequenzen 5´...CCCGC(N)₄▼...3´ und 3´...GGGCG(N)₆▼...5´. Die Proben wurden 16 Stunden bei 55°C inkubiert.

Für die RFLP Analyse von **p.M1V** und **p.M1I** wurden die PCR Produkte von Exon 1 mit dem Restriktionsenzym Bcc I 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Bcc I identifiziert folgende Sequenzen: 5´...CCATC(N)₄▼...3´ und 3´...GGTAG(N)₅▼...5´.

4.4 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der klinischen Daten wurde das Statistikprogramm Statview verwendet. Die Patienten wurden hinsichtlich der Merkmale in Tabelle 5 ausgewertet und aufgrund ihrer klinischen und molekulargenetischen Merkmale in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Gruppen wurden hinsichtlich Median, Range und prozentualen Anteil am Gesamtkollektiv analysiert. Bei der Auswertung habe ich mich für die Angabe des Medians anstelle des Mittelwertes entschieden, da der Median auch extrem abweichende Werte berücksichtigt und sich gut als Lageparameter für nicht normal verteilte Grundgesamtheiten eignet. In der Auswertung wurden die Werte für Median und Range in Klammern angegeben (Median; Range).

Um die Gruppen miteinander zu vergleichen wurde zuerst einen Mehrfeldertest, der Kruskal-Wallis-Test, benutzt. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nicht parametrischer Test für mehrere unabhängige Stichproben. Die Prüfgröße ist hier ein Chi-Quadrat-Wert. Chi-Quadrat-Wert $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten und $p < 0,001$ einen hochsignifikanten Gruppenunterschied an. Für weitere Einzeltests wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier statistischer Test, der zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier unabhängiger Stichproben dient. Die Prüfgröße ist der U-Wert. $P < 0,05$ gibt einen signifikanten Gruppenunterschied an. Während $p < 0,001$ einen hochsignifikanten Gruppenunterschied angibt.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Analyse

In der Datensammlung des Institutes für Klinische Chemie, Molekulare Diagnostik und Mitochondriale Genetik und der eingesandten Proben mit der konkreten Fragestellung nach einem mitochondrialen DNA Depletionssyndrom konnte ich 44 Kinder deutscher, österreichischer, polnischer und türkischer Abstammung mit neurologischen Symptomen und Leberinsuffizienz ausfindig machen, bei denen andere Ursachen eines hepatozerebralen Syndroms ausgeschlossen wurden. Sie wurden hinsichtlich eines mitochondrialen DNA Depletionssyndroms und Mutationen im *DGUOK*- bzw. *POLG1*-Gen untersucht. Bei 28 Kindern lagen uns Ergebnisse der biochemischen Analyse der Atmungskettenenzyme vor. In 30 Fällen führten wir einen mitochondrialen DNA Depletionstest durch. Lebergewebe wurde diesbezüglich in neun Fällen untersucht. Von 37 Patienten stand uns DNA extrahiert aus EDTA-Blut, Muskel-, Lebergewebe oder Fibroblasten zur Mutationsanalyse zur Verfügung.

5.1.1 Gesamtkollektiv

Alle 44 Kinder präsentierten klinische Zeichen einer Leberdysfunktion sowie neurologische Symptome mit unterschiedlicher Varianz. Tabelle 5 zeigt die klinischen Merkmale dieser Patienten.

Die Mehrzahl unserer Patienten war männlich (Geschlechtsratio 1,44; 26 männlich/18 weiblich) und erkrankte im Alter von sechs Monaten (Range 0 - 99 Monate). Beinahe die Hälfte der erkrankten Kinder (19/44; 43%) verstarb vor dem zweiten Lebensjahr (Median 12 Monaten; Range 1 – 105 Monate). Bei biochemischer bzw. molekular-genetischer Analyse waren die Patienten im Mittel fünfzehn Monate alt (Range 0,5 - 132 Monate). Einige Kinder (15/44; 34%) haben eine positive Familienanamnese, die einen rezessiven Vererbungsmodus vermuten lässt. Es wurden Geschwisterkinder bzw. Familienangehörige mit gleichem Krankheitsbild, sowie unklare Aborte, neonatale oder infantile Todesfälle geschildert. Andere Kinder (8/44; 18%) haben blutsverwandte gesunde Eltern. Alle Patienten erkrankten an einer Hepatopathie. Es wurden milde Verläufe einer hepatozellulären Dysfunktion bis hin zur Leberinsuffizienz und Leberversagen beschrieben. Ebenso litten alle Kinder an verschiedenen neurologischen Erscheinungen. Die Varianzbreite reicht von milder bis schwerer Enzephalopathie mit geistiger und/oder motorischer Retardierung, Epilepsie (17/44;

39%), Myoklonien (4/44; 9%), Ataxie (3/44; 7%), Schlaganfall-ähnliche Episoden (2/44; 5%) und Nystagmus (8/44; 18%). Weitere häufig beobachtete Krankheitszeichen waren muskuläre Hypotonie (25/44; 57 %), teilweise einhergehend mit einem Anstieg der Kreatinkinase im Serum (6/25; 24%), Sehverlust (11/44; 25%) und Kardiomyopathie (7/44; 16%). Seltener wurden Nephropathie (4/44; 9%), exokrine Pankreasinsuffizienz (3/44; 7%) und Hörverlust (1/44; 2%) berichtet. Eine Laktatazidose als diagnostisches Indiz für eine mitochondriale Erkrankung wurde bei der Hälfte der Untersuchten (24/44; 55%) gemessen. Ragged-Red-Fibers (RRF) als histologischer Nachweis einer mitochondrialen Zytopathie wurden in 3/44 Patienten (7%) unserer Gruppe gefunden. Erstaunlicher Weise zeigte ein Proband des Kollektivs (Pat 34) mit Hepatopathie, Enzephalopathie, muskulärer Hypotonie, Myoklonus, Nephropathie, Laktatazidose und CK-Erhöhung unter anderem auch einen T-Zell-Defekt. Ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und immunologischer Erkrankung wird von Reichenbach et al., 2006 S. 321 beschrieben.

Beim Erheben der Daten kristallisierten sich nicht nur Unterschiede im klinischen Verlauf sondern auch im Schweregrad der Erkrankung heraus. 8/44 Patienten hatten eine schwere neonatal beginnende Hepatopathie mit unterschiedlich schwer ausgeprägten neurologischen Symptomen. Eine zweite Gruppe (13/44) präsentierte ein Alpers Syndrom mit therapieresistenten Krampfanfällen, psychomotorischer Entwicklungsverzögerung, Leberinsuffizienz und Leberversagen. Weitere 23 Patienten zeigten verschiedene Formen und Schweregrade einer neurologischen Erkrankung mit milder oder schwerer Leberbeteiligung und Symptomen anderer Organmanifestationen. Aufgrund dieser phänotypischen und der molekulargenetischen Ergebnisse habe ich unser Patientenkollektiv mit hepatozerebralem Syndrom in drei Gruppen eingeteilt.

1. Patienten ohne molekulargenetischem Nachweis von Mutationen im *POLG1*-Gen oder im *DGUOK*-Gen
2. Patienten mit der hepatischen Form des MDS und Mutationen im *DGUOK*-Gen
3. Patienten mit Alpers Phänotyp und Mutationen im *POLG1*-Gen

Tabelle 5 Patienten mit hepatozerebralem Syndrom

Gruppe	Gesamt- kollektiv	<i>DGUOK</i>- Mutationen	<i>POLG1</i>- Mutationen	keine Mutation
Patienten (n; %)	44	8; 18%	13; 30%	23; 52%
Geschlecht (w/m)	18/26	3/5	2/11	13/10
Manifestationsalter (Monate)	6 [0-99]	1 [0-3]	9,5 [2,5-81]	6 [0,25-99]
Tod (n; Monate)	19; 12 [1-105]	4; 7 [5-17]	7; 16 [2,5-19]	8; 20 [1-105]
Alter bei Analyse (Monate)	15 [0,5-132]	2 [1-18]	16,5 [2,5-108]	21 [0,5-132]
pos. Familienanamnese	15; 34%	5; 63%	3; 23%	7; 30%
konsanguine Eltern	8; 18%	1; 12,5%	4; 31%	3; 13%
Hepatopathie	44; 100%	8; 100%; 1 LTx	13; 100%	23; 100%
Hepatopathie nach VPA	4; 9%	0	4; 31%	0
Encephalopathie	44; 100%	8; 100%	13; 100%	23; 100%
Epilepsie	17; 39%	0	11; 85%	6; 26%
muskuläre Hypotonie	25; 57%	6; 75%	8; 62%	11; 48%
Nystagmus	8; 18%	5; 62,5%	1; 8%	2; 9%
Myoklonus	4; 9%	0	3; 23%	1; 4%
Stroke-like episodes	2; 5%	0	2; 15%	0
Ataxie	3; 7%	0	0	3; 13%
Nephropathie	4; 9%	1; 12,5%	0	3; 13%
Kardiomyopathie	7; 16%	0	2; 15%	5; 22%
exo. Pankreasinsuffizienz	3; 7%	1; 12,5%	0	2; 9%
Sehverlust	11; 25%	0	4; 31%	7; 30%
Laktatazidose	24; 55%	8; 100%	6; 46%	10; 43%
α-Fetoproteinämie	3; 7%	2; 25%	0	1; 4%
CK-Erhöhung	6; 14%	2; 25%	0	4; 17%
AE-Defekt (n/n untersuchten; %)	25/28; 89%	3/5; 60%	6/6; 100%	16/17; 94%
	23M; 2L	3M	5M; 1L	15M; 1L
mtDNA Depletion (n/n untersuchten; %)	15/30; 50%	5/5; 100%	5/6; 83%	5/19; 26%
		1M; 4L	3M; 4L; 2Hi; 1He; 1F	3M; 1L; 1F; 1N
DNA (n/n)	37/44			
DGUOK-Mutationen	+ 8/44	+ 8		- 12/12
POLG1-Mutationen	+13/44		+ 13	- 14/14

F=Fibroblasten, He=Herz, Hi=Hirn, L=Leber, m=männlich, M=Muskel, Monate=Median und [Range], n=Anzahl, N=Niere, w=weiblich, %=Prozentzahl

5.1.2 Patienten ohne Nachweis einer Mutation im *POLG1*-Gen oder *DGUOK*-Gen

Bei der Hälfte der Kinder (23/44; 52%) unseres Kollektivs mit klinisch manifester Hepatopathie und Enzephalopathie konnten wir weder pathogene Veränderungen der Basenabfolge im *POLG1*-Gen noch im *DGUOK*-Gen identifizieren (Tab. 5). Darunter sind 10/23 Jungen (43%) und 13/23 Mädchen (57%). Die Kinder erkrankten zwischen 0,25 und 99 Monaten (Median 6 Monate). Acht Kinder verstarben (Range 1 - 105 Monate; Median 20 Monate). 7/23 Kinder (30%) haben Familienmitglieder mit gleicher oder ähnlicher Erkrankung. 3/23 Kinder (13%) haben konsanguine Eltern. Während wir

Zeichen einer manifesten Lebererkrankung sowie neurologische Symptome bei allen Kindern verzeichnen konnten, hatte nur die Hälfte (11/23; 48%) eine ausgeprägte Muskelschwäche und nur 26% (6/23) eine Epilepsie. Weitere häufig beobachtete Symptome waren Sehverlust (7/23; 30%), Laktatazidose (10/23; 44%) und Kardiomyopathie (5/23; 22%). Seltener wurden Ataxie (3/23; 13%), Nephropathie (3/23; 13%), CK-Erhöhung (4/23; 17%), Nystagmus (2/23; 9%), Myoklonus (1/23; 4%), Alpha-Fetoprotein-Erhöhung (1/23; 4%), und RRF (1/23; 4%) beschrieben. Bei siebzehn Patienten lagen die Aktivitätslevel der Atmungskettenenzyme im Muskel- oder Lebergewebe vor. Dabei hatten nahezu alle Kinder (16/17; 94%) einen Atmungskettendefekt. Ein Depletionstest führten wir in neunzehn Gewebeproben durch und wiesen in einem Viertel (5/19; 26%) eine mitochondriale DNA Depletion nach.

5.1.3 Patienten mit der hepatischen Form des MDS und Mutationen im *DGUOK*-Gen

Die hepatozerebrale Form des MDS ist durch das frühe Auftreten einer Leberzirrhose und eine relativ mild verlaufende Enzephalopathie gekennzeichnet. Typischerweise fallen die meisten Patienten innerhalb der ersten sechs Lebensmonate durch ein früh manifestes, progressiv verlaufendes Leberversagen, neurologische Abnormalitäten, Nystagmus, Gedeihstörung, Hypoglykämie und Laktaterhöhung im Blut auf. Die Lebererkrankung steht im Vordergrund und ist häufig für das frühe Versterben verantwortlich.

Unter unseren acht Patienten mit Mutationen im *DGUOK*-Gen sind 63% (5/8) männlich und 38% (3/8) weiblich (Tab. 5 und 6). Die ersten Symptome wie Ikterus prolongatus, Hypoglykämie, Erbrechen und Gedeihstörung manifestierten sich kurz nach der Neonatalperiode (Range 0 – 3 Monate; Median 1 Monat). Viele (5/8; 63%) weisen eine positive Familienanamnese mit ähnlich betroffenen Geschwisterkindern und ebenfalls pathogenen Mutationen im *DGUOK*-Gen auf. Alle Patienten zeigen eine progressive Lebererkrankung, die in 50% (4/8) der erkrankten Kinder fulminant zum Leberversagen und Tod im Säuglingsalter führte (Range 5 – 17 Monate; Median 7 Monate). Neurologische Abnormalitäten traten ebenso in allen Beteiligten jedoch in variablen Schweregraden von milder bis schwerer geistiger und motorischer Retardierung auf. Muskuläre Hypotonie (6/8; 75%) und Nystagmus (5/8; 63 %) konnten ebenfalls häufig beobachtet werden. Ein Patient litt zusätzlich an einer exokrinen Pankreasinsuffizienz. Ein anderer Patient wiederum präsentierte RRF in der Histologie des Skelettmuskels und einen ausgeprägten Hörverlust. Bei allen Kindern war eine Laktatazidose nachweislich. Zwei Patienten (25%) zeigten erhöhte Tyrosinwerte und ein erhöhtes α -

Fetoprotein bis 65000 U/l. Ein CK-Anstieg im Serum wurde ebenfalls in einem Viertel der Fälle dokumentiert. Ein kombinierter Atmungskettendefekt wurde in drei von fünf untersuchten Muskelbiopsien (60 %) gemessen. Bei fünf Patienten wurde ein Depletionstest praktiziert, der bei allen eine Verminderung des mtDNA Gehalts zum Vorschein brachte. Ein Kind hatte eine mtDNA Depletion im Skelettmuskel, während bei den anderen vier Patienten eine Verminderung des mtDNA Gehalts im Lebergewebe gemessen wurde. Drei Patienten haben einen homozygoten Status, vier sind compound heterozygot, in einem Patienten entdeckten wir bislang nur eine pathogene heterozygote Mutation. Patient 1 wurde aufgrund des milden Verlaufs erfolgreich lebertransplantiert. In der pathologischen Untersuchung der explantierten Leber wurde zusätzlich zur diffusen Hepatopathie ein hepatozelluläres Karzinom festgestellt [43 S. 1133]. Ein weiterer Patient zeigte in der sonographischen Untersuchung der Leber suspekthe choreiche Herde, die ebenfalls auf ein hepatozelluläres Karzinom hindeuteten. Beiden Patienten sind eine drastische Erhöhung des Alpha-Fetoproteins im Serum und eine mitochondriale DNA Depletion im Lebergewebe gemeinsam.

Tabelle 6 Patienten mit *DGUOK*-Mutationen

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Geschlecht	w	m	w	m	w	m	m	m
Manifestationsalter (Monate)	2	1,5	1	0	0	3	0	nb
Tod (Monate)	-	17	5	9	-	-	5	nb
Alter bei Analyse (Monate)	2,5	2	1	5	1	18	2	nb
pos. Familienanamnese	-	dCS	+	+	+	-	+	+
Hepatopathie	+/LTx	+	+	+	+	+	+	+
Entwicklungsverzögerung	+	+	+	+	+	+	+	+
Epilepsie	-	-	-	-	-	-	-	-
muskuläre Hypotonie	-	+	+	+	-	+	+	+
Nystagmus	-	+	-	+	-	+	+	+
Laktatazidose	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Fetoproteinämie	+	+	nb	nb	nb	nb	nb	nb
CK-Erhöhung	-	-	-	+	+	-	-	-
AE-Defekt	n M	n M	I-IV M	nu	nu	I,III,IV M	II-IV M	nu
mtDNA Depletion	74 L	149 L	nu	nu	125 L	164 M	17% L	nu
Mutation	M1V M1I	S52F S52F	S52F 681- 684delGTTT	L250S M1T	L250S M1T	Q170R	Stop after aa105	Stop after aa105

Patienten 4 + 5 Geschwister, Patienten 7 + 8 Geschwister [Müller-Höcker et al., 2002; Taanman et al., 2002], CS=konsanguine Eltern, L=Leber, M=Muskel, m=männlich, n= normal, nb=nicht bekannt, nu=nicht untersucht, LTx=Lebertransplantation, w=weiblich

5.1.4 Patienten mit Alpers Syndrom und Mutationen im *POLG1*-Gen

Fast ein Drittel unseres Kollektivs (13/44; 30%) präsentierte Symptome eines Alpers Syndroms, darunter elf Jungen (85%) (Tab. 5 und 7). Elf der Kinder erfüllten alle Kriterien eines typischen Alpers Syndroms. Auf eine positive Familienanamnese kann in 23% (3/13) der Erkrankten verwiesen werden. Vier Kinder (31%) haben blutsverwandte Eltern. Als erstes neurologisches Krankheitszeichen traten bei allen Kindern bis auf Patient 12 und 19 Krampfanfälle im Säuglingsalter auf (11/13; 85%), die häufig als infektassoziiert beschrieben wurden (Range 2,5 – 81 Monate; Median 9,5 Monate). Im Verlauf entwickelten sich bei allen Kindern Symptome einer Leberdysfunktion, die in einem Drittel der Jungen (4/13; 31%) infolge einer Therapie des Krampfleidens mit Valproinsäure auftraten. Die Hälfte der Kinder, wiederum alles Jungen (7/13; 54%), verstarb vor dem zweiten Lebensjahr (Range 2,5 – 19 Monate; Median 16 Monate). 62% (8/13) präsentierten zusätzlich Zeichen einer muskulären Hypotonie. Eine Myoklonus-Epilepsie wurde in 23% der Fälle (3/13) aufgezeichnet, Schlaganfall-ähnlichen Episoden zeigten zwei (15%) Probanden. Eine Kardiomyopathie wurde ebenfalls bei zwei Patienten dokumentiert. Vier Patienten (31%) hatten eine Visusverminderung. Eine Laktatazidose lenkte in 46% (6/13) der Fälle die Aufmerksamkeit in Richtung einer Stoffwechselerkrankung. RRF und COX negative Fasern zeigte ein Patient in der histochemischen Untersuchung des Skelettmuskelgewebes. Ein Atmungskettendefekt wurde in sechs der sechs untersuchten Gewebeproben (100%) gemessen. Bei sechs Patienten konnten wir einen Depletionstest durchführen, der in der Mehrzahl (5/6; 83%) eine Verminderung der mtDNA im Vergleich zur nDNA pro Zelle nachwies. Neun Patienten (69%) haben einen compound heterozygoten Mutationsstatus, während wir bei vier Kindern (31%) bisher nur eine heterozygote Mutation nachweisen konnten.

Tabelle 7 Patienten mit *POLG1*-Mutationen

Patient	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Geschlecht	m	m	m	m	m	m	m	w	m	w	m	m	m
Manifestationsalter (Monate)	17	9,5	15	6	6	8	12	24	81	9	2,5	nb	nb
Tod (Monate)	-	12	19	16,5	16	11	16	-	-	nb	2,5	nb	nb
Alter bei Analyse (Monate)	21	12	17	16,5	16	11	17	108	96	9	2,5	nb	nb
pos. Familienanamnese	-	+	-	-	-	-	nb	CS	nb	-	CS	CS/+	CS/+
Hepatopathie	+/v	+/v	+	+	+	+	+	+/v	+/v	+	+	+	+
Entwicklungsretardierung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Epilepsie	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
muskuläre Hypotonie	-	+	+	+	+	+	nb	+	nb	+	+	-	nb
Nystagmus	-	-	-	-	+	-	nb	-	nb	-	-	-	nb
Myoklonus	-	+	+	-	-	-	nb	+	nb	-	-	-	nb
Stroke-like episodes	-	-	+	-	-	-	nb	-	+	-	-	-	nb
Kardiomyopathie	-	-	-	+	-	-	nb	-	nb	-	+	-	nb
Schwerlust	+	-	+	-	-	-	nb	-	nb	-	-	-	nb
Laktatazidose	-	+	+	-	+	+	nb	-	nb	-	-	+	+
AE-Defekt	II-IV	nu	PDH+I M	IV M	I,III,IV L	nu	nu	nu	nu	II-IV M I+IV M	+	-	nb
mtDNA Depletion	nu	nu	ja L	ja M/L/He	ja L/Hi/F	ja M/L/Hi	nu	nu	nu	ja M	-	nu	nu
POLG1-Mutation	A467T T914P	G737R A767N	A467T IVS21+ 1T>C	A467T K1191N	R309H R627Q	A467T G848S	A467T IVS15- 9_12Del	R1096C R1096C	R627Q R1096H	S305R	G268A	G1051R+ IVS15-43 C>A	G1051R+ IVS15-43 C>A

Patienten 20+21 Geschwister, Patienten 13+14 [Tesarova et al., 2004 S. 218], CS=konsanguine Eltern, F=Fibroblasten, He=Herz, Hi=Hirn, L=Leber, M=Muskel, m=männlich, n= normal, nb=nicht bekannt, nu=nicht untersucht, v=Valproinsäure, w=weiblich

5.1.5 Unterschiede der einzelnen Gruppen und Signifikanzen

Um zu bestätigen, dass sich die drei Gruppen „Patienten ohne Mutationsnachweis“, „Patienten mit *DGUOK*- Mutationen“ und „Patienten mit *POLG1*-Mutationen und Alpers Syndrom“ unterscheiden, wurden die Werte degruppiert und ein Mehrfeldertest (Kruskal-Wallis-Test) zur Auswertung benutzt. Dieser zeigte in Bezug auf das *Manifestationsalter* signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p=0,0037$; $p<0,05$) (Abb. 14). Damit waren weitere Einzeltests möglich. Ich wandte den Mann-Whitney-U-Test an und verglich die einzelnen Gruppen miteinander. Ein signifikanter Unterschied der einzelnen Gruppen liegt vor, wenn $p<0,05$ ist. Ist $p<0,001$ liegt ein hochsignifikanter Gruppenunterschied vor. Dabei stellte sich heraus, dass sich die beiden Gruppen „Patienten ohne Mutationsnachweis“ und „Patienten mit *DGUOK*-Mutationen“ signifikant in Bezug auf das Manifestationsalter unterscheiden ($p=0,0275$). Die Kinder mit Mutationen im *DGUOK*-Gen erkrankten im Median im Alter von einem Monat, während bei den Kinder ohne Mutationsnachweis erst im Median von sechs Monaten erste Krankheitszeichen beobachtet wurden. Die Gruppen „Patienten mit *DGUOK*-Mutationen“ und „Patienten mit *POLG1*-Mutationen“ unterschieden sich mit hoher Signifikanz ($p=0,0007$). Die Kinder mit einem Alpers Syndrom erkrankten im Median mit neuneinhalb Monaten.

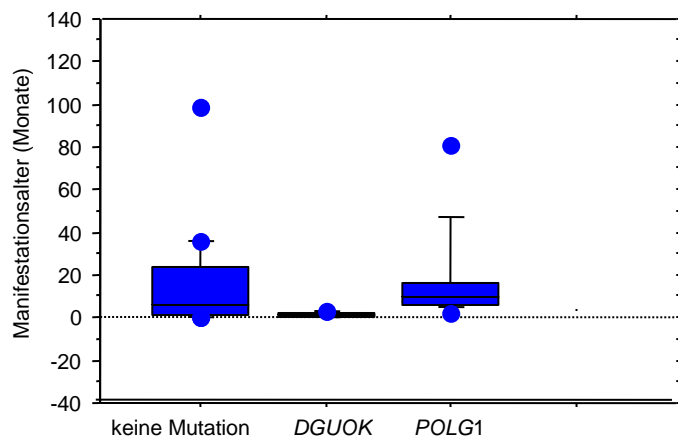


Abbildung 14
Box-Diagramm für
Manifestationsalter

Dann prüfte ich in wie weit sich die drei Gruppen bezüglich der Kriterien in Tabelle 5 unterscheiden. Dabei stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten ohne Mutationsnachweis, den Patienten mit *DGUOK*-Mutationen und den Patienten mit *POLG1*-Mutationen hinsichtlich einer *mitochondrialen DNA Depletion* ($p=0,0079$) heraus. Dies zeigt, dass Mutationen im *DGUOK*- und *POLG1*-Gen in unserem Kollektiv regelmäßig (10/11; 91%) mit einer mtDNA Depletion im Muskel- und / oder Lebergewebe einhergehen. Unterdessen haben nur 26% (5/19) der Patienten ohne Mutationsnachweis eine mtDNA Depletion im untersuchten Gewebe.

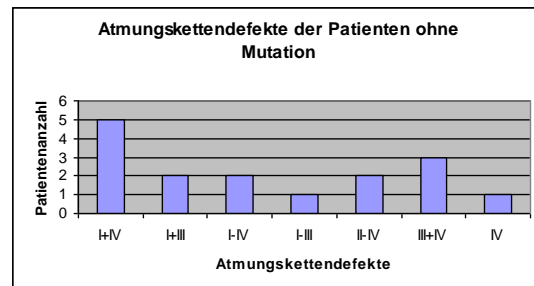
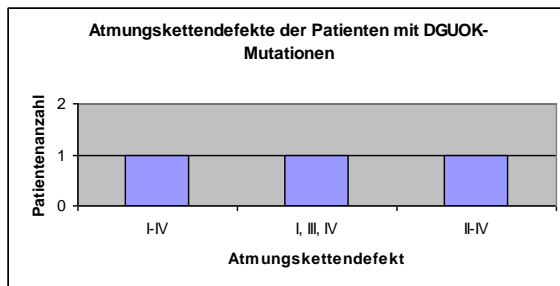
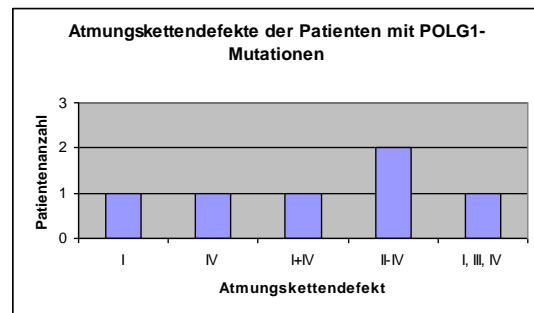
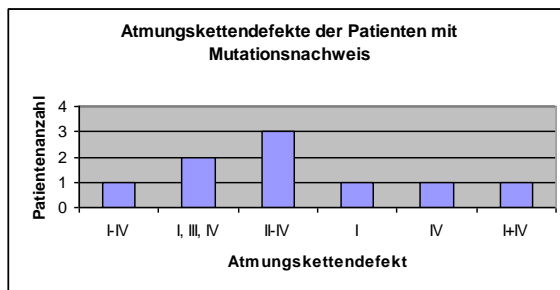
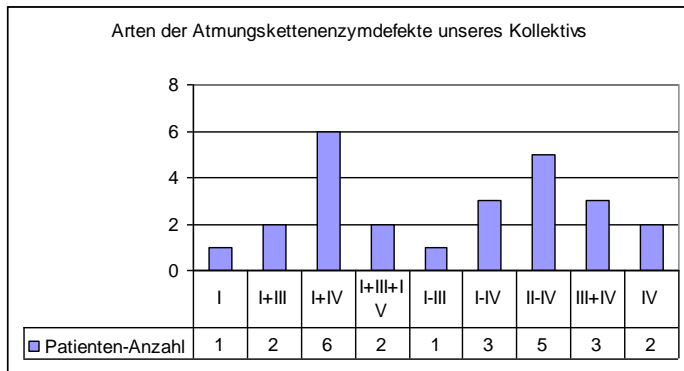
Beim Vergleich der Gruppen „Patienten mit *DGUOK*-Mutationen“ und „Patienten mit *POLG1*-Mutationen“ ergab sich beim Merkmal *Epilepsie* ein hochsignifikanter Unterschied ($p<0,0001$). Die Epilepsie ist ein führendes Symptom des Alpers Syndroms. Von den dreizehn Patienten mit Alpers Syndrom haben elf Patienten eine Epilepsie, während bei keinem Patient mit Mutationen im *DGUOK*-Gen Krampfanfälle beschrieben wurden. Einen weiteren hochsignifikanten Unterschied fanden wir beim Merkmal *Nystagmus* ($p<0,0001$). Bei fünf der acht Patienten mit *DGUOK*-Mutationen wurde ein Nystagmus beschrieben. Hingegen hatte nur ein Patient mit *POLG1*-Mutationen einen Nystagmus.

5.2 Biochemische Analyse

Die biochemische Analyse der Aktivität der Atmungskettenenzymkomplexe wurde in 28 Gewebeproben durchgeführt. In 25 Fällen maßen wir verminderte Aktivitätslevel der von der mtDNA kodierten Komplexe (89%; 23/25 im Muskel; 2/25 in der Leber). Die Mehrzahl (22/25; 88%) dieser Patienten hat einen kombinierten Atmungskettendefekt, am häufigsten einen kombinierten Komplex I+IV (6/22; 27%) und II-IV Mangel (5/22; 23%) (Abb. 15).

Interessant ist, dass in fünf dieser Gewebeproben zusätzlich die Aktivität von Komplex II vermindert war, in zwei Fällen einhergehend mit Mutationen im *POLG1*-Gen und in einem Fall mit Mutationen im *DGUOK*-Gen.

Abbildung 15 Atmungskettendefekte unseres Kollektivs



5.3 Molekulargenetische Analyse

5.3.1 mtDNA Depletionstest

Bei 30 Patienten konnten wir auf DNA, extrahiert aus Muskel-, Lebergewebe oder Fibroblasten, zurückgreifen und den Gehalt an mitochondrialer DNA pro Zelle im Vergleich zur nukleären DNA messen. Eine ausgeprägte Depletion der mtDNA Moleküle zeigte sich in der Hälfte der untersuchten Gewebeproben (15/30; 50%)

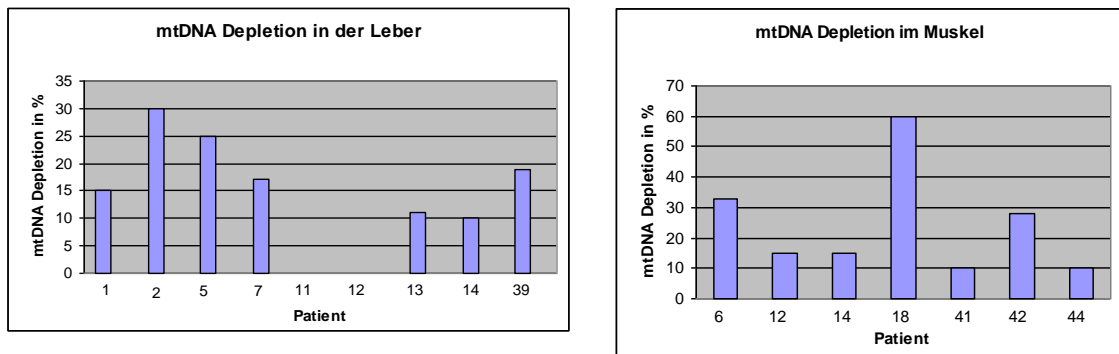
sowohl im Muskelgewebe, Lebergewebe, Herzmuskel, Hirngewebe, Nierengewebe als auch in Fibroblasten (Abb. 16).

Mutationen im *DGUOK*-Gen gingen in unserem Kollektiv in allen untersuchten Fällen (5/5) mit einer Depletion der mitochondrialen DNA einher. Eine mtDNA Depletion infolge von Mutationen im *POLG1*-Gen wurde in 83% (5/6) der untersuchten Gewebeproben gefunden. Nur in 26% (5/19) der Patienten ohne Mutationen wurde eine mtDNA Depletion nachgewiesen.

Binnen unserer Patienten mit mtDNA Depletion im Lebergewebe (9/15) hatten vier Patienten Mutationen im *DGUOK*-Gen, vier Patienten Mutationen im *POLG1*-Gen und nur ein Patient keinen Mutationsnachweis. Eine Verminderung der mtDNA Kopien im Muskelgewebe wurde bei einem Kind (Patient 6) durch Mutationen im *DGUOK*-Gen und bei drei Kindern durch pathogene Mutationen im *POLG1*-Gen verursacht. Bei drei weiteren Kindern konnte keine pathogene Mutation nachgewiesen werden.

Patient 12 hatte eine mtDNA Depletion sowohl im Skelettmuskel als auch im Leber- und Herzmuskelgewebe. Patient 13 zeigte eine mtDNA Depletion im Lebergewebe, Hirngewebe und in Fibroblasten. Bei Patient 14 konnte eine Verminderung der mtDNA Kopien im Muskel-, Leber- und Hirngewebe festgestellt werden. Alle drei Kinder haben Mutationen im *POLG1*-Gen. Ein weiterer Patient (Patient 39) zeigte im Leber- und im Nierengewebe eine deutliche Abnahme der mtDNA-Kopien. Bei diesem Jungen konnten wir keine pathogenen Mutationen im *POLG1*- oder *DGUOK*-Gen finden.

Abbildung 16 Ergebnisse des mtDNA Depletionstests



5.3.2 Mutationsanalyse

Bei 37/44 Patienten stand uns DNA, extrahiert aus EDTA-Blut, Muskel-, Lebergewebe und Fibroblasten, für molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung. Patienten mit im Vordergrund stehender Hepatopathie, Enzephalopathie und Nystagmus wurden primär auf pathogene Mutationen im *DGUOK*-Gen getestet. Das *POLG1*-Gen wurde zuerst bei Kindern mit therapieresistenten, epileptischen Anfällen und Hepatopathie bzw. nach Therapie mit Valproinsäure einsetzendem Leberversagen analysiert.

5.3.2.1 Mutationen im *DGUOK*-Gen

Bei 8/44 Patienten (18%) unseres Kollektivs konnten wir insgesamt zwölf Veränderungen der Basenabfolge im *DGUOK*-Gen nachweisen (Tab. 8). Darunter befinden sich sieben Missense-Mutationen, die eine gut konservierte Aminosäure im *DGUOK*-Protein verändern und eine durch 4 bp Deletion hervorgerufene Frameshift-Mutation.

Patient	Exon	cDNA Substitution	verursachter Aminosäureaustausch
1	1	1A>G	M1V
	1	3G>A	M1I
2	2	155C>T	S52F
	2	155C>T	S52F
3	2	155C>T	S52F
	5	681-684delGTTT	frameshift
4	6	749T>C	L250S
	1	2T>C	M1T
5	6	749T>C	L250S
	1	2T>C	M1T
6	4	509A>G	Q170R
7	3	313C>T	R105X
	3	313C>T	R105X
8	3	313C>T	R105X
	3	313C>T	R105X

Tabelle 8

***DGUOK*-Substitutionen**

Die von uns neu identifizierten Mutationen sind rot markiert.

Einige der sequenzierten Mutationen wurden bereits von anderen Forschungsgruppen beschrieben. Wir konnten insgesamt fünf neue pathogene Basenveränderungen finden, eine Frameshift-Mutation (681-684delGTTT) und vier Missense-Mutationen (p.M1V, p.M1I, p.S52F, p.Q170R), von denen eine in zwei nicht verwandten,

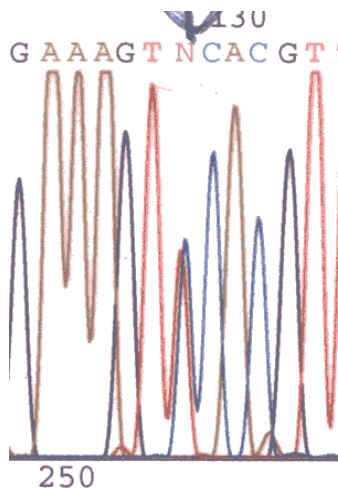
erkrankten Kindern nachgewiesen werden konnte. Die neu identifizierten Mutationen p.M1V, p.M1I, p.S52F und p.Q170R konnten in 50 Kontrollproben nicht gefunden werden.

Unter den acht betroffenen Patienten weisen zwei Kinder einen homozygoten und sechs Kinder einen compound heterozygoten Status auf. Bei einem Patienten konnten wir bisher nur eine pathogene heterozygote Missense-Mutation finden.

Drei verschiedene Mutationen (p.M1V, p.M1I, M1T) betreffen die Aminosäure Methionin, die das Startcodon des Proteins darstellt. Dies lässt an dieser Stelle einen Mutations-Hot-Spot vermuten.

Bei Patient 1 fanden wir zwei compound heterozygote Missense-Mutationen in Exon 1 c.1A>G / p.M1V und c.3G>A / p.M1I. Interessant ist, dass beide Mutationen das Start-Methionin des Proteins betreffen.

Bei Patient 2 fanden wir in der Sequenzierung des *DGUOK*-Gens eine neue homozygote Missense-Mutation in Exon 2 c.155C>T / p.S52F, die eine gut konservierte Aminosäure betrifft (Abb. 17 und 19). Die gleiche Mutation fanden wir heterozygot in Patient 3 auf dem einen Allel. Das andere Allel trägt eine heterozygote 4 bp große c.681-684 GTTT Deletion in Exon 5, die zu einem Frameshift führt (Abb. 18).



Wildtyp: T C C
 Mutante: T T C

Abbildung 17 Heterozygote Mutation p.S52F von Patient 3

Der Basenaustausch TCC>TTC an Position c.155 verändert die Aminosäure Serin zu Phenylalanin.

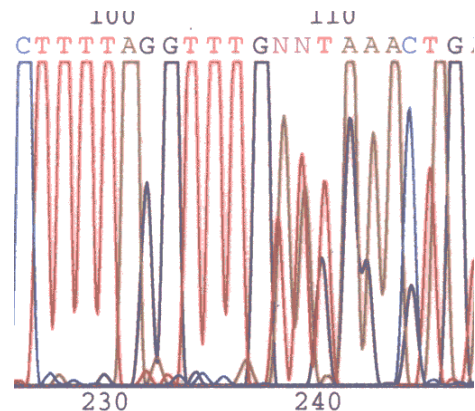


Abbildung 18 Heterozygote 4 bp Deletion 681-684 GTTTdel von Patient 3

Der Basenverlust an Position c.681-684 führt zu einem Frameshift.

Patient 4 und 5 sind compound heterozygot für die bereits kürzlich beschriebenen pathogenen Missense-Mutationen in Exon 6 c.749 T>C / p.L250S und in Exon 1 c.2T>C / p.M1T, die ebenfalls das Start-Methionin des Proteins betrifft.

In Patient 6 detektierten wir eine noch nicht beschriebene heterozygote Missense-Mutation in Exon 4 c.509A>G / p.Q170R, die eine gut konservierte Aminosäure verändert (Abb. 19). Der Vater des Kindes zeigt einen heterozygoten Status für die p.Q170R Mutation, während die Mutter keine Veränderungen an dieser Basenstelle zeigte. In 50 Kontrollproben konnten wir die p.Q170R Mutation nicht nachweisen. Aufgrund der Heterozygotie vermuteten wir eine zweite pathogene Mutation. Wir sequenzierten die Exon-Intron-Bereiche des *DGUOK*-Gens sowohl in der kindlichen als auch in der mütterlichen DNA. Allerdings konnten wir keine weitere pathogene Mutation entdecken. Die Analyse der cDNA des *DGUOK*-Gens aus Muskelgewebe des Patienten enthüllte zwei Banden. Eine Bande von normal langer cDNA beherbergt die p.Q170R Mutation, während die schmalere Bande (ungefähr 260 bp groß, detektiert durch RT-PCR) ein kurzes Transkript repräsentiert, welches Exon 1, Exon 6 und Exon 7 enthält. Allerdings fehlen Exon 2 bis 5. Dieses kurze Transskript konnte jedoch auch in Kontroll-cDNA entdeckt werden, was vermuten lässt, dass diese Bande nicht durch einen Splicing-Defekt entsteht. Weitere Studien sind geplant, um die zweite pathogene Mutation in dieser Familie zu finden.

Die homozygote c.313C>T / p.R105X Missense-Mutation in Exon 3 in Patient 7 und 8 führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon und wurde bereits 2002 beschrieben [108 S. 238, 239].

Table 2. Conservation of the Missense Mutations S52F and Q170R

Genus Species	Missense Mutation
Conservation of S52F	
<i>Homo sapiens</i>	NIAVGKSTFVKLLT
<i>Bos taurus</i>	NIAVGKSTFVKLLT
<i>Canis familiaris</i>	NIAVGKSTFVKLLT
<i>Mus musculus</i>	NIAVGKSTFVKLLM
<i>Xenopus</i>	NIAVGKSTFLRLLS
<i>Tetraodon</i>	NIAAGKSTFVRLLE
Conservation of Q170R	
<i>Homo sapiens</i>	DIEMHIYQDWHSFLL
<i>Bos taurus</i>	DIEMHIYQDWHSFLL
<i>Canis familiaris</i>	DIEMHIYQDWHSFLL
<i>Mus musculus</i>	DIEMHIYQDWHSFLL
<i>Xenopus</i>	MEWTLYQEWHTFLI
<i>Tetraodon</i>	PTEWAIYQDWHSLL

Abbildung 19
Konservierung der
Missense-Mutationen
p.S52F and p.Q170R

[aus Freisinger et al., 2006 S. 1132]

5.3.2.2 Mutationen im *POLG1*-Gen

Insgesamt 22 Veränderungen der Basenabfolge im Vergleich zur Referenzsequenz des *POLG1*-Gens vom *Homo sapiens* fanden wir in 13/44 hepatozerebralen Patienten (Tab. 9). Darunter befinden sich fünfzehn verschiedene Basenabfolgeveränderungen einschließlich zwei neue Splicing-Mutationen und dreizehn Veränderungen, die die Aminosäuresequenz betreffen (Missense-Mutationen) und gut konservierte Aminosäuren im *POLG1*-Protein alterieren (Abb. 20).

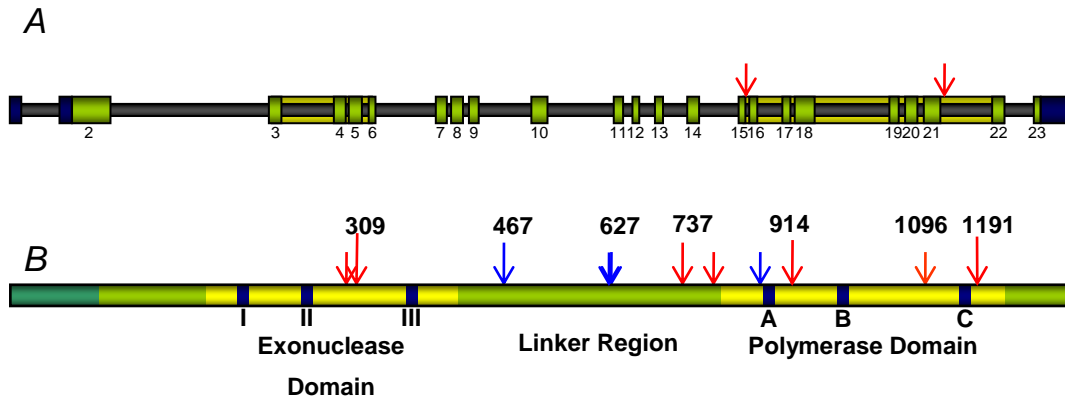
Tabelle 9 *POLG1*-Substitutionen

Patient	Exon	cDNA Substitution	verursachter Aminosäureaustausch	Exonuklease Domäne	Linker Region	Polymerase Domäne
9	7 18	1399G>A 2740A>C	A467T T914P		+	+
10	13 14	2209G>C 2300C>A	G737R A767N		++	
11	7 Ex 21/ Intron	1399G>A IVS21+1T>C	A467T splice-site		+	+
12	7 22	1399G>A 3573G>T	A467T K1191N		+	+
13	4 10	926G>A 1880G>A	R309H R627Q	+	+	
14	7 16	1399G>A 2542G>A	A467T G848S		+	+
15	7 Ex 15/ Intron	1399G>A IVS15-9- c.2485del 12bp	A467T splice-site		+	+
16	21	3286C>T 3286C>T	R1096C R1096C			++
17	10 21	1880G>A 3287G>A	R627Q R1096H		+	+
18	4	1197C>G	S305R	+		
19	3	803G>C	G268A	+		
20	20	3073G>C	G1051R			+
21	20	3073G>C	G1051R			+

Die von uns neu identifizierten Mutationen sind rot markiert.

Abbildung 20 POLG1-Substitutionen

[modifiziert nach Horvath et al., 2006 S. 1679]



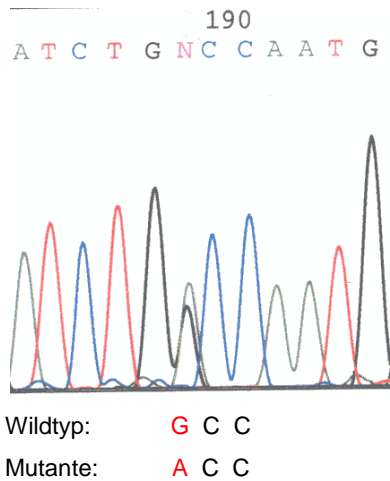
Lokalisation der Intron / Splicing Veränderungen (A) und Aminosäure-Substitutionen (B). Rot = neue Substitutionen; Blau = bereits beschriebene Substitutionen. Die Zahlen oben sind Beispiele von spezifischen Lagen, um die Position der Aminosäurereste zu illustrieren. Die Exonuclease Domäne breitet sich vom Aminosäure Rest 1 bis 418 aus. Die Polymerase Domäne breitet sich vom Aminosäurerest 756 bis 1239 aus. Die Linker Region liegt zwischen den Aminosäureresten 418 und 756.

Insgesamt identifizierten wir neun noch nicht beschriebene pathogene Mutationen im *POLG1*-Gen. Darunter befinden sich sieben Missense-Mutationen (p.T914P, p.G737R, p.A767N, p.K1191N, p.R309H, p.R1096H, p.S305R) und zwei Splicing-Mutationen (IVS21+1T>C, IVS15-9-del12bp).

Unter den dreizehn Patienten mit Mutationen im *POLG1*-Gen hat ein Patient eine homozygote Mutation. Acht Patienten zeigen einen compound heterozygoten Status. In 4/13 DNA-Proben konnten wir jeweils nur eine heterozygote Mutation nachweisen.

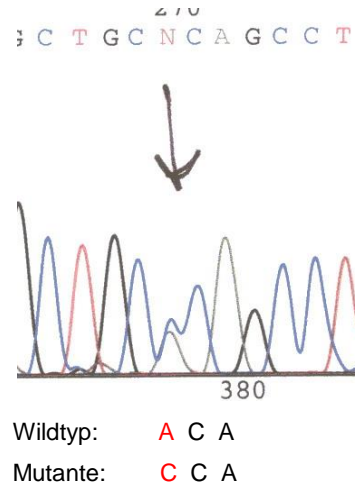
Die p.A467T Mutation wurde erstmals 2004 von Naviaux et al. beschrieben und seitdem in vielen Patienten gefunden. In unserem Patientenkollektiv konnten wir die p.A467T Mutation in 38% der Patienten mit Mutationen im *POLG1* nachweisen. Die Pathogenität der Missense-Mutation p.A467T in Exon 7 wurde bereits in autosomal rezessiven CPEO Familien und bei Kindern mit Alpers-Syndrom bestätigt [88 S. 708].

Die Sequenzierung des *Polymerase gamma*-Gens in Patient 9 zeigte eine heterozygote Missense-Mutation in Exon 7 c.1399 G>A / p.A467T (Abb. 21) und eine neue heterozygote Missense-Mutation in Exon 18 c.2740 A>C / p.T914P (Abb. 22).



**Abbildung 21 Heterozygote Mutation
p.A467T von Patient 9**

Der Basenaustausch GCC>ACC an Position c.1399 verändert die Aminosäure Alanin zu Threonin.



**Abbildung 22 Heterozygote Mutation
p.T914P von Patient 9**

Der Basenaustausch ACA>CCA an Position c.2740 verändert die Aminosäure Threonin zu Prolin.

In Patient 10 fanden wir zwei bisher noch nicht beschriebene heterozygote Missense-Mutationen in Exon 13 c.2209 G>C / p.G737R und in Exon 14 c.2300 C>A / p.A767N. Patient 11 zeigte in Exon 7 eine heterozygote Missense-Mutation c.1399 G>A / p.A467T und in Intron-21 eine neue heterozygote Basenveränderung T>C IVS21+1. Diese heterozygote Splicing-Mutation, direkt nach Exon 21 im ersten Nukleotid des Introns 21, verändert die Splicing-Stelle.

Infolge der Sequenzierung des *POLG1*-Gens konnten wir eine heterozygote Missense-Mutation in Exon 7 c.1399G>A / p.A467T und eine neue heterozygote Missense-Mutation in Exon 22 c.3573 G>T / p.K1191N in Patient 12 nachweisen (Abb. 23).

In Patient 13 konnten wir zwei heterozygote Missense-Mutationen identifizieren in Exon 4 c.926 G>A / p.R309H und in Exon 10 c.1881G>A / p.R627Q.

Als Ursache der Symptome von Patient 14 fanden wir zwei heterozygote Missense-Mutationen im *POLG1*-Gen in Exon 7 c.1399 G>A / p.A467T und in Exon 16 c.2542G>A / p.G848S.

In Patient 15 wiesen wir folgende heterozygote Mutationen nach: die Missense-Mutation in Exon 7 c.1399 G>A / p.A467T und am Übergang Intron15/ Exon 16 eine neue 12 bp große heterozygote Deletion, die die Splicing-Stelle zerstört und die ersten drei Nukleotide von Exon 16 involviert IVS15-9_12Del.

Patient 16 ist homozygoter Mutationsträger für folgende bereits beschriebene Missense-Mutation in Exon 21: c. 3286 C>T / p.R1096C.

Patient 17 zeigt einen compound heterozygoten Status für zwei Missense-Mutationen in Exon 10 c.1880G>A / p.R627Q und in Exon 21, die bisher noch nicht beschriebene Mutation c.3287G>A / p.R1096H.

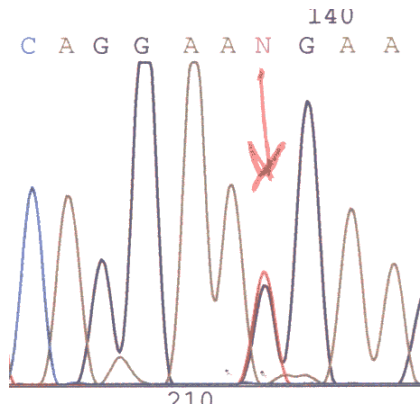


Abbildung 23 Heterozygote Mutation p.K1191N von Patient 12

Wildtyp: A A G
 Mutante: A A T

Der Basenaustausch AAG>AAT an Position c.3573 verändert die Aminosäure Lysin zu Asparagin.

In den folgenden vier Patienten fanden wir durch Sequenzierung des *POLG1*-Gens jeweils nur eine heterozygote pathogene Mutation. Die Sequenzierung der Intron-Exon-Bereiche ergab keine zweite pathogene heterozygote Mutation. In drei dieser Patientenproben sequenzierten wir die cDNA. Diese Untersuchung brachte ebenfalls keine zweite pathogene Mutation zum Vorschein.

In Patient 18 fanden wir eine bis jetzt noch nicht beschriebene heterozygote Missense-Mutation in Exon 4 c.1197 C>G / p.S305R, die neben den bereits beschriebenen pathogenen Mutationen p.L304R, p.R309L und p.W312R liegt.

Patient 19 ist heterozygot für die erst kürzlich beschriebene Missense-Mutation in Exon 3 c.803 G>C / p.G268A.

Wir haben in den Patienten 20 + 21 eine neue Missense-Mutation in Exon 20 c.3073 G>C / p.G1051R gefunden. Auffällig ist noch eine andere heterozygote intronische Mutation im Intron 15 IVS15-43C>A. Diese Splicing-Mutation befindet sich auf dem gleichen Allel, da sowohl der gesunde Vater als auch der erkrankte Bruder der Geschwisterkinder beide Mutationen tragen, die Mutter wie auch die Schwester der erkrankten Kinder zeigen keine der beiden Mutationen.

6 Diskussion

Bisher wurden autosomal rezessive Mutationen in acht nukleären Genen beschrieben, die ein MDS mit verschiedenen klinischen Präsentationen hervorrufen: **DGUOK** [77], **TK2** [97], **POLG1** [88; 39], **ECGF1** [90, 91], **SUCLA2** [36], **MPV17** [107], **RRM2B** [10] und **SUCLG1** [92].

Bei Patienten mit der hepatozerebralen Form des mtDNA Depletionssyndroms wurden bislang Mutationen im *DGUOK*-Gen [77; 98; 76; 94; 108; 110; 124; 64; 103], *POLG1*-Gen [88; 87; 39; 25] und *MPV17*-Gen [107; 58] nachgewiesen. Das phänotypische Spektrum reicht von neonatal beginnender, schwerer Leberinsuffizienz mit variabler neurologischer und muskulärer Beteiligung bis hin zum Alpers Syndrom mit therapieresistenter Epilepsie und Leberinsuffizienz. Die mtDNA Depletion kann anfangs einzelne Organe betreffen, typischerweise Skelettmuskel oder Leber, und sich dann auf andere Gewebe ausbreiten. Das MDS, verursacht durch Mutationen im *POLG1*- und *DGUOK*-Gen, wurde in den letzten Jahren häufiger diagnostiziert.

Ziel der Studie war es, ein Kollektiv von 44 Kindern mit neurologischen Symptomen, hepatozellulärer Insuffizienz und dem Nachweis einer mitochondrialen Dysfunktion oder dem Verdacht auf eine mitochondriale Dysfunktion hinsichtlich eines mtDNA Depletionssyndroms und Mutationen im *POLG1*- und *DGUOK*-Gen zu analysieren.

Die Kinder waren deutscher, österreichischer, polnischer und türkischer Abstammung. Alle litten an einer Lebererkrankung und variablen neuromuskulären Symptomen. Das klinische Bild der betroffenen Kinder reichte von schwerer Leberinsuffizienz mit milder neurologischer Erkrankung, typischem Alpers Syndrom bis zur progressiven multisystemischen Erkrankung (siehe Tab. 6 und 7). Mehr als die Hälfte der Kinder waren Jungen (26/44; 59%) und erkrankte bereits im ersten Lebensjahr (25/44; 57%), ein Viertel der Kinder in der Neugeborenenperiode. Als erste Anzeichen einer Leberfunktionsstörung traten Hypoglykämien, Laktatazidosen, Erhöhung der Transaminasen im Serum, Ikterus sowie eine Hepatomegalie auf. Die Beteiligung des ZNS erschien dabei sehr variabel von leichter psychomotorischer Entwicklungsverzögerung über therapieresistente Krampfanfälle, Ataxie, Stroke-like Episoden, Sprachstörung, Sehverlust und Hörverlust bis hin zur schweren Enzephalopathie. Muskelschwäche sowie schwere muskuläre Hypotonie wurden ebenfalls beschrieben. Ferner entwickelten einige der Patienten ungewöhnliche klinische Symptome wie Kardiomyopathie, Tubulopathie, exokrine Pankreasinsuffizienz oder gastrointestinale

Beschwerden. Bei einem Patienten wurde zusätzlich ein T-Zell-Defekt nachgewiesen. In der Literatur wurde kürzlich ein Patient mit T-Zell-Immundefizienz und mitochondrialer Dysfunktion beschrieben [95 S. 322].

In 89% der Biopsien (25/28) lag eine deutliche Aktivitätsabnahme der Enzymkomplexe der Atmungskette vor. In nahezu allen Gewebeproben wurde ein kombinierter Atmungskettendefekt nachgewiesen. Am häufigsten trat eine gemeinsame Aktivitätsminderung der Enzymkomplexe I+IV sowie II-IV auf (siehe Abb. 15). Dies zeigt, dass mitochondriale hepatozerebrale Syndrome häufig auf dem Boden eines kombinierten Atmungskettendefektes entstehen. Die verschiedenen Kombinationen der Enzymdefekte, die wir in unseren Patienten nachweisen konnten, wurden ebenfalls von zwei weiteren Forschungsgruppen beobachtet [99 S. 532; 29 S. 232].

Erstaunlicherweise verzeichneten wir in fünf Muskelgewebestücken eine zusätzliche Abnahme der Aktivität von Komplex II. Der Atmungskettenenzymkomplex II wird ausschließlich durch die nukleare DNA kodiert. In zwei dieser Muskelproben (Patient 9 und 18) wiesen wir pathogene *POLG1*-Mutationen nach. Bei einem Patienten (Patient 7) konnten wir eine homozygote missense-Mutation im *DGUOK*-Gen finden. Eine reduzierte Komplex II Aktivität wurde bereits in Patienten mit mtDNA Deletion beschrieben, was ein sekundäres Ereignis vermuten lässt [45]. De Vries und Kollegen bestätigen in einer aktuellen Studie diesen Befund. Alle ihre Probanden mit Mutationen im *POLG1*, bis auf ein Kind, haben einen kombinierten AE-Defekt an dem sowohl Komplex II wie auch der Pyruvatdehydrogenase-Komplex beteiligt sind [29 S. 232]. Sarzi und Kollegen wiesen in einer aktuellen Studie ebenfalls in neun Patienten eine gemeinsame Aktivitätsminderung aller Atmungskettenkomplexe inklusive Komplex II nach [99 S. 532]. Diese Ergebnisse und unsere Daten lassen vermuten, dass eine mtDNA Depletion ein sekundäres, noch nicht geklärtes Phänomen im Sinne eines mildereren Mangels des nicht von der mtDNA kodierten Enzymkomplexes verursacht [99 S. 532].

Eine ausgeprägte Verminderung der mtDNA Kopienanzahl ermittelten wir in der Hälfte der überprüften Gewebestücke (15/30). Jedoch scheint die Inzidenz eher unterbewertet, da uns nur in 68% der untersuchten Patienten (30/44) Leber- oder Muskelgewebe zur Verfügung stand.

In mehr als zwei Drittel der Depletionsfälle (10/15) beruhte die mtDNA Depletion auf Mutationen im *DGUOK*- bzw. *POLG1*-Gen. Diese Basenveränderungen verursachen

eine Verminderung des intramitochondrialen Nukleotidpools bzw. eine eingeschränkte Replikation der mtDNA. Die daraus resultierende Depletion der mtDNA Moleküle pro Zelle verursacht eine Aktivitätsminderung der von der mtDNA kodierten Atmungskettenenzymkomplexe (Komplexe I, III, IV und/oder V) in verschiedenen Kombinationen. Es wird weniger ATP produziert und es entstehen vermehrt freie Radikale. Dies bewirkt eine Schädigung der betroffenen Zellen. Mutationen im *DGUOK*-Gen gingen in unserem Kollektiv ausnahmslos mit einer mtDNA Depletion einher, während eine Verminderung der mtDNA Kopienanzahl infolge von Mutationen im *POLG1*-Gen nur in 83% der untersuchten Gewebeproben auftrat.

In einem Drittel der Fälle mit mtDNA Depletion (5/15) konnten wir keine pathogenen Mutationen im *POLG1*- oder *DGUOK*-Gen identifizieren. Als mögliche Kandidatengene für eine mtDNA Depletion kommen *TK2*, *ECGF1*, *SUCLA2*, *SULG1*, *RRM2B* und *MPV17* in Frage. Im Zusammenhang mit einer Hepatoenzephalopathie und mtDNA Depletion stehen Mutationen im *MPV17*-Gen. Ein Screening bezüglich pathogener Mutationen in diesem Gen sollte bei den fünf Kindern durchgeführt werden.

In unserem Kollektiv von 44 Kindern mit hepatozerebralen Syndrom konnten wir 37 DNA-Proben auf Basenveränderungen im *POLG1*- und *DGUOK*-Gen untersuchen. Dabei entdeckten wir in mehr als der Hälfte der Proben (21/37; 57%) pathogene Mutationen in diesen Genen und bestätigen damit die hohe Frequenz von *POLG1*- und *DGUOK*-Mutationen als molekulargenetische Ursache des mitochondrialen hepatozerebralen Syndroms. Während 62% (13/21) dieser DNA-Proben Mutationen im *POLG1*-Gen besaßen, konnten wir im *DGUOK*-Gen nur in 38% (8/21) der Fälle Mutationen identifizieren.

6.1 Patienten mit hepatischer Form des Depletionssyndroms und Mutationen im *DGUOK*-Gen

Für das hepatozerebrale Syndrom, hervorgerufen durch Mutationen im Gen der *DGUOK*, sind das frühe Auftreten einer Leberschädigung und eine Enzephalopathie kennzeichnend.

Wir konnten eine früh beginnende, neonatale Form mit einer Manifestation vor dem fünften Lebensstag und eine später beginnende Form mit Auftreten im Alter von eineinhalb bis drei Lebensmonaten identifizieren (siehe Tab. 6). Die kleinen Patienten fielen anfangs durch muskuläre Hypotonie, Hypoglykämie und Laktatazidose auf, vier

Kinder bereits in den ersten fünf Lebenstagen. Dann folgten eine zunehmende Trinkschwäche, prolongierter Ikterus, Hepatomegalie, Anstieg der Transaminasen, Gerinnungsstörung und Hyperammonämie. Die Lebererkrankung stand im Vordergrund und war für das frühe Versterben der Hälfte der Betroffenen (4/8) im ersten Lebensjahr verantwortlich. Diese Erkenntnisse wurden bereits von Salviati und Kollegen beschrieben [98 S. 315]. Im Gegensatz dazu kann die Enzephalopathie gänzlich fehlen oder mild verlaufen [98 S. 315; 110 S. 290]. In unserem Kollektiv entwickelten sich im Verlauf neurologische Symptome in sehr variablen Ausprägungsgraden wie psychomotorische Entwicklungsverzögerung und Nystagmus. Vier Kinder präsentierten zusätzlich gastrointestinale Symptome wie Erbrechen, Malnutrition und Ileus. Einzelne Kinder hatten zudem eine ausgeprägte Schwerhörigkeit, Nephropathie oder exokrine Pankreasinsuffizienz.

Eine Epilepsie als neurologisches Symptom wurde bei keinem unserer Patienten mit einem *DGUOK*-Defekt beschrieben. Krampfanfälle sind eher ungewöhnlich bei Kindern mit *DGUOK*-Mutationen. Kürzlich wurde ein Patient mit Krampfanfällen in Zusammenhang mit *DGUOK*-Mutationen publiziert [98 S. 312]. Die Krampfanfälle wurden aber erst während der Terminalphase der Erkrankung beobachtet. Neben den Krampfanfällen traten zusätzlich Komplikationen wie Kreislaufschock, Bluterbrechen und Hypoglykämien auf. Elektroenzephalographische Untersuchungen dieses Kindes zeigten keine pathologischen Veränderungen. Diese Krampfanfälle können zum Einen durch metabolische Krisen im Rahmen der Hepatopathie im Endstadium erklärt werden, zum Anderen aber auch durch die Enzephalopathie, die sich durch das Leberversagen entwickeln kann.

Viele Patienten mit *DGUOK*-Mutationen haben auffallende Augenbewegungsstörungen, wie z. B. oszillierende und diskonjugierte Augenbewegungen sowie rotatorischer, pendelnder oder multidirektionaler Nystagmus. Nur in einzelnen Fällen wurde in der Literatur kein Nystagmus beschrieben. Bei diesen Kindern konnte ein milderer klinischer Verlauf beobachtet werden [98 S. 312]. Einen Nystagmus als erstes Anzeichen einer neuronalen Beteiligung verzeichneten wir in fünf unserer acht Patienten. Wie bereits von Salivati und Kollegen festgestellt wurde, könnte das Fehlen von Augenbewegungsstörungen in Patienten mit *DGUOK*-Mutationen einen milderen Verlauf sowie eine bessere Prognose voraussagen. Patient 1 unseres Kollektivs zeigte einen milden Verlauf des hepatozerebralen Syndroms hervorgerufen durch *DGUOK*-Mutationen mit nur leichter Entwicklungsverzögerung und fehlenden Augenbewegungsstörungen. Das kleine Mädchen erhielt erfolgreich eine Leber-

transplantation und zeigt auch drei Jahre nach der Transplantation keine neurologische Verschlechterung.

Da die mitochondriale Deoxyguanosinkinase ubiquitär exprimiert wird und in den meisten Geweben eine ähnliche Aktivität aufweist [6], fällt auf, dass Patienten mit einem DGUOK-Defekt primär an einer Hepatopathie oder Hepatoenzephalopathie leiden und einen normalen Gehalt mtDNA im Blut, Haut und infantilen Muskel aufweisen [35 S. 393]. Besonders das Lebergewebe erscheint extrem vulnerabel gegenüber *DGUOK*-Mutationen. Eine mögliche Erklärung kann das zytosolische Enzym Deoxycytidinkinase liefern. Die Deoxycytidinkinase hat ein überlappendes Substratspektrum mit der Deoxyguanosinkinase. Beide Enzyme phosphorylieren Deoxyguanosine und Deoxyadenosine, sodass die Deoxycytidinkinase eine verminderte Deoxyguanosinkinaseaktivität in den Geweben kompensieren kann. In Leber und Gehirn ist dieser Mechanismus aufgrund der sehr geringen Deoxycytidinkinaseaktivität nicht so effektiv [77 S. 339]. Die unbeeinträchtigte fetale Entwicklung der Patienten mit einem DGUOK-Mangel kann teilweise durch die hohe Zellproliferation und die damit verbundene hohe De-Novo-Synthese von Deoxynukleotiden erklärt werden. Nach der Geburt, wenn die Zellproliferation progressiv abnimmt, kann die Deoxycytidinkinase den DGUOK-Defekt noch zum Teil kompensieren. Im adulten Leber- und Hirngewebe ist die Deoxycytidinkinaseaktivität dagegen sehr niedrig [5 S. 721; 6 S. 155]. Dies könnte erklären, warum der DGUOK-Mangel diese beiden Organe nach der Geburt selektiv beeinträchtigt. Im Muskelgewebe liegen dagegen höhere Deoxycytidinkinase-Enzymaktivitäten vor. Dies könnte begründen, warum im Muskelgewebe von Patienten mit einem hepatozerebralen mtDNA Depletionssyndrom und Mutationen im *DGUOK*-Gen seltener eine mtDNA Depletion gemessen wird.

Dennoch wurden verschiedene Kinder in der Literatur beschrieben, die eine zusätzliche Beteiligung anderer Organe wie Skelettmuskel und Herz präsentierten und in diesen Geweben ebenfalls eine mtDNA Depletion zeigten. Interindividuelle Differenzen der Deoxycytidinkinase-Expression können eine mögliche Erklärung geben. Eine zweite Erklärung könnte eine unterschiedlich starke Expression des Deoxynukleotid-Carriers in den verschiedenen Geweben sein, der für den Import von zytosolischen Deoxynukleotiden ins Mitochondrium verantwortlich ist [98 S. 316].

Andererseits schließt ein mtDNA Depletionssyndrom mit im Vordergrund stehender Muskelbeteiligung einen Defekt in der DGUOK nicht aus, wie in Patient 6 gezeigt wird.

Bei diesem Kind dominierte klinisch die muskuläre Hypotonie, was ungewöhnlich für Patienten mit *DGUOK*-Mutationen ist. Der Junge fiel im Alter von drei Lebensmonaten mit muskulärer Hypotonie auf. Im Alter von vier Monaten kamen rezidivierendes Erbrechen, Malnutrition und Laktatazidose (5,6-6,5 mmol/l; normal < 2) hinzu. In der neurologischen Untersuchung wurden ein Nystagmus, ein schwerer bilateraler Hörverlust und eine generalisierte muskuläre Hypotonie festgestellt. Die Ernährungsproblematik nahm zu und Zeichen einer Hepatopathie mit Vergrößerung der Leber kamen zum Vorschein. Eine mtDNA Depletion sowie die heterozygote *DGUOK*-Mutation p.Q170R konnten wir in seinem Muskelgewebe nachweisen.

In allen untersuchten Biopsien mit einem Deoxyguanosinkinase-Defekt (5/5) konnten wir eine mtDNA Depletion feststellen, einen kombinierten Atmungskettendefekt aber nur in 60% (3/5) der Fälle. In der Mehrzahl (4/5) der untersuchten Fälle fanden wir die Depletion im Lebergewebe.

6.2 Patienten mit Alpers Syndrom und Mutationen im *POLG1*-Gen

Bei den Patienten mit Mutationen im *POLG1*-Gen lässt sich ein heterogener Verlauf erkennen (siehe Tab. 7). Bei einigen Kindern verlief die Erkrankung schubweise über Jahre hinweg, bei anderen nahm sie einen rapiden, fatalen Verlauf. Das prominenteste Symptom war eine therapieresistente, progressive Epilepsie. Die Beteiligung der Leber kann dabei über einen langen Zeitraum diskret verlaufen oder sich im Rahmen einer valproatbedingten Lebertoxizität dramatisch verschlechtern.

Unsere Patienten mit einem Alpers Syndrom waren bei Geburt zunächst asymptomatisch und entwickelten sich in den ersten Lebenswochen bis Jahren normal. Das Erkrankungsalter reicht von der frühen Säuglingszeit (Patient 19 erkrankte mit 2,5 Lebensmonaten) bis hin ins Schulalter (Patient 17 erkrankte mit 81 Monaten). Die Mehrzahl der Kinder erkrankte im späten Säuglingsalter (6-12 Monate). Alle bis auf zwei Kinder (11/13) fielen durch eine anfallsartige, häufig infektassoziierte, neurologische Verschlechterung im Rahmen von Krampfanfällen auf. In der Folge entwickelten sie eine progrediente und therapieresistente Epilepsie. Zwei (Patienten 12 und 19) präsentierten nur milde neurologische Krankheitszeichen ohne Hinweise auf eine Epilepsie und erfüllten damit nicht die Kriterien eines typischen Alpers Syndroms. Im Krankheitsverlauf im Median von einem Monat (Range 0,25-4 Monaten) stiegen die Leberenzyme an, eine Hepatomegalie infolge der Leberinsuffizienz fortschreitend bis

zum Leberversagen wurde auffällig. Drei Kinder hatten zusätzlich gastrointestinale Symptome wie Erbrechen, Malnutrition und Ileus. Im Rahmen der Enzephalopathie wurden ferner Myoklonien, Schlaganfall-ähnliche Episoden und Sehverlust beschrieben. Eine Kardiomyopathie wurde zusätzlich bei den beiden Kindern mit milderer Neurologie beobachtet (Patienten 12 und 19). 70% der Kinder mit Mutationen in der *POLG1* verstarben vor dem zweiten Lebensjahr.

Eine Verminderung der mtDNA Kopienanzahl im Gewebe mit *POLG1*-Mutationen trat in 83% unserer untersuchten Biopsien (5/6) auf. Dabei wurde eine mtDNA Depletion in vier Leberbiopsien, drei Muskelgewebsproben, zwei Hirnbiopsien, einer Fibroblastenkultur und einmal im Herzmuskelgewebe festgestellt. Zur Analyse stand uns nur Gewebe von 6 der 13 Patienten zur Verfügung. Wir gehen aber davon aus, dass ein Großteil der Patienten mit Alpers Syndrom eine mtDNA Depletion in ihrer Leber aufweist, wie es von Sarzi und Kollegen beschrieben wurde [99 S. 532]. In einem Patienten (Patient 12) mit typischem Alpers Syndrom konnten wir eine Depletion der mtDNA im Muskel-, Leber- und Herzmuskelgewebe nachweisen, in einem weiteren Kind (Patient 13) im Leber-, Hirngewebe und Fibroblasten. Patient 14 zeigte eine mtDNA Depletion im Muskel-, Leber- und Hirngewebe.

Valproinsäure, ein Antiepileptikum, erwies sich in vier Fällen unseres Kollektivs (Patient 9, 10, 16, 17) als Trigger einer Hepatopathie. Bei diesen Kindern schien, die Leberbeteiligung lang zu fehlen (Median 7 Monate; Range 2-80 Monate). Erst nach Substitution von Valproinsäure bei nicht beherrschbarer Epilepsie im Median sieben Monate (Range 2-80 Monate) nach Auftreten der ersten neurologischen Symptome, traten Zeichen einer Leberbeteiligung auf. Eine Leberzellschädigung ist eine seltene Nebenwirkung dieses Antiepileptikums. Als richtungsweisende Symptome gelten Übelkeit, Erbrechen, Apathie und vermehrte Krampfanfälle. In der Folge kommt es zum Anstieg der Transaminasen. Schreitet der fibrotische Umbau der Leber fort, entwickelt sich ein akutes Leberversagen.

Im Jahr 1981 beschrieben Haas und Kollegen erstmals die hemmenden Effekte von Valproinsäure auf die oxidative Phosphorylierung in Rattenleber-Mitochondrien [46]. Bis heute wurden verschiedene Theorien der Entstehung der VPA-induzierten Hepatopathie beschrieben, jedoch ist der genaue Mechanismus weiterhin unklar.

Das Risiko eines akuten Leberversagens nach Valproinsäuregabe bei Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen wurde in den letzten Jahren wiederholt berichtet.

Chabrol und Kollegen beschrieben 1994 ein dreijähriges Mädchen mit einer Myoklonus-Epilepsie und einem COX-Defizit, das nach dreimonatiger Valproinsäure-Substitution ein fatales Leberversagen und eine Laktatazidose entwickelte [14 S. 133]. Ferrari und Kollegen beschrieben 2005 einen Jungen mit juvenilem Alpers Syndrom, der im Alter von achtzehn Jahren zur Kontrolle der nicht beherrschbaren Epilepsie Valproinsäure erhielt und kurze Zeit später ein schweres akutes Leberversagen entwickelte [39 S. 725]. Galimberti und Kollegen beschrieben kürzlich ein achtjähriges Kind mit Epilepsie und heteroplasmischer p.C8393T Mutation im *MTATP8*-Gen, das unter Therapie mit Valproinsäure eine schwere, aber reversible Verhaltensstörung und kognitive Dysfunktion, einhergehend mit einer Pseudoatrophie des Gehirns, entwickelte. Nach Absetzen des Medikamentes verbesserten sich sowohl das Verhalten als auch die schulischen Leistungen dieses Kindes [44 S. 1715]. De Vries schilderte aktuell einen Patienten mit Alpers Syndrom und homozygoter p.A467T Mutation, der im Alter von 24 Monaten an einer therapieresistenten Epilepsie erkrankte und nach Gabe von Valproinsäure ein akutes Leberversagen entwickelte [29 S. 232]. Die beschriebenen Fälle lassen vermuten, dass durch die mtDNA Mutationen die hepatotoxischen Effekte der VPA zusätzlich getriggert werden. Andererseits muss ein potentieller Effekt von Umweltfaktoren, die das phänotypische Spektrum der Alpers Erkrankung und anderer mitochondrialer Erkrankungen modulieren können, diskutiert werden. Letztendlich sollte Valproinsäure als Antiepileptikum bei Patienten mit der hepatozerebralen Form des mtDNA Depletionssyndroms und in Patienten mit Epilepsie und mitochondrialer Dysfunktion nur mit Vorsicht benutzt werden oder besser in dieser Gruppe von Patienten vermieden werden.

6.3 Weitere durch Mutationen im *POLG1*-Gen verursachte Krankheiten

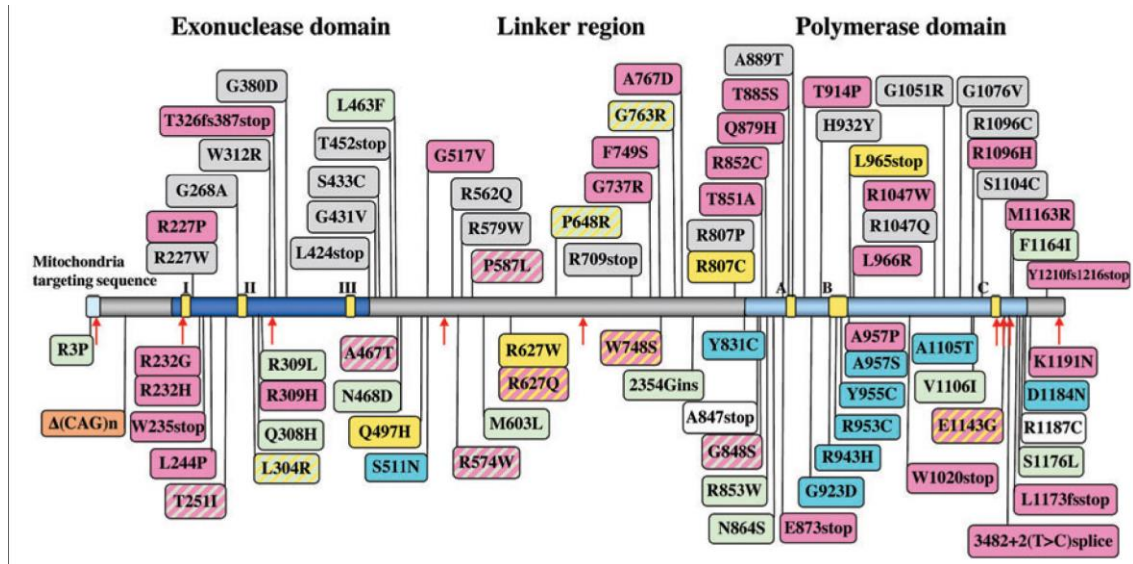
Die DNA Polymerase gamma ist die einzige bekannte DNA Polymerase in Mitochondrien von Säugetieren. Dies veranschaulicht ihre Bedeutung für die DNA Replikation und Reparatur. Die erste pathogene Missense-Mutation p.Y955C wurde in einer Familie mit autosomal dominanter, chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie (adPEO; OMIM *157640) beschrieben [115 S. 211]. Wie Abbildung 24 zeigt, wurden in den letzten Jahren beinahe 90 pathogene Mutationen im *POLG1*-Gen identifiziert [21 S. 133; siehe ebenfalls www.dir-apps.niehs.nih.gov/polg]. Das phänotypische Spektrum scheint sich, damit kontinuierlich auszuweiten. Zu den Erkrankungen zählen neben dem Alpers Syndrom und der adPEO die autosomal rezessive PEO (arPEO; OMIM *258450) [115], die zerebelläre Ataxie [119], die

sensorische Ataxie, Neuropathie, Dysarthrie und Ophthalmoparese (SANDO; OMIM *607459) [116], die spinozerebelläre Ataxie mit Epilepsie und migräneartigen Kopfschmerzen [126] sowie das MNGIE [40]. Zusätzlich wurde die PEO in Verbindung mit Hypogonadismus, Parkinsonismus oder vorzeitiger Menopause [71 S. 875] beschrieben. Die *POLG1*-Mutationen können dabei autosomal dominant und autosomal rezessiv vererbte Erkrankungen verursachen.

Kürzlich wurden pathogene Mutationen im *POLG1*-Gen bei Kindern mit isolierten neurologischen Symptomen beschrieben. Anzeichen einer klinisch manifesten Leberdysfunktion wurden bei ihnen nicht beobachtet. Die Patienten fielen durch psychomotorische Entwicklungsverzögerung und therapieresistente Epilepsie zum Teil einhergehend mit muskulärer Hypotonie, Nystagmus, Myoklonien, Stroke-like Episoden, Ataxie oder Sehverlust auf [51 S. 1676, 1677]. Dieser Phänotyp wurde dem juvenilen Alpers Syndrom zugeordnet, da die Mehrzahl der Betroffenen erst im Vorschulalter erkrankte [51 S. 1676, 1677]. Ferrari und Kollegen beschrieben einen Jungen mit juvenilem Alpers Syndrom, der bis zum achtzehnten Lebensjahr eine isolierte Enzephalopathie hatte. Aufgrund von zahlreichen Krampfanfällen und Myoklonien wurde ihm im Alter von achtzehn Jahren Valproinsäure verordnet. Kurze Zeit später entwickelte er ein akutes Leberversagen und verstarb im Alter von neunzehn Jahren trotz Lebertransplantation an der fortschreitenden Enzephalopathie [39 S. 725].

Abbildung 24 Pathogene Aminosäure-Substitutionen und Polymorphismen im *POLG1*-Gen

[modifiziert nach Copeland, 2008 S. 133, siehe auch www.dir-apps.niehs.nih.gov/polg/]



Die schematische Darstellung des humanen Polymerase gamma Proteins zeigt die Lokalisationen von pathogenen Aminosäure-Substitutionen und Polymorphismen. Das Protein wird eingeteilt in die Exonuklease Domäne, Linker Region und Polymerase Domäne. Die pathogenen Substitutionen werden in Boxen dargestellt: hellblaue Box: adPEO; hellgrüne Box: autosomal rezessive Mutationen; graue Box: sporadische PEO; pinkfarbende Box: Alpers Syndrom; gelbe Box: Ataxie-Neuropathie-Syndrome; orange Box: männliche Infertilität; gestreifte Box: pathogene Substitutionen, die in mehreren Erkrankungen identifiziert wurden. Rote Pfeile stellen Polymorphismen dar.

6.4 Mutationen

6.4.1 Mutationen im *DGUOK*-Gen

Die erste *DGUOK*-Mutation wurde im Jahr 2001 bei einem Patienten mit der hepatozerebralen Form des MDS von Mandel und Kollegen beschrieben [77 S. 337]. Seitdem wurden 40 Fälle von 21 Familien mit vierzehn verschiedenen pathogenen *DGUOK*-Mutationen demonstriert (Tab. 10).

Tabelle 10 Bisher beschriebene Mutationen im *DGUOK*-Gen

[modifiziert nach Freisinger et. al., 2006 S. 1133]

Ex on	Mutation	Effect	CNS Involvement	Muscle Involvement	Reference / Source
1	c.2 T>C hom.	M1T	...	Hypotonia, RC↓	Slama et al, 2005
2	c.204delA hom.	Frameshift, stop after aa 80	Nystagmus, failure to thrive	normal	Mandel et a, 2001
2	c.269 C>T hom.	Stop after aa 79	Nystagmus	normal	Mancuso et a,2005
3	c.313 C>T hom.	Stop after aa 105	Nystagmus, encephalopathy	Hypotonia, RC↓	Taanman et al. 2002
3	c.318 G>A hom.	Stop after aa 106	Optic dysplasia, nystagmus	normal	Mancuso et al, 2005
3	c.352 G>A hom.	Stop after aa 107	optic dysplasia, nystagmus	normal	Mancuso et al, 2005
3,	c.425G>A het.	R142K	normal	normal	Salviati et al, 2002
5	c.679G>A het.	E227K			
4,	c.494 A>T het.	E165V	...	Hypotonia, RC↓	Slama et al, 2005
6	c.797 T>G het.	L266R			
4	c.609-610delGT hom.	Frameshift, stop after aa 213	developmental delay	RC↓	Salviati et al, 2002
5,	c.632 A>G het.	E211G	...	Hypotonia, RC↓	Slama et al, 2005
6	c.797 T>G het.	L266R			
6	c.709T>C hom.	L250S	Nystagmus, dystrophy	Hypotonia RC↓	Wang et al, 2005
6	c.763G>T hom.	D255Y	cytathioninuria ?	RC↓	Tadiboyina et al, 2005
6	c.766-768insGATT hom.	Frameshift, stop after aa 255	Nystagmus, developmental delay	Hypotonia RC↓	Salviati et al, 2002
6	c.766-768insGATT hom.	Frameshift, stop after aa 255	...	+ acid maltase def.	Mancuso et al, 2003
6	c.766-768insGATT hom.	Frameshift, stop after aa 255	Nystagmus, abnormal VEP,BAEP	Hypotonia RC↓	Rabinowitz et al, 2004
6	c.766-768insGATT hom.	Frameshift, stop after aa 255	Nystagmus, psychomotor delay, pyramidal signs	Hypotonia, failure to thrive	Labarthe et al, 2005
6	c.766-768insGATT hom.	Frameshift, stop after aa 255	...	Hypotonia RC↓	Slama et al, 2005

Wir fanden fünf neue (Tab. 8) und drei kürzlich beschriebene *DGUOK*-Mutationen. Sieben Mutationen sind Missense-Mutationen (p.M1V, p.M1I, p.M1T, p.S52F, p.R105X, p.Q170R, p.L250S), die konservierte Aminosäuren betreffen. Eine Mutation (681-684delGTTT) führt durch Deletion von vier Basen zu einem Frameshift und bedingt dadurch ein vorzeitiges Stoppcodon.

Die Missense-Mutationen p.M1V, p.M1I und p.M1T verändern das initiale Methionin des Proteins, das Startcodon. p.M1T wurde zuvor von einer anderen Forschungsgruppe beschrieben [103 S. 464]. Ob aus dem Verlust des normalen initialen Methionins ein reduzierter Gehalt des Proteins oder abnormale, gekürzte Proteine resultieren, ist noch unklar. Um dies zu klären, sind weitere Studien nötig. Die beiden

Kinder (Patient 1 und 2) mit Mutationen im Startmethionin zeigten einen milderen Verlauf der Erkrankung. Sie erkrankten mit eineinhalb bzw. zwei Lebensmonaten und hatten eine mildere Enzephalopathie. Das Mädchen (Patient 1) erhielt im Alter von zwölf Monaten eine Lebertransplantation und ist aktuell bei guter Gesundheit. Der Junge (Patient 2) verstarb erst im Alter von siebzehn Monaten, während andere DGUOK-Patienten bereits mit fünf Lebensmonaten verstarben. Die von uns neu beschriebenen Mutationen p.M1V und p.M1I konnten wir in 50 Kontrollpersonen nicht nachweisen, was die Pathogenität dieser Mutationen unterstreicht.

Patient 3 hat eine 4 bp GTTT Deletion, die zu einem Frameshift und vorzeitiger Termination führt (siehe Abb. 18). Diese Deletion liegt in der Nähe der bereits beschriebenen Missense-Mutationen p.E211G [103 S. 464] und p.E227K [98 S. 313, 314]. Das Mädchen erkrankte bereits am Ende der Neonatalphase an einer schweren Hepatopathie, milden Enzephalopathie und muskulärer Hypotonie und verstarb vier Monate später an einem schweren Leberversagen.

Die p.S52F Missense-Mutation betrifft eine gut konservierte Aminosäure (Abb. 17 und 19), die in der Nachbarschaft von 204delAstop [77 S. 339] und 269C>Tstop [76 S. 746] liegt und ebenfalls in 50 Kontrollproben nicht gefunden wurde. In Patient 3 trat die p.S52F Mutation in compound heterozygoter Form zusammen mit der Frameshift-Mutation auf, während in Patient 2 die Mutation homozygot vorlag.

In Patient 6 konnten wir nur eine heterozygote Missense-Mutation finden. Die p.Q170R Mutation liegt in einer gut konservierten Region des *DGUOK*-Gens (siehe Abb. 19) nahe der aktiven Seite des Enzyms, die für die Bindung von Substraten verantwortlich ist [123 S. 321]. In diesem Genabschnitt konnten bereits zwei pathogene Mutationen identifiziert werden: p.E165V [103 S. 464] und der 609-610delIGT [98 S. 313]. Um die Pathogenität von p.Q170R zu stützen, untersuchten wir 50 Kontrollproben bezüglich dieser Missense-Mutation und konnten sie nicht nachweisen. Um die zweite pathogene Mutation zu finden, sequenzierten wir zusätzlich die cDNA. Auch hier konnten wir keine zweite pathogene Mutation identifizieren. Abweichend von den anderen Kindern mit Mutationen im Gen der *DGUOK* präsentierte dieser Junge (Patient 6) einen Phänotyp, bei dem eine schwere muskuläre Hypotonie dominierte. Bei der Vorsorgeuntersuchung U4 wurde erstmals eine muskuläre Hypotonie festgestellt. Kurz darauf kamen Erbrechen, Nahrungsverweigerung und Laktatazidose hinzu. Erst mit acht Lebensmonaten fielen erhöhte Transaminasen und eine Hepatomegalie auf, sowie ein hochgradiger beidseitiger Hörverlust und eine Entwicklungsverzögerung. Im Verlauf

nahmen die Symptome der Leberinsuffizienz zu. Weiterführende Studien sind nötig, um die zweite pathogene Mutation in diesem Patienten zu identifizieren.

Es ist unklar, warum einige der DGUOK-Patienten eine milde Enzephalopathie zeigen, während andere eine Multisystemerkrankung entwickeln. Diese phänotypische Varianz könnte mit den verschiedenen pathogenetischen Effekten der verschiedenen Mutationen in Verbindung gebracht werden.

Missense-Mutationen bewirken eine verminderte Funktion bzw. eine Aktivitätsabnahme der Deoxyguanosinkinase, während aus einer Frameshift-Mutation oder einem Stoppcodon ein kompletter Ausfall der DGUOK resultiert. Aufgrund der klinischen Merkmale unserer Patienten (siehe Tab. 6) und bereits früher beschriebener Patienten (siehe Tab. 10) nehmen wir an, dass Patienten mit Missense-Mutationen eine spätere Manifestation der Symptome zeigen und die Erkrankung bei ihnen langsamer fortschreitet. Bei Patient 3 mit einer Frameshift-Mutation und einer Missense-Mutation verlief die Krankheit fatal und führte bereits im fünften Lebensmonat zum Tod.

Die variable Beteiligung des ZNS wurde schon von anderen Forschungsgruppen mit Nonsense- und Missense-Mutationen in Verbindung gebracht [77 S. 339; 98 S. 315]. In weiteren neuropathologischen Studien mit Patienten mit verschiedenen *DGUOK*-Mutationen sollte das Augenmerk auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den molekularen Defekten und der Schwere der Gehirnläsionen gerichtet werden.

6.4.2 Mutationen im *POLG1*-Gen

Beinahe 90 pathogene Mutationen im *POLG1*-Gen wurden in Patienten mit verschiedenen klinischen Präsentationen beschrieben, was eine komplexe Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp in den Patienten und ihren Familien vermuten lässt (Abb. 24; siehe ebenfalls www.dir-apps.niehs.nih.gov/polg). Das große phänotypische Spektrum reicht von fataler Hepatoenzephalopathie im Kleinkindesalter bis zu mild verlaufenden klinischen Syndromen, die ein einzelnes Organ betreffen und im Schulalter sowie Erwachsenenalter auftreten können.

In den letzten Jahren wurden vermehrt Mutationen in der *POLG1* im Zusammenhang mit dem Alpers Syndrom beschrieben [88 S. 706; 87 S. 54; 39 S. 723; 25 S. 921].

Wir identifizierten fünfzehn verschiedene DNA-Sequenzveränderungen in dreizehn Kindern mit einem Alpers Syndrom (siehe Tab. 9). Darunter fielen neun neue

pathogene Mutationen auf, die in 600 Kontrollchromosomen nicht nachweisbar waren und zusätzlich durch direktes Sequenzieren der Eltern bestätigt wurden.

Bei Patient 11 und 15 konnten wir die zwei neuen Mutationen IVS21+1T>C und IVS15-9-c2485del12bp feststellen. Diese Splicing-Mutationen verändern die Splicing-Stelle und liegen in unseren beiden Patienten compound heterozygot mit der bereits beschriebenen pathogenen Mutation p.A467T vor. Diese Art von Basenveränderungen führt zu einer Verkürzung des POLG1-Proteins.

Von den sieben neuen Missense-Mutationen wurden p.G737R, p.A767N und p.K1191N in compound Heterozygoten gefunden. Sie verändern konservierte Reste und liegen nahe publizierter, pathogener Mutationen in der Polymerase-Domäne (p.W748S, p.N864S, p.A889T, p.K1184) [1 S. 1354; 40 S. 1279; 118 S. 547; 119 S. 1251].

Die homozygote p.R1096H Substitution betrifft das gleiche Codon wie die bereits beschriebene Mutation p.R1096C [1 S. 1354].

Der Basenaustausch p.S305R in Exon 4 im Bereich der Exonuklease-Domäne liegt ebenfalls in einem compound heterozygoten Status vor und ist benachbart zu bereits berichteten rezessiven Mutationen (p.L304R, p.R309L) [115 S. 211; 65 S. 211].

p.R309H liegt auf dem gleichen Nukleotid wie die kürzlich in erwachsenen Patienten mit PEO als pathogen beschriebene p.R309L Substitution [65 S. 216]. In p.R309H wird das hydrophile Argenin durch ein ebenfalls hydrophiles Histidin substituiert, während R309L ein hydrophobes Leucin bedingt. Hydrophobe Aminosäureveränderungen wurden im Zusammenhang mit später beginnenden mitochondrialen Erkrankungen wie PEO beschrieben [65 S. 216].

Die Substitution p.T914P in Exon 18 verändert eine konservierte Aminosäure und liegt nahe der beschriebenen pathogenen Mutation p.G923D in der Polymerase-Domäne [65 S. 216]. Die p.T914P Missense-Mutation liegt in Patient 9 compound heterozygot mit der häufigen *POLG1*-Mutation p.A467T vor und verursacht eine schwere frühkindliche Enzephalopathie mit Leberbeteiligung. Die p.T914P Mutation in compound heterozygotem Status mit den Mutationen p.Q308H und p.F1164I führte in einem zehnjährigen Mädchen zu einem divergenten Phänotyp mit PEO und Myopathie [51 S. 1678]. p.Q308H liegt in der Exonuklease-Domäne, während p.F1164I in der Polymerase-Domäne des *POLG1*-Gens vorkommt.

Schließlich fanden wir Mutationen im *POLG1*-Gen in Patienten mit dem kindlichen hepatozerebralen Syndrom, die bereits in erwachsenen Patienten mit einem anderen

Phänotyp beschrieben wurden. Die Missense-Mutationen p.G1051R [74 S. 316], p.Y831C [75 S. 1777], R627Q [72 S. 1907], p.G848S [65 S. 211] und p.R1096C [1 S. 1354] wurden bereits als pathogen in Erwachsenen mit PEO, SANDO, Parkinsonismus, Ataxie-Myopathie bzw. PEO-Ataxie-Neuropathie bestätigt. Kann der gleiche heterozygote Basenaustausch mehrere andersartige Phänotypen wie Alpers Syndrom, progressive externe Ophthalmoplegie oder SANDO verursachen? Eine Erklärung für diese phänotypische Varianz kann die heterozygote Mutation auf dem anderen Allel sein.

In vier Patienten (Patienten 18, 19, 20, 21) konnten wir nur eine einzige heterozygote pathogene Mutation im *POLG1*-Gen identifizieren. Wir erwarteten, dass die zweite Mutation in der Promoterregion oder in den intronischen Sequenzen liegt. Deshalb sequenzierten wir die cDNA in einem dieser Patienten (Pat. 18), konnten aber die zweite pathogene Mutation nicht identifizieren. Ob bei diesen Mutationen auch dominante Manifestationen in Frage kommen, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Ein weiteres Rätsel ist, ob eine pathogene Mutation im *POLG2*-Gen zusammen mit einer heterozygoten Mutation im *POLG1*-Gen ein Alpers Syndrom verursachen kann. Das *POLG2*-Gen kodiert die p55 akzessorische Untereinheit der DNA Polymerase gamma. Mutationen im *POLG2*-Gen wurden in einer aktuellen Veröffentlichung in einem Patienten mit PEO, multiplen Deletionen und COX-defizienten Muskelfasern beschrieben [69 S. 1027, 1028]. Die p.G451E Substitution führt zu einer inkompletten Stimulation der katalytischen Untereinheit und in der Folge zu einer gestörten Interaktion der beider Untereinheiten der POLG.

6.4.2.1 p.A467T – eine häufige Mutation beim Alpers Syndrom

Die beim Alpers Syndrom häufig beschriebene c.1399 G>A / p.A467T Linker-Region Mutation fanden wir in 38% (5/13) der im Kindesalter manifestierten Fälle (siehe Abb. 21). Die p.A467T heterozygoten Eltern der betroffenen Kinder dieser Studie waren alle klinisch unauffällig.

In einigen Populationen konnte diese Mutation in Kontrollpersonen nachgewiesen werden. So wurde sie in 0,69% der britischen Kontrollallele identifiziert, was ein Reservoir für rezessive Erkrankungen darstellen kann. Im Gegensatz dazu wurde p.A467T in nur 0,17% der finnischen Kontrollallele und 0,19% der 1066 deutschen

Kontrollallele gefunden. In 674 italienischen Kontrollchromosomen konnte die p.A467T Mutation nicht nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die geographischen Unterschiede in der Überträgerfrequenz in Europa [51 S. 1680].

Angesichts der veröffentlichten Daten von funktionellen [14 S. 31341] und klinischen Studien [49 S. 217] wird klar, dass die häufige Linker-Region Mutation p.A467T direkt zur Pathogenese beiträgt. Eine A467T Substitution resultiert in einer verminderten Aktivität, DNA-Bindung und Genauigkeit der DNA Polymerase gamma [72 S. 1907].

Bei Individuen mit homozygoter p.A467T Mutation wurde ein milderer Phänotyp im Vergleich zur monoallelischen Expression von p.A467T in compound Heterozygoten beschrieben [89 S. 1495; 51 S. 1680]. Die homozygoten Fälle erkrankten oft erst im Schulalter und zeigten eine isolierte Enzephalopathie. Häufig war das erste Symptom eine Epilepsie. Zusätzliche Symptome entwickelten sich aber im weiteren Krankheitsverlauf. In der Literatur werden sechs Kinder mit homozygoter p.A467T Mutation, juveniles Alpers Syndrom und anfänglich mildem Verlauf erwähnt [39 S. 725, 726; 89 S. 1494; 51 S. 1677; 29 S. 231]. Zwei dieser beschriebenen Kinder entwickelten im Verlauf ein Leberversagen, das durch eine Therapie der Krampfanfälle mit Valproinsäure getriggert wurde [39 S. 725; 29 S. 231]. Dieser milde Verlauf bei homozygoter p.A467T Mutation erscheint ungewöhnlich, da kürzlich in vitro erhobene Daten zeigten, dass die POLG mit dem A467T mutantern Protein nur noch eine Aktivität von 4% aufweist [15 S. 31345; 72 S. 1911, 1912] und eine fehlerhafte Interaktion der beiden POLG-Untereinheiten p140 und p55 aufweist [15 S. 31345]. Vermutlich reicht diese Restaktivität von 4% aus, um eine zumindest eingeschränkte Funktion des Proteins zu gewährleisten und einen milderen Phänotyp zu bedingen. Bei compound Heterozygoten mit der p.A467T Mutation auf dem einen Allel bewirkt vermutlich die pathogene Mutation auf dem zweiten Allel einen schwereren Phänotyp des Alpers Syndroms.

In unserem Kollektiv beobachteten wir, dass die p.A467T Mutation compound heterozygot mit einer Mutation in der Polymerase-Domäne eine schwere, fatal verlaufende Hepatoenzephalopathie verursachte. p.A467T scheint zusammen mit einer Mutation in der Polymerase-Domäne, zu einer schwerwiegenderen Funktionseinschränkung der POLG zu führen. Vermutlich tragen aber noch weitere Faktoren zu dieser Phänotyp-Variabilität bei. Weitere Untersuchungen in einer größeren Kohorte sind hier nötig, um die klinische Variabilität zu klären.

Unter den Fällen mit *POLG1*-Mutationen, die sich im Erwachsenenalter manifestieren, wird die p.A467T Mutation seltener gefunden [51 S. 1680]. Es ist unklar, warum die p.A467T Mutation häufiger bei Kindern als bei Erwachsenen identifiziert wird. Ein Argument kann die rezessive Vererbung dieser Mutation sein. Neue klinisch-genetische und funktionelle Studien vermuten, dass p.A467T auch als dominante Mutation in Erscheinung treten kann. In der Literatur wird ein Patient mit mildem Phänotyp und sich spät manifestierender Ptosis beschrieben. Bei diesem Patienten lag die p.A467T Mutation auf dem einen Allel vor; auf dem anderen Allel fand sich keine weitere pathogene Mutation [72 S. 1910].

6.4.2.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Unsere Beobachtungen bestätigen, dass pathogene Mutationen im *POLG1* über die kodierenden Regionen verteilt sind. Obwohl es keine strenge Genotyp-Phänotyp-Beziehung bei den *POLG1*-Mutationen gibt, lässt sich ein Muster erahnen, das sich an der Lage und Art der Mutationen im *POLG1*-Gen orientiert [51 S. 1680].

Missense-Mutationen bewirken eine verminderte Funktion bzw. eine Aktivitätsabnahme der mitochondrialen DNA Polymerase gamma, während aus einer Frameshift-Mutation oder einem Stoppcodon ein kompletter Ausfall der POLG resultiert.

Bei den Patienten mit *POLG1*-Missense-Mutationen unseres Kollektivs reicht das Manifestationsalter von zweieinhalb Monaten bis 81 Monaten. Phänotypisch präsentieren die Kinder ein typisches Alpers Syndrom. Bei Missense-Mutationen entscheidet vermutlich die Lage der Mutation im Gen über den Krankheitsverlauf. Die meisten Fälle mit einer schweren Manifestation in der Kindheit haben jeweils eine heterozygote Mutation in der Linker-Region (Tab. 11).

Tabelle 11 Lage der *POLG1*-Mutation im Gen und Phänotyp

Lage der Mutation	Linker-Region + Polymerase-Domäne		Linker-Region	Exonukleas e-Domäne + Linker-Region	Polymerase -Domäne
Art der Mutation	Missense-Mutation	Splice-site-Mutation + Missense-Mutation	Missense-Mutation	Missense-Mutation	homozygote Missense-Mutation
Phänotyp	Alpers Syndrom, schwerer Verlauf	Alpers Syndrom	Alpers Syndrom,	Alpers Syndrom,	Alpers Syndrom, schweren Enzephalopathie, Leberbeteiligung erst mit 8,5 Jahren
Patienten	9, 12, 14, 17	11, 15	10	13	16
Manifestationsalter in Mon. Median; [Range]	12,5; [6-81]	3,5; [12-15]	9,5	6	24
Tod in Mon. Pat.-anzahl / Median; [Range]	2/ 13,5; [11-16,5]	2 / 17,5; [16-19]	12	16	-

6.5 Therapieansätze

6.5.1 Supportive Maßnahmen

Therapeutische Maßnahmen zur Behandlung eines mtDNA Depletionssyndroms sind bisher nicht bekannt. Lediglich supportive Maßnahmen wie kontinuierliche Sondenernährung, Gerinnungsfaktorsubstitution, ggf. antibiotische Therapie und Physiotherapie stehen derzeit zur Verfügung.

6.5.2 Lebertransplantation

Seit kurzem werden gute Erfolge mit einer Lebertransplantation bei leberspezifischen mitochondrialen Erkrankungen verzeichnet [98 S. 316]. Eine Lebertransplantation wurde in sechs bereits beschriebenen DGUOK-Fällen durchgeführt [98 S. 316; 76 S. 746; 108 S. 237; 94 S. 219; 110 S. 290; 103 S. 463]. Vier dieser Kinder hatten eine multisystemische Präsentation zum Zeitpunkt der Lebertransplantation. Die Lebertransplantation konnte aber eine Progression der Erkrankung in den anderen

Organen nicht aufhalten. Infolgedessen verstarben diese Kinder. Im Gegensatz dazu zeigten zwei weitere Patienten, die Missense-Mutationen im *DGUOK*-Gen tragen, eine isolierte Hepatopathie und wurden im Alter zwischen zwölf bzw. siebzehn Monaten lebertransplantiert. Im Alter von drei bzw. fünf Jahren zeigten sie keine Beteiligung weiterer Organe [98 S. 316; 94 S. 219]. Das Kind, das von Salviati und Kollegen beschrieben wurde [98 S. 316], ist mittlerweile elf Jahre alt und hat bis auf eine episodische Migräne keine Beteiligung anderer Gewebe [Annette Feigenbaum, MD, schriftliche Kommunikation, Dez. 2005].

Patient 1 unserer Studie mit den heterozygoten Missense-Mutationen p.M1V und p.M1I im Startcodon des *DGUOK*-Gens erhielt im Alter von zwölf Monaten eine Lebertransplantation. Sie ist momentan mit dreieinhalb Jahren bei guter Gesundheit (Abb. 25). Bei dem Mädchen dominierten die Symptome einer Hepatopathie. Ein Nystagmus oder morphologische Veränderungen in der Kernspintomographie wurden nicht beobachtet.



Abbildung 25

**Patientin mit *DGUOK*-Defekt nach
Lebertransplantation**

In der Literatur wurde aktuell ein Kind mit Alpers Syndrom und Leberversagen im Endstadium kurz nach der ersten epileptischen Episode beschrieben, das im Alter von zweieinhalb Jahren eine orthotope Lebertransplantation erhielt. Sechs Monate später verstarb es jedoch an den Folgen der therapieresistenten Epilepsie [29 S. 231]. Ein weiterer Fall wurde 2005 geschildert. Ein Junge mit homozygoter p.A467T Mutation erkrankte im Alter von sieben Jahren an einer Epilepsia partialis continua. Im Alter von achtzehn Jahren bekam er Valproinsäure zur Therapie der nicht beherrschbaren Epilepsie. Kurze Zeit später entwickelte er ein schweres akutes Leberversagen und erhielt eine Lebertransplantation [39 S. 725]. Er verstarb im Alter von neunzehn Jahren an den Folgen der fortschreitenden Enzephalopathie.

6.5.3 Experimentelle Ansätze

6.5.3.1 Supplementation von dGMP und dAMP in DGUOK-defizienten Zellen

Taanman und Kollegen studierten 2003 Hautfibroblasten eines Patienten mit homozygoter Nonsense-Mutation in Exon 3 des *DGUOK*-Gens. Sie zeigten, dass, obwohl die mtDNA in ruhenden DGUOK-defizienten Fibroblasten vermindert ist, die Depletion durch Supplementation von dGMP und dAMP verhindert werden kann [109 S. 1839]. Sie hemmten den Zellzyklus und versetzten die Zellen in ein Ruhestadium. Dabei sank die mtDNA Menge in DGUOK-defizienten Zellen bedenklich ab, blieb aber in Kontroll-Fibroblasten stabil [109 S. 1842]. Diese Abnahme der mtDNA Menge in ruhenden, DGUOK-defizienten Zellen konnte durch Substitution von dGMP und dAMP verhindert werden. Ihre Experimente zeigten, dass während der S-Phase des Zellzyklus die zytosolische Deoxynukleotid-Konzentration durch die Aktivität des De-Novo-Synthese-Pathway hoch ist. Suffizient phosphorylierte Deoxyguanosine und Deoxyadenosine passieren die mitochondriale Membran, um die mtDNA Synthese in DGUOK-defizienten Zellen zu unterstützen. In anderen Phasen des Zellzyklus, wenn die zytosolische Deoxyribonukleotid-Konzentration durch die fehlende De-Novo-Synthese niedriger ist, gelangen insuffizient phosphorylierte Deoxyguanosine und Deoxyadenosine in die mitochondriale Matrix [109 S. 1842]. Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass möglicherweise geringe Mengen an dGMP und dAMP, die durch die Deoxycytidinkinase im Zytosol synthetisiert werden, als Vorstufen für die mtDNA Synthese genutzt werden [109 S. 1843].

6.5.3.2 Erhöhung des dNTP Pools

Mutationen in Genen, die den mitochondrialen Vorrat an Deoxynukleotiden (dNTP) kontrollieren, beeinträchtigen die Integrität der mtDNA sowohl in Menschen als auch in Hefezellen. Baruffini und Kollegen testeten 2006, inwieweit Manipulationen am dNTP Pool die Auswirkungen von *POLG1*-Mutationen in Hefezellen modifizieren können [7 S. 2846]. Zu diesem Zweck induzierten sie in *MIP1*, dem *POLG1*-Homologen in Hefezellen, die bekannten, humanen *POLG1*-Mutationen p.Y955C und p.G268A [7 S. 2851]. Eine Steigerung des mitochondrialen dNTP Pools konnte zum Einen durch Überexpression des *RNR1*, einem dNTP Checkpoint-Enzym (Ribonukleotid-Reduktase), erreicht werden [16 S. 29984], zum Anderen durch Deletion seines Inhibitors, *SML1* [122 S. 6114; 7 S. 2848]. Die *petite* Mutabilität beider rekombinanter, mutanter Erbanlagen wurde daraufhin reduziert. Die Erhöhung des dNTP Pools zeigt einen protektiven Effekt auf die mtDNA. Dahingegen ist eine gesteigerte Produktion

von reaktiven Sauerstoffradikalen mit einem Anstieg von mtDNA Rearrangements verbunden [34 S. 740; 125 S. 671]. Die Exposition der mutanten Erbanlagen mit Dihyroliposäure, einem Sauerstoffradikalfänger, vermindert ebenfalls signifikant die *petite* Mutabilität in beiden Fällen [7 S. 2849]. Ein Anstieg des mitochondrial dNTP Pools und/oder eine Abnahme der reaktiven Sauerstoffradikale können die Schädigung der mtDNA durch *POLG1*-Mutationen in Hefezellen und möglicherweise in humanen Zellen verhindern.

6.6 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, dass Mutationen im *DGUOK*- und *POLG1*-Gen eine häufige Ursache der hepatozerebralen Form des MDS darstellen, in einer Vielzahl der Fälle mit einer mtDNA Depletion in den betroffenen Geweben einhergehen und bei Hepatoenzephalopathien mit vermuteter mitochondrialer Genese berücksichtigt werden sollten.

Die klinische Präsentation von *DGUOK*-Mutationen scheint auf ein infantiles Leberversagen beschränkt zu bleiben. Während *POLG1*-Mutationen im Kindesalter neben einem typischen Alpers Syndrom auch ein juveniles Alpers Syndrom [51 S. 1674] verursachen, werden sie im Erwachsenenalter mit einem großen Spektrum an klinischen Präsentationen in Verbindung gebracht: dominante und rezessive PEO [115 S. 211], Ataxie [47 S. 430], SANDO Syndrom [117 S. 133], Parkinsonismus [71 S. 875] oder männliche Infertilität [96 S. 261]. Bei wenigen Patienten mit *DGUOK*-Defekt oder Alpers Syndrom wurde eine mildere Verlaufsform mit einer langsam progredienten neurologischen und hepatischen Symptomatik beobachtet. Diese Kinder haben vermutlich eine längere Lebenserwartung. Die Schwere der Symptomatik scheint, mit der Art und Lage der Mutationen im Gen und dem Ausmaß der Depletion an mtDNA zu korrelieren.

Die Identifizierung der Individuen mit möglichen *POLG1*-Mutationen kann aufgrund der klinischen Heterogenität von *POLG1*-Defekten schwierig sein. Die Mehrheit der *POLG1*-Patienten dieser Studie hat keine relevante Familienanamnese, während über die Hälfte der *DGUOK*-Kinder ähnlich betroffene Geschwisterkinder haben. Dies verdeutlicht, dass *POLG1*-Mutationen in einem breiten Spektrum von sporadischen neuromuskulären und hepatozerebralen Erkrankungen in Betracht gezogen werden müssen. Während Mutationen im *DGUOK*-Gen nur in einer begrenzten Entität mit überwiegender Lebersymptomatik in Frage kommen.

7 Zusammenfassung

Hepatozerebrale Syndrome können sowohl angeboren als auch erworben (toxisch, infektiös) auftreten. Verursacht durch eine mitochondriale Dysfunktion treten sie oft im Rahmen mitochondrialer DNA Depletionssyndrome auf. Mutationen im *Deoxyguanosinkinase- (DGUOK-)* Gen, *Polymerase gamma-A (POLG1-)* Gen wie auch im *MPV17-Gen* wurden in Zusammenhang mit der hepatozerebralen Form des mitochondrialen DNA Depletionssyndroms beschrieben. Das phänotypische Spektrum reicht von neonatal beginnender, schwerer Leberinsuffizienz mit variabler neurologischer und muskulärer Beteiligung bis hin zum Alpers Syndrom mit therapieresistenter Epilepsie und Leberinsuffizienz.

In unserer Studie untersuchten wir 44 Kinder deutscher, österreichischer und türkischer Abstammung mit neurologischen Symptomen und Leberinsuffizienz, bei denen andere Ursachen eines hepatozerebralen Syndroms ausgeschlossen wurden, hinsichtlich der Inzidenz eines mitochondrialen DNA Depletionssyndroms und Mutationen im *DGUOK-* bzw. *POLG1-Gen*.

Wir konnten in 25 Gewebeproben (25/28) eine verminderte Aktivität der Atmungskettenenzyme nachweisen. Darunter fanden wir in 22 Fällen (22/25) einen kombinierten Atmungskettendefekt, am häufigsten einen kombinierten Komplex I+IV und II-IV Mangel. Eine ausgeprägte Depletion der mitochondrialen DNA Moleküle zeigte sich in fünfzehn Fällen (15/30) sowohl im Muskelgewebe, Lebergewebe als auch in Fibroblasten.

Dreizehn Kinder mit Alpers Syndrom (13/44) haben Mutationen im *POLG1-Gen*, vielfach einen compound heterozygoten Status mit einer Mutation in der Polymerase-Domäne und einer weiteren in der Linker-Region, häufig p.A467T. Die Kinder fielen durch Entwicklungsverzögerung, therapieresistenten Anfallsleiden und erhöhte Transaminasen auf. In vier Fällen wurde die Leberfunktionsstörung durch die Hepatotoxizität der antikonvulsiven Therapie mit Valproinsäure getriggert. Eine mtDNA Depletion trat in 83% der untersuchten Gewebeproben infolge Mutationen im *POLG1-Gen* auf.

In weiteren acht Kindern (8/44) sequenzierten wir pathogene Mutationen im *DGUOK-Gen*. Drei Mutationen betreffen allein das Start-Methionin des Proteins. Die Mehrzahl dieser Kinder erkrankte bereits in der Neonatalzeit mit Hypoglykämie, Laktatazidose, prolongiertem Ikterus und Anstieg der Transaminasen. Eine Patientin mit milder Form des hepatozerebralen mitochondrialen DNA Depletionssyndroms wurde erfolgreich lebertransplantiert. In der histopathologischen Untersuchung fiel ein hepatozelluläres

Karzinom auf. Mutationen im *DGUOK*-Gen gingen in unserem Kollektiv ausnahmslos mit einer Depletion der mitochondrialen DNA einher.

Anhand unserer Studie stellen wir fest, dass das mitochondriale DNA Depletionssyndrom, das durch Mutationen im *DGUOK*- und *POLG1*-Gen hervorgerufen wird, eine häufige Ursache mitochondrialer hepatozerebraler Syndrome im Kindesalter darstellt.

8 Literaturverzeichnis

1. AGOSTINO A, VALETTA L, CHINNERY PF, FERRARI G, CARRARA F, TAYLOR RW, SCHAEFER AM, TURNBULL DM, TIRANTI V, ZEVIANI M. Mutations of *SLC25A4*, *Twinkle*, and *POLG1* in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* 2003;60:1354-1356.
2. ALPERS BJ. Diffuse progressive degeneration of gray matter of cerebrum. *Arch Neurol Psychiat* 1931;25:469-505.
3. ANDERSON S, BANKIER AT, BARREL BG, ET AL. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
4. ANDREU A L, CHECCARELLI N, IWATA S, SHANSKE S, DIMAURO S. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediat. Res.* 2000;48:311-314.
5. ARNÉR ESJ, SPASOKOUKOTSKAJA T, ERIKSSON S. Selective assays for thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase and their activities in extracts from human cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:712-718.
6. ARNÉR ESJ, ERIKSSON S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* 1995;67:155-186.
7. BARUFFINI E, LODI T, DALLABONA C, PUGLISI A, ZEVIANI M, FERRERO I. Genetic and chemical rescue of the *Saccharomyces cerevisiae* phenotype induced by mitochondrial DNA polymerase mutations associated with progressive external ophthalmoplegia in humans. *Hum Mol Genet* 2006;15:2846-2855.
8. BÉNIT P, CHRETIEN D, KADHOM N, DE LONLAY-DEBENEY P, CORMIER-DAIRE V, CABRAL A, PEUDENIER S, RUSTIN P, MUNNICH A, RÖTIG A. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear *NDUFV1* and *NDUFS1* genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet.* 2001; 68:1344-1352.
9. BOLDEN A, NOY GP, WEISSBACH A. DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. *J Biol Chem* 1977;252:3351-3356.
10. BOURDON A, MINAI L, SERRE V, JAIS JP, SARZI E, AUBERT S, CHRÉTIEN D, DE LONLAY P, PAQUIS-FLUCKLINGER V, ARAKAWA H, NAKAMURA Y, MUNNICH A, RÖTIG A. Mutation of *RRM2B*, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 2007;39:776-780.
11. BUDE SMS, VAN DEN HEUVEL LPWJ, JANSSEN AJ, SMEETS RJP, BUSKENS CAF, DEMEIRLEIR L, VAN COSTER R, BAETHMANN M, VOIT T, TRIJBELS JMF,

- SMEITINK JAM. Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:63-68.
12. BRYANT AE 3RD, DREIFUSS FE. Valproic acid hepatic fatalities. III. U.S. experience since 1986. *Neurology*. 1996;46(2):465-469.
 13. BULL PC, THOMAS GR, ROMMENS JM, FORBES JR, COX DW. THE WILSON DISEASE GENE IS A PUTATIVE COPPER TRANSPORTING P-TYPE ATPASE SIMILAR TO THE MENKES GENE. *NAT GENET* 1993;5:327-337. ERRATUM IN: *NAT GENET* 1994;6:214.
 14. CHABROL B, MANCINI J, CHRETIEN D, RUSTIN P, MUNNICH A, PINSARD N. Valproate induced hepatic failure in a case of cytochrome c oxidase deficiency. *Eur J Pediatr* 1994;153:133-135.
 15. CHAN SS, LONGLEY MJ, COPELAND WC. The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory submit. *J Biol Chem* 2005;280:31341–31346.
 16. CHI NW AND KOLODNER RD. Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. *J Biol Chem* 1994;269:29984-29992.
 17. CHINNERY PF, TURNBULL DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001;106:94-101.
 18. CHINNERY PF, DIMAURO S. Mitochondrial hepatopathies. *J Hepatology* 2005;43:207-209.
 19. CLAYTON CE, LOVETT M, RIGBY PW. Functional analysis of a simian virus 40 super T-antigen. *J Virol* 1982;44:974-982.
 20. COENEN MJH, ANTONICKA H, UGALDE C, ET AL. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *New Engl J Med* 2004;351:2080-2086.
 21. COPELAND WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med* 2008;59:131-146.
 22. CORMIER-DAIRE V, CHRETIEN D, RUSTIN P, ET AL. Neonatal and delayed-onset liver involvement in disorders of oxidative phosphorylation. *J Pediatr* 1997;130:817-822.
 23. COULTER DL. Carnitine, valproate and toxicity. *J Child Neurol* 1991;6:7-14.
 24. DARIN N, OLDFORS A, MOSSEMI AR ET AL. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001;49:377-383.

25. DAVIDZON G, MANCUSO M, FERRARIS S, ET AL. POLG mutations and Alpers syndrome. *Ann Neurol* 2005;57:921-924.
26. DE LONLAY P, VALNOT I, BARRIENTOS A, ET AL. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 2001;29:57-60
27. DE MEILEIR L, SENECA S, DAMIS E, ET AL. Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in BCS1L gene. *Am J Med Genet* 2003;121A:126-131.
28. DE MEIRLEIR L, SENECA S, LISSENS W, DE CLERCQ I, EYSKENS F, GERLO E, SMET J, VAN COSTER R. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J. Med. Genet.* 2004;41:120-124.
29. DE VRIES MC, RODENBURG RJ, MORAVA E, VAN KAAUWEN EPM, TER LAAK H, MULLAART RA, SNOECK IN, VAN HASSELT PM, HARDING P, VAN DEN HEUVEL LPW, SMEITINK JAM. Multiple oxidative phosphorylation deficiencies in severe childhood multi-system disorders due to polymerase gamma (POLG1) mutations. *Eur J Pediatr* 2007;166:229-234.
30. DIMAURO S, SCHON EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New Engl J Med* 2003;348:2656–2668.
31. DIMAURO S, HIRANO M. Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromusc Disord* 2005;15:276-286.
32. DOLCE V, FIERMONTE G, RUNSWICK MJ, PALMIERI F, WALKER JE. THE HUMAN MITOCHONDRIAL DEOXYNUCLEOTIDE CARRIER AND ITS ROLE IN THE TOXICITY OF NUCLEOSIDE ANTIVIRALS. *PROC NATL ACAD SCI USA* 2001;98:2284-2288.
33. DRISCOLL SG, HAYES AM, LEVY HL. Neonatal hemochromatosis: evidence for autosomal recessive transmission. (Abstract) *Am J Hum Genet* 1988;43:A232 only.
34. ELLEDGE SJ AND DAVIS RW. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* 1990;4:740-751.
35. ELPELEG O, MANDEL H, SAADA A. Depletion of the other genome-mitochondrial DNA depletion syndromes in humans. *J Mol Med* 2002;80:389-396
36. ELPELEG O, MILLER C, HERSHKOVITZ E, ET AL. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 2005;76:1081-1086.
37. ERNSTER L, IKKOS D, LUFT R. Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 1959;184:1851-1854.

38. FELLMAN V, RAPOLA J, PIHKO H, VARILO T, RAIVIO KO. Iron-overload disease in infants involving fetal growth retardation, lactic acidosis, liver haemosiderosis, and aminoaciduria. *Lancet* 1998;351:490-493.
39. FERRARI G, LAMANTEA E, FONATI A, ET AL. Infantile hepatocerebrale syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA. *Brain* 2005;128:723-731.
40. FILOSTO M, MANCUSO M, NISHIGAKI Y, PANCRUDO J, HARATI Y, GOOCH C, MANKODI A, BAYNE L, BONILLA E, SHANSKE S, HIRANO M, DIMAURO S. Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase-gamma. *Arch Neurol* 2003;60:1279-1284.
41. FILOSTO M, MANCUSO M, TOMELLERI G, RIZZUTO N, BERNARDINA BD, DIMAURO S, SIMONATI A. Hepato-cerebral syndrome: genetic and pathological studies in an infant with a dGK mutation. *Acta Neuropathol* 2004;108:168-171.
42. FISCHER JC, RUITENBEEK W, GABREELS FJ, JANSSEN AJ, RENIER WO, SENGERS RC, STADHOUDERS AM, TER LAAK HJ, TRIJBELS JM, YEERKAMP JH. A mitochondrial encephalomyopathy: the first case with an established defect at the level of coenzyme Q. *Eur J Pediatr* 1986;144:441-444.
43. FREISINGER P, FÜTTERER N, LANKES E, GEMPEL K, BERGER TM, SPALINGER J, HOERBE A, SCHWANTES C, LINDNER M, SANTER R, BURDELSKI M, SCHAEFER HJ, SETZER B, WALKER UA, HORVATH R. Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome caused by deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations. *Arch Neurol* 2006;63:1129-1134.
44. GALIMBERTI CA, DIEGOLI M, SARTORI I, UGGETTI C, BREGA A, TARTARA A, ARBUSTINI E. Brain pseudoatrophy and mental regression on valproate and a mitochondrial DNA mutation. *Neurology* 2006;67:1715-1717.
45. GELLERICH FN, DESCHAUER M, CHEN Y, MULLER T, NEUDECKER S, ZIERZ S. Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochim Biophys Acta* 2002;1556:41-52.
46. HAAS R, STUMPF DA, PARKS JK, EGUREN L. Inhibitory effects of sodium valproate on oxidative phosphorylation. *Neurology* 1981;31:1473-1476.
47. HAKONEN AH, HEISKANEN S, JUVONEN V, LAPPALAINEN I, LUOMA PT, RANTAMAKI M, ET AL. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet* 2005;77:430-441.
48. HAUT S, BRIVET M, TOUATI G, RUSTIN P, LEBON S, GARCIA-CAZORLA A, SAUDUBRAY JM, BOUTRON A, LEGRAND A, SLAMA A. A deletion in the human

- QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet* 2003;113:118-122.
49. HISAMA FM, MANCUSO M, FILOSTO M, DIMAURO S. Progressive external ophthalmoplegia: a new family with tremor and peripheral neuropathy. *Am J Med Genet A* 2005;135:217-219.
50. HORVATH R. Biochemische Diagnostik bei mitochondrialen Enzephalomyopathien. Beitrag der Biochemischen Diagnostik bei mitochondrialen Enzephalomyopathien, *Aktuelle Neuropädiatrie* 2005, Novartis-Pharma Verlag.
51. HORVATH R, HUDSON G, FERRARI G, FÜTTERER N, AHOLA S, LAMANTEA E, PROKISCH H, LOCHMÜLLER H, MCFARLAND R, RAMESH V, KLOPSTOCK T, FREISINGER P, SALVI S, MAYR JA, SANTER R, TESAROVA M, ZEMAN J, UDD B, TAYLOR RW, TURNBULL D, HANNA M, FIALHO D, SUOMALAINEN A, ZEVIANI M, CHINNERY PF. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006;129(Pt 7):1674-1684.
52. HOLT IJ, HARDING AE, MORGAN-HUGHES JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988;331:717-719.
53. HOLVE S, HU D, SHUB M, TYSON RW, SOKOL RJ. Liver disease in Navajo neuropathy. *J Pediatr* 1999;135:482-493.
54. HUDSON G, AMATI-BONNEAU P, BLAKELY EL, STEWART JD, HE L, SCHAEFER AM, GRIFFITHS PG, AHLQVIST K, SUOMALAINEN A, REYNIER P, MCFARLAND R, TURNBULL DM, CHINNERY PF, TAYLOR RW. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 2008;131:329-337.
55. HUTTENLOCHER PR, SOLITARE GB, ADAMS G. Infantile diffuse cerebral degeneration with hepatic cirrhosis. *Arch Neurol* 1976;33:186-192.
56. JOHANSSON M, BAJALICA-LAGERCRANTZ J, KARLSSON A. Localization of the human deoxyguanosine kinase gene (*DGUOK*) to chromosome 2p13. *Genomics* 1996a;38:450-451.
57. JOHANSSON M, KARLSSON A. Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996b;93:7258-7262.
58. KARADIMAS CL, VU TH, HOLVE SA, CHRONOPOULOU P, QUINZII C, JOHNSEN SD, KURTH J, EGGERS E, PALENZUELA L, TANJI K, BONILLA E, DE VIVO DC, DIMAURO S, HIRANO M. Navajo Neurohepatopathy Is Caused by a Mutation in the *MPV17* Gene. *Am J Hum Genet* 2006;79:544-548.

59. KAUKONEN J, JUSELIOUS JK, TIRANTI V, KYTTALA A, ZEVIANI M, COMI GP, KERÄNEN S, PELTONEN L, SUOMALAINEN A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 2000;289:782-785.
60. KELLY AL, LUNT PW, RODRIGUES F, BERRY PJ, FLYNN DM, MCKIERNAN PJ, KELLY DA, MIELI-VERGANI G, COX TM. Classification and genetic features of neonatal haemochromatosis: a study of 27 affected pedigrees and molecular analysis of genes implicated in iron metabolism. *J Med Genet* 2001;38:599-610.
61. KNISELY AS, MAGID MS, DISCHE MR, CUTZ E. Neonatal hemochromatosis. *Birth Defects Orig Art Ser* 1987;XXIII:75-102.
62. König SA, Siemes H, Bläker F, Boenigk E, Gross-Selbeck G, Hanefeld F, Haas N, Köhler B, Koelfen W, Korinthenberg R, Kurek E, Lenard HG, Penin H, Penzien JM, Schünke W, Schultze C, Stephani U, Stute M, Traus M, Weinmann HM, Scheffner D. Severe hepatotoxicity during valproate therapy: an update and report of eight new fatalities. *Epilepsia* 1994;35:1005-1015.
63. KOENIG SA, BUESING D, LONGIN E, OEHRING R, HÄUSSERMANN P, KLUGER G, LINDMAYER F, HANUSCH R, DEGEN I, KUHN H, SAMII K, JUNGCK A, BRÜCKNER R, SEITZ R, BOXTERMANN W, WEBER Y, KNAPP R, RICHARD HH, WEIDNER B, KASPER JM, HAENSCH CA, FITZEK S, HARTMANN M, BORUSIAK P, MÜLLER-DEILE A, DEGENHARDT V, KORENKE GC, HOPPEN T, SPECHT U, GERSTNER T. Valproic acid-induced hepatopathy: nine new fatalities in Germany from 1994 to 2003. *Epilepsia* 2006;47:2027-2031.
64. LABARTHE T, DOBBELAERE D, DEVISME L, DE MURET A, JARDEL C, TAANMAN J-W, ET AL. Clinical, biochemical and morphological features of hepatocerebral syndrome with mitochondrial DNA depletion due to deoxyguanosine kinase deficiency. *J Hepatol* 2005;43:333-341.
65. LAMANTEA E, TIRANTI V, BORDONI A, TOSCANO A, BONO F, SERVIDEI S, PAPADIMITRIOU A, SPELBRINK H, SILVESTRI L, CASARI G, COMI GP, ZEVIANI M. Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* 2002;52:211-219.
66. LESHINSKY-SILVER E, LEVINE A, NISSENKORN A, BARASH V, PERACH M, BUZHAKER E, SHAHMUROV M, POLAK-CHARCON S, LEV D, LERMAN-SAGIE T. Neonatal liver failure and Leigh syndrome possibly due to CoQ-responsive OXPHOS deficiency. *Mol Genet Metab* 2003;79:288-293.
67. LÖFFLER G. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung. In: „Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie“, Löffler G, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-

- New York-Barcelona-Hongkong-London-Mailand-Paris-Singapur-Tokio, 2001, 4. Auflage, S. 25-234.
68. LONGLEY MJ, NGUYEN D, KUNKEL TA, COPELANS WC. The fidelity of human polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. *J Biol Chem* 2001;276:38555-38562.
69. LONGLEY MJ, CLARK S, MAN CYW, HUDSON G, DURHAM SE, TAYLOR RW, NIGHTINGALE S, TURNBULL DM, COPELAND WC, CHINNERY PF. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 2006;78:1026-1034.
70. LÖßNER J, BACHMANN H, SIEGEMUND R, KÜHN HJ, GÜNTHER K. Wilsonsche Erkrankung in der DDR: Rückblick und Ausblick - eine Bilanz. *Psychiatr Neurol Med Psychol* 1990;42:585-600.
71. LUOMA P, MELBERG A, RINNE JO, KAUKONEN JA, NUPPONEN NN, CHALMERS RM, ET AL. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004;364:875-882.
72. LUOMA PT, LUO N, LÖSCHER WN, FARR CL, HORVATH R, WANSCHITZ J, KIECHL S, KAGUNI LS, SUOMALAINEN A. Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia-myopathy syndrome. *Human Molecular Genetics* 2005;14:1907-1920.
73. MAIER-DOBERSBERGER T. Morbus Wilson. Diagnosestellung mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden. *Dtsch Med Wschr* 1999;124:493-496.
74. MANCUSO M, FILOSTO M, BELLAN M, LIGUORI R, MONTAGNA P, BARUZZI A, DIMAURO S, CARELLI V. POLG mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness. *Neurology* 2004a;62:316-318.
75. MANCUSO M, FILOSTO M, OH SJ, DIMAURO S. A novel polymerase-gamma mutation in a family with ophthalmoplegia, neuropathy, and parkinsonism. *Arch Neurol* 2004b;61:1777-1779.
76. MANCUSO M, FERRARI S, PANCRUDO J, ET AL. New *DGK* gene mutations in the hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome. *Arch Neurol* 2005;62:745-747.
77. MANDEL H, SZARGEL R, LABAY V, ELPELEG O, SAADA A, SHALATA A, ANBINDER Y, BERKOWITZ D, HARTMAN C, BARAK M, ERIKSSON S, COHEN N. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted

- hepatocerebral mitochondrial DNA. [letter] [published correction appears in *Nat Genet*. 2001;29:491] *Nat Genet* 2001;29:337-341.
78. McDONALD DG, McMENAMIN JB, FARRELL MA, DROOGAN O, GREEN AJ. Familial childhood onset neuropathy and cirrhosis with the 4977bp mitochondrial DNA deletion. *Am J Med Genet* 2002;111:191-194.
79. MERANTE F, PETROVA-BENEDICT R, MACKAY N, MITCHELL G, LAMBERT M, MORIN C, DE BRAEKELEER M, LAFRAMBOISE R, GAGNE R, ROBINSON BH. A biochemically distinct form of cytochrome oxidase (COX) deficiency in the Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet* 1993;53:481-487.
80. MILLER C, SAADA A, SHAUL N, ET AL. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* 2004;56:724-728.
81. MONTANER JS, COTE HC, HARRIS M, ET AL. Mitochondrial toxicity in the era of HAART: evaluating venous lactate and peripheral blood mitochondrial DNA in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34:S85-S90.
82. MOOTHA VK, LEPAGE P, MILLER K, BUNKENBORG J, REICH M, HJERRILD M, DELMONTE T, VILLENEUVE A, SLADEK R, XU F, MITCHELL GA, MORIN C, MANN M, HUDSON TJ, ROBINSON B, RIOUX JD, LANDER ES. Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Nat Acad Sci* 2003;100:605-610.
83. MORAES CT, SHANSKE S, TRITSCHLER HJ, APRILLE JR, ANDRETTA F, BONILLA E, SCHON EA, DIMAURO S. MtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 1991;48:492-501.
84. MÜLLER-HÖCKER J, MUNTAU A, SCHÄFER S, JAKSCH M, STAUDT F, PONGRATZ D, TAANMAN JW. Depletion of mitochondrial DNA in the liver of an infant with neonatal giant cell hepatitis. *Hum Pathol* 2002;33:247-253.
85. MURRAY KF, KOWDLEY KV. Neonatal hemochromatosis. *Pediatrics* 2001;108:960-964.
86. NASS S, NASS M. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol* 1963;19:593-629.
87. NAVIAUX RK, NYHAN WL, BARSHOP BA, POULTON J, MARKUSIC D, KARPINSKI NC, HAAS RH. Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann Neurol* 1999;45:54-58.

88. NAVIAUX RK, NGUYEN KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004;55:706-712.
89. NGUYEN KV, ØSTERGAARD E, HOLST RAVN S, BALSLEV T, RUBÆK DANIELSEN E, VARDAG A, MCKIERNAN PJ, GRAY G, NAVIAUX RK. POLG mutations in Alpers syndrome. *Neurology* 2005;65:1493-1495.
90. NISHINO I, SPINAZZOLA A, HIRANO M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283:689-92.
91. NISHINO I, SPINAZZOLA A, PAPADIMITRIOU A, ET AL. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann Neurol* 2000;47:792-800.
92. ØSTERGAARD E, CHRISTENSEN E, KRISTENSEN E, MOGENSEN B, DUNO M, SHOUBRIDGE EA, WIBRAND F. Deficiency of the α subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 2007;81:383-387.
93. PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH. Walter de Gruyter Verlag, 259. Auflage, Berlin 2002, S. 341.
94. RABINOWITZ SS, GELFOND D, CHEN CK, GLOSTER ES, WHITINGTON PF, SACCONI S, SALVIATI L, DIMAURO S. Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome: clinical and morphologic features of a nuclear gene mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:216-220.
95. REICHENBACH J, SCHUBERT R, HORVATH R, FÜTTERER N, MALLE E, STUMPF A, GEBHARDT B, KOEHL U, SCHRAVEN B, ZIELEN S. Fatal neonatal-onset mitochondrial respiratory chain disease with T cell immunodeficiency. *Pediatr Res* 2006;60:321-326.
96. ROVIO AT, MARCHINGTON DR, DONAT S, SCHUPPE HC, ABEL J, FRITSCH E, ET AL. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet* 2001;29:261-262.
97. SAADA A, SHAAG A, MANDEL H, ET AL. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 2001;29:342-344.
98. SALVIATI L, SACCONI S, MANCUSO M, OTAEGUI D, CAMANO P, MARINA A, RABINOWITZ S, SHIFFMAN R, THOMPSON K, WILSON CM, FEIGENBAUM A, NAINI AB, HIRANO M, BONILLA E, DIMAURO S, VU TH. Mitochondrial DNA depletion and dGK gene mutations. *Ann Neurol* 2002;52:311-317.
99. SARZI E, BOURDON A, CHRETIEN D, ZARHRATE M, CORCOS J, SLAMA A, CORMIER-DAIRE V, DE LONLAY P, MUNNICH A, RÖTIG A. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007;150:531-534.

100. SCHNEBLE H. (Redaktion). Standardtherapien der Epilepsien im Kindes- und Jugendalter- Früherkennung von Komplikationen einer Valproattherapie. *Epilepsie-Blätter* 1995;8:100-102.
101. SETZER B, SCHLESIER M, WALKER UA. Effects of didanosine-related depletion of mtDNA in human T lymphocytes. *J Infect Dis* 2005;191:848-855.
102. SKLADAL D, HALLIDAY J, THORNBURN DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003;126:1905-1912.
103. SLAMA A, GIURGEA I, DEBREY D, ET AL. Deoxyguanosine kinase mutations and combined deficiencies of the mitochondrial respiratory chain in patients with hepatic involvement. *Mol Genet Metab* 2005;86:462-465.
104. SPELBRINK JN, TOIVONEN JM, HAKKAART GA, KURKELA JM, COOPER HM, LEHTINEN SK, LECRENIER N, BACK JW, SPEIJER D, FOURY F, JACOBS HT. In vivo functional analysis of the human mitochondrial DNA polymerase POLG expressed in cultured human cells. *J Biol Chem* 2000;275:24818-24828.
105. SPELBRINK JN, LI FY, TIRANTI V, NIKALI K, YUAN QP, WANROOIJ S, GARRIDO N, COMI G, MORANDI L, SANTORO L, TOSCANO A, FABRIZI GM, SOMER H, CROXEN R, BEESON D, POULTON J, SUOMALAINEN A, JACOBS HT, ZEVIANI M, LARSSON C. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localised in mitochondria. *Nat Genet* 2001;28:223-231.
106. SPINAZZOLA A, ZEVIANI M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* 2005;354:162-168.
107. SPINAZZOLA A, VISCOMI C, FERNANDEZ-VIZARRA E, CARRARA F, D'ADAMO P, CALVO S, MARSANO RM, DONNINI C, WEIHER H, STRISCIUGLIO P, PARINI R, SARZI E, CHAN A, DIMAURO S, RÖTIG A, GASPARINI P, FERRERO I, MOOHA VK, TRIANTI V, ZEVIANI M. *MPV17* encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 2006;38:570-575.
108. TAANMAN JW, KATEEB I, MUNTAU AC, JAKSCH M, COHEN N, MANDEL H. A novel mutation in the deoxyguanosine kinase gene causing depletion of mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 2002;52:237-239
109. TAANMAN J-W, MUDDLE JR, MUNTAU AC. Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* 2003;12:1839-1845.

110. TADIBOYINA VT, RUPAR A, ATKISON P, ET AL. Novel mutation in *DGUOK* in hepatocerebral mitochondrial depletion syndrome associated with cystathioninuria. *Am J Med Genet A* 2005;135:289-291.
111. TANZI RE, PETRUKHIN K, CHERNOV I, PELLEQUER JL, WASCO W, ROSS B, ROMANO DM, PARANO E, PAVONE L, BRZUSTOWICZ LM, DEVOTO M, PEPPERCORN J, BUSH AI, STERNLIEB M, PIRASTU M, GUSELLA JF, EVGRAFOV O, PENCHASZADEH GK, HONIG B, EDELMAN IS, SOARES MB, SCHEINBERG IH, GILLIAM TC. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genetics* 1993;5:343-350.
112. UUSIMAA J, FINNILA S, VAINIONPAA L, ET AL. A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease. *Pediatrics* 2003;111:e262-e268.
113. VALLANCE HD, JEVEN G, WALLACE DC, BROWN MD. A case of sporadic infantile histiocytoid cardiomyopathy caused by the A8344G (MERRF) mitochondrial DNA mutation. *Pediatr Cardiol* 2004;25:538-540.
114. VALNOT I, OSMOND S, GIGAREL N, ET AL. Mutations of the *SCO1* gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2000;67:1104-1109.
115. VAN GOETHEM G, DERMAUT B, LOFGREN A, MARTIN JJ, VAN BROECKHOVEN C. Mutation of *POLG* is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001;28:211-212.
116. VAN GOETHEM G, MERCELIS R, LOFGREN A, SENECA S, CEUTERICK C, MARTIN JJ, VAN BROECKHOVEN C. Patient homozygous for a recessive *POLG* mutation presents with features of MERRF. *Neurology* 2003;61:1811-1813.
117. VAN GOETHEM G, MARTIN JJ, DERMAUT B, LOFGREN A, WIBAIL A, VERVERKEN D, ET AL. Recessive *POLG* mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2003b;13:133-142.
118. VAN GOETHEM G, SCHWARTZ M, LOFGREN A, BERMAUT B, VAN BROECKHOVEN C, VISSING J. Novel *POLG* mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Eur J Hum Genet* 2003c;11:547-549.
119. VAN GOETHEM G, LUOMA P, RANTAMAKI M, AL MEMAR A, KAAKKOLA S, HACKMAN P, KRAHE R, LOFGREN A, MARTIN JJ, DE JONGHE P, SUOMALAINEN A, UDD B, VAN BROECKHOVEN C. *POLG* mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology* 2004;63:1251-1257.

120. VISAPAA I, FELLMAN V, VESA J, ET AL. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 2002;71:863-76.
121. WALLACE DC, SINGH G, LOTT MT, ET AL. MtDNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242:1427-1430.
122. WANG PJ, CHABES A, CASAGRANDE R, TIAN XC, THELANDER L, HUFFAKER TC. Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol Cell Biol* 1997;17:6114-6121.
123. WANG L, ERIKSSON S. Mitochondrial deoxyguanosine kinase mutations and mitochondrial DNA depletion syndrome. *FEBS Letters* 2003;554:319-322.
124. WANG L, LIMONGELLI A, VILA MR, ET AL. Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes. *Mol Genet Metab* 2005;84:75-82.
125. WEI YH AND LEE HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* 2002;227:671-682.
126. WINTERHUN S, FERRARI G, HE L, TAYLOR RW, ZEVIANI M, TURNBULL DM, ENGELSEN BA, MOEN G, BINDOFF LA. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase-gamma mutations. *Neurology* 2005;64:1204-1208.
127. Zschocke J, Hoffmann GF. Störungen der Fettsäureoxidation und Ketogenese. In: *Vademecum Metabolicum. Diagnose und Therapie erblicher Stoffwechselkrankheiten*. Milupa GmbH, Schattauer Verlag, 2004, 3. Auflage, S. 94-97.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Mitochondrialer Energiestoffwechsel	12
Abbildung 2	Mitochondriale DNA (mtDNA) und Atmungskette.....	14
Abbildung 3	Pathogene Mutationen im menschlichen mitochondrialen Genom.....	16
Abbildung 4	Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf hepatozerebrales Syndrom mitochondrialer Genese	41
Abbildung 5	Primer Depletionstest	42
Abbildung 6	Primer <i>DGUOK</i> -Gen.....	43
Abbildung 7	Primer <i>POLG1</i> -Gen.....	44
Abbildung 8	Gelelektrophorese <i>POLG1</i> und <i>DGUOK</i> nach PCR.....	46
Abbildung 9	Gelelektrophorese <i>POLG1</i> nach Reinigung.....	47
Abbildung 10	cDNA-Primer <i>POLG1</i> - und <i>DGUOK</i> -Gen.....	49
Abbildung 11	p.A467T-Verdau	50
Abbildung 12	p.A467T-Verdau	51
Abbildung 13	p.S52F-Verdau	52
Abbildung 14	Box-Diagramm für Manifestationsalter	61
Abbildung 15	Atmungskettendefekte unseres Kollektivs.....	63
Abbildung 16	Ergebnisse des mtDNA Depletionstestes	64
Abbildung 17	Heterozygote Mutation p.S52F von Patient 3.....	66
Abbildung 18	Heterozygote 4 bp Deletion 681-684 GTTTdel von Patient 3	66
Abbildung 19	Konservation der Missense-Mutationen p.S52F and p.Q170R.....	67
Abbildung 20	<i>POLG1</i> -Substitutionen.....	69
Abbildung 21	Heterozygote Mutation p.A467T von Patient 9.....	70
Abbildung 22	Heterozygote Mutation p.T914P von Patient 9.....	70
Abbildung 23	Heterozygote Mutation p.K1191N von Patient 12.....	71
Abbildung 24	Pathogene Aminosäure-Substitutionen und Polymorphismen im <i>POLG1</i> -Gen.....	81
Abbildung 25	Patientin mit <i>DGUOK</i> -Defekt nach Lebertransplantation.....	90

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mitochondriale Hepatoenzephalopathien	10
Tabelle 2	Genetische Klassifikation mitochondrialer Krankheiten	18
Tabelle 3	Biochemische Diagnostik bei mitochondrialen Enzephalomyopathien....	19
Tabelle 4	Fettsäureoxidationsstörungen	33
Tabelle 5	Patienten mit hepatozerebralem Syndrom	56
Tabelle 6	Patienten mit <i>DGUOK</i> -Mutationen	58
Tabelle 7	Patienten mit <i>POLG1</i> -Mutationen.....	60
Tabelle 8	<i>DGUOK</i> -Substitutionen.....	65
Tabelle 9	<i>POLG1</i> -Substitutionen	68
Tabelle 10	Bisher beschriebene Mutationen im <i>DGUOK</i> -Gen.....	82
Tabelle 11	Lage der <i>POLG1</i> -Mutation im Gen und Phänotyp	89

9.3 Liste der Internetseiten

Name der Internetseite	Internetadresse
Human Polymerase Gamma Mutation Database	http://www.dir-pps.niehs.nih.gov/polg
Deutsche Gesellschaft für Neurologie	http://www.dgn.org/
Medizinisch Genetisches Zentrum München	http://www.mgz-muenchen.de/
Journal Nature Genetics	http://www.genetics.nature.com/
Basic Local Alignment Search Tool	http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

10 Publikationen

Originalarbeiten

HORVATH R, HUDSON G, FERRARI G, FÜTTERER N, AHOLA S, LAMANTEA E, PROKISCH H, LOCHMÜLLER H, MCFARLAND R, RAMESH V, KLOPSTOCK T, FREISINGER P, SALVI S, MAYR JA, SANTER R, TESAROVA M, ZEMAN J, UDD B, TAYLOR RW, TURNBULL D, HANNA M, FIALHO D, SUOMALAINEN A, ZEVIANI M, CHINNERY PF. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006;129(Pt 7):1674-1684.

FREISINGER P, FÜTTERER N, LANKES E, GEMPEL K, BERGER TM, SPALINGER J, HOERBE A, SCHWANTES C, LINDNER M, SANTER R, BURDELSKI M, SCHAEFER HJ, SETZER B, WALKER UA, HORVATH R. Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome caused by deoxyguanosine kinase (DGUOK) mutations. *Arch Neurol* 2006;63:1129-1134.

REICHENBACH J, SCHUBERT R, HORVATH R, FÜTTERER N, MALLE E, STUMPF A, GEBHARDT B, KOEHL U, SCHRAVEN B, ZIELEN S. Fatal neonatal-onset mitochondrial respiratory chain disease with T cell immunodeficiency. *Pediatr Res* 2006;60:321-326.

Abstracts

101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin
gemeinsam mit der 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie
57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Sozialpädiatrie und Jugendmedizin
29. Sept. bis 2. Okt. 2005 Messe- und Congress-Centrum Bremen

Das mitochondriale DNA Depletionssyndrom – Ursache einer Hepatopathie bei zwei Säuglingen.

E Lankes, R Horvath, S Schlicht, N Fütterer, I Henrichs, S Burdach, P Freisinger

20. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen.
15.-17.März 2006 Fulda

Mutationen des Polymerase γ Gens (POLG1) als Ursache des Alpers-Syndroms und juveniler Epilepsien ohne Lebersversagen.

R. Horváth, N. Fütterer, J. Mayr, W. Sperl, J. Koch, S. Waltz, P. Freisinger

38th European Human Genetics Conference (EHGC) in Amsterdam 6.-9.Mai 2006
Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion caused by deoxyguanosine kinase
(DGUOK) mutations.

Peter Freisinger MD, Nancy Fütterer, Erwin Lankes MD, Holger Prokisch PhD, Rita
Horváth, MD

10th World Congress on Child Neurology 11.06 2006 - 16.06.2006 Ort: Montreal,
Kanada

Genotype-phenotype correlations in children with mitochondrial DNA depletion caused
by mutations in DGUOK or POLG1

Rita Horvath, Nancy Fütterer, Johannes A. Mayr, Wolfgang Sperl, Peter Freisinger

The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIM)

Tokio -Chiba, Japan, September 12-16, 2006

Hepatocerebral mitochondrial DNA depletion caused by deoxyguanosine kinase
(DGUOK) mutations.

Freisinger P, Fütterer N, Lankes E, Prokisch H, Mayer H, Horváth R

The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIM)

Tokio- Chiba, Japan September 12-16, 2006

Genotype-phenotype correlations in children with mitochondrial DNA depletion caused
by mutations in DGUOK or POLG1

Freisinger P, Mayr JA, Fuetterer N, Sperl W, Horvath R

102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin.

14.-17. September 2006, Mainz

Mutationen in POLG1 und DGOUK als Ursache des mitochondrialen hepatozerebralen
Syndroms

Freisinger P, Mayr JA, Fuetterer N, Sperl W, Horvath R

11th International Congress of the World Muscle Society, Bruges-Belgium, 4.-

7.10.2006

Five children with early-onset mitochondrial encephalomyopathy and one heterozygous
pathogenic mutation in POLG1.

Beril Talim, Nancy Fütterer, Barbara Plecko, Rita Horvath

18. Kongress des Wissenschaftlichen Beirates der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. 28. Februar – 3. März 2007 Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität
Hepatocerebrale Syndrome im Kindesalter sind häufig von Mutationen im DGUOK- und POLG1-Gen verursacht.

Nancy Fütterer, Peter Freisinger, Johannes A. Mayr, Johannes Koch, Wolfgang Sperl, Rita Horvath

Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder und Jugendheilkunde 4.-6.Mai 2007 Würzburg.

Störungen der intergenomischen Kommunikation: Eine neue Gruppe von Mitochondriopathien.

Freisinger P, Fuetterer N , Horvath R , Prokisch H, Mayr JA, Koch J, Sperl W

11 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Peter Freisinger für das Überlassen dieser Arbeit und seine große Unterstützung, Motivation und Hilfsbereitschaft bei der Planung, Durchführung und dem Verfassen der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. Rita Horvath möchte ich sehr herzlich für die Betreuung des experimentellen Teils und ihre Unterstützung bei wissenschaftlichen und labortechnischen Fragestellungen danken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern im Labor, die für ein freundschaftliches Arbeitsverhältnis sorgten und den Laboralltag bereicherten, insbesondere Frau Ira Kaus, Frau Solvig Müller-Ziermann und Frau Kathleen Kirschbauer, die bei allen technischen Fragen im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen.