

Aus dem Institut für Tierpathologie  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. W. Schmahl)  
und dem Institut für Diabetesforschung, Forschergruppe Diabetes e.V.  
(Vorstand: PD Dr. M.F. Bauer)

Morphologische, biochemische und  
genetische Untersuchungen zur subakuten nekrotisierenden  
Enzephalopathie des Hundes  
(kanines Leigh-Syndrom)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Kerstin Baiker  
aus Regensburg

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Poulsen-Nautrup

Tag der Promotion:  
28.07.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.</b>	<b>Struktur und Funktion von Mitochondrien</b> .....	<b>6</b>
1.1.1.	Die mitochondriale Atmungskette.....	7
<b>1.2.</b>	<b>Besonderheiten der mitochondrialen Genetik</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b>Mitochondriale Dysfunktionen und menschliche Erkrankungen</b> .....	<b>13</b>
1.3.1	Das humane Leigh-Syndrom.....	17
<b>1.4</b>	<b>Bekannte mitochondriale Enzephalopathien beim Hund</b> .....	<b>18</b>
1.4.1	Hereditäre Polioenzephalomyelopathie des Australian Cattle Dog.....	19
1.4.2	Mitochondriale Enzephalopathie des English Springer Spaniels.....	20
1.4.3	MELAS-ähnliche, mitochondriale Enzephalopathie des Jack Russell Terriers.....	21
1.4.4	Spongiforme Leukenzephalomyelopathie bei Australian Cattle Dogs und Shetland Sheepdogs.....	23
1.4.5	Alaskan Husky Enzephalopathie (kanines Leigh-Syndrom).....	25
1.4.6	Zusammenfassung.....	26
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b> .....	<b>32</b>
3.1.1	Kontrollgruppe.....	33
<b>3.2</b>	<b>Gewebeentnahmen</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Patho-morphologische Untersuchungen</b> .....	<b>34</b>
3.3.1	Histologie.....	34
3.3.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	34
3.3.1.2	Luxol-Fast-Blue-Färbung.....	35
3.3.1.3	Silberimprägnation nach Bodian.....	35
3.3.1.4	Woelcke-Spielmeyer-Schröder-Färbung.....	36
3.3.2	Immunhistochemie.....	36
3.3.3	Elektronenmikroskopie.....	37
<b>3.4</b>	<b>Biochemische Analysen</b> .....	<b>38</b>

3.4.1	Aufschluß des Muskelgewebes.....	38
3.4.2	Messung des Non-Kollagen-Protein-Gehaltes.....	38
3.4.3	Messung der Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe.....	39
3.4.4	Messung der Zitratsynthese.....	41
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>42</b>
3.5.1	Isolation der DNA aus Paraffinschnitten.....	42
3.5.2	Isolation der DNA aus EDTA-Blut.....	42
3.5.3	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
3.5.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Aufreinigung von DNA.....	44
3.5.5	Photometrische Quantifizierung von DNA.....	45
3.5.6	Restriktionsverdau mit Apal.....	45
3.5.7	DNA-Sequenzierung.....	46
3.5.8	Southern Blot-Analyse.....	46
3.5.9	Haplotypenanalyse.....	48
<b>3.6</b>	<b>Chemikalien und Geräte.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Retrospektive Betrachtungen.....</b>	<b>51</b>
4.1.1	Klinische Symptomatik der subakuten nekrotischen Enzephalopathie beim Yorkshire Terrier.....	51
4.1.2	Bildgebende Diagnostik.....	54
<b>4.2</b>	<b>Patho-morphologische Befunde.....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Weiterführende morphologische Untersuchungen.....	59
<b>4.3</b>	<b>Biochemische Untersuchungen.....</b>	<b>60</b>
4.3.1	Enzymaktivitäten der mitochondrialen Atmungskette.....	60
<b>4.4</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen.....</b>	<b>63</b>
4.4.1	Analyse von Kandidatengenen des mitochondrialen Genoms.....	63
4.4.2	Sequenzierung mitochondrialer tRNA-Gene.....	64
4.4.3	Mutationsnachweis mittels RFLP.....	68
4.4.4	Ausschluss von mitochondrialen Deletionen und Mutationen in ATPase-Genen.....	69
4.4.5	Molekularbiologische Untersuchungen eines Alaskan Husky.....	71
4.4.6	Heteroplasmatische Verteilung der Mutation.....	71
4.4.7	Untersuchungen zur Pathogenität der A2691G Mutation beim Hund.....	74

4.4.8	Haplotypenanalyse im D-Loop der mtDNA.....	75
4.4.9	Vergleichende Analyse der humanen und der kaninen tRNA-Leu <sup>(UUR)</sup> .....	80
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien, als intrazelluläre Organellen eukaryotischer Zellen, sind genetisch und strukturell einzigartig ausgestattet.

Sie sind als einzige Organelle in der Zelle von einer Doppelmembran umgeben. Da die innere Membran in ihrer Zusammensetzung eher einer prokaryotischen Zellhülle entspricht, wurde schon früh die so genannte Endosymbiontentheorie aufgestellt. Nach dieser entwickelten sich eukaryotische Zellen ursprünglich als anaerobe Organismen und sind dann eine stabile endosymbiontische Partnerschaft mit einem Bakterium eingegangen um so deren oxidative Phosphorylierung zur effizienteren Energiegewinnung nutzen zu können (*DiMauro, 1996, Stryer, 1996*). Die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und Strukturen hängt von der ständigen Verfügbarkeit von Energie in Form von ATP ab und wird zum größten Teil in Mitochondrien mit Hilfe der durch Verbrennung von Nährstoffen gewonnenen Energie synthetisiert.

Durch die Doppelmembran werden vier mitochondriale Reaktionsräume definiert. Die äußere Membran umschließt das gesamte Mitochondrium und enthält Kanäle aus Proteinkomplexen, welche den Austausch von Molekülen und Ionen zwischen dem Mitochondrium und dem Zytosol ermöglichen (*Stryer, 1996; Neupert, 1997*). Die innere Membran besteht aus Cristae genannten Einstülpungen, die die Matrix begrenzen und die eigene Oberfläche um ein Vielfaches vergrößern. Da die Innenmembran für alle hydrophilen und geladenen Moleküle undurchlässig ist, gibt es eine Reihe spezifischer Transportproteine, die die Substrate und andere Metabolite kontrolliert passieren lassen (*Stryer, 1996*).

Zudem enthält die Innenmembran die für die ATP-Generierung entscheidenden Strukturen - die Atmungskette und die ATP-Synthase - in Form hochmolekularer Enzymkomplexe (*Abbildung 1*), die beide unter dem Begriff „OXPHOS-System“ zusammengefasst werden.

Der von der Innenmembran umschlossene Raum, die sogenannte Matrix, enthält viele Enzyme des katabolen Energiestoffwechsels, wie beispielsweise den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (*PDH*) und die Enzyme des Zitratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren. Hier befindet sich auch das mitochondriale Genom.

Mittlerweile ist auch klar, dass Mitochondrien nicht nur für die Generierung und Bereitstellung zellulärer Energie zuständig sind (*Leonard und Schapira, 2000a*), sondern auch für die Apoptose (*Schapira, 2002*), den Kalzium-Stoffwechsel und weitere wichtige Teilschritte anderer Stoffwechselwege wie Harnstoffzyklus und Eisenstoffwechsel.

### *1.1.1 Die mitochondriale Atmungskette*

Die Atmungskette in der Innenmembran besteht aus vier hochmolekularen, membranständigen Enzymkomplexen, Komplex I bis IV, die funktionell mit den mobilen Elektronenüberträgern Ubiquinon und Cytochrom *c* in Verbindung stehen (*Abbildung 1*). Die aus den Reduktionsäquivalenten NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> stammenden Elektronen werden durch den Komplex I (NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase) bzw. Komplex II (Succinat:Ubiquinon-Oxidoreduktase) in die Atmungskette eingeschleust, entlang sequentiell angeordneter Redoxsysteme übertragen und schließlich durch den Komplex IV

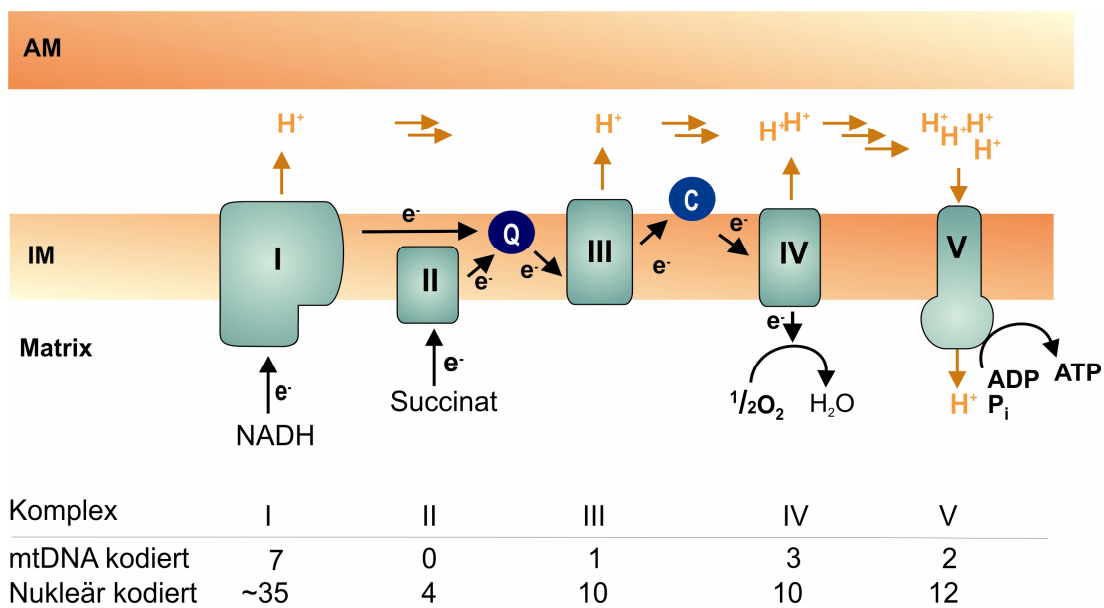
zur Reduktion von molekularem Sauerstoff zu H<sub>2</sub>O benutzt. Die bei der Elektronenübertragung freiwerdende Energie dient dazu, um an drei Stellen (Komplex I, III und IV) Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Der dadurch entstehende elektrochemische Gradient liefert die Energie zur Umwandlung von ADP in ATP durch die ATP-Synthase (Komplex V) (Stryer, 1996; Leonard und Schapira, 2000a). Im entkoppelten Zustand, d.h. wenn der Protonenrückfluss nicht zur ATP-Synthase genutzt wird, wird die frei werdende Energie in Wärme umgesetzt (Stryer, 1996).

Zur Entstehung dieser hochmolekularen Enzymkomplexe des Energie generierenden OXPHOS-Systems tragen zwei verschiedene Genome bei: das nukleäre Genom sowie das mitochondriale Genom. Das mitochondriale Genom kodiert für Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V, während die Untereinheit II ausschließlich nukleär kodiert ist. Komplex I und Komplex IV sind diejenigen Untereinheiten mit den meisten mitochondrial kodierten Untereinheiten, so dass eine generelle Störung in der Biogenese der mitochondrialen Proteine diese Komplexe zuerst betreffen würde (Abbildung 1).

Darüber hinaus hängt die Biogenese und Assemblierung der verschiedenen Untereinheiten zu Multienzymkomplexen von einer Vielzahl weiterer nukleär kodierter Faktoren ab, die zum Beispiel den Transport und Einbau von Kofaktoren, wie Kupfer oder Häm, in die Atmungskettenkomplexe regulieren.

Wird die Atmungskette in ihrer Funktion gestört, akkumulieren Elektronen an einer frühen Stelle innerhalb dieser Redox-Kaskade, was die direkte Übertragung auf molekularen Sauerstoff unter Entstehung von Superoxidanionen begünstigt. Diese und andere toxische Sauerstoffradikale können langfristig zu einer oxidativen Schädigung mitochondrialer und anderer zellulärer Proteine, Lipide und Nukleinsäuren und damit zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Energiebereitstellung führen.





**Abbildung 1:**

**Das energiegenerierende OXPHOS-System in der mitochondrialen Innenmembran.** Die Enzyme des OXPHOS-Systems sind hochmolekulare Komplexe, deren Untereinheiten sowohl nukleär als auch mtDNA-kodiert sind und somit der Regulation durch zwei von einander unabhängige Genome unterliegen. Elektronen ( $e^-$ ) aus NADH/ $H^+$  bzw.  $FADH_2$ -produzierenden Prozessen werden entlang des Komplex I bzw. des Komplex II in die Atmungskette eingeschleust. An drei Stellen ist der Elektronentransfer an die Translokation von Protonen über die Innenmembran gekoppelt. Der entstehende elektrochemische Gradient wird dazu verwendet, mit Hilfe der ATP-Synthase (Komplex V) ATP aus ADP und anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) zu synthetisieren. Q, Ubiquinon; C, Cytochrom c. (AM : Außenmembran ; IM : Innenmembran)

## **1.2 Besonderheiten der mitochondrialen Genetik**

Mitochondrien besitzen ihr eigenes funktionales Genom. Es befindet sich in der mitochondrialen Matrix und unterscheidet sich strukturell und funktional vom nukleären Genom. Da jedes Mitochondrium zwischen 2 und 10 mtDNA-Kopien enthält und fast jede eukaryotische Zelle Mitochondrien besitzt, kann die Anzahl der Kopien zwischen einigen wenigen und mehreren Tausend liegen und spiegelt damit auch den Energiebedarf der jeweiligen Zelle wieder (*Leonard und Schapira, 2000a*).

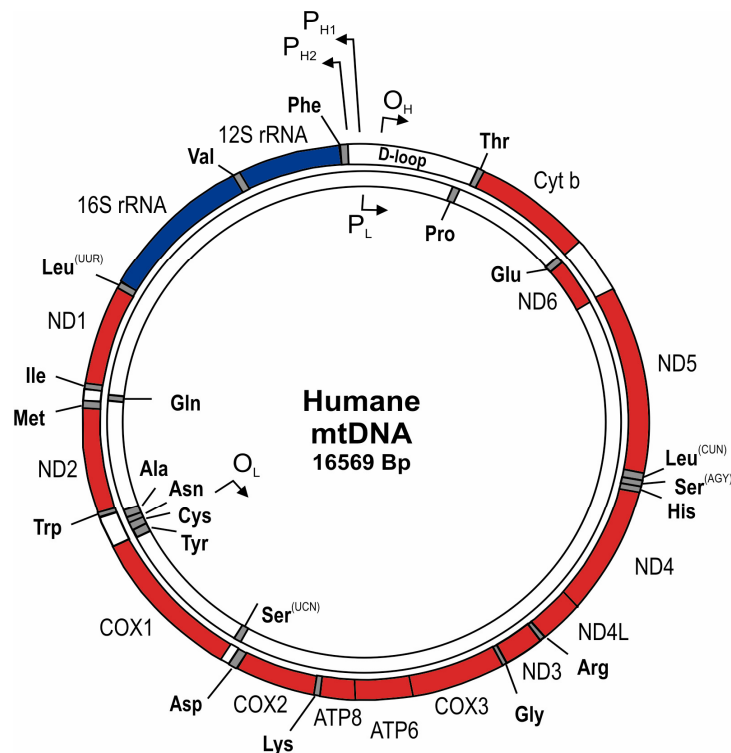
Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist ein zirkuläres doppelsträngiges Molekül, das aus einem schweren H-Strang (Guanin-reich) und einem leichteren L-Strang (Cytosin-reich) aufgebaut ist (*Abbildung 2*) und beim Menschen aus 16.569 Basenpaaren besteht (*Anderson et al., 1981*). Die mtDNA des modernen Menschen kodiert für 13 der insgesamt über 80 Polypeptide der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung (*siehe Abbildung 1*). Darüber hinaus enthält sie die Gene für zwei rRNAs, nämlich die 12S rRNA und die 16S rRNA, sowie für 22 tRNAs.

Obwohl das Mitochondrium über eine eigenen Proteinsynthese-Maschinerie verfügt, ist das mitochondriale Genom in seiner Existenz dennoch vollständig vom Kerngenom abhängig, da Enzyme und Faktoren, die für die Replikation und Aufrechterhaltung der mtDNA benötigt werden, von der nukleären DNA synthetisiert und in das Mitochondrium importiert werden. Auch die fehlerfreie Transkription und Translation ist vom Kerngenom abhängig (*DiMauro und Schon, 2003*).

Das mitochondriale Genom zeichnet sich durch einen sehr kompakten Aufbau aus und besitzt im Gegensatz zur nukleären DNA keine Introne. Damit sind 93% des mitochondrialen Genoms kodierende Regionen, während es im

Kerngenom nur 5% sind. Die einzige nicht-kodierende Region ist der sogenannte D-Loop (*displacement loop*). Er enthält die Promotoren für die Transkription des H- und des L-Stranges, die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor A sowie den Replikationsursprung des H-Stranges (*Schapira und Cock, 1999*). Da der D-Loop keine kodierenden Bereiche enthält, unterliegt er keinerlei Selektionsdruck. Aus diesem Grund konnten sich in diesem Bereich Mutationen etablieren und den D-Loop damit zum variabelsten Bereich innerhalb der mtDNA machen (*Schapira und Cock, 1999*).

Im Vergleich zum Kerngenom unterliegt die mtDNA einer 10-100fach höheren Mutationsrate. Das liegt zum einen an den fehlenden Histonen, die bei der nukleären DNA eine gewisse Protektion darstellen, und zum anderen am Fehlen eines effizienten Reparaturmechanismus. Ausserdem ist die mtDNA permanent dem oxidativen Stress durch freie Radikale ausgesetzt, die aus dem OXPHOS-System stammen.



**Abbildung 2: Organisation der mtDNA:** Das mitochondriale Genom (ca. 16569 Basenpaare) kodiert für 13 Polypeptidunterheiten (rot) des mitochondrialen OXPHOS-Systems, 2 ribosomale Untereinheiten (blau) sowie 22 tRNA-Moleküle (grau). ND1-ND5 bezeichnen Komplex I-Gene, COX1-COX3 kodieren für den Komplex IV, ATP6 und ATP8 bezeichnen die zwei mtDNA-kodierten Komplex V-Gene. P<sub>L</sub>, P<sub>H</sub>: Promotoren des L- bzw. H-Stranges; O<sub>L</sub>, O<sub>H</sub>: Replikationsursprung des L- bzw. H-Stranges.

In Säugetieren wird das mitochondriale Genom bis auf sehr wenige Ausnahmen ausschließlich über die Mutter vererbt (*Schwartz und Vissing, 2002*). Falls paternale Mitochondrien bei der Befruchtung in die Oocyte gelangen, werden diese sofort mit Ubiquitin markiert und unterliegen hiermit einer raschen Proteolyse (*McFarland et al., 2002*).

Normalerweise enthalten alle Mitochondrien genetisch identische Kopien der mtDNA (Homoplasmie). Entsteht eine Mutation, erzeugt sie ein Gemisch aus zwei unterschiedlichen mtDNA-Populationen, die sich bei jeder Zellteilung

zufällig neu auf die Tochterzellen aufteilen. Dieser Zustand wird als Heteroplasmie bezeichnet. Die zufällige Verteilung bedingt, dass der Anteil der mutierten Moleküle im Laufe mehrerer Zellteilungen bzw. im Laufe mehrerer Generationen ansteigen kann (*Holt et al., 1988*).

Ist eine Mutation krankheitsauslösend, d.h. pathogen, bestimmt der Grad der Heteroplasmie (Schwellenwert), das Verteilungsmuster der Mutation auf bestimmte Zelltypen oder Organe, der Zeitpunkt der Mutation sowie die unterschiedliche Energieabhängigkeit dieser Organe, ob und in welcher Form sich eine Erkrankung manifestiert, d.h. als organspezifisches Symptom oder als allgemeine Systemerkrankung (*Leonard und Schapira, 2000a*).

### **1.3 Mitochondriale Dysfunktionen und menschliche Erkrankungen**

Mitochondriale Erkrankungen stellen eine klinisch sehr heterogene Erkrankungsgruppe dar, deren Ursachen auf Störungen mitochondrialer Funktionen beruhen, die entweder biochemisch, morphologisch oder genetisch eingeteilt werden können (*DiMauro, 1996*). Zu diesen Erkrankungen zählen Störungen der mitochondrialen Energiegewinnung, wie Defekte der Atmungskette, des Fettsäuretransports und -abbaus ( $\beta$ -Oxidation) und des Aminosäureabbaus, aber auch Defekte im eigenen mitochondrialen strukturellen Aufbau oder des Proteinimports (*Finsterer, 1997*).

Zu den häufigsten mitochondrialen Erkrankungen zählen Defizienzen der Atmungskettenkomplexe und der oxidativen Phosphorylierung, die unter dem Begriff OXPHOS-Erkrankungen zusammengefasst werden. Am häufigsten werden dabei beim Menschen Atmungskettenkomplex I-Defizienzen

diagnostiziert, gefolgt von Komplex IV-Defizienzen und kombinierten Atmungskettendefekten. Aufgrund des derzeitigen Wissenstandes wird die Inzidenz einer OXPHOS-Erkrankung auf 1 von 5.000 bis 10.000 Lebendgeborenen geschätzt (*Gillis und Kaye, 2000; McFarland et al., 2002*).

Dysfunktionen des OXPHOS-Systems betreffen in erster Linie Organe mit einem hohen Energiebedarf wie Skelettmuskel, Herz, ZNS oder das endokrine System. Entsprechend manifestieren sich solche Dysfunktionen klinisch als Myopathie, Kardiomyopathie, neurologische Ausfallserscheinungen oder Diabetes mellitus (*Johns, 1995*). Die phänotypische Heterogenität dieser Erkrankungen reicht von milden, spät einsetzenden und organspezifischen Erkrankungen bis hin zu schweren, letalen und früh-kindlichen Systemerkrankungen.

Die duale genetische Kontrolle des OXPHOS-Systems bedingt, dass sowohl Defekte des mitochondrialen Genoms als auch des Kerngenoms zur Entstehung mitochondrialer Erkrankungen beitragen können. Etwa 10-15% aller OXPHOS-Erkrankungen sind auf Defekte der mtDNA zurückzuführen (*Hanna und Nelson, 1999*). Mittlerweile sind über 100 pathogene mtDNA Mutationen in proteinkodierenden Genen, tRNA- und rRNA-Genen bekannt (*Mitomap*). Dabei handelt es sich entweder um Punktmutationen, die jeweils nur ein Gen betreffen, oder um Längenveränderungen wie Deletionen und Duplikationen, die die Funktionen mehrerer Gene betreffen können.

Während bei Mutationen in proteinkodierenden Genen nur die jeweilige Proteinuntereinheit betroffen ist, führen Veränderungen in mitochondrialen tRNA-Genen und Deletionen zu einer allgemeinen Biogenesestörung und damit zu einer Dysfunktion mehrerer OXPHOS-Komplexe. Ein Beispiel für Defekte proteinkodierender Gene ist die Leber'sche Optikusatrophie (LHON), die durch Mutationen in Strukturgenen des Komplexes I (ND1-ND6-Gene) verursacht wird

(Howell, 1997). CPEO (Chronic progressive external ophtalmoplegia) (Holt, 1989) dagegen ist eine Augenmuskelschwäche des Erwachsenen, die typischerweise in Assoziation mit mtDNA-Längenmutationen auftritt (*Tabelle 1*) (Zeviani et al., 1988). Prominente Beispiele für Mutationen innerhalb einer mitochondrialen tRNA sind die A3243G Mutation, die ursprünglich in Assoziation mit MELAS (Myopathy, encephalopathy, lactate acidosis and stroke-like episodes) gefunden wurde (Goto, 1990), sowie die Mutation an der Nukleotidposition (np) 8344 als Ursache für MERRF (Myoclonic epilepsy and ragged red fibres).

Die meisten OXPHOS-Erkrankungen sind nukleär kodiert. Hier wurden zum einen krankheitsverursachende Mutationen in Strukturgenen, wie Gene für Untereinheiten des Komplexes I oder II gefunden, aber vor allem auch Defekte in sog. „Assemblierungsgenen“. Beispiele dafür sind das *SURF1*-Gen (Assemblierung Komplex IV) (Tiranti et al., 1998) oder das *SCO2*-Gen (Assemblierung Komplex IV) (Walker et al., 1996), deren Funktionsstörung zu einer isolierten Komplex IV-Defizienz führt (*Tabelle 1*).

Bei allen mitochondrialen Erkrankungen ist vor allem die hohe Genotyp-Phänotyp Variabilität auffällig. So kann ein und dieselbe Mutation unterschiedliche klinische Phänotypen verursachen. Ein Beispiel hierfür ist die oben erwähnte A3243G Mutation, die nicht nur beim MELAS-Syndrom, sondern auch bei MERRF, Leigh-Syndrom, CPEO oder Kardiomyopathie beschrieben wurde. Zum anderen kann ein bestimmter klinischer Phänotyp verschiedenste genetische Ursachen haben. Ein Beispiel hierfür ist das Leigh-Syndrom (*siehe 1.3.1.*), das durch Mutationen im ATPase6-Gen, durch mitochondriale tRNA-Mutationen oder durch Defekte nukleärer Struktur- und Assemblierungsgene für Atmungskettenuntereinheiten verursacht werden kann (*Tabelle 1*).

**Tabelle 1:** Übersicht einer aktuellen klinischen Klassifizierung verschiedener mitochondrialer Erkrankungen des Menschen und deren genetische Ursachen.

Akronym/Syndrom	Klinik	Genetischer Defekt
CPEO	Ophthalmoplegie, Ptosis	mt tRNA <sup>LEU(UUR)</sup> 3243G, mtDNA Deletion
adPEO	Autosomal dominante Ophthalmoplegie, Ptosis	ANT1, POLG1
KSS	CPEO, Retinitis pigmentosa, Protein↑ in CSF, geistige Retardierung, Taubheit, Anämie	mtDNA Deletion
Pearson Syndrom	Sideroblastische Anämie, Leberinsuffizienz, exogene Pankreasinsuffizienz	mtDNA Deletion/Duplikation
MELAS	Diabetes, Epilepsie, kortikale Blindheit, Optikusatrophie, Migräne, Taubheit, Erbrechen, dilatative Kardiomyopathie, Kleinwuchs	mt tRNA <sup>LEU(UUR)</sup> A3243G, 3252G, 3256T, 3271C; mt tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> 7512C
MERRF	Myopathie, zerebelläre Ataxie, Demenz, CPEO, Taubheit, Epilepsie	mt tRNA <sup>LEU(UUR)</sup> 3243G, mt tRNA <sup>Ser(UCN)</sup> 7512C, mt tRNA <sup>Lys</sup> 8344G, 8356C
LHON	Akuter oder subakuter partieller oder totaler Visusverlust	ND1 G3460A ND4 G11778A ND6 T14484C ND6 G14459A Cyt b G15257A
Leigh-Syndrom	Entwicklungsverzögerung, Anfälle, Ataxie, Optikusatrophie, Retinitis pigmentosa, Ausfälle OMN, CPEO, Laktatazidose, Hypotonie	ATP6 T8993C ATP6 T9176G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> 3243 NDUFS4 NDUFS7 NDUFS8 SDHA SURF1
MNGIE	Myopathie, Neuropathie, Enzephalopathie, Malabsorption	TP
NARP	Geistige Retardierung, Epilepsie, Ataxie, Paresen, sensorische Neuropathie	ATP6 T8993C
CoQ Defizienz	Geistige Retardierung, Myopathie	CoQ



CPEO: Chronic progressive external ophthalmoplegia; KSS: Kearns-Sayre syndrome; MELAS: Myopathy, encephalopathy, lactate acidosis and stroke-like episodes; MERRF: Myoclonic epilepsy and ragged red fibres; LHON: Leber's hereditary optic neuropathy; MNGIE: Myoneuro-gastrointestinal encephalopathy; NARP: Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa. ANT: Adenine nucleotide translocator 1; POLG: Polymerase  $\gamma$  A; ND: NADH dehydrogenase; NDUFS: NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1; SDHA: Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp); TP: Thymidine phosphorylase. Veränderungen im nukleären Genom in blau. Veränderungen im mitochondrialen Genom rot.

### 1.3.1 Das humane Leigh-Syndrom

Diese subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie (*Leigh, 1951*) ist eine schwere, neurodegenerative Erkrankung des Kleinkindes mit psychomotorischen Entwicklungsstörungen, muskulärer Hypotonie, Ataxie, einer Hirnstammsymptomatik und respiratorischer Insuffizienz. Sie zählt zu den am häufigsten diagnostizierten mitochondrialen Erkrankungen im Säuglings- und frühen Kindesalter (*DiMauro, 1999*).

Zentralnervöse Störungen stehen beim Leigh-Syndrom im Vordergrund. Neurologisch ist diese Erkrankung durch fokale, bilateral-symmetrische nekrotische Läsionen, vor allem in der Hirnstammregion und im Thalamus gekennzeichnet. Dem Leigh-Syndrom können funktionelle Defekte verschiedener mitochondrialer Enzymkomplexe, wie der Pyruvatdehydrogenase (PDH) oder den Atmungskettenkomplexen I, II oder IV zu Grunde liegen (*DiMauro und DeVivo, 1996*).

Entsprechende genetische Defekte in Genen für Untereinheiten der PDH (E1a) (*Dahl, 1995*) sowie für Untereinheiten des Komplexes I, II und Assemblierungsfaktoren des Komplex IV wurden bereits identifiziert (*Finsterer, 2004*). Obwohl das Leigh-Syndrom in den meisten Fällen somit autosomal rezessiv vererbt wird, kann es auch durch Mutationen der mtDNA verursacht

werden (*Tabelle 1*) und damit einem maternalen Erbgang unterliegen. Die zwei häufigsten mit Leigh-Syndrom assoziierten mtDNA-Mutationen liegen im ATPase6-Gen und kommen immer heteroplasmatisch vor (*Santorelli et al., 1995*). Insbesondere bei der Mutation an Nukleotidposition 9176 im ATPase6-Gen korreliert der Heteroplasmie-Grad mit der Schwere der klinischen Symptomatik und reicht vom phänotypisch milden NARP-Syndrom (Neurogenic muscle weakness, ataxia, retinitis pigmentosa), bei niedrigem Heteroplasmie-Grad, bis hin zum schweren Bild des Leigh-Syndroms bei höheren Anteilen mutierter mtDNA (*DiMauro, 1996*).

#### **1.4 Bekannte mitochondriale Enzephalopathien des Hundes**

Auch bei Tieren stellen Mitochondriopathien, wie beim Menschen, natürlich vorkommende Erkrankungen dar. In den vergangenen Jahren wurden vermehrt neurodegenerative Erkrankungen bei Kleintieren, insbesondere Hunden, beschrieben, die den mitochondrial bedingten Enzephalopathien beim Menschen sowohl klinisch als auch patho-morphologisch stark ähneln. In den meisten dieser Fälle ist eine mitochondriale Beteiligung auf Grund der ultrastrukturellen Befunde hoch wahrscheinlich (*Brenner et al., 1997; 2000; Gruber et al., 2002*). In einem Fall wurde eine mitochondriale Dysfunktion bereits biochemisch diagnostiziert bzw. sogar genetisch definiert (*Li et al., 2005*). Die bisher bei Hunden beschriebenen Enzephalopathien werden im Folgenden kurz beschrieben.

#### 1.4.1 Hereditäre Polioenzephalomyelopathie des Australian Cattle Dog

Erstmals wurde 1997 von Brenner *et al.* eine neurologische, akut auftretende Erkrankung bei Hunden beschrieben, die auf Grund der neurologischen Ausprägung sowie der ultrastrukturellen Befunde als mitochondriale Stoffwechselerkrankung diagnostiziert wurde. Bei den drei beschriebenen Hunden einer Zucht und beiderlei Geschlechts manifestierten sich innerhalb des ersten Lebensjahres Anfälle, später entwickelte sich zusätzlich eine spastische Tetraparese.

Bei der makroskopischen Betrachtung der Gehirnpräparate fielen bereits deutliche bilateral-symmetrische Malaziefelder in den Kleinhirnkernen, im Hirnstamm und in der grauen Substanz des Rückenmarks auf. In der Histologie zeigten sich diese multifokalen Läsionen in größerem Ausmaß im Neuropil der grauen Substanz, die sich bei stärker betroffenen Arealen bis in die weiße Substanz ausdehnen konnten. Die Schäden innerhalb der grauen Substanz waren in unterschiedlich fortgeschrittenen Stadien aufzufinden.

Zusätzlich zu den ZNS-Veränderungen trat bei den Tieren eine bilaterale Muskelatrophie in den Schultergliedmaßen auf, die sich bei der weiteren morphologischen Untersuchung als Denervationsatrophie darstellte.

Weitere ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten demyelinisierte Axone sowie vakuolisierte reaktive Astrozyten mit einer deutlich erhöhten Zahl an Mitochondrien, die stark vergrößert erschienen. Der letztere Befund lieferte einen deutlichen Hinweis auf eine mitochondriale Schädigung.

Die Familienanamnese der betroffenen Hunde wies auf einen autosomal-rezessiv vererbten Gendefekt als Ursache der Erkrankung hin. In dieser Arbeit wurde somit erstmals eine kanine neurologische Erkrankung beschrieben, die

sich als bilateral-symmetrische Enzephalomyelopathie darstellte und vermutlich durch eine genetisch-bedingte mitochondriale Dysfunktion verursacht wird.

#### *1.4.2 Mitochondriale Enzephalopathie des English Springer Spaniels*

Ebenfalls von *Brenner et al. (2000)* wurde eine weitere Form einer progressiven Enzephalomyelopathie beschrieben, die sich allerdings klinisch, histopathologisch und ultrastrukturell von der oben beschriebenen Erkrankung unterscheidet.

Die 16 Monate alte English Springer Spaniel-Hündin zeigte eine dysmetrische Ataxie sowie visuelle Defizite und Verhaltensänderungen, die desorientierte Phasen und eine erhöhte Erregbarkeit beinhalteten. Die Haltungs- und Stellreaktionen waren an allen vier Gliedmaßen verzögert und spastisch. Zusätzlich konnte ein vertikaler positioneller Nystagmus ausgelöst werden. Diese klinische Symptomatik deutete auf eine bilateral-symmetrische, multifokale Läsion im ZNS mit einer deutlichen zerebellomedulären Komponente hin.

Histopathologische Untersuchungen zeigten eine deutliche Astrogliose und Axonverlust in den Sehbahnen, während die Retina selbst unauffällig erschien. Im Hirnstamm, und hier vor allem in den Olivenkernen und der Substantia nigra, sowie den Kleinhirnkernen konnte eine milde, bilaterale, spongiöse Enzephalopathie nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu diesen lichtmikroskopischen Befunden konnte man im Kleinhirn eine Degeneration der Purkinje-Zellen feststellen.

Ultrastrukturelle Untersuchungen erbrachten genauere Hinweise auf die zellulären Veränderungen im Neuroparenchym. Der Verlust des Neuropils, der Myelinverlust und letztendlich vollständig degenerierte Axone konnten gezeigt werden. Wie bei den australischen Cattle Dogs ließen sich ebenfalls unter dem Elektronenmikroskop veränderte Mitochondrien nachweisen. Während hier allerdings die Mitochondrien in den untersuchten Astrozyten keinerlei Veränderungen aufwiesen, zeigten sich die Mitochondrien in den Nervenzellen bis zu zehnfach vergrößert sowie mit Lipid-Einschlüssen innerhalb der Matrix, einem Verlust an Cristae und verdickten Mitochondrien-Membranen.

Damit ähnelten die neuropathologischen und klinischen Befunde dieser Hündin mit einer progressiven Enzephalomyelopathie in auffälliger Weise dem Erkrankungsbild einer humanen mitochondrialen Enzephalomyelopathie wie dem Leigh-Syndrom, deren auffälligste Merkmale neben den morphologisch stark veränderten Mitochondrien ebenfalls eine Spongiose, Astrogliose und ein selektiver Nervenzellverlust sind.

#### *1.4.3 MELAS-ähnliche, mitochondriale Enzephalopathie des Jack Russell Terriers*

Eine progressive zerebelläre Enzephalopathie wurde von *Gruber et al. (2002)* bei einer Parson Jack Russell Terrier-Hündin beschrieben. Die Hündin wurde bereits akut mit Ataxie, Hypermetrie und Taubheit in der zehnten Lebenswoche auffällig und musste im zehnten Lebensmonat auf Grund der rapiden klinischen Verschlechterung euthanasiert werden.

In der anschließenden histologischen Untersuchung der Organe zeigte sich als Hauptbefund eine ausgeprägte bilaterale Mineralisation und Degeneration der

Kleinhirnkerne und ventraler zerebellärer Cortexanteile, der Medulla oblongata und des Nervus Vestibulocochlearis.

Die Kalkablagerungen befanden sich entweder frei im neuronalen Parenchym, um intakte oder degenerierte Neuronen oder innerhalb von glatten Muskelzellen kleinerer Arterien oder um Kapillaren.

In Leberzellen, Herzmuskelzellen, und in geringeren Anteil auch in Skelettmuskelzellen fielen in der Hämalaun-Eosin-Färbung im Zytoplasma eosinophile Granula auf, die sich unter dem Elektronenmikroskop als deutlich veränderte Mitochondrien in erhöhter Anzahl identifizieren ließen. Die meisten dieser veränderten Mitochondrien besaßen zahlreiche, zufällig verteilte und unregelmäßig geformte elektronendichte Einschlusskörperchen unterschiedlicher Größe.

Diese mikroskopischen und ultrastrukturellen erfassten Läsionen wiesen auf eine mitochondrialen Enzephalopathie hin, wobei die Autoren die Ähnlichkeit mit menschlichen, durch die MELAS-Mutation hervorgerufenen Erkrankungen hervorhoben. Die Verteilung und das Vorkommen der Kalkablagerung im degenerierten Neuroparenchym, die eosinophilen Granula im Zytoplasma extraenzephaler Zelltypen sowie die mitochondrialen Veränderungen sind Charakteristika, die ebenfalls bei humanen MELAS-Patienten gefunden werden (*Howell, 1999*).

#### 1.4.4 Spongiforme Leukenzephalomyelopathien bei Australian Cattle Dogs und Shetland Sheepdogs

Erst letztes Jahr konnte erstmals eine Mutation im mitochondrialen Genom als mögliche genetische Ursache einer kaninen mitochondrialen Mitochondriopathie gezeigt werden. *Li et al. (2005)* beschrieben eine hereditäre Leukenzephalopathie bei zwei unterschiedlichen Hunderassen, den Australian Cattle Dogs und Shetland Sheepdogs.

Bei den Australian Cattle Dogs waren alle drei Würfe einer Hündin aus der Verpaarung mit einem Rüden derselben Rasse betroffen. Bei einer Shetland Sheepdog Hündin mit ebenfalls drei Würfen von zwei Rüden waren von 19 Welpen 12 Welpen beiden Geschlechts erkrankt. Da die Rüden bei Verpaarungen mit anderen Hündinnen keine erkrankten Nachkommen produzierten, wurde von den Autoren ein maternaler Erbgang angenommen.

Bereits in den ersten Lebenswochen zeigten die betroffenen Welpen Anfälle, Paresen, Spastizität, Tremor und Ataxien. Elektrophysiologische Untersuchungen erbrachten als Befund eine Leitungsverzögerung im Hirnstamm und Rückenmark, die auf eine zentrale Demyelinisierung oder Schädigung der Myelinhüllen hindeutete.

Biochemische Untersuchungen zeigten im Liquor einen proportional zur Schwere der Erkrankung erhöhten Laktatwert. Außerdem waren im Vergleich zu Kontrolltieren Pyruvat, 3-Hydroxybutyrat und der Quotient aus 3-Hydroxybutyrat und Azetoazetat erhöht, die auf eine mitochondriale Dysfunktion hinwiesen.

Bei der computertomographischen Untersuchung eines erkrankten Welpen konnte eine Erweiterung der Lateralventrikel und des vierten Ventrikels und eine diffuse Hypomyelinisierung der weißen Substanz festgestellt werden.

Bei den histopathologischen Untersuchungen der Tiere zeigte sich eine ausgeprägte Vakuolisierung des Myelins in der subkortikalen weißen Substanz, des Kleinhirns, des Hirnstamms und des Rückenmarks.

Unter dem Elektronenmikroskop konnten keine veränderten Mitochondrien in Astrozyten oder Oligodendrozyten festgestellt werden.

Proteinexpressions-Analysen mittels Western Blot bei einem Shetland Welpen zeigten erniedrigte Werte für Cytochrom *b* des Atmungskettenkomplexes III und kompensatorisch erhöhte Werte von *Core I* und *Core II* desselben Komplexes. Zusätzlich zeigte sich die Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette) erniedrigt.

Die Sequenzanalyse des gesamten mitochondrialen Genoms eines betroffenen Australian Cattle Dog identifizierte eine homoplasmatische A > G Transition an np 14474 im Gen für Cytochrom *b* (MTCYB), die einen Valin > Methionin Austausch im kodierten Protein vorhersagt. Diese Mutation wurde bei allen weiteren untersuchten betroffenen und nicht betroffenen Mitgliedern beider Hunderassen, nicht jedoch bei 246 Kontrollhunden gefunden. Die Ursächlichkeit dieser Mutation für die progressive neurologische Symptomatik dieser Tiere konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Insbesondere wies die Analyse des D-Loops auf einen gemeinsamen maternalen Vorfahren dieser beiden Familien hin, so dass es sich bei der identifizierten Mutation auch um eine seltene, mtDNA Haplogruppen-spezifische Variante handeln könnte.



#### 1.4.5 Alaskan Husky Enzephalopathie (kanines Leigh-Syndrom)

Im Jahr 2000 wurde von *Brenner et al.* erstmals eine kanine neurodegenerative Erkrankung beim Alaskan Husky beschrieben, die dem humanen Leigh-Syndrom ähnelt und von den Autoren als *Alaskan Husky Enzephalopathie* bezeichnet wird.

Vier von fünf Hunden aus dieser Studie zeigten die ersten neurologischen Symptome bereits im ersten Lebensjahr (7-11 Monate), der fünfte Hund erst im Alter von 2½ Jahren. Die klinische Symptomatik trat bei allen akut auf und beinhaltete im Laufe der Erkrankung Ataxie, Anfälle, Verhaltensstörungen, Blindheit, faziale Hypalgesien und Schwierigkeiten bei der Futteraufnahme.

Die makroskopisch-pathologischen Veränderungen beschränkten sich auf das ZNS und bestanden aus symmetrischen und bilateralen Malaziefeldern in der grauen Substanz, hauptsächlich im Thalamus, bei manchen Tieren bis in kaudale Hirnstammbereiche.

Histopathologisch präsentierten sich diese pathologischen Areale in einem deutlich größeren Ausmaß und waren durch Spongiose, vaskuläre Hypertrophie und Hyperplasie und durch eine Gliose im Gewebe charakterisiert. Diese Läsionen zeigten sich unter dem Mikroskop als bilateral-symmetrische degenerative Herde in Basalganglien, Mittelhirn, Pons und Medulla oblongata. Typischerweise finden sich im Thalamus reaktive gemistozytäre Astrozyten mit einer deutlichen Vakuolisierung im Zytoplasma.

Die Veränderungen im Kleinhirn beinhalteten den Verlust von Purkinje-Zellen und Granularzellen sowie eine ausgeprägte Gliose in der Granularzellschicht.

Sofern Veränderungen im Rückenmark vorlagen, beschränkten sich diese auf die weiße Substanz im Halsmark und waren durch eine Wallersche Degeneration gekennzeichnet. Bei den zwei Hunden mit den deutlichsten Veränderungen waren bilateral-symmetrisch die dorsolateralen Funiculi und der ventrale Funiculus betroffen.

Die Art und das Verteilungsmuster der Hirnveränderungen ähneln sehr den neuropathologischen Befunden, die bei humanen Patienten mit Leigh-Syndrom festgestellt werden. Außerdem lassen sich Ähnlichkeiten im klinischen Erscheinungsbild beider degenerativen Enzephalopathien feststellen. Beide Erkrankungen beginnen meist akut, betreffen sehr junge bis adoleszente Individuen und zeichnen sich durch einen in Schüben fortschreitenden Krankheitsverlauf aus, der bei Mensch und Tier eigentlich immer fatal endet.

Wie beim humanen Leigh-Syndrom handelt es sich bei der Alaskan Husky-Enzephalopathie um eine hereditäre Erkrankung, da in dieser Studie immer mehrere Geschwister eines Wurfes mit der gleichen Symptomatik betroffen waren und eine beispielsweise differentialdiagnostische Intoxikation unbekannter Genese auf Grund der Anamnese ausgeschlossen werden konnte.

#### *1.4.6 Zusammenfassung*

Alle vermuteten und bestätigten kaninen mitochondrialen Enzephalopathien weisen einige gemeinsame Befunde auf. Die Erkrankungen manifestieren sich bereits im frühen Welpenalter und beinhalten meist Ataxien, Anfälle und Paresen. Ob in computertomographischen Aufnahmen oder später in der neuropathologischen makroskopischen Untersuchung stellen sich immer bilateral-symmetrische Malaziefelder, vor allem im Hirnstamm bis in die Medulla

oblongata, aber auch oft im Dienzephalon dar. Histopathologisch sind diese zystischen Kavitationen deutlich weiter ausgebreitet und meist durch eine vaskuläre Proliferation, Gliose, einen Nervenzellverlust und Demyelinisierung gekennzeichnet. Oft konnten in den Studien stark veränderte Mitochondrien im betroffenen Gewebe nachgewiesen werden.

Bei all diesen unterschiedlichen Erkrankungen handelt es sich offensichtlich um vererbare, innerhalb der Mitochondrien lokalisierte Stoffwechseldefekte.

Tabelle 2 fasst die bisher bekannten kaninen mitochondrialen Enzephalopathien zusammen:

**Tabelle 2: Kanine mitochondriale Enzephalopathien**

	<b>Australian Cattle dog</b> (Brenner at al.)	<b>English Springer Spaniel</b> (Brenner at al.)	<b>Jack Russell Terrier</b> (Gruber et al.)	<b>Australian Cattle dog, Shetland Sheepdog</b> (Li et al.)	<b>Alaskan Huskies</b> (Brenner at al.)
<b>Systemerkrankung</b>	Polioenzephalomyelopathie	Mitochondriale Enzephalopathie	Mitochondriale Enzephalopathie	Spongiforme Leukenzephalopathie	Subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie
<b>Anzahl untersuchter Fälle</b>	3	1	1	15	5
<b>Manifestationsalter</b>	5. Monat- 2. Jahr	16. Monat	10. Monat	1.-9. Lebenswoche	7.- 25. Monat
<b>Geschlecht</b>	w + m	w	w	w + m	w + m
<b>Auftreten</b>	akut	schleichend	akut	akut	akut
<b>Dauer der Erkrankung</b>	5 Monate- 1 Jahr	wenige Wochen	8 Monate	wenige Wochen	wenige Wochen
<b>Initialsymptome</b>	Anfälle, Ataxie , Schwäche	Ataxie	Ataxie	Ataxie, Tremor	Ataxie, Anfälle
<b>Bewusstsein</b>	unauffällig	desorient.Phasen	unauffällig	unauffällig	unauffällig
<b>Drangwandern</b>	+	-	-	-	-
<b>Oberes motor. Neuron</b>	+	+	+	+	+
<b>Hypermetrie</b>	+	+	+	+	+
<b>Veränderte Haltungs- + Stellreaktion</b>	+	+	+	+	+
<b>Zentraler Visusverlust</b>	-	+	+	-	+
<b>Drohreaktion</b>	?	fehlt	fehlt	+	?
<b>Nystagmus</b>	+	Vertikal-positionell	Horizontal-positionell	+	-

<b>Dysphagie</b>	-	-	-	+	+
<b>Taubheit</b>	?	?	+	-	?
<b>Veränderte Mitochondrien (ELMI)</b>	Astrozyten	Neuronen	Leber- und Herzmuskelzellen	-	nicht untersucht
<b>Multifokale, bilat.-symm. Läsion im Gehirn</b>	+	+	+	+	+
<b>Heredität</b>	Autosomal rezessiv (Vermutet)	?	?	Maternal (Vermutet)	Autosomal rezessiv (Vermutet)
<b>Blut-/ Liquorchemie</b>	unauffällig	unauffällig	unauffällig	Liquor: Laktat + 3-OH-Byturat/Azetoazetat ↑	unauffällig
<b>Ähnlichkeiten zu humanen Syndromen</b>	Leigh-Syndrom	LHON/Leigh	MELAS	Canavan, KSS	Leigh-Syndrom
<b>Mutation</b>	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	G14.474A V98M (MTCYB)	nicht untersucht

ELMI: Elektronenmikroskop; m: Rüde; w: Hündin KSS: Kearns-Sayre Syndrome; LHON: Leber's hereditary optic neuropathy; MELAS: Mitochondrial enzephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes; MTCYB: Gen für Cytochrom b auf mitochondrialem Genom;

## 2 Zielsetzung

Die subakute nekrotisierende Enzephalopathie des Hundes, auch kanines Leigh-Syndrom genannt, zeigte sich in retrospektiven neuropathologischen Analysen als häufige angeborene, neurologische Erkrankung beim Hund. In Anlehnung an die Erkenntnisse zum menschlichen Leigh-Syndrom wurde eine mitochondriale Dysfunktion als molekulare Ursache vermutet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Spezifizierung des neuropathologischen Erscheinungsbildes mittels patho-morphologischer Untersuchungen. Zur Verfügung standen zehn betroffene Yorkshire Terrier und ein Alaskan Husky, bei denen auf Grund vorhergehender klinischer und bildgebender Analysen bereits die Verdachtsdiagnose „kanines Leigh-Syndrom“ gestellt wurde.

Die Ergebnisse dieser neuropathologischen Untersuchung sollten (i) eine Korrelation der Befunde mit den klinischen Symptomen, (ii) eine differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Enzephalopathien des Hundes und (iii) richtungsweisende Befunde hinsichtlich der Ursache dieser Erkrankung ermöglichen.

Zum Nachweis der für Mitochondriopathien typischen morphologischen Veränderungen der Mitochondrien sollten ultrastrukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskop herangezogen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Studie stellte die Aufklärung der molekularen Ursachen des kaninen Leigh-Syndroms dar. Zunächst sollte anhand geeigneter Gewebeproben betroffener Hunde die Annahme überprüft werden, dass dem

kaninen Leigh-Syndrom Störungen des mitochondrialen OXPHOS-System zu Grunde liegen.

Die Ergebnisse aus diesen biochemischen Messungen zeigten sich dann richtungsweisend für die Identifizierung möglicher Kandidatengene. Hierbei wurden insbesondere Mutationen mitochondrialer Gene als Ursache für das kanine Leigh-Syndrom in Betracht gezogen.

Die Erkenntnisse aus den neuropathologischen, biochemischen und genetischen Untersuchungen sollten für eine zukünftige Standardisierung der diagnostischen Vorgehensweise bei Verdacht auf kanines Leigh-Syndrom benutzt werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patientenkollektiv**

Alle untersuchten Hunde (zehn Yorkshire Terrier und ein Alaskan Husky) stammten aus unterschiedlichen Züchtungen. Auf Grund der Aussagen der Besitzer konnten Verwandtschaftsbeziehungen untereinander ausgeschlossen werden. Die klinischen Untersuchungen, die in den verschiedenen Praxen oder Tierkliniken vorgenommen wurden, beinhalteten einen kompletten neurologischen Untersuchungsgang mit Überprüfung des Bewusstseins, des Verhaltens, Haltung und Gang, der Haltungs- und Stellreaktionen, spinalen Reflexe, Muskeltonus, Reaktionen auf sensorische und Schmerzreize, sowie die Funktion der Gehirnnerven, wie im Standardprotokoll beschrieben (*De Lahunta, 2003*). Außerdem wurden im Rahmen der Diagnostik transversale computertomographische oder Magnetresonanztomographische Aufnahmen in den Tierkliniken gemacht, die zur Verfügung standen. Nach einer individuell unterschiedlichen Erkrankungsdauer mussten alle Tiere auf Grund einer massiven Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit einer tödlichen Dosis Pentobarbital euthanasiert werden.



### 3.1.1 Kontrollgruppe

Neuro- und myologisch unauffällige Hunde aus der I. Medizinischen Tierklinik

Kontrollgruppe:

Hund	Geschlecht		Hund	Geschlecht		Hund	Geschlecht
51	w		4	w		18	m
52	w		5	w		19	m
54	m		6	m		20	w
66	w		7	m		21	w
67	w		8	w		22	w
68	m		9	m		23	w
73	m		10	m		24	w
78	w		11	m		25	m
101	m		12	w		26	w
113	w		13	w		27	m
123	w		14	m		28	m
1	w		15	m		29	m
2	m		16	w		30	w
3	m		17	w		31	m

**Tabelle: 3** Kontrollgruppe 42 gesunder Hunde (m: Rüde; w: Hündin).

### 3.2 Gewebeentnahmen

Im Zuge der Sektion wurden Gehirn, Rückenmark, Ischiasnerven, Augen, Muskelproben, das Herz und weitere viszerale Organe entnommen und zur Fixierung in Formalin gebracht.

### **3.3 Patho-morphologische Untersuchungen**

#### *3.3.1 Histologie*

Nach 1-tägiger Fixation in einer 4%-igen neutral gepufferten Formaldehydlösung wurden die Organproben über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol in einem Einbettungsgerät (Hypercenter XP<sup>®</sup>, Fa. Shandon) entwässert und in Paraplast Plus<sup>®</sup> (Fa. Sherwood Medical Co, USA) mit einem Schmelzpunkt von 56-58°C eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom (Fa. Leica, Deutschland) wurden 8 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt, auf 0,1% polylysierte Objektträger aufgezogen und über Nacht im Brutschrank bei 58°C getrocknet. Zur Färbung wurden die Gewebeschnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Ethanolreihe rehydratisiert. Danach erfolgte die Färbung mit Hämalaun-Eosin. Das Nervengewebe wurde zusätzlich mit Luxol Fast Blue, Färbung nach Bodian und Färbung nach Woelcke-Spielmeyer-Schröder gefärbt und anschließend in Eukitt<sup>®</sup> eingebettet.

#### **3.3.1.1 Hämalaun-Eosin Färbung (Übersichtsfärbung)**

Zellkerne, Kalk:	Blau
Muskulatur und Bindegewebe:	Rot

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe bis 30%
  - Spülen in Aqua dest.
  - Kernfärbung mit Mayers Hämalaun-Lösung
  - Bläuen in fließendem Leitungswasser
  - Spülen in Aqua dest.
  - Gegenfärbung mit Eosin G
  - Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
  - Xylol
  - Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup>
- |            |
|------------|
| 7 – 10 min |
| 30 min     |
| 5 – 7 min  |
| je 5 min   |
| 5 min      |

3.3.1.2 Luxol Fast Blue-Färbung (Markscheidenfärbung)

Myelin:	Intensiv blau
Zellkerne:	Dunkelblau
Graue Substanz:	Blassgrün

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe bis 96%
- Färbung in Luxol Fast Blue-Lösung über Nacht
- Farblösung abspülen mit 96% Alkohol
- Spülen in Aqua dest.
- Differenzierung in gelöstem Lithiumcarbonat 20 – 25 min
- Differenzierung unter optischer Kontrolle mit 70% Alkohol bis weiße und graue Substanz unterscheidbar
- Spülen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Cresylechtviolett (Nissl-Farbstoff) 3 – 5 min
- Differenzierung mit 96% Alkohol
- Entwässern mit 2 x 100% Alkohol je 5 min
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Eukitt<sup>®</sup>

3.3.1.3 Silberimprägnation nach Bodian

Nervenfaser:	Intensiv schwarz-violett
--------------	--------------------------

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe bis 70%
- In 5% Essigsäure stellen 2 h
- Spülen mit Aqua dest.
- In 5% Salpetersäure stellen
- Spülen mit Aqua dest.
- Schnitte bei 37°C in Küvette mit Kupferblättchen und 2,5 g Protargol-Albumosesilber (M7447) stellen über Nacht
- Spülen mit Aqua dest.
- Reduzieren mit Hydrochinon Na-Sulfit 10 min
- Spülen mit Aqua dest.
- Entwickeln in 1% Goldchlorid 2 min
- Spülen mit Aqua dest.
- Einstellen in 2% Oxalsäure 2-3 min
- Spülen mit Aqua dest. mindest. ½ h
- Fixieren in 5% Natriumthiosulfat 10 min

- Spülen mit Aqua dest. 5 min
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe je 5 min
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Eukitt®

#### 3.3.1.4 Woelcke-Spielmeyer-Schröder Färbung (Markscheidenfärbung)

Myelin: Schwarz-grau

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe bis 70%
- Spülen mit Aqua dest.
- Beizen in 2,5% Eisenalaun-Lösung 12 h
- Spülen mit Aqua dest.
- Färbung in Schröder'sche Hämatoxylin-Lösung 7 h
- Spülen mit Aqua dest. 5 min
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe je 5 min
- Xylol 5 min
- Eindecken mit Eukitt®

#### *3.3.2 Immunhistochemie*

Um spezifische Gewebezusammensetzungen genauer untersuchen zu können, wurden immunhistochemische Verfahren an Hirnschnitten (5 µm), die mit Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert wurden, angewendet. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (Vector, Burlingame, USA) mit einer Avidin-Biotin-Peroxidase gekoppelt. Der erste Antikörper richtete sich gegen den von-Willebrand-Faktor (rabbit anti vWF, Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:2000), gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein, rabbit anti GFAP, Dako Cytomation, Verdünnung 1:400), Neurofilament (mouse anti pan nf, Zymed, San Francisco, USA, Verdünnung 1:50) oder MBP (myelin basic protein, rabbit anti MBP, Dako Cytomation, Verdünnung 1: 400).

Zur besseren Antigen-Darstellung wurden die Schnitte für den von-Willebrand-Faktor 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Proteinase K präinkubiert. Bei den Neurofilament-Präparaten erfolgte eine Mikrowellenbehandlung in einem 10 mM Zitrat-Puffer, pH 6, 10 Minuten bei 300 Watt. Um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern, wurden die Präparate für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1x PBS und 10% Ziegenerum geblockt. Anschließend konnte der Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubieren. Danach wurde die Proben mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit Biotin-markiertem Ziege-anti-Kaninchen/Maus Antikörper (Dako Cytomation, Verdünnung 1:100) für 1 h bei Raumtemperatur dekoriert. Die Schnitte wurden dann mit Hämatoxylin gegengefärbt und am Ende mit Deckgläschen und Eukitt® eingebettet.

### *3.3.3. Elektronenmikroskopie*

Die Elektronenmikroskopie beruht auf dem Prinzip der Wechselwirkungen von Elektronen mit Materie. Von den entsprechenden Blöcken mit Muskel- und Nervengewebe wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen Ultradünnschnitte von 70 nm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend auf Kupferringe und -netze (Stork Veco, NL) aufgebracht. Es folgte eine Kontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat. Unter dem Elektronenmikroskop von der Fa. Zeiss EM10 konnten Zellstrukturen mit 2500 – 80.000 facher Vergrößerung betrachtet werden.

### **3.4 Biochemische Analysen**

#### *3.4.1 Aufschluß des Muskelgewebes*

Um das Muskelgewebe aufzuschließen, wurde es 1:20 in sterilem SETH-Puffer (250 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 10 mM TRIS pH 7.4 und 50 U Heparin/ml) für 90 Sekunden in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill (300 rpm) homogenisiert. Durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm und 4°C wurden Zelltrümmer und Zellkerne im Muskelhomogenat sedimentiert. Der postnukleäre Überstand (Homogenat) wurde als Probeneinsatz für die Enzymaktivitätsmessungen verwendet.

#### *3.4.2 Messung des Non-Kollagen-Protein-Gehaltes*

Muskelgewebe enthält nicht nur Muskelzellen, sondern auch Bindegewebe. Durch alkalische Hydrolyse werden laugenunlösliche Bestandteile wie Kollagen vom reinen Zellprotein getrennt. Sämtliche ermittelten Enzymaktivitätsbestimmungen wurden in der vorliegenden Arbeit auf dieses kollagenfreie Protein bezogen (*Fischer et al., 1986*).

1951 entwickelten *Lowry et al.* eine spezifische Methode zur Eiweißbestimmung. Nach Zugabe einer Kupfer-Reagenz bildet sich ein Eiweiß-Kupfer-Komplex, der nach Zugabe von Folins Reagenz durch Farbänderung sichtbar wird und spektrophotometrisch gemessen werden kann.

10 µl Muskelhomogenat sowie 100 µl fortlaufend 1:1 verdünntem Rinderserum-Albumin Standard der Konzentrationen 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 g/l wurden mit 100 µl 0,05 NaOH 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden 2 Minuten bei 1200 g zentrifugiert und das Pellet mit Aqua

dest. auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Für die Doppelbestimmungen wurden je 2 x 100  $\mu\text{l}$  der Proben, der Standardlösungen und des Null-Wertes (nur Aqua dest.) mit 1000  $\mu\text{l}$  Lösung ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 M NaOH, 1,35 g/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  Kalium-Natriumtartrat; 5,5 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) versetzt und für 10 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Folins Reagenz (Fa. Merck) wurden die Mischungen nochmals 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Danach folgte die Messung der Extinktionsänderung in Halbmikro-Küvetten bei 578 nm am Shimadzu Spektralphotometer und die Berechnung der Konzentrationen beim Vergleich mit der Standardkurve.

### 3.4.3 Messung der Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe

#### *Aktivitätsbestimmung der NADH-CoQ-Oxidoreduktase (Komplex I)*

Gemessen wird die Oxidation von NADH. Der Elektronenfluss von NADH nach Coenzym Q wird durch Antimycin blockiert. Die Oxidationsrate ist somit direkt abhängig von der NADH-Dehydrogenase. Die Messung des Absorptionsmaximums des reduzierten NADH erfolgt bei 334 nm am Shimadzu Spektralphotometer.

Ermittelt wird die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung,  $\Delta E/\text{min}$ . Mit folgender Formel wurde dann die Enzymaktivität des Komplex I berechnet:

$$\epsilon_{\text{NADH}} = 6,18 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Aktivität (U/l)} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times 1000 \times \text{Gesamtvolumen Reaktionsgemisch [ml]}}{\epsilon_{\text{NADH}} \times V_{\text{Probe [ml]}}$$

*Aktivitätsbestimmung der Succinat - Cytochrom c- Oxidoreduktase (Komplex II+III)*

Gemessen wird Extinktionszunahme bei 550 nm bei Reduktion von Cytochrom c durch die Succinat-Cytochrom c-Oxidoreduktase.

Ermittelt wird die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung,  $\Delta E/\text{min}$ . Mit folgender Formel wurde dann die Enzymaktivität berechnet:

$$\epsilon_{\text{Cytochrom c}} = 21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Aktivität (U/l)} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times 1000 \times \text{Gesamtvolumen Reaktionsgemisch [ml]}}{\epsilon_{\text{Cytochrom c}} \times V_{\text{Probe}} \text{ [ml]}}$$

*Aktivitätsbestimmung der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV)*

Mit Na-Dithionit reduziertes Cytochrom c wird durch die Cytochrom c Oxidase oxidiert und die dabei resultierende Extinktionsabnahme pro Zeit bei 550 nm gemessen.

Ermittelt wird die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung,  $\Delta E/\text{min}$ . Mit folgender Formel wurde dann die Enzymaktivität des Komplex IV berechnet:

$$\epsilon_{\text{Cytochrom c}} = 21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Aktivität (U/l)} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times 1000 \times \text{Gesamtvolumen Reaktionsgemisch [ml]}}{\epsilon_{\text{Cytochrom c}} \times V_{\text{Probe}} \text{ [ml]}}$$



### 3.4.4 Messung der Zitratsynthase:

Gemessen wird die Extinktionszunahme von APADH (Azetylpyridin-Adenin-Dinukleotid) bei 366 nm im Spektralphotometer. APADH entsteht bei der Malat-Dehydrogenase-Reaktion durch Oxidation von Malat zu Oxalazetat. Oxalazetat wird mit Azetyl-CoA als Co-Substrat über die Zitratsynthase weiter zu Zitrat umgesetzt. Die Konzentrationszunahme von APADH ist somit direkt von der Zitratsynthase-Aktivität abhängig.

Ermittelt wird die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung,  $\Delta E/\text{min}$ . Mit folgender Formel wurde dann die Enzymaktivität der Zitratsynthase berechnet:

$$\epsilon_{\text{APADH}} = 9,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Aktivität (U/l)} = \frac{\Delta E \text{ min}^{-1} \times 1000 \times \text{Gesamtvolumen Reaktionsgemisch [ml]}}{\epsilon_{\text{APADH}} \times V_{\text{Probe [ml]}}$$

## **3.5 Molekularbiologische Methoden**

### *3.5.1 DNA-Isolation aus Paraffinschnitten*

Zur Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten mittels „All-tissue DNA Kit - First DNA“ (GEN-IAL, Institut für angewandte Laboranalysen, Troisdorf), wurde Gewebe von 3-4 Objektträgern in 1 ml Xylol in einem Eppendorfgesäß für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren von Xylol und Waschen mit 100% Ethanol wurde das trockene Gewebepellet über Nacht mit Lysepuffer

und Proteinase K (200 µg) bei 37°C lysiert. Der Überstand wurde am nächsten Morgen mit 0,8 Volumen Isopropanol und eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl Bideest aufgenommen.

### *3.5.2 DNA Isolation aus EDTA-Blut*

Die DNA wurde aus EDTA-Vollblut nach einem modifizierten Protokoll von Miller et al. (1988) isoliert. 5 ml EDTA-Blut wurden mit 45 ml Lyse-Puffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und bei 1500 U/min bei 7°C zentrifugiert. Das Pellet kernhaltiger Zellen wurde in 5 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8 mit NaOH) nach Zugabe von 25 µl Proteinase K (Sigma; 20 mg/ml) und 250 µl SDS (20%) über Nacht bei 37°C proteolytisch aufgeschlossen. Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von 2 ml 5 M NaCl, Vortexen und Zentrifugation bei 2500 U/min für 15 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde dann in ein neues Röhrchen überführt und die darin enthaltende DNA mit 2 Volumen 100% Ethanol und 1/10 3M Na-Azetat pH 5,4 gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol und Trocknung wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst.

### *3.5.3 Amplifikation von DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)*

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Dabei werden zwei kurze Oligonukleotide als "Primer" verwendet, die zu den Enden der gewünschten DNA-Sequenzen komplementär sind. Durch wiederholte Zyklen von Aufschmelzung der DNA-Stränge (Denaturierung), Anlagerung der Primer (Annealing) und Auffüllen der

freien 3'-Enden (Elongation) mit einer thermostabilen DNA Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) wird ein spezifischer DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt. Ein typischer präparativer Reaktionsansatz (50 µl) enthielt etwa 100 ng genomische DNA als Matrize (Template), 10 nmol jedes Primers, 50 nmol Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), und 2 U Taq-Polymerase in entsprechendem PCR-Puffer. Im Allgemeinen wurden 30 bis 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 30 sec. Die Annealingtemperatur ist in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer zu wählen. Als Näherung gilt:  $T_{\text{Annealing}} = \{4 \cdot (\text{G,C}) + 2 \cdot (\text{A,T})\} \text{ °C}$

Die Annealingzeit beträgt etwa 30 sek. Die Zeit der Elongation bei 72 °C ist von der Größe des zu amplifizierenden Fragments abhängig. Als Näherungswert gilt eine Elongationszeit von 1 min für ein Fragment von der Größe einer Kilobase.

#### Verwendete Primer:

cf ATP6 1F	tct gct aaa att gct ggt caa	ATP6 Gen
cf ATP6 1R	att gga tta ggt gtac ctg	ATP6 Gen
cf ATP8 1F	ccc tct ccc cct aat tcc	ATP8 Gen
cf ATP8 1R	ggg ctt ggg ttg act atg tg	ATP8 Gen
cf 3279-F	cct gac ccc tag cca tga t	tRNA Ile, Gln, Met
cf 3970-R	cag tgc gag ctt agt agt acg	tRNA Ile, Gln, Met
cf 3658-F	tgt tgc ctt acc cat tat cac	tRNA Ile
cf 3827-R	ccc gat agc tta att tag ctg	tRNA Ile
cf 2573-F	atg taa ggc cta cct cac aga g	tRNA Leu <sup>(UUR)</sup>
cf 2806-R	gag gaa ggc tac ggc aag	tRNA Leu <sup>(UUR)</sup>
cf 4810-F	cac cgc act tac cat att tcc	tRNA Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr
cf 5442-R	gga tga gga ggc tca aag c	tRNA Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr
cf 6520-F	gag gat ttg ccc act gat tc	tRNA Ser <sup>(UCN)</sup> , Asp
cf 7255-R	agg gaa ggt aga gcg att agg	tRNA Ser <sup>(UCN)</sup> , Asp
cf 6823-F	ttg agt gac tac atg gat gtc c	tRNA Ser <sup>(UCN)</sup>
cf 7052-R	tgc gtc ctg taa tcc gag	tRNA Ser <sup>(UCN)</sup>
cf 7676-F	ccc cta tct tac ttt gag acc tg	tRNA Lys

cf 7902-R	ttg gtt atc ggg ttt tct gg	tRNA <sup>Lys</sup>
cf 9331-Fneu	aac cac cac ttc gga ttt g	tRNA Gly, Arg
cf 10064-Rneu	tgc tgg cta atg tga ggt g	tRNA Gly, Arg
cf 11251-F	ctc ctt ccc cta ata gca gc	tRNA His, Ser, Leu <sup>(CUN)</sup>
cf 11824-R	gag gat ata atg atg ggc aaa g	tRNA His, Ser, Leu <sup>(CUN)</sup>
cf 910-F	ccg tca ccc tcc tca agt a	tRNA Val
cf 1191-R	cgg tac tat ctc tat cgc tcc	tRNA Val
cf 14016-F	caa gcc cac cat aaa tag gag	tRNA Gln
cf 14532-R	cga tat aag gga tgg cag ag	tRNA Gln
cf 15014-F	gca ccc ttt cat cat tat cg	tRNA Thr, Pro
cf 15711-R	agg gac att acg agc aag g	tRNA Thr, Pro

#### 3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurden Agarosegele in einer Konzentrationen von 2% hergestellt. Zur Detektion der DNA-Banden wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) verwendet, der in die DNA interkaliert und sie so im UV-Licht (254 nm) sichtbar macht. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Auftragspuffer (0,05 % Xylencyanol, 0,05 % Bromphenolblau, 15 % Ficoll 400) versetzt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (890 mM Tris/HCl, 890 mM Borsäure, 5 mM EDTA, pH 8,3). Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen.

#### *Isolierung von DNA aus Agarosegelen*

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem "GFX-PCR DNA and Gel-Band Purification Kit" (Amersham Biosciences) aufgereinigt. Dazu wurde das Gelstück gewogen und in der dreifachen Menge

eines chaotropen Puffers bei 50°C aufgeschmolzen. Die Lösung wurde auf Silikagelsäulen geladen und zentrifugiert (11.000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl leicht alkalischem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) oder H<sub>2</sub>O und Zentrifugation (14 000 rpm, 1 min, Tischzentrifuge) eluiert.

#### *Ethanol-fällung*

Durch Ethanol-fällung kann DNA konzentriert und von Salzen befreit werden. Dazu wird eine DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) und dem 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt und wahlweise bei –20°C über Nacht oder eine Stunde bei –80°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (14 000 rpm, 40 min, 4°C, Tischzentrifuge) isoliert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min im Vakuum getrocknet und in der gewünschten Menge H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### *3.5.5 Photometrische Quantifizierung von DNA*

Die Konzentration der DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA.

#### *3.5.6 Restriktionsverdau von DNA*

Die Restriktionsendonuklease *Apal* spaltet doppelsträngige DNA-Moleküle entsprechend ihrer spezifischen Erkennungssequenz GGGCCC. Die Reaktionen wurden mit dem vom Hersteller (Promega, USA) empfohlenen Inkubationspuffer (Puffer B) durchgeführt. Es wurde jeweils 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde

zwischen 0,1 und 1,0 µg/µl gewählt. Die Inkubation ging über Nacht bei der für das Enzym angegebenen Temperatur (30 °C). Die entstehenden Fragmente wurden durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert.

### *3.5.7 Sequenzierung von DNA*

Die Sequenzierung von DNA wurde mit einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei der automatischen DNA-Sequenzanalyse werden DNA-Fragmente, die am 3'-Ende basenspezifische Fluoreszenzmarkierungen tragen, der Größe nach aufgetrennt und anhand der Markierung identifiziert. Durch Mischen von markierten Nukleotiden (ddNTPs), die zum Kettenabbruch bei der DNA-Synthese führen, mit dNTPs erhält man in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer Abbruchfragmente jeder Länge. Die benötigten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) synthetisiert. Dazu wurden in einem 10 µl Ansatz 10-100 ng DNA, 10 pmol Primer und 2 µl des Polymerase-Mix eingesetzt. Eine Sequenzier-PCR bestand aus 25 Zyklen mit je 15 sek Denaturierung bei 94 °C, 15 sec Annealing bei 52 °C und 40 sec Elongation bei 60 °C. Zur Aufarbeitung der Sequenzierreaktion wurden die PCR-Produkte mit 170 µl Fällungsmix (125 µl Ethanol, 5 µl 3M Na-Azetat pH 4,8, 40 µl H<sub>2</sub>O) 30 min präzipitiert und zentrifugiert (14 000 rpm, 40 min, 4 °C, Tischzentrifuge). Die Pellets wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl Formamid aufgenommen. Die Proben wurden bei 95 °C denaturiert, sofort 5 min auf Eis gekühlt und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### *3.5.8 Southern Blot- Analyse*

Die Southern Blot Analyse diente in dieser Arbeit der Erkennung größerer Längenmutationen der mtDNA. Hierzu wurde aus Muskel gereinigte Gesamt-

DNA (je 4 µg) mit Restriktionsenzymen verdaut, die die mtDNA bekannterweise einmal (*HindIII*) oder mehrmals (*ApaI*, *EcoRI*) schneiden. Die entstehenden Fragmente wurden auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel mit Hilfe eines Orbitalschüttlers für 30 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 N NaOH/1,5 M NaCl) leicht geschwenkt und anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O abgespült. Zum Neutralisieren der DNA inkubierte man das Gel 30 Minuten in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris HCL pH 7,0/1,5 M NaCl). Im nächsten Schritt wurde die DNA auf eine spezielle Nylonmembran transferiert. Hier wird unter Ausnutzung der Kapillarkräfte ein Hochsalzpuffer (10xSSC-Puffer= 1,5M NaCl/0,15M NaZitrat, pH 7,0) durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Dabei wandert die DNA mit und bleibt auf der Membran haften. Vor Aufbau des Transferstapels wurde das vorbehandelte Gel für 30 Minuten in 20xSSC-Puffer inkubiert. Das „Blotsandwich“ bestand aus in Puffer getränkten Whatman-Filterpapieren, dem Gel, der Nylonmembran, mehreren Lagen trockenen Zellstoffpapierr und einer Abdeckplatte. Der Transferstapel wurde in einer Wanne mit 20xSSC-Puffer getränkt. Nach 12 h Transfer erfolgte eine kovalente Bindung der DNA an die Nylonmembran durch UV-Licht (UV-Stratalinker).

Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran 2 h im Hybridisierungssofen bei 80°C gebacken und danach in die Hybridisierungsröhre gegeben. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden 1 h 5-7 ml des Hybridisierungspuffers (6 M Harnstoff, 0,1% SDS, 0,5x SSC-Puffer) in die Hybridisierungsröhre gegeben (Prähybridisierung). Anschließend wurde eine zuvor vorbereitete mtDNA-Sonde zum Hybridisierungspuffer gegeben und bei 42°C über Nacht bei laufendem Rotationsmotor inkubiert.

Zur Herstellung der spezifischen mtDNA-Sonde wurde die gesamte kanine mtDNA zunächst in vier überlappenden Fragmenten PCR-amplifiziert (Primer cf910F/cf5442R, cf4810F/cf10064R, cf9331F/cf14532R). Die PCR-Fragmente wurden über ein Agarose-Gel gereinigt, vereinigt und anschließend mit Hilfe des ECL Direct Nucleid Acid Labelling Kit (Amersham) markiert. Hierzu wurde

der DNA Mix (20 µl) mit 44 µl Aqua bidest verdünnt, für 5 min gekocht und danach sofort für weitere 5 min in kaltes Eiswasser gegeben. Der Ansatz wurde mit 70 µl Labellinreagenz und 70 µl Glutaraldehyd gemischt, für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend als mtDNA-Sonde für die Hybridisierung verwendet. Nach dem Waschen mit 2x SSC-Puffer wurde die Membran auf einem Filterpapier kurz angetrocknet und für 1 Minute mit 12 ml Detektions-Reagentien bedeckt, danach in Haushaltsfolie eingeschlagen. In einer Filmkassette mit Verstärkerfolie wurde ein Röntgenfilm für 1-5 Minuten auf den Blot aufgelegt und anschließend im Entwicklungsgerät CURIX 60 entwickelt.

### 3.5.9 Haplotypenanalyse

Die Amplifizierung, Aufreinigung und Sequenzierung der gewünschten DNA-Abschnitte – ein 261 Basenpaar großes Fragment aus dem hochvariablen D-Loop der kaninen mtDNA- mittels PCR geschah nach dem gleichen Protokoll wie bereits beschrieben (*siehe 3.6.3 - 3.6.7*).

Anschließend wurde ein Stammbaum mit den Sequenzen, mit dem Programm MegAlign aus der Reihe DNASTAR (Clustal, Standardparameter) erstellt.

Verwendete Primer:

cf 15401 1F	aag ctc ttg ctc cac cat cag c	D-Loop
cf 15662 1R	gac cct tat tgg act aag tg	D-Loop
cf 15430 2F	gct gag att ctt ctt aaa cta ttc c	D-Loop
cf 15679 2R	tcg agg cat ggt gat taa gc	D-Loop



### 3.6 Chemikalien und Geräte

#### Chemikalien

Agfa-Gevaert, München: Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme

Amersham-Pharmacia, Freiburg: ECL Reagenz

AppliChem GmbH, Darmstadt: Mayers Hämatoxylin Lösung A 0884

Biozym, Hess. Oldendorf: Agarose

Dako, Cytomation, Hamburg, Deutschland: Antikörper

Fermentas, St. Leon-Rot: Taq-Polymerase,

Kindler GmbH & Co, Freiburg: Eukitt®

Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat XR

Macherey-Nagel, Düren: Filterpapier, Gelextraktionskit

Merck KgaA, Darmstadt: Eosin G (Nr. 1.15935), Xylol (Nr. 8681)

New England Biolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme

Paraplast Plus®: Sherwood Medical Co., St. Louis, Mo, USA: Paraffin

Promega, Heidelberg: Restriktionsenzym *Apal*

Roth, Karlsruhe: Puffersubstanze

Schleicher und Schüll, Dassel: Nitrozellulosemembran

Sigma München: Proteinase K

Vector, Burlingame, USA: Diaminobenzidin

Von der Firma Merck, Darmstadt sowie Firma Roth, Karlsruhe wurden alle übrigen Chemikalien als analysenreine Substanzen bezogen

#### Geräte

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipette

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Curix 60

Applied Biosystems, Darmstadt: Abi Prism 310 Genetic Analyzer, Gene Amp PCR System 9700

Bachofer, Reutlingen: Tischzentrifugen

Beckman Instruments, München: Tischzentrifuge Optima TL

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifuge (kühlbar), Reaktionsgefäße, Thermomixer

Hypercenter XP<sup>®</sup>, Fa. Shandon: Einbettgerät

Janke&Kunkel, Staufen: Vortex-Mixer

Leica, Deutschland: Rotationsmikrotom

Perkin Elmer, Überlingen: Gene Amp PCR System 9600

Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-160A

Sigma, München: Elektrophoresekammern für Agarosegele

Varian, Paolo Alto, USA: Varian-Vista ICP OES Simultan-Spektrometer

Zeiss EM10: Elektronenmikroskop

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Retrospektive Betrachtungen

#### *4.1.1 Klinische Symptomatik der subakuten nekrotisierenden Enzephalopathie beim Yorkshire Terrier*

Für diese Arbeit standen 10 Yorkshire Terrier zur Verfügung, deren Erkrankung auf Grund der klinischen Symptomatik und insbesondere der Befunde der bildgebenden Verfahren als subakute nekrotisierende Enzephalopathien diagnostiziert und zur weiteren neuropathologischen Abklärung nach der Euthanasie an das Institut für Tierpathologie der Tiermedizinischen Fakultät, LMU München, übersandt wurden. Hier zeichneten sich bereits in anfänglichen neuropathologischen Untersuchungen und unter Einbezug bildgebender Verfahren die typischen Anzeichen des „kaninen Leigh-Syndrom“ ab (*Matiasek et al., 2002*).

Im Verlauf der klinischen Untersuchungen, die in unterschiedlichen Tierkliniken vorgenommen wurden, zeigte sich bei allen betroffenen Hunden ein monophasisch progressiver Krankheitsverlauf mit Bewegungsstörungen, Verhaltensänderungen und Visusverlust, die sich meist schon im ersten Lebensjahr manifestierten. Die Bewegungsstörungen umfassten Ganganomalien, Ataxien, Hypermetrien und spastische Tetraparesen. Zusätzlich konnte bei allen Tieren ein kompletter Verlust der Haltungs- und Stellreaktionen nachgewiesen werden (*Abbildung 3*).



**Abbildung 3:** Yorkshire Terrier mit propriozeptiven Defiziten,  
Ausfall der Korrekturreaktion vorne.

Verhaltensänderungen wie akute bis subakute Episoden von Drangwandern und Desorientiertheit traten vor allem schon im juvenilen Alter oder im frühen Erwachsenenstadium auf. Sie stellten oft die ersten Anzeichen dar, die von den Besitzern bemerkt wurden. Meist kam es innerhalb einer kurzen Zeit zu einer fatalen Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Erst im späteren Verlauf dieser Studie konnte ein Alaskan Husky identifiziert werden, der durch eine Leigh-Syndrom typische Symptomatik auffiel. Im Gegensatz zu den Yorkshire Terriern zeigte er einen langsameren und rezidivierenden Krankheitsverlauf über acht Jahre hinweg. Die neuropathologischen Veränderungen waren allerdings mit denen der Yorkshire Terrier identisch.

*Tabelle 4* fasst die verschiedenen klinischen Symptome der 10 erkrankten Yorkshire Terrier und des Alaskan Husky mit den Ergebnissen der neurologischen Untersuchung zum Zeitpunkt des ersten Vorstellens beim Tierarzt zusammen.

**Tabelle 4: Klinische Präsentation**

<b>Symptome</b>	<b>412</b>	<b>119</b>	<b>361</b>	<b>627</b>	<b>702</b>	<b>631</b>	<b>352</b>	<b>423</b>	<b>594</b>	<b>61</b>	<b>A.Husky 116</b>
<b>Erkrankungsbeginn</b>	7,5 Mo	6 Mo	18 Mo	18 Mo	5 Mo	5 Mo	< 4 Mo	< 6 Mo	12 Mo	5 Jahre	7 Mo
<b>Geschlecht</b>	m	w	w	w	m	w	w	m	m	m	m
<b>Auftreten</b>	akut	akut	akut	schleichend	akut	schleichend	?	akut	akut	schleichend	akut
<b>Dauer der Erkrankung</b>	1 Wo	1 Wo	1 Wo	?	2 Mo	6 Mo	2 Mo	?	1 Wo	?	8 Jahre
<b>Initialsymptome</b>	Gang-anomalien	Gang-anomalien	Anfälle	Desorientiertheit	Gang-anomalien	Gang-anomalien	Gang-anomalien	Gang-anomalien	Gang-anomalien	Gang-anomalien	Gang-anomalien
<b>Bewusstsein</b>	aufmerksam	stuporös	reduziert	stuporös	reduziert	reduziert	aufmerksam	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert
<b>Anfälle</b>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>Drangwandern</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Oberes motor. Neuron</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Hypermetrie</b>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>Veränderte Haltungs- u. Stellreaktion</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Zentraler Visusverlust</b>	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	-
<b>Drohreaktion</b>	fehlte bilateral	fehlte unilateral	fehlte bilateral	?	fehlte bilateral	fehlte bilateral	fehlte bilateral	fehlte bilateral	fehlte bilateral	fehlte bilateral	fehlte bilateral
<b>Dysphagie</b>	+	-	-	+	?	+	-	-	+	+	-
<b>Taubheit</b>	?	-	+	-	?	-	-	-	+	-	-

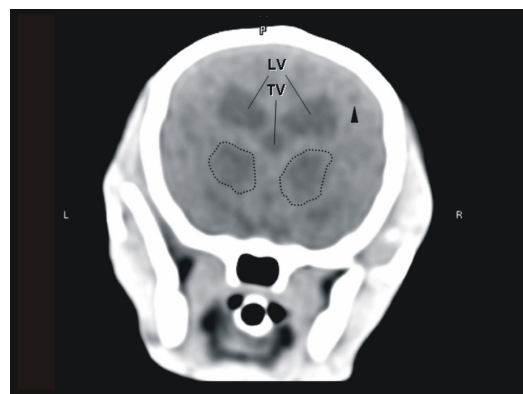
#### 4.1.2 Bildgebende Diagnostik

Das Leigh-Syndrom der Yorkshire Terrier und Alaskan Huskies stellt eine Erkrankung der grauen Hirnsubstanz dar, die Basalganglien, Diencephalon, Hirnstamm, Kleinhirn und zerebrale Kortexareale betreffen kann.

Transversale computertomographische Aufnahmen, die im Rahmen der Diagnostik in den Tierkliniken gemacht und dem Institut für Tierpathologie zur weiteren Klärung zur Verfügung gestellt wurden, zeigen multifokale bilateralsymmetrische Läsionen, die sich als hypodense Areale in der grauen Substanz des Prosenzephalons darstellen (*Abbildung 4*). Diese Läsionen im Thalamus präsentieren sich typischerweise als ovoide hypodense Areale, die sich lateral des dritten Ventrikels und ventral der Seitenventrikel befinden. In den hoch auflösenden MRT-Aufnahmen des Gehirns (nicht gezeigt) finden sich entsprechende, mit Flüssigkeit gefüllte Malaziefelder, die noch ein trabekuläres Netzwerk an Geweberesten beinhalten und ein „Tiger-Auge“ ähnliches Aussehen aufweisen, und damit insgesamt dem neuropathologischen Bild des kaninen Leigh-Syndroms entsprechen (*Matiasek et al., 2002*).

**Abbildung 4:** Transversale Computertomographische Aufnahme:

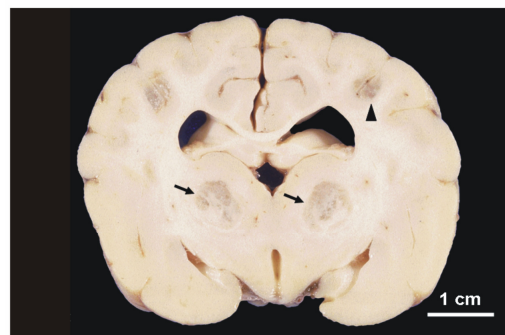
LV: Lateralventrikel; TV: Tertiärventrikel;  
Pfeilkopf: Hypodense Areale an der Basis  
einiger temporaler Großhirn-Sulci;  
gepunktete Umrandung: Malaziefelder im  
Thalamus (Tier 412).



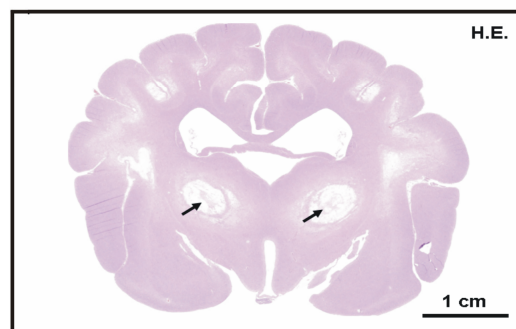
## 4.2 Patho-morphologische Befunde

Bereits bei der makroskopischen Untersuchung am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie zeigten sich im frischen Gewebe bei transversaler Schnittführung die für das humane Leigh-Syndrom (*Leigh, 1951*) typischen mit Wasser gefüllten Kavitäten auf Höhe des Diencephalons (*Abbildung 5*). Im Gegensatz zum restlichen Gewebe nahm dieser Bereich eine verstärkte Graufärbung an. In der Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung stellten sich diese Kavitäten in den Basalganglien und im Thalamus als netzartige Gewebereste innerhalb eines nekrotischen Areals dar (*Abbildung 6*). Ähnliche nekrotische Gewebeveränderungen konnten ebenfalls mit einer multifokalen, bilateral-symmetrischen Verteilung an der Basis zahlreicher frontaler, temporaler und parietaler Großhirn-Sulci diagnostiziert werden.

**Abbildung 5:** Makroskopisches Bild derselben Malaziefelder wie in der CT-Aufnahme. (*Abbildung 4*). Pfeile: Malaziefelder im Thalamus eines an Leigh-Syndrom erkrankten Yorkshire Terrier, Pfeilkopf: Malaziefelder an der Basis einiger temporaler Großhirn-Sulci (Tier 631).



**Abbildung 6:** Hämatoxylin-Eosin Übersichtsfärbung eines transversalen Gehirnschnittes. Die Pfeile markieren die Malaziefelder im Thalamus (Tier 631).



Histopathologisch ist die Zerstörung des Nervengewebes im Gehirn durch eine Trias von Nervenzellverlust, Gliazelldegeneration und vaskulärer Proliferation gekennzeichnet. Allerdings zeigt sich in den einzelnen Regionen eine unterschiedliche Betroffenheit der Zelltypen (*Tabelle 5*). In den Basalganglien, im Thalamus und im Hirnstamm beruht der Gewebeuntergang hauptsächlich auf dem Abbau der Neuroglia. Die Neuronen erscheinen in diesen Gebieten vital (*Abbildung 7a*). Die zerebrokortikalen und zerebellären Läsionen werden dagegen eher durch fortschreitende Nervenzelluntergänge geprägt. Innerhalb des Großhirnkortex sind chromatolytische Neuronen mit veränderten Nuklei sowie nekrotische Nervenzellen mit der typischen Hypereosinophilie und einer Vakuolisierung erkennbar (*Abbildung 7f*).

Eosinophile Nervenzellnekrosen sind vor allem in der Purkinje-Zellschicht des mittleren Kleinhirn-Vermis und unterschiedlichen isokortikalen Laminae zu beobachten (*Abbildung 7g*). Normalerweise wird die Molekularschicht durch eine Anreicherung von Purkinjezellen von der Granularschicht der Kleinhirnkortex getrennt (*Abbildung 7h*). In betroffenen Arealen, wie vor allem im mittleren Teil des Vermis, zeigt sich ein kompletter Verlust an Neuronen, der von reaktiver Bergmann Glia begleitet wird (*Abbildung 7i*). Zusätzlich lassen sich ödematisierte Gliazellen nachweisen und geben der Molekularschicht ein gestreiftes Aussehen. Ein Fortschreiten der Erkrankung führt zu weiteren Verlusten von Nervenzellen in der Granularschicht und schließlich auch in der Molekularschicht, während die reaktive Gliose im Gewebe deutlich zunimmt (*Abbildung 7j*).

Die spezifischen Färbungen und immunhistologischen Darstellungen zeigen deutlich das trabekuläre Netzwerk (*Abbildung 7b*), das in den Malaziefeldern der grauen Substanz des Prosenzephalons übrig geblieben ist. Diese bestehen hauptsächlich aus myelinisierten Fasern (*Woelcke-Spielmeier-Schröder-Färbung, Abbildung 7c*), Kapillaren (*von-Willebrand-Faktor, Abbildung 7d*) und demyelinisierten Axonen (*Bodian-Färbung, Abbildung 7e*).



**Abbildung 7:**

**(a)** Luxol-Fast-Blue-Färbung (LFB): Vitale Neuronen (roter Pfeil) und Makrophagen bei der Beseitigung zerstörter Neuroglia (schwarze Pfeile).

**(b)** Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE): Trabekuläres Netzwerk (Pfeil), das in den Malaziefeldern übrig bleibt.

**(c)** Woelcke-Spielmeyer-Schröder-Färbung (WS): Das Netzwerk besteht hauptsächlich aus myelinisierten Fasern (roter Pfeil).

**(d)** In der Immunhistochemie mit von-Willebrand-Faktor (vWF) werden Kapillaren dargestellt (Pfeile).

**(e)** Bodian-Färbung (BS): demyelinisierte Axone.

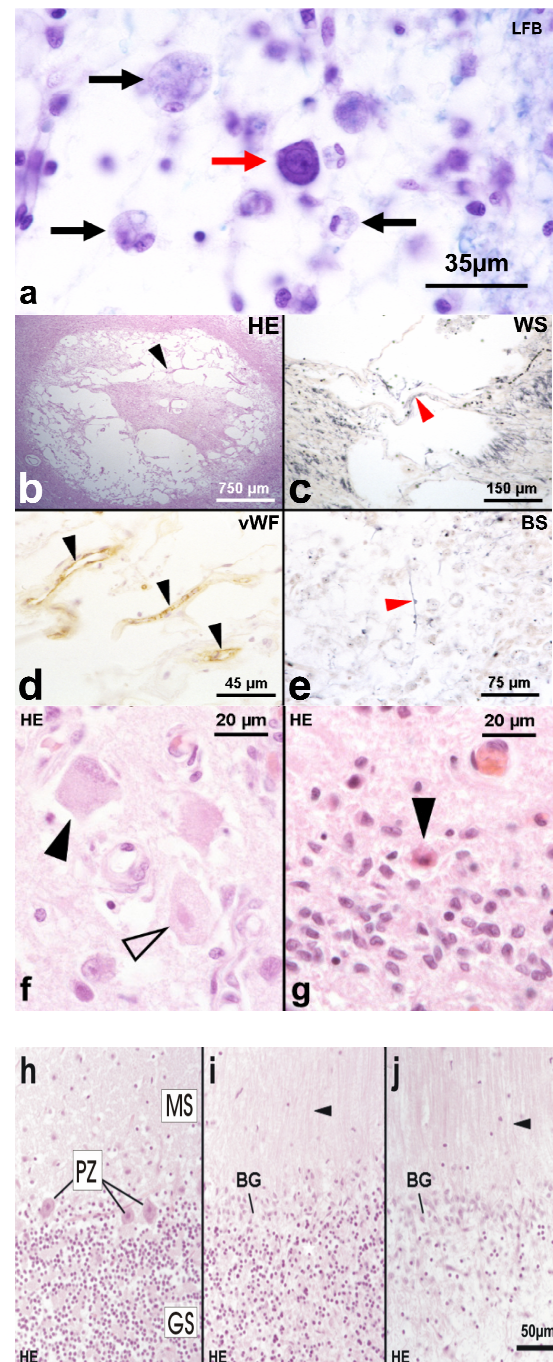
**(f)** HE-Färbung: Chromatolytische Nervenzellen (schwarzer Pfeil) und hyper-eosinophile, vakuolisierte Nervenzellen (leerer Pfeil).

**(g)** Eosinophile Nervenzellnekrose (Pfeil).

**(h)** Kleinhirn: Purkinje-Zellen (PZ) trennen Molekularschicht (MS) und Granularschicht (GS) (Normalbefund).

**(i)** Verlust von Purkinje-Zellen, die von Bergmann Glia (BG) ersetzt wird. Die geschwollenen Gliazell-Ausläufer reichen weit in die Molekularschicht (Pfeil).

**(j)** Progressiver Verlust von Neuronen in Granular- und Molekularschicht, während die reaktive Gliose zunimmt.



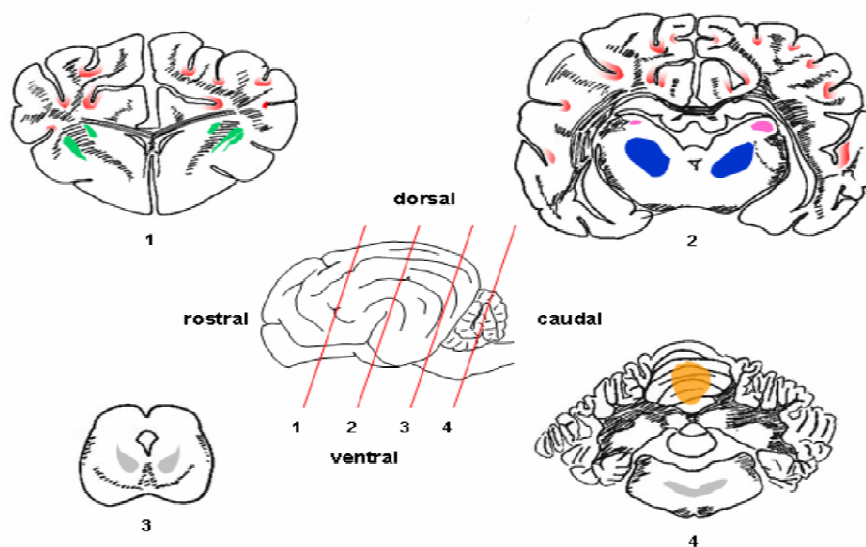
Als allgemeiner zytopathologischer Befund konnten im gesamten Gehirn der betroffenen Hunde Alzheimer Typ II-Astrozyten festgestellt werden. Diese Zellen sind als Indiz für eine systemische Stoffwechsellentgleisung zu verstehen.

Zusammenfassend zeigte sich das kanine Leigh-Syndrom als eine multifokale bilateral-symmetrische neurodegenerative Erkrankung. Das auffälligste pathologisch-morphologische Merkmal war die V-förmige Enzephalomalazie, die sich rostro-kaudal von den Basalganglien bis zur Formatio reticularis des verlängerten Rückenmarkes erstreckte (*Tabelle 5 und Abbildung 8*). Diese topographische Verteilung ist spezifisch für das kanine Leigh-Syndrom der Yorkshire Terrier und Alaskan Huskies (*Brenner et al., 2000; Matiasek et al., 2002*).

**Tabelle 5:**  
Unterschiedliche Betroffenheit der einzelnen Hirnregionen

	Großhirn-Kortex	Basalganglien	Thalamus	Corpora geniculata lateralia	Formatio reticularis (Mesenz.)	Formatio reticularis (Med. obl.)	Vermis
<b>Kavitäten</b>	(+)	+	+++	-	(+)	(+)	-
<b>Malazien</b>	++	++	+++	-	+	++	-
<b>Spongiöse Veränderungen</b>	+++	++	+++	+	++	+++	-
<b>Nervenzellnekrosen</b>	++	(+)	+	+	+	(+)	+++
<b>Glia-Degeneration</b>	++	++	+++	+	++	+++	(+)
<b>Gliose</b>	++	-	++	+	++	++	+++
<b>vaskuläre Proliferation</b>	+++	(+)	+++	+	++	++	-

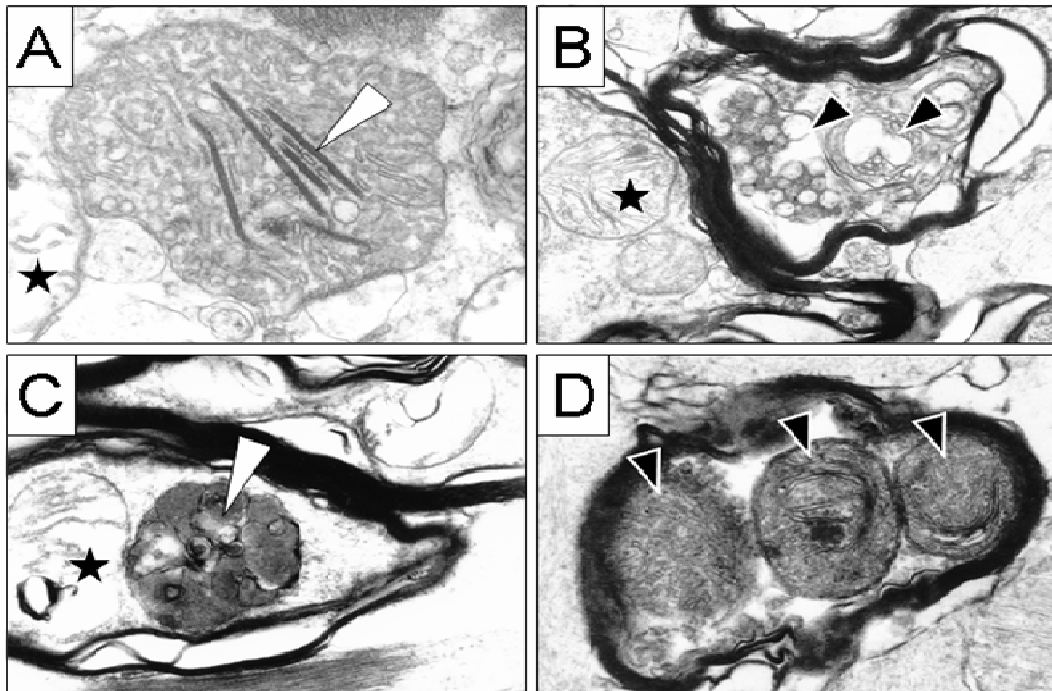
- = nicht nachweisbar; (+) nicht bei allen Tieren nachweisbar, unterschiedlich stark nachweisbar: + = mild; ++ = mittel; +++ = stark (Mesenz.: Mesenzephalon; Med. obl.: Medulla oblongata)



**Abbildung 8: Die spezifische Verteilung der Läsionen in Gehirnen bei Leigh-Syndrom:** an der Basis der Großhirn-Sulci (rot), in den Basalganglien (grün), im Thalamus (blau), den lateralen Corpora geniculata (rosa), der Formatio reticularis (grau) und im Kleinhirn (gelb).

#### 4.2.1 Weiterführende morphologische Untersuchungen

Da das humane Leigh-Syndrom eine Mitochondriopathie darstellt und um einer mitochondrialen Dysfunktion als möglichen Ursache der systemischen Stoffwechselstörung näher zu kommen, wurden Skelettmuskelproben, periphere Nerven und Hirnproben elektronenmikroskopisch genauer untersucht. Im Vergleich zu Kontrollgewebe zeigte sich eine mild veränderte Mitochondrienmorphologie mit ungleichen und teilweise fehlenden Cristae und zahlreichen vakuolären Einschlüssen (*Abbildung 9*). Zudem war die Anzahl der Mitochondrien erhöht. Somit zeigten sich alle drei Hauptmerkmale einer Mitochondriopathie: (i) eine abnormale Cristae-Struktur, (ii) parakristalline und elektronendichte Einschlüsse, sowie (iii) eine Mitochondrienvermehrung. Diese Ergebnisse wiesen somit auf eine möglicherweise ursächliche Beteiligung der Mitochondrien am kaninen Leigh-Syndrom hin. Bei einer Gomori-Trichrom-Färbung (modifiziert nach Engel) von Skelettmuskelproben konnten keine sog. „ragged red fibers“ (RRFs) sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 9:** In Abbildung A und D sind vor allem die deformierten Cristae (Pfeile) zu sehen. Abbildung B und C zeigen parakristalline Einschlüsse. Die Sterne zeigen Mitochondrien mit deutlichem Cristae-Verlust.

### 4.3 Biochemische Untersuchungen

#### *4.3.1 Enzymaktivitäten der mitochondrialen Atmungskette*

Alle bisher beim Menschen in Assoziation mit Leigh-Syndrom identifizierten Mutationen betreffen die mitochondriale oxidative Energiegewinnung. Bei etwa 25% Prozent aller Patienten liegt der Erkrankung ein isolierter Defekt des Komplexes I der Atmungskette zu Grunde. Bei etwa einem Drittel der Patienten wird das Leigh-Syndrom durch eine isolierte Defizienz des Komplexes IV verursacht und bei 20% aller Patienten konnte eine gestörte Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase diagnostiziert werden. Darüber hinaus gibt es Berichte über weitere ursächliche Defekte in einer mitochondrial kodierten ATPase-

Untereinheit, sowie in mitochondrial kodierten tRNA Genen (*MITOMAP; Übersichtsreview Schapira, 2002*).

Auf Grundlage der Kenntnisse über die Ursachen des Leigh-Syndroms beim Menschen und der bereits nachgewiesenen veränderten Mitochondrienmorphologie bei den Hunden wurde die Annahme aufgestellt, dass das kanine Leigh-Syndrom ebenfalls durch Defekte der mitochondrialen Energiegewinnung verursacht wird (*Brenner et al., 2000; Matiasek et al., 2002*).

Um diese Annahme zu untersuchen, wurden die Aktivitäten der einzelnen Komplexe der Atmungskette bei betroffenen Hunden gemessen.

Die Diagnose einer gestörten Funktion der Enzymkomplexe erfolgt beim Menschen durch Enzymaktivitätsmessungen an Muskelhomogenaten (*Fischer et al., 1986*). Um falsch-erniedrigte Ergebnisse zu verhindern, muss die Muskelbiopsie sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff (-196°C) tief gefroren werden. Entsprechend behandeltes Probenmaterial stand von zwei der zehn Tiere zur Verfügung (Tiere 412 und 119). Die Referenzbereiche der Komplexaktivitäten beim Menschen basieren auf Messungen von Muskelhomogenaten gesunder Probanden verschiedenen Geschlechts und Alters. Um einen Hunde-spezifischen Referenzbereich für die Enzymaktivitäten der Komplexe I – IV zu erstellen, wurde Muskelmaterial von elf neuro- und myologisch unauffälligen Hunden aus der I. Medizinischen Tierklinik München untersucht (*Tabelle 3*).

Die Biopsieproben der beiden Yorkshire Terrier sowie der Kontrolltiere wurden homogenisiert; der postnukleäre Überstand nach Zentrifugation wurde zur Messung der Aktivitäten von Komplex I (NADH-CoQ Oxidoreduktase), Komplex II und III (Succinat-Cytochrom c Oxidoreduktase) sowie Komplex IV (Cytochrom

c Oxidase) eingesetzt. Auf Grund der zu geringen Probenmenge musste auf eine zusätzliche Messung der Pyruvat-Dehydrogenase verzichtet werden. Als mitochondriales Markerenzym wurde die Aktivität der Zitratsynthase gemessen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich bei dem Hund 412 eine signifikante Erniedrigung der Aktivitäten der Komplexe I und IV (*Tabelle 6*). Die Aktivität des Komplexes I war mit 10 U/g Protein auf 55% des niedrigsten Wertes des Referenzbereiches (18-45 U/g Protein) reduziert. Bei Komplex IV lag der absolute Wert der Enzymaktivität bei 59 U/g Protein und entsprach damit 45% des unteren Grenzwertes des Referenzbereiches (130-260 U/g Protein) für die Cytochrom c Oxidase. Wurden diese Aktivitätswerte auf das Markerenzym Zitratsynthase bezogen, um eine Quantifizierung des Anteils mitochondrialer Enzyme zu ermöglichen, so waren die Aktivitäten der Komplexe I und IV auf 60% bzw. auf 41% reduziert. Bei dem Hund 119 lagen alle gemessenen Aktivitäten im Referenzbereich. Bezogen auf die Zitratsynthase, die bei diesem Tier leicht erhöht war und ein Indiz für eine kompensatorische Vermehrung der Mitochondrien darstellt, ergaben sich für Komplex I und IV leicht erniedrigte Werte (90%, bzw. 88% des unteren Wertes des jeweiligen Referenzbereichs, *Tabelle 6*). Die Komplexe II und III waren bei beiden Tieren unauffällig.

Zusammenfassend zeigte sich also in der biochemischen Untersuchung von Skelettmuskelproben zweier betroffener Tiere bei einem Patienten, dem Yorkshire Terrier 412, ein kombinierter Defekt der Atmungskettenkomplexe I und IV, der mit einer Erniedrigung auf etwa 50 % deutlich ausgeprägt war. Beim zweiten Tier (119) konnte lediglich eine sehr milde Aktivitätserniedrigung der Komplexe I und IV festgestellt werden. Die Erhöhung der Aktivität der Zitratsynthase deutete auf eine mögliche kompensatorische, leichte Akkumulation der Mitochondrien im biopsierten Gewebe hin.

**Tabelle 6:** Aktivitätsmessungen der mitochondrialen Atmungskettenenzyme

Enzyme	Hund 412	Hund 119	Referenzbereich (n = 11)
Komplex I [U/g NKP]	10.0	29.8	18 - 45
Komplex I [U/U ZS]	0.12	0.18	0.22 - 0.36
Komplex II+III [U/g NKP]	8.4	13.1	10 - 30
Komplex II+III [U/U ZS]	0.1	0.08	0.08 - 0.21
Komplex IV [U/g NKP]	59	250	130 - 260
Komplex IV [U/U ZS]	0.71	1.5	1.7 - 2.4
Zitratsynthase (ZS) [U]	83	162	76 - 142

(U: Unit; NKP: Non-Kollagen-Protein; ZS: Zitratsynthase)

#### **4.4. Molekularbiologische Untersuchungen**

##### *4.4.1 Analyse von Kandidatengen des mitochondrialen Genoms*

Die biochemischen Untersuchungen zweier erkrankter Yorkshire Terrier (412, 119) deuteten auf einen milden, kombinierten Atmungskettendefekt als mögliche Ursache des kaninen Leigh-Syndroms beim Yorkshire Terrier hin. Zumindest bei diesen beiden Tieren konnten somit isolierte Defekte einzelner Atmungskettenkomplexe und die damit assoziierten Genmutationen in Struktur- oder Assemblierungsgenen ausgeschlossen werden.

Komplex I und Komplex IV sind diejenigen Komplexe mit den meisten mitochondrial kodierten Untereinheiten (*siehe Abbildung 1*). Reduzierte Aktivitäten mehrere Atmungskettenkomplexe bei gleichzeitiger normaler

Aktivität des ausschließlich nukleär kodierten Komplexes II deuteten auf eine allgemein gestörte Proteinbiosynthese mitochondrial kodierter Untereinheiten hin. Aus Untersuchungen am Menschen weiß man, dass Mutationen mitochondrialer tRNA-Gene häufige Ursachen kombinierter Atmungskettendefezenzen darstellen und sich dabei in erster Linie auf die Aktivitäten der Komplexe I und IV auswirken (*Wallace, 1994*). Da darüber hinaus schon pathogene Mutationen mitochondrialer tRNA-Gene beim Menschen in Assoziation mit dem klinischen Bild des Leigh-Syndroms beschrieben wurden (*Vilarinho et al., 1997; Koga et al., 2000*), erschienen mitochondriale tRNA-Gene als gute Kandidatengene für das canine Leigh-Syndrom.

#### 4.4.2. Sequenzierung mitochondrialer tRNA-Gene

Im Jahr 1997 wurde das mitochondriale Genom des Hundes erstmals vollständig sequenziert (*Kim et al., 1997*) (*GenBank U96639*). Sieben Jahre später wurde eine korrigierte Fassung von *Chang et al. (2004)* (*GenBank AY729880*) veröffentlicht, die in dieser Arbeit als Referenzsequenz benutzt wurde.

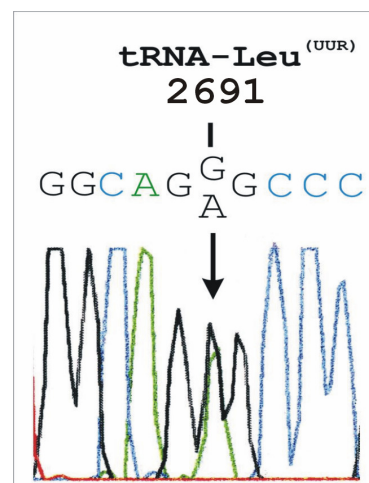
Anhand dieser Sequenz wurden spezifische Primer synthetisiert, die eine Amplifizierung aller 22 tRNA-Gene in Form elf verschiedener Genfragmente ermöglichten. Als Ausgangsmaterial stand von zwei Tieren (412 und 119) Muskelgewebe zur Verfügung, aus dem hochreine genomische DNA extrahiert werden konnte. Von den restlichen acht Tieren standen lediglich Paraffinschnitte von Geweben zur Verfügung. Die Reinigung aus diesem Material liefert weniger reine DNA, die zudem meist durch die Formalinbehandlung stark fragmentiert vorliegt. Aus diesem Grund gestaltete sich die Amplifizierung per PCR aus diesem Material deutlich schwieriger,



weswegen bei diesen Tieren zunächst nur diejenigen tRNA-Gene sequenziert wurden, die bereits beim Menschen mit dem Leigh-Syndrom oder anderen Formen fataler Enzephalopathien in Zusammenhang gebracht wurden. Dies waren die Gene für die tRNA-Leuzin<sup>(UUR)</sup> (Goto et al., 1990), tRNA-Lysin (Sakuta et al., 2003), tRNA-Tryptophan (Tulinius et al., 2003), tRNA-Glutamat (Bataillard et al., 2001) und die tRNA-Isoleuzin (Santorelli et al., 1995).

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und die spezifischen DNA-Banden anschließend über Säulen gereinigt und mit den Vorwärts- und Rückwärts-Primern sequenziert.

Die Sequenzanalyse der DNA-Fragmente identifizierte eine A nach G Mutation an der Nukleotidposition (np) 2691 in 4 von 10 untersuchten Tieren (Abbildung 10). Die Mutation betrifft eine evolutionär hoch konservierte Position im Gen für die tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>. Das Alignment von tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>-Sequenzen verschiedener Spezies aus einer öffentlichen Gendatenbank, von niederen Säugetieren wie dem Schnabeltier aus der Ordnung der Monotremata bis hin zum Menschen, zeigt durchgehend ein „A“ an dieser Position (Tabelle 7).



**Abbildung 10:** In der Sequenzanalyse kann ein heteroplasmatischer Basenaustausch von A nach G an der np 2691 festgestellt werden.

**Tabelle 7:** Das Alignment der tRNA Leu<sup>(UUR)</sup>-Sequenz verschiedener Säugetier-Spezies zeigt bei allen an der untersuchten Nukleotidposition ein Adenin als Base.

	Acc-Stem	D-Stem	D-Loop	D-Stem	Ac-Stem	Anticd-Loop	Ac-Stem	T-Stem	T-Loop	T-Stem	Acc-Stem	
Artibeus jamaicensis	GTAAAG	TG GCAG	AGACCGGTAA	TTGC	G TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TTCCC	AGAGG	TTCAAAGT	CCTCT	CTTTAAC A
Balaenoptera musculus	GTTGAGG	TG GCAG	AGTTCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	CACTC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCCAAC A
Balaenoptera physalus	GTTGAGG	TG GCAG	AGTTCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	TTTTA	CACCC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCCAAC A
Bos taurus	GTAAAGG	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	TTTTA	TATCC	AGAGA	TTCAAAT	CCTCT	CCTTAAC A
Canis familiaris	GTTAGGG	TG GCAG	AGCCCGGTAA	CTGC	G TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	CTATC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	CCCTAAC A
Dasyus novemcinctus	GTTAAGA	TG GCAG	AGACAGGTAA	TTGC	A TAAGA	CTTAAAC	CTTTA	TTACC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	TCTTAAC A
Equus asinus	GTTAGGG	TG GCAG	AGCCCGGAAA	TTGC	G TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	CACCC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCCTAAC A
Equus caballus	GTTAGGG	TG GCAG	AGCCCGGAAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	CACTC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCCTAAC A
Erinaceus europeus	GTTAGTG	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	TAACC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CTCTAAC A
Felis catus	GTTAGGG	TG GCAG	AGCCCGGTAA	CTGC	A TAAAA	CTTAAGC	TTTTA	TTATC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	CCTTAAC A
Gorilla gorilla	GTTAAGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TCGC	A TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	TAGTC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAAC A
Halichoerus grypus	GTTAGGG	TG GCAG	AGCCCGCAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TCTTC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCCTAAC A
Hippopotamus amphibius	GTTGCGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	CACC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	TCACAAC A
Homo sapiens	GTTAAGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TCGC	A TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	CAGTC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAAC A
Macropus robustus	ATTAAGG	TG GCAG	AGCCCGCAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TAATC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCTTAAT A
Mus musculus	ATTAGGG	TG GCAG	AGCCAGGAAA	TTGC	G TAAGA	CTTAAAA	CCTTG	TTCCC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAAT A
Ornithorhynchus anatinus	ATTAAGG	TG ACAG	AGACCGGTAA	TTGT	G TAAAA	CTTAAGC	TTTTA	TAGTC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCTTAAT A
Oryctolagus cuniculus	GTTAAGG	TG GCAG	AGCCCGTAA	TTGC	G TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	TAACC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCTTAAC A
Ovis aeries	GTTAAGG	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	G TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TACTC	AGAGA	TTCAAAT	CCTCT	CCTTAAC A
Pan paniscus	GTTAAGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TCGC	A TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	CAATC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTAAC A
Pan troglodytes	GTTAAGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	CAATC	AGAGG	TTCAATT	CCTCT	TCTTGAC A
Papio hamadryas	GTTAAGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAA	CTTTA	CACCC	AGAGG	TTCAACC	CCTCT	TCTTAAC A
Phoca vitulina	GTTAGGG	TG GCAG	AGCCCGCAA	TTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TCTTC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCCTAAC A
Rattus norvegicus	ATTAGGG	TG GCAG	AGCCAAGTAA	TTGC	G TAAGA	CTTAAAA	CCTTG	TTCCC	AGAGG	TTCAAAT	CCTCT	CCCTAAT A
Rhinoceros unicornis	GTTAGGA	TG GCAG	AGCCCGGTAA	CTGC	A TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TAACC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	TCCTAAC A
Sus scrofa	ATTAGGG	TG GCAG	AGACCGGTAA	TTGC	G TAAAA	CTTAAAC	CTTTA	TTACC	AGAGG	TTCAACT	CCTCT	CCCTAAT A

Wie bereits erwähnt wurde, ist der Austausch einer evolutionär konservierten Position eines der Hauptkriterien für die Pathogenität einer Mutation. Als weiteres Kriterium gilt, dass eine pathogene Mutation nicht bei gesunden Individuen gefunden werden darf (*DiMauro, 1997*). Um dies zu überprüfen, wurden elf gesunde Kontrolltiere (*Tabelle 3*) auf eventuelle Varianten in der Sequenz für die tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> untersucht. Entsprechend der Referenzsequenz fand sich bei allen Kontrolltieren an der Nukleotidposition 2691 ein Adenin als Base.

An der exakt korrespondierenden Stelle der humanen tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> (Position 3243) ist ein Basenaustausch von A nach G eine der häufigsten und bekanntesten pathogenen Mutationen innerhalb des mitochondrialen Genoms, die so genannte MELAS-Mutation (Mitochondrial encephalopathy, lactat acidosis, stroke like episodes) (*Goto et al., 1990*). Diese humane A3243G Mutation kann sich klinisch sehr unterschiedlich ausprägen und wurde bisher mit verschiedensten Phänotypen assoziiert, wie MELAS, MERRF (Myoclonic epilepsy and ragged red fibers) (*Verma et al., 1996; Fabrizi et al., 1996; Campos et al., 1996*), CPEO (Chronic progressive external ophtalmoplegia) (*Moraes et al., 1993*) oder Diabetes mellitus mit Taubheit (*Van den Ouweland et al., 1992*). In einigen Fällen wurde sie auch in Assoziation mit dem humanen Leigh-Syndrom beschrieben (*Koga et al., 2000*).

Die Identifizierung der A2691G Mutation bei den erkrankten Yorkshire Terriern zusammen mit den Erkenntnissen zur Pathogenität der korrespondierenden Position der humanen mtDNA deuteten darauf hin, dass die gefundene Mutation den krankheitsverursachenden Defekt bei vier von zehn Hunden darstellen könnte.

Dieser Basenaustausch wurde jedoch nicht bei allen erkrankten Tieren gefunden. Dies ließ darauf schließen, dass das Leigh-Syndrom bei Hunden – wie auch beim Menschen – eine heterogene Erkrankung darstellt und durch verschiedene Gendefekte ausgelöst werden kann.

Bemerkenswerterweise fand sich bei dem Patienten 119, der nur sehr milde biochemische Veränderungen in den Enzymkomplexen der Atmungskette und eine erhöhte Zitratsynthase aufwies, kein Basenaustausch an np 2691. Damit ließe sich also die unterschiedliche biochemische Präsentation der Tiere 412 und 119 durch das Vorhandensein unterschiedlicher genetischer Defekte erklären. Weitere Mutationen in anderen tRNA-Genen wurden bei keinem der hier untersuchten Tiere gefunden.

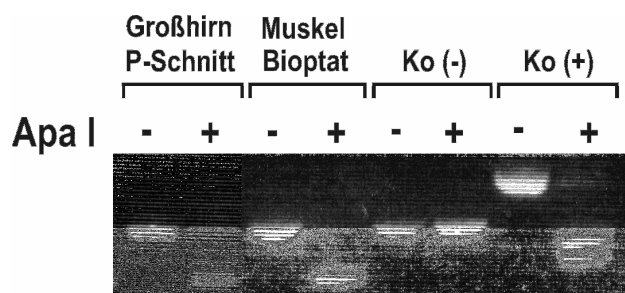
#### 4.4.3 Mutationsnachweis mittels RFLP

Der Austausch von A nach G an der Nukleotidposition 2691 in der mtDNA generiert eine neue Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *ApaI* (...GGGCC...). Dadurch ergibt sich ein schneller und sicherer Test für die Diagnose dieses Basenaustausches mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP). Ein die tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> umfassendes 233 Basenpaare großes DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und durch direkte Zugabe des *ApaI*-Enzyms über Nacht verdaut und zusammen mit einer nicht verdauten Probe auf ein Agarosegel aufgetragen (*Abbildung 11*). Bei Vorhandensein der Mutation A2691G kann das Enzym das Amplifikat in ein 111 bp und ein 122 bp großes Fragment schneiden. Im Falle der Wildtyp-Sequenz würde das 233 bp Fragment nicht geschnitten werden.

*Abbildung 11* zeigt die RFLP-Analyse von DNA-Fragmenten, die zum einen aus Paraffinschnitten des Großhirnes und zum anderen aus Muskelgewebe des

Tieres 412 amplifiziert wurden. Beide Proben zeigten sich im Vergleich zu einer Negativkontrolle (Tier 123) eindeutig positiv für die A2691G Mutation, wobei ein höherer Anteil mutierter DNA in der DNA aus Muskelgewebe zu finden war. Als Positivkontrolle diente ein genomisches DNA-Fragment, das eine *ApaI* Erkennungssequenz enthält. Die Restmengen an unverdauter DNA, die bei diesem Kontroll-Fragment erkennbar waren, können ein Hinweis darauf sein, dass trotz vorhandener Mutation oder Erkennungssequenz die DNA nicht vollständig verdaut wurde.

**Abbildung 11:**  
Agarosegel mit RFLP-Verdau. Es wurden jeweils unverdaute und verdaute Proben nebeneinander aufgetragen. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Ko-) sind Großhirn und Muskel des erkrankten Tieres eindeutig positiv.



#### 4.4.4 Ausschluss von mitochondrialen Deletionen und Mutationen in *ATPase-Genen*

Der oben beschriebene Basenaustausch konnte nicht bei allen erkrankten Tieren gefunden werden. Bei sechs von zehn an Leigh-Syndrom erkrankten Hunden war der genetische Hintergrund als Ursache weiterhin unbekannt. Aus diesem Grund wurden weitere mitochondriale Kandidatengene analysiert.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass etwa 20% aller humanen Leigh-Fälle durch eine T>G Transition an der np 8993 im mitochondrial kodierten ATPase6-Gen verursacht werden (*Santorelli et al., 1995*). Tritt diese Mutation in geringeren Heteroplasmiegraden auf, verursacht sie das NARP-Syndrom (Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa); in höheren Heteroplasmiegraden das Leigh-Syndrom. Darüber hinaus konnten im Menschen noch weitere Mutationen im ATPase6-Gen identifiziert werden, allerdings zeigen diese eine deutlich geringere Prävalenz (*DiMauro et al., 1996*)

Von zehn erkrankten Hunden wurden diejenigen (412, 119) auf Mutationen im ATPase6- und ATPase8-Gen untersucht, von denen DNA aus Muskelgewebe zur Verfügung stand. Beide Gene wurden in insgesamt drei Fragmenten amplifiziert und sequenziert. Es konnten keine pathogenen Veränderungen in der untersuchten Nukleotidfolge festgestellt werden.

Um außerdem noch größere Deletionen in der mitochondrialen DNA ausschließen zu können, die beim Menschen ebenfalls ein Leigh-Syndrom auslösen können (*Vilarinho, 1997*), wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Da für die Hybridisierung der Sonde an verdaute mtDNA-Fragmente größere Mengen an DNA benötigt werden (*siehe Material und Methoden*), konnte diese Untersuchung nur an den Individuen 119 und 412 durchgeführt werden, von denen Muskelgewebe zur Verfügung standen. Mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *ApaI* und *HindIII* wurde die aus dem Muskelbiopsat extrahierte mitochondriale DNA verdaut und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, um eventuelle verkürzte Fragmente darstellen zu können. Die Southern-Analyse mit einer Gesamt-mtDNA-Sonde zeigte jedoch keinerlei auffällige Längenveränderungen des mitochondrialen Genoms im Vergleich zu Kontrolltieren (nicht gezeigt). Deletionen, als auch Duplikationen der mtDNA konnten also bei diesen Tieren als Ursache für das kanine Leigh-Syndrom ausgeschlossen werden.

#### 4.4.5. Molekularbiologische Untersuchung eines Alaskan Husky

Zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Analyse der Yorkshire Terrier konnte ein Alaskan Husky identifiziert werden, der ein dem Leigh-Syndrom dieser Rasse (*Brenner et al., 2000*) identisches klinisches und neuropathologisches Bild zeigte, wobei der Verlauf der Erkrankung laut behandelnden Tierarztes in Schüben und über acht Jahre hinweg deutlich langsamer verlief. Das Tier fiel mit sieben Monaten akut durch Ganganomalien und Anfällen auf, die durch Antiepileptika behandelbar waren.

Es wurde DNA aus den zur Verfügung stehenden Gehirn-Paraffinschnitten gereinigt und gezielt auf die A2691G Mutation untersucht. Sowohl die RFLP- als auch die Sequenzanalyse der mtDNA dieses Alaskan Huskies identifizierte die A > G Punktmutation an np 2691.

Dies zeigte, dass die gefundene A2691G Mutation rasseübergreifend für das Leigh-Syndrom, beziehungsweise eine Leigh-ähnliche Symptomatik, ursächlich sein könnte.

#### 4.4.6. Heteroplasmatische Verteilung der Mutation

Der Zustand der Heteroplasmie einer Mutation im mitochondrialen Genom gilt als wichtiges Pathogenitätskriterium (*Wallace, 1994*). Pathogene Mutationen beeinträchtigen die Funktionalität der Mitochondrien. Bei Erreichen eines bestimmten Heteroplasmiegrades der Mutation (Schwellenwert) ist diese nicht mehr mit der Überlebensfähigkeit der Zelle vereinbar. Pathogene Mutationen der mtDNA unterliegen somit einem negativen Selektionsdruck, der der

Etablierung dieser Mutationen entlang der maternalen Linie entgegenwirkt. Nur „milde“ pathogene Mutationen der mtDNA können unter Umständen homoplasmatische Zustände erreichen.

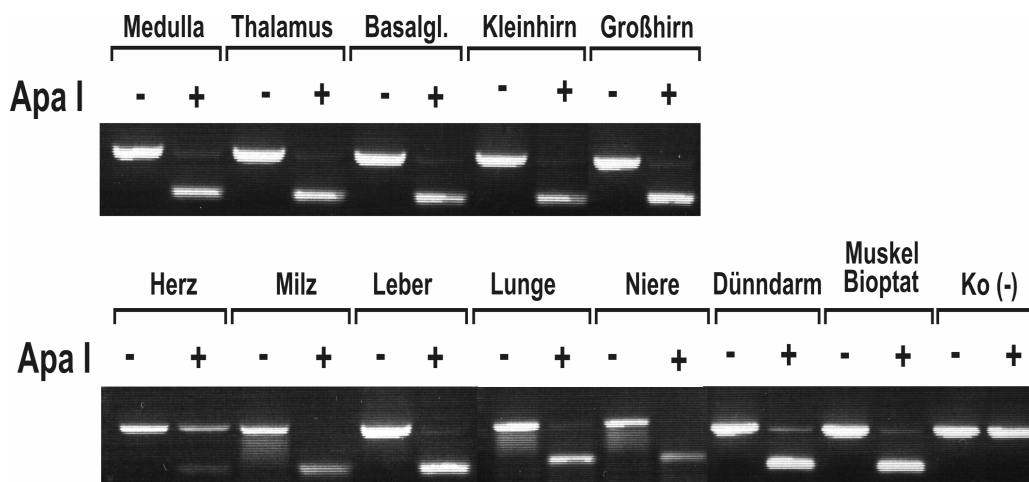
Neutrale Polymorphismen dagegen liegen immer homoplasmatisch vor. Sie unterliegen keinem negativen Selektionsdruck und können sich daher entlang der maternalen Linie etablieren und einen homoplasmatischen Wert erreichen.

Die RFLP-Untersuchungen der mtDNA von Muskelgewebe und Großhirn des Hundes 412 haben bereits Hinweise darauf gegeben, dass die Mutation an np 2691 heteroplasmatisch vorliegt (*Abbildung 11*). Dieses Kriterium für eine pathogene Mutation wäre somit für den Basenaustausch A2691G erfüllt.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die Höhe des Heteroplasmiegrades in einem bestimmten Gewebebereich mit der Schwere der Zellschädigung korreliert. Dadurch könnte möglicherweise erstmals ein Zusammenhang der spezifischen topographischen Verteilung des Zelluntergangs im Hirngewebe und des Mutationsgrades gemacht werden. Um dies zu untersuchen, wurde der Heteroplasmiegrad der A2691G Mutation in verschiedenen Organen und Gehirnarealen mittels RFLP getestet. Aus Paraffinschnitten verschiedener Gewebe und Gehirnareale von Individuum 412 wurde Gesamt-DNA aufgereinigt und mittels PCR und *ApaI*-Verdau die Menge an mutierter im Verhältnis zur Wildtyp-mtDNA bestimmt. Die densitometrische Quantifizierung der Anteile verdauter bzw. unverdauter DNA ergaben in allen Hirnarealen Heteroplasmiegrade zwischen 92% (Großhirn) und 98% (Thalamus) (*Abbildung 12*). Ähnlich hohe Werte fanden sich in den unterschiedlichen Organen; einzige Ausnahme bildete der Herzmuskel, in dem nur 37% mutierte mtDNA zu finden war. Bei der aus Muskel isolierten DNA fand sich die Mutation nahezu homoplasmatisch (*Abbildung 12*).



Der Befund, dass der Anteil an mutierter DNA nicht mit der Schwere der Betroffenheit eines Organs korrelierte, war erstaunlich. Weitere Untersuchungen streuten Zweifel an der Richtigkeit dieser Ergebnisse. Beim Versuch, diese Ergebnisse zu reproduzieren, ergaben sich unterschiedliche Heteroplasmiegrade bei gleichen Gewebearealen des identischen Hundes. Die Grade bewegten sich zwischen 30% mutierter DNA und einer fast homoplasmatischen Verteilung von annähernd 100% an veränderter DNA (nicht gezeigte Daten). Die Schwankungen in den gefundenen Heteroplasmiegraden waren nur zu beobachten, wenn DNA aus Paraffinschnitten verwendet wurde. Sobald die DNA hochrein aus Muskelgewebe anstatt Paraffinschnitten isoliert wurde, ergaben sich reproduzierbar nahezu homoplasmatische Verteilungsgrade. Dies wies erstmalig auf mögliche Störfaktoren oder Kontaminationen hin, die evtl. während der Fixation und Herstellung der Paraffinblöcke aus fixiertem Gewebe entstanden.



**Abbildung 12:** RFLP-Analyse der A2691G Mutation verschiedener Organe bzw. Gehirnareale des Hundes 412. Die für die RFLP-Analyse benutzte DNA wurde aus Paraffinschnitten bzw. Muskelgewebe gereinigt. Es sind jeweils unverdaute und verdaute Proben nebeneinander auf das Agarosegel aufgetragen worden. Als Negativkontrolle diente extrahierte DNA aus der Muskelbiopsie eines für die Mutation A2691G negativen Kontrollhundes. Die Heteroplasmiegrad-Bestimmung (in %) erfolgte durch densitometrische Quantifizierung der DNA-Banden.

#### 4.4.7 Untersuchungen zur Pathogenität der A2691G Mutation beim Hund

Nach Abschluss aller bisher erwähnten molekularbiologischen Untersuchungen der erkrankten Yorkshire Terrier und des Alaskan Husky streuten neue Einträge in der Datenbank weitere Zweifel an der Pathogenität der Punktmutation A>G an np 2691 der mtDNA bei *Canis familiaris*.

Im Zuge einer systematischen Untersuchung der Diversität des mitochondrialen Genoms von *Canis familiaris* durch eine amerikanische Arbeitsgruppe (*Shahid et al., 2005, unpublished*) wurde die gesamte mtDNA 19 verschiedener Hunderassen sequenziert und im August 2005 in der GenBank Datenbank veröffentlicht (*GenBank IDs AY656737-AY656755*).

Die Analyse dieser Sequenzen ergab, dass bei 3 von 19 Hunden (15,7%) an der Nukleotidposition 2691 ebenfalls ein G festgestellt werden konnte. Diese Daten zeigten, dass der A>G Austausch offenbar mit einer geringen Häufigkeit auch bei gesunden Kontrollieren zu finden ist, womit die kausale Rolle dieser Mutation für die Entwicklung des kaninen Leigh-Syndroms in Frage zu stellen war.

Bei den eigenen Untersuchungen einer gesunden Kontrollgruppe mit elf gesunden Tieren konnte die A2691G Mutation nicht gefunden werden (*siehe 4.4.2*). Um die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und den Daten von *Shahid et al. (2005)* aufzuklären, wurde Blut weiterer 31 neurologisch unauffälliger und gesunder Kontrollhunde (*Tabelle 3*) gesammelt, die DNA extrahiert und das Vorhandensein der A2691G Mutation mittels PCR und anschließendem *Apal*-Verdau getestet. In diesem neuen Kollektiv fanden sich insgesamt drei „G-Träger“ an np 2691. Fasst man die Daten der eigenen Kontrollgruppe zusammen, so wurden drei von 42 Hunden (7%) positiv auf die A2691G Mutation getestet. Die Prozentzahl der 2691G-Träger in der gesunden

Kontrollgruppe bewegt sich somit in einem ähnlichen Bereich wie die von *Shahid et al. (2005, unpublished)* gefundenen 15%.

Bei der „Leigh-Gruppe“ (zehn Yorkshire Terrier und ein Alaskan Husky) wurden fünf positive Tiere gefunden (45%). Es ist nicht auszuschließen, dass diese erhöhte Assoziation der A2691G Mutation mit erkrankten Tieren eine pathogene Relevanz bei der Entwicklung des kaninen Leigh-Syndroms besitzt.

#### *4.4.8. Haplotypenanalyse im D-Loop der mitochondrialen DNA*

Es stellte sich die Frage, ob es sich bei der A2691G Mutation um einen etablierten, möglicherweise populationsgenetisch wichtigen Austausch handelt. Eine Möglichkeit, dies zu untersuchen, bot die Haplotypenanalyse vorhandener A2691- und A2691G-Träger. Da neutrale Varianten der mitochondrialen DNA keinen negativen Selektionsdruck ausüben, können sie sich entlang der maternalen Vererbungslinie etablieren. Heutzutage sind viele solche neutralen Polymorphismen der mtDNA bekannt; die meisten davon befinden sich im hochvariablen, nicht-kodierenden D-Loop der mtDNA. Die Polymorphismen der mtDNA sind in der Regel sehr alt, sie sind also schon vor langer Zeit entstanden und haben sich entlang der maternalen Linie auf die Nachkommen übertragen (*Schon et al., 1994*).

Solche etablierten Varianten der mtDNA werden vielfach auch für populationsgenetische Untersuchungen herangezogen, um ganze ethnische Sozietäten – Haplogruppen mit einem gemeinsamen maternalen Vorfahren – voneinander abzugrenzen. Auf der anderen Seite können Haplogruppenanalysen auch dazu herangezogen werden, um die Pathogenität einer identifizierten Mutation zu untermauern. Eine Mutation, die eine haplogruppenspezifische Zugehörigkeit zeigt, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit

eine nicht-pathogene Variante. Dagegen ist eine Mutation, die bei Erkrankten mit unterschiedlicher Haplogruppenzugehörigkeit gefunden wird, eher als pathogen einzustufen.

Die Untersuchung der D-Loop-Abschnitte der mtDNA aller A2691G-Träger bot eine gute Möglichkeit die Pathogenität bzw. Kausalität der gefundenen A2691G Mutation in der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> von *Canis familiaris* zu untersuchen.

Für die Haplotypenanalyse der A2691G-Träger wurde ein hochvariabler Bereich des D-Loops der mtDNA (np 15401-15662) mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Untersucht wurden die drei A2691G-Träger aus der gesunden Kontrollgruppe (Ko-Hunde 20, 33, 43) sowie die fünf A2691G-Träger aus der Gruppe der an Leigh-Syndrom erkrankten Hunde (Yorkshire Terrier 412, 627, 352, 631; Alaskan Husky 116).

Parallel dazu wurden 7 gesunde A2691-Träger aus der eigenen Kontrollgruppe in gleicher Weise analysiert (Hunde 13, 16, 17, 24, 25, 32, 37).

Um eine Zuordnung dieser Sequenzen zu bekannten mtDNA-Haplogruppen zu ermöglichen, wurden Daten aus den Arbeiten von *Savolainen et al. (2002)* benutzt, die die Klärung der evolutionären Abstammung des Hundes zum Ziel hatten (*Savolainen et al., 1997 und 2002*)(Abbildung 13). In diesen Arbeiten wurden die D-Loop Regionen verschiedenster Rassen weltweit sequenziert und phylogenetisch analysiert.

Diese Arbeiten zeigten eine Verteilung der heute lebenden Hundepopulationen auf sechs Hauptlinien (A–F), die sich wiederum in unterschiedliche Subgruppen aufspalten ließen (*Haplogruppen*). Die Hauptpopulation aller Hunde auf der Welt, die hauptsächlich europäisch-asiatischen Ursprünge besitzen, sind drei

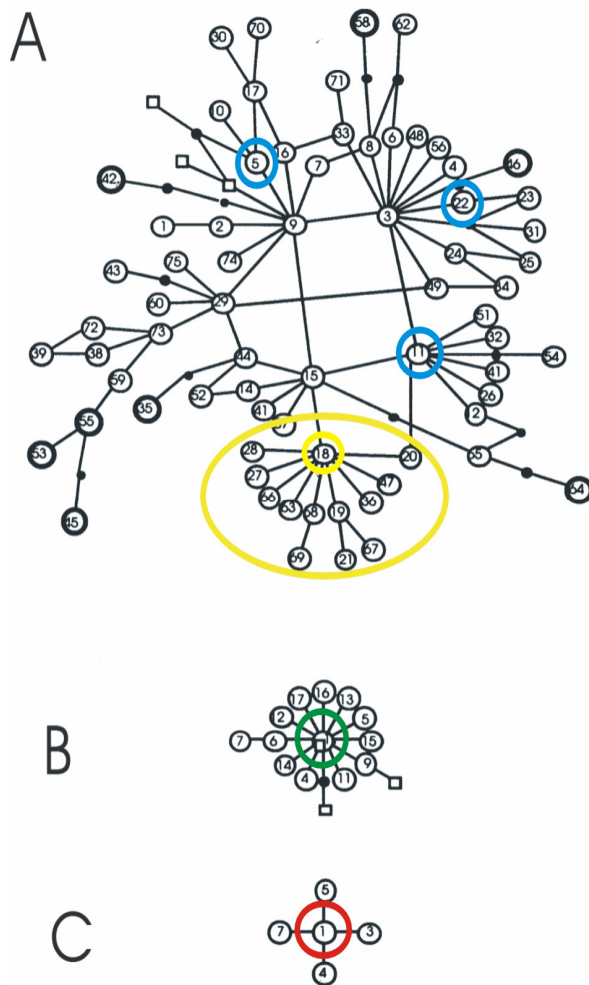
der oben genannten sechs Hauptlinien zugeordnet (Stämme A, B, C) (*Abbildung 13*).

Aus dem *Supporting online material* der evolutionsbiologischen Veröffentlichung von *Savolainen et al. (2002)* konnten D-Loop Sequenzen der jeweiligen Vertreter der dort zugeordneten Stämme A, B, C, E, und F (*Abbildung 14*) ausgewählt und als Gerüst zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes benutzt werden. Die unterschiedlichen D-Loop Sequenzen der eigenen Tiere wurden mit diesen verglichen (*aligned*) und so zu Haplogruppen zugeordnet. Um mehr Vergleichssequenzen zu erhalten und um damit die Stichprobe zu vergrößern, wurden die erhaltenen Sequenzen mit korrespondierenden Sequenzabschnitten aus der Studie von *Shahid et al. (2005)* verglichen, die drei A2691G-Träger sowie 16 A2691-Träger beinhalteten.

*Abbildung 14* zeigt den Stammbaum der Sequenzen, der mit dem Programm MegAlign aus der Reihe DNASTAR (*Clustal, Standardparameter*) erstellt wurde. Wie darin zu sehen ist, sind alle A2691-Träger aus den eigenen Patienten- und Kontrollgruppen, sowie alle A2691-Träger der Kontrollgruppe von *Shahid et al. (2005)* über die verschiedenen Haplogruppen verteilt. Die meisten Tiere ordnen sich in Subgruppen des Stammes A ein und da sie alle aus Europa stammen, stimmen diese Ergebnisse mit den populationsgenetischen Untersuchungen von *Savolainen* überein.

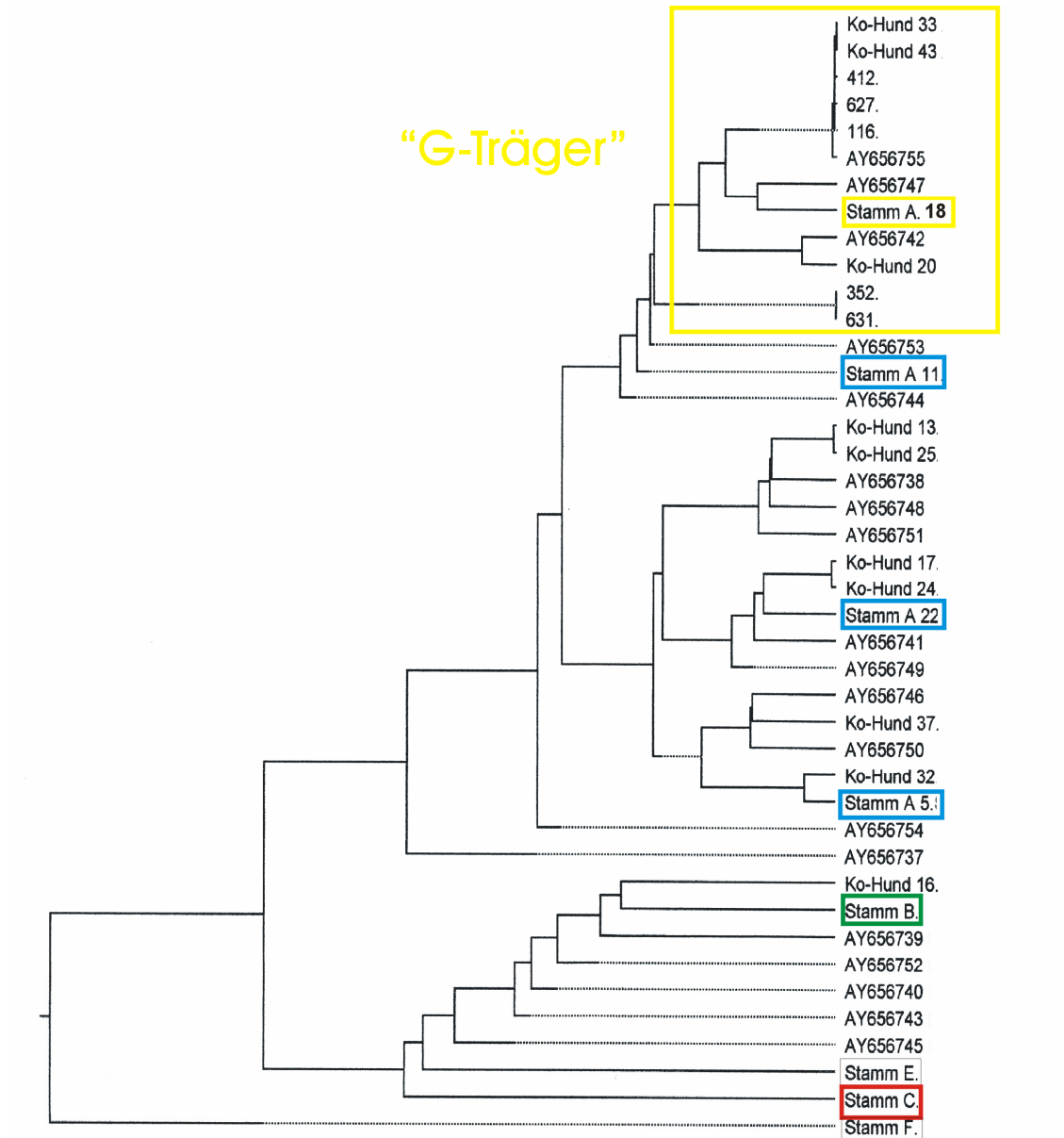
Dagegen ließen sich alle A2691G-Träger einer einzigen und damit spezifischen Subgruppe des Stammes A zuordnen (*siehe farbige Markierung, Abbildung 13 und 14*). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass es sich bei der A2691G Mutation offensichtlich um einen evolutionär gesehen sehr alten neutralen Polymorphismus handelt, der sich in einem Unterzweig des Stammes A etabliert hat.

Eine direkte pathogene Rolle der A2691G Mutation in der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> bei der Entwicklung des kaninen Leigh-Syndroms kann somit ausgeschlossen werden.



**Abbildung 13:**  
**Stämme A – C** (Savolainen et al., 2002)

Der von Savolainen et al. erstellte phylogenetische Stammbaum von *Canis familiaris*: die verschiedenen Hunde-Haplotypen (schwarze Kreise) unterscheiden sich jeweils durch eine einzelne Mutation. Die Rechtecke stellen Wolfs-Haplotypen dar; schwarze Punkte hypothetische Intermediate. Alle A2691G-Träger ordnen sich alle in die gelb markierte Subgruppe um Haplotyp A 18 ein. Die Sequenzen ausgewählter Vertreter der einzelnen Stämme wurden genutzt um ein Gerüst zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes zu erstellen (blaue, gelbe, grüne und rote Umrandung) (Abbildung 14).



**Abbildung 14:**

**Phylogenetischer Stammbaum:** Die „G-Träger“ aus der Patientengruppe (Yorkshire Terrier 412, 627, 352, 631; Alaskan Husky 116), die „G-Träger“ der eigenen Kontrollgruppe (Ko-Hunde 20, 33 und 43) sowie die „G-Träger“ der veröffentlichten kaninen mtDNA Sequenzen von *Shahid et al. (2005)* ordnen sich alle in der Subgruppe des Stammes A um A 18 ein (gelbe Umrandung). Die Yorkshire Terrier 352 und 631 unterscheiden sich nur durch einen weiteren Basenaustausch an einer hochpolymorphen Stelle im D-Loop.

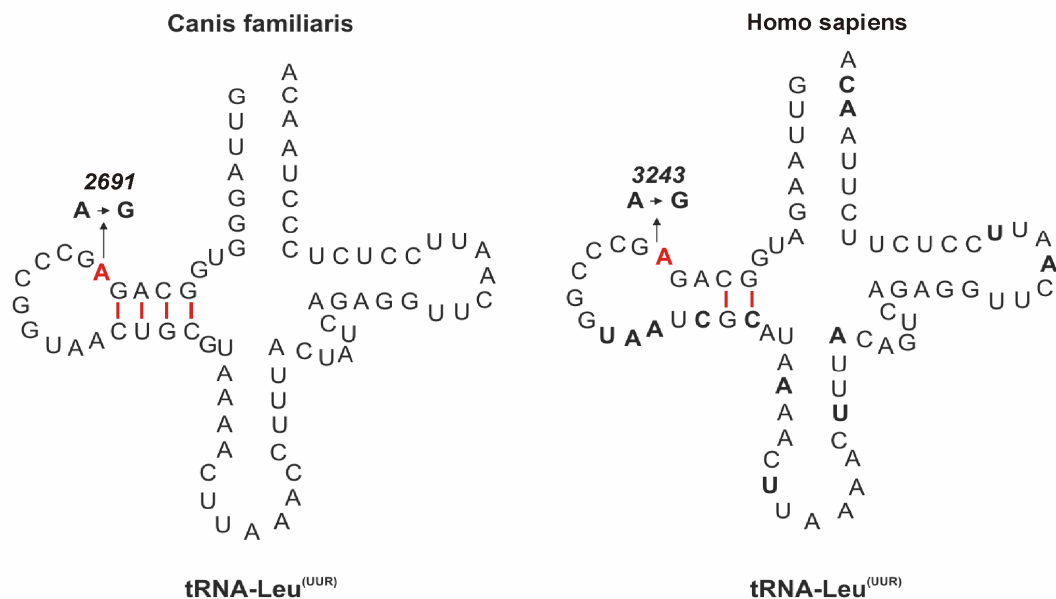
#### 4.4.9 Vergleichende Analyse der humanen und der kaninen tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>

Der A3243G Austausch in der menschlichen mtDNA führt zu schwersten Systemerkrankungen wie dem MELAS-Syndrom, einer Kardiomyopathie oder dem humanen Leigh-Syndrom (*siehe Tabelle 1, Einleitung*). Diese Mutation ist an der zur np 2691 korrespondierenden Position innerhalb der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> lokalisiert. Es war daher überraschend, dass die A2691G Mutation in der kaninen mtDNA keine pathogene Relevanz hat.

Um Aufschluss über dieses Phänomen zu erhalten, wurde die Sekundär- und die Tertiärstruktur beider tRNAs analysiert und miteinander verglichen. Eine mögliche Erklärung für diesen eklatanten Unterschied in der phänotypischen Ausprägung zwischen Mensch und Hund ergab sich beim Vergleich der Watson-Crick-Paarungen zur Ausbildung der für die tRNAs typischen Kleeblattstruktur. Wie in *Abbildung 15* dargestellt wird, ist die np3243 beim Menschen bzw. die np 2691 beim Hund die erste 3' Base des sog. D-Stems der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>. Dieser D-Stem wird über die Watson-Crick-Paarungen gegenüber liegender Basen stabilisiert.

Ein Vergleich der Sequenzen des D-Stems und deren Paarungen bei verschiedenen Tierarten zeigte, dass ebenfalls vier Paarungen im D-Stem bei Katze und dem Rhinozeros; drei Paarungen beim Großteil aller Eukaryonten und nur zwei Paarungen beim Menschen, Gorilla und Schimpansen zu finden sind.



**Abbildung 15:**

Im D-Stem der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> des Hundes liegen vier stabilisierende Paarungen vor, während es beim Menschen nur zwei sind. Grund dafür sind Variabilitäten an anderer Stelle in der Sequenzfolge.

Aus Veröffentlichungen zu Stabilitätsuntersuchungen diverser tRNAs beim Menschen ist bekannt, dass diese Watson-Crick-Paarungen im D-Stem, als auch im Anticodon-Stem eine stabilisierende Wirkung auf die gesamte Sekundärstruktur der tRNA ausüben und damit funktionell wichtig sind. Insbesondere haben sie eine Bedeutung für die Aminoazylierung der tRNAs (Kondrashov et al. 2004; Wittenhagen und Kelley, 2002, 2003; Hao et al., 2004).

Diese Unterschiede in der tRNA-Struktur von Mensch und Hund könnten erklären, warum die A3243G Mutation im Menschen zur Dysfunktion der tRNA und damit zur Erkrankung führt, im Hund dagegen keine oder kaum funktionelle Auswirkungen hat.

## 5 Diskussion

In den letzten zwanzig Jahren wurden die Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die den neurodegenerativen Mitochondriopathien beim Menschen zu Grunde liegen, deutlich erweitert. Es konnten nicht nur zahlreiche Erkrankungen in ihrem klinischen Erscheinungsbild präzise beschrieben werden, sondern es ist auch gelungen, in vielen Fällen den kausalen Gendefekt zu identifizieren und den zu Grunde liegenden mitochondrialen Funktionsausfall zu charakterisieren. Bereits vor mehreren Jahren konnten nun auch beim Tier neurodegenerative Erkrankungen nachgewiesen werden, die den Mitochondriopathien beim Menschen ähneln (*Braund, 2003*) (*Tabelle 8*). Einige davon besitzen auffällige Ähnlichkeiten mit dem humanen Leigh-Syndrom (*Brenner et al., 2000; Matiasek et al., 2002*).

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte neuropathologische Beschreibung des kaninen Leigh-Syndroms. Darüber hinaus sollten der dieser Erkrankung zu Grunde liegende biochemische Funktionsausfall charakterisiert und mögliche Kandidatengene analysiert werden. Zehn Yorkshire Terrier und ein Alaskan Husky standen für diese Arbeit zur Verfügung, bei denen auf Grund der bildgebenden Diagnostik und neuropathologischer Untersuchungen die Diagnose „kanines Leigh-Syndrom“ gestellt wurde. Von allen Tieren standen mehrere Organe sowie das Gehirn in Form von Paraffinschnitten zur Verfügung, die für die patho-morphologischen Untersuchungen genutzt wurden. Eine Muskelbiopsie, wie sie für biochemische Analysen benötigt wird, lag nur von zwei der Tiere vor.

Das kanine Leigh-Syndrom ist als subakut nekrotisierende Enzephalopathie definiert und basiert wie beim Menschen auf Ergebnissen bildgebender Verfahren und neuropathologischen Befunden. Während es sich beim

Menschen mit ca. 2 pro  $10^5$  Lebendgeborenen um eine eher seltene Erkrankung (*Castro-Gago et al., 2006*) handelt, reihen retrospektive Analysen des institutseigenen Materials über den Zeitraum 2000-2005 das kanine Leigh-Syndrom als dritthäufigste angeborene neurologische Erkrankung beim Yorkshire Terrier ein (*persönliche Mitteilung, K. Matiasek*).

Die klinische Symptomatik des kaninen Leigh-Syndroms präsentiert sich typischerweise in Form von Bewegungs- und Verhaltensstörungen, einem zentralen Visusverlust und weiteren neurologischen Ausfällen, die sich meist schon im ersten Lebensjahr manifestieren. Alle hier untersuchten Hunde zeigten Ausfälle im oberen motorischen Neuron und Bewusstseinsstörungen. Trotz dieser einheitlichen klinischen Symptomatik trat das kanine Leigh-Syndrom manchmal akut, manchmal schleichend auf und das Erkrankungsalter reichte vom Welpenalter (unter vier Monaten) bis zum Erwachsenenalter (fünf Jahre) mit einem teilweise unterschiedlich schnellen Krankheitsverlauf, der jedoch meist zwischen einer Woche und zwei Monaten lag. Diese Befunde stimmen mit den Erkenntnissen über das menschlichen Leigh-Syndrom überein (*DiMauro, 1999*): auch dort ist der Verlauf und das Manifestationsalter variabel. Ob die heterogene klinische Präsentation bei den untersuchten Tieren in Zusammenhang mit unterschiedlichen Gendefekten und damit einem anderen Pathomechanismus steht, muss noch geklärt werden.

Das kanine Leigh-Syndrom ist in seiner klinischen Ausprägung wie auch in den neuropathologischen Befunden dem humanen Leigh-Syndrom sehr ähnlich. Beide Erkrankungen präsentieren sich mit typischen bilateral-symmetrischen Nekrosen an der Basis zahlreicher frontaler, temporaler und parietaler Großhirnsulci und mit symmetrischen Malaziefeldern in den Basalganglien, Thalamus, Corpora geniculata lateralia bis in den Hirnstamm. Diese bilateral-symmetrischen Kavitäten ergeben rostro-kaudal gesehen eine für das Leigh-Syndrom charakteristische V-förmige Läsion, die vom Putamen bis in die

Formatio reticularis der Medulla oblongata reicht. Zusätzlich konnten bei allen untersuchten Hunde-Hirnen deutliche Nervenzellverluste im mittleren Teil des Vermis des Kleinhirnes festgestellt werden.

Insgesamt ähneln die neuropathologischen Befunde der in dieser Studie untersuchten Yorkshire Terriern und dem Alaskan Husky stark den Beschreibungen von *Brenner et al. (2000)* zur „Alaskan Husky Enzephalopathie“. Möglicherweise liegt ein ähnlicher Pathomechanismus bei diesen Tieren zu Grunde.

Das neuropathologische Schädigungsmuster korrespondiert mit der klinischen Symptomatik der Hunde. Die Schäden in den Basalganglien und in den thalamischen Kernen verursachten Störungen in den extrapyramidalen Bahnen und führten damit zu den Gangstörungen. Die Bewusstseinsstörungen ließen sich mit den ausgeprägten Läsionen im Thalamus und in der Formatio reticularis erklären, der zentrale Visusverlust mit der Degeneration der lateralen Corpora geniculata, wobei Retina, Sehnerv, Tractus opticus und der visuelle Kortex in der Histologie unauffällig erschienen. Die zerebrokortikalen Läsionen, die an der Basis multipler Sulci im Frontal-, Parietal- und Temporallappen gefunden wurden, haben hauptsächlich motorische und somato-sensorische Felder im Großhirn beeinträchtigt. Der deutliche Verlust an Nervenzellen im Vermis des Kleinhirnes erklärte die Ataxien und die fehlende Drohreaktion.

Generell können derartige multifokale, bilateral-symmetrische Enzephalopathien vaskulär, über einen ischämischen Prozess oder eine metabolische Störung, durch eine Intoxikation oder im Sinne einer neurodegenerativen Erkrankung entstehen. Auf Grund der Regionenspezifischen histopathologischen Veränderungen und der unterschiedlichen Vulnerabilität betroffener Hirnareale ist nicht von einem einheitlichen Schädigungsmechanismus auszugehen, wie er durch eine mangelnde Blutversorgung hervor gerufen werden könnte. Während es im Großhirnkortex

zu eosinophilen Nervenzellnekrosen kam, die durchaus hypoxisch entstanden sein könnten, erschienen die Neuronen im Thalamus und den Basalganglien weitgehend vital; dort kam es hauptsächlich zum Abbau der Neuroglia. Die Veränderungen im Großhirnkortex besitzen gewisse Ähnlichkeiten mit MELAS-Syndrom assoziierten infarktiven Läsionen in der Großhirnrinde (*Tanji et al., 2001*).

Ebenso konnten Intoxikationen als äußerst unwahrscheinlich eingestuft werden. Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Nerven, Hirn- und Muskelgewebe konnten bei den betroffenen Tieren veränderte Mitochondrien festgestellt werden. Es gibt zwar Gifte, die zu Mitochondriopathien führen (*Finsterer, 2004*), diese konnten aber auf Grund der Besitzeraussagen und des Krankheitsverlaufes ausgeschlossen werden.

Über die Auswirkungen der mitochondrialen Insuffizienz im Gehirn der Leigh-Syndrom-Patienten gibt es zum derzeitigen Wissensstand nur Vermutungen. Sicher spielt die zellspezifische Vulnerabilität gegenüber Energiemangel und eine damit verbundene Laktatakkumulation und Sauerstoff-Radikalanhäufung im Nervengewebe eine wesentliche Rolle (*Cavanagh und Harding, 1994*). Den bisher biochemisch analysierten kaninen Enzephalopathien (diese Arbeit und *Li et al., 2005*) sowie auch den meisten mitochondrialen Enzephalopathien des Menschen (*Gillis und Kaye, 2000*) liegt eine funktionelle Störung der mitochondrialen Energiegenerierung zu Grunde. Dennoch kann eine verminderte zelluläre Energiebereitstellung alleine nicht erklären, warum sowohl Neuronen als Zellen mit einem hohen Energiebedarf als auch Gliazellen, teilweise von vitalen Neuronen umgeben, betroffen sind, und warum es zudem zu dieser spezifischen topographischen Verteilung im Gehirn kommt.

Die metabolische Entgleisung im Nervengewebe könnte allerdings auch zu einer gestörten Aktivierung von exzitatorischen Aminosäure-Neurotransmittern wie Glutamat führen. Bei Energieverlust besitzen sie eine Schlüsselrolle in der

Stimulation einer Zellantwort bei Stoffwechselstörungen im Gehirn und erhöhen ihre Sensitivität über NMDA-Rezeptoren. Dadurch könnte es zu einem selektiven exzitotoxischen Zelltod kommen (*Brown und Squier, 1996*), worauf eosinophile Nervenzellnekrosen in subkortikalen Arealen der Hunde Hinweise geben könnten.

Obwohl auch bei den anderen mitochondrialen Enzephalopathien des Hundes junge Tiere mit einer ähnlichen klinischen Symptomatik betroffen sind und bei allen eine Heredität angenommen wird, unterscheiden sie sich vor allem in der Art der neurologischen Schädigungen (*siehe 1.4 Einleitung*). Die einzelnen Erkrankungen zeichnen sich jeweils durch eine spezifische Verteilung der Läsionen im ZNS, eine unterschiedliche Betroffenheit der einzelnen Zellarten und Lokalisation der veränderten Mitochondrien aus.

Beim Menschen ist das Leigh-Syndrom eine genetisch und biochemisch heterogene Erkrankung. Alle bisher identifizierten Defekte betreffen Komponenten der mitochondrialen Energiegewinnung wie die Komplexe I, II, IV oder V des OXPHOS-Systems oder die Pyruvatdehydrogenase (*DiMauro, 1996*). Die meisten gefundenen Mutationen liegen in Genen für strukturelle Untereinheiten oder Assemblierungsfaktoren einzelner dieser Enzymkomplexe und führen somit zu isolierten Enzymdefekten.

Bei zwei erkrankten Yorkshire Terriern wurde ein kombinierter Defekt der Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette diagnostiziert. Da mehrere Komplexe betroffen waren, erschienen ursächliche Mutationen in Struktur- oder Assemblierungsgenen einzelner Komplexe unwahrscheinlich. Der vorliegende biochemische Befund sprach dagegen eher für eine gestörte allgemeine mitochondriale Biogenese. Kandidatengene der ersten Wahl für einen kombinierten Komplex I und IV Defekt sind die mitochondrialen tRNA-Gene (*Jacobs, 2003*). Darüber hinaus wurden auch beim Menschen tRNA-Defekte in Assoziation mit dem Leigh-Syndrom identifiziert (*Vilarinho et al.,*

1997; Santorelli et al., 1997; Koga et al., 2000, McFarland et al., 2002; Tulinius et al., 2003; Darin et al., 2003).

Bei vier von zehn Yorkshire Terriern konnte an der Nukleotidposition 2691 in dem Gen für die tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> ein Basenaustausch von A > G festgestellt werden, der der A3243G-Mutation in der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> des Menschen (MELAS-Mutation) entspricht. Außerdem wurde zusätzlich noch ein Alaskan Husky mit Leigh-Syndrom identifiziert, der dieselbe Punktmutation aufwies und damit einen Hinweis auf eine rasseübergreifende pathogene Mutation als Ursache des kaninen Leigh-Syndroms gab. Dieser Basenaustausch im kaninen tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>-Gen ist an einer evolutionär hoch konservierten Stelle lokalisiert und erfüllte damit das erste Kriterium für die Pathogenität einer Mutation im mitochondrialen Genom (*DiMauro, 1997*). Das zweite Kriterium – der fehlende Nachweis derselben Mutation bei gesunden Tieren – ließ sich anhand einer kleinen Kontrollgruppe von elf gesunden Hunden zunächst bestätigen. Ein drittes Kriterium für die Pathogenität einer mitochondrialen Mutation ist die Segregation mit dem klinischen Phänotyp. So sollten innerhalb einer betroffenen Familie nur klinisch erkrankte Mitglieder Mutationsträger sein, bzw. klinisch unauffällige Familienmitglieder sollten zumindest einen deutlich niedrigeren Heteroplasmiegrad der Mutation aufweisen. Jedoch waren die Familien der Tiere aus dieser Studie nicht bekannt oder diese Familien waren nicht zugänglich. Alternativ kann die Segregation der Mutation mit dem Phänotyp kann auch innerhalb eines erkrankten Individuums getestet werden. So sollte beim Vergleich verschiedener Gewebe oder Organe eine Korrelation des Heteroplasmiegrades der Mutation mit der Schwere der Betroffenheit der Organe festzustellen sein (*Shanski et al., 2004*). In der vorliegenden Untersuchung geschah dies durch RFLP-Analysen an Paraffinschnitten diverser Organe von Individuum 412 und ergab überraschenderweise ähnlich hohe Heteroplasmiegrade der Mutation in allen betroffenen und nicht betroffenen

Organen (außer dem Herzmuskel). Bei dem Versuch, diese Ergebnisse verlässlich zu reproduzieren, ergaben sich für dieselben Organe immer wieder unterschiedliche Heteroplasmiegrade. Nur wenn die analysierte DNA aus dem klinisch unauffälligen Muskelgewebe isoliert wurde, ergab sich reproduzierbar für die Mutation ein nahezu homoplasmatischer Wert. Vor allem die schwere Reproduzierbarkeit, aber auch die große Menge mutierter mtDNA im weniger betroffenen Muskelgewebe ließen auf eine mögliche Kontamination mit Fremd-DNA in den Paraffinschnitten schließen.

Die Erkenntnis, dass der A2691G-Austausch eine wahrscheinlich homoplasmatische Mutation darstellt, streuten erste Zweifel an der Pathogenität dieser Punktmutation. Weitere Zweifel entstanden, als im August 2005 die kompletten mtDNA-Sequenzen von 19 verschiedenen Hunderassen veröffentlicht wurden (*Shahid et al., 2005*). Bei 3 von 19 Sequenzen wurde an der Nukleotidposition 2691 ein G als Base angegeben. Aus diesem Grunde wurde die eigene Kontrollgruppe von 11 auf 42 erhöht. Es ergaben sich auch in dieser Analyse drei gesunde A2691G-Träger. Damit konnten zwischen den beiden Stichproben unauffälliger Tiere ähnliche Werte ermittelt werden (7% zu 15,7%). Da die Mutation auch bei gesunden Tieren zu finden war, handelte es sich bei diesem Basenaustausch offensichtlich doch um einen neutralen Polymorphismus.

Die Haplotypenanalyse zeigte zudem eindeutig, dass alle A2691G-Träger, unabhängig ob aus Patienten- oder Kontrollgruppe, einer spezifischen Haplogruppe zuzuordnen sind. Bei der A2691G-Mutation in der kaninen mtDNA handelt es sich somit um einen evolutionsbiologisch gesehen „alten“ Polymorphismus und bestätigt damit die Neutralität dieses Basenaustausches. Das Vorkommen des A2691G-Basenaustausches bei mehreren gesunden Hunden schloss zwar einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen dieser Mutation und dem kaninen Leigh-Syndrom aus, dennoch könnte es sich bei der



A2691G-Mutation um eine beim Hund milde Mutation mit geringer Penetranz handeln, die im Zusammenwirken mit anderen genetischen oder epigenetischen Faktoren (*genetischer Suszeptibilitätsfaktor*) eine höhere Erkrankungsempfänglichkeit bewirkt. Die Tatsache, dass die A2691G-Mutation bei den an Leigh-Syndrom erkrankten Tieren mit einer deutlich höheren Frequenz auftrat – 45% im Vergleich zu 7% der A2691G-Träger im Normalkollektiv –, könnte auf eine derartig prädisponierende Wirkung dieser Mutation hindeuten.

Die Bedeutung von Haplotypen für die Empfänglichkeit von Störungen, wie für Entwicklungsprozesse allgemein, wird in den letzten Jahren verstärkt diskutiert. Verschiedene Studien zeigen Zusammenhänge zwischen mtDNA-Haplotypen einerseits und Entwicklungsphänomenen wie Intelligenzquotient, Adaptation an klimatische Veränderungen sowie Krankheiten wie Kardiomyopathie, Alzheimer Demenz, Multiple Sklerose und LHON, andererseits (siehe auch *Howell, 1999; Kalman et al., 1999; Chinnery et al., 2000; Shin et al., 2000; DiMauro und Davidzon, 2005*). Dies macht deutlich, dass auch Haplotypen, bzw. die einen Haplotyp definierenden Varianten, eine prädisponierende Wirkung bei der Genese von Krankheiten aufweisen können. So ist es auch möglich, dass bei der Ausprägung und Penetranz des kaninen Leigh-Syndroms mtDNA-Haplogruppen mit einer höheren Suszeptibilität eine Rolle spielen.

Warum ist der A2691G-Austausch in der kaninen mtDNA nicht pathogen, während die korrespondierende Position in der menschlichen mtDNA mit schweren Erkrankungen assoziiert ist?

Die vergleichende Analyse der humanen und kaninen tRNA für Leuzin<sup>(UUR)</sup> zeigte, dass im D-Stem der Kleeblattstruktur der tRNA beim Hund vier stabilisierende Basen-Paarungen vorliegen, während es beim Menschen nur zwei sind (*Kern und Kondrashov, 2004*). Beim Menschen stellt die Dimer-Bildung zweier mutierter tRNAs durch die entstehende Palindromsequenz

(...CCCGGG...) einen möglichen Pathomechanismus der A3243G-Mutation dar. Wichtig für die pathologische Dimerisierung ist eine instabilere tRNA, die durch den Basenaustausch an 3243 an thermodynamischer, struktureller Stabilität verliert. Ein Einfügen zusätzlicher Watson-Crick-Bindungen innerhalb des D-Stem der mutierten tRNA beeinträchtigt die Dimer-Bildung mutierter tRNAs beim Menschen (*Roy et al., 2004; 2005*).

Es kann daher angenommen werden, dass die eher instabile menschliche tRNA in ihrer Struktur und Funktion durch die A3243G-Mutation stärker beeinträchtigt wird als eine Mutation an der korrespondierenden Stelle in der stabileren kaninen tRNA für Leuzin<sup>(UUR)</sup>. Diese strukturellen Unterschiede können also dafür verantwortlich sein, dass der A > G Austausch beim Menschen zu schweren Systemerkrankungen führen kann, während er beim Hund einen neutralen Polymorphismus darstellt.

Welche Bedeutung haben die hier gezeigten Untersuchungen für die zukünftige Erforschung des kaninen Leigh-Syndroms? Die ultrastrukturelle Untersuchung weist durch die Darstellung veränderter Mitochondrien auf eine mitochondriale Erkrankung hin, auch wenn die trichromatische Gomori-Färbung keine *ragged red fibers* (RRF) im Muskel darstellen konnte. Dieser Befund stimmt auch mit den Erkenntnissen vom humanen Leigh-Syndrom überein, bei dem generell keine RRF nachzuweisen sind (*Tanji et al., 2001*).

In Anlehnung an das Wissen um die funktionellen Ursachen des humanen Leigh-Syndroms war ein Defekt des mitochondrialen OXPHOS-System auch bei der kaninen Erkrankung zu vermuten; das Auffinden eines kombinierten Komplex I/IV Defektes bei zwei betroffenen Tieren haben diese Annahme bestätigt. Obwohl die mitochondrialen tRNAs zu den wahrscheinlichsten Kandidatengen für einen kombinierten Atmungskettendefekt zählen (*Jacobs, 2003*), konnten diesbezüglich keine ursächlichen Mutationen in den 21 anderen mitochondrialen tRNA-Genen bei diesen Hunden identifiziert werden.

Welche Kandidatengene könnten Ziel zukünftiger genetischer Analysen sein? Eine gestörte Biogenese multipler Atmungskettenkomplexe kann nicht nur durch Mutationen in mitochondrialen tRNA-Genen, sondern auch durch Defekte in nukleär kodierten Faktoren verursacht sein, die die Expression und Translation mitochondrial kodierter Komplexuntereinheiten regulieren. In diesem Zusammenhang ist das EFG1-Gen zu erwähnen, welches für einen mitochondrialen Elongationsfaktor kodiert und beim Menschen mit einem kombinierten Atmungskettendefekt und einer Enzephalopathie assoziiert wurde (Coenen et al., 2004).

Die zunehmende Entschlüsselung des kaninen Kern-Genoms wird in Zukunft die Identifizierung und Zugänglichkeit weiterer Kandidatengene für das kanine Leigh-Syndrom enorm vereinfachen. Bis dahin muss das Hauptaugenmerk auf der Gewinnung geeigneter Gewebeproben für die biochemische Analyse sein, die wegweisend für die Auswahl geeigneter Kandidatengene ist.

Alternative Ansätze zur Untersuchung des biochemischen Phänotyps ergeben sich mit Hilfe neuer immunhistochemischer Techniken, die eine Detektion von OXPHOS-Komplexen auch am Paraffinschnitt ermöglichen (Vogel und Zamecnik, 2005).

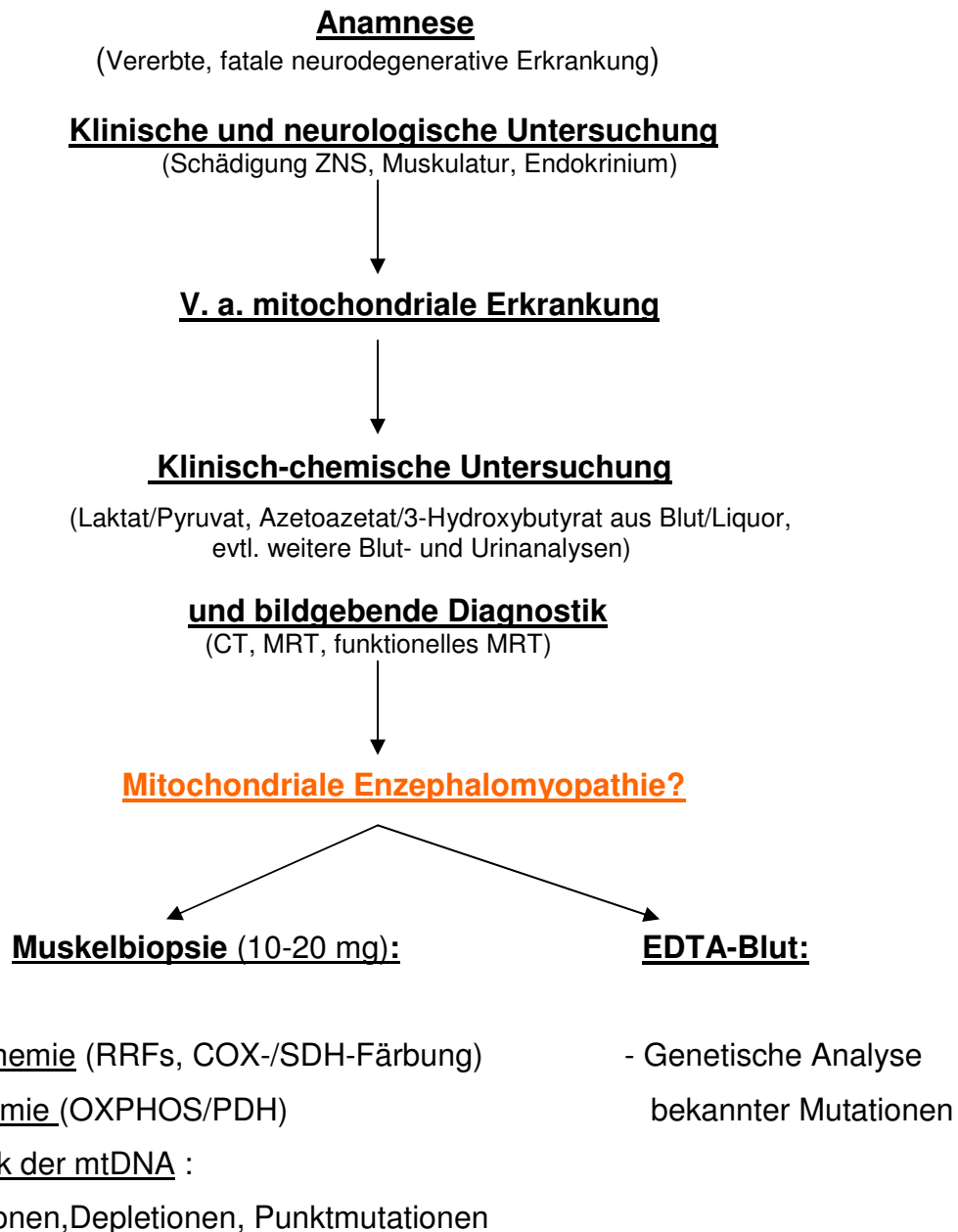
Die weitere Erforschung des kaninen Leigh-Syndroms hat auch humanmedizinische Relevanz, da es ein natürlich vorkommendes Tiermodell zur Erforschung pathogener Mechanismen von Mitochondriopathien darstellt und im Phänotypus der menschlichen Erkrankung deutlich ähnlicher ist als generierte Maus-Modelle (Betts et al., 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werfen die Notwendigkeit von standardisierten Diagnosestrategien bei Verdacht auf kanine Mitochondriopathien auf (Abbildung 16).

Das diagnostische Procedere kann bei mehreren neurologisch auffälligen, jungen Tieren eines Wurfes in der Pedigree-Anamnese beginnen. Ergibt sich dabei der Verdacht einer genetisch bedingten Erkrankung, die bei mitochondrialen Störungen vor allem das ZNS, Muskulatur und das Endokrinium betreffen können, sollten zuerst klinisch-chemische Untersuchungen zum Ausschluß der Differentialdiagnosen vorgenommen werden. Die dabei gemessene mögliche Erhöhung des Azetoacetat/3-Hydroxybutyrat-Quotienten im Blut/Liquor als pathologischer Parameter für eine mitochondrial bedingte Energiedefizienz ist beim Hund aussagekräftiger als der Laktat/Pyruvat-Quotient (*Li et al., 2005*).

Mittels bildgebender Diagnostik können dann die für mitochondriale Enzephalopathien charakteristischen Läsionen im ZNS dargestellt werden (Basalganglienverkalkung bei MELAS-ähnlichen Syndromen, bilateral-symmetrische, V-förmige Malaziefelder bei kaninem Leigh-Syndrom etc.).

In der histologischen und enzymhistochemischen Analytik einer Muskelbiopsie können RRF als Anzeichen einer kompensatorischen Mitochondrienakkumulation oder COX-negative Fasern als Anzeichen einer Cytochrom c Defizienz dargestellt werden. Die weitere biochemische Untersuchung des Muskelmaterials kann eventuell bestehende Defekte mitochondrialer Enzymkomplexe aufdecken und zudem richtungsweisend für die gezielte Analyse von Kandidatengen sein.

**Abbildung 16:** Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine mitochondriale Erkrankung

ZNS: Zentrales Nervensystem; CT: Computertomographie; MRT: Magnetresonanztomographie;  
RRF: ragged red fibers; COX: Cytochrom c Oxidase; SDH: Succinatdehydrogenase;  
OXPHOS:oxidative Phosphorylierung; PDH: Pyruvatdehydrogenase.

**Tabelle 8:** Übersicht über bestätigte mitochondriale Enzephalopathien:

	<b>Yorkshire Terrier</b>	<b>Alaskan Huskies</b> (Brenner et al.)	<b>Australian Cattle dog</b> (Brenner et al.)	<b>English Springer Spaniel</b> (Brenner et al.)	<b>Jack Russell Terrier</b> (Gruber et al.)	<b>Australian Cattle dog, Shetland Sheepdog</b> (Li et al.)
<b>Erkrankung</b>	Subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie	Subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie	Polioenzephalomyelopathie	Mitochondriale Enzephalopathie	Mitochondriale Enzephalopathie	Spongiforme Leukenzephalopathie
<b>Anzahl untersuchter Fälle</b>	10	5	3	1	1	15
<b>Manifestationsalter</b>	4. – 18. Monat	7.- 25. Monat	5. Monat- 2. Jahr	16. Monat	10. Monat	1.-9. Lebenswoche
<b>Geschlecht</b>	w + m	w + m	w + m	w	w	w + m
<b>Auftreten</b>	akut	akut	akut	schleichend	akut	akut
<b>Dauer d. Erkrankung</b>	1 Woche – 6 Monate	wenige Wochen	5 Monate- 1 Jahr	wenige Wochen	8 Monate	wenige Wochen
<b>Initialsymptome</b>	Ataxie	Ataxie, Anfälle	Anfälle, Ataxie , Schwäche	Ataxie	Ataxie	Ataxie, Tremor
<b>Bewusstsein</b>	aufm. - stuporös	unauffällig	unauffällig	desorient.Phasen	unauffällig	unauffällig
<b>Drangwandern</b>	+	-	+	-	-	-
<b>OMN</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Hypermetrie</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Veränderte Haltungs- + Stellreaktionen</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Zentraler Visusverlust</b>	+	+	-	+	+	-

<b>Drohreaktion</b>	fehlt	?	?	fehlt	fehlt	+
<b>Nystagmus</b>	-	-	+	Vertikal-positionell	Horizontal-positionell	+
<b>Dysphagie</b>	5 von 10	+	-	-	-	+
<b>Taubheit</b>	2 von 10	?	?	?	+	-
<b>Veränderte Mitochondrien (ELMI)</b>	Neuronen	nicht untersucht	Astrozyten	Neuronen	Leber- und Herzmuskelzellen	-
<b>Neuroanat. Diagnose einer multifokal. bilat. symm. Läsion</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Heredität</b>	?	Autosomal rezessiv (Vermutet)	Autosomal rezessiv (Vermutet)	?	?	Maternal (Vermutet)
<b>Blut-/ Liquorchemie</b>	Laktat ↑	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	Liquor: Laktat + 3-OH-Byturat/Azetoazetat ↑
<b>Ähnlichkeiten zu humanen Syndromen</b>	Leigh-Syndrom	Leigh-Syndrom	Leigh-Syndrom	LHON	MELAS	Canavan, KSS
<b>Mutation</b>	PM A2691G	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	G14.474A V98M (MTCYB)

aufm: aufmerksam; ELMI: Elektronenmikroskop; KSS: Kearns-Sayre-Syndrom; LHON: Leber's hereditary optic neuropathy; m: Rüde; w: Hündin; MELAS: Myopathy, encephalopathy, lactate acidosis and stroke-like episodes; MTCYB: mitochondrial kodiertes Gen für Cytochrom b; OMN: oberes motorisches Neuron; PM: Polymorphismus.

## 6 Zusammenfassung

Das kanine Leigh-Syndrom ist eine subakute bilateral-symmetrische nekrotisierende Enzephalopathie, die vor allem junge und adoleszente Hunde betrifft. Auf Grund der spezifischen Verteilung der Malaziefelder im Gehirn kann die vorläufige Verdachtsdiagnose schon am lebenden Tier durch bildgebende Verfahren gestellt werden. Die letztendlich sichere Diagnose bedarf einer patho-morphologischen Untersuchung des ZNS.

Ziel dieser Studie war es, das neuropathologische Erscheinungsbild dieser Erkrankung genauer zu spezifizieren und den möglichen molekularen Ursachen näher zu kommen. Der Untergang der grauen Substanz in subkortikalen Bereichen sowie in den diencephalen Arealen des Großhirns und die V-förmige Ausprägung des Zelluntergangs von den Basalganglien bis in die Formatio reticularis des Stammhirns sind neben der Purkinjezell-Degeneration im Kleinhirn Charakteristika dieser Erkrankung. In ultrastrukturellen Untersuchungen mittels Elektronenmikroskop konnten im Muskel- und Nervengewebe veränderte Mitochondrien dargestellt werden. Dieser Befund wies somit wie beim humanen Leigh-Syndrom auf eine ursächliche Beteiligung an der systemischen Stoffwechselstörung hin.

Aus diesem Grund wurde die Annahme aufgestellt, dass das kanine Leigh-Syndrom ebenfalls durch Defekte der mitochondrialen Energiegewinnung verursacht wird. Tatsächlich zeigte die Messung der Enzymaktivitäten der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette bei betroffenen Hunden einen kombinierten Defekt der Komplexe I und IV. Das Vorliegen eines kombinierten Atmungskettendefektes wies auf eine zu Grunde liegende allgemeine Biogenesestörung hin, wie sie beim Menschen durch Defekte mitochondrial kodierter tRNAs verursacht werden kann. Daher wurde die DNA betroffener Tiere, die aus Muskelgewebe bzw. Paraffinschnitten isoliert wurde,



auf Mutationen in allen 22 mitochondrialen tRNA-Genen untersucht. Hierbei wurde bei vier von zehn erkrankten Yorkshire Terrier sowie bei einem zusätzlich untersuchten Alaskan Husky ein A > G Austausch an der Nukleotidposition 2691 innerhalb der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> identifiziert. Diese Mutation entspricht exakt der A3243G-Mutation im menschlichen Gen für die tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>, die im Menschen zu schweren Systemerkrankungen wie MELAS-Syndrom, Kardiomyopathie und Leigh-Syndrom führt.

Neuere Einträge in Gendatenbanken sowie das Auffinden der A2691G Mutation in einer eigenen Kontrollgruppe gesunder Hunde, wenn auch in geringerer Prävalenz, schlossen eine direkte ursächliche Beteiligung der A2691G Mutation am kaninen Leigh-Syndrom aus. Eine mitochondriale Haplotypenanalyse der 2691G und –A Träger zeigte eine Zuordnung aller gesunden und kranken 2691G Träger zu einer spezifischen mitochondrialen Haplogruppe. Die A2691G Mutation ist damit ein – evolutionsbiologisch gesehen - alter, neutraler Polymorphismus. Ob die höhere Prävalenz dieser Variante in der Patientengruppe versus der Kontrollgruppe auf eine mögliche Rolle als Suszeptibilitätsfaktor hinweist, muss noch geklärt werden.

Ungeklärt war, warum diese Mutation bei Hunden keine direkte pathogene Rolle spielt, die korrespondierende Mutation beim Menschen dagegen schwere Systemerkrankungen verursacht. Die A2691G bzw. die A3243G Mutation ist im D-Loop der tRNA direkt im Anschluss an den D-Stem lokalisiert. Die Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur der humanen und kaninen tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> zeigte einen mit nur zwei Watson-Crick-Paarungen deutlich instabileren D-Stem bei der menschlichen tRNA im Vergleich zur kaninen tRNA mit vier Paarungen. Der instabilere D-Stem der menschlichen tRNA führt bei Vorhandensein der Mutation zu einer Dimerbildung und somit zum Funktionsausfall der tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>. Diese strukturellen Unterschiede könnten die unterschiedlichen Auswirkungen der jeweiligen Mutationen beim Mensch und Hund erklären.

## Summary

### Morphological, biochemical and genetic investigations of the canine subacute necrotizing encephalopathy (canine Leigh syndrome)

The canine Leigh syndrome is a subacute bilateral symmetrical necrotizing encephalopathy affecting mostly puppies and young dogs. On the basis of the specific topographic distribution of the lesions of the brain, a suspected diagnosis is already possible within a living dog. But for the final diagnosis it is necessary to have a histopathological examination of the central nervous system and/or muscle biopsies. The aim of this study was the specification of the neuropathological appearance of this disease and the analysis of the underlying genetic basis. The loss of grey matter in cerebro-cortical and diencephalic areas together with the V-shaped encephalomalacia extending rostro-caudally from the basal ganglia to the reticular formation of the elongated marrow, added to the cerebellar neuronal loss are characteristics of this entity. Electron microscopy revealed structural mitochondrial abnormalities in muscle and nerve tissue and suggested as in the human Leigh syndrome a mitochondriopathy as the reason for the systemic metabolic disarrangement. On order to confirm a respiratory chain deficiency, the enzymatic activities of five mitochondrial complexes were measured in the affected dogs. The result was a combined deficiency of complex I and IV of the respiratory chain which is highly suggestive of a mitochondrial tRNA mutation. Therefore, all 22 mitochondrial tRNA-genes were screened. Sequence analysis revealed an A > G transition at nucleotide position 2691 within the tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup>. This mutation corresponds exactly to the A3243G mutation in the human gene for the tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> which leads to severe clinical phenotypes like the MELAS syndrome, cardiomyopathy and the human Leigh syndrome. However, new entries in the gene data bank and the finding of the A2691G mutation in the control group, though remarkably less prevalent, excluded the

mutation from being the pathogenic reason of the canine Leigh syndrome. A haplotype lineage analysis using the mtDNA D-loop region of all affected or non-affected examined dogs revealed all G-carriers in one specific subgroup, and this therefore proves the A2691G mutation as an evolutionary old neutral polymorphism. It is unclear, if the higher prevalence of the transition within the affected group versus the control group is maybe associated with an epigenetic susceptibility factor. Also the question why the same evolutionary highly conserved mutation within the dogs does not have a pathogenic role but within man leads to a severe systemic disorder had to be answered. The analysis of the secondary and tertiary structure of the human and canine tRNA-Leu<sup>(UUR)</sup> showed with only two Watson-Crick-pairs in the D-stem a clearly more unstable human tRNA which allows a dimerization and therefore a loss of function in the presence of the mutation. The canine tRNA D-stem is fixed with four Watson-Crick pairs and probably retains a normal phenotype because of the strengthened D-stem. These structural varieties could give an explanation for different impact of the respective mutation.

## 7 Literaturverzeichnis

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MH, Coulson AR, Droui J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Angleby H, Savolainen P. 2004. Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. 2004. *J Forensic Sci* 154:99-110
- Bataillard M, Chatzoglou E, Rumbach L, Sternberg D, Tournade A, Laforet P, Jardel C, Maisonobe T, Lombes A. 2001. Atypical MELAS syndrome associated with a new mitochondrial tRNA glutamine point mutation. *Neurol* 56:405-407.
- Bauer MF, Rothbauer U, Muehlenbein N, Smith RJ, Gerbitz KD, Neupert W, Brunner M, Hofmann S. 1999. The mitochondrial TIM22 preprotein translocase is highly conserved throughout the eukaryotic kingdom. *FEBS Lett* 464:41-47.
- Bauer MF, Neupert W. 2001. Import of proteins into mitochondria: a novel pathomechanism for progressive neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 24:166-180.
- Betts J, Lightowlers RN, Turnbull DM. 2004. Neuropathological aspects of mitochondrial DNA disease. *Neurochem Res* 29:505-511.
- Börner GV, Zeviani M, Tiranti V, Carrara F, Hofmann S, Gerbitz KD, Lochmüller H, Pongratz D, Klopstock T, Melberg A, Holme E, Pääbo S. 2000. Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum Mol Genet* 9:467-475.

- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin D, Bourgois M, Viegas - Pequignot E, Munnich A, Rotig A. 1995. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 11:144-149.
- Braund, KG. 2003. Degenerative Disorders of the Central Nervous System. Ithaca, New York, USA. *International Veterinary Information Service*. [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- Brenner O, De Lahunta A, Cummings JF, Summers BA, Monachelli M. 1997. A canine encephalomyelopathy with morphological abnormalities in mitochondria. *Acta Neuropathol (Berl)* 94:390-397.
- Brenner O, Wakshlag JJ, Summers BA, De Lahunta A. 2000. Alaskan Husky encephalopathy - a canine neurodegenerative disorder resembling subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome). *Acta Neuropathol (Berl)* 100:50-62.
- Brown DT, Samuels DC, Michael EM, Turnbull DM, Chinnery PF. 2001. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am J Hum Genet* 68:533-536.
- Brown GK, Squier MW. 1996. Neuropathology and pathogenesis of mitochondrial diseases. *J Inher Metab Dis* 28:393-401.
- Brown MD, Starikovskaya E, Derbeneva O, Hosseini S, Allen JC, Mikhailovskaya IE, Sukernik RI, Wallace DC. 2002. The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup. *J Hum Genet* 110:130-138.
- Burton MP, Schneider BG, Brown R, Escamilla-Ponce N, Gulley ML. 1998. Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 24:86-92.

- Campos Y, Martin MA, Lorenzo G, Aparicio M, Cabello A, and Arenas J. 1996. Sporadic MERRF/MELAS overlap syndrome associated with the 3243 tRNA(Leu(UUR)) mutation of mitochondrial DNA. *Muscle Nerve* 19:187-190.
- Castro-Gago M, Blanco-Barca M, Campos-Gonzalez Y, Arenas-Barbero J, Pintos-Martinez E, Eiris-Punal J. 2006. Epidemiology of pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in northwest Spain. *Pediatr Neurol* 34:204-211.
- Cavanagh JB, Harding BN. 1994. Pathogenic factors underlying the lesions in Leigh's disease. Tissue responses to cellular energy deprivation and their clinico-pathological consequences. *Brain* 117:1357-1376.
- Chinnery PF, Taylor GA, Howell N, Andrews RM, Morris CM, Taylor RW, McKeith IG, Perry RH, Edwardson JA, Turnbull DM. 2000. Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies. *Neurol* 55:302-304.
- Coenen M, Antonicka H, Ugalde C, Sasarman F, Rossi R, Heister A, Newbold R, Trijbels F, van den Heuvel L, Shoubridge EA, Smeitink J. 2004. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* 351:2080-2086.
- Dahl H. 1995. Pyruvate dehydrogenase E1 $\alpha$  deficiency: males and females differ yet again. *Am J Hum Genet* 56:553-557.
- Darin N, Moslemi AR, Lebon S, Rustin P, Holme E, Oldfors A, Tulinius M. 2003. Genotypes and clinical phenotypes in children with cytochrome-c oxidase deficiency. *Neuropediatrics* 34:311-317
- De Lahunta A. 2003. Neurological Examination. Ithaca, New York, USA. *International Veterinary Information Service. www.ivis.org.*

- De Vivo DC. 1993. The expanding clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Brain Dev* 15:1-22.
- DiMauro S. 1996. Mitochondrial encephalomyopathies: what next? *J Inherit Metab Dis* 19:489-503.
- DiMauro S and De Vivo DC. 1996. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 40:5-7.
- DiMauro S. 1998. Mitochondrial diseases: clinical considerations. *Biofactors*, 7, 277-285.
- DiMauro S. 1999. Mitochondrial encephalomyopathies: back to Mendelian genetics. *Ann Neurol* 45:693-694.
- DiMauro S und Schon EA. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668.
- DiMauro S, Davidzon G. 2005. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 37:222-232.
- Ducote JM, Johnson KE, Dewey CW, Walker MA, Coates JR, Berridge BR. 1999. Computed tomography of necrotizing meningoencephalitis in 3 Yorkshire Terriers. *Vet Radiol Ultrasound* 40:617-621.
- Ernster L, Ikkos D, Luft R. 1959. Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 184:1851-1854.
- Fabrizi GM, Cardatoli E, Grieco GS, Cavallaro T, Malandrini A, Manneschi L, Dotti MT, Federico A, and Guazzi G. 1996. The A to G transition at nt 3243 of the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) may cause an MERRF syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61:47-51.
- Finsterer J, Mitochondriopathies. 2004. *Eur J Neurol* 11:163-186.

- Fischer JC, Ruitenbeek W, Gabreels FJ, Janssen AJ, Renier WO, Sengers RC, Stadhouders AM, Ter Laak HJ, Trijbels JM, Veerkamp JH. 1986. A mitochondrial encephalomyopathy: the first case with an established defect at the level of coenzyme Q. *Eur J Pediatr* 144:441-444.
- Gerbitz KD, Gempel K, Brdiczka D. 1996. Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes* 45:113-126.
- Gillis L, Kaye E. 2002. Diagnosis and management of mitochondrial diseases. *Pediatr Clin North Am* 49:203-219.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. 1990. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348:651-653.
- Greer CE, Lund JK, Manos MM. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl* 1:46-50.
- Gruber AD, Wessmann A, Vandeveld M, Summers BA, Tipold A. 2002. Mitochondriopathy with regional encephalic mineralization in a Jack Russell Terrier. *Vet Pathol* 39:732-736.
- Hanna MG, Nelson IP. 1999. Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases. *Cell Mol Life Sci* 55:691-706.
- Hao R, Yao YN, Zheng YG, Gang Xu M, Wang ED. 2004. Reduction of mitochondrial tRNA leu<sup>(UUR)</sup> aminoacylation by some MELAS-associated mutations. *FEBS Lett* 578:135-139.
- Hofmann S, and Bauer MF. 2003. Mitochondrial disorders. In *Encyclopedia of the Human Genome*. London, New York, Munich: Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group. 1-9.



- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331:717-719.
- Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AH, Toscano A, Clark JB, Morgan-Hughes JA. 1989. Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 26:699-708.
- Howell N. 1997. Leber hereditary optic neuropathy: how do mitochondrial DNA mutations cause degeneration of the optic nerve? *J Bioenerg Biomembr* 29:165-173.
- Howell N. 1999. Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers. *Int Rev Cytol* 186:49-116.
- Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. 2000. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 26:176-181.
- Jacobs HT. 2003. Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Hum Mol Genet* 12:293-301.
- Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA. 1997. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* 16:93-95.
- Johns DR. 1995. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 333:638-644.
- Jull BA, Merryman LI, Thomas WB, McArthur A. 1997. Necrotizing encephalitis in a Yorkshire terrier. *J Am Vet Med Assoc* 211:1005-1007.
- Kalman B, Li S, Chatterjee D, O'Connor J, Voehl MR, Brown MD, Alder H. 1999. Large scale screening of the mitochondrial DNA reveals no pathogenic mutations but a haplotype associated with multiple sclerosis in Caucasians. *Acta Neurol Scand* 99:16-25.

- Kern AD, Kondrashov FA. 2004. Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nature Genet* 11:1201-1212.
- King MP, Attardi G. 1996. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264:304-313.
- Koga Y, Akita Y, Takane N, Sato Y, Kato H. 2000. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Arch Dis Child* 82:407-411.
- Larsson NG, Rustin P. 2001. Animal models for respiratory chain disease. *Trends Mol Med* 7:578-581.
- Leigh D. 1951. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 14:216-221.
- Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Giullen S, Vila C. 2002. Ancient DNA evidence for old world origin of new world dogs. *Science* 298:1613-1616.
- Leonard JV, Schapira AH. 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 355:299-304.
- Leonard JV, Schapira AH. 2000. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 355:389-394.
- Levy SE, Waymire KG, Kim YL, MacGregor GR, Wallace DC. 1999. Transfer of chloramphenicol-resistant mitochondrial DNA into the chimeric mouse. *Transgenic Res* 8:137-145.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Man Y, Moinfar F, Bratthauer GL, Kuhls EA, Tavassoli FA. 2001. An improved Method for DNA Extraction from Paraffin Sections. *Pathol Res Pract* 197:635-642.
- Marchington DR, Barlow D, Poulton J. 1999. Transmitochondrial mice carrying resistance to chloramphenicol on mitochondrial DNA: developing the first mouse model of mitochondrial DNA disease. *Nat Med* 5:957-960.
- Matiasek K, Kopp A, Stierstorfer B, Fischer A, Schmahl W. 2002. Clinicopathologic survey on Leigh's syndrome in Yorkshire Terriers. *J Vet Int Med* 17:247.
- McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. 2002. The neurology of mitochondrial DNA disease. *Lancet Neurol* 1:343-351.
- McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowlers RN, Turnbull DM. 2002 Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nature Genet* 30:145-146
- MITOMAP. A human mitochondrial genome database. [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)
- Moraes CT, Ciacci F, Silverstri G, Shanske S, Sciacco M, Hirano M, Schon EA, Bonilla E, DiMauro S. 1993. Atypical clinical presentations associated with the MELAS mutation at position 3243 of human mitochondrial DNA . *Neuromusc Dis* 3:43-50.
- Morgan-Hughes JA, Sweeney MG, Cooper JM, Hammans SR, Brockington M, Schapira AH, Harding A., Clark JB. 1995. Mitochondrial DNA (mtDNA) diseases: correlation of genotype to phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1271:135-140.
- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66:863-917.
- Obayashi T, Hattori K, Sugiyama S, Tanaka M, Tanaka T, Itoyama S, Deguchi H, Kawamura K, Koga Y, Toshima H. 1992. Point mutations in

- mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 124:1263-1269.
- Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. 1984. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16:481-488.
- Pereira L, Van Asch B, Amorim A. 2003. Standardisation of nomenclature for dog mtDNA D-Loop: a prerequisite for launching a *Canis familiaris* database. *J Forensic Sci* 141:99-108.
- Roy MD, Wittenhagen L, Vozzella BE, Kelley SO. 2004. Interdomain communication between weak structural elements within a disease-related human tRNA. *Biochem* 43:384-392.
- Roy MD, Wittenhagen L, Kelley SO. 2005. Structural probing of a pathogenic tRNA dimer. *RNA* 11:254-260.
- Sakuta R, Honzaw S, Murakani N, Goto Y, Nagai T. 2002. Atypical MELAS associated with mitochondrial tRNA(Lys) gene A8296G mutation. *Pediatr Neurol* 27:397-400.
- Santorelli FM, Mak SC, Vasquez-Acevedo M, Gonzalez-Astiazaran A, Ridaura-Sanz C, Gonzalez-Halphen D, DiMauro S. 1995. A novel mitochondrial DNA point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 216:835-840.
- Santorelli FM, Tanji K, Sano M, Shanske S, El-Shahawi M, Kranz-Eble P, DiMauro S, De Vivo DC. 1997. Maternally inherited encephalopathy associated with a single base insertion in the mitochondrial tRNA Trp gene. *Annals of Neurology* 42: 256-260.
- Santra S, Gilkerson RW, Davidson M, Schon EA. 2004. Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann Neurol* 56:662-669.

- Savolainen P, Rosen B, Holmberg A, Leitner T, Uhlen M, Lundeberg J. 1997. Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use. *J Forensic Sci* 42:593-600.
- Savolainen P, Zhang YP, Luo J, Lundeberg J, Leitner T. 2002. Genetic evidence for an East Asian Origin of domestic Dogs. *Science* 298:1610-1613.
- Schapira AH und Cock HR. 1999. Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Eur J Clin Invest* 29:886-898.
- Schapira AH. 2002. The "new" mitochondrial disorders. *J Neurol Neurosurg Psych* 72:144-149.
- Schapira AH. 2002. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Inherit Metab Dis* 25:207-214.
- Schon EA. 2000. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci* 25:555-560.
- Schroder JM, Sommer C. 1991. Mitochondrial abnormalities in human sural nerves: fine structural evaluation of cases with mitochondrial myopathy, hereditary and non-hereditary neuropathies, and review of the literature. *Acta Neuropathol (Berl)* 82:471-482.
- Shanske S, Pancrudo J, Kaufmann P, Engelstad K, Jhung S, Lu J, Naini A, DiMauro S, De Vivo DC. 2004. Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: implications for diagnosis. *Am J Med Genet* 130:134-137.
- Shin WS, Tanaka M, Suzuki J, Hemmi C, Toyono-Oka T. 2000. A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 67:1617-1620.
- Silvestri G, Bertini E, Servidei S, Rana M, Zachara E, Ricci E, Tonali P. 1997. Maternally inherited cardiomyopathy: a new phenotype associated with

- the A to G AT nt 3243 of mitochondrial DNA (MELAS mutation). *Muscle Nerve* 20:221-225.
- Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, Allard P, Dillehay DL, Nusinowitz S, Heckenlively JR, MacGregor GR, Wallace DC. 2000. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14461-14466.
- Sohm B, Frugier M, Brule H, Olszak K, Przykorska A, Florentz C. 2003. Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J Mol Biol* 328:995-1010.
- Stryer L. Biochemie, 1996. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Sundqvist AK, Björnerfeldt S, Leonard JA, Hailer F, Hedhammar A, Ellegren H, Vila C. 2006. Unequal contribution of sexes in the origin of dog breeds. *Genetics* 172:1121-1128.
- Takahasi S, Miyahara K, Ishikawa H, Ishiguro N, Suzuki M. 2002. Lineage classification of canine inheritable disorders using mitochondrial DNA haplotypes. *J Vet Med Sci* 64:255-259.
- Tanaka M, Ino H, Ohno K, Ohbayashi T, Ikebe S, Sano T, Ichiki T, Kobayashi M, Wada Y, Ozawa T. 1991. Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun* 174:861-868.
- Tanji K, Bonilla E. 2000. Neuropathologic aspects of cytochrome c oxidase deficiency. *Brain Pathol* 10: 422-430.
- Tanji K, Kunimatsu T, Vu TH, Bonilla E. 2001. Neuropathological features of mitochondrial disorders. *Semin Cell Dev Biol* 12:429-439.
- Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez JA, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T,

- Zeviani M. 1998. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 63:1609-1621.
- Tulinius M, Moslemi AR, Darin N, Westerberg B, Wiklund LM, Holme E, Oldfors A. 2003. Leigh syndrome with cytochrome-c oxidase deficiency and a single T insertion nt 5537 in the mitochondrial tRNATrp gene. *Neuropediatrics* 34:87-91.
- Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, De Vijlder MF, Struyvenberg PA, Van de Kamp JJ, Maassen JA. 1992. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1:368-371.
- Verma A, Moraes CT, Shebert RT, Bradley WG. 1996. A MERRF/PEO overlap syndrome associated with the mitochondrial DNA 3243 mutation. *Neurology* 46:1334-1336.
- Vilarinho L, Maia C, Coelho T, Coutinho P, Santorelli FM. 1997. Heterogeneous presentation in Leigh syndrome. *J Inherit Metab Dis* 20:704-705.
- Vogel H, Zamecnik J. 2005. Diagnostic immunohistology of muscle diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:181-193.
- Wakshlag JJ, De Lahunta A, Robinson T, Cooper BJ, Brenner O, O'Toole TD, Olson J, Beckman KB, Glass E, Reynolds AJ. 1999. Subacute necrotising encephalopathy in an Alaskan husky. *J Small Anim Pract* 40:585-589.
- Walker UA, Collins S, Byrne E. 1996. respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 36:260-267.
- Wallace DC. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci* 91:8739-8746.
- Wallace DC. 1999. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* 283:1482-1488.

- Wallace DC. 2001. Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* 106:71-93.
- Wittenhagen LM, Kelley SO. 2002. Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat Struct Bio* 8:586-590.
- Wittenhagen LM, Kelley SO. 2003. Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci* 11:605-611.
- Wittenhagen LM, Roy MD, Kelley SO. 2003. The pathogenic U3271C human mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation disrupts a fragile anticodon stem. *Nucl Acids Res* 31:596-601.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. 1988. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurol* 38:1339-1346.



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bp	Basenpaare
CoQ	Ubichinon = Coenzym Q
COX	Cytochrom c Oxidase
CPEO	<i>Chronic progressive external ophtalmoplegia</i>
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
et al.	et alii
HE	Hämatoxylin-Eosin
KSS	<i>Kearns-Sayre-syndrome</i>
LHON	<i>Leber's hereditary optic neuropathy</i>
log	dekadischer Logarithmus
M	molar (Mol/l)
MELAS	<i>Myopathy, encephalopathy, lactate acidosis and stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic epilepsy and ragged red fibers</i>
MgCl	Magnesiumchlorid
mt	mitochondrial

---

mtDNA	mitochondriale DNA
N	Normalität von Lösungen
Na-azetat	Natriumazetat
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NARP	<i>neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa</i>
np	Nukleotidposition
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAS	<i>Periodic acid Schiff's reaction</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
POLG	Polymerase $\gamma$ A
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RRF	<i>Ragged red fibers</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

### **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. W. Schmahl für die Überlassung des Dissertationsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen und seine jederzeit freundlich gewährte Unterstützung.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Betreuern bedanken:

Herrn Dr. Kaspar Matiasek für die Unterstützung bei der neuropathologischen Auswertung, seine kompetente, geduldige Betreuung und die vertrauensvolle Zusammenarbeit. Zudem möchte ich mich besonders für seine hervorragende Aus- und Weiterbildung bedanken.

PD Dr. Sabine Hofmann danke ich für ihre engagierte und ausgezeichnete Betreuung, ständige konstruktive Diskussionsbereitschaft und ihre vielen fachlich sehr wertvollen Ratschläge, die viel zur Verwirklichung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

PD Dr. Matthias F. Bauer, in dessen Arbeitsgruppe ein großer Teil dieser Arbeit entstand. Durch seine vielfältigen Ideen, seine konstruktive Kritik sowie seinem wissenschaftlichen Verständnis hatte er einen entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Für die freundliche Hilfsbereitschaft, die gute Arbeitsatmosphäre und aufmunternden Worte möchte ich mich bei meiner Kollegin Nicole Mühlenbein und ganz besonders herzlich bei meiner Kollegin Bettina Treske bedanken.

Für die großartige Unterstützung in jeder Hinsicht danke ich natürlich aus tiefstem Herzen meiner Familie. Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit widme ich meiner Großmutter Johanna, die sicherlich eine große Freude daran gehabt hätte.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

---

Name: Kerstin Baiker  
Geburtsdatum: 29.09.1974  
Geburtsort: Regensburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Sylvia Kruse, geb. Hartleib und  
Harald Baiker

### Ausbildung :

---

1981 – 1985 Grundschole in Uhdlingen-Mühlhofen  
1985 – 1994 Gymnasium in Überlingen am Bodensee  
Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife  
Febr. 1995 - Mai 1996 Studium der Tiermedizin in Pisa, Italien  
Juli 1996 - Okt. 1998 Ausbildung zur Tierarzthelferin bei Dr.  
B. Stark, Salem  
Nov. 1998 - Febr. 2004 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-  
Maximilians-Universität, München  
Mai 2004 Beginn der Promotion am Lehrstuhl für  
Allgemeine Pathologie und Neuropathologie,  
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität, München  
Oktober 2005 Approbation