

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Humangenetik

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München und

Helmholtz Zentrum München

Leitung: Prof. Dr. Thomas Meitinger

**Mutationsscreen bei Patienten mit isoliertem Komplex-I-Defekt der mitochondrialen  
Atmungskette**

**Florence Chantal Dominique Madignier**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Thomas Meitinger

2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 06.03.2017 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.05.2018 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Mitochondriopathien .....	3
1.1.1 Klinik und Genetik der Atmungskettendefekte .....	3
1.1.2 Klassifikation.....	6
1.1.3 Die mitochondriale DNA (mtDNA) und Atmungskettendefekte durch mtDNA Mutationen .....	7
1.1.4 Die Atmungskette .....	9
1.1.5 Der Komplex I.....	10
1.1.6 Der isolierte Komplex-I-Defekt.....	12
1.2 Angewandte Methoden der Mutationsanalyse .....	13
1.2.1 (Direkt-) Sequenzierung nach Sanger.....	13
1.2.2 Präscreeningverfahren zum Nachweis unbekannter Mutationen .....	14
1.2.3 Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA).....	16
<b>2 Aufgabenstellung.....</b>	<b>20</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	21
3.1.1 Technische Geräte .....	21
3.1.2 Allgemeiner Laborbedarf .....	21
3.1.3 Chemikalien.....	22
3.1.4 Enzyme und Kits .....	22
3.1.5 Datenbanken und Computersoftware .....	23
3.2 Patientenmaterial .....	23
3.3 DNA-Konzentrations- und Mengenbestimmung.....	24
3.4 Genomweite Amplifizierung von DNA .....	24
3.5 Primer .....	25
3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	26
3.6.1 Vorbereitung: Anlegen von 96-Well- und 384-Well-Platten .....	27
3.6.2 Standardprotokolle .....	28
3.6.3 Vom Standard abweichende Protokolle .....	28
3.7 Agarosegelelektrophorese .....	30
3.8 Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA).....	31

3.8.1 Allgemeines .....	31
3.8.2 Analyse der Schmelzkurven .....	31
3.9 DNA-Sequenzierung .....	35
3.9.1 Aufreinigung von PCR-Produkten durch Ultrafiltration .....	35
3.9.2 Sequenzreaktion.....	35
3.9.3 Fällung der Sequenzreaktion .....	36
3.9.4 Sequenzanalyse.....	36
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1 Etablierung des Mutationsscreens .....	37
4.1.1 Erstellen der Probensammlung.....	37
4.1.2 Auswahl der Kandidatengene .....	38
4.1.3 Etablierung der PCR-Protokolle.....	39
4.2 Mutationsanalyse .....	41
4.2.1 Allgemeines .....	41
4.2.2 Übersicht über die Ergebnisse der Mutationssuche.....	44
4.2.3 Spektrum der pathogenen Mutationen.....	44
4.2.4 Bekannte pathogene Mutationen der nukleären DNA.....	45
4.2.5 Neue wahrscheinlich pathogene Mutationen der nukleären DNA .....	45
4.2.6 Varianten unklarer Signifikanz der nukleären DNA .....	47
4.2.7 Bekannte pathogene Mutationen der mitochondrialen DNA .....	49
4.2.8 Bisher unbekannte Varianten der mitochondrialen DNA.....	49
4.2.9 Häufige Varianten und stille Mutationen .....	50
4.3 Klassifizierung von Varianten nach potentieller Pathogenität .....	51
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1 Gefundene Varianten: pathogen oder neutral? .....	53
5.1.1 Allgemeines .....	53
5.1.2 Bekannte Mutationen.....	54
5.1.3 Herangezogene Kriterien zur Interpretation von unbekanntem Mutationen .....	54
5.1.4 Beurteilung der als pathogen bewerteten, unbekanntem Mutationen.....	57
5.2 Spektrum der gefundenen Mutationen, Anteil an Kindern mit mitochondrialen Mutationen .....	58
5.3 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur und Limitationen der Arbeit .....	60

5.3.1 Vorselektion von Patienten mit ergebnisloser Mutationsdiagnostik .....	60
5.3.2 Einschluss von Patienten mit hoher Komplex-I-Restaktivität.....	61
5.3.3 Kausale Mutationen in nicht-untersuchten Genen.....	62
5.3.4 Kausale Mutationen in nicht-untersuchten Genabschnitten und methodenbedingte Ausfälle .....	64
5.3.5 Fehlende experimentelle Validierung der Pathogenität von Mutationen .....	65
5.4 Anwendung der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse zur Mutationssuche und Konsequenzen für nachfolgende Mutationsscreens.....	66
5.4.1 Sensitivität der angewandten Methoden.....	66
5.4.2 Praktische Anwendung der HRMA und Konsequenzen für nachfolgende Mutationsscreens.....	68
5.4.2.1 Anzahl an sequenzierten Proben.....	68
5.4.2.2 Heteroduplexformation durch Beimischen von Wildtyp-DNA .....	68
5.4.2.3 Sequenzieren des gesamten Gens bei Vorliegen einer einzelnen heterozygoten Mutation.....	69
5.4.2.4 Gleichzeitige Analyse genomweit amplifizierter und genomischer DNA .....	70
5.4.3 Anwendungsmöglichkeiten der HRMA in Zeiten des Next Generation Sequencing .....	70
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>75</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>101</b>
<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>103</b>



# Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPEO	Chronisch-Progressive Externe Ophtalmoplegie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
F-Primer	Vorwärtsprimer
g	Normalfallbeschleunigung
H	Wasserstoff
H <sup>+</sup>	Wasserstoffproton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRMA	Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (High Resolution Melting Analysis)
IHG	Institut für Humangenetik des Helmholtz-Zentrum Münchens
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LHON	Leber'sche Optikusneuropathie
MDA	Multiple Displacement Amplification
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NADH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
ncDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerasekettenreaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

RNA	Ribonukleinsäure
R-Primer	Rückwärtsprimer
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SNV	Einzelnukleotidvariante (Single Nucleotide Variant)
TBE	Tris Borate EDTA
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
VUS	Variante unklarer Signifikanz (Variant of unknown significance)
W	Watt
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

### Einheiten

A	Ampere
B	Basen
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
k	Kilo
kb	Kilobasen (tausend Basen)
M	Molar
Min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
sec	Sekunde
U	Unit
V	Volt
W	Watt



# 1 Einleitung

In diesem einleitenden Kapitel soll zunächst auf das Krankheitsbild der Mitochondriopathien eingegangen werden. Dabei werden die klinischen Aspekte sowie die Genetik dieser Krankheitsgruppe erläutert und auch die Grundlagen der Energieproduktion der Zelle durch die Atmungskette selbst dargestellt. In dieser Arbeit wurde ein Patientenkollektiv mit isoliertem Defekt des Komplex I der Atmungskette untersucht, daher wird dieser Proteinkomplex sowie seine Funktion detaillierter geschildert.

Im Anschluss werden die angewandten Methoden der Mutationsanalyse aufgezeigt. Insbesondere wird hier auf die Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRMA; High Resolution Melting Analysis) eingegangen, da diese für die Durchführung dieser Arbeit Anwendung fand und die Untersuchungsbedingungen hierfür für dieses Projekt etabliert wurden.

## 1.1 Mitochondriopathien

### 1.1.1 Klinik und Genetik der Atmungskettendefekte

Unter Mitochondriopathien versteht man im Allgemeinen Erkrankungen der Mitochondrien, den energieproduzierenden Organellen der Zelle. Die exakte Definition dieser Krankheitsgruppe ist jedoch sehr uneinheitlich. Als klassische Mitochondriopathien werden nur Erkrankungen bezeichnet, denen die Fehlfunktion der mitochondrialen Atmungskette mit ihren fünf Enzymkomplexen zugrunde liegt (Zeviani and Di Donato 2004). Im weiteren Sinne können darunter jedoch auch Störungen anderer mitochondrialer Stoffwechselwege wie z.B. des Citratzyklus, der Fettsäureoxidation oder des Harnstoffzyklus gezählt werden ebenso wie die Beeinträchtigung anderer Funktionen der Mitochondrien wie die Apoptose und Calciumhomöostase.

Diese Arbeit hält sich an die klassische Begriffsterminologie und definiert Mitochondriopathien als Atmungskettendefekte.

Die Mitochondriopathien zählen heute zu den häufigsten genetischen Stoffwechselkrankheiten, wobei die Prävalenz nach epidemiologischen Untersuchungen aus den Jahren 1998 bis 2004 mit mindestens 1:5.000 Lebendgeborenen angegeben wird

(Schaefer et al. 2004, Zeviani and Di Donato 2004). Dabei stellt die verringerte Komplex-I-Aktivität den am häufigsten beobachteten biochemischen Defekt dar (Distelmaier et al. 2009).

Allgemein gesprochen, leitet sich aus einem Defekt und somit einer verminderten biochemischen Aktivität der Atmungskette ein erheblicher Energiemangel auf zellulärer Ebene ab. Dieser kann sich in unterschiedlichen Organsystemen klinisch sehr verschieden äußern. Dabei können generell alle Gewebe bzw. Organe des Körpers betroffen sein.

Tachytrophe Gewebe mit hohem Energieverbrauch wie Zentrales Nervensystem (ZNS), Skelett- und Herzmuskulatur, Sinnesorgane und Nieren reagieren dabei jedoch am empfindlichsten auf eine reduzierte ATP-Synthese. Symptome der Mitochondriopathien können sich jedoch grundsätzlich in allen Organen oder Geweben manifestieren, einzeln oder in Kombination, in jedem Alter und nach jedem Erbgang auftreten (Rotig and Munnich 2003). Das klinische Bild reicht von monosymptomatischer Belastungsintoleranz durch Muskelschwäche im Erwachsenenalter bis hin zu fulminant und letal verlaufenden infantilen Enzephalomyopathien (Loeffen et al. 2000).

Grundsätzlich kann jeder der fünf Atmungskettenkomplexe einzeln oder in Kombination betroffen sein, wobei der isolierte Komplex-I-Defekt mit ca. 30% aller klassischen Mitochondriopathien am häufigsten auftritt (von Kleist-Retzow et al. 1998, Loeffen et al. 2000, Scaglia et al. 2004). Eine detailliertere Aufzählung von möglichen Symptomen und laborchemischen Zeichen findet sich in Tabelle A 1 im Anhang.

Bei der Genetik der mitochondrialen Atmungskettendefekte ist grundsätzlich zu berücksichtigen, dass die Mitochondrien mit all ihren Funktions- und Strukturproteinen – im Gegensatz zu allen anderen Zellorganellen – unter der dualen Kontrolle zweier Genome stehen: des nukleären Genoms im Zellkern mit seinen 46 Chromosomen sowie darüber hinaus zusätzlich des mitochondrialen Genoms (mitochondriale Desoxyribonukleinsäure, mtDNA). Der Hauptteil der mitochondrialen Proteine wird zwar im Kern kodiert und transkribiert, im Zytosol translatiert und dann über Erkennungssequenzen in die Mitochondrien importiert (Janssen et al. 2006).

Einige Proteine jedoch – darunter 13 Strukturproteine der Atmungskette – werden direkt durch das mitochondriale Genom kodiert. Die gesamte Proteinsynthese inkl. Transkription und Translation läuft hier in den Mitochondrien ab (siehe Abschnitt 1.1.3). Eine Vielzahl an weiteren, zumeist nukleär kodierten Proteinen ist nötig für den Transport der im Zytosol produzierten Proteine ins Mitochondrium sowie wie für die Assemblierung der nukleären und mitochondrialen Proteine zu funktionierenden Atmungskettenkomplexen. All diese Gene müssen daher beim klinischen bzw. biochemischen Bild eines Atmungskettendefekts als

Träger der krankheitsauslösenden Mutation berücksichtigt werden. Insgesamt ergeben sich dadurch nach heutigem Kenntnisstand in etwa 1.500 Kandidatengene (Haas et al. 2008).

Bei dieser ausgeprägten klinischen und genetischen Heterogenität ist das Herleiten eindeutiger Phänotyp-Genotyp-Korrelationen enorm erschwert. Mutationen in unterschiedlichen Genen können den selben klinischen Phänotyp hervorrufen und umgekehrt kann eine einzige pathogene Variante zu unterschiedlichen Krankheitsbildern führen (Janssen et al. 2006). In der Routinediagnostik werden nur einige Bereiche der mtDNA untersucht, so dass nur bei einer geringen Anzahl von Patienten mit biochemisch nachgewiesenem Defekt und/oder eindeutigem Phänotyp eine molekulargenetische Diagnose gestellt werden kann (Zeviani and Di Donato 2004).

Jedoch fällt auf, dass sich die Krankheitsbilder von betroffenen Erwachsenen zu denen von Kindern typischerweise unterscheiden (aktuelle S2-Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen. Sperl et al. 2009).

So finden sich bei Erwachsenen am ehesten sogenannte Klassische Mitochondriale Syndrome (Tabelle 1.1), die sich durch eine für sie spezifische Symptomenkonstellation auszeichnen und meist auf pathogene Varianten der mtDNA zurückzuführen sind (Zeviani and Di Donato 2004). Die biochemische Diagnostik zeigt bei den Klassischen Mitochondrialen Syndromen häufig keinen pathologischen Befund. Die Diagnosestellung erfolgt daher direkt aus der Mutationsanalyse des mitochondrialen Genoms (Sperl et al. 2009).

Tabelle 1.1: durch mtDNA-Punktmutationen bedingte mitochondriale Syndrome; an Zeviani and Di Donato 2004 angelehnt.

Syndrom	Phänotyp	Homo-/Heteroplasmie
<b>MELAS</b>	fokal neurologische Ausfälle im Rahmen apoplexähnlicher Episoden: kortikale Blindheit, Hemianopsie, Hemiparesen; Myopathie; Laktatazidose, RRF's	heteroplasmatisch
<b>MERRF</b>	myoklonische epileptische Krampfanfälle, Myopathie, zerebelläre Ataxie, RRF's	heteroplasmatisch
<b>LHON</b>	progressive, schmerzlose und initial unilaterale Visusminderung/ Erblindung; selten neurologische Auffälligkeiten; m>w: Penetranz 50% (m) vs. 10% (w)	homoplasmatisch (Komplex-I-Gene), 90% in 3 Punktmutationen
<b>NARP</b>	Ataxie, Sehverlust	heteroplasmatisch

MELAS = **M**itochondriale **E**nzephalomyopathie, **L**aktatazidose und **S**chlaganfall-ähnliche Episoden, MERRF = **M**yoklonus-**E**pilepsie mit **R**agged **R**ed**F**ibers, LHON = **L**ebersche **H**ereditäre **O**ptikus**n**euroopathie, NARP = **N**euroopathie, **A**taxie und **R**etinitis**P**igmentosa, RRF's = **R**agged **R**ed **F**ibers (mikroskopischer Nachweis sich subsarkolemmal ansammelnder abnormer Mitochondrien in der Muskelbiopsie), m = männlich, w= weiblich

Hingegen fallen Kinder mit Atmungskettendefekten meist durch psychomotorische Retardierung, generalisierte muskuläre Hypotonie und Zeichen respiratorischer oder kardialer

Insuffizienz auf (Zeviani and Di Donato 2004). Symptome treten selten isoliert, sondern meist als Multisystemerkrankungen auf. Biochemisch ist eine ausgeprägte Laktatazidose als Zeichen des erhöhten anaeroben Stoffwechsels wegweisend. Bei Kindern liegen der Erkrankung – zumindest wie bisher angenommen – zu einem größeren Anteil Defekte der nukleären DNA zugrunde (Sperl et al. 2009).

Allgemein ist festzuhalten, dass bis heute trotz aller Fortschritte nur bei der Hälfte der erwachsenen Patienten bzw. 10-20 % der Kinder mit biochemisch nachgewiesenem Defekt und/oder eindeutigen Phänotyp eine molekulargenetische Diagnose gestellt werden kann (Zeviani and Di Donato 2004).

### 1.1.2 Klassifikation

Wegen dieses sehr heterogenen Krankheitsbildes ist die definitive Diagnosestellung erschwert und beruht immer auf der Zusammenschau von klinischen Symptomen, Laborbefunden, bildgebenden Daten, histologischen Ergebnissen sowie biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen (Sperl et al. 2009).

Eine systematische und einheitliche Klassifikation der Mitochondriopathien ist schwierig. Sie kann nach mehreren, voneinander unabhängigen Gesichtspunkten vorgenommen werden:

- Klinisch nach Symptomen bzw. Symptomkonstellationen (Sperl et al. 2009)
  - Klassische Mitochondriale Syndrome mit spezifischen Symptomkombinationen
  - Nicht-syndromale mitochondriale Enzephalomyopathien
  - Mitochondriopathien mit primär nicht-neuropathologischer Symptomatik
- Nach dem Erkrankungsalter (infantile, juvenile und adulte Mitochondriopathien)
- Biochemisch nach den betroffenen Atmungskettenkomplexen (isolierte oder kombinierte Defekte der Komplexe I bis V)
- Genetisch nach der zugrundeliegenden genetischen Variante
  - nach betroffenem Genom (mitochondrial vs. nukleär) und
  - nach betroffenem Gen (direkte Strukturgene der Atmungskettenenzyme, Assemblierungsfaktoren oder andere Kandidatengene wie Transkriptions- und Translationsfaktoren)
- Vererbungsmuster (Mendel'sche Erbgänge, hier v.a. autosomal-rezessiv, X-linked, maternale Vererbung der mitochondrialen DNA, somatische de novo Mutationen (DiMauro and Schon 2003))

### **1.1.3 Die mitochondriale DNA (mtDNA) und Atmungskettendefekte durch mtDNA Mutationen**

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, besitzen Mitochondrien als einzige Zellorganellen ein eigenes, vom Zellkern weitestgehend unabhängiges Genom. Für die Krankheitsgruppe der Mitochondriopathien ist dies deshalb von Bedeutung, da Erkrankungen, die auf Mutationen in der mtDNA zurückzuführen sind, Charakteristika aufweisen, die im Zusammenhang mit spezifischen Eigenschaften der Mitochondrien und ihres Genoms stehen (Chan 2006). Die Kenntnis hierüber hilft, bestimmten klinischen Phänotypen Mutationen nukleären oder mitochondrialen Ursprungs zuzuordnen zu können und somit die molekulargenetische Diagnostik zielführend zu gestalten und so Kosten und Arbeitsaufwand zu reduzieren.

Mitochondrien werden zum Zytosol hin durch eine Doppelmembran (mit innerer und äußerer Membran) abgegrenzt und verfügen über einen eigenen Proteinsyntheseapparat mit 12S/16S-Ribosomen (DiMauro and Schon 2003). Das doppelsträngige mitochondriale Genom ist ringförmig angeordnet und besteht aus 16.569 Basenpaaren (bp). Die Mutationsrate ist auch im Gesunden wesentlich höher als in der kernkodierten DNA, was auf reaktive Sauerstoffspezies, die durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) vermehrt anfallen, und das Fehlen von Histonproteinen zurückgeführt werden kann. Das mitochondriale Genom kodiert neben 22 Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNA) und zwei ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNA), die für die mitochondriale Proteinsynthese benötigt werden, auch für 13 Strukturuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe (Anderson et al. 1981), wovon allein sieben dem Komplex I zugeordnet sind (siehe Abbildung 1-1). 93% der mtDNA ist kodierend und innerhalb der Gene gibt es keine nicht-kodierenden Introns (Tuppen et al. 2010).

Erkrankungen durch mtDNA Mutationen werden, entsprechend der mütterlichen Vererbung der Mitochondrien selbst, rein maternal übertragen. Ihre Vererbung folgt demnach nicht den Mendel'schen Regeln. Die in den Spermien enthaltenen paternalen Mitochondrien werden nach Eindringen in die Eizelle zerstört und somit nicht an die Nachkommen weitergegeben. Die Penetranz der klinischen Manifestation ist bei beiden Geschlechtern identisch, mit Ausnahme der Leber'schen Optikusneuropathie (LHON). Hier liegt sie bei männlichen Nachkommen wesentlich höher als bei weiblichen (siehe Tabelle 1.1). Überträgt sich die Erkrankung vom Vater auf seine Nachkommen, kann ein maternaler mitochondrialer Erbgang vor Einleitung der molekulargenetischen Diagnostik relativ sicher ausgeschlossen werden und daher auf die Analyse mitochondrial kodierter Gene verzichtet werden. (Bisher ist nur ein

einzigster Fall von paternalen Vererbung einer mtDNA-Mutation bekannt (Schwartz and Vissing 2002)). Genauso spricht ein Stammbaum, der strikt den Regeln der Mendel'schen Vererbungslehre folgt, gegen eine extrachromosomale Vererbung.

Auffällig ist weiterhin, dass Atmungskettendefekte durch mtDNA-Mutationen progressiv verlaufen, meist werden sie erst im Erwachsenenalter klinisch apparent. Dies steht im Gegensatz zu den nukleär vererbten Defekten, die häufiger bereits im frühen Kindesalter schwerwiegende Verläufe zeigen. Diese Eigenschaft ist auf die Akkumulation von pathogener mtDNA im betroffenen Gewebe im Laufe der Jahre zurückzuführen. Die mtDNA ist im Gegensatz zum diploiden nukleären Genom mit bis zu zehn DNA-Ringen pro Mitochondrium polyploid. Zudem besitzt jede Zelle mehrere Hundert Mitochondrien. Normalerweise enthalten alle mtDNA-Moleküle dieselbe Sequenz (homoplasmatisch). Liegt eine pathogene Mutation vor, findet sie sich meist nur in einigen DNA-Kopien eines einzelnen Mitochondriums, und nicht in allen Mitochondrien der Zelle (heteroplasmatisch). Teilt sich eine heteroplasmatische Zelle, werden die Mitochondrien ungleich auf die Tochterzellen verteilt, und das Verhältnis von gesunder zu pathogener mtDNA variiert von Zelle zu Zelle. Erreicht die Anzahl der betroffenen Mitochondrien in einer Zelle einen gewissen Schwellenwert, kommt es zum symptomatischen Atmungskettendefekt mit Zelldysfunktion. Dabei liegt der Schwellenwert in Geweben, die ihre Energie hauptsächlich aus der Zellatmung gewinnen, niedriger als in anderen. Dazu zählen Gehirn, Netzhaut, Skelett- und Herzmuskulatur. Im Allgemeinen verlieren Zellen ihre OXPHOS-Funktion jedoch erst bei einer hohen Mutationslast, d.h. einer Heteroplasmie von 60 bis 90% (Hayashi et al. 1991). Durch die zufällige Mitochondrienverteilung bei der Zellteilung kann eine Tochterzelle nur mutierte mtDNA tragen, also homoplasmatisch werden. Dieser Zustand ist irreversibel; die Homoplasmie wird fortan an alle Tochterzellen weitergegeben. Homoplasmatische Mutationen führen deshalb meist zu Erkrankungen nur eines bestimmten Gewebes oder Organs, z.B. des Auges (siehe Mitochondriale Syndrome in Tabelle 1.1). Der relative Anteil mutierter mtDNA und ihre Gewebeverteilung bestimmen den Zeitpunkt des Ausbruchs und die Schwere der Krankheit (Zeviani and Di Donato 2004).

Auch kann die Konstellation der Enzymaktivitäten einen Hinweis auf den Ursprung der Mutation liefern. Ist der rein nukleär kodierte Komplex II vermindert, schließt diese eine mitochondriale Mutation aus. Umgekehrt müssen bei Defekten der anderen Komplexe, deren Strukturproteine zum Teil mitochondrial und zum Teil im Kern kodiert werden (Komplex I, III, IV und V), sowohl mitochondriale als auch genomische Mutationen bedacht werden.

Sind diese Atmungskettenenzyme kombiniert betroffen, jedoch der rein nukleär kodierte Komplex II nicht, ist eine Mutation innerhalb der Strukturgene dieser Komplexe unwahrscheinlich. Ihre genetische Analyse wird daher nicht den ersten Schritt der Gendiagnostik darstellen. Vielmehr gibt es Hinweis darauf, dass das betroffene Gen die allgemeine Funktion des mitochondrialen Genoms beeinflusst, wie es z.B. Transkriptions- oder Translationsfaktoren tun.

#### **1.1.4 Die Atmungskette**

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Enzymkomplexen und stellt die Endstrecke aerober Stoffwechselwege dar. Dabei wird ein großer Energiebetrag in Form von Adenosintriphosphat (ATP)-Molekülen freisetzt (Löffler 2001).

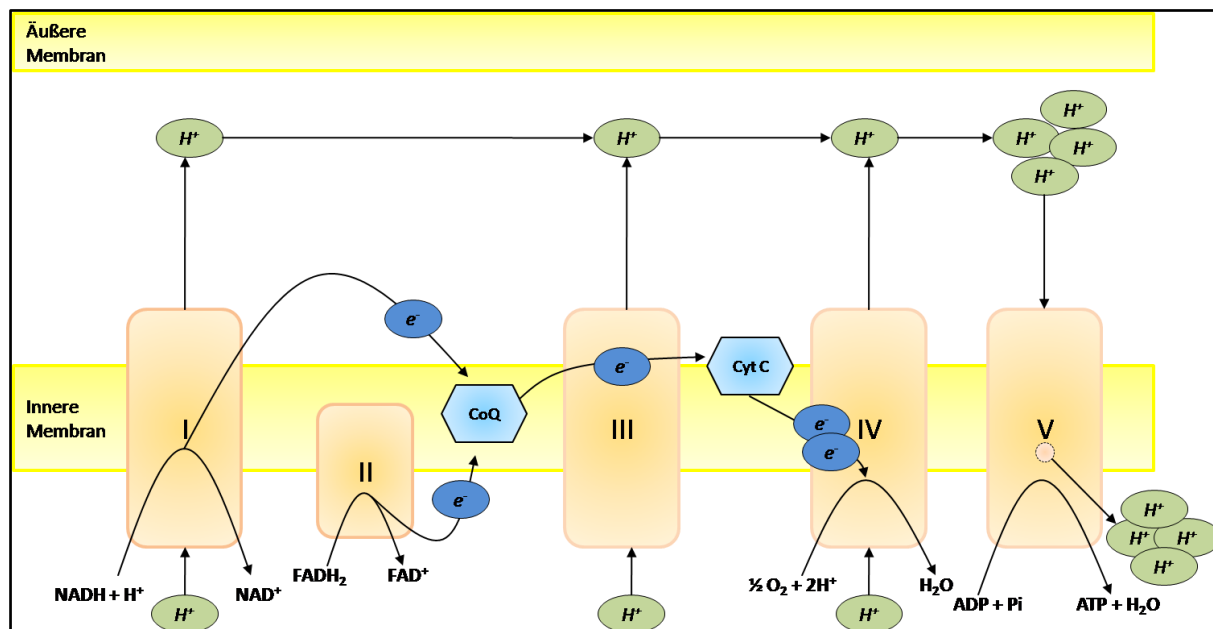
Die vorangehenden katabolen Stoffwechselgänge Glykolyse, Citratzyklus und Fettsäureoxidation beinhalten kaum ATP-produzierende Schritte. Allerdings fallen hier die reduzierten wasserstoffübertragenden Coenzyme Nicotinamidadeninucleotid (NADH/H<sup>+</sup>) und Flavinadeninucleotid (FADH<sub>2</sub>) in großen Mengen an, die anschließend in der Atmungskette als Reduktionsäquivalente zur Energiegewinnung verwertet werden.

In den Atmungskettenkomplexen an der Innenmembran der Mitochondrien werden diese Reduktionsäquivalente durch mehrere nachgeschaltete Redoxreaktionen reoxidiert. Die von ihnen angelieferten Elektronen werden dabei zwischen den einzelnen Komplexen weitergeleitet. Bei diesem Elektronentransport entsteht Energie durch die hohe Redoxpotentialdifferenz zwischen den Elektronendonatoren NADH/H<sup>+</sup> bzw. FADH<sub>2</sub> und dem Elektronenakzeptor Sauerstoff (O<sub>2</sub>), der dadurch reduziert wird. Gleichzeitig nimmt der Sauerstoff, durch den vierten Komplex der Atmungskette katalysiert, Wasserstoffprotonen (H<sup>+</sup>) aus der Matrix der Mitochondrien auf, um H<sub>2</sub>O bilden zu können.

Die Komplexe I, III und IV sind imstande, die während des Elektronentransportes auftretende Änderung der freien Energie für den aktiven Transport von H<sup>+</sup>-Ionen gegen ein Konzentrationsgefälle aus dem Matrixraum in den Intermembranraum der Mitochondrien zu nutzen. Pro Elektronenpaar werden in den Komplexen I und III jeweils vier und im Komplex IV zwei Protonen durch die Membran transportiert. Diese elektrochemische Potentialdifferenz konserviert die Energie, die durch die Reoxidation von NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> frei wird, und wird durch den bereits angesprochenen Verbrauch von Protonen in der Mitochondrienmatrix bei der Bildung von Wasser weiter verstärkt.

Den Zusammenhang zwischen dieser komplex aufgebauten elektrochemischen Potential- und pH-Differenz und der Energieerzeugung in Form von ATP wird durch die Funktion der

chemiosmotischen Kopplung (Mitchell 1961) im Komplex V erklärt: die freiwerdende Energie durch den passiven Rückstrom der Protonen vom Intermembran- in den Matrixraum durch den transmembranösen Kanal (F<sub>0</sub>-Teil) wird an die ATP-Synthese im katalytischen Bereich (F<sub>1</sub>-Teil) gekoppelt. Aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat entstehen ATP und H<sub>2</sub>O.



Komplex:	I	II	III	IV	V
Gesamtanzahl Strukturproteine	45	4	11	13	16
ncDNA kodierte Strukturproteine	38	4	10	10	14
mtDNA kodierte Strukturproteine	7	0	1	3	2

Abbildung 1-1: Oben: Vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Atmungskette. Unten: Nukleär und mitochondrial kodierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I-V. An DiMauro and Schon 2003 angelehnt. CoQ = Coenzym Q, CytC = Cytochrom C.

### 1.1.5 Der Komplex I

Da sich diese Arbeit mit der genetischen Diagnostik von Patienten mit isoliertem Komplex-I-Defekt befasst, soll dieser Komplex und seine Funktionsweise hier näher betrachtet werden. Die Oxidierung von NADH/H<sup>+</sup> in der Atmungskette findet ausschließlich im Komplex I, der NADH-Dehydrogenase, statt (Hunte et al. 2010). Hier werden die Elektronen auf Ubichinon übertragen. Das dadurch reduzierte Ubichinol transportiert sie zu den nachgeschalteten Atmungskettenkomplexen weiter. Zwar stellt auch Komplex II eine potentielle Eintrittspforte



in die Elektronentransportkette dar, jedoch nur für  $\text{FADH}_2$ . Dieses fällt bei den katabolen Stoffwechselfvorgängen jedoch in deutlich geringerer Menge an als  $\text{NADH}/\text{H}^+$ .

Da die auf dem Elektronentransport basierenden Redoxreaktionen die Grundlage für den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran und somit letztlich für die ATP-Synthese darstellen, führt insbesondere die Fehlfunktion des Komplex I zu einem ausgeprägten Energiemangel der Zellen und klinisch zu schweren Krankheitsbildern.

Die NADH-Dehydrogenase ist das größte Atmungskettenenzym. Sie wird aus 45 Strukturproteinen, nicht-kovalent gebundenem Flavinmononukleotid (FMN) und acht Schwefel-Eisen-Clustern gebildet (Carroll et al. 2006). Sieben Untereinheiten werden durch mitochondriale und 38 durch nukleäre DNA kodiert. Letztere werden im Zytosol synthetisiert und aufgrund ihrer Signalsequenzen über Membrantransporter in die Mitochondrien importiert (Janssen et al. 2006).

Die molekulare Struktur des humanen Komplex I ist noch nicht vollständig erforscht, es gilt jedoch als gesichert, dass die Untereinheiten des Komplex I anderer Spezies (*Neurospora crassa*, *Yarrowia lipolytica*, Rind, *Escherichia coli*) L-förmig angeordnet sind (Hofhaus et al. 1991, Grigorieff 1998, Djafarzadeh et al. 2000). Dieses L-Modell besteht aus der hydrophoben zentralen Domäne in der Lipiddoppelschicht der Mitochondrieninnenmembran und der hydrophilen peripheren Domäne, die in die Matrix der Mitochondrien ragt (Hunte et al. 2010). 14 Untereinheiten formieren das katalytische Zentrum des Enzymkomplexes. Davon befindet sich die Hälfte in der hydrophilen peripheren Domäne und wird nukleär kodiert (NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1 und NDUFV2). Die andere Hälfte auf Seiten der hydrophoben Membrandomäne wird mitochondrial kodiert (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 und ND6) (Hirst et al. 2003). Bei Patienten mit isoliertem Komplex-I-Mangel konnte die Mehrzahl der bisher identifizierten pathogenen Mutationen in diesen 14 hoch konservierten Genen der Kernuntereinheiten nachgewiesen werden (Brandt 2006).

Den restlichen 31 nukleär kodierten Proteinen des humanen Komplex I werden ergänzende Aufgaben zugeschrieben, die nicht in direktem Zusammenhang mit dem Elektronen- und Protonentransport stehen (Carroll et al. 2006). Hierzu zählen die Stabilisierung und Regulation des Komplex I sowie die Protektion der Redoxgruppen gegenüber Sauerstoff, um die Bildung schädigender reaktiver Sauerstoffspezies zu verhindern (Janssen et al. 2006).

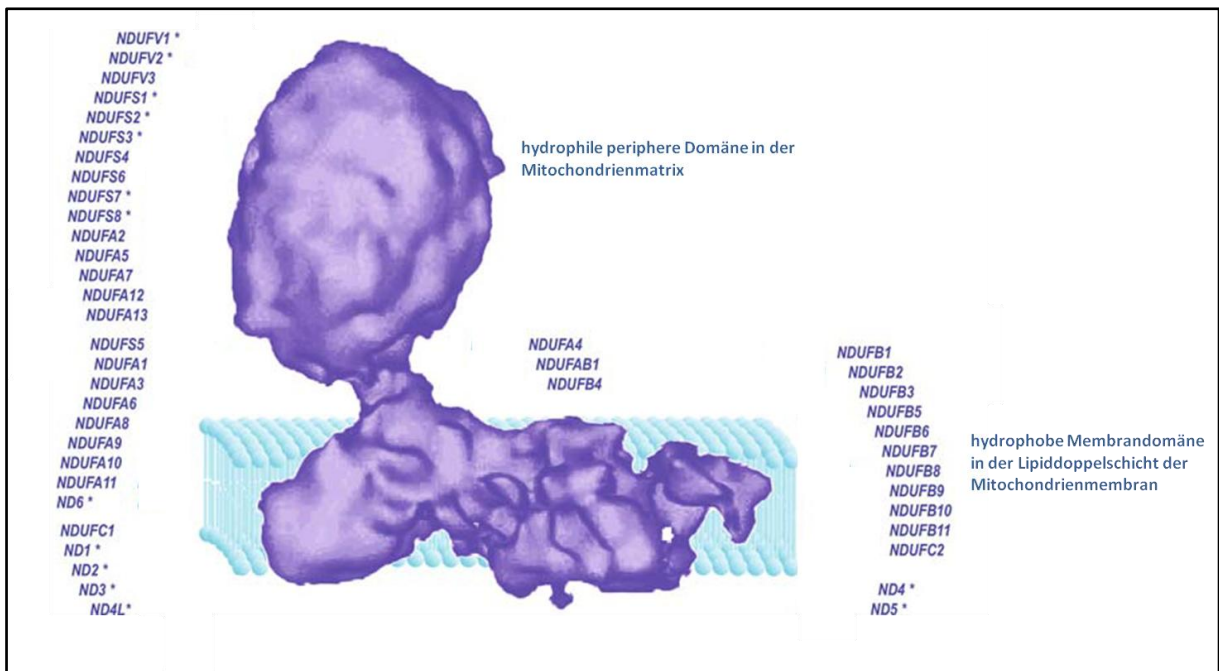


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der 45 Untereinheiten des Atmungskettenkomplex I. Untereinheiten des katalytischen Zentrums sind mit Stern markiert.

Aus Janssen et al. 2006 übernommen und adaptiert und an das Modell von Walker (Carroll, Fearnley et al. 2003) angelehnt.

Die spezifische und komplizierte räumliche Anordnung der 45 Untereinheiten wird durch die Beteiligung von sogenannten Assemblierungsfaktoren ermöglicht. Eine besondere Herausforderung stellt die bereits erwähnte Kodierung der Strukturproteine durch zwei getrennte Genome dar, die Signalwege zwischen Zellkern und Mitochondrien nötig machen. In dieser Arbeit wurden nur die zu Beginn dieses Mutationsscreens bekannten Assemblyfaktoren NDUFAF1, NDUFAF2 und ECSIT untersucht. Mittlerweile wurden für Komplex I elf Assemblierungsfaktoren identifiziert (Tabelle A 2 im Anhang). Im Vergleich dazu konnten für Komplex IV, der mit 13 Untereinheiten wesentlich kleiner ist, bereits mindestens 14 Assemblierungsfaktoren im Modellorganismus Hefe nachgewiesen werden. Hier und nicht etwa in den Strukturgenen des Komplexes findet sich bemerkenswerterweise der Großteil der Komplex-IV-Defekt auslösenden Mutationen (Lazarou et al. 2009). Daher wird angenommen, dass es für den menschlichen Komplex I eine hohe Anzahl an noch unbekanntem Assemblyfaktoren geben muss.

### 1.1.6 Der isolierte Komplex-I-Defekt

Unter allen Atmungskettendefekten ist der isolierte Komplex-I-Defekt mit ca. 30% der häufigste. Kombinierte Atmungskettendefekte mit Beteiligung des Komplex I machen weitere 38% aus (von Kleist-Retzow et al. 1998, Loeffen et al. 2000, Scaglia et al. 2004). Somit ist die Dysfunktion von Komplex I an über zwei Dritteln aller Atmungskettendefekte beteiligt.

Phänotypisch lässt sich die Komplex-I-Defizienz nicht von anderen Atmungskettendefekten abgrenzen. Vielmehr entscheidend für die Diagnosestellung „Komplex-I-Defekt“ ist daher der biochemische Befund. Er ist wegweisend für die anschließende molekulargenetische Untersuchung und die Auswahl der zu analysierenden Gene.

Eine Ausnahme hiervon stellt das LHON-Syndrom dar (Tabelle 1.1), denn bei über 95 % der betroffenen Patienten liegt eine Punktmutation in einem von drei mtDNA kodierten Komplex-I-Strukturgenen vor (3460G>A, p.A52T in ND1, 11778G>A, p.R340H in ND4 und 14484T>C, p.M64V in ND6). Diese drei primären Mutationen sind für das LHON-Syndrom spezifisch (Riordan-Eva and Harding 1995). Bei Vorliegen der klinischen Verdachtsdiagnose LHON werden daher zunächst nur selektiv diese drei Loci genetisch untersucht, eine biochemische Testung geht wie bei anderen eindeutigen Syndromen nicht voran.

Wie bereits erwähnt, wurden bisher pathogene Mutationen in den 14 Strukturuntereinheiten des katalytischen Zentrums identifiziert (Brandt 2006). Zusätzlich wurden Mutationen in weiteren acht peripheren Strukturuntereinheiten sowie in elf für die Assemblierung bzw. für die Funktion des Enzymkomplexes nötigen Proteinen (alle nukleär kodiert) gefunden. Die hier genannten Mutationen der nukleären DNA werden alle autosomal-rezessiv vererbt - mit Ausnahme von hemizygoten Mutationen in NDUFA1, einem X-chromosomalen Gen (Fernandez-Moreira et al. 2007). Eine Auflistung aller Gene, die bereits publizierte pathogene Mutationen beinhalten, ist im Anhang mit Referenzen aufgeführt (Tabelle A 2).

## **1.2 Angewandte Methoden der Mutationsanalyse**

Für diese Arbeit kamen zur Mutationsanalyse die PCR-basierten Methoden der neuartigen hochauflösenden Schmelzpunktanalyse (HRMA) und der Sequenzierung nach Sanger zur Anwendung.

### **1.2.1 (Direkt-) Sequenzierung nach Sanger**

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) zählt seit Langem zu den Standardmethoden in der Molekularbiologie und -genetik zur Bestimmung der Basenfolge eines DNA-Abschnitts. Bei der Amplifikationsreaktion werden durch die DNA-Polymerase neben den für die PCR üblichen Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut, die durch ihre fehlende 3'-Hydroxygruppe zum Kettenabbruch führen. Diese ddNTPs werden nach dem Zufallsprinzip statistisch an allen Positionen der Zielsequenz eingebaut, d.h. es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Ursprünglich waren die ddNTPs

radioaktiv, in modernen Ansätzen sind sie fluoreszenz markiert (Prober et al. 1987). Automatisierte DNA-Sequencer ordnen die Fragmente ihrer Länge nach in Kapillaren an und detektieren mit Lasern die Fluoreszenzsignale der ddNPTs am Ende jedes DNA-Fragmentes, die für jede der vier Basen unterschiedlich ist. Anhand der Farbabfolge kann die exakte Basensequenz entschlüsselt werden (Elektropherogramme).

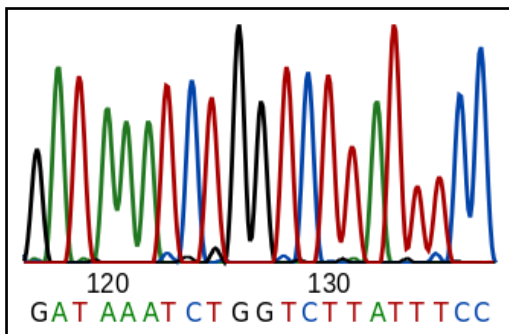


Abbildung 1-3: Beispiel für ein Elektropherogramm nach Fluoreszenz-Sequenzierung. Die vier Basen werden mit Farben grafisch wiedergegeben: Adenin=grün, Cytosin=blau, Guanin=schwarz, Thymin=rot.

Die Methode der Sequenzierung findet in der Mutationsanalytik sehr breite Anwendung. In der genetischen Diagnostik können so bekannte Mutationen in bekannten Genabschnitten sehr sicher bestätigt bzw. ausgeschlossen werden (Genotypisierung). Bei der Suche nach unbekannt Mutationen (Mutationsscreening) kann die Sequenzierung nach Sanger als primäre Methode verwendet werden, dies nennt man Direktsequenzierung. Da hierfür mehrere Abschnitte eines Gens oder mehrere Gene untersucht werden müssen, stellt die Direktsequenzierung jedoch für dieses Anwendungsgebiet ein sehr kosten- und arbeitsintensives Verfahren dar.

### 1.2.2 Präscreeningverfahren zum Nachweis unbekannter Mutationen

Der Sequenzierung werden daher heute meist andere sogenannte Präscreeningverfahren vorangestellt, die kostengünstiger und effektiver sind und einen geringeren Arbeitsaufwand fordern. Sie detektieren Nucleotikvariationen im untersuchten DNA-Fragment, nicht jedoch die exakte Position und Basensequenz. Für eine exakte Sequenzanalyse werden auffällige Proben im Anschluss selektiv sequenziert. Damit kann der Probendurchsatz im Vergleich zur Direktsequenzierung massiv gesteigert werden, was die Durchführung wesentlich größer angelegter Studien ermöglicht.

Die hier vorgestellten Präscreeningverfahren sind PCR-basiert, das heißt, die Präscreeningmethode wird an bereits mittels PCR spezifisch amplifizierten DNA-Fragmenten angewandt.

Zudem sind sie auf das Vorliegen einer Heteroduplex angewiesen, d.h. zweier DNA-Einzelstränge mit nicht-identischer Basenfolge, die einen Doppelstrang bilden.

Träger heterozygoter Mutationen besitzen je ein Wildtyp-Allel (WT) und ein mutiertes Allel mit der Sequenzvariante. Wird eine PCR durchgeführt, entstehen durch die Vervielfältigung der vier Einzelstränge zwei doppelsträngige Kopien der beiden Allele (Homoduplices). Um daraus Heteroduplices generieren zu können, werden die PCR-Produkte im Anschluss an die Amplifizierungsreaktion nochmals kurz denaturiert. Dabei lösen sich die komplementären Homoduplices. Es entstehen Einzelstränge, die bei Abkühlung zufällig wieder zu Doppelsträngen hybridisieren – jedoch mit einem Mismatch (Heteroduplex).

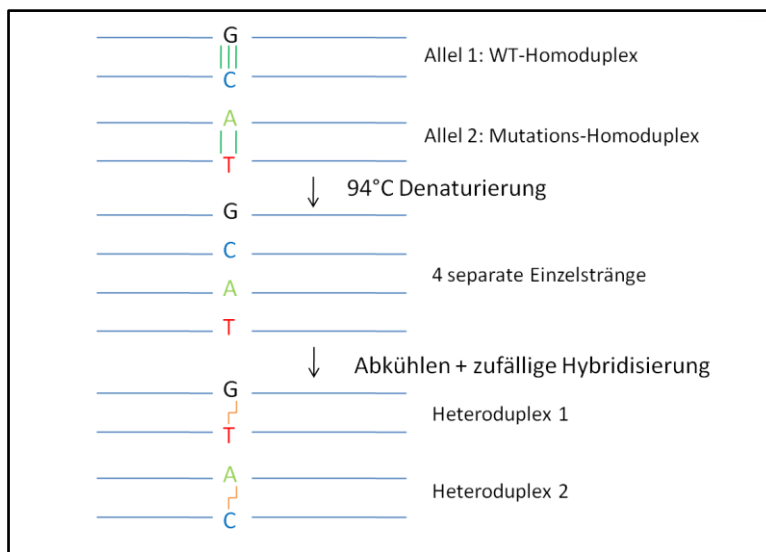


Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung der Heteroduplexbildung nach PCR bei heterozygoten Varianten. An (Murken et al. 2011) angelehnt.

Nach abgelaufener PCR werden durch Erhitzen auf 94 °C die beiden unterschiedlichen Homoduplices denaturiert und liegen einzelsträngig vor. Durch Abkühlen hybridisieren die Einzelstränge der beiden unterschiedlichen Allele zufällig wieder. Die neu entstandenen Doppelstränge enthalten nun einen Mismatch (ohne Watson-Crick-Bindung), da sie an der Stelle der Variante nicht komplementär sind.

Einige Techniken machen sich die Kenntnis über die spezifischen Schmelzeigenschaften von DNA-Heteroduplices im Gegensatz zu -Homoduplices bei Denaturierung zu Nutze und können so Nukleotidvariationen detektieren. Dazu gehören die Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) und die in dieser Arbeit zum Einsatz kommende Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA; High Resolution Melting Analysis). Bei der DHPLC wird die Doppelstrang-DNA durch chemische Lösungen denaturiert, bei der HRMA hingegen durch steigende Temperaturen bis 95°C.

Die Sensitivität der DHPLC wird mit 96 bis 100 % bei der Detektion von heterozygoten Varianten angegeben (Wagner et al. 1999). Das Verfahren wurde im Jahr 1995 erstbeschrieben und beinhaltet bereits halb automatisierte Arbeitsschritte (Oefner and Underhill 1995).

Homozygote Varianten können nur durch die Beimischung von Wildtyp-DNA detektiert werden, wodurch nach Denaturierung Heteroduplices generiert werden. Die Analyse eines einzelnen DNA-Fragments einer einzelnen Probe bedarf sechs bis zehn Minuten. Dabei können maximal 1,5 Kilobasen (kb) betrachtet werden (Wagner et al. 1999). Damit kann der Probendurchsatz im Vergleich zur Direktsequenzierung zwar deutlich gesteigert werden. Parallelisierte Analysen mehrerer Proben gleichzeitig sind damit aber nicht möglich.

Die DHPLC ist damit weiterhin wesentlich kosten- und zeitintensiver als die HRMA, bei der (hoch-) parallelisierte und halbautomatisierte Analysen von bis zu 384 Proben simultan ermöglicht werden.

Die HRMA konnte als neuartiges Präscreeningverfahren in dieser Arbeit angewandt werden und soll daher im nächsten Abschnitt detaillierter betrachtet werden.

Zusätzlich stehen noch weitere Präscreeningverfahren (wie die Single-Strand-Conformation-Polymorphism Methode, SSCP) zum Nachweis unbekannter Mutationen zur Verfügung, die hier nicht näher aufgeführt werden.

### **1.2.3 Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA)**

Bei der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse werden Fragmente PCR-amplifizierter DNA kontinuierlich bis 95°C erhitzt. Die steigende Temperatur bedingt das Denaturieren und Aufschmelzen der komplementären, doppelsträngigen DNA-Stücke (dsDNA; double-strand DNA), wodurch Einzelstrang-DNA entsteht (ssDNA; single-strand DNA) (Zhou et al. 2005).

Die Reaktion verläuft in Anwesenheit eines fluoreszierenden Farbstoffs, der ausschließlich in Doppelstrang-DNA interkalieren kann. In ssDNA hingegen liegt keine Bindungsstelle für den Farbstoff vor und es ist keine Fluoreszenz zu detektieren. Bei der HRMA liegt zu Beginn der Untersuchung bei niedriger Temperatur das maximale Niveau der Fluoreszenz vor, da die Doppelstrang-DNA noch nicht denaturiert ist. Bei konstant steigender Temperatur verliert die Fluoreszenz an Intensität, weil die Bindungen zwischen den komplementären DNA-Strängen nun aufbrechen und zunehmend Einzelstrang-DNA vorliegt. Als Schmelztemperatur ( $T_m$ ; Melting temperature) wird hierbei die Temperatur (in °C) definiert, bei der die Hälfte der Doppelstränge in Einzelstränge denaturiert ist und nur mehr 50 % der Ausgangsfluoreszenz zu verzeichnen ist (Ruskova et al. 2011).

Die Fluoreszenz der einzelnen DNA-Proben wird durch eine Kamera gemessen (Fluorometer) und deren Abnahme (y-Achse) über der steigenden Temperatur (x-Achse) abgetragen, woraus die jeweiligen Schmelzkurven generiert werden.

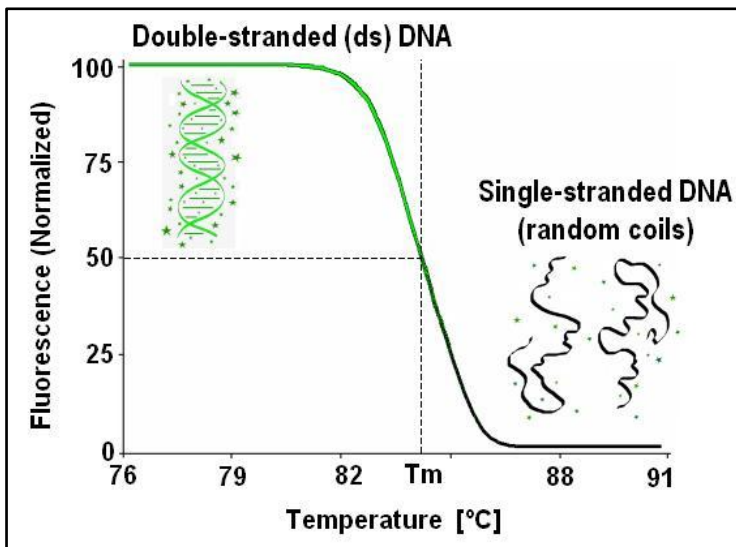


Abbildung 1-5: schematische Darstellung der Schmelzkurve einer DNA-Probe. Die Fluoreszenz (y-Achse) wird gegen die Temperatur (x-Achse) abgetragen und nimmt bei steigender Temperatur ab. Der Schmelzpunkt ( $T_m$ ) entspricht auf der y-Achse 50 % der Ausgangsfluoreszenz der jeweiligen Probe (aus [https://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP\\_Hi-Res%20Melting.html](https://dna.utah.edu/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html)).

Die Schmelztemperatur und der -kurvenverlauf der PCR-Produkte ist abhängig von ihrer Länge, ihrem Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (CG-Gehalt) und ihrer exakten Basenabfolge (Herrmann et al. 2006). Nukleotidvarianten tragende Proben zeigen daher ein anderes Schmelzverhalten als Wildtyp-DNA. Die Differenzierung beruht dabei hauptsächlich auf der Veränderung der Form der Schmelzkurve und nur zu einem geringen Anteil auf einer Veränderung der eigentlichen Schmelztemperatur (Zhou et al. 2005).

Dabei zeigen Proben mit homozygoten Varianten lediglich Letzteres (Liew et al. 2004). Demnach sind nach der bisherigen Literatur homozygoten Varianten mit der Methode der HRMA schwerer zu detektieren. Heterozygote Varianten hingegen fallen bei der HRMA durch das Vorhandensein eines Mismatches in den Heteroduplices zusätzlich durch einen veränderten Schmelzkurvenverlauf auf (Herrmann et al. 2006).

Zur Verbesserung der Sensitivität der Detektion von homozygoten Varianten wird den Patientenproben daher meist WT-DNA beigemischt. Werden die gemischten DNA-Proben nach Ablauf der PCR wie zuvor beschrieben denaturiert, kommt es hier zur Ausbildung von Heteroduplices (Details im vorherigen Abschnitt 1.2.2). Dieses Verfahren wurde in den meisten der bisher publizierten Arbeiten angewandt und von Carl Wittwer in einem Review zusammengefasst (Wittwer 2009).

Die veränderte Schmelzkurve der einen Mismatch enthaltenden Heteroduplices kann mit einer Sensitivität von über 95 bis 100 % gegenüber den WT-Fragmenten abgegrenzt werden (Dobrowolski et al. 2005; Wittwer 2009). Selbst das Vorliegen einer Einzelnukleotidvariante

(SNV; Single Nucleotide Variant) kann sicher detektiert werden, bei mtDNA Varianten bereits ab einem Heteroplasmiegrad von 1 % (Dobrowolski et al. 2009).

Das Differenzieren unterschiedlicher Varianten innerhalb eines Fragments stellt jedoch eine Herausforderung dar, da neben dem WT nicht nur eine, sondern mehrere abweichende Kurven entstehen. Diese sind zwar spezifisch, können aber einander sehr ähneln (Herrmann et al. 2006). Die Sensitivität liegt hier bei 90 %. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 4-2 zu sehen.

Größere Deletionen und Insertionen können wie bei allen nicht-quantitativ PCR-basierten DNA-analytischen Verfahren nicht zuverlässig registriert werden (Wittwer 2009).

Für die Durchführung der HRMA ist keine Sondenmarkierung der Proben oder der Primer nötig ("unlabeled probes"). Die einzigen zusätzlichen Arbeitsschritte zur regulären PCR sind das Beimischen des Farbstoffs in den PCR-Ansatz sowie das Auftragen einer Schicht Öl direkt vor der Schmelzpunktanalyse zum Schutz vor Verdampfung (sogenannte "closed-tube-method"). Außerdem sind Gelelektrophoresen zur optischen Kontrolle der abgelaufenen PCR-Reaktionen nicht erforderlich.

Bei der HRMA handelt es sich um ein nicht-destruktives Verfahren, d.h. die amplifizierten DNA-Fragmente können für nachgeschaltete Analysen wie das Sequenzieren unverändert weiter verwendet werden (Vossen et al. 2009). Das Verwerten von farbstoffhaltenden PCR-Produkten für die Sequenzreaktion nach Sanger beeinträchtigt nicht die Qualität des Chromatogramms wie z.B. durch etwaiges verstärktes Hintergrundrauschen (Dobrowolski et al. 2007).

Die Methode wurde erstmals 1996 von Carl Wittwer bei der Durchführung von quantitativen PCR-Reaktionen (Real-Time-PCR) am von ihm entwickelten LightCycler (Idaho Technologies; Lizenz an Roche verkauft 1997) angewandt (Ririe et al. 1997). Der dabei verwendete Farbstoff SYBR Green I® ist toxisch und kann daher nur in nicht-sättigenden Konzentrationen beigemischt werden.

2003 wurde die weiterentwickelte und sensitivere Methode der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse mit dem Farbstoff LC Green I® am Gerät HR-1 (beide Idaho Technologies Inc., Idaho, USA) eingeführt. Es stand erstmals ein gering toxischer Farbstoff zur Verfügung, der in sättigenden Konzentrationen verwendet werden kann, und dadurch viel geringere Schmelztemperaturdifferenzen detektieren kann (Wittwer et al. 2003). Der zwei Jahre später auf den Markt gebrachte Farbstoff LC Green Plus® (ebenfalls Idaho Technologies Inc.) besitzt für die Detektion heterozygoter Mutationen verglichen mit anderen Farbstoffen die höchste Sensitivität (Herrmann et al. 2006; Wittwer 2009). Der Farbstoff LC



Green Plus® wurde in dieser Arbeit verwendet, als Gerät kam der ebenfalls 2005 erschienene 384-Multiwell-Platten basierte Idaho Light Scanner (Idaho Technologies Inc., Idaho, USA) zur Anwendung.

#### Anwendungsgebiete

Die HRMA kann sowohl mit dem Ziel des Genscannens bzw. Mutationscreenings, also der Untersuchung von Proben auf unbekannte Varianten hin, als auch zur Genotypisierung von Proben auf bereits bekannte Varianten in Gegenwart von Positivkontrollen (Träger der bekannten Mutation) angewandt werden (Erali and Wittwer 2010). Zusätzlich kann die HRMA in der Epigenetik zur Analyse von DNA-Methylierung herangezogen werden (Er and Chang 2012).

#### Kosten und Probendurchsatz

Der Sequenzieraufwand kann durch Anwendung der wenig arbeits- und kostenintensiven Präscreening-Technik der HRMA um mindestens 85 % gesenkt werden. Die Kostenersparnis ist enorm, wenn man von Kosten in Höhe von ca. 10 Euro pro sequenziertem DNA-Fragment ausgeht und dem einen finanziellen Aufwand von nur 1,10 Euro für PCR und HRMA (1 € für PCR, 0,10 € für den Farbstoff) gegenüberstellt (Vossen et al. 2009).

Die HRMA bietet heute die Möglichkeit, parallelisiert bis zu 384 DNA-Proben mit Fragmenten bis zu 500 bp simultan zu analysieren. Ein Schmelzanalysendurchgang mit 384 Proben benötigt dabei etwa fünf Minuten.

Damit können wesentlich höhere Zahlen an Patienten und Genen mit geringeren Kosten und Zeitaufwand untersucht werden als mit der konventionellen Direktsequenzierung oder auch anderen Präscreeningverfahren wie der DHPLC.

## 2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte bei 88 Patienten mit biochemisch nachgewiesenem isoliertem Komplex-I-Defekt der mitochondrialen Atmungskette ein Hochdurchsatz-Mutationscreen durchgeführt werden. Als zu untersuchende Gene wurden die 45 Strukturproteine des Komplex I sowie drei seiner Assemblierungsfaktoren definiert. Ziel war, in diesen Kandidatengenomen bekannte sowie unbekannte Sequenzvariationen zu erfassen. Dies sollte mittels der PCR-basierten Methoden der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse (HRMA) und der Sequenzierung nach Sanger erfolgen.

Hierfür sollten zunächst die 48 Gene (unterteilt in 232 DNA-Genfragmente) mittels PCR spezifisch amplifiziert werden, wofür Primer entworfen und optimale PCR-Bedingungen etabliert werden sollten.

Anschließend sollten in den DNA-Amplifikaten durch das neuartige Präscreeningverfahren der Hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (HRMA) Nukleotidvariationen detektiert werden. Proben mit auffälligem Schmelzverhalten sollten nachgeschaltet der Sequenzierung unterzogen werden, um so die exakte Basenabfolge und mögliche kodierende Varianten zu identifizieren.

Zuletzt sollte versucht werden, zur Pathogenitätsprüfung Kriterien herauszuarbeiten, anhand derer die Relevanz der gefundenen Varianten für die Krankheitsentstehung eingestuft werden kann und somit pathogene von neutralen Varianten abgegrenzt werden können.

Die Etablierung dieses Hochdurchsatzmutationsscreens sollte dazu beitragen, in Zukunft die molekulargenetische Diagnostik im Bereich struktureller Untereinheiten und Assemblierungsfaktoren des Komplex I für Patienten mit isoliertem Komplex-I-Defekt zu ermöglichen und zu verbessern.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Materialien und Geräte

#### 3.1.1 Technische Geräte

Gerät	Firma
ABI 3730 DNA Sequenzer	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA-Konzentrationsmesser Nanodrop™ ND-1000 V.3.1.2.	Thermo Scientific/PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Gelelektrophorebehälter Mini Subcell GT, Subcell und Mini Subcell	Bio Rad, München
Gelelektrophoresekasten Power-Pac® 300	Bio Rad, München
Lightscanner® High-Resolution-Melting-Analysis 384 System	Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)
Milliporegerät	Millipore, Schwalbach
MJ Research PT C-225 Gradient Cycler 96er System	GMI, Minnesota (USA)
MJ Research PT-225TET Gradient Cycler 384er System	GMI, Minnesota (USA)
Pipettierroboter TeMO (96- + 384-Well)	TeCaN, Männedorf (Schweiz)
Vortexer FVL-2400 CombiSpin	PeQLAB, Erlangen
Zentrifuge 4k15	Sigma, Osterode am Harz

#### 3.1.2 Allgemeiner Laborbedarf

Produkt	Firma
384 Well Thermofast® White Mikrotiter Platte	Abgene, Hamburg
96 Well Round-Well Platte	Quiagen, Hilden
96 Well Sequencing Plates Thermofast® barcoded	Abgene, Hamburg
96 Well Thermofast® Non Skirted Platte (AB-0600)	Abgene, Hamburg
96 Well Thermofast® Skirted Platte	Abgene, Hamburg
96 Well Thermofast® Platte	Abgene, Hamburg
Einkanalpipetten Pipetman 2, 20, 200, 1000 (µl)	Gilson, Den Haag (Niederlande)
Einmalfolie Tape Pads 1018104	Quiagen, Hilden
Genetic Analyzer Plate Septa 96-Well für ABI Sequencer	Abgene, Hamburg
Manifold 384 Vakuumfiltrationssystem	Millipore, Schwalbach
Mehrkanalpipetten Pipetman ultra 12fach 1-20µl, 20-300µl	Gilson, Den Haag (Niederlande)
Mehrkanalpipetten Transferpette 0,5-10µl (8fach), 10-100µl (12fach), 20-200µl (12fach)	Brand, Wertheim
Nucleofast® 96 (PCR-Aufreinigung)	Macherey-Nagel, Düren
PCR Folie AB-0558	Abgene, Hamburg
Pipettenspitzen Diamond Tower D10, DL10, D200, D1000	Gilson, Den Haag (Niederlande)
Rainin Mehrkanalpipetten 1-10µl (12fach) und 20-200µl (12fach)	Mettler-Toledo, Giessen

## Material und Methoden

Rainin Pipettenspitzen Stable Stak 10µl und 250µl	Mettler-Toledo, Giessen
Reagenzgefäße 1,5 ml und 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
Stepperpipette Distriman mit Distritipaufsatz 125µl	Gilson, Den Haag (Niederlande)

### 3.1.3 Chemikalien

Produkt	Firma
1.5g (15%) Ficoll™ PM 400	Amersham Biosciences, Freiburg
Borsäure (>99,8%)	Roth, Karlsruhe
DNA Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
DNA-Ladder GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs PureExtreme™ 25µmol, 0.25ml von je100mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
GenomiPhi® Enzyme Mix	GE Healthcare, München
GenomiPhi® Reaction Buffer	GE Healthcare, München
GenomiPhi® Sample Buffer	GE Healthcare, München
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> (HPLC-Wasser)	Merck, Darmstadt
LC Green Plus®	Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)
MgCl 25 mM, 1.5ml	Thermo Scientific, Dreieich
MgCl <sub>2</sub>	Quiagen, Venlo (Niederlande)
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumhypochlorit (verdünnt 0,12%)	Merck, Darmstadt
Oligonukleotidprimer	Metabion international AG, Martinsried
Orange G Sodium Salt (für Ficoll)	Sigma-Aldrich, Hamburg
PCR Puffer AB-1217/HP 10x, 1.25 ml	Thermo Scientific, Dreieich
Puffer	Quiagen, Venlo (Niederlande)
Q-Solution	Quiagen, Venlo (Niederlande)
Thermo-Start DNA Polymerase	Quiagen, Venlo (Niederlande)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt

### 3.1.4 Enzyme und Kits

Enzym	Firma
DNA Sequencing Kit dGTP BigDye™ Terminator v.3.1 Ready Reaction (100 Reactions)	Applied Biosystems, Darmstadt
GenomiPhi® HY DNA Amplification Kit	GE Healthcare, München
Thermo-Start™ Taq DNA Polymerase (AB-1057) with High Performance Buffer, Conc. 5U/µl, 250U Volumen	Abgene, Hamburg

### 3.1.5 Datenbanken und Computersoftware

Bezeichnung	Website / Firma
BLAT	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&amp;org=Human&amp;db=hg18&amp;hgsid=98847378">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&amp;org=Human&amp;db=hg18&amp;hgsid=98847378</a>
Call-IT Software Idaho Lightscanner	Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)
dbSNP (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>
EMBL Nucleotide Sequence Database	<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl/">http://www.ebi.ac.uk/embl/</a>
Exon Primer	<a href="http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html">http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html</a>
Google	<a href="https://www.google.de/">https://www.google.de/</a>
Hi-Res Melting Software Lightscanner	Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)
Human Gene Mutation Database	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>
Human Genome Variation Society	<a href="http://www.hgvs.org/mutnomen/">http://www.hgvs.org/mutnomen/</a>
in-silico PCR	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?org=Human&amp;db=hg18&amp;hgsid=173293025">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?org=Human&amp;db=hg18&amp;hgsid=173293025</a>
Mitomap	<a href="http://www.mitomap.org">http://www.mitomap.org</a>
mtDB	<a href="http://www.genpat.uu.se/mtDB/">http://www.genpat.uu.se/mtDB/</a>
Mutationtaster	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM</a>
PolyPhen	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/</a>
Pub Med	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez</a>
Staden	<a href="http://staden.sourceforge.net/">http://staden.sourceforge.net/</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

### 3.2 Patientenmaterial

Alle Patienten bzw. deren Vormunde gaben ihre schriftliche Einwilligung in die wissenschaftliche Verwendung von Blut- bzw. Gewebeproben zur genetischen Untersuchung vor Zusendung ihres DNA-Materials an das Institut für Humangenetik des Helmholtz Zentrum Münchens. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

Die beteiligten zusendenden Institute werden im Folgenden aufgeführt:

- Städtisches Klinikum München GmbH, Institut für Klinische Chemie Standort Schwabing, München: Prof. Boris Rolinski, Dr. Uwe Ahting; Kinderklinik Standort Schwabing: Prof. Dr. Peter Freisinger
- Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Salzburg, Österreich: Prof. Wolfgang Sperl, Dr. Hans Mayr

- University of Prague, Department of Paediatrics, Prag, Tschechien: Dr. Marketa Tesarova

Unmittelbar nach Erhalt der isolierten DNA-Proben wurden die Patientendaten in die DNA-Datenbank des Instituts für Humangenetik (IHG) eingegeben, nummeriert und damit für die weitere Verwendung anonymisiert.

Als WT-Kontrollen wurden DNA-Proben gesunder, anonymisierter Probanden verwendet.

Die Anordnung der Proben und Kontrollen auf den Mikrotiterplatten ist in der Abbildung A 2 und Abbildung A 3 im Anhang zu finden. In Abbildung A 4 wird das Patientenkollektiv hinsichtlich Geschlecht, Alter und biochemisch gemessener Restaktivität des Komplex I beschrieben.

### **3.3 DNA-Konzentrations- und Mengenbestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem NanoDrop Spectrophotometer (ND-1000 V.3.1.2, Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Die Ratio der Lichtabsorptivität bei 260/280 nm sowie 260/230 nm gibt dabei Aufschluss über die Reinheit der DNA bzw. Verunreinigungen durch Proteine. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> (Merck) für alle Proben eine Standardkonzentration von 50 ng/μl eingestellt. Aus Konzentration (in ng/μl) und Volumen (in μl) ergibt sich die Menge (in ng; Menge = Volumen x Konzentration) der DNA.

### **3.4 Genomweite Amplifizierung von DNA**

Die genomweite Amplifizierung von DNA wurde unter der Verwendung des GenomiPhi® DNA HY Amplification Kits (GE Healthcare) durchgeführt. Sie beruht auf dem Prinzip der multiplen Verdrängungsamplifikation (MDA, Multiple Displacement Amplification)(Dean et al. 2002).

Nach Trennung doppelsträngiger Template-DNA in Einzelstränge durch Hitzedenaturierung wird die phi29 DNA-Polymerase und ein Gemisch aus Desoxynukleotiden sowie unspezifischen Hexamerprimer zugefügt. Während der nachfolgenden isothermalen Amplifikationsreaktion lagern sich die Hexamerprimer an die Einzelstränge der DNA an, und die Polymerase stellt den dazu komplementären Strang her. Durch ständige Verdrängung der neugebildeten komplementären Stränge entstehen kontinuierlich neue, einzelsträngige Template-Bereiche, die wiederum als Ausgangspunkt neuer Replikationen dienen. Die replizierte DNA erreicht eine Länge von bis zu 100 kb, wobei durchschnittliche Fragmentlängen von 10 kb erzielt werden (Holbrook et al. 2005).

Unabhängig von der eingesetzten Menge an Ausgangsmaterial (laut Herstelleranleitung mindestens 10 ng DNA; in dieser Arbeit wurden soweit vorhanden 25 ng eingesetzt) werden dabei sehr einheitliche DNA-Ausbeuten von 50 µg erreicht. Bei einem Reaktionsvolumen von 50 µl entspricht dies einer DNA-Konzentration von 1 µg/µl. Dies erlaubt den Einsatz der amplifizierten DNA in nachgeschalteten Untersuchungen ohne vorherige Konzentrationsmessungen.

### Durchführung

Gemäß der Anweisung des Herstellers wurden 2,5 µl DNA in einer Konzentration von 10 ng/µl in 22,5 µl Probenpuffer (GenomiPhi® Sample Buffer, GE Healthcare) gelöst, 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. 2,5 µl Enzymmix (GenomiPhi® Enzyme Mix, GE Healthcare) wurden zu 22,5 µl Reaktionspuffer (GenomiPhi® Reaction Buffer, GE Healthcare) gegeben und mit der Probe gemischt. Die isothermale Amplifizierungsreaktion erfolgte vier Stunden bei 30 °C in einem PCR-Thermocycler (MJ Research PT C-225 Gradient Cycler 96er System, GMI) in 96-Well-Mikrotiterplatten (Abgene). Zuletzt wurde die Polymerase bei 65 °C über zehn Minuten hitzedeaktiviert.

Anschließend wurde durch 1:4 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> eine Standardkonzentration von 250 ng/µl eingestellt.

Zum Nachweis der abgelaufenen Vervielfältigung wurden bei allen genomweit amplifizierten Proben Test-PCR-Reaktionen mit validierten Primerpaaren und daran anschließende elektrophoretische Analysen auf einem 1,5 prozentigen Agarosegel mit Ethidiumbromid-färbung durchgeführt (siehe hierzu Abschnitt 3.7).

## **3.5 Primer**

Für die spezifische Amplifikation der Gene mittels PCR wurden Vorwärtsprimer (F-Primer) und Rückwärtsprimer (R-Primer) entworfen, die die kodierenden Exons bzw. mtDNA-Gene flankieren. Primer sind kurze einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen, die komplementär zu den Enden des Templates sind und als Startpunkt für die Replikation durch die DNA-Polymerase dienen. Die Position der Primer wurde so gewählt, dass Produkte mit einer maximalen Fragmentlänge von 500 bp amplifiziert werden. Der minimale Abstand zwischen Primer und Exon wurde auf 35 bp und die minimale, optimale und maximale Primerlänge auf 17, 20 und 27 bp festgelegt. Der Anteil der Basen Guanin und Cytosin wurde möglichst hoch gewählt (höhere Stabilität). Exons bzw. mtDNA kodierte Gene, deren PCR-Amplifikation mit den genannten Primereigenschaften nicht möglich war, ohne die gewünschte maximale Produktlänge zu überschreiten, wurden in mehrere PCR-Fragmente unterteilt. Umgekehrt konnten sehr kleine Exons in ein gemeinsames PCR-Produkt zusammengefasst werden.

Daraus ergibt sich, dass die Anzahl der Exons und Gene (219 = 212 Exons nukleärer Gene + sieben mtDNA kodierte Gene) nicht exakt mit der der PCR-Amplifikate (232) übereinstimmt.

Die spezifischen Oligonukleotidprimer wurden mit dem Programm Exonprimer konstruiert und die Spezifität anschließend über elektronische in-silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?org=Human&db=hg18&hgsid=173293025>) und BLAT-Suche (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start&org=Human&db=hg18&hgsid=98847378>) überprüft. Alle konstruierten Primer wurden in die Primerdatenbank des Instituts für Humangenetik eingegeben und mit Nummern versehen. Die Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/µl geliefert.

Für die Verwendung der Primer für PCR-Reaktionen wurden F- und R-Primer durch 1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> auf eine Standardkonzentration von 10 pmol/µl eingestellt. Für Sequenzreaktionen hingegen wurden Primer auf 1 pmol/µl eingestellt (1:100 verdünnt).

Das Programm Exonprimer gibt zwar für jedes Primerpaar die zu erwartende Anlagerungstemperatur in der PCR an. Diese ist variabel und von der Basenzusammensetzung des jeweiligen Primers bzw. der Größe des zu amplifizierenden PCR-Produkts abhängig. Die Zugabe des LCGreen Plus® Dyes (Idaho Technologies Inc.) in den PCR-Mastermix erhöht die Primeranlagerungstemperatur um 1-3 °C. Daher können die vom Programm ermittelten Temperaturen nicht angewandt werden.

Zur Feststellung der optimalen PCR-Bedingungen wurden alle Primerpaare standardmäßig mit Anlagerungstemperaturen von 63, 65 und 68 °C getestet. Als Kontroll-Zielsequenz diente Wildtyp-DNA. War bei keiner dieser Temperaturen ein zufriedenstellendes PCR-Produkt in der anschließenden Gelelektrophorese zu verzeichnen, wurden Temperaturen ab 60 °C und bis zu 70 °C getestet.

Positive Ergebnisse wurden zur Kontrolle wiederholt und bestätigt, bevor sie für den Hochdurchsatz-Mutationsscreen mit Patienten-DNA übernommen wurden.

Detaillierte Beschreibungen der Primersequenzen, amplifizierten Produktgrößen, etablierten Anlagerungstemperaturen sowie der angewandten PCR-Ansätze finden sich im Anhang (Tabelle A 3).

### **3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die spezifische Amplifikation mittels PCR wurde gemäß der Standardmethode nach Saiki (Saiki et al. 1988) durchgeführt. Die PCR-Reaktionen erfolgten in programmierbaren Thermocyclern (MJ Research PT C-225 Gradient Cycler 96er System, GMI bzw. MJ Research PT-225TET Gradient Cycler 384er System, GMI) in 96- und 384-Well-



Microtiterplatten (beides Abgene). Als Ausgangsmenge für die Amplifikation wurden 10 ng genomische Wildtyp-DNA zur Etablierung der PCR-Bedingungen bzw. 5 ng Patienten-DNA / Wildtyp-DNA im Mutationsscreen verwendet und das Reaktionsvolumen wurde standardmäßig auf 10 µl bzw. 5 µl festgelegt.

Es wurden stets Negativkontrollen ohne Zielsequenz (Ausschluss Kontamination) sowie Positivkontrollen (Ausschluss Inhibition der Reaktion) mitgeführt.

### **3.6.1 Vorbereitung: Anlegen von 96-Well- und 384-Well-Platten**

Den 88 DNA-Proben wurden auf einer 96-Roundwell-Mikrotiterplatte (Quiagen, 1ml-Wells) feste Positionen zugewiesen. Zwei Positionen wurden für Negativkontrollen frei gehalten. Zusätzlich wurden aus einem anderen Projekt drei Proben mitgeführt, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird. Weitere drei Positionen sind unbesetzt, nachdem drei Proben nach Beginn der Experimente ausgeschlossen werden mussten (siehe hierzu Abschnitt 4.1.1 und Abbildung A 1 im Anhang).

Es wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> eine Standardkonzentration von 10 ng/µl und ein Volumen von 800 µl pro Well eingestellt. Dies wurde durch 1:5-Verdünnung bei den nicht amplifizierten und 1:25-Verdünnung bei den mithilfe des GenomiPhi Kits (GE Healthcare) amplifizierten DNA-Proben erreicht.

Bei Bedarf wurden durch einen weiteren Verdünnungsschritt (1:10) Platten mit der Zielkonzentration von 1 ng/µl angefertigt, aus denen mithilfe des Pipettierroboters TeMo (TeCaN) direkt 384-Well-Thermofast-Mikrotiterplatten (Abgene) derselben Konzentration und einem Volumen von 5 µl pro Well (5 ng DNA) fertiggestellt wurden. Dabei lag jeder Patient auf den 384-Well-Platten als Quadruplikat vor. Nachdem die DNA über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet wurde, wurden die Platten, mit Einmalfolie (Quiagen) versehen, aufbewahrt. Diese Vorgehensweise ermöglichte anschließend für die PCR das Auftragen von DNA-freiem Mastermix (5 µl) mit Multikanalpipetten auf die 384-Well-Platten ohne Kontaminationsgefahr. Er wurde auf jede zweite Reihe beginnend mit der obersten (Reihe A, C, E etc.) pipettiert. Getrennt hiervon wurde Mastermix mit beigemischter Wildtyp-DNA angesetzt, der in jede zweite Reihe beginnend mit der zweitobersten (Reihe B, D, F ...) pipettiert wurde (5 µl). Die Positionen der einzelnen DNA-Proben, Leerwerte und Kontroll-DNA auf den 96-Well- und 384-Well-Platten lassen sich im Anhang nachvollziehen (Abbildung A 2 und Abbildung A 3).

### 3.6.2 Standardprotokolle

#### Standard-PCR-Protokoll:

<u>Reagenz</u>	<u>Test-PCR</u> <u>Volumen (µl)</u>	<u>Screen</u> <u>Volumen (µl)</u>	<u>Screen mit WT-DNA</u> <u>Volumen (µl)</u>
10xHigh Performance Puffer	1,0	0,50	0,50
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2 mM)	1,0	0,50	0,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0	0,50	0,50
LCGreen Plus Dye	0,5	0,25	0,25
Thermo-Start-DNA-Polymerase (0,25 U)	0,1	0,05	0,05
Primer F+R (10 pmol/µl)	0,4	0,20	0,20
Wildtyp-DNA (10 ng/µl)	1,0	-	0,50
H <sub>2</sub> O	ad 10,0	ad 5,0	ad 5,0

#### Thermocycler-Standardbedingungen PCR

<u>Schritte</u>	<u>Temperatur (in °C)</u>	<u>Dauer</u>
1. Initiale Denaturierung	95	15 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Anlagerung	variabel <sup>*)</sup>	30 sec
4. Elongation	72	30 sec
5. Wiederholung der Schritte 2-4 in 39 Zyklen		
6. Heteroduplexbildung	94	30 sec
7. Anlagerung	25	30 sec

<sup>\*)</sup>siehe Tabelle A 3 im Anhang; Hier sind die individuellen Anlagerungstemperaturen für alle etablierten PCR-Amplifikate aufgeführt.

### 3.6.3 Vom Standard abweichende Protokolle

#### 1. Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR stellt gegenüber der Standard-PCR eine Abwandlung des Temperatur-Profiles am Thermocycler dar. Die Spezifität der Primerbindung kann hierbei durch die Wahl der Primeranlagerungs-Temperatur erhöht werden. Die Amplifikation nicht spezifischer Sequenzen durch Fehlanlagerung der Primer wird verhindert. Beginnend mit einer hohen Anlagerungstemperatur, die die spezifischste Primerbindung ermöglicht, wird diese in den Folgezyklen schrittweise um je 1 °C herabgesetzt.

Thermocycler-Bedingungen

<u>Schritte</u>	<u>Temperatur (in °C)</u>	<u>Dauer</u>
1. Initiale Denaturierung	95	15 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Anlagerung	*)	30 sec
4. Elongation	72	30 sec
5. Wiederholung der Schritte 2-4 in 39 Zyklen		
6. Denaturierung	94	30 sec
7. Heteroduplexbildung	25	30 sec

\*) 1. Zyklus: 70 °C, bei den folgenden Zyklen: schrittweise in jedem Zyklus 0,5 °C niedriger

2. weitere PCR-AnsätzePCR-Ansatz B

<u>Reagenz</u>	<u>Test-PCR</u> <u>Volumen (in µl)</u>	<u>Mutationsscreen</u> <u>Volumen (in µl)</u>	<u>Mutationsscreen mit</u> <u>Kontroll-DNA</u> <u>Volumen (in µl)</u>
10xHigh Performance Puffer	1,0	0,50	0,50
dNTPs (2 mM)	1,0	0,50	0,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0	0,50	0,50
Thermo-Start DNA- Polymerase (0,25 U)	0,1	0,05	0,05
Primer F+R (10 pmol/µl)	0,4	0,20	0,20
Wildtyp-DNA (10 ng/µl)	1,2	-	0,60
H <sub>2</sub> O	ad 10,0	ad 5,0	ad 5,0

PCR-Ansatz C

<u>Reagenz</u>	<u>Test-PCR</u> <u>Volumen (in µl)</u>	<u>Mutationsscreen</u> <u>Volumen (in µl)</u>	<u>Mutationsscreen mit</u> <u>Kontroll-DNA</u> <u>Volumen (in µl)</u>
10xHigh Performance Puffer	1,0	0,50	0,50
dNTPs (2 mM)	1,0	0,50	0,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0	0,50	0,50
Q-Solution	2,0	1,00	1,00
Thermo-Start DNA- Polymerase (0,25 U)	0,1	0,05	0,05
Primer F+R (10 pmol/µl)	0,4	0,20	0,20
Wildtyp-DNA (10 ng/µl)	1,2	-	0,60
H <sub>2</sub> O	ad 10,0	ad 5,0	ad 5,0

Bei den PCR-Ansätzen B und C ist kein LCGreen Plus Farbstoff enthalten. Er muss nachträglich hinzugefügt werden (0,5 µl pro Well).

<u>PCR-Ansatz D</u>			
<u>Reagenz</u>	<u>Test-PCR</u> <u>Volumen (in µl)</u>	<u>Mutationscreen</u> <u>Volumen (in µl)</u>	<u>Mutationscreen mit</u> <u>Kontroll-DNA</u> <u>Volumen (in µl)</u>
10xHigh Performance Puffer	1,0	0,50	0,50
0dNTPs (2 mM)	1,0	0,50	0,50
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0	0,50	0,50
LCGreen Plus Dye	0,5	0,25	0,25
Thermo-Start DNA-Polymerase (0,25 U)	0,1	0,05	0,05
Primer F+R (10 pmol/µl)	0,8	0,40	0,40
Wildtyp-DNA (10 ng/µl)	1,0	-	0,50
H <sub>2</sub> O	ad 10,0	ad 5,0	ad 5,0

### 3.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente im Rahmen dieser Arbeit dem visuellen Nachweis von DNA (genomischer DNA und PCR-Amplifikaten). Ihr liegt das Prinzip zugrunde, dass die negativ geladene DNA in der Gelkammer, die als elektrisches Feld dient, aufgetragen wird und dort vom negativen Pol durch das engmaschige Agarosegel dem positiven Pol entgegen wandert. Kürzere Fragmente bewegen sich schneller als längere, dadurch kommt es zu einem Auftrennen der DNA-Fragmente ihrer Länge nach. Durch Anfärben der DNA mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid werden die DNA-Banden unterschiedlicher bp-Länge unter ultraviolettem Licht sichtbar. Mitgeführte Molekülmassenstandarde (GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas) dienen der Bestimmung der bp-Länge der DNA-Fragmente.

#### Herstellung von TBE Puffer (1 %, pH 8,0):

Für die Herstellung von 10 % TBE Puffer wurden 884 mM Tris (Merck), 900 mM Borsäure (Roth) und 20 mM EDTA (Roth) ad 5 Liter mit destilliertem Wasser versetzt. Durch 1:10 Verdünnung entstand einprozentiger TBE Puffer.

#### Herstellung des Agarosegels:

Für 1,5 bzw. 0,8 prozentiges Agarosegel wurden 4,5 mg bzw. 2,4 mg DNA-Agarose (Biozym) in 300 ml TBE Puffer (1%) in der Mikrowelle (Siemens) bei 600 Watt (W) für fünf

Minuten erhitzt. Anschließend wurden 7,5 µl Ethidiumbromid (1 %, Roth) hinzugegeben. Das fertige Agarosegel wurde in einem Heizschrank bei 60 °C aufbewahrt.

#### Vorbereiten der Proben und der Gelkammern:

5 µl PCR-Produkt wurden mit 5 µl Ficollischer Lösung (15 %ig, Amersham Biosciences) versetzt. Das Agarosegel wurde in Gelhalterungen gefüllt und dort für 30 min ausgehärtet. Eingesetzte Gelkämme bildeten Taschen zum Einführen der DNA-Proben. Anschließend wurde das erhärtete Gel in TBE-Pufferlösung (1 %) der Gelkammer gelegt und mit den DNA-Proben und DNA-Leitern (GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas) versehen.

#### Gelelektrophorese:

Die Elektrophorese wurde bei großen Gelkammern mit 130 V und 400 mA über 30 min durchgeführt. Bei kleinen Kammern wurden 80 V gewählt.

Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht (UV-Lampe Hero, Herolab) gehalten und abgelichtet (Kamera von Herolab).

### **3.8 Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA)**

#### **3.8.1 Allgemeines**

Die Schmelzpunktanalyse wurde am Lightscanner High-Resolution-Melting-Analysis 384 Gerät in Gegenwart des fluoreszierenden Farbstoffes LCGreen Plus (beides Idaho Technologies Inc.) durchgeführt.

Nach der PCR konnten die 384-Well-Thermofast-Mikrotiterplatten (Abgene) ohne Zwischenschritte in das Lightscanner Instrument eingegeben werden. Einzig das Auftragen einer Schicht Mineralöl (8 µl pro Well, Sigma) zum Schutz vor Verdampfen war notwendig. Davor und danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert, um Kontaminationen zu vermeiden.

Nach abgelaufener Analyse der Schmelzkurven wurden Proben mit auffälliger Schmelzkurve für die nachgeschaltete Sequenzierung ausgewählt.

#### **3.8.2 Analyse der Schmelzkurven**

Bei der HRMA werden 384 DNA-Proben parallel schrittweise von 76 auf 95 °C erhitzt und denaturiert. Zur graphischen Darstellung wird die abnehmende Fluoreszenz über der Temperatur abgetragen und in einem Zwei-Achsen-Diagramm angezeigt (Fluoreszenz y-Achse, Temperatur x-Achse). Die anschließende Kurvenanalyse durch die integrierte

Software (Hi-Res Melting Software Lightscanner, Idaho Technologies Inc.) ist in mehrere Schritte unterteilt und wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (Wittwer et al. 2003). Sie ermöglicht die optische Differenzierung der einzelnen Schmelzkurven untereinander (Chou et al. 2005).

### 1. Ausschluss negativer Proben:

Zunächst wurden die Negativkontrollen (C3/4 und M21/22) und andere negative Proben markiert und von der Analyse ausgeschlossen. Ausgefallene Proben wurden nachfolgend nochmals einzeln per PCR amplifiziert und direkt sequenziert (in der Abbildung 3-1 beispielhaft die Probe M11/12).

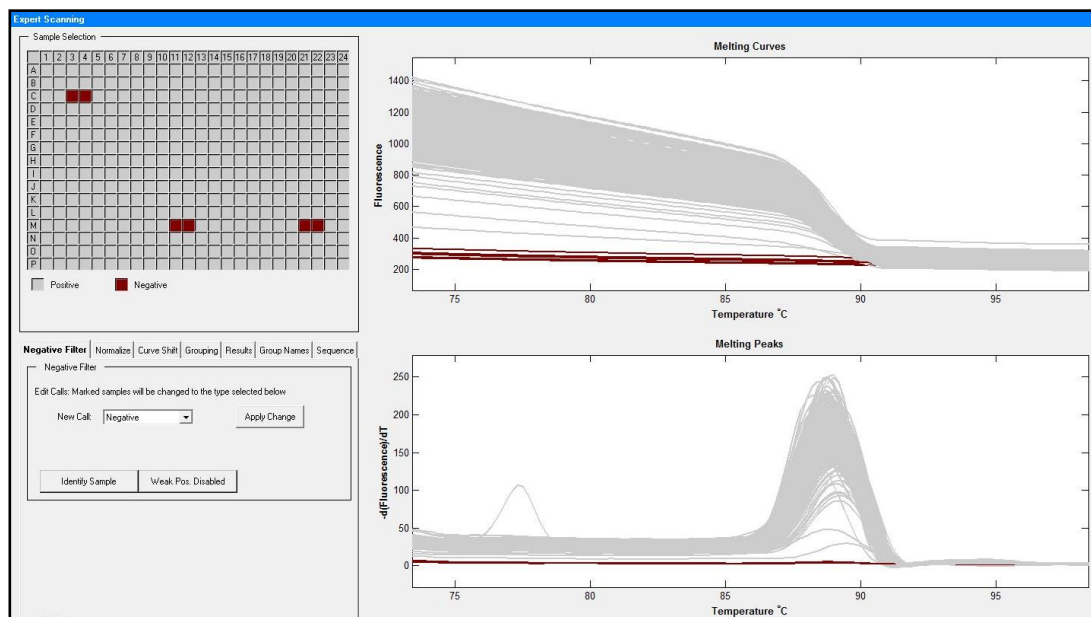


Abbildung 3-1 Erster Schritt der Rohdatenanalyse der Schmelzkurven mit Hilfe der integrierten Software (Hi-Res Melting Software Lightscanner, Idaho Technologies Inc.): negative Proben werden von weiterer Analyse ausgeschlossen. Die Felder C3/4 und M21/22 sind geplante Negativkontrollen ohne WT-DNA-Beimischung und sind nicht als Versager zu betrachten, siehe Abbildung A 3.

## 2. Fluoreszenz-Normalisierung der Schmelzkurven (y-Achse):

Jede der Kurven beginnt auf unterschiedlichen Fluoreszenzniveaus (y-Achse), abhängig z.B. von der DNA-Ausbeute nach PCR. Um die einzelnen Kurven miteinander vergleichen zu können, werden die Kurven in einem zweiten Schritt zunächst normalisiert und die Startwerte auf 100% und die Endwerte auf 0% relative Fluoreszenz vereinheitlicht. Hierfür wird ein linear verlaufender Bereich der Kurven ausgewählt, der eindeutig vor dem Beginn des Aufschmelzens der DNA-Fragmente liegt und auf der y-Achse als 100 % der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe definiert (entspricht 1,0 in der graphischen Darstellung). Entsprechend wird mit einem Bereich hinter dem Schmelzbereich verfahren. Die hier vorhandene Fluoreszenz der Proben wird als 0 % definiert (entspricht 0,0 in der graphischen Darstellung).

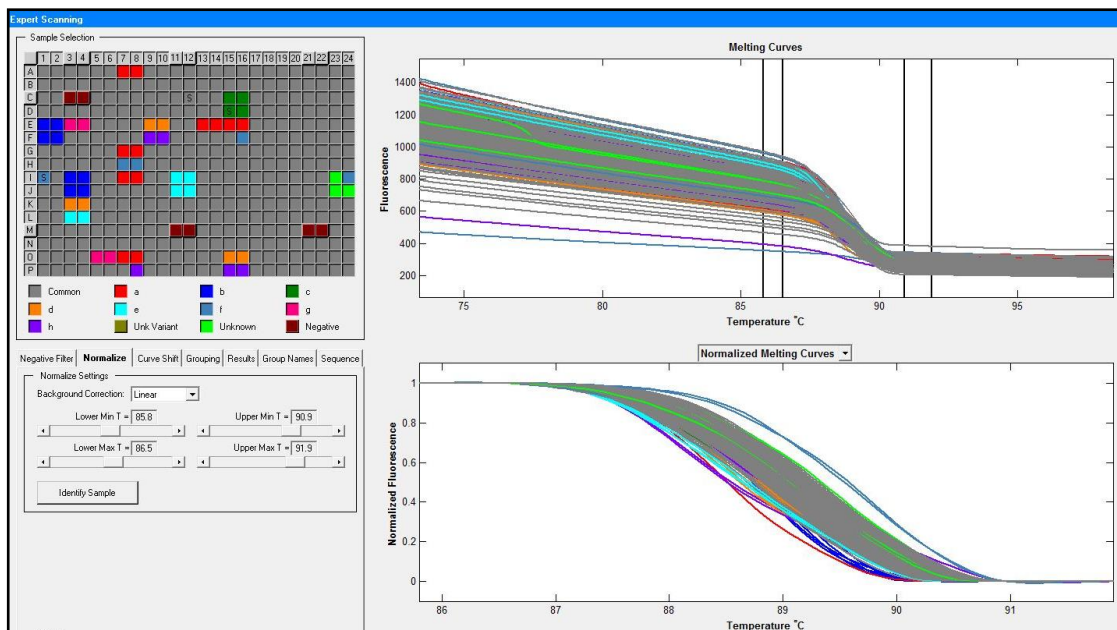


Abbildung 3-2 Zweiter Schritt in der Analyse: Normalisierung der Fluoreszenzintensitäten entlang der y-Achse.

## 3. Temperatur-Normalisierung (x-Achse):

Entsprechend der Fluoreszenz-Normalisierung ist eine Normalisierung entlang der x-Achse ebenfalls erforderlich. Beispielsweise führt eine erhöhte Konzentration von interkalierenden Farbstoffen oder die wesentlich geringere Konzentration an dsDNA in bestimmten Proben auch zu einer Verschiebung der Schmelzkurven nach rechts entlang der x-Achse zu höheren Temperaturen. Darüber hinaus kommt es innerhalb der Platten zu Temperaturunterschieden zwischen den Wells, die eine normalisierende Temperaturverschiebung erforderlich machen.

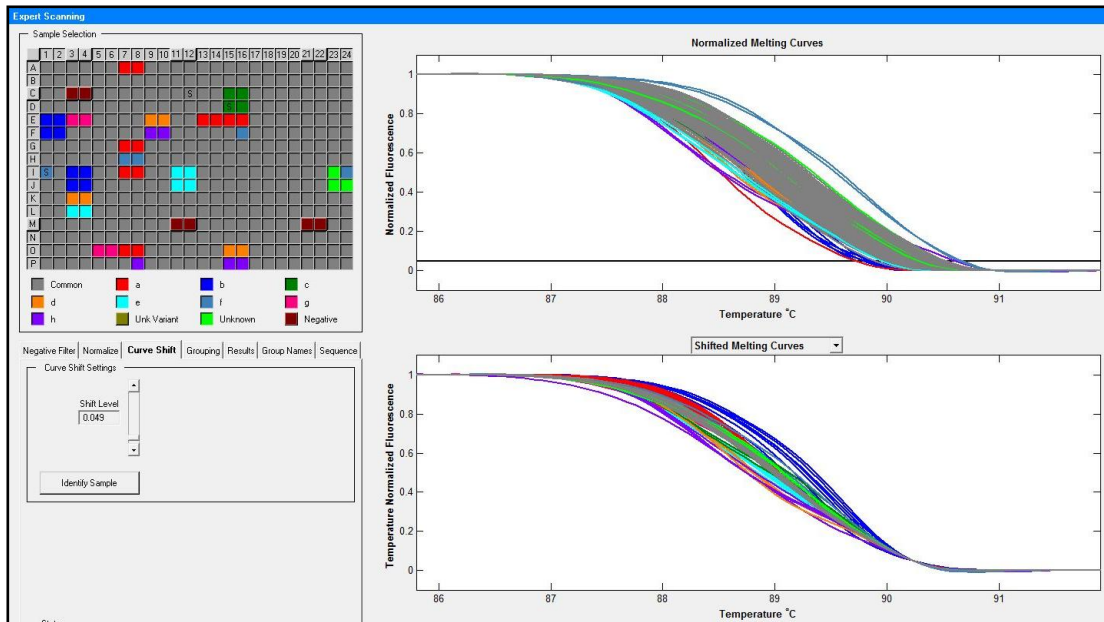


Abbildung 3-3 Dritter Schritt der Analyse: Normalisierung der Temperaturverschiebungen entlang der x-Achse.

4. Darstellung der Schmelzkurven als Differenzkurven ( $-\Delta F / \Delta t$ ):

Abschließend wurden die Schmelzkurven graphisch als Differenzkurven dargestellt. Diese zeigen die Differenz ( $\Delta$ ) der Abnahme der Fluoreszenzintensität unter den einzelnen Proben und erlauben eine einfachere visuelle Einteilung der Proben in Wildtypen und Mutanten. Die Gruppe mit den meisten Proben mit identischem Kurvenverlauf wurde als Wildtyp und somit als Referenz angenommen; ihr wurde die horizontale Nulllinie zugewiesen.

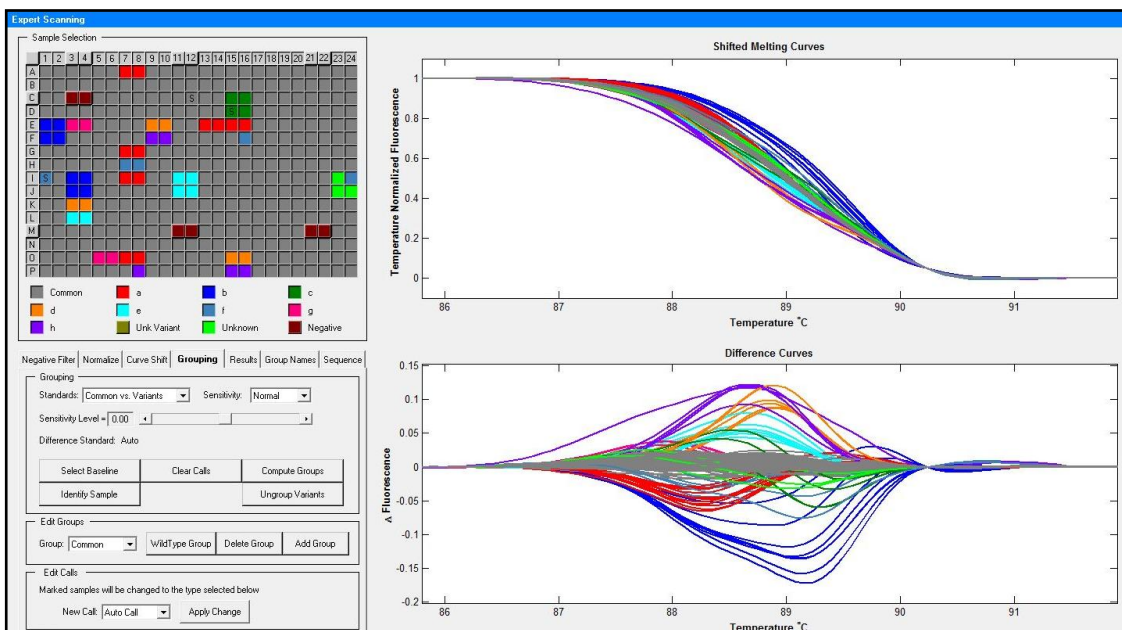


Abbildung 3-4 Vierter Schritt der Schmelzkurvenanalyse: graphische Darstellung der Schmelzkurven als Differenzkurven ( $-\Delta F / \Delta t$ ).



### 3.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzreaktion erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Diese wird in Kapitel 1.2.1 erläutert.

#### 3.9.1 Aufreinigung von PCR-Produkten durch Ultrafiltration

Die zu sequenzierenden PCR-Produkte wurden nach dem Ultrafiltrationsprinzip aufgereinigt. Hierdurch wurden Puffer, Nukleotide, Farbstoff, Mineralöl und ungebundene Primer eliminiert. Das PCR-Produkt (5 µl) wurde mit HPLC-Wasser auf ein Volumen von mindestens 100 µl eingestellt, auf eine Nucleofast® 96 Platte (Millipore) mit einer Ultrafiltrationsmembran geladen und für fünf bis zehn Minuten unter ein Vakuum von 450 mmHg gesetzt (Vakuumfiltrationssystem Manifold 384, Millipore). Durch die Poren dieser Filtermembran bleiben DNA-Fragmente, die größer als 150 bp sind, auf der Membran haften, während kleinere Fragmente (Primer), Salze und Nukleotide durch die Membran gesaugt werden. Um das gereinigte PCR-Produkt zu erhalten, wurden 20 µl HPLC-Wasser zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer Pipette von der Membran gelöst. Anschließend konnten die gereinigten PCR-Produkte in eine saubere 96-Well Thermofast® Platte überführt werden.

#### 3.9.2 Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion wurde mit dem Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v.3.1 Kit (Applied Biosystems) angesetzt und erfolgte in programmierbaren PCR-Thermocyclern (PT C-225 Gradient Cycler, GMI) in 96-well-Thermofast-Mikrotiterplatten (Abgene).

##### Ansatz Sequenzreaktion

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen (in µl)</u>
Big Dye Terminator Puffer	0,25
Big Dye Terminator	0,75
F-bzw. R-Primer (1pmol/µl)	1,00
Aufgereinigtes PCR-Produkt	3,00
<u>Gesamtvolumen</u>	5,00

### Bedingungen Sequenzreaktion

---

<u>Schritte</u>	<u>Temperatur (in °C)</u>	<u>Dauer</u>
1. Denaturierung	94	30 sec
2. Anlagerung	50	15 sec
3. Elongation	60	4 min
4. Wiederholung der Schritte 1-3 in 25 Zyklen		
5. Abkühlen	4	5 min

---

### **3.9.3 Fällung der Sequenzreaktion**

Nach abgelaufener Sequenzreaktion wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt, um nicht gebundene Didesoxynukleotide, Enzyme und Primer zu entfernen. Zum Reaktionsansatz in der Mikrotiterplatte wurden 25 µl Ethanol (100 %, Merck) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 30 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der ethanolische Überstand wurde verworfen und die DNA nochmals mit 50 µl Ethanol (70%, Merck) gewaschen und für 15 min bei 2000 x g zentrifugiert. Das so gewonnene DNA-Pellet wurde zunächst durch Zentrifugieren mit der Öffnung nach unten für 1 min bei 600 x g und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde das gereinigte Sequenzprodukt in 50 µl Wasser gelöst.

### **3.9.4 Sequenzanalyse**

Die Sequenzen wurden auf dem Sequenziergerät ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen analysiert. Hierfür wurden je 25 µl der gereinigten Sequenzprodukte auf eine 96-Well-Sequenzierplatte (Abgene) aufgetragen. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe des Staden Package Programms (<http://staden.sourceforge.net/>) grafisch als Elektropherogramme dargestellt und anschließend einzeln ausgewertet. Die als Referenz dienende Vergleichssequenz wurde von der EMBL Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) bezogen.

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung des Mutationsscreens

#### 4.1.1 Erstellen der Probensammlung

Durch Überweisung von DNA-Material aus drei europäischen Zentren für mitochondriale Erkrankungen konnte am IHG des Helmholtz Zentrum Münchens eine Sammlung aus 110 Patienten mit mitochondrialem Komplex-I-Defekt angelegt werden. Von folgenden Kliniken wurden DNA-Proben bezogen: Städtisches Klinikum München, Institut für Klinische Chemie und Kinderklinik Schwabing; Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Salzburg, Österreich; University of Prague, Department of Paediatrics, Prag, Tschechien (siehe Abschnitt 3.2).

Bei allen Patienten war aufgrund des Phänotyps die klinische Verdachtsdiagnose eines mitochondrialen Atmungskettendefekts gestellt worden. Als Einschlusskriterium für die Studie galt die biochemische Diagnosesicherung eines isolierten Komplex-I-Atmungsketten-Defekts. Die Aktivitätsmessung der Atmungskettenkomplexe in Homogenaten von Muskelbiopsaten wurde durch das jeweils zusendende Institut selbst durchgeführt. Dabei wurde die auf die Citratsynthese in derselben Probe normierte Aktivität des Komplex I ins Verhältnis zum niedrigsten Normal-Referenzwert des jeweiligen Instituts gesetzt und in Prozentpunkten angegeben.

Bei allen Patienten war die bisher abgelaufene Gendiagnostik ohne Resultate geblieben. Diese umfasste bei allen Patienten den Ausschluss der häufigsten Mutationen der mtDNA durch Sequenzierung. Die zusätzlich durchgeführte molekulargenetische Routinediagnostik reichte, abhängig vom zusendenden Zentrum, vom selektiven Sequenzieren bekannter nukleärer und mitochondrialer Krankheitsgene bis zur Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms.

Vor Untersuchungsbeginn wurden 19 Patientenproben ausgeschlossen. Die Kriterien für den Ausschluss umfassten beispielsweise das Vorliegen degradierter DNA oder das Fehlen von DNA im zugesandten Material. Drei weitere Proben wurden nach Beginn der Untersuchungen ausgeschlossen (Abbildung A 1 im Anhang).

In die Durchführung des Mutationsscreen wurden letztendlich 88 Patienten eingeschlossen (Zusammenstellung der Proben in Abbildung A 2 und Abbildung A 3). Deren Daten bzgl.

Geschlecht, Alter und biochemisch gemessener Restaktivität des Komplex I (sofern vorhanden) können der Abbildung A 4 entnommen werden.

### DNA-Qualitätskontrolle

Die Qualität der DNA der zugesandten Proben wurde vor Verwendung analysiert. Zur visuellen Kontrolle des Vorhandenseins von nicht-degradierten Nukleinsäuren wurde mit der isolierten genomischen DNA eine Gelelektrophorese (0,8 prozentiges Agarosegel) durchgeführt. Hierbei musste eine kräftige Kompressionsbande sichtbar werden. Weiterhin wurden zum Nachweis der Amplifizierbarkeit der Proben Test-PCRs mit validierten Primerpaaren angefertigt.

### Benötigte DNA-Menge pro Probe

Vor Projektstart wurde durch Vorversuche bestimmt, dass für jede PCR- und nachfolgende HRMA- sowie Sequenzier-Reaktion mindestens 5 ng DNA eingesetzt werden müssen. Jede Probe wurde vierfach untersucht. Bei einer Gesamtzahl von 48 Genen (aufgeteilt in 232 PCR-Amplifikate) ergibt sich eine Mindest-DNA-Menge von 4,64 µg (5 ng x 4 x 232). Mit Einberechnen von eventuellen Wiederholungen und notwendigen Kontrollen von Experimenten wurde eine benötigte minimale DNA-Menge von 5 µg definiert.

### Genomweite Amplifizierung

74 Proben wurden wegen zu geringen DNA-Materials (< 5 µg) genomweit prä-amplifiziert (Genomi Phi). Aus einer Mindestmenge von 10 ng genomischer DNA konnten so ca. 50 µg DNA pro Probe generiert werden.

### Vergleich des HRMA-Schmelzverhaltens genomweit amplifizierter DNA mit dem genomischer DNA

Vor dem Einsatz genomweit-amplifizierter DNA für dieses Projekt wurde durch Vorversuche überprüft, ob deren HRMA-Schmelztemperaturen und -kurven denen nicht-amplifizierter, genomischer DNA des jeweils selben Patienten exakt entsprechen.

#### **4.1.2 Auswahl der Kandidatengene**

Zunächst musste festgelegt werden, welche Kandidatengene bei dem zur Verfügung stehenden Patientenkollektiv genetisch untersucht werden sollten. Durch das Wissen um den isolierten Atmungskettendefekt konnte die Auswahl der Kandidatengene eingeschränkt werden.

Eine krankheitsverursachende Mutation innerhalb der 45 Strukturgene dieses einen Komplexes ist bei einem Teil der Patienten anzunehmen. Diese Annahme wird dadurch

---

gestützt, dass andere Arbeitsgruppen bereits bei Patienten mit singulärem Mangel des Komplex-I in 22 Strukturgenen pathogene Mutationen nachweisen konnten (Abschnitt 1.1.6 und Tabelle A 2 im Anhang).

Zusätzlich gibt es in der Literatur gehäuft Hinweise darauf, dass sich die Vielzahl der Mutationen in den Assemblierungsfaktoren des jeweiligen Komplexes befindet (Referenzen siehe Abschnitt 1.1.5). Bei Etablierung dieses Mutationsscreens waren drei Assemblierungsfaktoren für den Komplex I bekannt (NDUFAF1, NDUFAF2 und ECSIT). Deren genetische Untersuchung wurde daher mit eingeschlossen.

Hingegen war anzunehmen, dass allgemeinere, unterstützende Funktionen der Atmungskette wie die Signalwege der intergenomischen Kommunikation (zwischen ncDNA und mtDNA) und der Transport von Proteinen ins Mitochondrium bei diesen Patienten intakt sind, denn alle anderen Komplexe der Atmungskette, die ebenfalls nukleär und mitochondrial kodierte Proteine enthalten (Komplex III, IV und V), waren bei diesen Patienten funktionell unbeeinträchtigt. Gene, die für Proteine in diesen komplexen Transportwegen kodieren, wurden demnach nicht näher betrachtet. mtDNA regulierende Gene, wie etwa mitochondriale Translations-, Elongations- oder Transkriptionsfaktoren, wurden aus denselben Überlegungen heraus ebenfalls ausgeschlossen.

Die insgesamt 48 selektierten Gene unterteilen sich in 41 nukleär kodierte Gene (mit 212 kodierenden Exons) und sieben mtDNA Gene, die in insgesamt 232 spezifische PCR-Amplifikate unterteilt wurden (siehe Abschnitt 3.5).

#### **4.1.3 Etablierung der PCR-Protokolle**

Für 221 der 232 kodierenden Genabschnitte (95 %) konnten optimale PCR-Bedingungen für die nachgeschaltete Schmelzpunktanalyse (HRMA) und Sequenzreaktion etabliert werden.

Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht über die analysierten Gene und deren erfolgreich untersuchte bzw. ausgeschlossene Genabschnitte. Detaillierte Angaben zu den jeweiligen Primersequenzen und den angewandten PCR-Protokollen sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle A 3).

## Ergebnisse

Tabelle 4.1 Übersicht über die Komplex-I-Untereinheiten und Assemblierungsfaktoren.

\*Die durchgängig kodierenden mtDNA Gene werden als ein „Exon“ aufgeführt.

Gen	Exons*	PCR-Amplicons	analysierte PCR-Ampl.	ausgeschl. PCR-Ampl.	Gen	Exons*	PCR-Amplicons	analys. PCR-Ampl.	ausgeschl. PCR-Ampl.
NDUFA1	3	3	3	0	NDUFB11	3	3	2	1
NDUFA2	3	3	3	0	NDUFC1	3	3	3	0
NDUFA3	4	4	4	0	NDUFC2	3	3	3	0
NDUFA4	4	4	4	0	NDUFS1	18	18	18	0
NDUFA5	5	5	5	0	NDUFS2	14	14	14	0
NDUFA6	3	3	3	0	NDUFS3	7	7	7	0
NDUFA7	4	4	4	0	NDUFS4	5	5	5	0
NDUFA8	4	4	4	0	NDUFS5	2	2	2	0
NDUFA9	11	11	11	0	NDUFS6	4	4	3	1
NDUFA10	10	10	9	1	NDUFS7	8	8	8	0
NDUFA11	4	4	2	2	NDUFS8	6	6	6	0
NDUFA12	4	4	4	0	NDUFV1	10	10	10	0
NDUFA13	5	6	5	1	NDUFV2	8	8	7	1
NDUFAB1	4	4	3	1	NDUFV3	3	3	3	0
NDUFB1	3	3	3	0	ND1	1*	2	2	0
NDUFB2	3	3	3	0	ND2	1*	3	3	0
NDUFB3	2	2	2	0	ND3	1*	1	1	0
NDUFB4	3	3	3	0	ND4	1*	4	4	0
NDUFB5	6	6	6	0	ND4L	1*	1	1	0
NDUFB6	3	3	3	0	ND5	1*	5	5	0
NDUFB7	3	3	2	1	ND6	1*	2	2	0
NDUFB8	5	5	5	0	ECSIT	7	7	7	0
NDUFB9	4	4	4	0	NDUFAF1	4	5	5	0
NDUFB10	3	3	1	2	NDUFAF2	4	4	4	0

<b>Anzahl gesamt</b>	<b>48</b>	<b>219</b>	<b>232</b>	<b>221</b>	<b>11</b>
<b>Anteil (%)</b>			<b>100 %</b>	<b>95,3 %</b>	<b>4,7 %</b>

Dabei konnte bei 198 Genabschnitten das im Abschnitt 3.6 dargestellte Standard-PCR-Protokoll angewandt werden. Die einzige Variable stellt hier die getestete, bestmögliche Primeranlagerungstemperatur dar. Diese lag zwischen 60 und 71 °C.

In fünf Fällen musste beim Primerentwurf die gewünschte maximale Produktlänge von 500 bp überschritten werden, in 22 Fällen von den PCR-Standardreagenzien abgewichen werden. Außerdem konnte in vier Fällen durch Anwendung der sogenannten Touchdown-PCR (siehe Abschnitt 3.6) ein zufriedenstellendes PCR-Produkt generiert werden.

Methodenbedingte Ausfälle:

Bei den restlichen elf Genabschnitten (5 %) war trotz Optimierungsversuchen und Kontrollexperimenten kein PCR-Produkt nachzuweisen bzw. die Spezifität der PCR oder der HRMA-Schmelzkurve nicht zufriedenstellend, was zum Ausschluss dieser Genabschnitte aus dem Mutationsscreen führte. Diese sind im Detail:

NDUFA10	Exon 1
NDUFA11	Exon 1 und 3
NDUFA13	Exon 4
NDUFAB1	Exon 1
NDUFB7	Exon 2
NDUFB10	Exon 1 und 3
NDUFB11	Exon 1
NDUFS6	Exon 1
NDUFV2	Exon 1

Diese neun Gene enthalten ein oder in zwei Fällen zwei Exons, die mit denen in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht auf Mutationen hin untersucht werden konnten.

Probenbedingte Ausfälle:

Bei 0,76 % der angesetzten Reaktionen konnte trotz erfolgreich etablierter PCR- und HRMA-Bedingungen kein PCR-Produkt nachgewiesen werden und somit keine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden. Durch individuell wiederholte PCR-Amplifizierung, Gelelektrophorese und anschließende direkte Sequenzierung aller primär negativen PCR-Reaktionen sind abschließend bei den 88 untersuchten Patienten keine probenbedingten Ausfälle zu verzeichnen gewesen.

Zusammenfassung:

95% der 232 kodierenden Genabschnitte konnten bei 88 Patienten erfolgreich analysiert werden. 39 der 48 Gene konnten lückenlos untersucht werden (36 Strukturuntereinheiten und 3 Assemblierungsfaktoren). In neun Genen fehlen ein (n=7) oder zwei (n=2) Exons.

**4.2 Mutationsanalyse****4.2.1 Allgemeines**

Bei 221 Amplifikaten und 88 Patienten ergibt sich eine Summe von 19.360 untersuchten DNA-Fragmenten. Alle Proben wurden als Quadruplikat geführt (zweifach in reiner Form und zweifach mit zugesetzter Wildtyp-DNA). Die Beimengung von Kontroll-DNA dient bei der HRMA der Bildung von Heteroduplices beim Vorliegen homozygoter Mutationen und

## Ergebnisse

soll laut bisherigen Literatur die Sensitivität der Methode verbessern (Wittwer 2009). Insgesamt wurden 77.440 PCRs und Schmelzkurvenanalysen für diese Arbeit angefertigt. Diese Zahlen beinhalten keine Experimentwiederholungen oder -kontrollen.

Hiervon wurden 1394 Proben selektiert, die im Anschluss an die HRMA sequenziert wurden. Dies entspricht einem Anteil von 7,2 % der 19.360 einfachen Gen-Fragmente, die zuvor im Präscreening (PCR/HRMA) betrachtet wurden, und einem Anteil von 1,8 % der Quadruplikate. Unter die 1394 sequenzierten Proben fielen einzelne Proben mit auffälligem Schmelzbefund, wie in Abbildung 4-1 zu sehen.

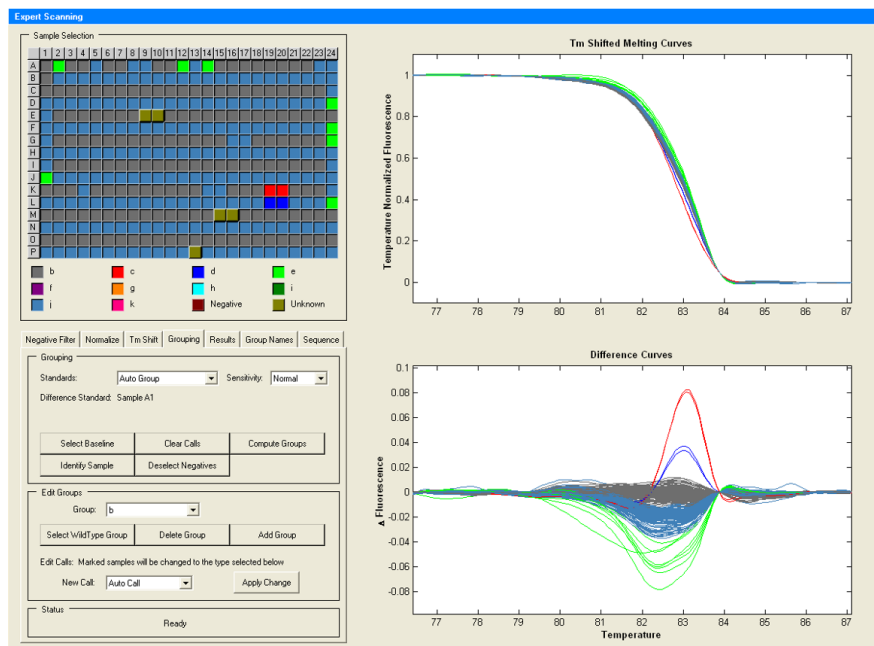


Abbildung 4-1 Beispiel für durchgeführte Schmelzkurvenanalysen mit auffälligem Schmelzkurvenverlauf bei jeweils nur einer einzelnen Probe (links: K19/20 nur Patienten-DNA + L19/20 mit beigemischter WT-DNA). In den folgenden Sequenzierung konnte die pathogene Variante G>A in heterozygoter Form nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt, dass die HRMA als Präscreeningverfahren das Vorliegen einer Sequenzvariation sehr sensitiv anzeigt. Die tatsächliche Basenfolge und somit Bedeutung der Variante kann – bei unbekanntem Varianten – nur durch die folgende Sequenzierung gesichert werden.

Zusätzlich wurden für jedes untersuchte Amplifikat drei Proben aus der vermuteten Wildtypgruppe zur Sequenzierung selektiert. Aus Gruppen, deren Schmelzdifferenzkurven zwar vom Wildtyp abwichen, aber so viele Proben beinhalteten, dass eine häufige, nicht-pathogene Variante vermutet wurde, wurden mindestens drei Proben sequenziert. Bei Nachweis einer bisher nicht annotierten kodierenden Variante wurden alle restlichen Proben dieser Gruppe ebenfalls sequenziert.



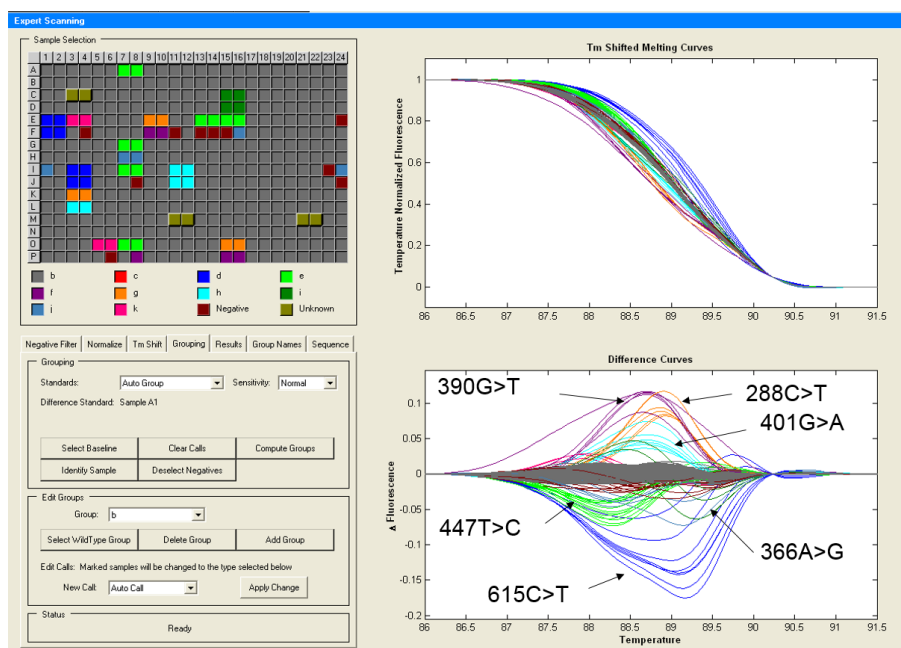


Abbildung 4-2 Beispiel für eine durchgeführte Schmelzkurvenanalyse mit multiplen Schmelzkurvenverläufen. Durch die nachgeschalteten Sequenzierreaktionen konnten den einzelnen "Farbgruppen" aus der graphischen HRMA-Auswertung verschiedene Genotypen zugewiesen werden.

Analysiert wurde hier ein Ausschnitt aus dem mitochondrial kodierten Gen ND1. Wegen der physiologisch hohen Mutationsrate sind bei mitochondrialer DNA diverse Genotypen mit unterschiedlichen Heteroplasmiegraden zu erwarten. Die daraus entstehenden individuellen Schmelzkurven sind war spezifisch, können einander aber sehr ähneln. In der Literatur wird für die Differenzierung unterschiedlicher Varianten innerhalb eines untersuchten Fragments eine Sensitivität von 90 % angegeben (Herrmann et al. 2006).

Alle gefundenen kodierenden Mutationen wurden durch unabhängige Kontrollexperimente (PCR und direkte Sanger-Sequenzierung) wiederholt um Probenverwechslungen, Kontaminationen sowie Replikationsfehler durch die PCR-Taq-Polymerase auszuschließen. Zusätzlich wurde bei genomweit amplifizierten Proben die PCR und Sequenzreaktion aus genomischer DNA wiederholt, um auch Replikationsfehler bei der Genomamplifizierung ausschließen zu können. Dabei konnten bis auf zwei Varianten alle Ergebnisse reproduziert werden.

Konnte in einer Probe nur eine einzelne heterozygote Mutation nachgewiesen werden, wurden anschließend alle Exons des betreffenden Gens sequenziert, um beim eventuellen Vorliegen einer kombinierten Heterozygotie die zweite Mutation sicher detektieren zu können. Dies kam bei insgesamt 15 Proben zur Anwendung. In keiner der Proben konnte durch dieses Verfahren eine weitere Mutation innerhalb des gleichen Gens gefunden werden.

Die mögliche krankheitsrelevante Bedeutung der hier im Folgenden aufgeführten Mutationen wurde anhand mehrerer Kriterien herausgearbeitet (Abschnitt 4.3). Danach erfolgte die Klassifizierung in pathogene Mutationen, Varianten unklarer Signifikanz (VUS) und Polymorphismen.

Alle in dieser Arbeit als „neu“ oder „bisher unbekannt“ bezeichnete Mutationen sind in den Datenbanken dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), HGMD

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) und mtDB (<http://www.genpat.uu.se/mtDB/>) nicht annotiert und ergeben bei den Suchmaschinen Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) und Google ([www.google.com](http://www.google.com)) keinen Treffer abgesehen von der Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit.

Im Allgemeinen kam die Variantennomenklatur der HGVS (Human Genome Variation Society) zur Anwendung.

#### 4.2.2 Übersicht über die Ergebnisse der Mutationssuche

Bei zwölf der 88 untersuchten Patienten konnten krankheitsauslösende Mutationen identifiziert werden und somit die molekulargenetische Diagnostik erfolgreich abgeschlossen werden. Dies entspricht einem Prozentsatz von 14 %. Die Hälfte der Patienten ist Träger pathogener Mutationen der mitochondrialen DNA, die andere Hälfte der nukleären DNA.

Bei weiteren 25 Patienten (29 %) wurden Varianten unklarer Signifikanz (VUS) nachgewiesen. Bei den restlichen 51 Patienten (58 %) konnten in den hier untersuchten Genen lediglich bekannte benigne Polymorphismen und stille Mutationen gefunden werden.

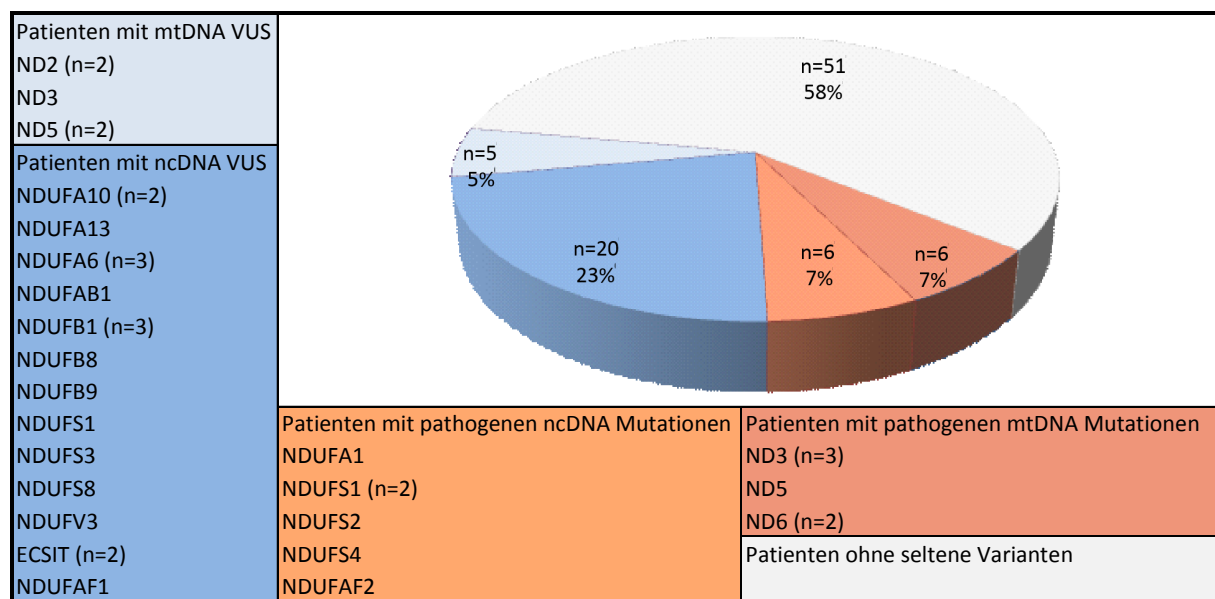


Abbildung 4-3 Übersicht der Ergebnisse der Mutationssuche.

#### 4.2.3 Spektrum der pathogenen Mutationen

Die gefundenen pathogenen Varianten sind auf insgesamt acht bekannte Kandidatengene aufgeteilt (Quellenangaben in Tabelle 4.3, Tabelle 4.5 und Tabelle A 2 im Anhang).

Die Mutationsloci innerhalb der bekannten Gene sind jedoch zum Teil neu.

Tabelle 4.2 Spektrum der pathogenen Varianten.

Gen	Anzahl Patienten	Genom	Strukturgen/Ass.faktor	katalytisches Zentrum Komplex I
NDUFA1	1	nukleär	Strukturgen	nein
NDUFS1	2	nukleär	Strukturgen	ja
NDUFS2	1	nukleär	Strukturgen	ja
NDUFS4	1	nukleär	Strukturgen	nein
ND3	3	mitochondrial	Strukturgen	ja
ND5	1	mitochondrial	Strukturgen	ja
ND6	2	mitochondrial	Strukturgen	ja
NDUFAF2	1	nukleär	Assemblierungsfaktor	-

#### 4.2.4 Bekannte pathogene Mutationen der nukleären DNA

Bei der Analyse der kernkodierten DNA konnten bei sechs Patienten pathogene Mutationen der nukleären DNA identifiziert werden. Die Vererbung aller betroffenen Gene erfolgt autosomal-rezessiv nach Mendel mit Ausnahme des X-chromosomalen Gens NDUFA1 (Fernandez-Moreira et al. 2007), das einem hemizygoten Vererbungsmuster folgt.

Vier dieser Patienten sind Träger von bereits bekannten Mutationen. Patient 2 (#33255) ist Träger einer bekannten und einer neuen Mutation im Gen NDUFS1.

Die hemizygoten Mutation p.G32R in NDUFA1 (X-linked) beim Patienten 1 (#33545) wurde zwar zuvor durch andere Autoren beschrieben (Potluri et al. 2009), konnte jedoch durch diesen Mutationscreen erstmalig bei einem weiblichen Individuum nachgewiesen und veröffentlicht werden (Mayr et al. 2011).

#### 4.2.5 Neue wahrscheinlich pathogene Mutationen der nukleären DNA

Bei drei Patienten konnten bisher unbekannte Mutationen der Kern-DNA detektiert werden (Definition "neue" Mutation siehe Kapitel 4.2.1). Lediglich die Variante rs35086265 im Gen NDUFS2 ist in der Datenbank dbSNP als heterozygote Einzelnukleotidvariante (SNV) gelistet. Als kombiniert heterozygote pathogene Mutation ist sie jedoch nicht bekannt oder publiziert.

Patient 2 (#33255) ist Träger einer bekannten (p.V228A) und einer neuen Mutation (p.G166E) im Gen NDUFS1.

Die homozygote Stop-Mutation im Assemblierungsfaktor NDUFAF2 (p.W3X) im Patienten 6 (#33462) ist neu und konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit erstpubliziert werden (Herzer et al. 2010). Die folgende Tabelle 4.3 zeigt alle gefundenen pathogenen Mutationen der nukleären DNA.

Tabelle 4.3 Bekannte und bisher unbekannte nukleär kodierte pathogene Mutationen.

Bekannte pathogene Mutationen der nukleären DNA										
Pat. Nr.	Gen	Mutation <sup>1)</sup>	Zygotie	dbSNP <sup>2)</sup>	HGMD <sup>3)</sup>	Allelfrequenz			Referenz	
						dbSNP	PolyPhen <sup>4)</sup>	Mut.taster <sup>5)</sup>		AS-Kons. <sup>6)</sup>
1	33545	NDUFA1 c.94G>C p.G32R	hemi (X-linked)	rs1801316	CM091572	0,026	c	B	++	Potluri, Davila et al. (2009)
2	33255	NDUFS1 c.683T>C p.V228A (c.497G>A p.G166E)	hetero (hetero)	-	CM091556	-	c	B	++	Pagniez-Mammeri, Lombes et al. (2009)
3	33460	NDUFS1 c.683T>C p.V228A	hetero	-	CM091556	-	c	B	++	Pagniez-Mammeri, Lombes et al. (2009)
4	33253	NDUFS4 c.316C>T p.R106X	hetero	-	CM012411	-	a	B	++	Benit, Chretien et al. (2001)
			homo	-	CM002072	-	stop	stop	stop	Budde, van den Heuvel et al. (2000)

Bisher unbekannte pathogene Mutationen der nukleären DNA										
Pat. Nr.	Gen	Mutation <sup>1)</sup>	Zygotie	dbSNP <sup>2)</sup>	HGMD <sup>3)</sup>	Allelfrequenz			Referenz	
						dbSNP	PolyPhen <sup>4)</sup>	Mut.taster <sup>5)</sup>		AS-Kons. <sup>6)</sup>
2	33255	NDUFS1 c.497G>A p.G166E (c.683T>C p.V228A)	hetero (hetero)	-	-	-	c	B	++	NEU
5	33354	NDUFS2 c.329A>T p.D110V	hetero	-	-	-	a	B	+	NEU
6	33462	NDUF2 c.96G>A p.W3X	hetero	rs35086265	-	0,026	a	B	+	NEU
			homo	-	-	-	stop	stop	stop	NEU

<sup>1)</sup>Variantennomenklatur der HGVS (Human Genome Variation Society)

<sup>2)</sup>in der Datenbank dbSNP bereits hinterlegte Variantennummer

<sup>3)</sup>in der Datenbank HGMD bereits hinterlegte Variantennummer

<sup>4)</sup>Pathogenitätsvorhersage durch PolyPhen-Programm: a=benigne, b=möglicherweise pathogen, c=wahrscheinlich pathogen

<sup>5)</sup>Pathogenitätsvorhersage durch Mutationtaster-Programm: A = nicht krankheitsauslösend, B = krankheitsauslösend

<sup>6)</sup>Aminosäurenkonservierung, + = konserviert in über 70 % von 40-42 Wirbeltierspezies, ++ = konserviert in über 85 % von 32-45 Wirbeltierspezies

#### **4.2.6 Varianten unklarer Signifikanz der nukleären DNA**

Zusätzlich wurden 22 nukleäre Varianten gefunden, die einfach heterozygot vorlagen und in dem betroffenen Gen die einzige Variante des jeweiligen Patienten – neben häufigen benignen Polymorphismen – darstellten. Diese sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Bei einem angenommenen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus ist es unwahrscheinlich, dass sie kausal an der Krankheitsentstehung beteiligt sind.

Zwei der hier aufgeführten Patienten sind auch Träger pathogener Varianten (Patient 2 = #33255 und Patient 3 = #33460). Die Anzahl an Patienten, bei denen ausschließlich nukleäre Varianten unklarer Signifikanz detektiert wurden, liegt damit bei 20.

## Ergebnisse

Tabelle 4.4 Varianten unklarer Signifikanz der nukleären DNA.

Pat.	Pat.Nr.	Gen	Variante <sup>1)</sup>	dbSNP <sup>2)</sup>	HGMD <sup>3)</sup>	PolyPhen <sup>4)</sup>	Mut.taster <sup>5)</sup>	AS-Kons. <sup>6)</sup>	Allelfrequenz	
									Screen <sup>7)</sup>	
13	33334	ECSIT	c.344G>A p.R115H	-	-	b	A	+		0,0053
14	33459	ECSIT	c.425G>A p.R142Q	-	-	-	A	+		0,0053
3	33460	ECSIT	c.1009G>A p.V337M	-	-	a	A	nein		0,0053
15	33034	NDUFA10	c.712G>A p.E238K	rs35462421	-	c	B	++		0,016
2	33255	NDUFA10	c.712G>A p.E238K	rs35462421	-	c	B	++		0,016
16	33278	NDUFA10	c.712G>A p.E238K	rs35462421	-	c	B	++		0,016
17	33281	NDUFA13	c.374C>A p.T125N	-	-	b	-	-		0,0053
18	33333	NDUFA6	c.146 G>C p.R49P	-	-	-	B	++		0,0053
19	33041	NDUFA6	c.384T>A p.H128Q	-	-	-	B	++		0,0053
20	33033	NDUFA6	c.400 C>T p.H134Y	-	-	-	B	+		0,0106
21	33021	NDUFAB1	c.247G>A p.V83I	-	-	a	B	++		0,0053
22	33326	NDUFAF1	c.708G>A p.M236I	-	-	a	A	+		0,0053
23	33015	NDUFB1	c.196 A>T p. M66L	-	-	-	A	++		0,016
24	33026	NDUFB1	c.196 A>T p. M66L	-	-	-	A	++		0,016
25	33358	NDUFB1	c.196 A>T p. M66L	-	-	-	A	++		0,016
26	33331	NDUFB8	c.364 A>G p.T122A	-	-	b	B	++		0,0053
27	33027	NDUFB9	c.140G>T p.R47L	-	-	c	B	++		0,0053
28	33017	NDUFS1	c.1291C>G p.L431V	-	-	a	B	+		0,0106
29	33023	NDUFS3	c.94C>G p.L32V	-	-	a	A	++		0,0053
30	33028	NDUFS8	c.305G>A p.R102H	rs121912638	CM981378	c	B	-		0,0053
31	33284	NDUFS8	c.476C>A p.A159D	-	-	c	B	++		0,0053
32	33007	NDUFV3	c.1289C>T p.P430L	-	-	-	B	++		0,0053

<sup>1)</sup> Variantennomenklatur der HGVS, <sup>2)</sup>Variantennummer dbSNP, <sup>3)</sup> Variantennummer bei HGMD, <sup>4)</sup> Pathogenitätsvorhersage durch Polyphen-Programm: a=Polymorphismus, b=krankheitsauslösend, c=konserviert, <sup>5)</sup> durch Mutationstaster: A = nicht krankheitsauslösend, B = krankheitsauslösend, <sup>6)</sup> Aminosäurenkonservierung, <sup>7)</sup> Beobachtete (heterozygote) Allelfrequenz im hier untersuchten Patientenkollektiv; Daten beruhen nicht auf Sequenzdaten sondern lediglich auf Schmelzkurvenanalysen

#### 4.2.7 Bekannte pathogene Mutationen der mitochondrialen DNA

Bei sechs Patienten konnten bekannte kausale Mutationen der mtDNA identifiziert werden.

Tabelle 4.5 Mitochondrial kodierte pathogene Mutationen.

Pat.	Pat. Nr.	Gen	Mutation <sup>1)</sup>	Hetero- plasmie <sup>2)</sup>	in 2704 Proben <sup>3)</sup>	Mitomap <sup>4)</sup>	assoziierte Krankheiten	Mitchell Score	Referenz Mitomap
7	33464	ND3	10158T>C p.S34P	<90%	0	confirmed	Leigh Syndrom	33	Crimi, Papadimitriou et al. (2004)
8	33343	ND3	10197G>A p.A47T	>90%	2	confirmed	Leigh Dystonie Apoplex		Sarzi, Brown et al. (2007)
9	33456	ND3	10197G>A p.A47T	>90%	2	confirmed	Leigh Dystonie Apoplex		Sarzi, Brown et al. (2007)
10	33328	ND5	13042G>A p.A236T	>90%	1	reported	Optische Neuropathie Retinopathie		Valentino, Barboni et al. (2006)
11	44732	ND6	14459G>A p.A72V	>90%	1	confirmed	LHON Dystonie	37	Jun, Brown et al. (1994)
12	33346	ND6	14487T>C p.M63V	>90%	0	confirmed	Leigh Dystonie Ataxie	39	Ugalde, Triepels et al. (2003)

<sup>1)</sup> Variantennomenklatur der HGVS (Human Genome Variation Society)

<sup>2)</sup> geschätzter Heteroplasmiegrad anhand der Sequenz-Elektropherogramme

<sup>3)</sup> Untersuchung von 2704 gesunden Individuen. Quelle: Datenbank mtDB ([www.genpat.uu.se/mtDB/](http://www.genpat.uu.se/mtDB/))

<sup>4)</sup> Status in der Datenbank Mitomap ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) reported=1x publiziert, confirmed=durch mehrere unabhängige Autoren publiziert

#### 4.2.8 Bisher unbekannt Varianten der mitochondrialen DNA

Bei weiteren acht Patienten konnten neue Varianten der mitochondrialen DNA identifiziert werden. Da in dieser Arbeit keine weitergehenden Untersuchungen zur Verifizierung der Kausalität dieser Mutationen durchgeführt wurden und eine Einteilung ohne eventuell nicht zuverlässig ist, wurden sie hier alle als Varianten unklarer Signifikanz klassifiziert um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Ein geringerer Anteil an Patienten mit erfolgreicher Mutationsdiagnostik wurde dafür in Kauf genommen.

## Ergebnisse

Tabelle 4.6 Bisher unbekannte Varianten der mitochondrialen DNA mit unklarer Signifikanz (VUS).

Pat.	Pat. Nr.	Gen	Variante	Heteroplasmie <sup>1)</sup>	in 2704 Proben <sup>2)</sup>	mitomap Status <sup>3)</sup>
33	32999	ND2	4512G>A p.A15T	>90%	1	neu
34	33016	ND2	5041T>C p.M191T	<90%	0	neu
24	33026	ND3	10192C>T p.S45F	>90%	6	neu
12	33346	ND4	11360A>G p.M201V	>90%	0	neu
35	33336	ND5	13889G>A p.C518Y	>90%	7	neu
8	33343	ND5	13969A>T p.S545C	>90%	0	neu
36	33353	ND5	13981C>T p.P549S	>90%	1	neu
10	33328	ND6	14420C>T p.G85E	<90%	2	neu

<sup>1)</sup> geschätzter Heteroplasmiegrad anhand der Sequenz-Elektropherogramme

<sup>2)</sup> Untersuchung von 2704 gesunden Individuen. Quelle: Datenbank mtDB ([www.genpat.uu.se/mtDB/](http://www.genpat.uu.se/mtDB/))

<sup>3)</sup> nach der Datenbank Mitomap ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org))

Bei den Patienten 8 (#33343), 10 (#33328) und 12 (#33346) konnte zusätzlich eine sicher krankheitsauslösende Mutation der mtDNA detektiert werden (siehe vorheriges Kapitel 4.2.7). Die Anzahl der Patienten, bei denen lediglich eine Variante unklarer Kausalität der mtDNA gefunden wurde konnte, reduziert sich damit auf fünf.

### 4.2.9 Häufige Varianten und stille Mutationen

Des Weiteren wurden zahlreiche benigne Polymorphismen gefunden, die in Tabelle 4.7 zusammengetragen sind.

Synonyme Varianten, sogenannte stille Mutationen, wurden ebenfalls zahlreich detektiert. Wegen ihrer geringen klinischen Relevanz werden sie hier nicht dargestellt.



Tabelle 4.7 Häufige benigne Varianten der nukleären DNA.

Gen	Variante <sup>1)</sup>	Zygotie	dbSNP <sup>2)</sup>	HGMD <sup>3)</sup>	Allelfrequenz dbSNP	Allelfrequenz Screen <sup>4)</sup>
ECSIT	c.832C>T, p.R278C	heterozygot	rs34803265	-	0,49	0,048
NDUFA6	c.104C>T, p.A35V	homozygot	rs1801311	-	0,422	0,037
NDUFA9	c.881C>T, p.P294L	heterozygot	rs34076756	-	0,026	0,032
NDUFAF1	c.26G>A, p.R9H	hetero-/ homozygot	rs1899	-	0,182	0,431
NDUFAF1	c.526G>A, p.E176K	heterozygot	rs35227875	-	0,053	0,053
NDUFAF1	c.92G>T, p.R31L	hetero-/ homozygot	rs3204853	-	0,068	0,426
NDUFAF1	c.941C>G, p.A314G	heterozygot	rs12900702	-	0,183	0,112
NDUFB9	c.436C>T, p.P146S	heterozygot	rs10195	-	0,214	0,154
NDUFC2	c.136 C>G, p. L46V	heterozygot	rs8875	-	0,354	>0,300
NDUFS2	c.58C>A, p.P20T	heterozygot	rs11538340	-	0,226	0,106
NDUFS2	c.1054 C>G, p.P352A	hetero-/ homozygot	rs11576415	-	0,064	0,16
NDUFS7	c.68C>T p.P23L	hetero-/ homozygot	rs1142530	-	0,481	>0,300
NDUFV2	c. 86C>T, p.A29V	hetero-/ homozygot	rs906807	CM983407	0,242	0,383
NDUFV3	c.168A>C, p.K56N	heterozygot	-	-	-	0,037

<sup>1)</sup> Variantennomenklatur der HGVS (Human Genome Variation Society)

<sup>2)</sup> in der Datenbank dbSNP bereits hinterlegte Variantennummer

<sup>3)</sup> in der Datenbank HGMD bereits hinterlegte Variantennummer

<sup>4)</sup> Beobachtete heterozygote Allelfrequenz im hier untersuchten Patientenkollektiv auf Basis von Schmelzkurvenprofilen

### 4.3 Klassifizierung von Varianten nach potentieller Pathogenität

Nach Detektion von insgesamt 45 seltenen und 14 häufigen kodierenden Varianten wurde versucht, krankheitsauslösende von benignen Varianten abzugrenzen, um die klinische Relevanz der gefundenen Ergebnisse abschätzen zu können. Bisher unbekannte genetische Varianten wurden zu diesem Zweck anhand der folgenden Argumentationspunkte auf potentielle Pathogenität hin untersucht und in (wahrscheinlich) pathogene Varianten, Varianten unklarer Signifikanz (VUS) und benigne Varianten eingeteilt.

#### Mögliche Pathogenitätskriterien:

1. Vergleich mit Datenbanken / Allelfrequenz bei Gesunden

### 2. Allelfrequenz im hier betrachteten Patientenkollektiv

berechnet durch Addieren aller Patienten, bei denen durch Sequenzieren die jeweilige heterozygote Variante gefunden wurde, und der Patienten, die exakt denselben HRMA-Schmelzkurvenverlauf zeigten, jedoch nicht sequenziert wurden. Homozygote werden dabei doppelt gezählt.

### 3. Zygotie der Variante (Homozygotie / kombinierte und einfache Hetero-/Hemizygotie)

### 4. Vorhersage der Pathogenitätsprognose-Programme

Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) und

Mutationtaster (<http://www.mutationtaster.org/>)

### 5. Evolutionäre Konservierung der substituierten Aminosäure

### 6. Stop-Mutationen

### 7. Mitochondriale Mutationen

Bisher unbekannte Varianten wurden grundsätzlich als unklar eingestuft (siehe Kapitel 5.1.3).

Unter Beachtung der genannten Punkte wurden bei sechs Patienten die zugrunde liegenden neuen Mutationen innerhalb der kernkodierten Gene als pathogen eingestuft. Sie sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Weiterhin wurden 22 neue nukleäre Varianten als Varianten unklarer Signifikanz bewertet. Diese sind in Tabelle 4.4 zu sehen.

Auf die einzelnen aufgeführten Argumentationskriterien, deren Bedeutung und Gewichtung bei der Interpretation von neuen Varianten wird in der Diskussion eingegangen (Kapitel 5.1.3). Genauso wird an dieser Stelle die Interpretation der einzelnen als wahrscheinlich pathogen eingestuften Varianten anhand der hier aufgeführten Punkte erläutert (Kapitel 5.1.4). Weitergehende Diagnostik zur experimentellen Validierung der Pathogenität, Stammbaumanalysen oder Sequenzierung der Eltern / Geschwister wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Gefundene Varianten: pathogen oder neutral?

#### 5.1.1 Allgemeines

„The challenge for investigators lies not in detecting mutations,  
but in determining which of them are pathogenic.“

Dieses Zitat aus Mitchell et al. (2006) verdeutlicht, dass mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden der Mutationsanalyse zeit- und kostengünstig eine enorme Anzahl an Varianten detektiert werden kann, die jedoch nicht alle zwingend krankheitsrelevant sind. Die Schwierigkeit besteht demnach heute nicht mehr in der Identifikation der Alterationen, sondern diese in einen korrekten Zusammenhang zur Pathogenese der untersuchten Krankheit zu bringen. Diese Aufgabe ergab sich auch in diesem Projekt: Denn es konnten insgesamt 45 seltene und 14 häufige kodierende Varianten gefunden werden – doch wie viele dieser Varianten sind tatsächlich krankheitsverursachend und können die isolierte Komplex-I-Dysfunktion der Patienten zuverlässig erklären und welche nicht?

Um dieser Frage nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit keine weitergehende Diagnostik wie z.B. funktionelle Untersuchungen am Muskelbiopsat, Stammbaumanalysen und Heterozygotentestung der Eltern / Heteroplasmiebestimmung der Mutter selbst durchgeführt. Dies war Gegenstand nachfolgender Projekte am Institut. Funktionsanalysen können Hinweise auf die Kausalität einer Mutation erbringen, da sie die Funktion bzw. die Fehlfunktion des betroffenen Gens / Proteins beim Vorliegen der Mutation demonstrieren können.

Da jedoch der systematischen Einteilung der Mutationen nach ihrer möglichen Krankheitsrelevanz eine zentrale Rolle in der genetischen Diagnostik zukommt, wurden die gefundenen Varianten anhand theoretischer Pathogenitätskriterien interpretiert und so valide als möglich in krankheitsverursachend und neutral differenziert.

Bei "neuen" Varianten, die durch diesen Mutationsscreen aufgedeckt wurden, kann daher nur von "sehr wahrscheinlich pathogenen" Mutationen gesprochen werden, da ein definitiver Nachweis der Kausalität mit den zur Anwendung gekommenen Methoden der DNA-Analyse nicht sicher möglich war. Zur Definition "neuer" / "bisher unbekannter" Varianten darf auf Abschnitt 4.2.1 verwiesen werden.

### **5.1.2 Bekannte Mutationen**

Um erste Rückschlüsse auf Eigenschaften gefundener Varianten gewinnen zu können, wurde im Anschluss an den Mutationsscreen eine Literaturrecherche durchgeführt. Hierdurch konnten bekannte gegenüber bisher unbekanntem Varianten abgegrenzt werden und bei ersteren die Frequenz des mutierten Allels eingesehen werden. Varianten mit hoher Frequenz ohne bisherigen Bezug zur Krankheitsentstehung bei Patienten mit Komplex-I-Defekt konnten für die untersuchten Patienten als benigne Veränderungen betrachtet werden.

Es wurden die Datenbanken Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), MITOMAP ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) und mtDB (<http://www.genpat.uu.se/mtDB/>) konsultiert.

Vier der gefundenen Mutationen der nukleären DNA und fünf der mitochondrialen DNA waren in den Datenbanken als pathogen annotiert (siehe Tabelle 4.3. und Tabelle 4.5 mit Quellen). Durch Angaben der jeweiligen Autoren zum assoziierten klinischen Krankheitsbild und dem von ihnen geführten Nachweis der Pathogenität der jeweiligen Mutation wurden diese Varianten für diese Arbeit ebenfalls als sicher pathogen gewertet.

Für Varianten der mitochondrial kodierten DNA wird bei MITOMAP weiter differenziert zwischen Mutationen mit einmaliger („reported“) bzw. unabhängiger, mehrmaliger Publikation durch unterschiedliche Arbeitsgruppen („confirmed“). Vier der fünf hier aufgeführten Mutationen sind „confirmed“, nur eine Mutation ist bislang im Zusammenhang mit isolierter Komplex-I-Defizienz einmalig publiziert worden. Da diese Mutation des Gens ND5 (13043G>A, p.A236T) mit einem hohen Heteroplasmiegrad von über 90 % im Patienten #33328 vorliegt und die Mutation in 2704 Kontrollen der Datenbank mtDB nur einmal zu finden war, wurde sie hier ebenfalls als sicher pathogen angesehen.

Damit konnte bei insgesamt neun Patienten mit bekannten Mutationen eine definitive genetische Diagnose gestellt werden und deren genetische Analyse erfolgreich abgeschlossen werden.

### **5.1.3 Herangezogene Kriterien zur Interpretation von unbekanntem Mutationen**

"Neue" Varianten wurden zusätzlich anhand weiterer definierter Pathogenitätskriterien interpretiert. Diese sollen nun näher betrachtet und auf ihre Aussagekraft hin diskutiert werden.

1. Vergleich mit Datenbanken / Publikation der Variante durch andere Autoren  
siehe vorherigen Abschnitt 5.1.2

---

## 2. Allelfrequenz der Variante im hier selektierten Patientenkollektiv

(Erläuterungen zur Bestimmung der heterozygoten Allelfrequenz im Ergebnisteil Abschnitt 4.3)

Allgemein gelten Varianten, die in erkrankten Patientenkollektiven, jedoch nicht in gesunden Kontrollen gefunden werden, als pathogenitätsverdächtig. Dagegen deuten Varianten, die auch in der gesunden Bevölkerung häufig auftreten, auf benigne Polymorphismen hin und konnten hier meist auch als solche in den oben genannten Datenbanken wiedergefunden werden.

Das sehr seltene oder sogar fehlende Auftreten in Kontrollgruppen wurde als Zeichen der möglichen Pathogenität gewertet. Alleine kann dieses Kriterium jedoch nicht angewandt werden, denn die Häufigkeit einer Variante ist kein sicherer Indikator für die Krankheitsrelevanz. So können Polymorphismen mit per definitionem einer Allelfrequenz von mehr als einem Prozent in der Bevölkerung durchaus in die Krankheitsentstehung involviert sein.

## 3. Zygotie der Variante (Homo-/Hetero-/Hemizygotie)

Für nukleäre Mutationen wurde ein autosomal-rezessives Vererbungsmodell nach Mendel angenommen, da dieses bei allen bisher publizierten Mutationen in Strukturuntereinheiten und Assemblierungsfaktoren des Komplex I beschrieben wird (Referenzen in Tabelle A 2) – mit Ausnahme des X-chromosomal vererbten NDUFA1-Gens, das einer hemizygoten Vererbung folgt.

Daher erschienen homozygote oder kombiniert-heterozygote Mutationen eher im Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung zu stehen als einfach-heterozygote. Bisher gibt es keinen Hinweis auf autosomal-dominant vererbte Mutationen bei isoliertem Komplex-I-Mangel, so dass bei einfach-heterozygoten Varianten nicht von einem pathogenen Charakter ausgegangen wurde.

## 4. Vorhersage durch die Pathogenitätsprognose-Programme Polyphen und Mutationtaster

Pathogenitätsprognose-Programme versuchen den Einfluss einer mutationsbedingten Aminosäuresubstitution auf Funktion und Struktur des betroffenen Proteins vorherzusagen, indem sie die Veränderungen durch eigene Algorithmen zu simulieren versuchen. Mit einbezogen werden hierbei z.B. die Kenntnis über die Konservierung der betroffenen Aminosäure sowie über Tertiär- und Quartärstrukturen des Proteins und über die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins (Schwarz et al. 2010).

Die Ergebnisse solcher Vorhersageprogramme zur Pathogenitätsprüfung heranzuziehen darf als sicherlich hilfreich erachtet werden, kann jedoch die reale

Durchführung von Experimenten zur Funktion des Gens oder Proteins nicht ersetzen. Hier wurden Mutationen, die nach den Vorhersageprogrammen Polyphen und/oder Mutationtaster (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> und <http://www.mutationtaster.org/>) als krankheitsauslösend eingestuft wurden, als wahrscheinlich pathogen gewertet. Kamen beide Programme unabhängig voneinander zum selben Ergebnis, erschien die Einschätzung durch die Simulation als noch zuverlässiger.

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit konnten mitochondriale Varianten noch nicht durch diese Vorhersageprogramme evaluiert werden.

### 5. Evolutionäre Konservierung der substituierten Aminosäure

Der Konservierungsgrad auf Aminosäurenniveau gilt als Zeichen der funktionellen oder strukturellen Bedeutung des betroffenen Proteinabschnitts.

Kodierende Varianten in (hoch)konservierten Aminosäuren wurden daher als wahrscheinlich kausal eingestuft, da es durch die Aminosäuresubstitution eher zur veränderten Struktur und zu funktionellen Einschränkungen des kodierten Proteins kommt als durch Varianten in nicht-konservierten Aminosäuren. Hier sind Ergebnisse der Pathogenitätsvorhersageprogramme ergänzend sinnvoll, da sie die daraus resultierende Veränderung der Struktur des Proteins in ihre Prognose mit einbeziehen.

### 6. Stop-Mutationen

Führt ein Basenaustausch innerhalb eines kodierenden Triplets zu einem Stop-Codon (TAA, TAG oder TGA), werden nachfolgende Aminosäuren nicht mehr translatiert. Bei der Proteinbiosynthese entsteht ein verkürztes Protein. Homozygote Stop-Mutationen wurden als sicher pathogen klassifiziert, da sie eindeutig zum Verlust der Funktion des jeweiligen Proteins führen ("Loss-of-function"/"Nonsense"-Mutation). Die zuvor genannten Gesichtspunkte 1-5 wurden dann nicht weiter berücksichtigt, ebenso bedarf es in diesem Fall für den sichereren Nachweis der Kausalität keiner weitergehenden Experimente.

Dies trifft auf die neue homozygote Stop-Mutation c.9G>A, p.W3X im Gen NDUFAF2 zu, die beim Patienten #33462 erstmalig nachgewiesen und publiziert werden konnte.

### 7. Mitochondriale Mutationen

Die Klassifizierung mitochondrialer Varianten gestaltet sich aufgrund der physiologisch hohen Mutationsrate wesentlich schwieriger als Veränderungen chromosomal kodierter Gene und ist ohne weitergehende Diagnostik vermutlich nicht

ausreichend aussagekräftig. Daher wurden „neue“ Varianten nicht nach den oben genannten Argumenten klassifiziert, sondern generell als Varianten unklarer Signifikanz bewertet um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Ein geringerer Anteil an Patienten mit erfolgreicher Mutationsdiagnostik wurde dafür in Kauf genommen.

#### 5.1.4 Beurteilung der als pathogen bewerteten, unbekannt Mutationen

Die bisher unbekannt nukleären Varianten wurden auf alle genannten Kriterien hin untersucht und nach Bewertung der Kriterien in ihrer Zusammenschau als wahrscheinlich pathogen interpretiert (siehe Tabelle 4.3).

- Patient 2 (#33255): Bei diesem Patienten konnten im Gen *NDUFS1* zwei kombiniert-heterozygote Varianten nachgewiesen werden: Die Mutation c.497G>A, p.G166E liegt heterozygot vor und ist in keiner der konsultierten Datenbanken annotiert. Im hier untersuchten Patientenkollektiv konnte die Mutation in keinem anderen Patienten identifiziert werden. Die alterierte Aminosäure Glycin (G) ist an dieser Position hoch konserviert und beide Vorhersageprogramme (Polyphen und Mutationtaster) kommen zum Ergebnis, dass die Mutation "wahrscheinlich pathogen" bzw. "krankheitsauslösend" ist. Die Mutation liegt im Patienten 2 kombiniert mit der bekannten Mutation c.683T>C, p.V228A vor (Pagniez-Mammeri et al. 2009).

Zusätzlich ist noch zu bemerken, dass das Gen *NDUFS1* Teil des katalytischen Zentrums des Komplex I ist und dass bisher in allen 14 Untereinheiten des katalytischen Zentrums pathogene Mutationen publiziert wurden. *NDUFS1* ist demnach essentiell für die Funktion des Proteinkomplexes.

Beide heterozygoten Mutationen zusammen innerhalb des Gens *NDUFS1* ließen einen kausalen Zusammenhang mit dem Komplex-I-Defekt des Patienten als sehr plausibel erscheinen.

- Patient 3 (#33354): Bei Patient 3 wurden zwei kombiniert-heterozygot vorliegende Varianten in *NDUFS2* identifiziert. Dieses Gen gehört, wie *NDUFS1* zum katalytischen Zentrum des Komplex I.

Die heterozygote Mutation c.329A>T, p.D110V wurde in keinem anderen Patienten noch in den genannten Datenbanken gesehen. Die Aminosäure Asparaginsäure (D) ist an dieser Position im Protein hoch konserviert. Die Aminosäure Valin (V) als Variante wird in keiner Spezies im Vergleich gefunden. Allerdings schätzen die Pathogenitätsvorhersageprogramme den Effekt der Mutation auf das Protein unterschiedlich ein: Polyphen stuft sie als „benigne“, Mutationtaster als „krankheitsauslösend“ ein. Ausschlaggebend für die Klassifizierung als pathogene

Mutation in dieser Arbeit war die hochkonservierte Position der betroffenen Aminosäure innerhalb eines Gens des katalytischen Zentrums, das fehlende Auftreten in gesunden Vergleichspopulationen und im Patientenkollektiv, sowie die Vorhersage einer kausalen Mutation durch zumindest ein Vorhersageprogramm.

Zusätzlich konnte beim Patienten 3 im selben Gen eine weitere heterozygote Variante nachgewiesen werden (c.968G>A, p.R323Q). Diese ist mit der Nummer rs35086265 in der Datenbank dbSNP als einfach-heterozygot vorliegende Einzelnukleotidvariante (SNV) gelistet mit extrem niedriger Allelfrequenz (0,0028). Sie ist aber weder als homozygote noch als kombiniert heterozygote Mutation bekannt oder publiziert. Für die Bewertung der Variante war hier ganz entscheidend, dass sie beim Patienten 3 nicht als einzige Veränderung zu finden war, sondern erst die Zusammenschau mit der erstgenannten kodierenden Mutation zur Einstufung als pathogene Mutation führte. Zusätzlich lies die Konservierung der Aminosäure Arginin (R) eine kausale Mutation plausibel erscheinen, sowie das Ergebnis des Vorhersageprogrammes Mutationtaster („krankheitsauslösend“).

- Patient 6 (#33462): Bei diesem Patienten konnte im Gen NDUFAF2 die homozygote Stop-Mutation c.9G>A, p.W3X nachgewiesen werden.

Das Vorliegen einer homozygoten Stop-Mutation führt sicher zum Abbruch der Proteinsynthese („loss of function“ Mutation), in diesem Fall sogar bereits nach dem dritten Codon. Die Mutation führt also zu einem extrem verkürzten Protein, das sicher seine Funktion verliert. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erläutert (Kapitel 5.1.3), wurden Stop-Mutationen auch ohne vorherige Publikation durch andere Autoren oder weitere Diagnostik als sicher pathogen gewertet und unterlagen keinen weiteren Kriterien bzgl. der Pathogenitätswahrscheinlichkeit.

## **5.2 Spektrum der gefundenen Mutationen, Anteil an Kindern mit mitochondrialen Mutationen**

Die gefundenen pathogenen Varianten sind auf insgesamt acht Gene aufgeteilt, in denen bereits zuvor krankheitsauslösende Mutationen in der Literatur beschrieben worden sind (Quellenangaben in Tabelle 4.3, Tabelle 4.5 und Tabelle A 2 im Anhang).

Die Mutationsloci innerhalb der bekannten Gene sind jedoch zum Teil neu. Bei sechs Patienten fanden sich pathogene Varianten der kernkodierten DNA sowie bei weiteren sechs Patienten der mitochondrialen DNA.

Dabei liegen die gefundenen pathogenen Mutationen bei elf der zwölf der Patienten (entspricht 92 %) in Genen vor, die für Strukturproteine des Komplex I kodieren und nur bei



---

einem Patienten in einem Assemblierungsfaktor. In zwei der selektierten Assemblyfaktoren (NDUFAF1 und ECSIT) konnte keine relevante Mutation entdeckt werden.

Betrachtet man nun nur die Patienten, bei denen eines der Strukturgene des Komplex I betroffen war (n=11), zeigt sich, dass dabei bei 82 % der Fälle (n=9) die Mutationen innerhalb eines der hochkonservierten Gene des katalytischen Zentrums des Proteinkomplexes liegt. NDUFA1 und NDUFS4 hingegen gehören zu den 31 Nebenproteinen des Komplex I, die nicht direkt am Elektronen- und Protonentransport durch die Atmungskette beteiligt sind (Carroll et al. 2006). Innerhalb dieser 31 Nebeneinheiten sind bisher erst in sieben pathogene Mutationen publiziert worden, wohingegen dies in allen Untereinheiten des katalytischen Zentrums gelang. Der hohe Anteil an krankheitsauslösenden Mutationen in Untereinheiten des katalytischen Zentrums auch im großen Patientenkollektiv dieses Screens unterstreicht die angenommene wichtige Rolle des katalytischen Zentrums auch im humanen Komplex I.

Bei sechs Patienten wurden bekannte pathogene Mutationen der mtDNA nachgewiesen. Hierunter waren drei Säuglinge im ersten Lebensjahr und ein Kind unter zehn Jahren. Nur ein Patient war erwachsen (20-40 Jahre) und bei einem Patienten lagen keine Angaben zum Alter vor. Bei den bisher unbekanntem Varianten fraglicher Pathogenität der mitochondrialen DNA lag folgende Altersverteilung vor: zwei Kinder unter zehn Jahren, ein Jugendlicher (10-20 Jahre), ein Erwachsener (20-40 Jahre) und ein Patient ohne Altersangaben. Die drei Patienten, bei denen zusätzlich eine pathogene Mutation der mtDNA nachgewiesen wurde, sind hier nicht nochmals mit einberechnet (Patient #33343 und #33346 Säuglinge und Patient #33328 20-40 Jahre). Für diesen Screen waren insgesamt zu 55 % Kinder unter zehn Jahren eingeschlossen worden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Hälfte der Patienten mit pathogener Mutation der mtDNA in diesem Screen Säuglinge im ersten Lebensjahr waren bzw. zwei Drittel Kinder unter zehn Jahren. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussage der großen retrospektiven Studie von Swalwell et al. (2011), dass Kinder mit klinisch oder biochemisch manifestem Komplex-I-Defekt ebenso häufig wie Erwachsene Träger kausaler Mutationen innerhalb der mitochondrialen DNA sein können. Die langjährige Annahme, dass bei Kindern typischerweise Mutationen der ncDNA und bei Erwachsenen und Jugendlichen Mutationen der mtDNA vorliegen, muss demnach überdacht werden. Unter anderem ist in den noch aktuellen S2-Leitlinien zu Mitochondriopathien zu lesen, dass bei Kindern zu einem größeren Anteil Defekte der nukleären DNA der Erkrankung zugrunde liegen als bei Erwachsenen (S2-Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen: Diagnostik und Therapieansätze bei Mitochondriopathien im Kindes- und Jugendalter. Sperl et al. 2009).

Dieses Umdenken hätte Konsequenzen für die Routinediagnostik bei betroffenen Patienten. So sollten bei jedem Patienten, also auch bei Kindern und Säuglingen, mit der Verdachtsdiagnose einer Mitochondriopathie routinemäßig alle mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I sowie die gesamte mtDNA sequenziert werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Diagnose eines Komplex-I-Defektes bereits biochemisch gesichert werden konnte. Die geringe Größe (16,6 kb) des mitochondrialen Genoms und der damit verbundene zusätzliche Aufwand sind im Verhältnis zu den unzähligen nukleär kodierten Assemblierungsfaktoren als sehr klein anzusehen. Im Kapitel 5.3.3 wird nochmals auf die Bedeutung der Analyse der gesamten mtDNA eingegangen.

### **5.3 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur und Limitationen der Arbeit**

In der Einleitung wurde eingangs unter Bezugnahme auf einen Reviewartikel aus dem Jahr 2004 festgehalten, dass nur bei der Hälfte der erwachsenen Patienten bzw. 10-20 % der Kinder mit biochemisch nachgewiesenem Defekt und/oder eindeutigen Phänotyp eine molekulargenetische Diagnose gestellt werden kann (Zeviani and Di Donato 2004). Auch aktuellere Veröffentlichungen mit den bisher größten Patientenkollektiven mit singulärem Komplex-I-Mangel (zum Teil über 100 Patienten) kommen zu dem Ergebnis, dass nach wie vor bei ca. 50% aller Betroffenen die Mutationssuche ohne Ergebnis bleibt (Swalwell et al. 2011; Calvo et al. 2010).

Im Vergleich zu den genannten Veröffentlichungen erscheint der Anteil der Patienten mit erfolgreicher molekulargenetischer Diagnostik durch diese Arbeit mit einem ebenfalls sehr großen Patientenkollektiv (14% von 88 Patienten) auf den ersten Blick gering. Folgende Punkte bzw. Limitationen der eigenen Arbeit lassen sich als Erklärung hierfür nennen und werden in den nächsten Kapiteln besprochen.

#### **5.3.1 Vorselektion von Patienten mit ergebnisloser Mutationsdiagnostik**

Vergleicht man unterschiedliche Studien hinsichtlich der Anzahl an erfolgreichen genetischen Diagnosen untereinander, muss zunächst das eingeschlossene Patientengut mit seinen Baseline-Charakteristika näher betrachtet werden.

In diesen Mutationsscreens fanden nur Patienten Eingang, bei denen bereits im Vorfeld in den zusehenden Instituten genetische Routinediagnostik durchgeführt worden und diese ergebnislos geblieben war. Im Umkehrschluss waren die angenommenen 50 % der Fälle, in denen eine molekulargenetische Diagnose gestellt werden kann, von vorneherein nicht Teil dieses Screens. Es handelt sich demnach um eine Vorselektion von Patienten, bei denen die Wahrscheinlichkeit, eine pathogene Mutation nachweisen zu können, als deutlich vermindert

einzuschätzen ist. Jeder Patient mit hier gefundener kausaler Mutation kann demnach als zusätzlich gelöster Fall betrachtet werden.

In der oben aufgeführten Publikation von Swalwell et al. (2011) lagen bei einer retrospektiven Analyse der genetischen Befunde von 101 Patienten mit isoliertem Komplex-I-Mangel bei 50,5 % der Betroffenen pathogene Mutationen vor. Es handelte sich – im Gegensatz zur hier vorgelegten Arbeit – nicht um Fälle mit vorangegangener erfolgloser Diagnostik. Diese aktuellen Ergebnisse mit großer Probensammlung bestätigen die allgemeine Annahme, dass bei ca. der Hälfte der Komplex-I-Patienten eine zugrunde liegende Mutation gefunden werden kann. Es ist jedoch noch hervorzuheben, dass dies bei ausschließlich pädiatrischem Kollektiv gelang, bei dem man bislang mit weniger Mutationsnachweis gerechnet hatte (10-20%, Review von Zeviani and Di Donato 2004).

In dem zweiten zitierten groß angelegten Mutationsscreen an insgesamt 103 Patienten wurden ebenfalls bei ca. 50 % der Fälle die zugrunde liegenden Mutationen aufgedeckt (Calvo et al. 2011). Allerdings wurden 43 Proben mit bekannten Mutationen als Kontrollen zur Genotypisierung mit eingeschlossen. Wurden diese von der statistischen Auswertung herausgenommen, handelte es sich bei den restlichen 60 Patienten um Fälle, in denen die zuvor durchgeführte Diagnostik – ebenso wie hier – keine Mutation hervor bringen konnte. Innerhalb dieser Untergruppe konnte in den 103 Kandidatengenomen nur bei 18 % (= elf Indexpatienten) eine neue krankheitsdefinierende Mutation gefunden werden (Zusätzlich wurden bei zwei Geschwistern von Indexpatienten dieselben Mutationen wie bei ihrem jeweiligen Geschwister, dem Indexpatienten, gefunden). Mit den Ergebnissen innerhalb dieser Subgruppe sind die Daten der hier vorgelegten Arbeit vergleichbar, da in beiden Arbeiten die selbe Vorselektion bzgl. der zuvor stattgehabten Diagnostik besteht. Dennoch fällt der Anteil an erfolgreicher Diagnostik im vorliegenden Screen noch etwas geringer aus (14 vs. 18 %).

### **5.3.2 Einschluss von Patienten mit hoher Komplex-I-Restaktivität**

Für den Mutationsscreen wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen eine verminderte Komplex-I-Aktivität im untersuchten Zellmaterial vorlag. Die Einschlusskriterien bzgl. der Aktivität wurden jedoch weit gefasst. Damit konnten auch Patienten analysiert werden, deren Restaktivität noch sehr hoch war, bei denen aber aufgrund ihrer charakteristischen Klinik eindeutig der Verdacht auf eine Mitochondriopathie geäußert worden war. Ausschlaggebend war hier, dass bei der (auswärtigen) biochemischen Testung keine andere mitochondriale Enzymminderaktivität auffiel und der Komplex-I-Mangel damit – wenn auch geringgradig ausgeprägt– isoliert vorlag. So lag die gemessene Restaktivität des Komplex I bei nur 19 % der Patienten unter 30 %, bei 26 % der Proben unter 40 %. In 31 % der Proben konnte eine

verbliebene Enzymaktivität von über 70 % demonstriert werden und bei 20 % hatte das zusehende Institut die biochemischen Daten nicht weitergegeben (Details zur Definition der gemessenen Restaktivität siehe Abschnitt 4.1.1, Verteilung der Restaktivität im Patientenkollektiv in Abbildung A 4 und Tabelle A 1 im Anhang).

Retrospektiv betrachtet, ist jedoch bei solch gut erhaltener Restfunktion des Komplex I die geringe Minderfunktion nicht unbedingt die alleinige Ursache für die gravierenden klinischen Symptome. Bei diesen Patienten ist zu vermuten, dass der krankheitsdefinierende genetische Defekt in anderen, hier nicht betrachteten Assemblierungsfaktoren oder Proteinen liegt, die z.B. die allgemeine Funktionsweise mitochondrialer Proteine, den Proteintransport ins Mitochondrium oder die intergenomische Kommunikation steuern.

So wurden nach Beendigung dieses Screens in weiterführenden Arbeiten am Institut bei zwei Patienten mit guter Restaktivität des Komplex I (65 bzw. 76 % in Myoblasten) und ohne Mutationsnachweis in dieser Arbeit pathogene Mutationen im Gen *MTMFT* entdeckt (Haack et al. 2014). Dieses Gen beeinträchtigt die mitochondriale Proteintranslation und resultiert damit auch nicht in einem isolierten Komplex-I-Mangel. Bei den meisten Patienten mit Alterationen in diesem Gen fanden sich kombinierte Atmungskettendefekte.

### **5.3.3 Kausale Mutationen in nicht-untersuchten Genen**

Ein weiterer Grund, weshalb durch diesen Mutationsscreen bei nur einem kleineren Anteil der Patienten eine relevante Mutation nachgewiesen werden konnte, ist sicherlich, dass nicht alle bis heute bekannten Kandidatengene betrachtet wurden. Hier wurden die 45 Strukturuntereinheiten des Komplex I sowie die zum Zeitpunkt der Etablierung dieses Mutationsscreens bekannten Assemblierungsfaktoren *NDUFAF1*, *NDUFAF2* und *ECSIT* als zu untersuchende Gene definiert.

Daneben sind mittlerweile nun acht weitere Assemblierungsfaktoren als Kandidatengene identifiziert und als Träger pathogener Mutationen verifiziert worden (siehe Tabelle A 2 im Anhang).

Möglicherweise liegt jedoch in eben diesen neu entdeckten Assemblierungsfaktoren des Komplex I eine kausale Mutation bei einem Teil der Patienten. So konnte z.B. in weiterführenden Screens der Arbeitsgruppe am IHG beim Patienten #33006 eine pathogene Mutation im 2008 entdeckten Assemblierungsfaktor *NDUFAF4* gefunden werden (Haack et al. 2012). Und beim Patienten #33023 (sowie seiner Schwester) fand sich in späteren Arbeiten eine kausale Frameshift-Mutation im Gen *XPNPEP3* (O'Toole et al. 2010).

Zudem wurden für diese Arbeit innerhalb des mitochondrialen Genoms nur die sieben Strukturuntereinheiten des Komplex I ausgewählt. Eine Analyse der gesamten

---

mitochondrialen DNA wurde hier nicht vorgenommen. Auch im Bereich der mtDNA wurde jedoch, wie in den oben genannten Beispielen, in folgenden Projekten der Arbeitsgruppe bei einem Patienten (#33041) eine Mutation im Gen mt-TL1 identifiziert (tRNA Leucin; Haack et al. 2012). Insgesamt kodiert das mitochondriale Genom für 22 Transfer-RNAs (tRNAs). In dem großen, bereits weiter oben zitierten, Review der Arbeitsgruppe um David Thorburn lagen immerhin bei acht der 101 untersuchten pädiatrischen Patienten mit isoliertem Komplex-I-Defekt die krankheitsverursachende Mutation in einem tRNA-Gen (Swalwell et al. 2011). Im Vergleich hierzu waren Mutationen in mitochondrialen Strukturuntereinheiten bei 21 Prozent der Fälle zu finden. Das bedeutet, dass fast ein Drittel der kausalen Mutationen innerhalb des mitochondrialen Genoms in einem tRNA-Gen lag. Somit erscheint es erfolgsversprechender, die genetische Analyse des kompletten mitochondrialen Genoms bei Komplex-I-Patienten durchzuführen, als nur wie in dieser Arbeit der Strukturuntereinheiten.

Bei der Auswahl der Gene, die in den Mutationsscreen eingeschlossen werden sollten, wurde angenommen, dass allgemeinere, unterstützende Funktionen der Atmungskette wie die Signalwege der intergenomischen Kommunikation (zwischen ncDNA und mtDNA) und der Transport von Proteinen ins Mitochondrium beim untersuchten Kollektiv mit isoliertem Komplex-I-Mangel intakt sind, denn alle anderen Komplexe der Atmungskette, die ebenfalls nukleär und mitochondrial kodierte Proteine enthalten (Komplex III, IV und V), waren bei diesen Patienten unbeeinträchtigt. Gene, die für Proteine in diesen komplexen Transportwegen kodieren, wurden demnach nicht näher betrachtet. mtDNA regulierende Gene wie etwa mitochondriale Translations-, Elongations- oder Transkriptionsfaktoren wurden aus denselben Überlegungen heraus ebenfalls ausgeschlossen.

Oben genannte Beispiele zeigen jedoch, dass die Untersuchung mittlerweile bekannter Kandidatengene (tRNAs und neuere Assemblierungsfaktoren) erwartungsgemäß die Erfolgsrate der Mutationsdiagnostik steigert. Durch die fehlende Analyse der genannten Gene kann zum Teil erklärt werden, weshalb im Rahmen dieses Screens weniger krankheitsverursachende Mutationen detektiert werden konnten.

Allerdings deuten die Ergebnisse der hier vorgelegten und der anderen genannten Arbeiten mit großen Patientenkollektiven (Review von Zeviani and Di Donato 2004, Swalwell et al. 2011, Calvo et al. 2010) aber auch darauf hin, dass ein Großteil der isolierten Komplex-I-Defekte weder durch Mutationen in Strukturproteinen noch in bisher bekannten Assemblierungsfaktoren ausgelöst werden. So ließen sich auch bei Calvo et al. trotz der Analyse von 103 Kandidatengenen bei mehr als der Hälfte der Patienten keine sichere Mutation nachweisen, bzw. bei 82 % der Patienten mit zuvor stattgehabter erfolgloser Routinediagnostik.

Vielmehr lassen die Ergebnisse vermuten, dass ein Großteil der kausalen Mutationen in weiterhin unbekanntem bzw. noch nicht untersuchten Genen vorliegen (wie Cofaktoren, Rezeptoren, Transportproteine für den Proteintransport vom Zytosol ins Mitochondrium, Signalmoleküle der intergenomischen Kommunikation etc.). Konkordant hierzu konnten für den Komplex IV in den Assemblierungsfaktoren und nicht etwa in den Strukturgenen der Großteil der Komplex-IV-Defekt auslösenden Mutationen nachgewiesen werden (Lazarou et al. 2009). 2008 wurde durch Haas et al. die Zahl der in Frage kommenden Kandidatengene, die in die Funktionsweise des Komplex I involviert sind, auf etwa 1.500 geschätzt (Haas et al. 2008).

Anders lässt sich nicht erklären, weshalb - trotz stetiger Identifikation einzelner neuer Kandidatengene - nach wie vor in der Literatur bei der Hälfte der Patienten mit Komplex-I-Defekt die molekulargenetische Diagnostik ohne Ergebnis bleibt.

Das Verständnis der genauen Funktionsweise des ersten Komplexes der Atmungskette, seiner Assemblierung sowie seiner Interaktionen mit anderen Proteinen weist noch viele offene Fragen auf, die in den nächsten Jahren noch entschlüsselt werden müssen. Nur hierdurch können neue potentiell krankheitsassoziierte Gene identifiziert werden und damit die Diagnosemöglichkeiten für Betroffene und deren Familien verbessert werden.

### **5.3.4 Kausale Mutationen in nicht-untersuchten Genabschnitten und methodenbedingte Ausfälle**

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass nicht-entdeckte pathogene Mutationen zwar in hier untersuchten Genen liegen, jedoch in nicht-analysierten Genabschnitten. Es wurden ausschließlich kodierende Exons amplifiziert und analysiert. Nicht-kodierende Exons sowie Introns mit Spleißstellen und andere genregulierende Regionen wurden nicht inkludiert.

In der großen Studie von Calvo et al. (2010) wurden hingegen nicht-kodierende Spleißstellen im Intron für die DNA-Analyse mit berücksichtigt. Hierdurch konnten bei drei Patienten (plus bei einem Geschwister eines Patienten) der Erkrankung zugrunde liegende Spleißmutationen aufgedeckt werden. Dies entspricht 27 % der 11 Patienten, bei denen eine krankheitsauslösende Mutation sicher gestellt werden konnte. Ohne diese drei Patienten hätte sich der Anteil an Patienten mit genetischer Diagnose auf nur mehr 13,3 % reduziert (8 von 60 Patienten), womit die Ergebnisse sehr übereinstimmend mit denen der hier vorgelegten Arbeit wären. Bei der Etablierung der Untersuchungsbedingungen neuer Kandidatengene sollten demnach die Sequenzmotive in den Übergangsbereichen zwischen Exons und Intron, die das Spleißen regulieren, mit einbezogen werden und bei der Mutationssuche mit berücksichtigt werden.

Es ist weiterhin anzumerken, dass auch einige kodierende Exons methodenbedingt nicht untersucht werden konnten, da es nicht gelang, passende PCR-Bedingungen zu etablieren. Hier liegende Mutationen konnten durch diese Arbeit nicht detektiert werden. Dies betrifft insgesamt 11 Exons in neun Genen (siehe Tabelle 4.1).

Beispielsweise liegt im Gen *NDUFA10* die Variante E238K bei drei Patienten (#33034, #33255 und #33278; siehe Tabelle 4.4) einfach heterozygot vor. Diese wird von beiden Pathogenitätsvorhersageprogrammen als krankheitsauslösend eingestuft. Zudem handelt es sich bei der substituierten Aminosäure um eine hochkonservierte Position im Protein. Durch den angenommenen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus reicht diese einzelne Mutation jedoch nicht aus, um das Entstehen des Erkrankungsbildes zu erklären. Für das erste Exon von *NDUFA10* gelang es nicht, Konditionen für die PCR-Primer zu etablieren. Möglicherweise liegt jedoch hier eine zweite kombiniert heterozygote Mutation.

Auch ist zu bedenken, dass methodenbedingt in durchaus untersuchten Genabschnitten Varianten nicht gesehen wurden. Denn die Sensitivität der HRMA wird nicht mit 100 % angegeben, sondern mit circa 95 % (Wittwer 2009; Yin et al. 2013). Nach Abschluss dieser Arbeit fanden sich in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe tatsächlich Mutationen in Genabschnitten, die mit den hier angewandten Methoden zwar betrachtet aber die Mutationen dennoch nicht detektiert werden konnten (Next Generation Sequencing (NGS), Haack et al. 2012). Hierauf wird im Kapitel 5.4.1 näher eingegangen.

### **5.3.5 Fehlende experimentelle Validierung der Pathogenität von Mutationen**

Weitergehende Diagnostik zur experimentellen Validierung von Varianten wurde, wie bereits im Kapitel 5.1 erläutert, in dieser Arbeit nicht durchgeführt. So war es auch nicht möglich, den definitiven Nachweis der Kausalität für Mutationen zu führen, sondern es konnten für neue Varianten nur Wahrscheinlichkeiten angegeben werden. Die Einstufung der gefundenen Varianten als vermutlich pathogene Mutationen wurde sehr restriktiv vorgenommen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Dies gilt insbesondere für neue Varianten der mitochondrialen DNA (siehe Tabelle 4.6). Wegen der physiologisch hohen Mutationsrate der mtDNA und der fehlenden Möglichkeit des sicheren Kausalitätsnachweises im Rahmen dieser Arbeit wurden sie grundsätzlich als unklar bewertet. Die rein theoretische Argumentationsweise der angewandten Pathogenitätskriterien erschien hier nicht ausreichend, da hierdurch keinerlei funktionelle Auswirkungen durch die Aminosäurealteration widergegeben werden kann. Auch Pathogenitätsvorhersageprogramme wie PolyPhen und Mutationtaster mit Simulation der

funktionellen Veränderung des betroffenen Proteins standen zum Zeitpunkt der Durchführung des Screens für das mitochondriale Genom noch nicht zur Verfügung.

Im Anschluss an die Mutationssuche sollte noch die Validierung der Pathogenität folgen, um die Diagnostik zu vervollständigen.

Im Nachgang zu dieser Arbeit erbrachten nachfolgende Projekte am Institut anhand funktioneller Zelldiagnostik tatsächlich weitere Hinweise auf die Kausalität einiger hier entdeckter Mutationen (Danhauser et al. 2011; Haack et al. 2012; Haack et al. 2012).

Auch sollte eine Stammbaumanalyse zur Identifizierung weiterer betroffener Angehöriger und eine Sequenzierung der Eltern durchgeführt werden. Hierdurch kann ggf. das Vorliegen jeweils einfach heterozygot vorliegender Varianten bei Vater und Mutter nachgewiesen werden, die im betroffenen Kind kombiniert heterozygot zu finden sind. Dies ist für die weitere Familienplanung bei erneutem Kinderwunsch entscheidend.

Bei mitochondrialen Mutationen sollte die DNA der gesunden Mutter untersucht werden. Ist bei ihr die fragliche Variante ebenfalls vorzufinden, jedoch mit einem wesentlich niedrigeren Heteroplasmiegrad als bei ihrem symptomatischen Kind, erscheint eine Krankheitsentstehung durch diese Veränderung plausibel.

Zudem sollten bei mitochondrialen Mutationen unterschiedliche Gewebe der Betroffenen auf den vorliegenden Heteroplasmiegrad untersucht werden. Ein geringeres Vorhandensein der Mutation im Blut als in erkrankten Geweben wie der Skelettmuskulatur deutet auf den pathogenen Charakter einer Mutation hin.

Zur primären Einschätzung einer Variante eignen sich die hier angewandten Pathogenitätskriterien sehr gut, um potentiell pathogene von neutralen Varianten separieren zu können. Anhand dieser Aufteilung kann dann selektiv in die weitere, aufwendige Diagnostik weniger Varianten investiert werden.

## **5.4 Anwendung der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse zur Mutationssuche und Konsequenzen für nachfolgende Mutationsscreens**

### **5.4.1 Sensitivität der angewandten Methoden**

Die hier angewandten DNA-analytischen Verfahren der HRMA und Sanger-Sequenzierung stellen PCR-basierte Methoden dar. Dabei gilt es zu bedenken, dass die Ergebnisse der HRMA ausgesprochen stark von einer sehr sorgfältigen Optimierung der PCR-Bedingungen abhängen (Wittwer 2009). Die Anwesenheit von unspezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren beeinträchtigt die Qualität der Schmelzpunktanalyse erheblich. Daher lag ein



---

Schwerpunkt dieser Arbeit auf Entwurf und Testen der passenden Oligonukleotidprimer sowie in der Auswahl der Reagenzien für den PCR-Ansatz und der Primeranlagerungs-Temperaturen für die bestmögliche und spezifischste Amplifikation.

Dennoch konnten für 4,7 % der 232 kodierenden Genabschnitte keine optimalen PCR-Bedingungen herausgearbeitet werden.

In der Literatur wird die Sensitivität der Methode der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse mit etwa 95 % angegeben (Wittwer 2009; Yin et al. 2013), die der Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger liegt bei nahezu 100 %.

Zusammen betrachtet, kann man davon ausgehen, dass mit den gewählten Methoden der PCR, HRMA und Sanger-Sequenzierung etwa 90,5 % der tatsächlich vorliegenden Mutationen innerhalb der selektierten DNA-Abschnitte detektiert werden konnten (95 % ige Sensitivität der HRMA-Methode x 95 % etablierte Untersuchungsbedingungen).

Diese rein theoretische Überlegung bezieht sich jedoch nur auf Einzelnukleotidvarianten in hetero- sowie homozygoter Ausprägung und kleinere Insertionen und Deletionen. Größere Deletionen und Insertionen können wie bei allen nicht-quantitativen PCR-basierten DNA-analytischen Verfahren nicht registriert werden (Wittwer 2009).

Nach Abschluss dieser Arbeit wurde bei einigen der hier vorgestellten Patienten das gesamte Exom sequenziert (Next Generation Sequencing (NGS), Haack et al. 2012). Tatsächlich fanden sich dabei Mutationen in Genen, die mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden nicht detektiert worden waren. Es handelt sich um kodierende Mutationen im Gen *NDUFS8*, die durch Komplementation als pathogen gedeutet wurden (#33027 homozygot und #33284 compound heterozygot). Zusätzlich fanden sich in *NDUFS7* zwei weitere heterozygote Varianten im Patienten #33027, die sich jedoch als nicht krankheitsrelevant herausstellten. Beim Patienten #33284 wurde interessanterweise im hier vorgestellten Mutationsscreen im Exon 4 des Gens *NDUFS8* die erste heterozygote Variante gefunden (p.A159D, siehe Tabelle 4.4), die zweite Variante im selben Exon jedoch nicht. Und beim Patienten #33027 wurde keine der mittels Exomsequenzierung detektierten Mutationen gefunden - obwohl die Etablierung der PCR- und HRMA-Bedingungen für alle Genabschnitte gelungen war.

In selbst durchgeführten Experimenten zur Sensitivitätskontrolle wurden sieben Proben mit bekannten kombiniert heterozygoten Mutationen der Schmelzpunktanalyse unterzogen. 12 der 14 Mutationen (86 %) konnten korrekt identifiziert werden. Hierdurch konnten systematische Fehler ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse unterstreichen jedoch auch die nicht 100 %ige Sensitivität der Methode.

## **5.4.2 Praktische Anwendung der HRMA und Konsequenzen für nachfolgende Mutationsscreens**

Da es sich um den ersten groß angelegten HRMA-Mutationsscreen am Institut für Humangenetik handelte, wurden, um keine Varianten zu übersehen, einige Arbeitsschritte sehr ausführlich durchgeführt. Dies betrifft beispielsweise die Anzahl der sequenzierten Proben nach Schmelzpunktanalyse. Diese Vorgehensweisen konnten mit zunehmenden Erfahrungswerten durch diese Arbeit für nachfolgende Projekte verlassen werden und damit der Arbeits- und Kostenaufwand im Vergleich zu diesem ersten Screen nochmals deutlich reduziert werden.

### **5.4.2.1 Anzahl an sequenzierten Proben**

Um möglichst keine Variante zu übersehen, wurden anfangs auch Proben sequenziert, deren Schmelzkurve nur leicht vom vermuteten Wildtyp abwichen. Damit sollte die potentielle Sensitivität der Schmelzkurvenanalyse verbessert werden. Eine Verschlechterung der Spezifität mit folglich vielen falsch-positiv auffälligen Schmelzkurven wurde hierfür in Kauf genommen. Zusätzlich wurden in jedem Genabschnitt drei der vermuteten Wildtypen ebenfalls sequenziert. Bei großen Gruppen, deren Schmelzdifferenzkurven auf eine häufige, nicht-pathogene Variante hindeuteten, wurden auch mindestens drei Proben sequenziert mit dem Ziel der Genotypisierung dieser Variante. Bei Nachweis einer bisher nicht annotierten kodierenden Variante wurden alle restlichen Proben dieser Gruppe ebenfalls sequenziert.

In späteren Projekten der Arbeitsgruppe wurde auf diese zusätzlichen Sequenzierungen verzichtet. Die aus dieser Arbeit gewonnenen spezifischen Schmelzdifferenzkurven aller sequenzierten Varianten und des Wildtyps dienen jedoch weiter als Positivkontrollen (Genotypisierung) auch nicht relevanter Varianten und helfen nachfolgende Sequenzierungen zu vermeiden.

### **5.4.2.2 Heteroduplexformation durch Beimischen von Wildtyp-DNA**

Für die Hochauflösende Schmelzpunktanalyse wurden alle Proben als Quadruplikate geführt - zweifach in reiner Form und zweifach gemischt mit Wildtyp-DNA. Dieses Verfahren dient der Bildung von Heteroduplices beim Vorliegen homozygoter Mutationen und soll die Sensitivität der Methode der HRMA verbessern (Wittwer 2009), da diese auf der Detektion eben solcher Heteroduplices basiert (Details hierzu siehe Abschnitt 1.2.2).

Die visuelle Analyse der Schmelzdifferenzkurven aller 221 erfolgreich etablierten Genabschnitte wurde retrospektiv nach Abschluss der Auswertung der Sequenzdaten

wiederholt. Dabei wurden speziell die Schmelzkurven der Proben mit identifizierten homozygoten Varianten (kodierende und synonyme Varianten) betrachtet und dabei die Kurvenverläufe der reinen Patienten-DNA mit der Mischung mit Wildtyp-DNA verglichen. Es zeigte sich, dass lediglich bei drei Proben die Schmelzkurven nur nach Zusatz von Wildtyp-DNA von der Normgruppe abwichen, ohne Zusatz jedoch unauffällig waren. Ohne Kontroll-DNA-Zusatz wären sie demnach nicht selektiv sequenziert und die DNA-Alteration nicht detektiert worden. Alle drei Varianten waren jedoch synonyme Basenaustausche und somit klinisch nicht relevant.

Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass alle anderen gefundenen homozygoten Varianten bereits in ihrer Homoduplex-Form auffällige Schmelzkurven präsentierten. Das Zumischen von Kontroll-DNA verstärkte lediglich die Abweichung von den Normalschmelzkurven.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur bisherigen Anwendungsweise der HRMA (Wittwer 2009 Review; Erali and Wittwer 2010; Er and Chang 2012). Durch den Verzicht auf die Beimengung von Wildtyp-DNA wird zwar eine eventuell geringgradige Minderung der Sensitivität der HRMA in Kauf genommen. Dem muss jedoch die enorme Arbeits- und Kostenersparnis gegenüber gestellt werden, die durch Führung der Patientenproben als Duplikate anstatt als Quadruplikate erzielt werden kann. In solch groß angelegten Untersuchungen kommt die Methode der HRMA gerade wegen ihrer geringen Kosten und der Einfachheit und Schnelligkeit in ihrer Anwendung zum Einsatz.

Die Beigabe von WT-DNA brachte in diesem Screen keinen Vorteil bei der Detektion von kodierenden homozygoten Varianten. Als Konsequenz der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bei der Planung folgender Screens am Institut keine Wildtyp-DNA mehr beigemischt und die Proben wurden nur mehr als Duplikate geführt.

#### **5.4.2.3 Sequenzieren des gesamten Genes bei Vorliegen einer einzelnen heterozygoten Mutation**

Bei Proben mit einzelnen heterozygoten Varianten wurden im Anschluss an die Schmelzpunktanalyse alle restlichen Exons des betreffenden Gens ebenfalls sequenziert - unabhängig von der Form der Schmelzkurven. Dies wurde durch den angenommenen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus begründet, der einzelne Varianten als wenig pathogen erscheinen ließ. Es sollte vermieden werden, die eventuell vorliegende zweite Mutation im Gen durch die etwaige mangelnde Sensitivität der HRMA zu übersehen. In keiner der Proben konnte durch die Sanger-Sequenzierung jedoch eine weitere Mutation gefunden werden, wodurch sich eine kombinierte Heterozygotie ergeben hätte.

Gleichzeitig konnten damit die Ergebnisse und die hohe Sensitivität der zuvor durchgeführten HRMA bestätigt werden. Diese hatte in den restlichen Exons primär unauffällige Kurvenverläufe geliefert, daher waren diese Abschnitte zunächst auch nicht sequenziert worden. Das Direkt-Sequenzieren erbrachte in keinem Fall ein diskrepantes Ergebnis gegenüber der HRMA. Daher wurde bei folgenden Screens auf dieses Vorgehen verzichtet.

### **5.4.2.4 Gleichzeitige Analyse genomweit amplifizierter und genomischer DNA**

Am IHG des Helmholtz Zentrum Münchens waren vor dieser Arbeit noch keine hochauflösenden Schmelzpunktanalysen mit genomweit amplifizierten DNA-Proben durchgeführt worden.

Daher wurde vor Beginn des Screens genomische und genomweit amplifizierte DNA mehrerer Patienten parallel einer HRMA unterzogen. Dabei wurde festgestellt, dass die HRMA-Schmelztemperaturen und -kurven der genomweit amplifizierten Proben denen genomischer DNA des jeweils selben Patienten exakt entsprechen. Es ergaben sich keine Abweichungen im Schmelzverhalten.

Hierdurch wurde sichergestellt, dass die parallelisierte Analyse amplifizierter und nicht-amplifizierter Proben nicht zu einer Sensitivitätsreduktion der HRMA führen würde.

Als Konsequenz können auch Proben von Patienten in HRMA-Screens eingeschlossen werden, bei denen kaum DNA-Material zur Verfügung steht. Dies ist insbesondere bei bereits (seit längerem) verstorbenen Patienten relevant. Besteht in betroffenen Familien z.B. ein erneuter Kinderwunsch, kann die molekulargenetische Diagnostik des verstorbenen Kindes neu aufgenommen werden. An den Ergebnissen kann sich im Anschluss die genetische Beratung der Eltern richten (Gendiagnostik bei den Eltern / pränatale Genotypisierung des Feten bei bereits neu eingetretener Schwangerschaft).

### **5.4.3 Anwendungsmöglichkeiten der HRMA in Zeiten des Next Generation Sequencing**

Diese Arbeit muss sich der Tatsache stellen, dass die Möglichkeiten der Sequenzierung von DNA mittlerweile durch Einführung und sogar Weiterentwicklung des Next Generation Sequencing (NGS) radikal erweitert wurden. NGS bezeichnet hierbei sämtliche Methoden der parallelisierten, nicht Sanger-basierten Hochdurchsatz-Sequenzierung.

Mit diesen neueren Techniken ist es mittlerweile möglich, Millionen von DNA-Strängen parallel zu analysieren und ganze Exome oder Genome zu entschlüsseln. Durch den rapiden technologischen Fortschritt eröffnen sich bei der Diagnostik von Erkrankungen mit heterogener Genetik und damit hoher Anzahl an Kandidatengenomen neue Möglichkeiten.

Gleiches gilt für genetisch multifaktoriell ausgelöste Krankheitsbilder, insbesondere wenn unbekannte Gene in der Vergangenheit noch nicht in den Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen gebracht werden konnten und dennoch in großer Zahl untersucht werden sollen.

Die HRMA stellt also mittlerweile bei Weitem nicht mehr die schnellste, am Markt verfügbare Screeningmethode zur Detektion unbekannter Varianten in Kandidatengen dar. Der vergleichsweise hohe Durchsatz im Verhältnis zu älteren Präscreening-Methoden wie der DHPLC (siehe Kapitel 1.2.2) wird durch die Revolutionierung der Mutationsanalyse durch das NGS relativiert.

Dennoch bietet das Verfahren der Hochauflösenden Schmelzpunktanalyse – auch heute noch – zahlreiche Vorteile gegenüber den NGS-Methoden, so dass es für einige Anwendungsgebiete weiterhin die Methode der Wahl bleiben dürfte.

Dies betrifft zum einen Untersuchungen von DNA-Material mit dem Ziel der Genotypisierung einzelner Varianten mit hohem Vorkommen. Hier sei als Beispiel die Zystische Fibrose mit häufigen Mutationshotspots im Gen CFTR (u.a. die Mutation F508del) genannt.

Aber auch im Bereich der Mitochondriopathien finden sich bzgl. der Genotypisierung von Hotspot-Mutationen Anwendungsbeispiele, etwa bei den klassischen Mitochondrialen Syndromen. Denn hier kann die Diagnose meist direkt aus einer selektiven molekulargenetischen Untersuchung des mitochondrialen Genoms gestellt werden (Sperl et al. 2009). Beim LHON-Syndrom reduziert sich die primär zu wählende genetische Diagnostik auf drei Punktmutationen in den mtDNA kodierten Komplex-I-Strukturgenen ND1, ND4 oder ND6, in denen bei über 95 % Prozent der Erkrankten eine pathogene Mutation nachgewiesen werden kann (3460G>A, p.A52T in ND1, 11778G>A, p.R340H in ND4 und 14484T>C, p.M64V in ND6; Riordan-Eva and Harding 1995). Bei Vorliegen der klinischen Verdachtsdiagnose LHON macht es daher Sinn, zunächst nur selektiv diese drei Loci genetisch zu untersuchen.

Voraussetzung für die Genotypisierung von Varianten ist selbstverständlich die Etablierung der PCR- und HRMA-Bedingungen vor Beginn der Diagnostik sowie die Kenntnis über Wildtyp- und Mutanten-Kurvenverläufe als Positivkontrollen. Für die oben genannten Beispiele mit eindeutiger Klinik stellt die Analyse der wenigen Genabschnitte bzw. sogar nur eines einzelnen Exons einen viel geringeren Aufwand in zeitlicher als auch finanzieller Hinsicht dar als mit neueren Methoden das gesamte Genom zu sequenzieren.

Zusätzlich zur gerade genannten Anwendung der HRMA zur Genotypisierung einzelner bekannter Mutationen, könnte die Schmelzpunktanalyse auch weiterhin für die

umfangreichere Diagnostik der Mitochondriopathien durch Komplex-I-Mangel im Allgemeinen attraktiv bleiben, nachdem die Untersuchungsbedingungen zumindest für die Strukturuntereinheiten des Komplex I und drei der Assemblierungsfaktoren durch diese Arbeit nun etabliert wurden und auf Anfrage verfügbar sind. Wird bedacht, dass in den routinemäßig untersuchten Genen bei immerhin etwa der Hälfte der Patienten krankheitsdefinierende Mutationen zu erwarten sind (Zeviani and Di Donato 2004, Swalwell et al. 2011; Calvo et al. 2010), ist die Durchführung eines Mutationsscreens mittels HRMA als erste diagnostische Maßnahme mit einer hohen Ausbeute viel versprechend. Die Anzahl der in dieser Arbeit definierten Kandidatengene überschreitet sogar bei weitem die Routinediagnostik, die von Institut zu Institut uneinheitlich ist und von einigen bekannten nukleären oder mitochondrialen Genen bis zur alleinigen Untersuchung des mitochondrialen Genoms reicht (siehe Abschnitt 4.1.1). Zudem bietet diese Arbeit durch das erfolgreiche Detektieren einer Vielzahl von pathogenen Mutationen mit ihren spezifischen HRMA-Schmelzkurvenverläufen zusätzlich Positivkontrollen zum Zwecke der Genotypisierung.

Es ist also festzuhalten, dass das Next Generation Sequencing und seine Weiterentwicklungen mittlerweile die moderneren und unvergleichbar durchsatzstärkeren Methoden zur Mutationsanalyse darstellen. Die Hochauflösende Schmelzpunktanalyse wird aber für oben genannte Einsatzgebiete als „Schwellentechnologie“ von Bedeutung bleiben, da der Zeit- und Kostenaufwand bei NGS-Anwendungen sehr hoch ist.

Die aus Exom-/Genomsequenzierungen resultierenden Datenmengen stellen eine große Herausforderung im Bereich der Bioinformatik dar (Er et al. 2012) und bedürfen einer eigenen Infrastruktur in Laboren. Dies ist für kleinere, vor allem nicht-universitäre Einrichtungen sowie humangenetische Praxen mit begrenzten finanziellen Ressourcen nicht zu erfüllen. Zudem endet die Diagnostik nicht mit der Identifikation zahlreicher Sequenzvariationen im gesamten Exom/Genom, denn diese sind zum allergrößten Teil nicht krankheitsrelevant. Im Anschluss an die Datenauswertung müssen die Varianten in einen korrekten Zusammenhang zur Entstehung der jeweiligen Erkrankung gebracht werden. Dies erfordert weitergehende kosten- und zeitintensive Diagnostik, z.B. in Form funktioneller Experimente (siehe Abschnitt 5.1). Im Gegensatz zum Next Generation Sequencing sind die Anschaffungskosten für Gerät und Reagenzien der HRMA unvergleichbar günstiger (Er et al. 2012) oder liegen als bereits getätigte Investitionen in den letzten Jahren bereits vor. Das Verfahren der Schmelzpunktanalyse ist bei begrenzter Anzahl an zu betrachtenden Genen eine schnelle, methodisch einfache und günstige Methode und ermöglicht damit eine zügige Mutationsdiagnostik.

## 6 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der molekulargenetischen Diagnostik von mitochondrialen Atmungskettendefekten. Die fünf Proteinkomplexe der Atmungskette stellen die gemeinsame Endstrecke des aeroben Abbaus von Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren dar und sind daher für den Energiehaushalt der Zelle und der Organe von herausragender Bedeutung. Mitochondriopathien, wie die Erkrankungen, die aus der Fehlfunktion der Atmungskette resultieren, genannt werden, zählen mit einer Prävalenz von 1:5.000 Lebendgeborenen zu den häufigsten hereditären Stoffwechselerkrankungen beim Menschen (Zeviani and Di Donato 2004). Dennoch werden sie wegen ihres stark heterogenen klinischen Bildes häufig nicht oder falsch diagnostiziert. Die genetische Diagnostik bleibt bei vielen Betroffenen ohne Ergebnis, da eine sehr große Zahl an Genen als Träger der krankheitsauslösenden Mutation in Betracht gezogen werden muss und die meisten dieser geschätzt 1.500 potentiellen Kandidatengene noch nicht identifiziert worden sind (Haas et al. 2008). Die weitere Mutationssuche in bekannten wie auch bisher unbekanntem Genen ist erforderlich mit dem Ziel, betroffenen Patienten und deren Angehörigen eine exakte genetische Diagnose bieten zu können.

In dieser Arbeit wurde ein Hochdurchsatz-Mutationsscreen bei einem Kollektiv von 88 Patienten mit isoliertem Defekt des ersten Komplexes der Atmungskette etabliert. Ziel war es, bekannte sowie unbekannte genetische Varianten zu detektieren, die die Krankheitsentstehung bei den betroffenen Patienten erklären können. Bei allen eingeschlossenen Patienten war der Enzymdefekt im Vorfeld bereits auswärtig biochemisch gesichert worden und die bis dahin stattgehabte genetische Routinediagnostik ergebnislos geblieben.

Bei den analysierten Genen handelt es sich um alle 45 Strukturuntereinheiten des Komplex I sowie seiner Assemblierungsfaktoren NDUFAF1, NDUFAF2 und ECSIT. Zur Mutationsanalyse kamen die Untersuchungsmethoden der Polymerasekettenreaktion, der neuartigen hochauflösenden Schmelzpunktanalyse (HRMA, High Resolution Melting Analysis) und der Sequenzierung nach Sanger zur Anwendung.

Bei der HRMA handelt es sich um ein sogenanntes Präscreeningverfahren, das der Sequenzierung vorangestellt wird. Die Technik der HRMA registriert Nukleotidvariationen beim Denaturieren von doppelsträngigen DNA-Fragmenten auf der Basis von Unterschieden in der Form der Schmelzkurven. Diese entstehen durch die spezifischen Schmelzeigenschaften von Sequenzvariationen im Gegensatz zur Wildtypsequenz. Die

HRMA ist ein PCR-basiertes Verfahren, das heißt, die Präscreeningmethode wird an bereits mittels PCR spezifisch amplifizierten DNA-Fragmenten angewandt.

Für die exakte Position der Variante und die Basensequenz müssen im Anschluss lediglich die Proben mit auffälligem Schmelzverhalten selektiv sequenziert werden. Damit kann der Probendurchsatz im Vergleich zur Direktsequenzierung aller Proben massiv gesteigert werden.

Für diese Arbeit wurden insgesamt 48 Gene, unterteilt in 232 Amplifikate, untersucht. In der Summe wurden 77.440 PCR- und Schmelzkurvenanalysen durchgeführt.

Im Ergebnis konnten für 95 Prozent der zu betrachtenden Genabschnitte Untersuchungsbedingungen für die angewandten Methoden etabliert werden (221 von 232 Amplifikaten), für 5 Prozent konnten keine Analysebedingungen erstellt werden (11 Amplifikate), was zum Ausschluss dieser Genabschnitte aus dem Mutationsscreen führte. Hiervon sind neun der 48 Gene betroffen. In diesen konnten ein oder in zwei Fällen zwei Exons mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht auf Mutationen hin untersucht werden.

In den untersuchten 48 Genen konnten insgesamt 59 kodierende Varianten gefunden werden. Diese wurden anhand von definierten Argumentationskriterien auf ihre potentielle Pathogenität hin untersucht und eingeteilt. Als Ergebnis der Pathogenitätsprüfung konnten bei zwölf Patienten bekannte pathogene bzw. bisher unbekannte sehr wahrscheinlich pathogene Mutationen identifiziert werden (entspricht 14 Prozent) und deren genetische Diagnostik damit erfolgreich abgeschlossen werden. Bei drei dieser Patienten wurden neue, bisher nicht publizierte nukleäre Mutationen entdeckt, u.a. eine homozygote Stop-Mutation im Assemblierungsfaktor NDUFAF1 (c.9G>A, p.W3X).

Bei weiteren 25 Patienten wurden die Sequenzvariationen als seltene Varianten unklarer Kausalität (28,7 Prozent) interpretiert. In den restlichen 51 Proben (58 Prozent) konnten neben häufigen benignen Polymorphismen und stillen Mutationen keine Varianten mit klinischer Relevanz erfasst werden.

Die molekulargenetische Diagnostik für Patienten mit isoliertem Komplex-I-Defekt inkl. der Pränataldiagnostik konnte durch diese Arbeit erweitert werden. Durch die Etablierung des Mutationsscreens wurde die genetische Analyse der Strukturgene des Komplex I und der drei Assemblierungsfaktoren NDUFAF1, NDUFAF2 und ECSIT mittels der PCR-gestützten Verfahren HRMA und Sequenzierung ermöglicht. Die Untersuchungsergebnisse hatten damit unmittelbare Konsequenzen für die molekulargenetische Diagnostik von Mitochondriopathien.



# Anhang

Tabelle A 1 Klinische und biochemische Manifestation der Mitochondriopathien.  
Modifiziert nach Zeviani and Di Donato (2004).

<b>Neurologische Manifestation</b>	<b>Extraneurologische Manifestation</b>
<b>ZNS</b>	<b>Kardiovaskulär</b>
zerebrale Krampfanfälle	dilatative/hypertrophe Kardiomyopathie
Apoplex	Erregungsleitungsstörungen
Demenz	<b>Endokrinologisch</b>
Kopfschmerzen	Diabetes
Myelopathie	exokrine Pankreasinsuffizienz
Mikrozephalie	Hypoparathyreoidismus
Ataxie	Hypothyreoidismus
Dystonie	<b>Hämatologisch</b>
Parkinson-Syndrom	Panzytopenie
Anders nicht zu erklärendes Koma	Sideroblastische Anämie
psychomotorische Retardierung	<b>Gastrointestinal</b>
Verlernen bereits erworbener Fähigkeiten	akutes/chronisches Leberversagen
<b>Sensorisch</b>	Pseudo-Obstruktion
Blindheit	<b>Renal</b>
Optikusneuropathie	Niereninsuffizienz
Retinitis pigmentosa	renale tubuläre Azidose
Katarakt	<b>Metabolisch</b>
sensorineurale Schwerhörigkeit	Laktat im Serum erhöht / Laktatazidose
Nystagmus	Laktat im Liquor erhöht
<b>Neuromuskulär</b>	Übelkeit und Erbrechen
Ophtalmoplegie	
Myopathie	
Belastungsintoleranz	
periphere sensomotorische Neuropathie	
Myoklonien	<b>Muskelbiopsie</b>
muskuläre Hypo-/Hypertonie	ragged red fibers/RRF's (mikroskopischer Nachweis von sich subsarkolemmal ansammelnder abnormer Mitochondrien)

Tabelle A 2 Übersicht über Kandidatengene, in denen bisher kausale Mutationen bei Patienten mit isoliertem Komplex-I-Defekt nachgewiesen werden konnten.

<b>Gene</b>	<b>Referenzen</b>
<b>mitochondrial kodierte Strukturuntereinheiten des Komplex I</b>	
ND1	Huoponen et al. (1991)
ND2	Schwartz and Vissing (2002)
ND3	Taylor et al. (2001)
ND4	Wallace et al. (1988)
ND4L	Brown et al. (1995), Mitchell et al. (2006)
ND5	Taylor et al. (2002)
ND6	Johns et al. (1992)
<b>nukleär kodierte Strukturuntereinheiten des Komplex I</b>	
NDUFA1	Fernandez-Moreira et al. (2007)
NDUFA2	Hoefs et al. (2008)
NDUFA10	Hoefs et al. (2011)
NDUFA11	Berger et al. (2008)
NDUFA12	Ostergaard et al. (2011)
NDUFB9	Haack et al. (2012)
NDUFS1	Benit et al. (2001)
NDUFS2	Loeffen et al. (2001)
NDUFS3	Benit et al. (2004)
NDUFS4	van den Heuvel et al. (1998)
NDUFS6	Kirby et al. (2004)
NDUFS7	Triepels et al. (1999)
NDUFS8	Loeffen et al. (1998)
NDUFV1	Schuelke et al. (1999)
NDUFV2	Benit et al. (2003)
<b>Assemblierungsfaktoren und andere Proteine</b>	
NDUFAF1	Dunning et al. (2007)
NDUFAF2	Ogilvie et al. (2005)
NDUFAF3	Saada et al. (2009)
NDUFAF4	Saada et al. (2008)
C20orf7	Sugiana et al. (2008) Gerards et al. (2009)
C8orf38	Pagliarini et al. (2008)
NUBPL	Calvo et al. (2010)
FOXRED1	Calvo et al. (2010) Fassone et al. (2010)
ACAD9	Haack et al. (2010)
ECSIT	Vogel et al. (2007)
XPNPEP3	O'Toole et al. (2010)

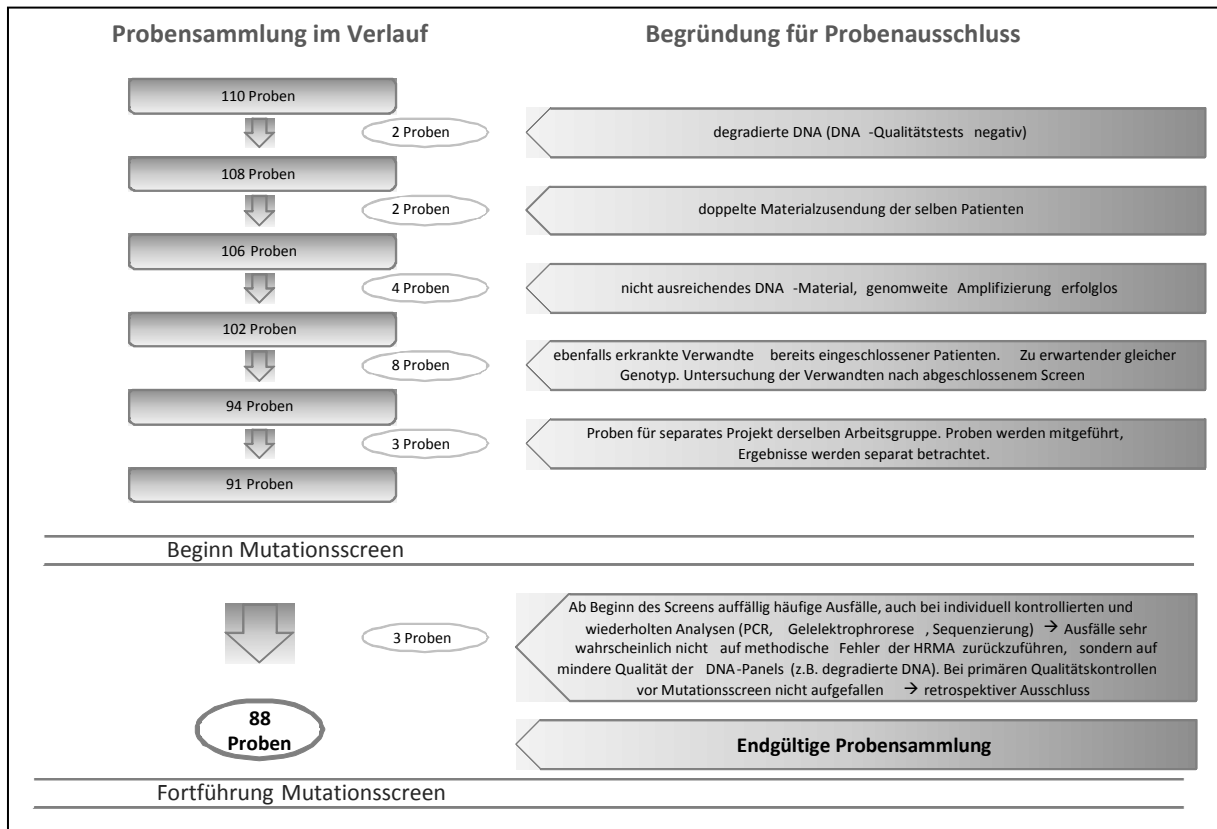


Abbildung A 1 Ausschluss von Patientenproben aus der Probensammlung.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	32998	33000	33001	(33002)*	33003	33004	33005	33006	33007	33008	33009	33014	A
B	33035	Neg.	33036	33332	33041	33255	33256	33324	33325	33326	33328	33331	B
C	33333	33334	33336	33338	33339	33340	33341	33343	33344	33346	33345	(33342)*	C
D	33354	33355	33356	33358	33348	33278	33281	33456	33457	33458	33459	33462	D
E	33464	33465	33545	fremd	fremd	fremd	33461	33015	33017	33018	33020	33023	E
F	33024	33027	33029	33030	33031	33032	33033	33253	32999	33010	33011	33013	F
G	33016	33021	33025	33026	33028	(33040)*	33267	33269	33277	33279	Neg.	33280	G
H	33282	33283	33284	33022	33034	33460	33488	33329	33327	33330	33353	33359	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abbildung A 2 Anordnung der Patientenproben auf einer 96-Well-Platte.

Alle Proben liegen einfach vor. Neg. = Negativkontrolle/Leerfeld, fremd = drei Proben aus fremden Projekt, \* = retrospektiv ausgeschlossene Proben.  
dunkel-blau hinterlegte Felder = nicht genomweit amplifizierte Proben; hell-blau hinterlegte Felder = genomweit amplifizierte Proben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
A	32998		33000		33001		(33002)*		33003		33004		33005		33006		33007		33008		33009		33014		A	
B																										B
C	33035		Neg.		33036		33332		33041		33255		33256		33324		33325		33326		33328		33331		C	
D																										D
E	33333		33334		33336		33338		33339		33340		33341		33343		33344		33346		33345		(33342)*		E	
F																										F
G	33354		33355		33356		33358		33348		33278		33281		33456		33457		33458		33459		33462		G	
H																										H
I	33464		33465		33545		fremd		fremd		fremd		33461		33015		33017		33018		33020		33023		I	
J																										J
K	33024		33027		33029		33030		33031		33032		33033		33253		32999		33010		33011		33013		K	
L																										L
M	33016		33021		33025		33026		33028		(33040)*		33267		33269		33277		33279		Neg.		33280		M	
N																										N
O	33282		33283		33284		33022		33034		33460		33488		33329		33327		33330		33353		33359		O	
P																										P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		

Abbildung A 3 Anordnung der Patientenproben auf einer 384-Well-Platte.

Alle Proben liegen als Quadruplikate vor. Gelb hinterlegte Felder = reine Patienten-DNA, hier dunkel-gelb hinterlegte Felder = nicht genomweit amplifizierte Proben; hell-gelb hinterlegte Felder = genomweit amplifizierte Proben; grün hinterlegte Felder = Probe in der darüber gelegenen Reihe + WT-Kontroll-DNA. Beispiel: in A1 und A2 befindet sich die Probe 32998, in B1 und B2 die Probe 32998 + WT-Kontroll-DNA. Neg. = Negativkontrolle, fremd = drei Proben aus fremden Projekt, \* = retrospektiv ausgeschlossene Proben.

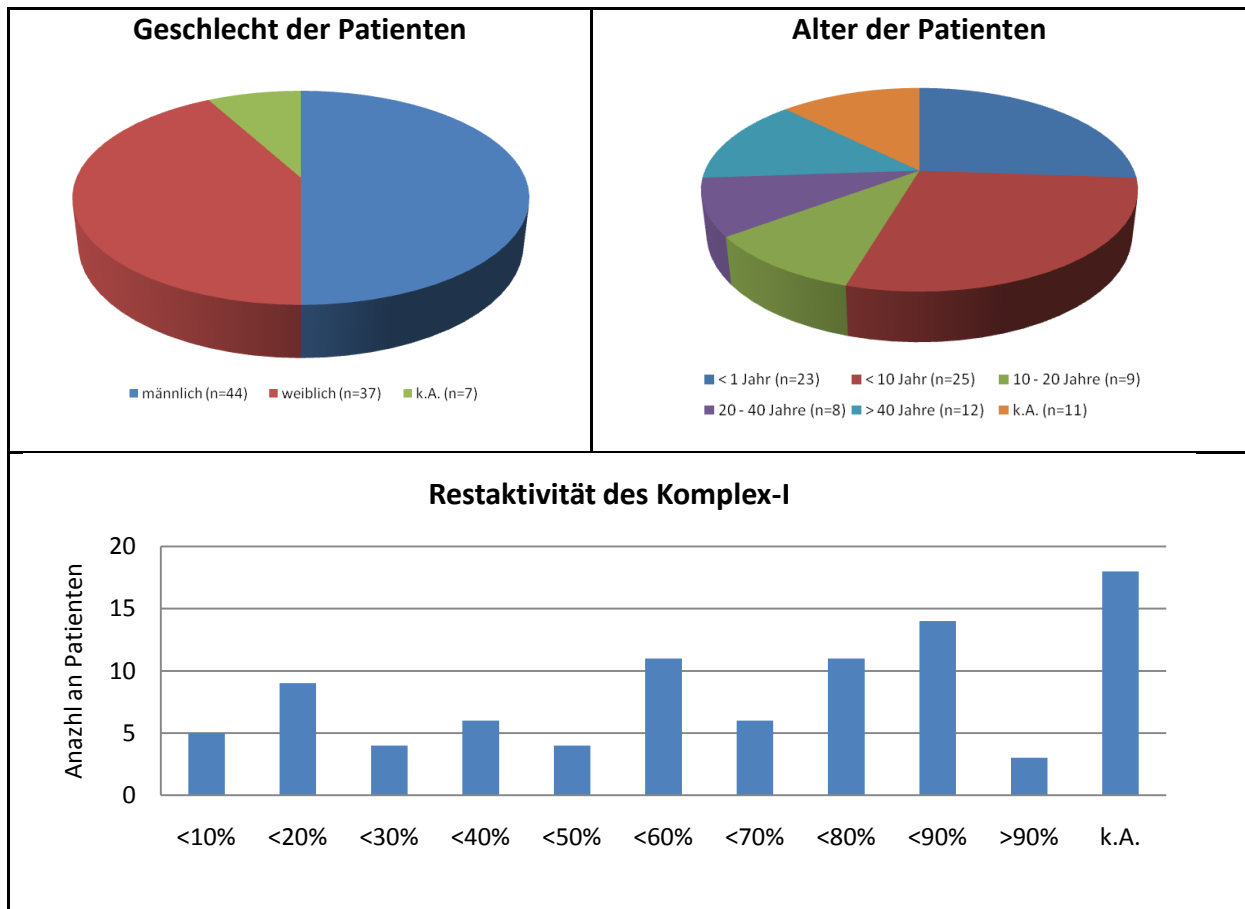


Abbildung A 4 Klinische und biochemische Daten zum Patientenkollektiv.

Oben: Angaben zum Geschlecht (links) und zum Alter der Patienten (rechts)

Unten: biochemisch gemessene Restaktivität des Komplex-I bei den untersuchten Patienten.

Dargestellt ist die auf die Citratsynthase derselben Probe normierte Aktivität des Komplex I im Verhältnis zum niedrigsten Normal-Referenzwert des zusendenden Instituts (in Prozent). Die Messungen wurden von den Zusendern vorgenommen.

k.A. = keine Angaben

## Anhang

Tabelle A 3 Etablierte PCR-Bedingungen für alle untersuchten Gene.

(1) = Nummerierung nach der internen Primerdatenbank des IHG, (2) = angewandter PCR-Ansatz, A = Standard PCR-Ansatz, B-D = vom Standard abweichende PCR Protokolle (siehe Abschnitt 3.6.2, 3.6.3), (3) = Primeranlagerungstemperatur im PCR-Zyklus (Schritt 3)

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFA1_1	9531	A	65	172	5' - GTTTTGGCCTAGGTAACGGG - 3'	5' - GAAATCAGCCCGTGGAGTC - 3'
NDUFA1_2	9532	A	65	234	5' - CCATTTCTCTGGAATGTCCC - 3'	5' - AGCACTGTATGACCCTTGGC - 3'
NDUFA1_3	9533	A	65	142	5' - TTGATGGGAACAGACTTGTAC - 3'	5' - TTCTAGCAGGGGTAGATGGC - 3'
NDUFA2_1	9949	B	63	208	5' - AAGACCTGGAATTGGCGAC - 3'	5' - TCAACTTCAGGGAGGTTCGAG - 3'
NDUFA2_2	15523	A	65	239	5' - GACCTCCCTGAAGTTGAGGGAAGC - 3'	5' - GGTCCCTTCTCTTCTCAAACCCTTGT - 3'
NDUFA2_3	9497	A	65	170	5' - TCCAGGGTGCAGAATAGTTAAAG - 3'	5' - TGGGGCTGTTGCTCTTAATC - 3'
NDUFA3_1	12285	A	65	112	5' - GGACCACAACCTCCAGG - 3'	5' - CAGAACTACCCGAGCCC - 3'
NDUFA3_2	10071	A	65	146	5' - CAGCTACTTGCAGGGGTGAC - 3'	5' - ATGCAAGTTTGCGCCTG - 3'
NDUFA3_3	9535	A	68	150	5' - GCCTCACCCCTGTGTCTC - 3'	5' - AGGGAGGCTGGGCCTATTC - 3'
NDUFA3_4	9536	D	65	167	5' - GTCTCAGTGGCCACCTC - 3'	5' - TTTTATTGGGAGCCGTGG - 3'
NDUFA4_1	9584	A	68	135	5' - TTTTAGCTTAGGGCCTGGTG - 3'	5' - ACATTAGGAGAGCGGTCACG - 3'
NDUFA4_2	9585	A	63	205	5' - TCGTTGGCCAGTGTTTAAG - 3'	5' - GTGGCTCCTAAACTGCCTTG - 3'
NDUFA4_3	9586	A	63	350	5' - TCTTGTGATAGGGATTCTGTGTTTC - 3'	5' - GTTTCAGAAAACCCACCCC - 3'
NDUFA4_4	9587	A	63	308	5' - CATTGAAGGCTGGAATTTTAGG - 3'	5' - GAAAATTGTGCGGATGTGG - 3'
NDUFA5_1	9951	D	65	98	5' - TGAGAATTGTTCCCAAAGGG - 3'	5' - TTCCAACAGTGACCTCCATTC - 3'
NDUFA5_2	9952	D	65	124	5' - CCGTAGTAAACAGCATGAATCG - 3'	5' - TTGGGAATTCAAGAACGAAG - 3'
NDUFA5_3	9518	A	65	297	5' - CAAGTGTTCCATTAAGTCTTTGG - 3'	5' - GAGCATTCAAGGAAGGAGAATAG - 3'
NDUFA5_4	9519	A	65	314	5' - GACAGAAAAGCAATGAAATAGCAG - 3'	5' - TCATTCTAGAACGTCAGTTGTGTG - 3'
NDUFA5_5	9520	D	63	323	5' - TCAACATTTGATGGTGAATAG - 3'	5' - AAAATGTCAGTAATAAGAACACGCTC - 3'

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFA6_1	9537	B	63	297	5' - CTCAGAGTCATCCTCCCGC - 3'	5' - CCCACGTAAGCCGCTACC - 3'
NDUFA6_2	9538	B	63	239	5' - GAATGGGCGACCTGTATGTG - 3'	5' - TTTAAATTGGTCAGGGAGGG - 3'
NDUFA6_3	9539	A	65	198	5' - TGACAACCTTTGACTGATGACCTC - 3'	5' - CAACGTGCATCTTTCCACTG - 3'
NDUFA7_1	9521	A	68	109	5' - GCTGCGCCCTTCAGTATC - 3'	5' - CATGGTGCAGCCCTGTC - 3'
NDUFA7_2	9522	A	68	129	5' - CTTGCAGGCCGACCTCTC - 3'	5' - AAAGGACAGAGCCAGAGGC - 3'
NDUFA7_3	9523	A	65	226	5' - CAGTGACTGTCTCTTTGCTTCAG - 3'	5' - GGCTGTGGTGAGCAGCG - 3'
NDUFA7_4	9524	A	65	158	5' - CCCTCACTGAAGTCTTTCCC - 3'	5' - AAGGAGGCAAAGTAGTCGGG - 3'
NDUFA8_1	9540	A	65	124	5' - GGCTGAGGGCTTCTCGTC - 3'	5' - ATGTCTCCCTTGCTGTCC - 3'
NDUFA8_2	9541	A	65	237	5' - AGTCTGTGGCCTTTGTCCC - 3'	5' - GCTTCAACCAAGTAGGCACTG - 3'
NDUFA8_3	9542	A	65	326	5' - CAAGGCTATGTATTTGAGATCTGTACC - 3'	5' - ACCTCCTGCCTTTATCCCAC - 3'
NDUFA8_4	9543	A	65	208	5' - TTTCAACTTTGCTTTTGCCC - 3'	5' - AGCACATGACCGAGTGTGG - 3'
NDUFA9_1	9560	A	63	160	5' - CTTAGCAGCCGTAGTCAGCC - 3'	5' - AACCTTAAATCCCCGTCTCG - 3'
NDUFA9_2	9561	A	65	236	5' - GCCATGCTTGTATACTTTGGG - 3'	5' - TGGAGCATATGAACTTAAGGAAC - 3'
NDUFA9_3	15527	A	65	237	5' - ATATCCACATTATGTTAATGTTGATCCTTT - 3'	5' - TTACTGCTTTATTATACTGCCTATCACTCC - 3'
NDUFA9_4	9563	A	65	169	5' - TCATCCGATTGCTTTCTGC - 3'	5' - AAACCCTAAGAAAGACTTAAGCAAAG - 3'
NDUFA9_5	9564	A	63	251	5' - GCTTTGAGATCCTGTGTGG - 3'	5' - CCCAAGAACTCTGGCTCTG - 3'
NDUFA9_6	9565	A	63	247	5' - TCATGTCTTAATAGTGAAAGAATGG - 3'	5' - TTGAGCAGCTTCAACTTGG - 3'
NDUFA9_7	15528	A	65	205	5' - AAGACTGTTGGATCTTACAGCAATTTAAGC - 3'	5' - ACCAGAACTTGATCACTCAAATCTGAAT - 3'
NDUFA9_8	14863	A	65	158	5' - TGTCTCTTTTCAACAATTACTTAGACATA - 3'	5' - GCACAATTTAAAATTCAACTCTAAGC - 3'
NDUFA9_9	9568	A	68	208	5' - GGAAACTTTGTGAGAAGCGTG - 3'	5' - GAACAAGTGTGTGGAGCTGG - 3'
NDUFA9_10	9569	A	65	147	5' - TCTTGGGCAGAGAGATGC - 3'	5' - GGCAGACGCTTCCACAC - 3'
NDUFA9_11	9570	A	68	281	5' - TCAGCCAGTTTTCAGCATTG - 3'	5' - GCTGGGTGCTCAAACCAC - 3'

## Anhang

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFA10_1						
NDUFA10_2	9572	A	63	273	5' - TCACAATGTGCTGCTGTGTG - 3'	5' - AAAACCAGTGAAATAAGCAACC - 3'
NDUFA10_3	9573	A	63	274	5' - GACTGCATCCGACTGTTTCTC - 3'	5' - AACAGATCTAACTGCCCAGAAATAC - 3'
NDUFA10_4	9574	A	65	167	5' - TGCTTTGCTATCTGTCTGATTTTC - 3'	5' - CCAGAAGTGGGTCTGCAATG - 3'
NDUFA10_5	9575	A	65	192	5' - TGTGGGGACTGGTAGGTGAC - 3'	5' - GGCCTTTGATTGAAAACCTGC - 3'
NDUFA10_6	9576	A	63	155	5' - GAACTCTAAATGTTCCAGTTTG - 3'	5' - GCCCTGTAATCAGTCGTGTG - 3'
NDUFA10_7	9577	A	63	171	5' - TGGAAAAGTTTACACTGAATTCATC - 3'	5' - CGATCTGATTTGCAAGAACC - 3'
NDUFA10_8	9578	A	65	164	5' - TGGGGTTCTCTGTTTAAATTGG - 3'	5' - ACCCCAGACATGCAGCAG - 3'
NDUFA10_9	9579	A	68	177	5' - TTGATGGTTTGGTGTGATCC - 3'	5' - CCAGCTTCTCCATTTCCAC - 3'
NDUFA10_10	9580	A	66	129	5' - AAACAGAATGCACCAATGCC - 3'	5' - TGCAGCTGGAGCAGAAG - 3'
NDUFA11_1						
NDUFA11_2	9526	A	68	213	5' - CTTAGCAGCAGTGGGGTCTG - 3'	5' - AGCCGTCAAATGTGCTCTG - 3'
NDUFA11_3						
NDUFA11_4	15518	A	68	213	5' - GTCTTGGTCCGGCCGAG - 3'	5' - CACAGACACAGAATTTATTTCTGGACG - 3'
NDUFA12_1	9634	A	68	161	5' - ATCCGGTGGGTTTTGCTC - 3'	5' - AAGAGCATGGCTCTGGC - 3'
NDUFA12_2	9635	A	63	200	5' - CCGTTTATGTTTGAACCTAAGAATC - 3'	5' - TCAAATCAAATCCCAATCCC - 3'
NDUFA12_3	9636	A	63	290	5' - AAAAGTTGTCTTCTTTGATATTATGC - 3'	5' - GGAGGTCAAAGCTGACATGAG - 3'
NDUFA12_4	9637	A	63	250	5' - GCCTTTCATAACTGTTTGGG - 3'	5' - TTTGCATGTTTCAACTGTTCTTC - 3'
NDUFA13_1_1	10007	A	68	271	5' - GTTCTGACTGGCCTGCG - 3'	5' - GAAGTGACTTACTGCCACCG - 3'
NDUFA13_1_2	10008	A	68	265	5' - CGCGGTCGGATAGTTACAC - 3'	5' - AGACTCTGAGACCCCGGC - 3'
NDUFA13_2	9639	A	68	158	5' - GGAGGAGGGTGTCTGGG - 3'	5' - AGACAACGCCACCAGG - 3'
NDUFA13_3	10005	D	68	147	5' - CCTGGTCTGACCTGAGTGTG - 3'	5' - GCCAGTGACCTCCAACC - 3'
NDUFA13_4						
NDUFA13_5	12293	A	65	325	5' - GCTGTGCCTCTACCCATAC - 3'	5' - GTGCATATCTGCTGCGT - 3'



Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFAB1_1						
NDUFAB1_2	15524	A	63	269	5' - GGCTTGTGCATTGATTTAGAGGTATT - 3'	5' - TATCTTTCCCTTTGCATTTTCTAGCATGTA - 3'
NDUFAB1_3	9590	A	68	144	5' - TTGTGTTTGGTGCTCCTTTC - 3'	5' - GCAGTGTGTAGATAGAAGACTGAGC - 3'
NDUFAB1_4	9591	A	63	237	5' - AGGGTCAGGTGTGTTTCAGTTC - 3'	5' - TTTCCCTTTATTGAAGAACCACAG - 3'
NDUFB1_1	15520	A	67	261	5' - TCAGAAATTATTGGTAATGTTTGAAGCTA - 3'	5' - GTCGCCGTGATCCTCGT - 3'
NDUFB1_2	9598	A	63	262	5' - GGCCAGATGCAATTTAAAAG - 3'	5' - AAATTTGGCCAATTGCTG - 3'
NDUFB1_3	9599	A	68	135	5' - TCCCCTTTTATCTCGTATCACAG - 3'	5' - TGTGAACATTCGATAATCTAGCC - 3'
NDUFB10_1						
NDUFB10_2	10074	A	Touchdown	219	5' - GTCCAAACCGATGAGGC - 3'	5' - TGCAGATCTCCACTCCC - 3'
NDUFB10_3						
NDUFB11_1						
NDUFB11_2	14982	A	68	236	5' - GAAGCCCTCATTGACCTCTA - 3'	5' - TGGCAGAATCCCCTTCAAC - 3'
NDUFB11_3	14984	A	68	202	5' - TGAGGCTCCCTCACGTCTA - 3'	5' - CCTTCACAACACAATCAACTA - 3'
NDUFB2_1	15522	A	Touchdown	207	5' - GGAAGCGAAGTAGGCAGGG - 3'	5' - GCGCTGTCCGCTACAGG - 3'
NDUFB2_2	9601	A	68	211	5' - GAATGTAGCACGCTGTCTGC - 3'	5' - GACAAGTGCTTTCTCCTGC - 3'
NDUFB2_3	9602	A	63	155	5' - GACTTTTCTTTCTTTTAAATGGTTGTC - 3'	5' - AAATTTGGAGCACACCCAC - 3'
NDUFB3_2	14988	A	63	227	5' - GCATATTTCTCACTTGTGTTAATCTTT - 3'	5' - ACTTGATTCTCTAGGATACATTCTATCTAA - 3'
NDUFB3_3	9603	A	68	299	5' - TGATCTTCTGTAGGGTAGCATTTAAG - 3'	5' - AACCACTATGATGCTTCCAGG - 3'
NDUFB4_1	9592	A	65	258	5' - GCAATTGTGCCCTGGTTC - 3'	5' - TCGGTCTCTCCAGGACTC - 3'
NDUFB4_2	9593	A	68	336	5' - ATGCGTCTGTGCTCCTTAC - 3'	5' - GGCAGTGGTGGCAATCTTC - 3'
NDUFB4_3	9594	A	68	350	5' - AGGTTTGGAGTGTTCATTCTG - 3'	5' - CGTCTGCTTCTGTGTTGTTAGG - 3'

## Anhang

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFB5_1	9604	A	69	192	5' - ACCCGCCTCCCTTCTTC - 3'	5' - CTTACGCCCCGTTCTCC - 3'
NDUFB5_2	9605	A	68	269	5' - TGA AACCCAGTCATCCTGC - 3'	5' - TTCCCTGTTACATGCAAAGAC - 3'
NDUFB5_3	9606	A	68	142	5' - TGGGGAGAGTTACGAAATGG - 3'	5' - CTGGCAGGGGATGGAAG - 3'
NDUFB5_4	9607	A	68	199	5' - AACCAAGAAGTTGGTTTCTTAC - 3'	5' - CAAGGCATGTAACAGTATGTAATTGTC - 3'
NDUFB5_5	9608	A	63	194	5' - AAGCAAAGTATTATTCAGAAATGGAC - 3'	5' - TTTTCTTTCCACCTACCCC - 3'
NDUFB5_6	9609	A	63	326	5' - AGCAGACTCCAGTGATTGTCC - 3'	5' - CAGTAATGTCAGAGGCTCTTTTG - 3'
NDUFB6_1	9610	A	68	258	5' - AGTCCGTAGTTCGAGGGTGC - 3'	5' - GGGACCGGAGAGGTCTG - 3'
NDUFB6_2	9611	A	68	269	5' - TTGATGCCTTTTGTCTGCC - 3'	5' - TGTTTATAAGTGGCAGATTATTTCC - 3'
NDUFB6_3	9612	A	63	236	5' - GCCAGAACTCAAGTACATTTTCC - 3'	5' - TGGTAATATAGGAACAACTTAGGCTC - 3'
NDUFB7_1	15525	A	68	230	5' - GTTCCGGGTAGGAGCTAGGTGAC - 3'	5' - CAGGTGTTCAAGCACCCGC - 3'
NDUFB7_2						
NDUFB7_3	14993	A	63	240	5' - CCCTCTCGTGCTTTTCC - 3'	5' - TCGCGTCGGAGCAGTAA - 3'
NDUFB8_1	10072	A	68	145	5' - GAAGGGAACGTGAAGAAGG - 3'	5' - CTTCCCACTGAGGTCTCG - 3'
NDUFB8_2	10073	A	68	200	5' - GCTCGCTTCTGACCTGTTC - 3'	5' - CATCACTACTTGGGTGCGAG - 3'
NDUFB8_3	9617	A	65	167	5' - CTCACAGCCCTTCCAGAAG - 3'	5' - GGAAGGTCAAATGAGATATGGTTC - 3'
NDUFB8_4	9618	A	65	236	5' - TGCATTTTGCAGGAAGAGTAG - 3'	5' - CCTAAGGGAGCACTTCTCGG - 3'
NDUFB8_5	9619	A	68	160	5' - CTGAATGTATGTTCTTGCTGACC - 3'	5' - GAGGACCCAAAAGCCAC - 3'
NDUFB9_1	9620	A	68	172	5' - GTGCAGTTTCCCGGCTC - 3'	5' - GAGTCCTGGGTCCCATC - 3'
NDUFB9_2	9621	A	68	324	5' - AGACAGCAACTGACCACG - 3'	5' - GCTGAGGTGTGGACTGAAG - 3'
NDUFB9_3	9622	A	68	187	5' - TTGATACCATGATTTCTCTCC - 3'	5' - TCCATCTACATAGCTAAGGAATAACG - 3'
NDUFB9_4	9623	A	68	189	5' - ATGATTCCTTCTTGCTCC - 3'	5' - TGCAAGCATGAAAGATGAGG - 3'
NDUFC1_1	9581	A	65	267	5' - CCAACTCGGAGAGACTGAGC - 3'	5' - TAATCTGAGGGTTCGAGTCGG - 3'
NDUFC1_2	9582	A	68	159	5' - AAATTTACAGACCCTTCC - 3'	5' - CACGACATCCGGGAGTAAAG - 3'
NDUFC1_3	9583	A	63	186	5' - TTCCTTTACAAAATATAAGTATCCAGG - 3'	5' - TTTGCATAATCTATTCATCCAATAAG - 3'

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFC2_1	9627	A	68	246	5' - ACCAGGCCTCAAGTGGAAAC - 3'	5' - AGCCCTACGACCCCTTCTC - 3'
NDUFC2_2	9628	A	63	290	5' - TTTTGCTTTCTTTGGGATTG - 3'	5' - TGGGAGTCAACAGAATTTAGAAG - 3'
NDUFC2_3	9629	A	65	167	5' - TTAGTGAGTGTTAATTTTCGTTTAGG - 3'	5' - TCAGTGAAACTGGAGCAAGC - 3'
NDUFS1_2	9416	A	65	174	5' - GCCATAAAACATTACCAAACAGTTG - 3'	5' - AATATCCACGAATGCAAATTTAAG - 3'
NDUFS1_3	10639	A	63	199	5' - TCCATTATCATCTGCTATAATAAACTG - 3'	5' - AAAATCAGAACACACACACAAAATAG - 3'
NDUFS1_4	9418	A	65	224	5' - CAATAACAGCAGTGAAGTCAGG - 3'	5' - AAGTTTTCTACCTTCTACAGCATGG - 3'
NDUFS1_5	9419	A	65	329	5' - AAATACCCTATTCTTTGCCTGTTATC - 3'	5' - GCACACCAACTTCTTCCGAG - 3'
NDUFS1_6	9954	A	68	226	5' - TGCCAGCAGTTAATGTCAGTG - 3'	5' - TGAAAGAGTCAATCTCATGCTG - 3'
NDUFS1_7	9955	A	68	388	5' - CTGTCCTATTTGTGACCAGGG - 3'	5' - GAAACAGCATCCCTCTTCTCC - 3'
NDUFS1_8	9421	A	65	316	5' - TTTGCTGGACTTGACCATTG - 3'	5' - AACCAGGAAGAAAATGAACC - 3'
NDUFS1_9	9422	A	63	315	5' - TTTCTTTATCCAAAAGCACC - 3'	5' - ATAAGCAACTCAGATTCAGTAGTC - 3'
NDUFS1_10	9423	A	65	220	5' - TTTAGCAAGATTCCACAATGG - 3'	5' - TTCATGGCAAAGATGTTTCTTG - 3'
NDUFS1_11	9424	A	65	279	5' - TGCTGCGGTAGGTTTCTTG - 3'	5' - TTGGAGAATCCAGGTTGTCAC - 3'
NDUFS1_12	9425	A	65	318	5' - AGAAGGCAATGGGTTTGATG - 3'	5' - CCACTAACACTATTAGGAAGATGCC - 3'
NDUFS1_13	9426	A	65	306	5' - TTGATGAGACCAGTAACTGCTTAG - 3'	5' - CGCCCAACCTGGTGTAAG - 3'
NDUFS1_14	9427	A	65	358	5' - GGCAAATATGGTTTGGTGTC - 3'	5' - CACATGTGTAAGTGGGATAATGTTG - 3'
NDUFS1_15	9428	A	65	213	5' - GGTAAAATCCATAATTGCTTTGC - 3'	5' - CTTTTGTTTCTGGTGTACAGG - 3'
NDUFS1_16	9429	A	63	260	5' - AAAATTTGGTTTACCATTTCC - 3'	5' - TCAAATATGCCTTTAGTAGCATCAC - 3'
NDUFS1_17	9956	B	63	267	5' - TTCAGTAGTGCTGCATTATTTAC - 3'	5' - ATGAAAAGTCTCATAGGCG - 3'
NDUFS1_18	9957	A	65	209	5' - CTCGCCTATGAGCAGTTTC - 3'	5' - TTCTTACCTTTTCGATTTGGCAG - 3'
NDUFS1_19	9431	A	65	246	5' - ATACTTGCATAGGGCCTTATAATC - 3'	5' - ATTATCTGCGGCAAACTGG - 3'

## Anhang

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFS2_2	9439	A	61	169	5' - GGTTCCTCCTTCCCGCAG - 3'	5' - GCCTTGGAGAAAAGTGTGTCG - 3'
NDUFS2_3	9440	A	63	178	5' - AACACTGTTCAGGCCCTTTG - 3'	5' - TGGGACAGCAACTCTGGTC - 3'
NDUFS2_4	9441	A	63	263	5' - CAAGGGAATAACCATGTGGC - 3'	5' - CCAAAAGGCTCCTGTTACC - 3'
NDUFS2_5	14899	A	65	260	5' - CCTATATCCTGTCTTCTCCTTG - 3'	5' - CTTCCCTATTCTATCCTTTCCCTC - 3'
NDUFS2_6	9959	A	65	246	5' - CTCTCTGTCCGCCTCAGTG - 3'	5' - AATCTCCTGTCTCCTTTATACCTTC - 3'
NDUFS2_7	9960	A	65	195	5' - TAGGCCATCATAGGACCTGG - 3'	5' - GGCCACAGGGAAAAATAGGC - 3'
NDUFS2_8	9961	A	65	276	5' - CTCCAAACCTGTATCGCTGG - 3'	5' - GAAACTGGTGTGTTAATACTCTTCC - 3'
NDUFS2_9	9962	A	65	236	5' - CCCCACAAGAAGGGCTAGAG - 3'	5' - GATATTAGGCTGGAACCTCCC - 3'
NDUFS2_10	9963	A	65	250	5' - AGGCTAAGGAAGAAGGAGCC - 3'	5' - AAGAGTGAGGCAGGGGAAAC - 3'
NDUFS2_11	9445	A	68	210	5' - CCTGCTCCTCTGACTGTTCTTC - 3'	5' - ACACCCACACTTTCCCC - 3'
NDUFS2_12	9964	A	65	330	5' - CATGTGGCTTTAGTCTCCCTG - 3'	5' - TTCTCTGCCAACAAAACCTC - 3'
NDUFS2_13	9965	A	65	249	5' - GAATAGAGGTTTTGTTGGCAGAG - 3'	5' - GCAAGGTGGGAGGAGAAAG - 3'
NDUFS2_14	9966	A	65	189	5' - CTTTCTCCTCCACCTTGC - 3'	5' - TCTCCTTCTGTCCCCAGTG - 3'
NDUFS2_15	9967	A	63	167	5' - TTGTTTTGCCTCACAAACAGG - 3'	5' - TTCCAGTGAGGAACAGGCTC - 3'
NDUFS3_1	15539	C	Touchdown	174	5' - CGTGCCTGCTGTCTTTCCGTC - 3'	5' - CTCTGCACTGGGCACGC - 3'
NDUFS3_2	10066F/9969R	A	68	135	5' - TCTGTGCCTTTTATCTCCCTG - 3'	5' - CCCGCCGATAGTTCAGAG - 3'
NDUFS3_3	9970	A	63	178	5' - TGGCTTTTGCCTTCTCC - 3'	5' - CCCAGACCCAAATAACATTAGTAAG - 3'
NDUFS3_4	9971	A	68	227	5' - TCCCTCAGTAGCTTTTGTTC - 3'	5' - CCAAACTTCTCAGATCTCC - 3'
NDUFS3_5	9972	A	68	206	5' - CAATCAGGGACTCCCATCTC - 3'	5' - AGAGGCAGGTCCACCATATC - 3'
NDUFS3_6	9973	A	68	177	5' - ATTGCTGTTTGTAGGTGGTC - 3'	5' - CTGCTGTCCCAGTTCCAAG - 3'
NDUFS3_7	9453	A	63	230	5' - TCCTTAGTGCTCAAGCCTGC - 3'	5' - TCTAGGATCCACATGCGTTC - 3'

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFS4_1	9459	A	63	178	5' - CCTTTCATCCTGGCGTTTG - 3'	5' - AAAATGGAGGGACCCAAG - 3'
NDUFS4_2	9460	A	63	174	5' - TCTCTCCTCTCATTGCCTGG - 3'	5' - CCTGAAGGCAGAACCATAGC - 3'
NDUFS4_3	9461	A	68	368	5' - TGTAGGCTGTTTGAACGTG - 3'	5' - TGTGTATCTTTGAGCACAGTGG - 3'
NDUFS4_4	9462	A	65	429	5' - TTAGAAAATCTCCCAAATTTAACAC - 3'	5' - TTTTGGAGGTGGGTGTTCTG - 3'
NDUFS4_5	9463	A	68	207	5' - GCTTTTCAGGTATCCTCTTTAATTC - 3'	5' - TGACTTTATTCACAGTCAAGCAGAG - 3'
NDUFS5_2	14901	A	65	322	5' - TGATTGCCCTCTTGTGGTAT - 3'	5' - CCAAAGGAACAAGAAAGTAATTCAG - 3'
NDUFS5_3	9530	A	65	177	5' - TCCCTCAGTTTAATTACCATTTC - 3'	5' - ACAGGAAAATCAGCCTCCAG - 3'
NDUFS6_1						
NDUFS6_2	9465	A	61	208	5' - GCCGTAAAAGTCACACATGG - 3'	5' - GGTGCTTGCAATATGGGG - 3'
NDUFS6_3	9466	A	61	267	5' - TGTGTGTGGTGGGTAAATTG - 3'	5' - TGGGAGTGAAGGGGAGTATG - 3'
NDUFS6_4	9467	A	63	339	5' - CTTCGGTCAGCCTGGAAC - 3'	5' - CAGCACCAGGAATACCCTTC - 3'
NDUFS7_1	12234	C	65	133	5' - GGAGCGCTAAGGAGAACG - 3'	5' - GACACCCGAGGCTCCCA - 3'
NDUFS7_2	9454	A	68	104	5' - GCAGTCACTGTTCCACC - 3'	5' - CAGCTGAGGGCTGGAGAC - 3'
NDUFS7_3	15531	A	65	181	5' - CCTGGGACAGCCACTGAC - 3'	5' - ACTGATGCAGAAAATAAGGAAGGGAT - 3'
NDUFS7_4	15532	A	66	182	5' - TGGCTGACGCCTCCTGT - 3'	5' - CTGGCGCTCGAGGAGGG - 3'
NDUFS7_5	15533	A	68	273	5' - CTCGGGGGTGGCGTCTGA - 3'	5' - GGGTCCGTGCGCAGCTC - 3'
NDUFS7_6	9992	C	60	124	5' - CCCCAGAGTGAGCTGCG - 3'	5' - TACGTCTGTCCCTGGAGACC - 3'
NDUFS7_7	9457	A	68	169	5' - GTCCTCGGCACACTCCCC - 3'	5' - CTGTCTCCAGCTCCCTCG - 3'
NDUFS7_8	9715	C	68	175	5' - AAGCGAGACTGAGGCAAGG - 3'	5' - CAGGCTGGGGACAGGAC - 3'

## Anhang

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFS8_2	9394	A	68	254	5' - ACACCCCACCTCCATC - 3'	5' - GAACACCTGAGGCTAGAGGC - 3'
NDUFS8_3	9394	A	68	254	5' - ACACCCCACCTCCATC - 3'	5' - GAACACCTGAGGCTAGAGGC - 3'
NDUFS8_4	9995	B	65	162	5' - CTCTTGCCATGGCCTCC - 3'	5' - CCGGCACCTTCCCTGTC - 3'
NDUFS8_5	15534	C	Touchdown	292	5' - GTGGGCACGGATGCATGG - 3'	5' - GGCCTCCCTCTCCCAGT - 3'
NDUFS8_6	9997	C	60	208	5' - GTGTCTGGTGGCCCTC - 3'	5' - TGGTTAGGCCCTGCTGAG - 3'
NDUFS8_7	9998	A	68	204	5' - CTAACCACCGTCCCTGCAC - 3'	5' - GTGGTTTTATTGGGCAGCAG - 3'
NDUFV1_1	12235	C	60	359	5' - TGGCCTCTCAGTCCTCC - 3'	5' - GAGGCCACTACAGACCC - 3'
NDUFV1_2	9999	A	63	134	5' - GCCTCTGACCTTTGTCTC - 3'	5' - CCAACACACTAAGGGCACTG - 3'
NDUFV1_3	10000	A	65	250	5' - AAGGTGTCCCCTTCATTGC - 3'	5' - GTCTCTCCACAGCCACATC - 3'
NDUFV1_4	9473	C	63	262	5' - TAGCCTGTCTGACCTGTGGG - 3'	5' - GAGTGCACACTGAACACCTTC - 3'
NDUFV1_5	9474	A	68	255	5' - TGGGAAACTCACACCTTTGTC - 3'	5' - CAGGACACAGTCTGACCCAG - 3'
NDUFV1_6	9475	C	63	314	5' - CCTAGCAGCCACCAGTTCTC - 3'	5' - TCTCTTTGTGGACACCTGCC - 3'
NDUFV1_7	9476	A	68	224	5' - ATGCATCCCTTTGGGGAC - 3'	5' - AGGGCTGGTGTGTGAACC - 3'
NDUFV1_8	10001	A	65	150	5' - CTGCTAATTGCCCTCGTC - 3'	5' - ATGAAGCCACAGCAAGCAAG - 3'
NDUFV1_9	10002	D	66	207	5' - GGAGATCATCAGGCCCTCTC - 3'	5' - CTACGCAGAAGGGTGGTG - 3'
NDUFV1_10	9478	A	65	162	5' - CTCTGTTTCACATGGTCCCC - 3'	5' - TTCCACATGGATAGACGCAG - 3'
NDUFV2_1						
NDUFV2_2	9480	A	63	211	5' - TCCATTGTTGTAATTATGAATCC - 3'	5' - CCCCAATTTCCAAGTCTTTTC - 3'
NDUFV2_3	10003	A	65	283	5' - CATGTTGGAATTAATGGAGAG - 3'	5' - TTTTACAATTGCCTCTATCCTCTG - 3'
NDUFV2_4	10004	A	65	360	5' - TGATACTCCATTTGATTTACACC - 3'	5' - GCTAAAGGGCTCCAAAATCC - 3'
NDUFV2_5	9633	A	65	417	5' - TCCAAGACAAGTATGTTTTCTGC - 3'	5' - CAATAAGATGGCAGAAGTTGG - 3'
NDUFV2_6	9481	A	63	286	5' - CCTGGTCCTTAGAGTGTATTATTG - 3'	5' - TTTTAAAACCTGGATATTTATGGTAAC - 3'
NDUFV2_7	15536	A	65	207	5' - GCAACATAGTGAGACCTTGTCTCTATAA - 3'	5' - ATTTAGGTGAGCCACTAAAATTCC - 3'
NDUFV2_8	9483	A	61	239	5' - TTAAGTGGGCTCTTGTGAGG - 3'	5' - GATTGGAAGTCCATATTTTATTCTC - 3'

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NDUFV3_1	12282	B	63	208	5' - CTGTAATTGGCGCAGTCG - 3'	5' - CCCTCACCCCATCCCCTA - 3'
NDUFV3_2	9488	A	68	323	5' - TGGACGACTGAGAGAGACCC - 3'	5' - AGTAAACTCACTGTCGTGCTTC - 3'
NDUFV3_4	15537	A	65	244	5' - TGTCCCTTGTGTTGGTCTCATGG - 3'	5' - ATGCAGTGAAGACGGTGG - 3'
ND1_1	10206	C	60	421	5' - AACTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTTC - 3'	5' - TGAGTTTGATGCTCACCCCTG - 3'
ND1_2	10207	A	68	427	5' - CTCCCATAACCAACCCC - 3'	5' - TGTTTGTGTATTCGGCTATGAAG - 3'
ND2_1	10208	A	68	456	5' - TCAGCTAAATAAGCTATCGGGC - 3'	5' - GTGAGAAGAAGCAGGCCG - 3'
ND2_2	10209	A	68	490	5' - CCATAACCAATACTACCAATCAATAC - 3'	5' - AGGGTGGATGGAATTAAGGG - 3'
ND2_3	10210	A	65	454	5' - TCCTAACTACTACCGCATTCTAC - 3'	5' - GGCTTTGAAGGCTCTTGCTC - 3'
ND3	10211	A	68	512	5' - CTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTTAG - 3'	5' - TGAAATGAGGGGCATTTGG - 3'
ND4L	10097	A	68	440	5' - AACAAAACGAATGATTTGCACTC - 3'	5' - AATTAGGCTGTGGGTGGTTG - 3'
ND4_1	10212	A	68	454	5' - TCAATCTCCAACACATATGGC - 3'	5' - GTGATGATAGCCAAGGTGGG - 3'
ND4_2	10213	A	65	502	5' - CCAGCGAACCCTATCACG - 3'	5' - GGGTTGAGAATGAGTGTGAGG - 3'
ND4_3	10214	A	65	464	5' - GACTCCCTAAAGCCCATGTC - 3'	5' - TAAGGCGAGGTTAGCGAGG - 3'
ND4_4	10215	A	68	452	5' - TGCCTAGCAAACCTCAAACCTACG - 3'	5' - CGTAAGCCTCTGTTGTCAGATTC - 3'
ND5_1	10216	A	65	563	5' - AGCTATCCATTGGTCTTAGGC - 3'	5' - GAATGGCTGCTGTGTTGG - 3'
ND5_2	10217	A	65	572	5' - CCTATTCCAAGTTCATCGG - 3'	5' - GGAATGCTAGGTGTGGTTGG - 3'
ND5_3	10218	A	68	557	5' - AGCAGTCTGCGCCCTTAC - 3'	5' - GGGAAATGTTGTTAGTAATGAGAAATC - 3'
ND5_4a	10369	A	68	365	5' - ATCGCTACCTCCCTGACAAG - 3'	5' - CGGTGTGTGATGCTAGGGTAG - 3'
ND5_4b	10370	A	63	428	5' - AGCCCTCGCTGTCACTTTC - 3'	5' - TGGGCGTTGATTAGTAGTGG - 3'

## Anhang

Gen_Exon	Primer-Nr (1)	PCR-Ansatz (2)	Temp. in °C (3)	Produktlänge (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
ND6_1	10220	A	69	352	5' - TCTTCCCCTCATCCTAACCC - 3'	5' - CAGCGATGGCTATTGAGGAG - 3'
ND6_2	10221F/1037 1R	A	65	350	5' - CACCAATCCTACCTCCATCG - 3'	5' - TTTTCATATCATTGGTCGTGG - 3'
ECSIT_2	10350	A	68	194	5' - TGCTGAATCTTCTTTTGGGC - 3'	5' - TGCTGAATCTTCTTTTGGGC - 3'
ECSIT_3_1	10353	A	68	310	5' - ACTGAGAGGTGCCAGATTCC - 3'	5' - CACCATACTCCCGCATCTTG - 3'
ECSIT_3_2	10355	A	68	306	5' - AGTTCCTGCAGACGGTG - 3'	5' - GCCAGCTATCAGTGTAGCCC - 3'
ECSIT_4	10357	A	68	341	5' - TCCATCTCTGAGTTCTGCC - 3'	5' - GAGAGAAGGGGAGCCAG - 3'
ECSIT_5-6	10358	A	68	444	5' - GTCCCCAGTTCCTCTGTAGG - 3'	5' - CCAGCCCCAACACATGC - 3'
ECSIT_7	10359	A	71	197	5' - AGACCGAGAGAGCCCTGG - 3'	5' - CACACATGTGAGCCACCG - 3'
ECSIT_8	10360	A	68	377	5' - AGGTGTAGGCATGGGTTAGC - 3'	5' - CATCTCATGCCTTCAGTCCAC - 3'
NDUFAF1_2_1	10078	A	68	385	5' - TTGCTAGCCCAGGAAGAAAC - 3'	5' - ATGCAGAGGGTGGCCTTC - 3'
NDUFAF1_2_2	10079	A	68	374	5' - GCCTGATGTTAGTTTCGATAAAGC - 3'	5' - TAGAAAACGATGGCTCCTGG - 3'
NDUFAF1_3	10080	A	65	306	5' - TGGTGATGACTCACATTTTGC - 3'	5' - CTCACCCAGCCAAGACCTC - 3'
NDUFAF1_4	10081	A	68	206	5' - GCAGATGCCTCAATTGCTTAC - 3'	5' - TGAAGTCACTCTCCCAGAG - 3'
NDUFAF1_5	10082	A	68	317	5' - TCCTGGAATAATCTCAGTACGTC - 3'	5' - ACTAGCCATTGGTTGGATGC - 3'
NDUFAF2_1	10361	A	68	193	5' - AGCGCTGGAACTGGGTG - 3'	5' - CAATCACTGACCACGCAATC - 3'
NDUFAF2_2	15589	A	63	202	5' - ATTGTAGAATACTGTATCATAGGTTTCATT - 3'	5' - ACTGTTATATACTTACCTCCCATGAGATT - 3'
NDUFAF2_3	15590	A	63	155	5' - AATGTTTGTGTAATAATTATGGGAACTGAC - 3'	5' - AGCTTCGTATATCCTTGGGAATATACT - 3'
NDUFAF2_4	15145	A	63	843	5' - TTCATAGAGTGTCTCAGGCTTCTG - 3'	5' - GCTACAGGATCCTTCTCAAGGG - 3'



Criteria		Maximum score
Biochemical defect	Demonstrated in affected tissues	8
	Demonstrated in multiple tissues	2
Functional studies	Single fibre PCR and/or hybrid studies	7
Reports from two or more independent laboratories of the mutation in patients with clinical disease		5
Heteroplasmy		5
Segregation of variant with disease within a family		3
Conservation		10
	-1 if a variant is seen in a mammal	
	-1 if a variant is seen in a primate	
	-1 if there are $\geq 2$ variants or there are $\geq 4$ mammals with variants	
	Up to -3 for variation in any of the four adjacent residues	
	-2 if variants are from different amino acid classes	
	-2 if variant is seen on databases in the absence of mtDNA disease	
<b>Total score</b>		<b>40</b>

mtDNA, mitochondrial DNA; PCR, polymerase chain reaction.

Abbildung A 5 Der von Mitchell et al. erstellte Pathogenitätsscore zur Klassifizierung von mitochondrialen Varianten in pathogene Mutationen und Polymorphismen.

Dargestellt sind die einzelnen Kriterien sowie die entsprechenden Punkte, die bei Vorliegen des jeweiligen Kriteriums vergeben werden. Sicher pathogene Mutationen können maximal 40 Punkte erreichen. Abbildung aus Mitchell et al. (2006).

## Literaturverzeichnis

Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. Smith, R. Staden and I. G. Young (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature**290**(5806): 457-465.

Benit, P., R. Beugnot, D. Chretien, I. Giurgea, P. De Lonlay-Debeney, J. P. Issartel, M. Corral-Debrinski, S. Kerscher, P. Rustin, A. Rotig and A. Munnich (2003). "Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy." Hum Mutat**21**(6): 582-586.

Benit, P., D. Chretien, N. Kadhom, P. de Lonlay-Debeney, V. Cormier-Daire, A. Cabral, S. Peudenier, P. Rustin, A. Munnich and A. Rotig (2001). "Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUF51 genes in mitochondrial complex I deficiency." Am J Hum Genet**68**(6): 1344-1352.

Benit, P., A. Slama, F. Cartault, I. Giurgea, D. Chretien, S. Lebon, C. Marsac, A. Munnich, A. Rotig and P. Rustin (2004). "Mutant NDUF53 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome." J Med Genet**41**(1): 14-17.

Berger, I., E. HersHKovitz, A. Shaag, S. Edvardson, A. Saada and O. Elpeleg (2008). "Mitochondrial complex I deficiency caused by a deleterious NDUF11 mutation." Ann Neurol**63**(3): 405-408.

Brandt, U. (2006). "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)." Annu Rev Biochem**75**: 69-92.

Brown, M. D., A. Torroni, C. L. Reckord and D. C. Wallace (1995). "Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations." Hum Mutat**6**(4): 311-325.

Budde, S. M., L. P. van den Heuvel, A. J. Janssen, R. J. Smeets, C. A. Buskens, L. DeMeirleir, R. Van Coster, M. Baethmann, T. Voit, J. M. Trijbels and J. A. Smeitink (2000). "Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUF54 gene." Biochem Biophys Res Commun**275**(1): 63-68.

Calvo, S. E., E. J. Tucker, A. G. Compton, D. M. Kirby, G. Crawford, N. P. Burt, M. Rivas, C. Guiducci, D. L. Bruno, O. A. Goldberger, M. C. Redman, E. Wiltshire, C. J. Wilson, D. Altshuler, S. B. Gabriel, M. J. Daly, D. R. Thorburn and V. K. Mootha (2010). "High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency." Nat Genet**42**(10): 851-858.

Carroll, J., I. M. Fearnley, R. J. Shannon, J. Hirst and J. E. Walker (2003). "Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria." Mol Cell Proteomics**2**(2): 117-126.

- Carroll, J., I. M. Fearnley, J. M. Skehel, R. J. Shannon, J. Hirst and J. E. Walker (2006). "Bovine complex I is a complex of 45 different subunits." J Biol Chem**281**(43): 32724-32727.
- Chan, D. C. (2006). "Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development." Cell**125**(7): 1241-1252.
- Chou, L. S., E. Lyon and C. T. Wittwer (2005). "A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model." Am J Clin Pathol**124**(3): 330-338.
- Crimi, M., A. Papadimitriou, S. Galbiati, P. Palamidou, F. Fortunato, A. Bordoni, U. Papandreou, D. Papadimitriou, G. M. Hadjigeorgiou, E. Drogari, N. Bresolin and G. P. Comi (2004). "A new mitochondrial DNA mutation in ND3 gene causing severe Leigh syndrome with early lethality." Pediatr Res**55**(5): 842-846.
- Dahl, H. H. (1998). "Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome." Am J Hum Genet**63**(6): 1594-1597.
- Danhauser, K., A. Iuso, T. B. Haack, P. Freisinger, K. Brockmann, J. A. Mayr, T. Meitinger and H. Prokisch (2011). "Cellular rescue-assay aids verification of causative DNA-variants in mitochondrial complex I deficiency." Mol Genet Metab**103**(2):161–166.
- Dean, F. B., S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm and R. S. Lasken (2002). "Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification." Proc Natl Acad Sci U S A**99**(8): 5261-5266.
- DiMauro, S. and E. A. Schon (2003). "Mitochondrial respiratory-chain diseases." N Engl J Med**348**(26): 2656-2668.
- Distelmaier, F., W. J. Koopman, L. P. van den Heuvel, R. J. Rodenburg, E. Mayatepek, P. H. Willems and J. A. Smeitink (2009). "Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease." Brain**132**(4): 833-842.
- Djafarzadeh, R., S. Kerscher, K. Zwicker, M. Radermacher, M. Lindahl, H. Schagger and U. Brandt (2000). "Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*." Biochim Biophys Acta**1459**(1): 230-238.
- Dobrowolski, S. F., C. E. Ellingson, L. Caldovic and M. Tuchman (2007). "Streamlined assessment of gene variants by high resolution melt profiling utilizing the ornithine transcarbamylase gene as a model system." Hum Mutat**28**(11): 1133-1140.
- Dobrowolski, S. F., A. T. Hendrickx, B. J. van den Bosch, H. J. Smeets, J. Gray, T. Miller and M. Sears (2009). "Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling." Hum Mutat**30**(6): 891-898.
- Dobrowolski, S. F., J. T. McKinney, C. Amat di San Filippo, K. Giak Sim, B. Wilcken and N. Longo (2005). "Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene." Hum Mutat**25**(3): 306-313.

Dunning, C. J., M. McKenzie, C. Sugiana, M. Lazarou, J. Silke, A. Connelly, J. M. Fletcher, D. M. Kirby, D. R. Thorburn and M. T. Ryan (2007). "Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease." Embo J**26**(13): 3227-3237.

Er, T. K. and J. G. Chang (2012). "High-resolution melting: applications in genetic disorders." Clin Chim Acta**414**: 197-201.

Erali, M. and C. T. Wittwer (2010). "High resolution melting analysis for gene scanning." Methods**50**(4): 250-261.

Fassone, E., A. J. Duncan, J. W. Taanman, A. T. Pagnamenta, M. I. Sadowski, T. Holand, W. Qasim, P. Rutland, S. E. Calvo, V. K. Mootha, M. Bitner-Glindzicz and S. Rahman (2010). "FOXRED1, encoding an FAD-dependent oxidoreductase complex-I-specific molecular chaperone, is mutated in infantile-onset mitochondrial encephalopathy." Hum Mol Genet**19**(24): 4837-4847.

Fernandez-Moreira, D., C. Ugalde, R. Smeets, R. J. Rodenburg, E. Lopez-Laso, M. L. Ruiz-Falco, P. Briones, M. A. Martin, J. A. Smeitink and J. Arenas (2007). "X-linked NDUFA1 gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy." Ann Neurol**61**(1): 73-83.

Gerards, M., W. Sluiter, B. J. van den Bosch, E. de Wit, C. M. Calis, M. Frentzen, H. Akbari, K. Schoonderwoerd, H. R. Scholte, R. J. Jongbloed, A. T. Hendrickx, I. F. de Coo and H. J. Smeets (2010). "Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome." J Med Genet**47**(8): 507-512.

Gerards, M., B. J. van den Bosch, K. Danhauser, V. Serre, M. van Weeghel, R. J. Wanders, G. A. Nicolaes, W. Sluiter, K. Schoonderwoerd, H. R. Scholte, H. Prokisch, A. Rotig, I. F. de Coo and H. J. Smeets (2011). "Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene." Brain**134**(1): 210-219.

Grigorieff, N. (1998). "Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice." J Mol Biol**277**(5): 1033-1046.

Haack, T. B., K. Danhauser, B. Haberberger, J. Hoser, V. Strecker, D. Boehm, G. Uziel, E. Lamantea, F. Invernizzi, J. Poulton, B. Rolinski, A. Iuso, S. Biskup, T. Schmidt, H. W. Mewes, I. Wittig, T. Meitinger, M. Zeviani and H. Prokisch (2010). "Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency." Nat Genet**42**(12): 1131-1134.

Haack, T. B., M. Gorza, K. Danhauser, J. A. Mayr, B. Haberberger, T. Wieland, L. Kremer, V. Strecker, E. Graf, Y. Medmari, U. Ahting, R. Kopajtich, S. B. Wortmann, R. J. Rodenburg, U. Kotzaeridou, G. F. Hoffmann, W. Sperl, I. Wittig, E. Wilichowski, G. Schottmann, M. Schuelke, B. Plecko, U. Stephani, T. M. Strom, T. Meitinger, H. Prokisch and P. Freisinger (2014). "Phenotypic spectrum of eleven patients and five novel MTFMT mutations identified by exome sequencing and candidate gene screening." Mol Gen Metab**111**(3): 342-352.

Haack, T. B., F. Madignier, M. Herzer, E. Lamantea, K. Danhauser, F. Invernizzi, J. Koch, M. Freitag, R. Drost, I. Hillier, B. Haberberger, J. A. Mayr, U. Ahting, V. Tiranti, A. Rotig, A. Iuso, R. Horvath, M. Tesarova, I. Baric, G. Uziel, B. Rolinski, W. Sperl, T. Meitinger, M. Zeviani, P. Freisinger and H. Prokisch (2012). "Mutation screening of 75 candidate genes in

---

152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9." J Med Genet**49**(2): 83-89.

Haack, T. B., B. Haberberger, E. M. Frisch, T. Wieland, A. Iuso, M. Gorza, V. Strecker, E. Graf, J. A. Mayr, U. Herberg, J. B. Hennermann, T. Klopstock, K. A. Kuhn, U. Ahting, W. Sperl, E. Wilichowski, G. F. Hoffmann, M. Tesarova, H. Hansikova, J. Zeman, B. Plecko, M. Zeviani, I. Wittig, T. M. Strom, M. Schuelke, P. Freisinger, T. Meitinger, H. Prokisch (2012). "Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing." J Med Genet**49**(4): 277-283.

Haas, R. H., S. Parikh, M. J. Falk, R. P. Saneto, N. I. Wolf, N. Darin, L. J. Wong, B. H. Cohen and R. K. Naviaux (2008). "The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease." Mol Genet Metab**94**(1): 16-37.

Hayashi, J., S. Ohta, A. Kikuchi, M. Takemitsu, Y. Goto and I. Nonaka (1991). "Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A**88**(23): 10614-10618.

Herrmann, M. G., J. D. Durtschi, L. K. Bromley, C. T. Wittwer and K. V. Voelkerding (2006). "Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes." Clin Chem**52**(3): 494-503.

Herzer, M., J. Koch, H. Prokisch, R. Rodenburg, C. Rauscher, W. Radauer, R. Forstner, P. Pilz, B. Rolinski, P. Freisinger, F. Madignier, J. A. Mayr and W. Sperl (2010). "Leigh Disease with Brainstem Involvement in Complex I Deficiency due to Assembly Factor NDUFAF2 Defect". Neuropediatrics**41**(1): 30-34.

Hirst, J., J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon and J. E. Walker (2003). "The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria." Biochim Biophys Acta**1604**(3): 135-150.

Hoefs, S. J., C. E. Dieteren, F. Distelmaier, R. J. Janssen, A. Epplen, H. G. Swarts, M. Forkink, R. J. Rodenburg, L. G. Nijtmans, P. H. Willems, J. A. Smeitink and L. P. van den Heuvel (2008). "NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease." Am J Hum Genet**82**(6): 1306-1315.

Hoefs, S. J., F. J. van Spronsen, E. W. Lissen, L. G. Nijtmans, R. J. Rodenburg, J. A. Smeitink and L. P. van den Heuvel (2011). "NDUFA10 mutations cause complex I deficiency in a patient with Leigh disease." Eur J Hum Genet**19**(3): 270-274.

Hofhaus, G., H. Weiss and K. Leonard (1991). "Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I)." J Mol Biol**221**(3): 1027-1043.

Holbrook, J. F., D. Stabley and K. Sol-Church (2005). "Exploring whole genome amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies." J Biomol Tech**16**(2): 125-133.

Hunte, C., V. Zickermann and U. Brandt (2010). "Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I." Science**329**(5990): 448-451.

- Huoponen, K., J. Vilkki, P. Aula, E. K. Nikoskelainen and M. L. Savontaus (1991). "A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy." Am J Hum Genet**48**(6): 1147-1153.
- Janssen, R. J., L. G. Nijtmans, L. P. van den Heuvel and J. A. Smeitink (2006). "Mitochondrial complex I: structure, function and pathology." J Inherit Metab Dis**29**(4): 499-515.
- Johns, D. R., M. J. Neufeld and R. D. Park (1992). "An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy." Biochem Biophys Res Commun**187**(3): 1551-1557.
- Jun, A. S., M. D. Brown and D. C. Wallace (1994). "A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia." Proc Natl Acad Sci U S A**91**(13): 6206-6210.
- Kirby, D. M., R. Salemi, C. Sugiana, A. Ohtake, L. Parry, K. M. Bell, E. P. Kirk, A. Boneh, R. W. Taylor, H. H. Dahl, M. T. Ryan and D. R. Thorburn (2004). "NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency." J Clin Invest**114**(6): 837-845.
- Lazarou, M., D. R. Thorburn, M. T. Ryan and M. McKenzie (2009). "Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease." Biochim Biophys Acta**1793**(1): 78-88.
- Liew, M., R. Pryor, R. Palais, C. Meadows, M. Erali, E. Lyon and C. Wittwer (2004). "Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons." Clin Chem**50**(7): 1156-1164.
- Loeffen, J., O. Elpeleg, J. Smeitink, R. Smeets, S. Stockler-Ipsiroglu, H. Mandel, R. Sengers, F. Trijbels and L. van den Heuvel (2001). "Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy." Ann Neurol**49**(2): 195-201.
- Loeffen, J., J. Smeitink, R. Triepels, R. Smeets, M. Schuelke, R. Sengers, F. Trijbels, B. Hamel, R. Mullaart and L. van den Heuvel (1998). "The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome." Am J Hum Genet**63**(6): 1598-1608.
- Loeffen, J. L., J. A. Smeitink, J. M. Trijbels, A. J. Janssen, R. H. Triepels, R. C. Sengers and L. P. van den Heuvel (2000). "Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects." Hum Mutat**15**(2): 123-134.
- Löffler, G. (2001). "Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie." Springer Verlag, Berlin.
- Mayr, J. A., O. Bodamer, T. B. Haack, F. A. Zimmermann, F. Madignier, H. Prokisch, C. Rauscher, J. Koch and W. Sperl (2011). "Heterozygous mutation in the X chromosomal NDUFA1 gene in a girl with complex I deficiency." Mol Genet Metab**103**(4): 358-361.
- Mitchell, A. L., J. L. Elson, N. Howell, R. W. Taylor and D. M. Turnbull (2006). "Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism?" J Med Genet**43**(2): 175-179.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature**191**: 144-148.

---

Murken, J. D., T. Grimm, E. Holinski-Feder and K. Zerres (2011). "Taschenlehrbuch Humangenetik." Thieme, Stuttgart.

O'Toole, J. F., Y. Liu, E. E. Davis, C. J. Westlake, M. Attanasio, E. A. Otto, D. Seelow, G. Nurnberg, C. Becker, M. Nuutinen, M. Karppa, J. Ignatius, J. Uusimaa, S. Pakanen, E. Jaakkola, L. P. van den Heuvel, H. Fehrenbach, R. Wiggins, M. Goyal, W. Zhou, M. T. Wolf, E. Wise, J. Helou, S. J. Allen, C. A. Murga-Zamalloa, S. Ashraf, M. Chaki, S. Heeringa, G. Chernin, B. E. Hoskins, H. Chaib, J. Gleeson, T. Kusakabe, T. Suzuki, R. E. Isaac, L. M. Quarmby, B. Tennant, H. Fujioka, H. Tuominen, I. Hassinen, H. Lohi, J. L. van Houten, A. Rotig, J. A. Sayer, B. Rolinski, P. Freisinger, S. M. Madhavan, M. Herzer, F. Madignier, H. Prokisch, P. Nurnberg, P. K. Jackson, H. Khanna, N. Katsanis and F. Hildebrandt (2010). "Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy." J Clin Invest**120**(3): 791-802.

Oefner, P. and P. Underhill (1995). "Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)." Am J Hum Genet**57**:266.

Ogilvie, I., N. G. Kennaway and E. A. Shoubridge (2005). "A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy." J Clin Invest**115**(10): 2784-2792.

Ostergaard, E., R. J. Rodenburg, M. van den Brand, L. L. Thomsen, M. Duno, M. Batbayli, F. Wibrand and L. Nijtmans (2011). "Respiratory chain complex I deficiency due to NDUFA12 mutations as a new cause of Leigh syndrome." J Med Genet**48**(11): 737-740.

Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, B. Chang, S. A. Sheth, S. B. Vafai, S. E. Ong, G. A. Walford, C. Sugiana, A. Boneh, W. K. Chen, D. E. Hill, M. Vidal, J. G. Evans, D. R. Thorburn, S. A. Carr and V. K. Mootha (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." Cell**134**(1): 112-123.

Pagniez-Mammeri, H., A. Lombes, M. Brivet, H. Ogier-de Baulny, P. Landrieu, A. Legrand and A. Slama (2009). "Rapid screening for nuclear genes mutations in isolated respiratory chain complex I defects." Mol Genet Metab**96**(4): 196-200.

Potluri, P., A. Davila, E. Ruiz-Pesini, D. Mishmar, S. O'Hearn, S. Hancock, M. Simon, I. E. Scheffler, D. C. Wallace and V. Procaccio (2009). "A novel NDUFA1 mutation leads to a progressive mitochondrial complex I-specific neurodegenerative disease." Mol Genet Metab**96**(4): 189-195.

Prober, J. M., G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen and K. Baumeister (1987). "A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides." Science**238**(4825): 336-341.

Ruskova, L. and V. Raclavsky (2011). "The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**155**(3): 239-252.

Riordan-Eva, P. and A. E. Harding (1995). "Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations." J Med Genet**32**(2): 81-87.

Ririe, K. M., R. P. Rasmussen and C. T. Wittwer (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal Biochem**245**(2): 154-160.

Rotig, A. and A. Munnich (2003). "Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders." J Am Soc Nephrol**14**(12): 2995-3007.

Saada, A., S. Edvardson, M. Rapoport, A. Shaag, K. Amry, C. Miller, H. Lorberboum-Galski and O. Elpeleg (2008). "C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I." Am J Hum Genet**82**(1): 32-38.

Saada, A., R. O. Vogel, S. J. Hoefs, M. A. van den Brand, H. J. Wessels, P. H. Willems, H. Venselaar, A. Shaag, F. Barghuti, O. Reish, M. Shohat, M. A. Huynen, J. A. Smeitink, L. P. van den Heuvel and L. G. Nijtmans (2009). "Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease." Am J Hum Genet**84**(6): 718-727.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science**239**(4839): 487-491.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A**74**(12): 5463-5467.

Sarzi, E., M. D. Brown, S. Lebon, D. Chretien, A. Munnich, A. Rotig and V. Procaccio (2007). "A novel recurrent mitochondrial DNA mutation in ND3 gene is associated with isolated complex I deficiency causing Leigh syndrome and dystonia." Am J Med Genet A**143**(1): 33-41.

Scaglia, F., J. A. Towbin, W. J. Craigen, J. W. Belmont, E. O. Smith, S. R. Neish, S. M. Ware, J. V. Hunter, S. D. Fernbach, G. D. Vladutiu, L. J. Wong and H. Vogel (2004). "Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease." Pediatrics**114**(4): 925-931.

Schaefer, A. M., R. W. Taylor, D. M. Turnbull and P. F. Chinnery (2004). "The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future." Biochim Biophys Acta**1659**(2-3): 115-120.

Schuelke, M., J. Smeitink, E. Mariman, J. Loeffen, B. Plecko, F. Trijbels, S. Stockler-Ipsiroglu and L. van den Heuvel (1999). "Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy." Nat Genet**21**(3): 260-261.

Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, M. Schuelke and D. Seelow (2010). "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations." Nat Methods**7**(8): 575-576.

Schwartz, M. and J. Vissing (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA." N Engl J Med**347**(8): 576-580.

Smeitink, J., L. van den Heuvel and S. DiMauro (2001). "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation." Nat Rev Genet**2**(5): 342-352.

Sperl, W., P. Freisinger, H. Mayr and P. Burgard (2009). "Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS): Diagnostik und Therapieansätze bei Mitochondriopathien im Kindes- und Jugendalter."  
from [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/027-016\\_S2\\_Diagnostik\\_und\\_Therapieansaezte\\_bei\\_Mitochondriopathien\\_im\\_Kindes-\\_und\\_Jugendalter\\_03-2009\\_03-2012.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/027-016_S2_Diagnostik_und_Therapieansaezte_bei_Mitochondriopathien_im_Kindes-_und_Jugendalter_03-2009_03-2012.pdf).



- Swalwell, H., D. M. Kirby, E. L. Blakely, A. Mitchell, R. Salemi, C. Sugiana, A. G. Compton, E. J. Tucker, B. X. Ke, P. J. Lamont, D. M. Turnbull, R. McFarland, R. W. Taylor and D. R. Thorburn (2011). "Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations." Eur J Hum Genet**19**(7):769-775.
- Sugiana, C., D. J. Pagliarini, M. McKenzie, D. M. Kirby, R. Salemi, K. K. Abu-Amero, H. H. Dahl, W. M. Hutchison, K. A. Vascotto, S. M. Smith, R. F. Newbold, J. Christodoulou, S. Calvo, V. K. Mootha, M. T. Ryan and D. R. Thorburn (2008). "Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease." Am J Hum Genet**83**(4): 468-478.
- Taylor, R. W., A. A. Morris, M. Hutchinson and D. M. Turnbull (2002). "Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation." Eur J Hum Genet**10**(2): 141-144.
- Taylor, R. W., R. Singh-Kler, C. M. Hayes, P. E. Smith and D. M. Turnbull (2001). "Progressive mitochondrial disease resulting from a novel missense mutation in the mitochondrial DNA ND3 gene." Ann Neurol**50**(1): 104-107.
- Triepels, R. H., L. P. van den Heuvel, J. L. Loeffen, C. A. Buskens, R. J. Smeets, M. E. Rubio Gozalbo, S. M. Budde, E. C. Mariman, F. A. Wijburg, P. G. Barth, J. M. Trijbels and J. A. Smeitink (1999). "Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I." Ann Neurol**45**(6): 787-790.
- Tuppen, H. A., E. L. Blakely, D. M. Turnbull and R. W. Taylor (2010). "Mitochondrial DNA mutations and human disease." Biochim Biophys Acta**1797**(2): 113-128.
- Ugalde, C., R. H. Triepels, M. J. Coenen, L. P. van den Heuvel, R. Smeets, J. Uusimaa, P. Briones, J. Campistol, K. Majamaa, J. A. Smeitink and L. G. Nijtmans (2003). "Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene." Ann Neurol**54**(5): 665-669.
- Ugalde, C., R. Vogel, R. Huijbens, B. Van Den Heuvel, J. Smeitink and L. Nijtmans (2004). "Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies." Hum Mol Genet**13**(20): 2461-2472.
- Valentino, M. L., P. Barboni, C. Rengo, A. Achilli, A. Torroni, R. Lodi, C. Tonon, B. Barbiroli, F. Fortuna, P. Montagna, A. Baruzzi and V. Carelli (2006). "The 13042G-> A/ND5 mutation in mtDNA is pathogenic and can be associated also with a prevalent ocular phenotype." J Med Genet**43**(7): e38.
- von Kleist-Retzow, J. C., V. Cormier-Daire, P. de Lonlay, B. Parfait, D. Chretien, P. Rustin, J. Feingold, A. Rotig and A. Munnich (1998). "A high rate (20%-30%) of parental consanguinity in cytochrome-oxidase deficiency." Am J Hum Genet**63**(2): 428-435.
- Vossen, R. H., E. Aten, A. Roos and J. T. den Dunnen (2009). "High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening." Hum Mutat**30**(6): 860-866.
- Wagner, T., D. Stoppa-Lyonnet, E. Fleischmann, D. Muhr, S. Pages, T. Sandberg, V. Caux, R. Moeslinger, G. Langbauer, A. Borg and P. Oefner (1999). "Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations." Genomics**62**(3): 369-376.

Wallace, D. C., G. Singh, M. T. Lott, J. A. Hodge, T. G. Schurr, A. M. Lezza, L. J. Elsas, 2nd and E. K. Nikoskelainen (1988). "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy." Science**242**(4884): 1427-1430.

Wittwer, C. T. (2009). "High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations." Hum Mutat**30**(6): 857-859.

Wittwer, C. T., G. H. Reed, C. N. Gundry, J. G. Vandersteen and R. J. Pryor (2003). "High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen." Clin Chem**49**(6): 853-860.

Yin, X., L. Zheng, Q. Liu, L. Lin, X. Hu, Y. Hu and Q. Wang (2013). "High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a meta-analysis." J Clin Microbiol**51**(10): 3294-3349.

Zeviani, M. and S. Di Donato (2004). "Mitochondrial disorders." Brain**127**(10): 2153-2172.

Zhou, L., L. Wang, R. Palais, R. Pryor and C. T. Wittwer (2005). "High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution." Clin Chem**51**(10): 1770-1777.

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der letzten Jahre bei meiner Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Meitinger für die Überlassung des Dissertationsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen und seine freundliche und konstruktive Unterstützung.

Bei meinem wissenschaftlichen Betreuer, Dr. Holger Prokisch, bedanke ich mich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe dieses Thema bearbeiten zu können sowie für seine Anregungen und Hilfestellungen bei auftretenden Fragen und Problemen.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik für die freundliche gemeinsame Arbeit. Insbesondere sei hier Dr. Uwe Ahting genannt, der mich durch seine engagierte konstruktive Diskussionsbereitschaft und fachlich sehr wertvollen Ratschläge allzeit gerne unterstützt hat. Bei Frau Dr. Anna Benet-Pages aus der Nachbararbeitsgruppe möchte ich mich für ihre aufmunternden Worte und die freundliche Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen bedanken.

Die technischen Assistentinnen Anne Löschner und ganz besonders Rosa Hellinger haben durch ihre praktischen Ratschläge und zahlreichen wie tatkräftigen Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeit sehr zum Gelingen des Mutationsscreens beigetragen.

Meinen Eltern gilt mein tiefster Dank. Sie haben mir meinen Lebensweg und diese Arbeit durch ihre langjährige finanzielle Hilfe während des Studiums überhaupt erst ermöglicht und mir dabei stetes Vertrauen in das erfolgreiche Zuendeführen dieser Arbeit entgegengebracht.

Mein allerletzter und dabei größter persönlicher Dank gehört meinem Freund Boris, der mich durch alle Höhen und insbesondere Tiefen während dieser Arbeit begleitet hat. Vielen Dank für die intensive und kritische Durchsicht des Manuskripts und die unzähligen Vorschläge und Hilfestellungen. Er war mir dank seiner Liebe und Geduld, seiner stets offenen Tür für alle Probleme, Sorgen und Zweifel die wertvollste Hilfe.



---

## Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse der Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Herzer, M., J. Koch, H. Prokisch, R. Rodenburg, C. Rauscher, W. Radauer, R. Forstner, P. Pilz, B. Rolinski, P. Freisinger, F. Madignier, J. A. Mayr and W. Sperl (2010).** "Leigh Disease with Brainstem Involvement in Complex I Deficiency due to Assembly Factor NDUFAF2 Defect." *Neuropediatrics***41**(1): 30-34.

**O'Toole, J. F., Y. Liu, E. E. Davis, C. J. Westlake, M. Attanasio, E. A. Otto, D. Seelow, G. Nurnberg, C. Becker, M. Nuutinen, M. Karppa, J. Ignatius, J. Uusimaa, S. Pakanen, E. Jaakkola, L. P. van den Heuvel, H. Fehrenbach, R. Wiggins, M. Goyal, W. Zhou, M. T. Wolf, E. Wise, J. Helou, S. J. Allen, C. A. Murga-Zamalloa, S. Ashraf, M. Chaki, S. Heeringa, G. Chernin, B. E. Hoskins, H. Chaib, J. Gleeson, T. Kusakabe, T. Suzuki, R. E. Isaac, L. M. Quarmby, B. Tennant, H. Fujioka, H. Tuominen, I. Hassinen, H. Lohi, J. L. van Houten, A. Rotig, J. A. Sayer, B. Rolinski, P. Freisinger, S. M. Madhavan, M. Herzer, F. Madignier, H. Prokisch, P. Nurnberg, P. K. Jackson, H. Khanna, N. Katsanis and F. Hildebrandt (2010).** "Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy." *J Clin Invest***120**(3): 791-802.

**Mayr, J. A., O. Bodamer, T. B. Haack, F. A. Zimmermann, F. Madignier, H. Prokisch, C. Rauscher, J. Koch and W. Sperl (2011).** "Heterozygous mutation in the X chromosomal NDUFA1 gene in a girl with complex I deficiency." *Mol Genet Metab***103**(4): 358-361.

**Haack, T. B., F. Madignier, M. Herzer, E. Lamantea, K. Danhauser, F. Invernizzi, J. Koch, M. Freitag, R. Drost, I. Hillier, B. Haberberger, J. A. Mayr, U. Ahting, V. Tiranti, A. Rotig, A. Iuso, R. Horvath, M. Tesarova, I. Baric, G. Uziel, B. Rolinski, W. Sperl, T. Meitinger, M. Zeviani, P. Freisinger and H. Prokisch (2012).** "Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9." *J Med Genet***49**(2): 83-89.