

J. Stehr¹, C. Siegismund¹, M. Rohde¹, P. Seibel², J. Zenker², B. Löffler², U. Kühl³, H. P. Schultheiss³, D. Lassner¹

¹ - Institut Kardiale Diagnostik und Therapie GmbH Berlin ² - Zentrum für Biotechnologie und Biomedizin Universität Leipzig ³ - Med. Klinik II, Abt. Kardiologie and Pulmologie, Charité CBF, Berlin
Contact: Dr. Dirk Lassner, Institut Kardiale Diagnostik und Therapie GmbH, Moltkestrasse 31, D-12203 Berlin, Germany, email: info@ikdt.com

Zielsetzung

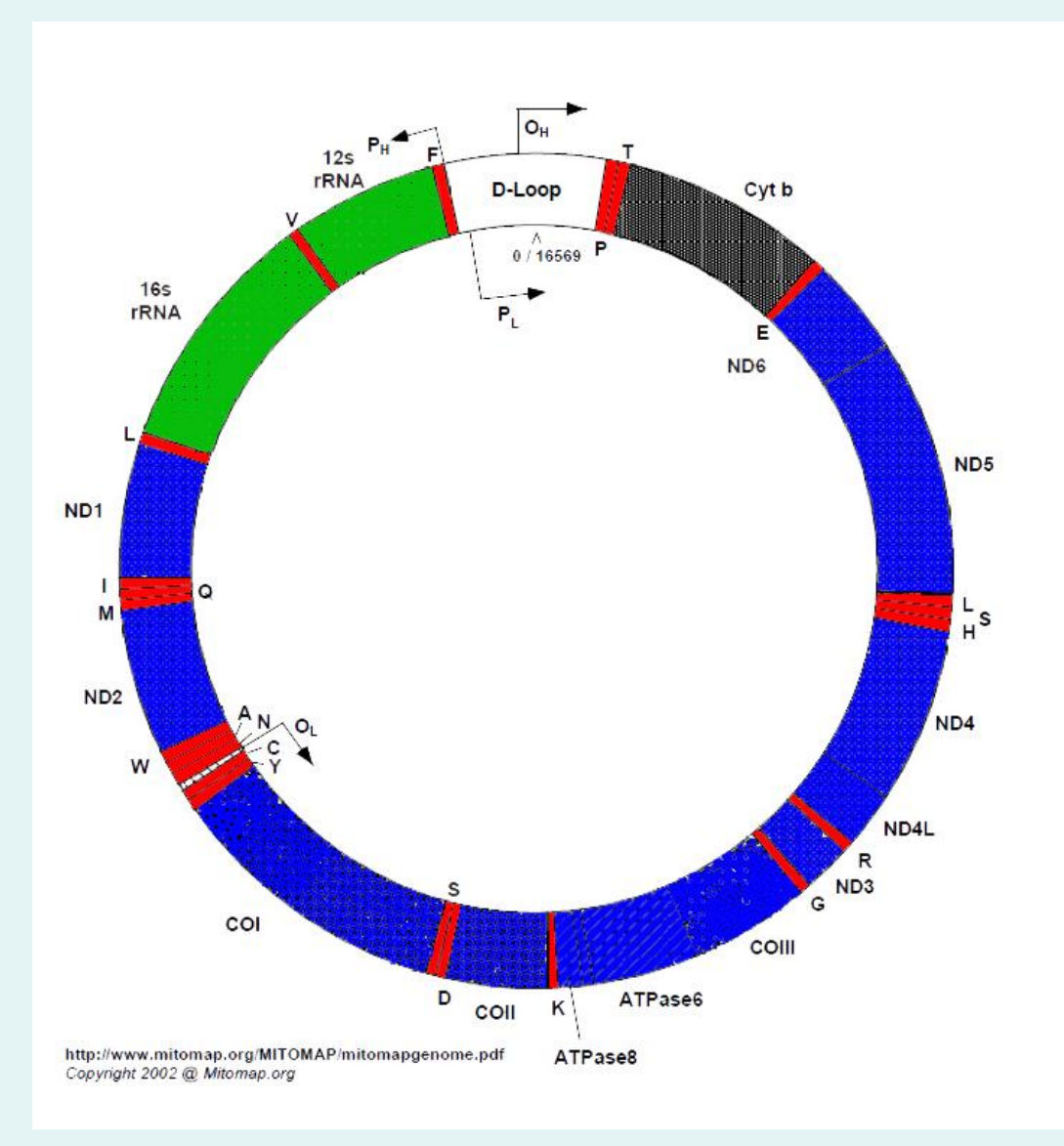
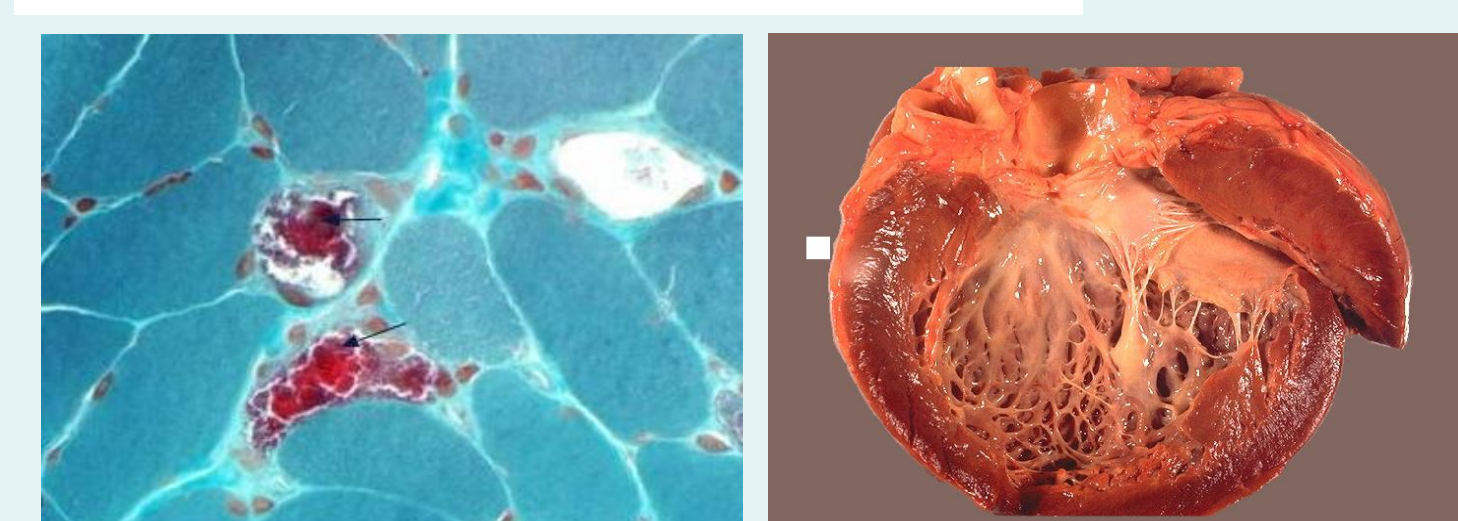
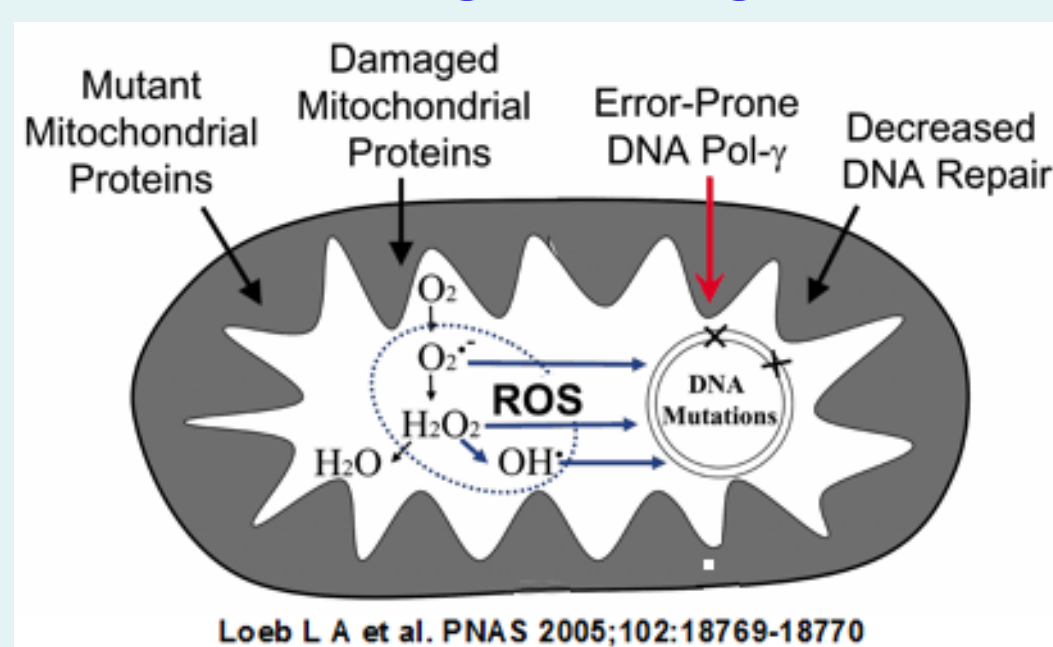
- Hochdurchsatz-Screening von Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) in Herzpatienten
- Bestimmung der Häufigkeit von 30 rRNA/tRNA Mutationen, 5 coding/control region Mutationen und der Common Deletion der mtDNA in Herzmuskelbiopsien von DCM Patienten
- Korrelation mit klinischen Parametern (Entzündung und virale Infektion)

Kardiomyopathien

- Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist die häufigste Todesursache in den westlichen Ländern
- Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist oft durch Entzündung und virale Infektionen verursacht
- Diese Konditionen könnten zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und somit des Herzmuskels führen

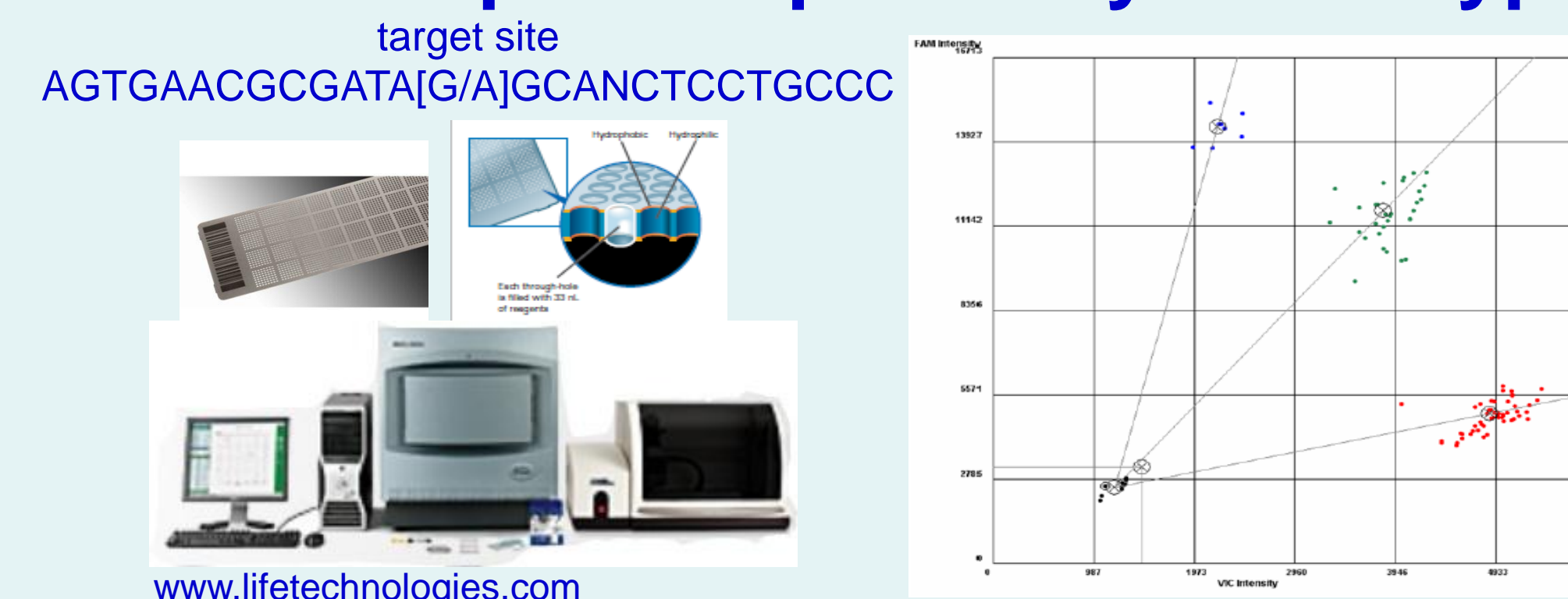
Mitochondrien

- Verantwortlich für die Energieversorgung der Zelle
- 36% der Herzmuskelmasse sind Mitochondrien
- Hohes Risiko der Schädigung der mtDNA
- Mitochondriendysfunktion beeinträchtigt Herzfunktion
- Viele Krankheiten sind mit Mutationen bzw. Umlagerungen innerhalb der mtDNA assoziiert

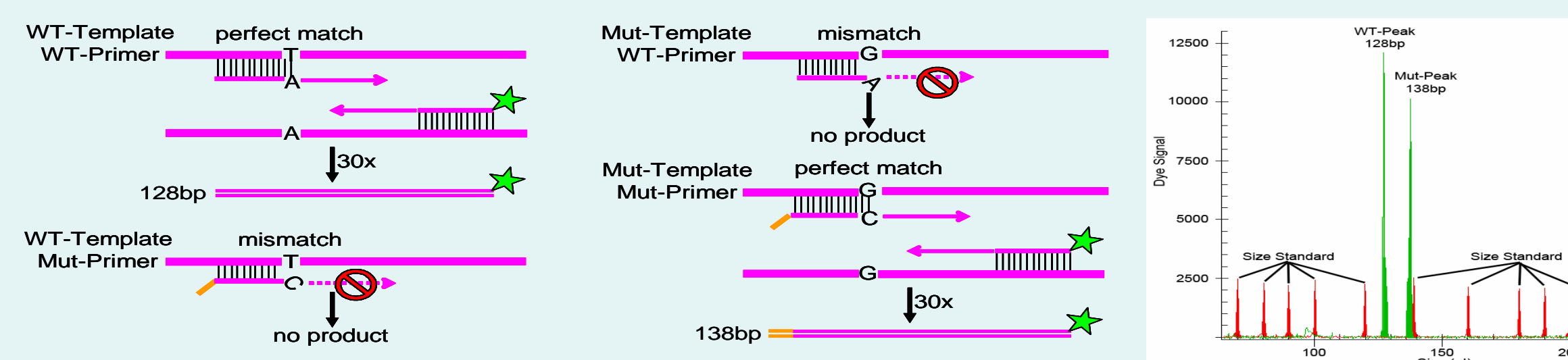


Diagnostisches Nachweissystem für mtDNA-Mutationen

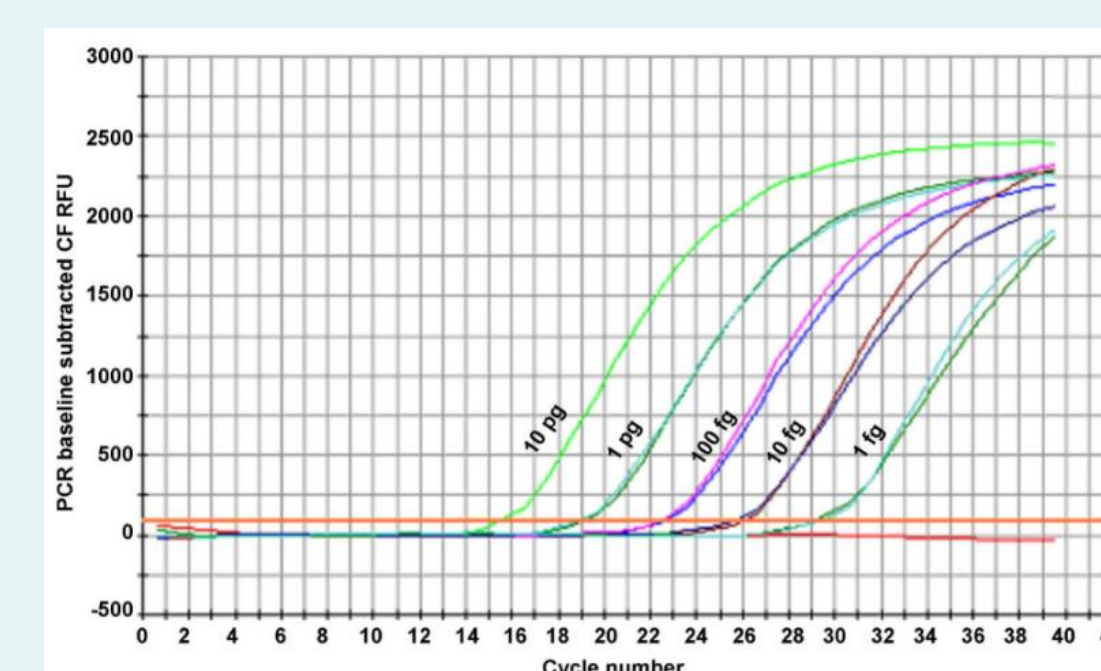
Custom TaqMan® OpenArray® Genotyping



Allel-spezifische Primer Verlängerung & Fragment Längen Analyse



mtDNA Common Deletion – Real-Time PCR

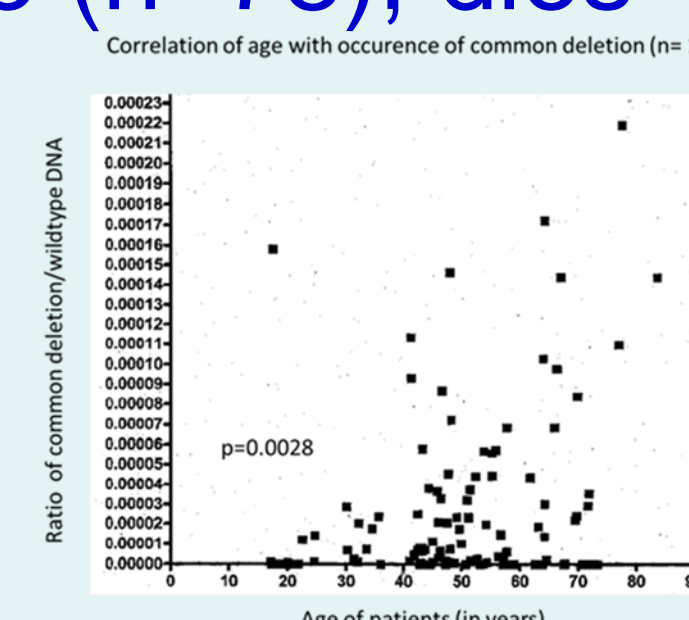


Ergebnisse

mtDNA Common Deletion – Real-Time PCR

- Common Deletion (CoDe) ist eine Deletion eines 5kb Fragmentes im mitochondrialen Genom
- Bestimmung des Verhältnisses von Wildtype zu mutierter mtDNA mittels QPCR
- Folgebiopsien zeigen erhöhte CoDe (n=78), dies korreliert mit Alter, Fibrose und hoher B19V Viruslast

Correlation with increase of CoDe in follow up biopsy			
Parameter	yes	no	p-value
Fibrosis (histology score)	2,3	1,8	0,0011
Age			0,0028



Häufigkeit und klinische Korrelation der tRNA Mutationen

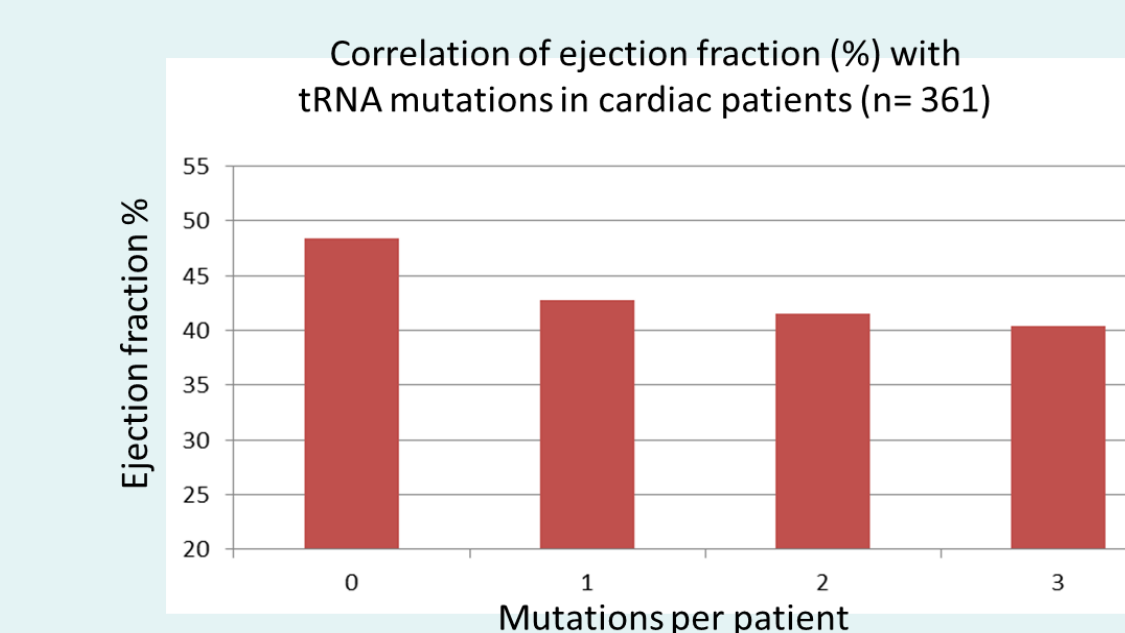
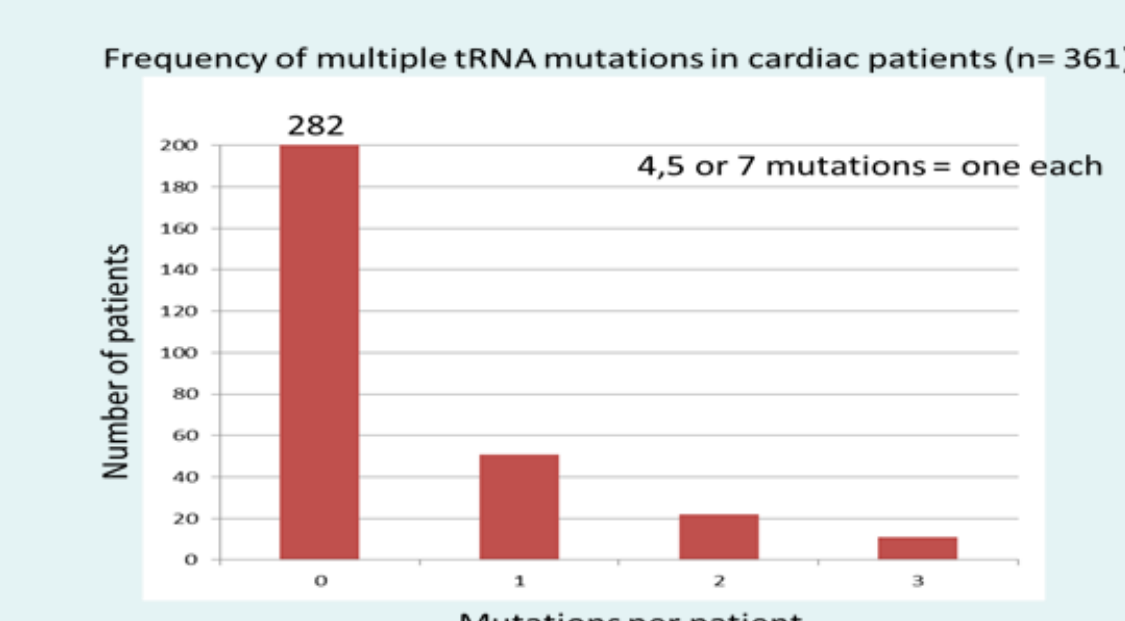
- Screening von 35 Punktmutationen der mtDNA mittels TaqMan QPCR OpenArray
- 361 klinisch und myokardbiopsisch eindeutig charakterisierte Patienten
- Bestätigung mittels Fragment Längen Analyse

Mutation position in mtDNA	Function	Publication in Pubmed	Year of publication	Mutated patients in this study
583	tRNA	0		0
1494	tRNA	0		4
1555	tRNA	0		8
1606	tRNA	0		3
3243	tRNA	14 (12)	1993-2009	23
3256	tRNA	0		3
3260	tRNA	1 (5)	2010	7
3271	tRNA	2	1993, 1998	11
3291	tRNA	0		14
3302	tRNA	0		1
3303	tRNA	2	1994, 1999	0
3460	coding	0		2
3635	coding	0		1
3700	coding	0		7
3733	coding	0		2
4171	coding	0		2
4298	tRNA	0		9
4300	tRNA	1	1995	9
4308	tRNA	0		7
4332	tRNA	0		1
5537	tRNA	0		8
5650	tRNA	0		3
5703	tRNA	0		5
7445	tRNA	0		6
7471	tRNA	0		10
7497	tRNA	0		1
7511	tRNA	0		3
8344	tRNA	1 (5)	1995	3
8356	tRNA	0		4
8363	tRNA	0		8
8993	tRNA	2 (1)	1994, 1996	6
10010	tRNA	0		1
12147	tRNA	0		11
12315	tRNA	0		2
14674	tRNA	0		0
14709	tRNA	0		4

87 Patienten (24%) mit 189 Mutationen

Klinische Parameter in Patienten mit u. ohne detektierten mtDNA Mutationen

Clinical parameter	Wildtype	Mutated	p-value
LVEF(%)	50	41,5	<0,05
Inflammation (CD3 cells/mm ³)	5,7	8,1	<0,05
Apoptosis Index (expression ratio Bax/BCL2)	0,9	3,2	<0,005
maximum O2 consumption (%)	70,5	61	<0,05



Clinical Diagnosis	n=	% of Total Code mutation	Correlation with tRNA mutations
Acute Myocarditis	52	14,4	
Myocarditis	211	58,4	p=0,9884
DCM	98	27,2	p=0,7367

Baseline Biopsy diagn	n=	% of Total Code mutation	Correlation with tRNA mutations
Acute Myocarditis	16	4,4	
Borderline Myocarditis	74	20,5	p=0,1511
DCM	78	21,6	
DCM	27	7,5	
No Myocarditis	166	46,0	p=0,3582

Korrelation von NYHA mit individuellen mtDNA Mutationen

Correlation of NYHA with Mutation		
Mutation	n	p-value
3291	0	0,0315
8356	0	0,0159
12147	0	0,014

Schlussfolgerung

- mtDNA Mutationen im Herzgewebe sehr häufig und gehen einher mit schädlichen myokardialen Veränderungen
- Detektion der mtDNA Mutationen könnte ein neues Hilfsmittel in der Diagnostik von Kardiomyopathien sein

Interessenerklärung

Dieses Projekt wurde vom Zentralen Innovationsprogramm für KMU (ZIM-KOOP) des Bundesministeriums für Wirtschaft (BMWi) in Deutschland finanziert.