Aus dem Friedrich-Baur-Institut an der Neurologischen Klinik der Universität München - Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

Hochdurchsatz-Mutationsscreen der mitochondrialen tRNA- und rRNA-Gene bei 376 Patienten mit Atmungskettendefekten

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

> vorgelegt von Martin Freitag aus Heidelberg 2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Thomas Klopstock

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein Prof. Dr. Gunnar Schotta

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. Holger Prokisch (Ph.D.)

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

08.03.2012

Gewidmet meinen Eltern (allen Vieren)

Wer das Unerwartete nicht erwartet, wird es nicht finden. Für ihn wird es unaufspürbar sein und unzugänglich. (Heraklit)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLE	ITUNG	1
	1.1 D	AS MITOCHONDRIALE GENOM	1
	1.2 V	ERERBUNG DES MITOCHONDRIALEN GENOMS	2
	1.3 D	IE ATMUNGSKETTE	2
	1.4 Ü	BERSICHT ÜBER DIE ATMUNGSKETTENDEFEKTE	5
	1.4.1	Klinische Phänotypen	7
	1.4.2	Die Bedeutung der mitochondrialen tRNA in Atmungskettendefekten	8
	1.4.3	Die Bedeutung der mitochondrialen rRNA in Atmungskettendefekten	9
	1.5 M	ITOCHONDRIALE MUTATIONEN	9
	1.5.1	Heteroplasmie versus Homoplasmie	9
	1.5.2	Argumente für die Pathogenität einer mtDNA-Mutation	
	1.5.3	Definition einer mitochondrialen Neumutation	
	1.6 Z	ELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	
2	MATE	RIAL UND METHODEN	13
	21 M		13
	211	Allaemeiner Laborbedarf	13
	2.1.2	Analysegeräte	
	2.1.3	Reagenzien	
	2.1.4	Enzvme	
	2.1.5	Platten und Plattenzubehör	
	2.1.6	Software	
	2.2 M	ETHODEN	
	2.2.1	Übersicht	
	2.2.2	Patientenkollektive - Herkunft des genetischen Materials	
	2.2.3	Konzentrationsbestimmung	
	2.2.4	PCR	
	2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	
	2.2.6	Design der Primer	20
	2.2.7	GenomiPhi	20
	2.2.8	Organisation der Platten	21
	2.2.9	PCR mit 384-Loch-Platten	22
	2.2.10	Schmelzkurvenanalyse und Auswertung	22
	2.2.11	PCR-Aufreinigung	26
	2.2.12	Sequenzierung	27
	2.2.13	Ethanol-Fällung	28
	2.2.14	Genotypisierung und Datenbanksuche	28
	2.2.15	Alignment	29
3	ERGE	BNISSE	30

	3.1	KONZENTRATIONSMESSUNGEN	30
	3.2	PRIMERTEST MITTELS GELELEKTROPHORESE	30
	3.3	HOCHDURCHSATZ-MUTATIONSANALYSE UND GENOTYPISIERUNG	31
	3.4	SEQUENZIERUNG	32
	3.5	Detektierte Varianten	33
	3.6	VARIABILITÄT	37
4	DISI	KUSSION	39
	4.1	METHODENVERGLEICH	39
	4.2	BEGRIFFSDEFINITION POLYMORPHISMUS, VARIANTE UND MUTATION	41
	4.3	DATENBANKEN	43
	4.4	MUTATIONEN BEI PATIENTEN MIT KOMPLEX I+IV-DEFEKT	45
	4.4.	1 G1886A (16S-rRNA) und G12256A (tNRA-Serin(AGY)) - Patient 31673	45
	4.4.2	2 A2239G hom. in der 16S-rRNA - Patientin 36333	46
	4.5	MUTATIONEN BEI PATIENTEN MIT KOMPLEX I-DEFEKT	47
	4.5.	1 1659insTT hom. in der tRNA-Valin - Patient 33354	47
	4.5.2	2 T1607C hom. in der tRNA-Valin - Patient 33267	48
	4.5.	3 G1767A hom. in der 16S-rRNA - Patient 33485	49
	4.5.4	4 A7570G in der tRNA-Aspartat - Patient 35803	50
	4.5.	5 14754delC im Cyt. B und A3243G in der tRNA-Leu(UUR) - Patient 33486	51
	4.6	BEREITS BEKANNTE MUTATIONEN MIT HOHER PATHOGENETISCHER EVIDENZ	54
	4.6.	1 A3302G in tRNA-Leucin(UUR)	54
	4.6.2	2 A1555G in der 12S-rRNA	55
	4.6.	3 T3250C in der tRNA-Leucin(UUR)	56
	4.6.4	4 T10191C p.S45P hom. in ND3	57
	4.6.	5 G15894A und A15924G in der tRNA-Threonin - Patient 38550	58
	4.7	VARIANTEN MIT WIDERSPRÜCHLICHER EVIDENZ	60
	4.7.	1 T4216C p.Y304H hom. in ND1	60
	4.7.2	2 T4336C hom. in der tRNA-Glutamin	60
	4.7.	3 A12308G in der tRNA-Leucin(CUN)	61
	4.7.4	4 T5814C in der tRNA-Cystein	64
	4.7.	5 G15928A in der tRNA-Threonin	65
	4.7.0	6 G7444A p.Ter513K in der Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1	66
	4.7.	7 C571A in der Kontrollregion (D-Loop) – Patient 35843	67
	4.7.8	8 T634C hom. in der tRNA-Phenylalanin – Patient 34853	68
	4.7.	9 5743delC (Patient 36349) und A5747G (Patient 34850) im L-Strang	69
	4.7.	10 C1011A und T1386C in der 12S-rRNA	72
5	zus	AMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	73
6	ANF	IANG	75
	6.1	BILDER	75
	6.1.	1 16S-rRNA 2D-Modell	75

	6.1.2	2 12S-rRNA 2D-Modell	76
	6.1.3	3 tRNA-Serin(AGY) 2D-Modell	77
	6.1.4	4 tRNA-Aspartat 2D-Modell	
	6.1.	5 tRNA-Valin 2D-Modell	79
	6.2	TABELLEN	80
	6.2.	1 Komplex I Ergebnisse	
	6.2.2	2 Komplex I+IV Ergebnisse	
	6.2.3	3 Biochemische Daten ausgewählter Patienten und Patientenkollektiv	90
	6.2.4	4 Primer	93
	6.3	REVISED CAMBRIDGE SEQUENCE	94
	6.4	MITOMAP SUBMISSIONS	94
	6.5	VERWENDUNG	94
	6.6	DANKSAGUNG	94
7	VER	ZEICHNISSE	95
	7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
	7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96
	7.3	TABELLENVERZEICHNIS	97
	7.4	LITERATURVERZEICHNIS	99
8	LEB	ENSLAUF	106

Anmerkung:

In Ribonukleinsäure existiert natürlicherweise Uracil anstelle von Thymidin (wie in Desoxyribonukleinsäure zu finden). Da jedoch viele Datenbanken und Schaubilder dies zum Teil nicht berücksichtigen, wird in dieser Arbeit im Falle von RNA stellvertretend von Thymidin gesprochen, obwohl Uracil richtigerweise zu verwenden wäre.

1 Einleitung

1.1 Das mitochondriale Genom

Das Mitochondrion ist nach heutigem Verständnis vor ungefähr 1,5 Milliarden Jahren als Alpha-Protobakterium in die vorläufige eukaryote Zelle durch Phagozytose eingewandert (Druzhyna et al., 2008). Im Sinne einer Endosymbiose ermöglichte die oxidative Phosphorylierung seither dem Eukaryonten eine weit effektivere Nutzung von Glukose im Gegensatz zur anaeroben Glykolyse. Aminosäuren- und Fettsäurenstoffwechsel, Zitratzyklus und Pyruvatoxidation sind weiterhin wichtige Funktionen, die durch das Mitochondrion ermöglicht wurden (DiMauro et al., 2003). Die Theorie der Endosymbiose wird durch mehrere, aber besonders durch zwei wichtige Argumente gestützt, die für diesen Ablauf der Geschichte plädieren: das Mitochondrion enthält eine innere und eine äußere Membran, wie es für einen eigenständigen Organismus bakteriellen Ursprungs typisch ist. Weiterhin ist es Träger einer eigenen Erbinformation, die bis heute in humanen Zellen, wenn auch in reduzierter Form, erhalten geblieben ist (Gray et al., 1999). Diese mitochondriale humane DNA enthält durchschnittlich 16569 Basenpaare, insgesamt 37 Gene sind auf diesem ringförmigen Molekül kodiert. Darunter enthalten sind 22 transfer-RNAs und 2 ribosomale RNAs, die die autonome Translation der restlichen 13 Proteine ermöglichen. Letztere sind essentielle Bestandteile der Atmungskette, die insgesamt aus über 85 Proteinen besteht (Abbildung 1). Die überwiegende Mehrheit der Atmungskettenproteine ist im Zellkern kodiert, wird dort hergestellt und schließlich über Membrantransporter in das Mitochondrion importiert und eingebaut (Zeviani et al., 2007). Von den 13 Proteinen kodieren 7 für Komplex I, 1 für Komplex III, 3 für Komplex IV und 2 für Komplex V. Komplex II ist in der Atmungskette der einzige, der komplett nukleär vertreten ist (Anderson et al., 1981).

Jedoch sind mit den mannigfaltigen neuen Möglichkeiten der Endosymbiose auch neue Angriffspunkte für Mutationen und Krankheiten entstanden. So ist die mitochondriale Mutationsrate etwa 10 bis 17fach höher als im Nukleus (Tuppen et al., 2010), exemplarisch mutieren die tRNA-Gene etwa 20mal und die rRNA-Gene circa 100mal schneller im Mitochondrion als die entsprechenden Gene im Kern (Pesole et al., 1999). Dies resultiert zum einen aus der Abwesenheit schützender Histon-Proteine und enzymatischer Reparaturmechanismen, sowie nicht zuletzt aus dem erhöhten oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies, dem die mtDNA ausgesetzt ist (Hannah et al., 1999). Darüber hinaus steht die uniparenterale polyploide Vererbung des mitochondrialen Genoms der biparentalen diploiden Vererbung des Kerngenoms diametral gegenüber (Zeviani and Carelli, 2007).

1.2 Vererbung des mitochondrialen Genoms

Ganz im Gegenteil zu der Mendel'schen Vererbungslehre des nukleären Genoms verhält sich die Vererbung der mtDNA. Die Mitochondrien des Spermiums werden nach einem Modell von Sutovsky et. al. nach Durchdringen der Eizelle bei der Befruchtung selektiv mit Ubiquitin markiert und durch einen Proteolyseapparat der Eizelle entfernt (Sutovsky et al., 2000). Das mitochondriale Genom wird daher nur von der Eizelle der Frau bereit gestellt. Dies hat für die Vererbung mitochondrialer Mutationen enorme Folgen. Durch das Entfernen der väterlichen mitochondrialen Erbinformation verringern sich auch drastisch die Möglichkeiten, eine mtDNA-Mutation weiterzugeben. Die einzige bekannte paternale Vererbung des mitochondrialen Genoms beim Menschen war mit einer Mutation assoziiert (Schwartz and Vissing 2002). Die mtDNA und damit auch mitochondriale Erkrankungen werden also grundsätzlich maternal vererbt (Montoya et al., 2009).

Da Mutationen in der mtDNA häufig den Effekt haben, auch Atmungskettendefekte hervorzurufen (Darin et al., 2001), soll zunächst die oxidative Phosphorylierung unter physiologischen Bedingungen skizziert werden.

1.3 Die Atmungskette

Die Atmungskette, eine Reihe von fünf Proteinkomplexen, befindet sich in der inneren Membran des Mitochondriums. Sie gewährleistet die Versorgung unseres Körpers mit dem universellen Energieträger Adenosintriphosphat, kurz ATP, und ermöglicht den Eukaryonten die Zellatmung. Dafür verstoffwechselt sie unter anderem den von uns eingeatmeten Sauerstoff und die Elektronen der Reduktionsäquivalente NADH/H⁺ und FADH² unter aeroben Bedingungen in einer Reihe von Redox-Reaktionen. Dabei werden die Elektronen zwischen den einzelnen Komplexen weitergeleitet. Der dadurch aufgebaute elektrische Gradient wird dafür benutzt, Protonen zwischen die äußere und innere Mitochondrienmembran - den Intermembranraum - zu befördern (Löffler et al., 2007). Dies erzeugt nach der erstmals 1961 schematisch beschriebenen chemiosmotischen Theorie von Peter Mitchell (Mitchell, 1961) einen Protonengradienten, der im letzten Schritt der Atmungskette durch den Komplex V, die ATP-Synthase, für das Erzeugen von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt wird. Für die Erkenntnis dieses fundamentalen Prinzips wurde dem Autor 1978 der Nobelpreis für Chemie verliehen. Im Folgenden sollen die einzelnen Komplexe detaillierter beschrieben werden.



Abbildung 1: Selbsterstelle schematische Darstellung der Atmungskette und des chemiosmotischen Prinzips unter Berücksichtigung der mitochondrialen und nukleären Komponenten (DiMauro and Schon, 2003). Die Anzahl der nukleär und mtDNA kodierten Einheiten schwankt zum Teil in der Literatur (siehe Text). CoQ: Coenzym Q (Ubichinon); Cyt. C: Cytochrom C.

Der erste Komplex der Atmungskette (NADH : Coenzym Q Oxidoreduktase oder NADH Dehydrogenase) oxidiert NADH und koppelt dies mit der Reduktion des CoenzymQ. Hierdurch werden bereits zu Beginn der Atmungskette netto vier Protonen in den Intermembranraum befördert. Komplex I ist dabei die Erste von zwei möglichen Eintrittsstellen in die Atmungskette, denn auch Komplex II kann für FADH² als Einstieg dienen. Komplex I selbst wird aus 45 Untereinheiten gebildet (Abbildung 1), von denen 7 auf dem mitochondrialen Genom kodiert sind. Die restlichen 38 Untereinheiten sind nukleär kodiert und werden über Membrantransporter in das Mitochondrium importiert (Vogel et al., 2007), wobei die Anzahl der nukleär kodierten Einheiten in der Literatur schwankt (DiMauro and Schon, 2003). Komplex II (Succinat : Ubichinon-Oxidoreduktase oder Succinat-Dehydrogenase) wird zusammengesetzt aus 4 nukleär kodierten Einheiten und katalysiert als membranständiger Teil des Zitratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei Komplex II wie auch Komplex I Ubichinon (Coenzym Q) zu Ubichinol reduziert (Löffler et al., 2007). Letzteres gibt seine Elektronen an den Komplex III (CoenzymQ : Cytochrom C Oxidoreduktase oder Cytochrom C Reduktase) weiter, der in Verbindung mit der Oxidation des Ubichinols netto 2 Protonen in den Intermembranraum transportieren kann. Komplex III wird aus einer mitochondrial kodierten Einheit und 10 nukleären zusammengesetzt. Das

Einleitung

Cytochrom C, ein aus ca. 100 Aminosäuren bestehender Elektonentransporter, übernimmt die Elektronen von Komplex III und überträgt sie auf den vierten Komplex, der diese für eine Knallgasreaktion (Sauerstoff + Wasserstoff -> Wasser) verwendet. Die Energie dieser exothermen Reaktion wird in den Transport von weiteren 4 Protonen investiert, die durch Komplex IV in den Intermembranraum gepumpt werden. Der vierte Komplex wird aus zehn nukleär und drei mitochondrial kodierten Einheiten zusammengesetzt (Löffler et al., 2007).

Im letzten Schritt der Atmungskette transportiert der fünfte Komplex (F_0F_1 -ATPase oder ATP-Synthase) pro Schritt etwa drei bis vier Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix, um mithilfe dieses Protonengradienten ATP aus ADP und anorganischem Phosphat zu erzeugen. Am Zusammenbau dieser Protonenpumpe sind zwei mitochondriale und etwa 14 nukleäre Komponenten beteiligt (DiMauro and Schon, 2003).

Aus der Kenntnis dieser Vorgänge wird ersichtlich, dass das Mitochondrion einen kleinen Teil an Untereinheiten für diese Komplexe zur Verfügung stellt. Diese Untereinheiten werden u.a. von der mtDNA transkribiert und über den eigenständigen mitochondrialen Translations-Apparat zu Proteinen erzeugt (Hanna et al., 1999). Zudem werden manche im Kern kodierte und translatierte Untereinheiten ebenfalls im Mitochondrion modifiziert, nachdem sie über Transporter importiert wurden. Man kennt mindestens 1300 nukleäre Gene, deren Produkte ins Mitochondrion importiert werden (Scaglia et al., 2008). Für den korrekten Zusammenbau der Untereinheiten am Beispiel des Komplex I sind viele weitere Moleküle und Proteine notwendig, wobei angenommen werden darf, dass einige noch nicht erschlossen sind und der Ablauf erst teilweise bekannt ist (Fernandez-Vizarra et al., 2008). Wie in Abbildung 2 gezeigt, können diese auf verschiedene Art und Weise prozessiert werden, bevor sie fertiggestellt sind und ihre spätere Funktion erfüllen. Unter der Annahme, dass Defekte bzw. ein unkorrekter Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten zu einer enzymatischen Dysfunktion der Komplexe führen können, ergibt sich die Konsequenz, dass die Untersuchung am Aufbau beteiligter Moleküle Hinweise für Ursachen von Atmungskettendefekten In konzentriert liefern kann. dieser Arbeit sich die Mutationsdiagnostik auf die mitochondriale tRNA und rRNA. Im folgenden Kapitel sollen daher der Aufbau und bekannte Defekte dieser Moleküle beschrieben, ihre Verwendung für den Hochdurchsatz-Mutationsscreen begründet und mögliche klinische Phänotypen vorgestellt werden.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Involvierung vieler verschiedener Elemente des mitochondrialen Translationsapparates zur Veranschaulichung der mannigfaltigen Möglichkeiten der Prozessierung von RNA-Molekülen. Mt-rRNA wird nach der Transkription zusammen mit nukleären Proteinen zu den Mitoribosomen zusammengesetzt. Die Enzyme, die für die Reifung mitochondrialer rRNA und tRNA benötigt werden, sind ebenso wie alle weiteren Translationsproteine (z.B. Initiations-, Elongations und Terminationssfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen) im Kern kodiert. Mitochondriale Produkte sind in blau, die nukleären in orange skizziert. TFB1M ist neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor B1 eine rRNA-Methylase.

Dieses Bild und die Beschriftung entstammt einer Veröffentlichung der Zeitschrift *Trends in Genetics* (Jacobs et al., 2005) und wurde zur Veranschaulichung der Thematik ins Deutsche übersetzt. *Mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier limited content, verifiziert durch Rightslink.*

1.4 Übersicht über die Atmungskettendefekte

Atmungskettendefekte sind als ein Teilgebiet der mitochondrialen Erkrankungen anzusehen und können durch Mutationen in mitochondrialen oder nukleär kodierten Genen verursacht werden (Moslemi et al., 2007). Grundsätzlich kann jeder Komplex einzeln aber auch in Kombination mit beliebigen anderen Komplexen betroffen sein. In einer 2000 veröffentlichen Studie aus dem *"Nijmegen Center for mitochondrial disorders" (Niederlande, Universität Nijmegen)*, die u.a. aus einer 5 jährigen Messungsperiode den prozentualen Anteil an Patienten mit unterschiedlichen Atmungskettendefekten präsentiert, stellt sich der isolierte Komplex I-Defekt mit etwa 23% als der häufigste aller Defekte dar (Loeffen et al., 2000). Unter den kombinierten fand sich am häufigsten der Typ I+IV mit ca. 8%. Die isolierten

Defekte waren mit 67,5% in dieser Studie häufiger vertreten als die kombinierten mit 32,5%. Leider wird in der Studie keine Angaben bezüglich der Größe der Patientenkollektive gemacht.

Die Messergebnisse des Klinikum München-Schwabings innerhalb von 10 Jahren (1.1.1998 bis 31.12.2007) bei insgesamt 642 Patienten mit Atmungskettendefekten ergaben jedoch deutlich unterschiedliche Werte. Hier überwogen die kombinierten Defekte im Verhältnis zu den isolierten ungefähr mit 2:1 (Tabelle 1).

Anzahl Pati	~%	
Isolierte Defekte	238	37
Komplex I	116	18
Komplex II/III	32	5
Komplex IV	90	14
Kombinierte Defekte	404	63
Komplexe I+IV	103	16
Komplexe I+II/III	28	4
Komplexe II/III+IV	75	12
Komplexe I+II/III+IV	157	25
Andere Kombinationen	41	6
Alle OXPHOS-Defekte	642	100

Tabelle 1: Messergebnisse des Klinikum München-Schwabings vom 1.1.1998 bis zum 31.12.2007.

OXPHOS-Defekte führen generell zu einer äußerst heterogenen Gruppe an klinischen Phänotypen, sind häufig charakteristisch aber nie spezifisch (Moslemi and Darin, 2007). Diese Tatsache kann durch den Umstand erklärt werden, dass Mutationen an verschiedensten Genloci das gleiche Resultat, also die Dysfunktion eines Teils der Atmungskette, hervorrufen können. Organe mit hohem Energiebedarf, wie z.B. Muskel, Herz und Gehirn sind zwar sehr häufig betroffen, aber auch nahezu jedes andere Organ kann beteiligt sein (Moslemi and Darin, 2007), was die Symptomvielfalt erklärt. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass mtDNA-Mutationen zu etwa 20% an Atmungskettendefekten beteiligt sind (Darin et al., 2001). Für etwa 50% aller Patienten mit Atmungskettendefekten kann eine genetische Ursache in Form von bereits bekannten Mutationen gefunden werden (Fernandez-Vizarra et al., 2008).



Abbildung 3: Präsentation der klinischen Heterogenität von rRNA- und tRNA-Mutationen sowie ihrer Position in der mtDNA - als blaue Gene dargestellt. Fett hervorgehobene Begriffe entsprechen Schwerpunkterkrankungen der jeweiligen Gene. MELAS: MELAS-Syndrom; PEO: progressive externe Ophtalmoplegie; EZM: Enzephalomyopathie; SA: Sideroblastische Anämie; SIDS: Plötzlicher Kindstot (Sudden infant death syndrome); MERRF: Myoklonus, Epilepsie, Ragged-red-fibers; PPK: Palmoplantares Keratoderm; LS: Leigh Syndrom; LHON: Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie.

Dieses Bild entstand aus verschiedenen Bestandteilen einer Veröffentlichung (DiMauro and Schon, 2003). Einzelne Elemente wurden geändert und ins Deutsche übersetzt, um die Bedeutung der tRNA und rRNA in mitochondrialen Erkrankungen hervorzuheben. Mit freundlicher Genehmigung des New England Journal of Medicine.

1.4.1 Klinische Phänotypen

Die klinische Heterogenität von tRNA- und rRNA-Mutationen wird in Abbildung 3 verdeutlicht. Doch es existieren nicht nur unterschiedlichste klinische Phänotypen für gleiche Mutationen, sondern auch umgekehrt können gleiche Syndrome durch verschiedene Mutationen erzeugt werden (Brandon et al., 2005). Die Symptome können weiterhin auch in jedem Alter obwohl schwerwiegende Verläufe in der Kindheit häufig sind. auftreten, Atmungskettendefekte treten mit einer Inzidenz von etwa 1:5000 auf (Fernandez-Vizarra et al., 2008). Die geschilderten Zusammenhänge veranschaulichen die Vielgestaltigkeit von mitochondrialen Erkrankungen und damit auch die Komplexität ihrer Diagnostik. Neben der Bestimmung von Basisuntersuchungen wie beispielsweise des Laktates und der CK, nehmen Muskelbiopsien zur lichtmikroskopischen Identifizierung von veränderten

Mitochondrien (ragged red fibers) und Cytochrom-C-Oxidase-negativen Fasern, MRT/CCT-Scans und die biochemische Analytik der Atmungskette einen zentralen Stellenwert ein, bevor schließlich durch molekulargenetische Untersuchungen die Diagnosestellung versucht wird (AWMF-Leitlinien, 2008). Die klinische Diagnostik ist daher bei der unterschiedlichen Ausprägung mitochondrialer Erkrankungen auch individuell abzustimmen. Eine häufige klinische Präsentation von Patienten mit mitochondrialer Enzephalomyopathie soll nun unter Berücksichtigung dieser Umstände vorgestellt werden.

Leigh-Syndrom

Bereits 1951 beschrieb erstmals Dr. Denis Leigh einen sieben Monate alten Jungen, der mit den Kernsymptomen Somnolenz, Blindheit, Taubheit und Spastik der Extremitäten auffiel und nach 6 Wochen verstarb (Leigh, 1951). Histopathologisch fanden sich insbesondere Läsionen im Thalamus, Cerebellum, in den Basalganglien und im Hirnstamm. Weitere Symptome können auch Optikusatrophie, Ataxie, psychomotorische Regression und Dystonie sein, sie zeigen meist eine schrittweise Verschlechterung. Die häufig durch einen isolierten Komplex I-Defekt hervorgerufene OXPHOS-Dysfunktion führt zu den charakteristischen neuropathologischen Korrelaten, die heutzutage durch die MRT-Technik bereits in frühen Stadien diagnostiziert werden können (Moslemi and Darin, 2007). Aber auch die anderen Komplexe können beteiligt sein (Finsterer, 2008).

Interessanterweise können viele verschiedene Mutationen das Leigh-Syndrom bzw. ein Leigh-like-Syndrom hervorrufen. Bekannte proteinkodierende mitochondriale Loci für Mutationen sind T10158C p.S34P (MTND3), T10191C p.S45P (MTND3), T8993C p.L156P (MTATP6). Auch in der tRNA wurden Positionen berichtet: C1624T (tRNA-Valin), G1644T (tRNA-Valin) und A5537insT (tRNA-Tryptophan) (Brandon et al., 2005). Insgesamt sind mehr als 20 Positionen mit Assoziation zum Leigh-Syndrom bekannt, darunter sowohl nukleäre wie auch mitochondriale Gene (Finsterer, 2008). Die Prognose des Leigh-Syndroms ist meist schlecht, die Patienten versterben häufig schon vor dem 5. Lebensjahr.

1.4.2 Die Bedeutung der mitochondrialen tRNA in Atmungskettendefekten

In Verbindung mit Atmungskettendefekten spielen die 22 mitochondrialen tRNA Gene eine besondere Rolle. Obwohl sie nur etwa 9% des mitochondrialen Genoms beanspruchen, sind von den über 200 bekannten krankheitsverursachenden Mutationen in der mtDNA über die Hälfte auf Mutationen in der tRNA zurückzuführen (Scaglia and Wong, 2008). In diesen Genen finden sich sogenannte Hotspots (Scaglia and Wong, 2008), in denen häufig Mutationen vorkommen. Doch auch neue Mutationen in diesen relativ kleinen Genen werden stetig identifiziert (Blakely et al., 2009). Zum Teil wurden Mutationen auch nur in einem Patienten bzw. in einer Familie gefunden (Sternberg et al., 2001). Diese Flut an neu

publizierten tRNA Mutationen, die in der letzten Dekade in den verschiedensten Journalen Einzug gehalten hat, verdeutlicht zum einen die Tatsache, dass Mutationen in der tRNA nicht immer kritisch genug auf Pathogenitätskriterien geprüft wurden (Bandelt et al., 2006). Zum anderen zeigt sie auch, dass diese Genloci eine scheinbar unerschöpfliche Quelle für die Erforschung von Mutationen in Atmungskettendefekten darstellen. Von den 22 tRNAs imponieren vor allem Isoleucin, Leucin(UUR) und Lysin, denen man momentan etwa 41% aller wahrscheinlich pathogenen Mutationen zuschreibt (Scaglia and Wong, 2008). Die tRNA-Leucin(UUR) sticht vor allem dadurch hervor, da sie alleine bereits 22 bekannte pathogene tRNA-Mutationen enthält und daher selbst einen Hotspot in der Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen darstellt (Scaglia and Wong, 2008). Eine exzellente Übersicht über bekannte tRNA-Mutationen und ihre Verteilung in der 2D-Struktur, sowie die Möglichkeit diese auf Konservierung in der Evolution zu überprüfen, bietet die Website http://mamittrna.u-strasbg.fr/ (Putz et al., 2007).

1.4.3 Die Bedeutung der mitochondrialen rRNA in Atmungskettendefekten

Im Gegensatz zu den sehr häufig vorkommenden tRNA-Mutationen sind bisher kaum Patienten mit rRNA-Mutationen in Zusammenhang mit Atmungskettendefekten beschrieben worden. Eine Konsultation bei der Datenbank MITOMAP liefert die Erkenntnis, dass etwa 16 Positionen in der 12S-rRNA und etwa 4 in der 16S-rRNA im Verdacht stehen, pathogen zu sein. Über 90% davon sind jedoch taubheitsassoziiert (Brandon et al., 2005). In Bezug auf Atmungskettendefekte gestaltet sich die Suche in der gegenwärtigen Literatur daher als spärlich. Dennoch ist eine Beteiligung der rRNA in Atmungskettendefekten grundsätzlich nicht ausgeschlossen. Beispielsweise wurde die Mutation A3090G in einer Patientin mit schwerer Myopathie gefunden und es lagen kombinierte Atmungskettendefekte der Komplexe I bis IV vor (Coulbault et al., 2007).

1.5 Mitochondriale Mutationen

1.5.1 Heteroplasmie versus Homoplasmie

Sind alle Mitochondrien eines Individuums gleich, wird dieser Zustand Homoplasmie genannt. Entwickelt sich eine neue Mutation, so existieren fortan zwei Typen von Mitochondrien: Wildtyp und Mutante. Dieser Zustand wird Heteroplasmie genannt. (Montoya et al., 2009). Weibliche Keimzellen durchlaufen ein Flaschenhalsprinzip (engl. "bottleneck") zwischen der Eizelle und dem Embryo, bei dem die Anzahl an mtDNA, die vererbt wird, drastisch reduziert wird (Cree et al., 2008). Aus diesem Modell heraus erklärt sich die

Beobachtung, dass niedrigprozentige heteroplasmische Mutationen, wenn sie vererbt werden, in der nächsten Generation nahezu homoplasmisch sein können. Dabei benötigt es prinzipiell eine Mindestanzahl betroffener Mitochondrien, bis sich eine klinische Manifestation zeigt. Dieser sogenannte "threshold effect" (zu Deutsch: "Schwelleneffekt") ist dabei individuell unterschiedlich. Die Schwelle für klinische Symptome ist in Geweben, die viel Energie verbrauchen, geringer. Diese Gewebe, wie beispielsweise Muskel, Herz oder Gehirn sind dadurch anfälliger auf die durch die Mutation resultierenden Defizite und reagieren schneller mit Dekompensation (DiMauro and Schon, 2003).

Für homoplasmische Mutationen hingegen ist der Nachweis einer krankheitsverursachenden Wirkung wesentlich schwieriger, vor allem wenn eine gesunde Mutter ebenfalls Trägerin der Mutation ist. Beispielsweise wurde die Mutation A5814G, die in hetero- (Manfredi et al., homoplasmische (Scuderi et al., 2007) Form die 1996) und mitochondriale Enzephalomyopathie hervorrufen kann, auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bei einem Patienten gefunden. Dennoch finden sich bei einer Konsultation der mtDB-Datenbank ebenfalls 10 Individuen, bei denen sich dieser Basenaustausch findet. Diese Datenbank ist laut Aussage des Autors primär aus den Sequenzanalysen gesunder Kontrollen entstanden. Dass also alle 10 Patienten an mitochondrialer Enzephalomyopathie erkrankt sind und dennoch erfasst wurden, ist sehr unwahrscheinlich. Wie kann also diese Mutation mit der Krankheit des Patienten singulär in Verbindung gebracht werden? Es ist anzunehmen, dass sich die pathologische Wirkung einiger Varianten/Mutationen in einem multifaktoriellen Kontext abspielt.

Dafür spricht, dass grundsätzlich eine Mutation eine weitere unter gewissen Bedingungen verstärken oder auch inhibieren kann. Dies zeigt sich am Beispiel der A7444G-Mutation, die wiederum die taubheitsassoziierte A1555G-Mutation beeinflusst (Yuan et al., 2005). Auch kann eine Haplogruppenzugehörigkeit, wie z.B. bei der Leber'schen Optikusneuropathie, entscheidend für die klinische Phänotypenausprägung sein (Hudson et al., 2007). Die Interpretation wird noch durch die häufig vorkommende Tatsache erschwert, dass 1) eine mitochondriale Mutation sehr heterogene Phänotypen hervorrufen kann und 2) gleiche Symptome bei unterschiedlichen Patienten auch von unterschiedlichen Mutationen bewirkt werden können (DiMauro and Schon, 2003).

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Komplexität der menschlichen Genetik es einem oft nicht erlaubt, eine einzelne mtDNA-Mutation als alleinige Ursache der Krankheit zu sehen. Selbst eine sehr häufige Variante, sei sie hetero- oder homoplasmisch, kann also krankheitsbegünstigend sein, wenn sie in einer komplexen multikausalen Verbindung mit anderen mtDNA-Mutationen steht (Bandelt et al., 2006). Die noch hinzukommenden möglichen Interaktionen mit anderen Genen, Proteinen, Transkriptions- und noch unbekannten weiteren Faktoren, spiegeln dadurch die Vielfältigkeit der humanen (mitochondrialen) Genetik wider und erschweren die Diagnostik.

1.5.2 Argumente für die Pathogenität einer mtDNA-Mutation

Um die krankheitsrelevante und biochemische Bedeutung einer Mutation wirklich verstehen zu können, bedarf es im Allgemeinen experimenteller Validierungsmodelle, die im Rahmen dieses Projektes nicht durchgeführt wurden. Mittels eines deskriptiven Modells können jedoch viele unklare Varianten besser beurteilt werden. Folgende Pathogenitätskriterien sind wissenschaftlich akzeptiert, um eine mtDNA-Mutation zu veröffentlichen:

"- Die Mutation muss im Patienten vorhanden sein aber nicht in Kontrollen.

- Sie muss in unterschiedlichen genetischen Hintergründen gefunden werden.
- Sie muss der beste Kandidat sein, wenn mehrere mtDNA-Mutationen vorhanden sind.
- Der Heteroplasmiegrad sollte mit dem Phänotyp korrelieren.
- Es ist eine in der Evolution stark konservierte Position verändert.
- Wichtige strukturelle oder funktionelle Positionen sind betroffen."

(Übersetzt aus: Montoya et al., 2009)

Der Stellenwert weiterführender Validierungsmodelle wird in Kapitel 4.1 diskutiert.

1.5.3 Definition einer mitochondrialen Neumutation

"The fact that a freshly detected mutation appears to be 'novel' relative to the published record has absolutely no significance within the framework of its potential pathogenicity or disease-association – unless further compelling evidence is provided." (Bandelt et al., 2006) (Die Tatsache, dass eine gefundene Mutation in Bezug auf die publizierten Datenbanken neu zu sein scheint, sagt absolut nichts über ihre Pathogenität oder Krankheitsverbindung aus, bis nicht weitere zwingende Anhaltspunkte gefunden wurden.)

Bandelt et. al beschrieben in ihrem Review (2006) "*What is a 'novel' mtDNA mutation – and does 'novelty' really matter?*" einen Algorithmus, mit dessen Hilfe die Wahrscheinlichkeit reduziert werden sollte, eine bereits bekannte mtDNA-Mutation als "neu" zu publizieren. Sie lieferten einige Beispiele von Fehlveröffentlichungen, die bei besserer Datenbank- und Internetrecherche hätten vermieden werden können. In diesen Publikationen wurden Mutationen als "neu" betitelt, obwohl sie bereits von großen mitochondrialen Haplogruppen-Studien und auch anderen Autoren längst als Varianten beschrieben waren. Da auch die Pathogenität von den Autoren mit dem Faktor "neu" verknüpft wurde, konnte dadurch leicht eine falsche Einschätzung entstehen. Aus den genannten Gründen heraus ist es wichtig,

einem Schema zu folgen, das Fehlinterpretationen vermeidet. Trotz der eindeutig hohen Relevanz der Datenbank MITOMAP ist die alleinige Konsultation nicht ausreichend (Bandelt et al. 2006).

Negative Suchergebnisse mit folgenden Phrasen sind wichtig, um eine Mutation als neu beschreiben zu können (als Beispiel dient die Mutation A8836G):

- " Datenbanksuche "8836" bei MITOMAP und mtDB
- Internetsuche bei Google (www.google.com) und Pubmed (www.pubmed.org) nach "A8836G", "8836A>G", "8836G", "8836" jeweils in Verbindung mit "mitchondrial disease" oder "human mtDNA".
- Überprüfung des phylogenetischen Zusammenhangs der Mutation und ihrer Haplogruppe mit den Schlüsselwörtern "complete mtDNA", "human mtDNA", mtDNA phylogeny", "mtDNA tree" und im Zusammenhang mit dem geographischen Aspekt z.B. "African"."
 (Übersetzt aus: Bandelt et al. 2006)

,

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Wie schon erwähnt, sind die genetischen Ursachen von etwa 50% aller Patienten mit Atmungskettendefekten ungeklärt. Im Rahmen einer Studie (Dr. Holger Prokisch, Institut für Humangenetik, Klinikum rechts der Isar, München) wurden viele verschiedene Gene auf Mutationen bei Patienten mit Atmungskettendefekten untersucht. Gerade bei der mitochondrialen tRNA kennt man die hohe Relevanz bei diesen Erkrankungen. Den untersuchten Patienten war gemein, dass bei ihnen die Hotspots in tRNA-Lysin, -Leucin(UUR) und -Cystein bereits ausgeschlossen waren. In dem vorliegenden Projekt sollten daher die Patienten mit kombiniertem Komplex I+IV- (n=189) und mit isoliertem Komplex I-Defekt (n=187) auf alle mitochondrialen tRNA- und rRNA-Gene untersucht werden, um mögliche neue Mutationen zu identifizieren und Rückschlüsse auf die Varianten-Verteilung in den relativ großen Patientenkollektiven zu erhalten. Die dabei gefundenen Abweichungen von der Referenzsequenz (Andrews et al., 1999) wurden mittels eines Argumentationsschemas auf Pathogenitätskriterien überprüft, um potentiell pathogene und neutrale Varianten zu unterscheiden.

Material und Methoden 2

2.1 Material

2.1.1 Allgemeiner Laborbedarf

Magnetmixer RH-KTLC	Ika, Staufen
Reagenzgefäße 1,5 ml und 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank Profi Line bei 6°C	Liebherr, Ochsenhausen
Eisschrank Premium bei -25°C	Liebherr, Ochsenhausen
Heizschrank 60°C	Memmert, Schwabach
Mikrowelle HF66021	Siemens, München
Eismaschine AF30	Scotsman, Vernon Hills (
Eisbehälter 1-6031	NeoLAB, Heidelberg
Kleine Zentrifuge/Vortexer FVL-2400 CombiSpin	PeQLAB, Erlangen
Zentrifuge 4k15	Sigma, Osterode am Har
Pipettierroboter TeMO (96- + 384-Well)	TeCaN, Männedorf (Sch
Autoklaviermaschine Bioclav	Schütt, Göttingen
pH-Meter pHLevel1 Inolab	WTW, Weilheim
UV-Lampe UVT-40M + Kamera E.A.S.Y. 440K	Herolab, Wiesloch
Gelelektrophorebehälter Mini Subcell GT, Subcell und Mini Subcell	Bio Rad, München
Gelelektrophoresekasten Power-Pac 300	Bio Rad, München
Kämme und Gelhalter	Bio Rad, München
MJ Research PT C-225 Gradient Cycler 96-Well	GMI, Minnesota (USA)
MJ Research PT-225TET Gradient Cycler 384-Well	GMI, Minnesota (USA)
Primererwärmer Neoblock 1 2-2503	NeoLab, Heidelberg
Einkanalpipetten Pipetman 2, 20, 200, 1000 (μl)	Gilson, Den Haag (Niede
Mehrkanalpipetten Pipetman ultra 12fach 1-20µl, 20- 300µl	Gilson, Den Haag (Niede
Mehrkanalpipetten Transferpette 0,5-10µl (8fach), 10- 100µl (12fach), 20-200µl (12fach)	Brand, Wertheim
Rainin Mehrkanalpipetten 1-10µl (12fach) und 20- 200µl (12fach)	Mettler-Toledo, Giessen
Stepperpipette Distriman mit Distritipaufsatz 125µl	Gilson, Den Haag (Niede
Pipettenspitzen Diamond Tower D10, DL10, D200, D1000	Gilson, Den Haag (Niede
Rainin Pipettenspitzen Stable Stak 10µl und 250µl	Mettler-Toledo, Giessen
Laborwaage	

Nünchen Vernon Hills (England) leidelberg Irlangen terode am Harz innedorf (Schweiz) ttingen lheim /iesloch lünchen lünchen lünchen esota (USA) esota (USA) eidelberg n Haag (Niederlande) n Haag (Niederlande) rtheim edo, Giessen n Haag (Niederlande) n Haag (Niederlande) edo, Giessen

2.1.2 Analysegeräte

DNA-Konzentrationsmesser Nanodrop ND-1000

Sequencer: ABI 3730 DNA Analyser Lightscanner High-Resolution-Melting-Analysis 384 System

2.1.3 Reagenzien

DNA Agarose 1.5g (15%) Ficoll PM 400 Orange G Sodium Salt (für Ficoll) DNA-Ladder GeneRuler 1Kb DNA Ladder Tris(hydroxymethy)aminomethan EDTA Borsäure (>99,8%) EtBr 1% (10 mg/ml) Natriumhypochlorit (verdünnt 0,12%) Ethanol 100% HPLC-H2O Lichrosolv Primer-Herkunft

Mineralöl dNTPs PureExtreme 25µmol, 0.25ml von jeweils 100mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP PCR-Farbstoff LCGreen Plus PCR Puffer AB-1217/HP 10x, 1.25 mL Volumen

MgCl 25 mM, 1.5mL Volumen

2.1.4 Enzyme

GenomiPHi DNA Amplification KitGE Healthcare, MünchenThermo-Star Taq DNA Polymerase (AB-1057) with
High Performance Buffer, Conc. 5U/µl, 250U VolumenAbgene, HamburgDNA Sequencing Kit dGTP BigDye Terminator v3.0
Ready Reaction (100 Reactions)Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.5 Platten und Plattenzubehör

96 Well Thermofast

Thermo Scientific/PeqLab Biotechnologie, Erlangen Applied Biosystems, Darmstadt Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)

Biozym, Hessisch Oldendorf Amersham Biosciences, Freiburg Sigma-Aldrich, Hamburg Fermentas, St. Leon-Rot Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Metabion international AG, Martinsried Sigma-Aldrich, Hamburg Fermentas, St. Leon-Rot Bioke, BZ Leiden (Niederlande) Thermo Scientific, Dreieich

Thermo Scientific, Dreieich

Abgene, Hamburg

96 Well Thermofast Skirted	Abgene, Hamburg
96 Well Round-Well (1 ml)	Quiagen, Hilden
96 Well Sequencing Plates Thermofast barcoded	Abgene, Hamburg
384 Well Thermofast White Mikrotiter	Abgene, Hamburg
Nucleofast 96 (PCR-Aufreinigung)	Macherey-Nagel, Düren
Manifold 384 Vakuumfiltrationssystem	Millipore
Genetic Analyzer Plate Septa 96-Well für ABI Sequencer	Abgene, Hamburg
PCR Folie AB-0558	Abgene, Hamburg
Einmalfolie Tape Pads 1018104	Quiagen, Hilden

2.1.6 Software

Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)
Idaho Technology Inc., Salt Lake City (USA)
GNU Public License http://staden.sourceforge.net/
http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/ bioedit.html
CLC Bio http://www.clcbio.com/

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht

Um nicht jeden der 376 Patienten einzeln sequenzieren zu müssen, um Kosten zu sparen und um die Suche nach Mutationen effizient zu gestalten, diente als zentraler Baustein des Mutationsscreens die PCR-Schmelzkurvenanalyse als Filter. Der Ablauf der kompletten Methode war daher für die Schmelzkurvenanalyse optimiert und ausgerichtet (Abbildung 4). *High-resolution-melting-analysis* ist jedoch generell mit einem sehr hohen DNA-Verbrauch verbunden. Um daher eine zu rasche Erschöpfung der DNA-Vorräte zu verhindern, wurde mittels genomweiter Amplifizierung eine Vervielfachung des genetischen Materials erreicht. Bevor die DNA für den Screen verwendet werden konnte, wurden die Patientennamen in Form von einer DNA-Nummer pro Patient in einer Datenbank kodiert. Als ein Teil einer Arbeitsgruppe waren in unterschiedlichem Ausmaß bereits DNA-Proben vorhanden, die Plattenzusammensetzung war zu Beginn dieser Arbeit insgesamt zu etwa 90% gestellt. Für die Komplettierung mussten daher zu Beginn dieses Projektes von weiteren 30 Proben die Konzentration gemessen, Test-PCRs angefertigt und die genomweite Amplifizierung erfolgen, bevor die Verdünnungsschritte und die darauffolgenden Experimente durchgeführt werden konnten. Die Methode ist im Rahmen einer separaten Dissertation von Florence Madignier aus unserer Arbeitsgruppe etabliert worden.

Testen der zugesendeten DNA mittels PCR auf Verwendbarkeit
Genomamplifizierung jeder DNA mittels GPni® auf 250 ng/µi
Zuordnung der Patienten-DNA auf 96-Loch-Platten
Mehrere Verdünnungsschritte von 250 ng/µl auf 1 ng/µl
Erzeugen von 384-Loch-Mikrotiterplatten mittels Pipettierroboter
PCR mit 384-Loch-Mikrotiterplatten
Schmelzkurvenanalyse
Auswahl der zu sequenzierenden Proben
Sequenzierung der ausgewählten Amplifikate
Genetische Typisierung

Abbildung 4: Prozessablauf der wichtigsten Bestandteile der verwendeten Methodik.

2.2.2 Patientenkollektive - Herkunft des genetischen Materials

189 Patienten mit kombiniertem I+IV-Defekt und 187 Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt der Atmungskette wurden auf Mutationen der mitochondrialen tRNA- und rRNA-Gene geprüft. Verschiedene Institutionen waren in Kooperation am Zusammentragen der DNA beteiligt: *Klinikum München-Schwabing* (Dr. B. Rolinski, Dr. U. Ahting, Prof. Dr. P. Freisinger), *Hauner'sche Kinderklinik* (München), *Friedrich-Baur-Institut* (München; Prof. T. Klopstock, Dr. R. Horvath), *Istituto Neurologico Carlo Besta* (Mailand; Dr. Zeviani), *Hôpital Necker* (Paris; Dr. Roetig) und das *Klinikum Salzburg* (Prof. Dr. W. Sperl, Dr. J. Mayr).

Nachdem der Atmungskettendefekt biochemisch durch die klinische Chemie der genannten Abteilungen gesichert war, wurde die bereits extrahierte DNA der Patienten der humangenetischen Abteilung des Helmholtz-Zentrums zur weiteren Forschung und Diagnostik zugesendet. Die extrahierte DNA stammte in nahezu allen Fällen aus Muskelbiopsat. Traf dies in Einzelfällen nicht zu, wurde die DNA-Quelle angegeben.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung

Der erste experimentelle Schritt bestand darin, eine Konzentrationsbestimmung der zugesandten DNA mit dem ND-1000 Spectrophotometer *Nanodrop* von Thermo Scientific vorzunehmen. Dies war wichtig, um spätere Verdünnungen zu errechnen, da die darauffolgende genomweite Amplifizierung mittels *GenomiPhi* eine Konzentration von 10 ng/µl erforderte. Dies wurde für 30 Proben durchgeführt.

Durchführung

Dazu wurde zunächst der Standardwert ermittelt, indem mit destilliertem Wasser geeicht wurde. Die Messfähigkeit des Gerätes wurde weiterhin geprüft, indem DNA mit bereits bekannter Konzentration (60 und 120 ng/µl) aufgetragen und verifiziert wurde. Nun konnte die Konzentration der Proben gemessen werden, pro Patient wurde jeweils 1.5 µl pure DNA aufgetragen. Auf jede Messung folgte eine gründliche Reinigung mit Wasser. Zuletzt wurde erneut mit der Test-DNA geprüft, um mögliche Abweichungen aufgrund von DNA-Vermischung auszuschließen.

2.2.4 PCR

Die PCR stellte in dieser Arbeit ein zentrales Verfahren dar, da sie durch Amplifizierung der gewünschten mitochondrialen Genabschnitte in Kombination mit dem Farbstoff *LCGreen Plus* die Schmelzkurvenanalyse und damit die Mutationssuche ermöglichte. DNA wurde mit dNTPs, einem Puffer, MgCl2, den Primern und einer Taq-Polymerase versetzt. Unter optimalen Temperaturen im PCR-Cycler vervielfachte die Polymerase gewünschte Abschnitte aus der menschlichen DNA, die durch die Primer definiert wurden (Mullis et al., 1987). Die Absorption des Farbstoffes wurde später beim Schmelzen der PCR-Produkte im Lightscanner-System gemessen. Daher wurde das PCR-Protokoll auf den Farbstoff ausgerichtet und für die Schmelzkurzvenanalyse optimiert.

PCR-Protokoll (Tabellen 2 und 3)

Um zu verhindern, dass die PCR-Mixtur aufgrund von Pipettierungenauigkeit leerlief, bevor sie komplett angesetzt war, wurde sie mit einem Faktor von 1.3 multipliziert. Weiterhin wurde eine Negativkontrolle miteinberechnet, um eine Kontamination der Mixtur mit DNA auszuschliessen. Folgende Formeln legen die Berechnung dar:

Faktor α = (Anzahl der PCR-Reaktionen + 1 Negativ-Kontrolle) x 1.3 ;

Mixtur mit unterschiedlicher DNA (alle in μ I)= (Primer x α) + (H2O x α) + (Puffer x α) + (dNTPs x α) + (MgCl2 x α) + (*LCGreen Plus* x α) + (Taq-Polymerase x α) ;

Mixtur mit unterschiedlichen Primern (alle in μ I) = (H2O x α) + (Puffer x α) + (dNTPs x α) + (MgCl2 x α) + (DNA x α) + (*LCGreen Plus* x α) + (Taq-Polymerase x α) ;

Tabelle 2: Links: Mixtur zum Testen neuer DNA und der Primer (Ansatz für 10μl). Rechts: Mixtur, wie sie durchweg für den Mutationsscreen mit dem 384-Loch-System verwendet wurde. Mittels Multikanalpipette wurde sie in die Platten eingefügt (Ansatz für 1225 μl).

	1x10 µl		1x1225µl
Primer 10 pmol/µl	0,4 µl	Primer 10 pmol/µl	48 µl
H2O	5 µl	H2O	1470 µl
10x Puffer (ohne Mg)	1 µl	10x Puffer (ohne Mg)	245 µl
dNTPs (2mM)	1 µl	dNTPs (2mM)	245 µl
MgCl2 (25mM)	1 µl	MgCl2 (25mM)	245 µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl	DNA (1 ng/µl)	eingetrocknet in 384-Loch- Platten
LCGreen Plus (Dye)	0,5 µl	LCGreen Plus (Dye)	122 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl	Taq-Polymerase	24,5 µl

Programm

Für alle PCR-Bedingungen wurden folgende Parameter im Cycler verwendet:

|--|

Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	94°C	30 sec.
Anlagerung	65°C	30 sec.
Erweiterung	72°C	1 min.
Wiederholungen	4	0X
Denaturierung	94°C	30 sec.
Heteroduplex Formation	25°C	30 sec.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in diesem Projekt generell dazu verwendet, eine durchgeführte PCR-Reaktion auf Erfolg zu überprüfen. Patienten-DNA (im Original wie auch in ihrer amplifzierten Form) und bestellte Primer konnten so getestet werden, ob sie für den Screen verwertbar waren. Eine PCR-Reaktion war dann erfolgreich, wenn sich eine klare Bande unter der UV-Lampe zeigte und mit der im Voraus bekannten Produktlänge übereinstimmte, was an der DNA-Leiter überprüft wurde. DNA-Proben, mit denen auch nach mehrfacher Durchführung einer PCR unter verschiedenen Bedingungen und unter Verwendung verschiedener Primer keine Bande erzeugt werden konnte, wurden aus dem

Screen ausgeschlossen. Umgekehrt galt dies für bestellte Primer, die mit einer Test-DNA eines anonymen Mitarbeiters des Helmholtz-Zentrums auf Verwertbarkeit geprüft wurden. Das Testen jeder zugesendeten Patienten-DNA war notwendig für die darauffolgende genomweite Amplifizierung mittels *GenomiPhi*.

Die negativ geladene DNA, die in kleine in das Gel ausgestanzte Taschen pipettiert wird, wandert in einem elektrischen Feld in einer Pufferlösung durch das engmaschige Agarosegel zur positiv geladenen Anode. Kürzere Fragmente bewegen sich weiter zur Anode als größere Fragmente, da diese im Gel zurückgehalten werden (Löffler et al., 2007). Eine erfolgte PCR-Reaktion kann nachgewiesen werden, indem man das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid (Le Pecq et al., 1966) - und damit das PCR-Produkt - mithilfe einer UV-Lampe sichtbar macht.

Durchführung

- 1) Verdünnung der DNA-Proben auf 10 ng/µl mit autoklaviertem destilliertem Wasser.
- 2) Herstellung des 10fach TBE-Puffers (pH 8,0) für 5I:
 255g Tris (840mM) wurden mit 137,5 g Borsäure (900 mM) und 18,75 g EDTA (20 mM) versetzt.

Daraufhin folgte das Auffüllen dieser Mischung auf 5 Liter mit destilliertem Wasser.

- 3) Herstellen eines TE-Puffers (pH 7,4) für 1I:
 372,24 mg EDTA (1 mM) werden mit 1,211 g Tris (10 mM) vermischt.
 Ein Soll-pH-Wert von 7,4 wurde mittels pH-Meter verifiziert.
- 4) Ficollsche Lösung:
 1.5g (15%) Ficoll wurde auf 10ml TE (pH 7,4) gegeben, dazu eine Spatelspitze Orange G von Sigma (Sodium Salt).
- 5) Herstellung des Agarosegels (1,5%):

6 mg *Biozym* DNA-Agarose wurden abgewogen und mit 400 ml TBE-Puffer gut vermischt. Nach 6 min. erhitzen bei 600 Watt wurde ca. 5 min. bei Raumtemperatur abgekühlt und danach 10 μl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Agarosegelmischung wurde bei 60 °C in einem Heizschrank gelagert.

6) Gelelektrophorese:

Die Größe und die Dauer einer Elektrophorese war abhängig von der Anzahl der Proben, die aufgetragen werden sollten. Nach Einstecken der Kämme in die dafür zugehörigen Behälter (von Bio-Rad) wurde mittels Wasserwaage die Lage des Gelhalters geeicht. Der Behälter wurde zu ca. 40% mit Agarosegelmischung aufgefüllt. Die Gelelektrophoresebehälter wurden mit TBE-Puffer aufgefüllt. Nach 30 min. Wartezeit wurden die Proben mittels Einkanalpipetten in die Geltaschen pipettiert. Die DNA-Leiter (*GeneRuler* von Fermentas, 1 kb) wurde jeweils in die erste

und die letzte Tasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 130 V, 400 mA und variabler Zeit (abhängig von Gelgröße, 12-40 min.) durchgeführt.

2.2.6 Design der Primer

Als zu untersuchende Gene wurden die mitochondrialen 22 Transfer-RNA und die 2 ribosomalen RNA Gene definiert.

Um spezifische PCR-Bedingungen für diesen Screen zu erreichen, war es wichtig, die optimale Annealingtemperatur der Primer genau zu ermitteln. Der zusätzlich in den PCR-Methoden verwendete Farbstoff *LCGreen Plus* verändert jedoch die Bedingungen. Daher wurde in diesem Screen die für die Schmelzkurvenanalyse entwickelte *Lightscanner Primer Design Software* (Version 1.0) zum Design der Primer benutzt, die speziell für das Lightscanner System entwickelt wurde. Dabei war es wichtig, dass ein Primerpaar auch wirklich nur das gewünschte Produkt erzeugte. Für diese Fragestellung wurde der Genome-Browser (http://genome.ucsc.edu/) konsultiert, indem man jeweils den Forward- und den Reverseprimer unter "In-Silico-PCR" eingab und das resultierende Produkt unter dem Eingabefeld "BLAT" einfügte. Mit diesem Alignment-Werkzeug konnte überprüft werden, ob das durch die selbsterzeugten Primerpaare entstandene Amplicon auch wirklich exakt mit dem gewünschten Produkt übereinstimmte (Zweig et al., 2008).

Die Annealingtemperatur der Primer wurde mittels Gelelektrophorese bei einem Temperaturgradienten zwischen 60 und 67 °C getestet. Die von Metabion gelieferte Primerkonzentration betrug 100 pmol/µl.

Die Primerliste findet sich im Anhang (Kapitel 6.2.4).

2.2.7 GenomiPhi

Da der Mutationsscreen einen hohen Bedarf und auch Verbrauch von DNA besaß, wurde jede Patienten-DNA mit einer DNA-Polymerase vom Typ Phi29 (*GenomiPhi Kit* von GE Healthcare) amplifiziert. Aus einem ursprünglich geringen Vorrat an DNA konnte so eine große Menge erreicht und dadurch auch beinahe erschöpfte Proben wieder erneuert werden. Das Enzym kopiert - unter Anwesenheit von dNTPs in einer optimalen Pufferlösung - mit sehr hoher Genauigkeit DNA in Form von fragmentierten Einzelsträngen, die im Durchschnitt mehr als 10kb lang sind (Holbrook et al., 2005). In zwei Studien zeigte diese Methode der genomweiten Amplifizierung im Vergleich zu anderen das höchste Maß an Reliabilität und Qualität (Dean et al., 2002; Pinard et al., 2006) und war daher optimal für den Hochdurchsatz-Mutationsscreen geeignet. Zu beachten ist dennoch, dass durch diesen Vorgang bei der DNA-Replikation Fehler in Form von Misinsertionen durch die Polymerase erzeugt werden können. Die Wahrscheinlichkeit einer Misinsertion und damit einer

artifiziellen Mutation beträgt abhängig vom Puffer und vom Nukleotid, das ersetzt wird, etwa $2,2 \times 10^{-5}$ bis 5 x 10^{-6} (Esteban et al., 1993). Jede gefundene Variante, die bei MITOMAP kein Sucherergebnis fand bzw. bei MITOMAP als Mutation notiert war, wurde daher ein zweites Mal mittels Sequenzierung aus der original zugeschickten DNA-Probe überprüft, um eine durch *GenomiPhi* künstlich erzeugte Mutation auszuschließen.

Es wurden insgesamt 30 Reaktionen mit dem GenomiPhi-Kit-System durchgeführt.

<u>Durchführung</u>

- 1) 2,5 μl pro DNA in einer Konzentration von 10 ng/μl wurden jeweils mit 22,5 μl spezieller Probenpufferlösung in eine 96-Loch-Platte versetzt.
- Für 3 Minuten wurden die Proben in einem PCR-Cycler bei 95°C erhitzt. Danach wurde auf 4°C gekühlt und auf Eis gelagert.
- Anschließend wurde die Mixtur f
 ür die Reaktionen vorbereitet. Jeweils 22,5 µl Reaktionspuffer und 2,5 µl Enzym wurden pro Probe berechnet, die Lagerung erfolgte auf Eis.
- 4) 25 µl wurden aus der Mixtur entnommen und in jedes Loch pipettiert.
- 5) Die Proben wurden schließlich bei 30°C für 4 Stunden in einem PCR-Cycler inkubiert, danach für 10 Minuten bei 65°C, um die Exonuklease-Aktivität der Polymerase zu inaktivieren. Die Konzentration nach Ablaufen der Reaktion betrug 1 µg/µl.
- Durch Hinzufügen von 150 μl TE-Puffer wurde eine Konzentration von 250 ng/μl und ein Volumen von 200μl erreicht.
- 7) Das Material wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.8 Organisation der Platten

Jedem Patienten wurde eine Position auf einer 96-Loch-Platte zugewiesen. Zwei 96-Loch-Platten pro Patientenkollektiv mussten auf 384-Loch-Platten verteilt werden.

In diesen musste eine Zielkonzentration von nur 1 ng/µl erreicht sein. Dabei sah es die Planung so vor, dass jeder Patient doppelt auf der Platte vorhanden sein sollte, um das Ausfallen einer PCR-Reaktion durch eine andere kompensieren zu können. Die amplifizierte DNA befand sich zu Beginn allerdings mit einer Konzentration von 250 ng/µl in 96-Loch-Platten. Es wurden daher zwei Verdünnungsschritte mit destilliertem autoklaviertem Wasser durchgeführt, um eine Zielkonzentration von 1 ng/µl zu erreichen.

- Verdünnung von 250 ng/μl der amplifizierten DNA auf 10 ng/μl (800 μl): 32 μl DNA wurden mit 768 μl Wasser versetzt (96-Loch-Platte Typ *Round-Well* 1ml).
- 2) Verdünnung der 10 ng/µl auf 1 ng/µl (800 µl): 80 µl DNA wurden mit 720 µl Wasser

versetzt (96-Loch-Platte Typ Round-Well 1ml).

Der Transfer vom 96-Loch-Platten auf 384-Loch-Platten wurde mittels eines Pipettierroboters erreicht (TeMo von TeCaN). Aus jeweils zwei 96-Loch-Platten (*Round-Well*, 1ml) mit globaler Konzentration von 1 ng/µl und einem Volumen von 800µl pro Loch, die ein Patientenkollektiv repräsentierten, konnten circa 68 384-Loch-Mikrotiterplatten erzeugt werden. Die Platten wurden über eine Nacht mit Krepppapier verdeckt, damit die DNA trocknen konnte. Danach wurden sie mit Einmalfolie versehen, bis sie gebraucht wurden.

2.2.9 PCR mit 384-Loch-Platten

Insgesamt umfasste der Screen 24 Gene (22 tRNAs, 2 rRNAs), die auf Mutationen in den Patientenkollektiven untersucht werden sollten. Da manchmal mehrere Gene in ein Amplicon zusammengefasst werden konnten, waren insgesamt nur 18 PCRs notwendig, um ein Patientenkollektiv (für alle Patienten daher 36 PCRs) auf die genannten Gene zu untersuchen. Eine Platte entsprach daher einer PCR. Die PCR-Mixtur wurde mittels Multikanalpipette auf die 384-Loch-Platten übertragen, und in einem speziellen PCR-Cycler (*PT-225TET Gradient Cycler*) wurde die Reaktion durchgeführt.

2.2.10 Schmelzkurvenanalyse und Auswertung

Mittels High-Resolution-Melting-Analysis konnten 384 Proben parallel auf Mutationen untersucht werden. Die Kernreagenzien für die PCR bestanden in den Primern, dem Farbstoff LCGreen Plus und der Patienten-DNA. Ohne dabei auf weitere spezielle Reagenzien, einer Real-Time-PCR, einer Allel-spezifischen PCR oder Sonden angewiesen zu sein (Liew et al., 2004), stellte die Schmelzkurvenanalyse eine optimale und effiziente Methode für das Aufsuchen von Einzelnukleotid-Polymorphismen und Mutationen dar. Spezifität und Sensitivität für heterozygote Mutationen liegen mit dieser Methode für Fragmente kleiner als 400 Basenpaare bei 100%, bei größeren PCR-Produkten erreicht die Sensitivität 96.1% und die Spezifität 99.4%. Obwohl ursprünglich für heterozygote Mutationsdetektion entwickelt, liegt die durchschnittliche Erkennungsrate auch bei homozygoten Mutationen des Menschen bei ca. 96.4% (Reed et al., 2007). Diese Angaben galten für nukleäre DNA. High-Resolution-Melting-Analysis konnte in Verbindung mit LCGreen Plus jedoch ohne weiteres auch für mitochondriale DNA verwendet werden. Dobrowolski et. al. beschrieben in ihrer Veröffentlichung, dass die Trennschärfe heteroplasmischer Mutationen zwischen 1-100% und die Erkennungsrate homoplasmischer Mutationen bei 96.5% lag (Dobrowolski et al., 2009).

Die Untersuchung von PCR-Produkten mit High-Resolution-Melting-Analysis wurde insbesondere durch die Gegenwart des DNA-Farbstoffs LCGreen Plus ermöglicht. Der Farbstoff lagerte sich bei der PCR-Reaktion in die DNA ein. Im Lightscanner-Instrument wurden die PCR-Produkte in den 384-Loch-Platten durch lineare Temperatursteigerung erhitzt, was bei einer bestimmten Temperatur zu einer Schmelzung der PCR-Produkte und zum Trennen des Doppelstranges und damit zum Aufbrechen von Domänen führte. Die Anzahl der schmelzenden Domänen war abhängig von der Größe des PCR-Produkts. Bis etwa 400bp zeigen die PCR-Produkte meist ein uniphasisches, zwischen 500-700bp meist ein biphasisches Muster (Reed et al., 2004). Durch das Aufbrechen der Doppelstränge sank die Intensität der Fluoreszenz (des Farbstoffes) im Laufe des Erhitzens, entsprechend der sinkenden Stabilität des Doppelstranges. Der dadurch entstandene und per Laserkamera gemessene Gradient wurde in der Software pro Probe durch eine Schmelzkurve repräsentiert. Die Fähigkeit des Farbstoffes auch Heteroduplexformationen zu erkennen, zeigte sich durch unterschiedliche Schmelzeigenschaften eines PCR-Produkts im Vergleich zum Wildtyp, was am Lightscanner-Instrument anhand der Schmelzkurven abgelesen werden konnte (Wittwer et al., 2003).

Die nun darauf folgende Auswertung der Schmelzkurven am Computer musste den Umstand berücksichtigen, die Auswertung der Schmelzkurven nach einem standardisiertem Schema, das im Protokoll beschrieben ist, vorzunehmen.

Durchführung der Analyse

Nachdem die PCR mit den 384-Loch-Platten abgeschlossen war, wurde vorbereitend für die Schmelzkurvenanalyse in jedes Loch 8 µl Mineralöl hinzugegeben. Die Platten wurden im Lightscanner-Instrument in Kombination mit der Lightscanner Software *Version 1.1.0.556* analysiert. Die Starttemperatur wurde auf 76°C gesetzt, die Endtemperatur betrug 96°C.

Durchführung der Auswertung

In der Auswertung der Schmelzkurven wurde festgelegt, welche Proben sequenziert werden sollten. Pro Patientenkollektiv wurden 18 PCRs mit entsprechend vielen 384-Loch-Platten durchgeführt. Fünf Schritte waren notwendig, um die Kurven mit der Software zu analysieren. Alle Einstellungen waren an die Herstellerempfehlungen angepasst.

- 1) Negativfilter (Abbildung 5)
- 2) Normalisierung (Abbildung 6)
- 3) Tm-Shift (Abbildung 7)
- 4) Farbgruppen-Zuweisung (Abbildung 8)
- 5) Auswählen der zu sequenzierenden Proben (Abbildung 9)



Abbildung 5: Eliminierung der Leerwerte und ausgefallener Proben. Dargestellt im Rechteck links oben sind 384 Proben einer 384-Loch-Platte, wobei 2 Quadrate jeweils einem Patienten entsprechen (A1, A2 = Patient 1; A3, A4 = Patient 2 etc.). Die sechs roten Doppelquadrate repräsentieren die Leerproben, die bewusst zur Fehlerkontrolle auf jeder Platte mitgeführt wurden. Im Falle einer Kontamination der Leerproben (eines dieser sechs roten Quadrate würde dann grün dargestellt sein) wäre die Platte nicht verwertbar gewesen. In diesem Beispiel ist auch keine Patientenprobe ausgefallen (ein grünes Quadrat würde dann rot dargestellt sein), wobei der Ausfall einer Probe (=eines Quadrats) durch ein Nachbarquadrat, das demselben Patienten entspricht, kompensiert werden kann. In diesem ersten Schritt wurden also die Schmelzkurven der ausgefallenen Proben inklusive der Leerwerte determiniert und entfernt, da die darauffolgenden Normalisierungs- und Analyseverfahren dies erforderten.

Im Rechten Diagramm sind die Schmelzkurven zu sehen. Auf der X-Achse ist die Temperatur, auf der Y-Achse die Fluoreszenz aufgetragen. Grüne Schmelzkurven entsprechen den grünen Quadraten im linken Rechteck, die roten in diesem Fall nur Leerkontrollen.



Abbildung 6: Normalisierung der Kurven. Da jede Probe einer Schwankung in der Fluoreszenz unterlag, mussten die gewonnenen Kurven normalisiert werden. Die beiden Normalisierungs-Intervalle wurden an einem Punkt platziert, an dem eine konstante Steigung herrschte. Dieser Abstand bewegte sich zwischen 1 bis 2°C auf der X-Achse.



Abbildung 7: Festlegung des Tm-Shifts auf den Wert 0.05. Feine Unterschiede in den Schmelzprofilen wurden eliminiert, indem die Kurven auf der X-Achse verschoben wurden. Dies wurde an einem Punkt (auf der Y-Achse, linkes Bild) durchgeführt, an dem ein größtmöglicher Temperaturabstand zwischen den Proben vorlag. Dieser Vorgang erleichterte die darauffolgende Gruppierung.



Abbildung 8: Farbgruppenzuweisung. Ursprünglich werden die Schmelzkurven einheitlich in einer Farbe ausgegeben (grau). Kurven, die annähernd gleich geschmolzen sind, wurden gruppiert und mit einer Farbe versehen. Die Farben des Diagramms links oben (384-Loch-Platte) entsprechen den Farben der Kurven im Schmelzkurvendiagramm rechts unten und rechts oben.

Durch ein ähnliches Schmelzprofil mehrerer Proben war auch eine Übereinstimmung der genetischen Sequenzen wahrscheinlich. Daher war es in diesem Schritt von besonderem Interesse, eine genaue Zuweisung zu erreichen, um die daraus resultierenden Sequenzierungsschritte zu optimieren. Sofern Schmelzprofile verschiedener Proben sehr unterschiedlich waren, bestand keine Schwierigkeit der Zuweisung. Waren die Kurven jedoch sehr ähnlich, so musste individuell entschieden werden, ob diese in eine große Gruppe, oder in eine neue kleine Gruppe zusammengefasst wurden.



Abbildung 9: Auswahl der Proben für die Sequenzierung. Mit "X" markierte Proben wurden sequenziert. Kam eine Farbe besonders häufig vor, so sprach dies dafür, dass die durch die Farbe repräsentierten Individuen aufgrund ihres ähnlichen Schmelzprofils auch eine ähnliche Sequenz des PCR-Produktes besaßen. Unabhängig von der Anzahl der Farben wurden zunächst maximal vier sequenziert und im Falle eines suspekten Befundes die restlichen dann nachgeholt. Da für jeden Patienten zur Sicherheit zwei PCR-Produkte angelegt wurden, wird, wie bereits in Abbildung 5 erwähnt, ein Patient jeweils durch zwei Quadrate repräsentiert, die einer ungeraden und darauffolgenden geraden Ziffer zugeordnet sind (z.B. A1 und A2, B3 und B4, etc.).

2.2.11 PCR-Aufreinigung

Die PCR-Aufreinigung schloss sich an die Schmelzkurvenanalyse an und hatte die Funktion, bei der PCR-Reaktion übrig gebliebene Abbauprodukte, Öl, Salze, den Farbstoff, Enzymreste, Nukleotide und Primer zu eliminieren. Verwendet wurden dafür 96-Loch-Platten (*Nucleofast* von Macherey-Nagel). Dabei bindet die DNA, die erhalten bleiben soll, in Anwesenheit einer hohen Salzkonzentration an eine Membran, die sich auf dem Boden der 96-Loch-Platten befindet (Macherey-Nagel, 2008). Unerwünschte Reste passieren die Membran und werden durch ein Vakuumfiltrationssystem (*Manifold 384 von Millipore*) abgesaugt.

Durchführung

- Nach der Schmelzkurvenanalyse wurden die zu sequenzierenden Proben bestimmt. Dabei befand sich in jedem Loch der 384-Loch-Platten eine Mischung aus 5 µl PCR-Produkt und 8 µl Mineralöl. Es wurden 8 µl mittels Einkanalpipette aus jeder Plattenposition aufgezogen, die sequenziert werden sollte und in eine neue 96-Loch-Platte (96-Well Thermofast von Abgene) aufgetragen.
- 2) Zugabe von 100 µl HPLC-H2O pro Loch.
- 3) Abzentrifugieren bei 2000g für 10 Sekunden, um Öl und PCR-Produkt/Wasser in 2

Phasen zu trennen.

- Von der unteren Phase wurden nun 100 µl des PCR-Wassergemisches in eine Nucleofast 96-Loch-Platte überführt.
- 5) Die Platte wurde auf das Vakuumfiltrationssystem gesetzt und bei 20 inches Hg für 9 min. abgesaugt.
- Um die Nucleinsäure von der Membranoberfläche zu lösen, pipettierte man in jedes Loch 20 µl HPLC-H2O mit der Multikanalpipette.
- Nach Durchmischen mit Pipette wurde das aufgereinigte PCR-Produkt in eine neue 96-Loch-Platte (96-Well Thermofast) überführt.

2.2.12 Sequenzierung

Ausgewählte Proben wurden mittels Sanger-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) auf Mutationen überprüft. Dabei wurde die ubiquitär gebräuchliche Variante mit vier (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) unterschiedlich farblich markierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) verwendet, die zusammen mit dNTPs und der Polymerase in dem hier verwendeten *BigDye Terminatior Kit 3.1* (Applied Biosystems) enthalten waren. In der Sequenzreaktion werden aus den doppelsträngigen PCR-Produkten Einzelstränge erzeugt. Entsprechend einer statistischen Verteilung werden nach jedem möglichen Nukleotid ddNTPs durch die Polymerase eingebaut. Die fehlende Hydroxygruppe der ddNTPS im Gegensatz zu den dNTPs führt zum Kettenabbruch. Dadurch entstehen Kettenlängen jeder möglichen Länge, an deren Ende sich ein farblich markiertes ddNTP befindet. Diese werden in einer im Sequencer (96-Kapillarsequenzer, ABI 3730 DNA Analyser von Applied Biosystems) integrierten Gelelektrophese abgelesen und ausgewertet (Löffler et al., 2007).

Durchführung in 96-Loch-Platte (96-Well Thermofast)

- Die Primer wurden einzeln als Forward und Reverse verdünnt, 1 µl wurden mit 99 µl Wasser versetzt.
- 2 μl aufgereinigtes PCR-Produkt wurde mit 0,5 μl *BigDye*, 1,5 μl Puffer und 1 μl Primer (Forward/Reverse getrennt) pro Loch pipettiert.
- 3) Vorgehen nach folgendem Programm in PT C-225 Gradient Cycler (Tabelle 4):

Tabelle 4: Protokoll der Sequenzreaktion.

Denaturierung	94°C	30 sec.
Anlagerung	50°C	15 sec.
Erweiterung	60°C	4 min.
Zyklen	2	24X
Kühlung	4°C	1 min.

2.2.13 Ethanol-Fällung

Die Fällung der Sequenzprodukte erfolgte durch Ethanol in einer Zentrifuge (4K15 von Sigma) und diente der Konzentration der DNA und der Aufreinigung durch Salze, Reaktionsprodukte und freie Nukleotide (Crouse et al., 1987).

<u>Durchführung</u>

- Pro Loch wurden 25 µl 100% Ethanol zu 5 µl Sequenzierprodukt dazupipettiert und 15 min. lang bei Raumtemperatur verschlossen stehen gelassen.
- 2) Bei 3000 RZB für 30 min. und 4°C wurde die Platte abzentrifugiert.
- 3) Der Überstand wurde verworfen und die Platte bei 100g für 10 sec. abzentrifugiert.
- 4) 125 µl 70% Ethanol wurden pro Loch hinzupipettiert.
- 5) Bei 2000 RZB, 14 min. und 4 °C erfolgte ein erneutes Zentrifugieren der Platte.
- 6) Der Überstand wurde erneut verworfen, zum Eliminieren der Alkoholreste wurde die Platte über Kopf bei 600 RZB für 1 min. abzentrifugiert.
- Zugabe von 50 µl HPLC-H2O und Überführen der kompletten Platte in eine neue 96-Loch-Platte (Sequencing Plates Thermofast barcoded) von Abgene.

2.2.14 Genotypisierung und Datenbanksuche

Mithilfe der Software "Staden-Package", die als Freeware frei im Internet (http://staden.sourceforge.net/) erhältlich war, wurden die Sequenzen ausgewertet und Basenabweichungen im Vergleich zur Standardsequenz notiert. Die Entschlüsselung des mitochondrialen Genoms (Anderson et al., 1981) beinhaltete einige Fehler sowie seltene Polymorphismen, die nach 18 Jahren revidiert wurden (Andrews et al., 1999). Als Referenzsequenz für die mtDNA diente daher die überarbeitete "revised Cambridge Sequence". Dabei konnte man mithilfe der Datenbank MITOMAP (Brandon et al., 2005) einen gefundenen Basenaustausch im Vergleich zur Referenzsequenz überprüfen. Fand sich eine Variante nicht bei MITOMAP beschrieben, so waren weitere Schritte zur Differenzierung zwischen Mutation und neutraler Variante notwendig (Kapitel 1.5.2). Dazu gehörte die Recherche bei der Datenbank mtDB auf der Website http://www.genpat.uu.se/mtDB/ (Ingman et al., 2006). Diese Datenbank beinhaltete zum Zeitpunkt der Überprüfung 2704 mitochondriale Sequenzen. Durch Eingabe der mtDNA-Position konnte man die Häufigkeit eines gefundenen Basenaustausches im Vergleich zu diesen Kollektiven erfahren. Dies war wichtig, um eine spätere Interpretation gefundener Varianten zu ermöglichen. Bekannte Polymorphismen wurden als solche kenntlich gemacht. Varianten, die nicht bekannt waren und damit als mögliche Mutationen in Betracht kamen, wurden entsprechend dem Algorithmus aus Kapitel 1.5.2 bewertet, um eine

krankheitsverursachende Wirkung begründen zu können.

2.2.15 Alignment

Als ein Pathogenitätsmerkmal für eine mitochondriale Mutation wurde im Kapitel 1.5.2 unter anderem eine starke Konservierung in der Evolution definiert. Dies konnte zum einen über im Internet bereits zusammengestellte Alignments von vielen Säugetieren-Spezies für tRNA und rRNA, zum anderen mit selbsterstellten Alignments mit niederen Arten überprüft werden. Letzteres wurde für die neuen Mutationen durchgeführt, für die eine pathogene Wirkung möglich oder wahrscheinlich erschien.

Eine zusammengestellte Liste bereits angeglichener tRNA-Sequenzen von 138 Säugetieren war über die Website http://mamit-trna.u-strasbg.fr/ (Putz et al., 2007) verfügbar, für die rRNA waren bereits 57 angeordnete Sequenzen von Säugetieren über die OGRe-Datenbank http://drake.physics.mcmaster.ca/ogre/ (Jameson et al., 2003) zugänglich.

Die selbsterstellen Alignments für den L-Strang enthielten den Patienten, Homo sapiens, Bos taurus (Rind), Canis lupus familiaris (Hund), Rattus norvegicus (Wanderratte), Mus musculus domesticus (Hausmaus) und Danio rerio (Zebrafish). Diese Sequenzen stammten aus der Genbank und wurden mit dem T-Coffee Algorithmus angeordnet, der unter http://tcoffee.vitalit.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi (Notredame et al., 2000) zugänglich war. Mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999) wurden diese Sequenzen dann dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationsmessungen

Für ca. 30 Proben wurden Konzentrationsmessungen durchgeführt, wobei eine Auswahl in Tabelle 5 gezeigt ist.

Tabelle 5: Ergebnisse der Konzentrationsmessungen. DNA_Nr: Patientennummer; ng/µl Konz.: Konzentration der DNA in ng/µl. Man erkennt die starken Schwankungen der Konzentrationen, wie sie bei der Isolierung von DNA aus Muskelgewebe auftreten können. DNA-Proben mit niedrigeren Konzentrationen als 4 ng/µl wurden nicht für die Hochdurchsatzmutationsanalyse verwendet.

DNA_Nr	ng/µL Konz.	DNA_Nr	ng/µL Konz.	DNA_Nr	ng/µL Konz.
38802	6,9	38811	3,4	38822	20,1
38803	8,4	38812	4,3	38823	22,4
38804	2,4	38813	62,2	38826	25,7
38805	9,5	38814	1,4	38827	41,7
38806	4,9	38815	13	38828	1,7
38807	14,2	38816	14,1	38829	7
38808	4,5	38817	28,1	38830	47,7
38809	5,4	38820	55,2	38832	17,1
38810	1,2	38821	18,2	38833	77,1

3.2 Primertest mittels Gelelektrophorese

Die Produktlänge der bestellten Primer wurde mittels PCR und Gelektrophorese überprüft. Die optimale Primerannealingtemperatur für alle Primer betrug 65°C (Abbildung 10).



Abbildung 10: Agoresegelelektrophorese der durchgeführten PCR-Reaktionen mit standardisierter DNA und der im Experiment verwendeten Primer. In das Bild sind die Produktlängen (Anzahl Basenpaare) eingetragen, sowie der DNA-Leiter an den Seiten links und rechts als Ableseschablone beschriftet. Die Reihenfolge der Proben entspricht Tabelle 40.
3.3 Hochdurchsatz-Mutationsanalyse und Genotypisierung

Insgesamt wurden 187 Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt und 189 Patienten mit kombiniertem Komplex I+IV-Defekt auf Mutationen in der mitochondrialen tRNA/rRNA gescreent, wobei Mutations-Hotspots (siehe Kapitel 1.4.2) bereits ausgeschlossen waren. Die Entscheidung, welcher Patient sequenziert werden sollte, wurde mittels *High-Resolution-Melting-Analysis* getroffen. Insgesamt wurden über 6732 PCR-Reaktionen für Komplex I und 6804 PCR-Reaktionen für Komplex I+IV durchgeführt. Rechnet man mit etwa 13000 bis 13500 Reaktionen insgesamt, und zählt man hinzu, dass etwa 380 von diesen Reaktionen durch die Schmelzkurvenanalyse für die weitere Sequenzierung ausgewählt wurden, so bewegt sich das prozentuale Verhältnis Sequenzreaktionen : PCR-Reaktionen etwa bei 3%. Durch die Schmelzkurvenanalyse konnten also etwa 97% gefiltert werden. Insgesamt wurden ca. 304 Abweichungen von der Referenzsequenz gefunden.

Die Datenbank MITOMAP stellte aufgrund ihrer Fähigkeit, bereits etwa 85% von allen Varianten und Mutationen zu identifizieren, einen sehr guten Filter dar. Nicht annotierte Basenveränderungen wurden mit einem deskriptiven Modell auf Pathogenitätskriterien geprüft. Die statistischen Analysen wurden mit dem exakten Test nach Fisher durchgeführt, um ein signifikantes Vorkommen ausgewählter Varianten in Atmungskettendefekten zu evaluieren. Dabei wurde ein 95%iges Konfidenzintervall gewählt.

3.4 Sequenzierung

1) Komplex I-Patientenkollektiv : Die DNA von 188 Patienten wurde überprüft, wobei ein systematischer Ausfall der DNA des Patienten 33352 dazu führte, dass insgesamt 187 Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt untersucht wurden.

197 Sequenzreaktionen wurden durchgeführt, in 123 Sequenzen fanden sich Abweichungen von der Referenzsequenz, 74 Sequenzen hatten keine Abweichungen.

7 PCR-Reaktionen konnten auch unter verschiedenen Bedingungen nicht amplifiziert werden.

2) Komplex I+IV-Patientenkollektiv: Die DNA von 189 Patienten wurde auf Mutationen gescreent.

183 Sequenzreaktionen wurden durchgeführt. In 127 Sequenzen fanden sich Abweichungen von der Referenzsequenz, 56 Sequenzen hatten keine Abweichungen.

3 PCR-Reaktionen konnten auch unter verschiedenen Bedingungen nicht amplifiziert werden.

Die komplette Liste der Ergebnisse finden sich im Anhang unter Kapitel 6.2.1 und 6.2.2. Der Grad der Heteroplasmie ist jeweils in Klammern angegeben. Weiterhin sind zur Vervollständigung auch Veränderungen angegeben, die in Nachbargenen gefunden wurden. Da im Mitochondrion keine Introns existieren (Tuppen et al., 2010), sind benachbarte Gene häufig mitsequenziert worden.

3.5 Detektierte Varianten

 Acht Mutationen wurden gefunden, die nicht bei MITOMAP annotiert waren (Tabelle 6). A7570G (EU597532) und A2239G (EF661002) sind in der *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) unter den jeweiligen Nummern in Klammern bereits identifiziert worden, Aussagen über die Individuen lassen sich anhand der Datenbankinformationen jedoch nicht treffen. Daher wurde diesen beiden Mutationen das Attribut "neu" im Sinne von "nicht in der Literatur beschrieben" zugewiesen. 14754delC p.P3fsX8 wurde von unserem Kooperationspartner Salzburg publiziert (Zimmermann et al., 2011). Die übrigen fünf von den acht folgenden gelisteten Mutationen erfüllen die Kriterien einer "neuen" Mutation aus Kapitel 1.5.3.

Genlocus	Mutation	Patient	Patientenkollektiv	Weiterführendes Procedere
16S-rRNA	G1886A het./hom.	31673	Komplex I+IV	***, biochemische Validierung empfohlen
16S-rRNA	A2239G hom.	36333	Komplex I+IV	***, biochemische Validierung empfohlen
tRNA-Serin(AGY)	G12256A het. (~90%)	31673	Komplex I+IV	***, biochemische Validierung empfohlen
tRNA-Valin	1659insTT hom.	33354	Komplex I	***, biochemische Validierung empfohlen
tRNA-Valin	T1607C hom.	33267	Komplex I	***, biochemische Validierung empfohlen
16S-rRNA	G1767A hom.	33485	Komplex I	***, biochemische Validierung empfohlen
tRNA-Aspartat	A7570G hom.	35803	Komplex I	***, biochemische Validierung empfohlen
Cytochrom B	14754delC p.P3fsX8 hom.	33486	Komplex I	-

***: Für diese Mutationen ist zur Komplettierung der Vererbungsdiagnostik eine zusätzliche Sequenzierung insbesondere des genannten Gens der Mutter sowie weiterer naher Familienangehöriger anzuraten. Eine Sequenzierung anderen Gewebes als Muskel, z.B. von Blutzellen der Patienten ist ebenfalls empfehlenswert, um die Verteilung jeweiliger Mutationen in diesem Gewebe zu vergleichen.

 Sechs bereits bekannte Mutationen wurden in dieser Arbeit identifiziert (Tabelle 7). Diese waren bereits in der Literatur bekannt und wurden unter ihrem jeweiligem Kapitelnamen erörtert.

Für diese Patienten ist ein erneuter Abgleich mit der Klinik empfehlenswert. Eine Re-Sequenzierung der Patienten ist zur Diagnosesicherung und gänzlichem Ausschluss einer Namensverwechslung obligat.

Genlocus	Mutation	Patient	Patientenkollektiv
12S-rRNA	A1555G	38512	Komplex I+IV
tRNA-Threonin	G15894A het. (~35%)	38550	Komplex I+IV
tRNA-Leucin(UUR)	T3250C hom.	33041	Komplex I
tRNA-Leucin(UUR)	A3302G het. (~90%)	38807	Komplex I
tRNA-Leucin(UUR)	A3243G het. (~35%)	33486	Komplex I
ND3	T10191C p.S45P hom.	35841	Komplex I

Tabelle 7: Liste bereits bekannter Mutationen, die in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurden.

 Neun gefundene Mutationen waren bei MITOMAP sowohl als Polymorphismus als auch als Mutation annotiert. Für zwei davon wurde eine pathogene Wirkung als wahrscheinlich erachtet (Tabelle 8):

Tabelle 8: Mutationen, die bei MITOMAP sowohl als Polymorphismus als auch krankheitsverursachend annotiert waren und als pathogen interpretiert wurden.

Genlocus	Mutation	Patient	Patientenkollektiv
tRNA-Cystein	T5814C	35799	Komplex I
tRNA-Leucin(CUN)	A12308G+T12297C	31685	Komplex I +IV

Für die restlichen sieben Varianten konnte aufgrund von widersprüchlichen Fällen in der Literatur keine Klarheit über die Bedeutung erlangt werden. In diesem Projekt ergab sich kein signifikant gehäuftes Vorkommen (im Vergleich zur Datenbank mtDB mit 2704 Kontrollen) dieser Varianten bei Patienten mit Atmungskettendefekten vom Typ I und Typ I+IV (Tabelle 9).

Genlocus	Variante	Frequenz Patienten	Frequenz Kontrollen	p-Wert
ND1	T4216C	1,3% (5 von 376)	9,0% (244 von 2704)	~0.999
tRNA-Glutamin	T4336C	1,1% (4 von 376)	1,2% (33 von 2704)	~0.679
tRNA-Cystein	T5814C	0,3% (1 von 376)	0,4% (10 von 2703)	~0.762
COX-1	G7444A	0,3% (1 von 376)	0,4% (10 von 2704)	~0.762
tRNA-Leucin(CUN)	A12308G	1,6% (6 von 376)	14,7% (347 von 2357)	~0.999
tRNA-Threonin	A15924G	0,3% (1 von 376)	3,9% (106 von 2703)	~0.999
tRNA-Threonin	G15928A	1% (4 von 376)	4,9% (132 von 2704)	~0.999

Tabelle 9: Die Pathogenität der hier gelisteten Varianten war widersprüchlich in der Literatur diskutiert worden. In den untersuchten Patientenkollektiven fand sich keine signifikant erhöhte Frequenz dieser Basenaustausche im Vergleich zu Kontrollen.

4) Die nun im folgenden gelisteten Varianten wurden in der vorliegenden Arbeit gefunden und waren nicht bei MITOMAP annotiert (Tabelle 10). Schwache Konservierung in Säugetieren und/oder Vorhandensein in gesunden Kontrollen für die jeweiligen nun vorgestellten Varianten sprachen eher gegen Pathogenität. A2755G ist ein Polymorphismus und besitzt eine Frequenz von ca. 19% in gesunden Kontrollen (http://www.genpat.uu.se/mtDB/). Eine biochemische Validierung der übrigen Varianten ist zur Klärung ihrer Pathogenität empfehlenswert. Eine vergleichende statistische Auswertung bezüglich der Frequenz bei Patienten und Kontrollen ist aufgrund der geringen Fallzahl entbehrlich. Varianten, die in 1 oder 0 Kontrollen vorkamen, wurden diskutiert. Tabelle 10: Nicht bei MITOMAP annotierte, unklare Varianten. A2755G kann aufgrund der hohen Frequenz in gesunden Kontrollen (~19%) als Polymorphismus eingestuft werden. mtDB: Humane mitochondriale Gendatenbank (http://www.mtdb.igp.uu.se/).

Genlocus	Variante	Patient	mtDB (n=2704)	Konservierung in Säugetieren	Patientenkollektiv
D-Loop (Kontrollregion)	C571A hom.	35843	1 von 2243 Kontrollen	-	Komplex I
tRNA- Phenylalanin	T634C hom.	34853	0 von 2704 Kontrollen	~16% T (22 von 136)	Komplex I+IV
	G719A hom.	38540	8 von 2704 Kontrollen	~63% G (36 von 57)	Komplex I+IV
	C739T hom.	34788 34800	3 von 2704 Kontrollen	~21% C (12 von 57)	Komplex I+IV
12S-rRNA	C1009T hom.	34805	2 von 2704 Kontrollen	~25% C (14 von 57)	Komplex I+IV
	C1011A hom.	34804 38494	0 von 2704 Kontrollen	~9% C (5 von 57)	Komplex I+IV
	T1386C het. (30%)	38548	0 von 2704 Kontrollen	~42% T (24 von 57)	Komplex I+IV
	A1692T hom.	38551	7 von 2704 Kontrollen	~40% A (23 von 57)	Komplex I+IV
	A1943G hom.	35802	1 von 2704 Kontrollen	~23% A (13 von 57)	Komplex I
16S-rRNA	A2294G hom.	38685	4 von 2704 Kontrollen	~75% A (43 von 57)	Komplex I+IV
	A2358G hom.	35799	8 von 2704 Kontrollen	~47% A (27 von 57)	Komplex I
	A2755G hom.	33325	525 von 2704 Kontrollen	~47% A (27 von 57)	Komplex I
L-Strang	5743delC hom.	36349	0 von 2704 Kontrollen	-	Komplex I+IV
	A5747G hom.	34850	0 von 2704 Kontrollen	-	Komplex I+IV
tRNA-Tyrosin	C5839T	33344	3 von 2704 Kontrollen	~31% C (43 von 137)	Komplex I

3.6 Variabilität

A750G ist signifikant gehäuft in Zusammenhang mit Atmungskettendefekten aufgetreten (Tabelle 11), insbesondere mit Typ I+IV-Defekt (Tabelle 12). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diesen Zusammenhang zu untermauern.

Tabelle 11: Frequenz der Variante A750G in 376 Patienten mit Atmungskettendefekten ist erhöht im Vergleich zu Kontrollen.

Genlocus	Variante	Frequenz im gesamten Kollektiv (11 von 376)	Frequenz in Kontrollen (22 von 2704)	p-Wert
12S-rRNA	A750G	2,9%	0,8%	~0.001

Tabelle 12: Die Frequenz der Variante A750G in 189 Patienten mit kominbiertem I+IV Defekt ist wesentlich höher im Vergleich zu 187 Patienten mit isoliertem Komplex I-Defekt.

Frequenz in Komplex I+IV- Defekt-Patienten (10 von 189)	Frequenz in Komplex I-Defekt- Patienten (1 von 187)	p-Wert
5,3%	0,5%	~0.006

Anhand der Abbildung 11 lässt sich erkennen, dass die Anzahl an Patienten mit Atmungskettendefekten sich in einem relativ ähnlichen Feld bewegen. Da 12S-rRNA und 16S-rRNA wesentlich größer als die kleinen tRNA-Gene sind, verwundern die Zahlen nicht.

Die Tendenz der Komplex I-Patienten im Vergleich zu den Komplex I+IV-Patienten mehr Variabilität in der 16S-rRNA zu haben, findet sich statistisch bestätigt (Abbildung 11, p=0.04).



Komplex I-Defekt Patientenkollektiv (n=187) - Verteilung



Komplex I+IV-Defekt Patientenkollektiv (n=189) - Verteilung

Abbildung 11: Verteilung aller Varianten in beiden Patientenkollektiven. Gezeigt ist pro Gen die Anzahl an Patienten, die eine oder mehr Varianten in diesem Gen besaßen. Hatte ein Patient mehr als eine Variante in diesem Gen so ist er nur einmal gezählt worden, um Streuungsfehler zu vermeiden. Am Beispiel der 12S-rRNA im KomplexI+IV-Patientenkollektiv sei erklärt: 24 Patienten hatten eine oder mehr Abweichungen von der Referenzsequenz in diesem Gen.

4 Diskussion

4.1 Methodenvergleich

High-Resolution-Melting-Analysis bietet die Möglichkeit, viele Individuen gleichzeitig bei hoher Sensitivität und Spezifität zu untersuchen. So konnte in der gegenwärtigen Arbeit ein relativ großes Kollektiv von insgesamt 376 Patienten zeitnah, effizient und kostengünstig auf Mutationen geprüft werden. *High-Resolution-Melting-Analysis* kann also primär als Screening- bzw. Suchmethode betrachtet werden. Neben vielen Vorzügen bietet die Schmelzkurvenanalyse jedoch auch einen nennenswerten Nachteil: sie ist ungeeignet, die Pathogenität einer gefundenen Variante zu klären. Hierfür sind verschiedene weiterführende Validierungsmodelle erforderlich:

Deskriptives Modell

Unter Berücksichtigung der betroffenen Position, dem Vorkommen in Kontrollen, dem Grad der Konservierung in der Evolution und der Höhe der Heteroplasmie können deskriptiv Argumente für die Pathogenität einer Variante gesammelt und dargelegt werden (Montoya et al., 2009). Diese werden in Kapitel 1.5.2 erörtert und in der gegenwärtigen Arbeit auch benutzt, um eine Einstufung von potentiell pathogenen Varianten vorzunehmen. So kann bereits argumentativ geklärt werden, welche Mutationen sich überhaupt zur Weiterverfolgung lohnen und welche am ehesten ausscheiden. Dennoch muss klar sein, dass einige pathogene Varianten dadurch möglicherweise nicht entdeckt werden, da eine rein deskriptive Analytik die biochemischen Zusammenhänge nicht beweisen kann. Das deskriptive Modell wird gegenwärtig zur Publizierung neuer mitochondrialer Mutationen, insbesondere in Kombination den folgenden aufgelisteten Verfahren, mit nahezu ausnahmslos herangezogen.

Familienmodell

Da mtDNA-Mutationen mütterlich veerebt werden, ist die Familienanalyse ein fester Bestandteil im Rahmen der humangenetischen Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen und ist vor allem bei Heteroplasmie häufig zielführend. Wenn eine gesunde Mutter Trägerin einer unklaren Variante mit geringer heteroplasmischer Ausprägung ist, so kann eine krankheitsverursachende Wirkung vermutet werden, wenn das kranke Kind der Mutter einen hohen heteroplasmischen Prozentsatz in betroffenem Gewebe besitzt. Je größer die Familie und die Menge an erkrankten Individuen, desto mehr Hinweise kann man über Genotyp-Phänotyp-Korrelationen erlangen. Bei homoplasmischen Mutationen liefert das Familienmodell überdies entscheidende Hinweise zur Penetranz und Expressivität einer Variante, was am Beispiel dreier Studien nachvollzogen werden kann (Jin et al., 2007; Lu et al., 2010; Wang et al., 2008). Auch kann der Vererbungsgang einer Mutation durch das Familienmodell rekonstruiert werden. Bei LHON beispielsweise hat das Familienmodell entscheidende Hinweise zur Vererbung erbracht. Obwohl LHON zu über 90% auf drei mitochondriale Mutationen zurückzuführen ist (G11778A, T14484C und G3460A) und damit mütterlich vererbt wird, sind ca. 50% männliche und nur 10% weibliche Träger der Mutationen betroffen (Eichhorn-Mulligan et al., 2008). Dieser Geschlechtsunterschied wurde anhand der beobachteten Vererbung zu erklären versucht, indem ein X-chromosomalgebundener Faktor postuliert wurde (Hudson et al., 2005).

Biochemische Modelle (für ein ausführliches Review siehe Swerdlow, 2007)

Eine elegante Methode, in der u.a. auch der Grad der Heteroplasmie mit der Ausprägung des Atmungskettendefektes korreliert werden kann, basiert auf der Verwendung transmitochondrialer zytoplasmatischer Zybridzellen (Swerdlow, 2007). In unsterblichen humanen Zelllinien wird die mtDNA entfernt (sogenannte p⁰-Zellen) und exogene Patientensodass die mtDNA mittels Zytoplasten integriert, mitochondriale Funktion bei gleichbleibendem nukleären Hintergrund besser beleuchtet wird (King et al., 1989). Dies kann zum einen in heteroplasmischer als auch in homoplasmischer Form erfolgen. Im ersten Fall können dadurch Zellen generiert werden, die die gleiche Variante in unterschiedlich heteroplasmischer Ausprägung besitzen. Durch die Messung der Enzymaktivität der Atmungskette kann man so starke Argumente für die Pathogenität erhalten, falls die Ergebnisse mit der Heteroplasmie korrelieren (Swerdlow, 2007). Üblicherweise wird ein relativ hoher heteroplasmischer Schwellenwert benötigt, um eine Dysfunktion der Atmungskette auszulösen, am Beispiel der MELAS-Mutation ab ca. 85% (Swerdlow, 2007). Auch bei homoplasmischen Varianten kann dieses Modell die pathogenetische Wirkung erklären. Da der nukleäre Hintergrund sich in den ρ^0 -Zellen nicht ändert, kann im Vergleich zwischen Kontroll-mtDNA und Patienten-mtDNA anhand der bioenzymatischen Funktion der Atmungskette beurteilt werden, ob die Ursache überhaupt im Mitochondrion liegt. Dies kann auch durchgeführt werden, ohne dass die mtDNA sequenziert wurde (Swerdlow, 2007). Ist dann nachgewiesen, dass im Falle der Patienten-mtDNA eine Dysfunktion der Atmungskette vorliegt, so ist auch anzunehmen, dass der Grund dafür sich in der mtDNA befinden muss. Gängige Zellen, die zur Validierung mitochondrialer Mutationen verwendet werden, sind NT2-Teratocarcinombeispielsweise Osteosarcom-. oder transformierte Fibroblastenzelllinien. Jedoch sind Ergebnisse zum Teil abhängig von der verwendeten Zellsorte (Swerdlow, 2007). So kann es vorkommen, dass eine Atmungskettendysfunktion nur in einer bestimmten Linie nachgewiesen werden kann und dies zusätzlich die Validierung erschwert. Dennoch ist dieses Modell grundsätzlich verlässlich und nimmt einen zentralen Stellenwert zum Nachweis der pathogenetischen Wirkung einer Variante ein. Daher ist es auch die am meisten verwendete Methode, um die Auswirkungen mitochondrialer Mutationen auf biochemisch/molekulargenetischer Ebene zu verstehen (Danielson et al., 2005).

Tiermodell (für ein ausführliches Review siehe Wallace, 2001)

Mit dieser Methode können die Auswirkungen mitochondrialer Mutationen in vivo untersucht werden. Vor allem zwei Mausmodelle haben sich bewährt, um genetisch unterschiedliche mtDNA in die Keimbahn eines Weibchens einzuschleusen. Cytoplasten, die keinen Zellkern mehr besitzen und mit bestimmter mtDNA angereichert sind, werden mit undifferenzierten weiblichen Stammzellen der Maus fusioniert (Wallace, 2001). Danach werden diese Stammzellzybride in Maus-Blastozysten injiziert und der daraus resultierende chimäre Embryo wird in eine austragende Maus implantiert. Diese Variante eignet sich sehr gut, um Punktmutationen zu untersuchen (Sligh et al., 2000).

Eine zweite Methodik konnte auch komplexere Mutationen unter Verwendung atmungskettendefizienter Cybride untersuchen (Inoue et al., 2000). Das mitochondriale Genom, das in diese Maus- ρ^0 -Zellen injiziert wurde, enthielt Deletionen. Die daraus entstandenen Cybride wurden dann in die Eileiter eines Weibchens implantiert. So konnte der Phänotyp in Form von überwiegendem Nierenversagen Aufschlüsse auf die Pathogenese dieser Deletionen bieten.

Wichtig zu erwähnen ist, dass der Phänotyp aufgrund der Speziesunterschiede nicht immer korreliert. Mutationen, die beim Menschen bestimmte Symptome auslösen, können bei der Maus variieren (Wallace, 2001).

4.2 Begriffsdefinition Polymorphismus, Variante und Mutation

Polymorphismus

Viele Publikationen und Autoren verwechseln Polymorphismus mit "benigner" Variante. Das "Polymorphismus" ist jedoch diesbezüglich ein wertfreier Begriff, Wort obwohl Polymorphismen sehr häufig benigne sind. Aus der Übersetzung (griechisch: "polymorph" = "vielgestaltig") erschließt sich die direkte Bedeutung. So bezieht sich dieser Ausdruck zunächst auf die Frequenz, also auf die Häufigkeit einer Variante in der Normalbevölkerung. Eine übliche Definition lautet, dass ein Polymorphismus dann vorliegt, wenn die Allelfrequenz einer Variante in einer Population mehr als 1% beträgt (Definiton des National Human Genome Research Institute, siehe "Polymorphism" http://www.genome.gov/Glossary). Dass Polymorphismus bestimmten Umständen jedoch auch ein unter eine krankheitsverursachende Wirkung haben kann, wurde am Beispiel der A7444G Variante (Brown et al., 1992b; Yuan et al., 2005) oder des Codons 129 bei der Creutzfeld-Jakob Erkrankung (Windl et al., 1996) bereits beschrieben. Ein Polymorphismus kann ein Protein verändern, indem er eine entscheidende Position in einem für eine Aminosäure kodierenden Basentriplett verändert. Bleibt die Aminosäurenfolge durch einen Polymorphismus unverändert, so resultiert dies in einem synonymen Austausch. Dies gilt für tRNA- und rRNA-Gene nicht, da diese nicht für Proteine kodieren und somit auch nicht in Aminosäuren translatiert werden. Hier rufen Polymorphismen Veränderungen der DNA-Sequenz hervor, die in das Transkript und dadurch in die Struktur der RNA übernommen werden. Auch komplexere Strukturveränderungen wie Insertionen und Deletionen können als Polymorphismen auftreten.

Mutation

Eine aktuelle Definition des National Human Genome Research Institute (http://www.genome.gov/Glossary) lautet übersetzt:

"Eine Mutation ist eine Änderung in der DNA-Sequenz. Diese kann durch DNA-Replikationsfehler, Fehler in der Zellteilung, Strahlung, Chemikalien oder Viren induziert werden. Mutationen in den Keimzellen entstehen in den Eizellen oder in den Spermien und werden an Kinder weitergegeben, während somatische Mutationen in Körperzellen vorkommen und nicht weitervererbt werden."

Diese Definition impliziert, dass der Begriff "Mutation" nicht grundsätzlich mit einem Änderung im Phänotyp einhergehen muss. Vielmehr ist die Änderung der DNA an sich der entscheidende Punkt. Denn aus evolutionärer Sicht können Mutationen auch einen positiven Effekt haben, da sie die genetische Weiterentwicklung von Lebewesen ermöglicht haben. In der Literatur des 20. Jahrhunderts hat jedoch das Wort "Mutation" eine uneinheitliche, überwiegend negative Konnotation erhalten, da Mutationen meist mit dem Aspekt "Krankheit" verbunden wurden (Condit et al., 2002). Auch heutzutage wird in den meisten Veröffentlichungen "Mutation" stillschweigend mit der sog. pathologischen Definition gleichgesetzt und die populargenetische bzw. evolutionäre Bedeutung vernachlässigt.

Variante

Der Ausdruck "Variante" bezeichnet generell eine Basenveränderung, die sowohl pathogen als auch neutral gewertet werden kann und ist im Gegensatz zu "Polymorphismus" unabhängig von der Frequenz. In ihrem Review haben Condit et al. als Synopsis ihrer historischen Begriffsanalyse vorgeschlagen, diesen Ausdruck zunehmend zu verwenden (Condit et al., 2002). Da das Wort "Mutation" in der Vergangenheit überwiegend mit einer negativen Konnotation hinsichtlich "Krankheit" benutzt wurde, wäre zukünftig die neutralere Form von "Variante" zielführender (Condit et al., 2002). Da er im Gegensatz zu "Polymorphismus" auch unabhängig von der Frequenz ist, bietet - sich angelehnt an Condit et al. (2002) - dieser Begriff an, wenn es um die Diskussion von seltenen Basenveränderungen geht, beispielsweise "pathogene Variante" oder "neutrale Variante". Um daher eine einheitliche Diskussion gefundener DNA-Veränderungen zu ermöglichen, wurden die Begriffe "Polymorphismus", "Variante" und "Mutation" in der vorliegenden Arbeit wie folgt verwendet:

<u>Polymorphismus:</u> Eine beschriebene Basenveränderung kam zu mehr als 1% in gesunden Kontrollen vor. Da jedoch alle in dieser Arbeit untersuchten Individuen krank waren, bedeutete dies bereits eine Vorselektierung. Wie bereits beschrieben, bezieht sich die Definition des Wortes "Polymorphismus" primär auf eine Population. Daher wurde der Begriff "Polymorphismus" nur verwendet, wenn dies bereits durch Datenbanken in gesunden Kontrollen bestätigt wurde (Frequenz in gesunden Kontrollen gleich oder größer 1%). Sonst wurde "Variante" vorgezogen.

<u>Mutation</u>: Die beschriebene DNA-Veränderung steht im Verdacht pathogen zu sein oder ist bereits als krankheitsverursachend eingestuft worden. Der positive evolutionäre Effekt einer Mutation wurde hier vernachlässigt, da alle untersuchten Individuen krank waren. Es wurde also die pathologische Definition von "Mutation" verwendet.

4.3 Datenbanken

Die Datenbank MITOMAP (Brandon et al., 2005) bot sich als erster Schritt zur Identifizierung einer gefundenen Variante an, da sie als kontinuierlich aktualisierte Datenbank in der Literatur bereits beschriebene Polymorphismen und Mutationen archiviert hat. 85% aller gefundenen Varianten konnten bereits bekannten Polymorphismen oder in Einzelfällen auch Mutationen zugeordnet werden. Neue Varianten können bei MITOMAP auch eingereicht werden. Die Datenbank unterscheidet dabei zwischen publizierten (engl. "published") und nicht publizierten (engl. "unpublished") Abweichungen. Datenbanken bedürfen generell intensiver Pflege und Wartung und sollten dabei das aktuelle Wissen der Literatur widerspiegeln. Dies setzt voraus, dass die Personen, die diese Datenbank pflegen, auch regelmäßig in Kenntnis über neu publizierte Mutationen gesetzt werden, was nicht immer gewährleistet werden kann. Häufig werden Varianten auch widersprüchlich publiziert, wobei diese unterschiedlichen Informationen nicht immer korrekt in der Datenbank eingetragen sind. Fehlerhafte Annotationen sind daher durchaus möglich. Beispielsweise ist die Mutation T3250C mit mitochondrialer Myopathie assoziiert (Goto et al., 1992; Ogle et al., 1997). Ein erhöhtes Vorkommen beim plötzlichen Kindstod konnte ihr in einer anderen Publikation nicht nachgewiesen werden (Opdal et al., 2004). Obwohl die letzte Veröffentlichung ihre krankheitsverursachende Wirkung nicht infrage stellte, führte dies zu einer doppelten Annotation bei MITOMAP: zum einen als Polymorphismus und zum anderen als Mutation. daraus resultierende Fehlannotation wirkt sich somit auch direkt auf den Die Datenbankbenutzer aus, der dadurch falsche Schlüsse ziehen kann. Unzureichende Datenbankrecherche und alleiniges Verlassen auf MITOMAP hat in der Vergangenheit häufig zu Fehlpublikationen von fälschlicherweise als "neu" erachteten Mutationen geführt (Bandelt et al., 2006; Bandelt et al., 2008; Bandelt et al., 2009). Zwar ist MITOMAP die am häufigsten zitierte Datenbank für mitochondriale Mutationen (Bandelt et al., 2008), eine präzise Suche mittels "Google" kann jedoch wesentlich effektiver sein (Bandelt et al., 2009). Die geschilderten Umstände sprechen dafür, dass gefundene Mutationen mit vordefinierten Suchalgorithmen auch bei Google überprüft werden sollten (Bandelt et al., 2006). Diese sind in Kapitel 1.5.3 beschrieben und wurden auf acht Mutationen in der Diskussion angewendet. GenBank Zwei konnten durch die Google-Suche der davon bei (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) identifiziert werden (A7570G, A2239G).

4.4 Mutationen bei Patienten mit Komplex I+IV-Defekt

4.4.1 G1886A (16S-rRNA) und G12256A (tNRA-Serin(AGY)) - Patient 31673

Klinische Angaben

Myopathie, im Alter von 7 Jahren diagnostiziert. Histologischer Befund: V.a. mitochondriale Myopathie

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 13: Mutationsprofil Patient 31673.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle
G1886A hom.	16S-rRNA	Möglicherweise pathogen	Siehe Diskussion
G12256A het.	tRNA-Serin (AGY)	pathogen	Siehe Diskussion
G3010A hom.	16S-rRNA	Polymorphismus	MITOMAP
G5773A hom.	tRNA-Cystein	Polymorphismus	MITOMAP
A10398G p.T114A hom.	ND3	Polymorphismus	MITOMAP
T10463C hom.	tRNA-Arginin	Polymorphismus	MITOMAP

Mutationsgrad:	Heteroplasmisch ~90%	
mtDB (n=2704):	In 0 Kontrollen enthalten	
Konservierung Säugetiere:	~99,3% G (137 von 138)	
Position betroffen:	T-Stamm, WC-Paarung (siehe Kapitel 6.1.3)	



Abbildung 12: G12256A het. 90%

Mutationsgrad:	Het ~95% bis Hom.	
mtDB (n=2704):	In 0 Kontrollen enthalten	
Konservierung Säugetiere:	~93% G (53 von 57)	
Position betroffen:	Loop-Region (siehe Kapitel 6.1.1)	



Abbildung 13: G1886A het./hom.

Interpretation: Der Fund von G12256A mit hohem heteroplasmischem Prozentsatz, hoher Konservierung und Lokalisation im T-Stamm spricht für Pathogenität und Entdeckung einer neuen tRNA-Mutation (Tabelle 13, Abbildungen 12 und 13). Es ist erwähnenswert, dass in der tRNA-Lysin (T8355C) und tRNA-Prolin (T15965C) an der gleichen Position in der Literatur bereits pathogene Mutationen beschrieben wurden (Putz et al., 2007). Interessanterweise ist dieser Fund jedoch nicht ganz losgelöst von der zusätzlichen G1886A Mutation in der 16S-rRNA zu behandeln, die ebenfalls stark konserviert und bisher unbekannt ist. Hierbei ist der Heteroplasmiegrad entweder sehr hoch oder es liegt Homoplasmie vor. Diese ist jedoch in der Loop-Region angesiedelt, sodass sich eine pathogene Wirkung anhand der Struktur nicht direkt erschließt.

4.4.2 A2239G hom. in der 16S-rRNA - Patientin 36333

Klinische Angaben

Zu diesem Patienten liegen keine klinischen Angaben vor.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 14: Mutationsprofil Patientin 36333.

Mutationsprofil	ionsprofil Betroffenes Gen		Bedeutun	g	Quelle	
A2239G hom.	1	l6S-rRNA	unklar	Siehe	Diskussion	
Mutations	grad:	Homoplasmisc	ch	CCAA	САТА	
mtDB (n=2	2704):	In 0 Kontrollen	enthalten			
Konservierung Säuge	etiere:	~74% A (42 vo	on 57)	$\Lambda \Lambda \Lambda$	$\Lambda \wedge \Lambda$	
Position betr	offen:	Loop-Region (siehe Kapitel (6.1.1)	L V X V V	\mathbf{V}	

Abbildung 14: A2239G hom.

Diese Variante wurde mithilfe einer Google-Suche in der GenBank gefunden (Nummer: EF661002) und war daher nicht gänzlich neu. Weitere Informationen über das betroffene Individuum konnten jedoch nicht erhoben werden.

Interpretation: A2239G wurde nicht Kontrollen gefunden, es liegt eine mittelstarke bis starke Konservierung vor (Tabelle 14, Abbildung 14). Wie im 2D-Modell in Abbildung 41 gezeigt, ist eine Base in der Loop-Region betroffen. Weitere biochemische Untersuchungen sind hier

notwendig, um bessere Evidenz zu schaffen. Bis dahin bleibt die Wirkung dieser Variante unklar.

4.5 Mutationen bei Patienten mit Komplex I-Defekt

4.5.1 1659insTT hom. in der tRNA-Valin - Patient 33354

Klinische Angaben

Weiblich, drei Jahre alt bei Vorstellung, Hepatopathie, Herzrhythmusstörungen, Bradykardie, schwere hypertrophe Kardiomyopathie, schnell progressiv bis zur Gabe von CoQ10+Idebenone. Chronische Pseudoobstruktion, Hypotonie, Gastrointestinale Blutungen; zwei Blutsverwandte starben in den ersten 2 Tagen.

Weitere durchgeführte Untersuchungen durch die klinische Chemie

- mtDNA SouthernBlot schwach normale Bande
- SCO2 G1541A negativ
- Depletion negativ
- MERFF 8344 negativ

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 15: Mutationsprofil Patient 33354.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung	9	Quelle
1659insTT	tF	RNA-Valin	pathogen	Sieh	e Diskussion
Mutationsg	grad:	Homoplasmisch	1	TAAC	TTTGA
mtDB (n=2)	704):	In 0 Kontrollen	enthalten	Г	
Konservierung Säuget (n=	iere: 138)	Keine Insertion	üblich	ΛΛΛ	$\Lambda \Lambda \Lambda \Lambda$
Position betro	ffen:	Loop-Region (siehe Kapitel 6	5.1.5)	<u> </u>	
Abbildung 15: 1659insTT ho	m.				

Zwar ist die Position 1659 (Tabelle 15, Abbildungen 15 und 46) bereits als bekannte pathogene Mutation eingezeichnet und wurde im Zusammenhang mit einer vorwiegend neurologischen Symptomatik beschrieben (Blakely et al., 2004), jedoch ist der Mutationsmechanismus durch die Insertion von zwei Thymidin-Basen grundlegend unterschiedlich. Der T-Loop wird um zwei Basen erweitert, was nicht grundsätzlich zu einer Dysfunktion führen muss. Die Möglichkeit, dass die Thymidin-Basen zwischen Position 1659 und 1660 eingefügt würden, ist nicht gegeben, da dies auch gleichzeitig die Watson-Crick-Paarung der gegenüberliegenden Seite beeinflussen würde und sich dies in der Sequenzierung gezeigt hätte. Eine Insertionsvariante ist in 2704 Kontrollen der mtDB nicht gefunden worden, im Alignment zeigte sich weder unter den Säugetieren noch im Vergleich mit niederen Arten eine derartige Strukturänderung in der mitochondrialen tRNA-Valin. **Interpretation:** Eine Insertion von zwei Basen ist in mt-tRNAs generell unüblich (Putz et al., 2007). In der tRNA-Threonin findet sich eine als Polymorphismus beschriebene Insertion von zwei T (Putz et al., 2007), Insertionen von bereits einer Base können jedoch auch pathogen sein (4370insT, tRNA-Glutamin; Putz et al., 2007). Sofern die Mutter nicht gesunde Trägerin dieser Variante ist, sprechen die genannten Umstände für Pathogenität. Es wird empfohlen, diese Mutation weiteren funktionellen Untersuchungen zuzuführen.

4.5.2 T1607C hom. in der tRNA-Valin - Patient 33267

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung		Quelle
T1607C	tRNA-Valin		Möglicherweise pathogen		Siehe Diskussion
Mutati	onsgrad:	Homopla	smisch	AG	AGCGTAG
mtDB (n=2704):	In 0 Kont	rollen enthalten		Λ
Konservierung Sä	ugetiere:	56,3% T	(76 von 135)	٨٨	
Position b	etroffen:	Akzeptor Paarung	-Stamm, keine WC- (siehe Kapitel 6.1.5)	$\langle V \rangle$	

Tabelle 16: Mutationsprofil Patient 33267.

Abbildung 16: T1607C hom.

Interpretation: In dieser neuen homoplasmischen Variante ist der Akzeptor-Stamm an der einzigen Position betroffen, an der keine WC-Paarung vorherrscht (Tabelle 16, Abbildungen 16 und 45). Die mittelstarke Konservierung und das Fehlen bei der mtDB sind Argumente für eine mögliche krankheitsverursachende Beteiligung dieser Mutation. In anderen tRNA-Genen (Arginin, Aspartat und Glutamin) sind an ähnlicher Position nur Polymorphismen beschrieben. Generell ist es jedoch möglich, dass an ähnlichen Positionen auch Mutationen entstehen können (z.B. Position 4250 in der tRNA-Isoleucin) (Putz et al., 2007). Daher wird empfohlen, diese Variante weiteren biochemischen Untersuchungen zu unterziehen.

Klinische Angaben:

Nierenonkozytom mit Komplex I-Defekt. (der Komplex I-Defekt wurde in dem Nierenonkozytom festgestellt).

Tabelle 17: Mutationsprofil Patient 33485.

	Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung		Quelle	
	G1767A hom.	16S-	-rRNA	Möglicherweise pathogen		Siehe	Diskussion
-							
	Mutatio	onsgrad:	Homoplas	misch	AC	СТА	GCGC
	mtDB (r	า=2704):	In 0 Kontro	ollen enthalten		- F	
I	Konservierung Säu	igetiere: (n=138)	~93% G (5	53 von 57)	$\wedge \wedge$	$\Lambda \Lambda$	
	Position be	etroffen:	Watson-Ci (siehe Kap	rick-Paarung bitel 6.1.1)	/ y v	L	VVL

Abbildung 17: G1767A hom.

Interpretation: Die hohe Konservierung und die betroffene Position, an der eine Watson-Crick-Paarung vorherrscht, sind Indizien, die für eine pathogene Wirkung dieser Mutation sprechen (Tabelle 17, Abbildungen 17 und 41). Zur Klärung des Erbgangs ist daher eine Sequenzierung der Mutter und möglicher Geschwister empfehlenswert. Die Sequenzierung des kompletten mitochondrialen Genoms sollte weiterhin deshalb erfolgen, weil Verlust der Komplex-I-Funktion in Kombination mit Nierenonkozytom vor allem mit Mutationen in den mitochondrialen Genen ND1, ND4, und ND5 assoziiert ist, aber auch andere mitochondriale Mutationen beteiligt sein können (Mayr et al., 2008).

4.5.4 A7570G in der tRNA-Aspartat - Patient 35803

Klinische Angaben:

Progressive Erkrankung mit muskulärer Hypertonie, Chronische progressive externe Ophtalmoplegie (CPEO), Ptosis.

Histologie: COX-negative Fasern.

Mutter und Schwester von ähnlicher Symptomatik betroffen.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 18: Mutationsprofil Patient 35803.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle	
A7570G hom.	tRNA-Aspartat	Möglicherweise pathogen	Siehe Diskussion	

Mutationsgrad:	Homoplasmisch	GCTAGATCC
mtDB (n=2704):	In 0 Kontrollen enthalten	
Konservierung Säugetiere:	~87% A (118 von 136)	
Position betroffen:	T-Loop (siehe Kapitel 6.1.4)	

Abbildung 18: A7570G hom.

Interpretation: A7570G war mittel bis stark konserviert und wurde in Kontrollen der mtDB nicht gefunden (Tabelle 18, Abbildung 18). Die Position ist in der T-Schleife lokalisiert, in der generell häufiger Polymorphismen, seltener Mutationen auftreten (Abbildung 44). Die Konservierung ist stark, 18 Säugetiere weichen jedoch ab und erschweren die Interpretation. Es wird daher empfohlen, dies mit einer weiterführenden biochemischen Validierungsmethode zu untersuchen, um bessere Evidenz zu gewährleisten. Bis zum Beweis des Gegenteils sollte A7570G als potentiell pathogen eingestuft werden.

4.5.5 14754delC im Cyt. B und A3243G in der tRNA-Leu(UUR) - Patient 33486

Klinische Angaben:

Isolierter Komplex I-Defekt und Nierenonkozytom (der Komplex I-Defekt wurde in dem Nierenonkozytom festgestellt).

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle
matationoprom		Doubling	Quono
A3243G het. (~35%)	tRNA-Leucin(UUR)	pathogen	MITOMAP
14754delC p.P3fsX8 hom.	Cytochrom B	pathogen	Siehe Diskussion
C14766T p.T7I hom.	Cytochrom B	Polymorphismus	MITOMAP

Tabelle 19: Mutationsprofil Patient 33486.

Die DNA dieses Patienten stammte aus dem Nierenonkozytom, ein isolierter Komplex I wurde zusätzlich diagnostiziert. Die Cytochrom B-Mutation 14754delC p.P3fsX8 hom. (Tabelle 19, Abbildungen 19-21) stellte einen Zufallsbefund dar, da ja primär nur tRNA und rRNA untersucht wurden. Da sie jedoch hinreichend die Diagnose des Patienten in Kombination mit der MELAS-Mutation erklären kann, wird sie nun vorgestellt. 14754delC und viele weitere Mutationen wurde im Zusammenhang mit Nierenonkozytomen von unserem Kooperationspartner Salzburg kürzlich veröffentlicht (Zimmermann et al., 2011). Die Studie und die hier vorgestellte Mutation beziehen sich auf denselben Patienten. Im Rahmen der Mutationsfunde handelte sich um somatische Mutationen aus verändertem Gewebe.



Abbildung 19: Gezeigt wird hier in der Referenzsequenz die Position der Basendeletion (14754), die das zweite Nukleotid im dritten Codon repräsentiert, sowie die Position des Polymorphismus C14766T p.T7I.

Durch die Deletion der Base an Position 14754 resultiert ein Frameshift, der sich über 8 Proteine erstreckt, bis die veränderte Aminosäurenkette schließlich terminiert wird:



Abbildung 20: Frameshift-Mutation 14754delC hom. Gezeigt ist die veränderte DNA Sequenz des Patienten und die daraus resultierende Leserasterverschiebung ab dem dritten Codon (vergleiche hierzu die Referenzsequenz in Abbildung 19). Methionin und Threonin sind die ersten beiden Codons im Cytochrom B und von der Mutation unbeeinflusst. Durch die Deletion an Position 14754 (*) kommt es nun zum Frameshift ab dem dritten Codon, der sich über 8 Codons erstreckt (=frameshift.X8). TAA führt nach mitochondrialer Aminosäurenübersetzung hier zur vorzeitigen Terminierung.

Durch den Frameshift entsteht zunächst eine deutlich andere Aminosäurensequenz und schließlich ein vorzeitiger Kettenabbruch (Abbildung 21):

 Referenzsequenz
 MTPMRKTNPL

 Patient 33486
 MTQYAKLTP*

Abbildung 21: Veränderte Aminosäurensequenz durch die Frameshift-Mutation 14754delC. Im 10. Codon wird die Aminosäurenkette terminiert (*). Der Polymorphismus 14766 fällt bei der Leserasterverschiebung nicht ins Gewicht.

Zusätzlich wurde bei dem Patienten die bekannte A3243G Mutation in der tRNA-Leucin(UUR) in etwa 35% igem heteroplasmischem Ausmaß identifiziert (Abbildung 22):

Mutationsgrad:	Heteroplasmisch ~35%	GCAGRGCCC
Patient:	33486	
Patientenkollektiv:	Komplex I	<u>VVVWVV</u>

Abbildung 22: A3243G het. 35%

Die Mutation A3243G ist u.a. mit MELAS-Syndrom, Leigh-Syndrom, CPEO und Myopathie assoziiert (Brandon et al., 2005). Diese Erkrankungen können mit Atmungskettendefekten

einhergehen und die Phänotypausprägung kann sehr variabel ausfallen (Koga et al., 2000). A3243G und Frameshift-Mutationen in mitochondrialen Genen wie beispielsweise ND1, ND4 und ND5 sind mit Nierenonkozytomen und Komplex I-Defekt assoziiert (Mayr et al., 2008). Interpretation: 14754delC p.P3fsX8 hom. bewirkt einen vorzeitigen Abbruch des Cytochrom B-Genproduktes. Das vorgestellte Mutationsprofil kann den Komplex-I Defekt und das Nierenonkozytom erklären (Zimmermann et al., 2011). Eine heteroplasmische Ausprägung von 35% (A3243G) dürfte grundsätzlich nicht reichen, um eine signifikante Atmungskettendysfunktion des ersten Komplexes auszulösen. Bei der MELAS-Mutation A3243G bewegt sich der Schwellenwert für biochemische Konsequenzen bei etwa 85% (Swerdlow, 2007).

4.6 Bereits bekannte Mutationen mit hoher pathogenetischer Evidenz

4.6.1 A3302G in tRNA-Leucin(UUR)

Klinische Angaben:

Die beschriebene Patientin war 1964 geboren und litt unter Muskelschwäche und armbetonten Paresen. Auffällig waren weiterhin Atrophien der Schultergürtel-, Gluteal- und Oberschenkelmuskulatur. Im EMG zeigten sich chronische neurogene Veränderungen. Die CK betrug 453 U/I, in der Histologie des Muskels zeigte sich kein Anhalt für eine Myositis oder Vaskulitis. Mit dem späten Beginn ihrer Erkrankung im Alter von etwa (genauer Zeitpunkt nicht mehr evaluierbar) verlor sie 10 kg in 12 Monaten.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 20: Mutationsprofil Patient 38807.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung		Quelle	
A3302G het.	tRNA	-Leucin(UUR)	patho	gen	MITOMAP	
Mutation	sgrad:	Heteroplasmis	ch ~90%	СТТ		С
P	atient:	38807		ΛΛ		Λ
Patientenkol	lektiv:	Komplex I+IV		<u> </u>	X KKX X	

Abbildung 23:A3302G het. 90%

Als eine der ersten beschriebenen mt-tRNA Mutationen ist diese Mutation mit mitochondrialer Myopathie assoziiert (Bindoff et al., 1993). In einem mitochondrialen Cybrid-Modell konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutation zur Anhäufung eines unprozessierten RNA-Zwischenproduktes (RNA19) sowie zu einem Defekt in der Aminoazylierung führt (Maniura-Weber et al., 2006).

Die bei dieser Patientin in hohem Heteroplasmiegrad gefundene Mutation A3302G (Tabelle 20, Abbildung 23) ist mehrfach in der Literatur in Zusammenhang mit Myopathie beschrieben worden. Die beschriebene heteroplasmische Mutation erklärt die Erkrankung der Patientin hinreichend und liefert die Diagnose.

4.6.2 A1555G in der 12S-rRNA

Klinische Angaben:

Zu diesem Patienten liegen keine klinischen Angaben vor.

Tabelle	21:	Mutationsprofi	il Patient 38512	2
---------	-----	----------------	------------------	---

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung	Quelle
A1555G	1	2S-rRNA	pathogen	MITOMAP
Mutations	sgrad:	Homoplasmisch	G	GAGGCAAG
Pa	atient:	38512	٨	
Patientenkol	lektiv:	Komplex I+IV	Γ	

Abbildung 24: A1555G hom.

Die Mutation A1555G (Tabelle 21, Abbildung 24) stellt eine der bekanntesten Mutationen in der 12S-rRNA dar und ist überwiegend mit Aminoglykosid-induzierter und nichtsyndromatischer Taubheit assoziiert (Yuan et al., 2005). Das besondere an ihr ist, dass sie ähnlich zu LHON-Mutationen häufig in homoplasmischer Form gefunden wird und dadurch nicht einem dem Phänotyp entsprechenden heteroplasmischen Prozentsatz zugeordnet sein muss. Chinesische Familienstudien konnten zeigen, dass der Phänotyp durch die Haplogruppe und auch durch nukleäre Modifikatoren beeinflusst werden kann (Lu et al., 2010), die Penetranz und auch die Expressivität dieser Mutation können also abhängig von der genetischen Prädisposition unterschiedlich ausfallen. Bei einer Konsultation der Datenbank http://www.pubmed.org finden sich nach Eingabe von "A1555G" sehr viele Studien, die mögliche Modifikatorgene oder die Penetranz der Mutation A1555G unter verschiedenen Bedingungen untersuchen. Einige Mutationen davon sind mitochondrial, z.B. A15927G in der tRNA (Wang et al., 2008), andere sind in nukleären Genen angesiedelt. Beispielsweise wurde die A10S Mutation im Gen TRMU identifiziert, die unter gewissen Bedingungen eine synergistische Wirkung mit A1555G entfaltet (Guan et al., 2006). Die vielen Suchergebnisse bezüglich der Penetranz, Expressivität und unterschiedlicher Co-Mutationsfunde legen nahe, dass A1555G in einem äußerst komplexen System mit anderen Varianten interagieren kann. Andere klinische Phänotypen wie beispielsweise Myopathie sind beschrieben worden (Yamasoba et al., 2002), diese repräsentieren jedoch Ausnahmen.

Empfohlenes Procedere: Die Gehörfunktion des Patienten sollte zunächst abgeklärt werden, da Taubheit die häufigste phänotypische Präsentation der A1555G-Mutation ist. Sollte der Patient taub oder gehörgeschädigt sein, so ist diese Mutation als der Krankheit ursächlich einzustufen unter dem Vorbehalt, dass weitere Mutationen als Modifikatoren eingebunden sein können. Bei gesundem Individuum ist es anzuraten, Aminoglykoside möglichst nicht einzusetzen, da angenommen werden darf, dass der Patient aufgrund der A1555G Mutation ein erhöhtes Risiko für eine ototoxische Nebenwirkung besitzt (Jin et al., 2007).

4.6.3 T3250C in der tRNA-Leucin(UUR)

Klinische Angaben:

Die Patientin 33041 wurde 1945 geboren, vom Bruder war in der Anamnese bekannt, dass er unter körperlicher Bewegungsintoleranz litt. In der Kindheit begann die Krankheit mit langsamem Progress, nur die motorischen Fähigkeiten waren eingeschränkt. Die Patientin litt unter Muskelschmerzen, Belastungsintoleranz und Muskelschwäche. An den Augen wurde bei ihr eine CPEO mit Ptosis diagnostiziert. Bei erhöhter Creatinkinase wurden in der daraufhin durchgeführten Muskelbiopsie neben COX-negativen Fasern auch Ragged-Red-Fibers identifiziert.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 22: Mutationsprofil Patient 33041.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung	Quelle
T3250C	tRNA	-Leucin(UUR)	pathogen	MITOMAP
Mutatior	nsgrad:	Homoplasmisch	CC	GGCAATC
F	Patient:	33041	٨٨	
Patientenko	llektiv:	Komplex I		

Abbildung 25:T3250C hom.

Die Mutation T3250C wurde erstmals in einer größeren Familie in Zusammenhang mit mitochondrialer Myopathie beschrieben (Goto et al., 1992), später in einer weiteren Patientin

mit Myopathie und Komplex-I-Defizienz bestätigt (Ogle et al., 1997). In der gegenwärtigen Arbeit ist sie in der Patientin 33041 in homoplasmischer Form ebenfalls mit Myopathie und Komplex-I-Defekt gefunden worden (Tabelle 22, Abbildung 25). T3250C ist fälschlicherweise in der Datenbank MITOMAP auch als Polymorphismus annotiert, die Referenzangabe bezieht sich jedoch lediglich auf eine Studie über den plötzlichen Kindstod (Opdal and Rognum, 2004), in der unter anderem auch die Mutation T3250C auf häufiges Vorkommen geprüft wurde, jedoch als Kandidat nicht infrage kam.

Aufgrund der Anamnese bezüglich myopathischer Veränderungen und der Ähnlichkeit der klinischen Symptomatik mit den Veröffentlichungen (Goto et al., 1992; Ogle et al., 1997) ist anzunehmen, dass die Mutation bei der Patientin pathogen wirkt. Da bisher bei ausführlicher Literaturrecherche bisher zwei Fälle bzw. Familien beschrieben worden sind, unterstreicht dieser Fund die pathogene Wirkung dieser Mutation.

4.6.4 T10191C p.S45P hom. in ND3

Klinische Angaben: Mikrozephalie.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 23: Mutationsprofil Patient 35841.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Bedeutung		Quelle	
T10191C hom.	ND3		pathog	pathogen		TOMAP
Mutations	grad:	Homoplasmisch		ΤA	ТАС	cccc
Pa	tient:	35841		٨٨	٨٨٨	۸۸۸۸
Patientenkoll	ektiv:	Komplex I			V	

Abbildung 26: T10191C p.S45P hom.

Diese Mutation ist mit gesicherter pathogenetischer Wirkung mit Epilepsie, Schlaganfall, Optikusatrophie, kognitiver Verschlechterung und dem Leigh-Syndrom/Leigh-like Syndrom assoziiert (Brandon et al., 2005). Der Patient erhält durch diesen Fund mit hoher Evidenz die Diagnose (Tabelle 23, Abbildung 26).

4.6.5 G15894A und A15924G in der tRNA-Threonin - Patient 38550

Klinische Angaben:

Zu diesen Patienten liegen keine klinischen Angaben vor.

Tabelle 24: Mutationsprofil Patient 38550.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle
C1721T hom.		Polymorphismus	MITOMAP
T1834C hom.	103-IRINA		
G15894A het. (~35%)	- tRNA-Threonin -	Assoziation mit Hepatopathie	(Jaksch et al., 2001)
A15924G hom.		Polymorphismus DD pathogen	MITOMAP

Mutationsgrad:	Heteroplasmisch ~35%	CCTTRTAGT
Patient:	38550	
Patientenkollektiv:	Komplex I+IV	VVVWVVV
Abbildung 27: G15894A het.		

Mutationsgrad:	Homoplasmisch	GTAAGCCGG
Patient:	38550	
Patientenkollektiv:	Komplex I+IV	

Interpretation: G15894A het. (Tabelle 24, Abbildungen 27 und 28) war bei MITOMAP nicht annotiert, fand sich aber nach Datenbanksuche assoziiert mit Hepatopathie und Atmungskettendefekt vom Typ IV (Jaksch et al., 2001). Die betroffene Variante ist am Übergang vom Akzeptor-Stamm zur Verbindung mit dem D-Stamm lokalisiert, hoch konserviert (118 von 136 = ~92% G) und betrifft eine Watson-Crick-Paarung. Die niedrige

Abbildung 28: A15924G hom.

heteroplasmische Konzentration von 35% scheint zu gering, um einen Phänotyp mit starker Erniedrigung der Atmungskettenaktivität hervorrufen zu können (Swerdlow, 2007). Die Heteroplasmie könnte in anderem Gewebe jedoch höher sein. Daher ist ein Abgleich mit den klinischen Daten des Patienten notwendig, um die Korrelation der Symptomatik mit dem Fund überprüfen zu können. Weiterhin ist eine Sequenzierung aus Blutzellen des Patienten sowie der Mutter empfehlenswert, um Rückschlüsse auf das Vererbungsmuster und Ausprägung der Mutation in anderem Gewebe zu erhalten.

<u>A15924G</u>

A15924G ist in der Literatur zum Teil äußerst widersprüchlich diskutiert worden. 1991 wurde sie in zwei nicht verwandten Patienten mit letaler kindlicher Myopathie und Atmungskettendefekten (v.a. Komplex IV) gefunden (Yoon et al., 1991). Jedoch führte der Fund dieser Mutation in der gesunden Mutter eines Patienten mit Myopathie, der wie seine Mutter die A15924G Veränderung besaß, dazu, dass diese als Polymorphismus revidiert wurde (Brown et al., 1992a). Bei Konsultation der mtDB fanden sich 106 Individuen, die diese Variante trugen. MITOMAP liefert die Erkenntnis, dass über 30 Publikationen ihre Rolle als Polymorphismus beschreiben. In einer weiteren Veröffentlichung wurde sie in 4 von 28 Patentien mit Morbus Parkinson gefunden, jedoch zeigte sich auch hier keine signifikante Assoziation mit der Krankheit (Simon et al., 2000). Dennoch wurde 2004 diese Mutation mit dilatierter Kardiomyopathie, Myopathie und Atmungskettendefekt erneut in Zusammenhang gebracht (Ruppert et al., 2004). Diese Umstände sprechen dafür, dass A15924G alleine nicht pathogen wirken kann, jedoch auch nicht unbeteiligt an Atmungskettendefekten zu sein scheint. In diesem Projekt konnte ihr keine signifikant erhöhte Frequenz im Vergleich zu Kontrollen (106 von 2703 = -3.9%) in den Patientenkollektiven nachgewiesen werden.

4.7 Varianten mit widersprüchlicher Evidenz

Nicht allen Mutationen ist eine pathogenetische Wirkung eindeutig zuzuordnen. Für eine Reihe von Mutationen gilt, dass sie bei MITOMAP einerseits als Polymorphismen, andererseits auch in Verbindung mit bestimmten Krankheiten beschrieben wurden. Dies legt nahe, dass andere Faktoren bzw. verstärkende Varianten an der summarischen Wirkung einer Punktmutation beteiligt sein können. Für eine Reihe von Mutationen sind bereits bekannte Verstärker-Mutationen beschrieben. Dass generell Polymorphismen den Phänotyp beeinflussen können, ist z.B. für Codon 129 bei der Creutzfeld-Jakob Erkrankung hinreichend bekannt (Windl et al., 1996). In Kapitel 1.5.1 wird auf diesen Umstand näher eingegangen.

Für die Diskussion der nun folgenden Mutationen soll unter Berücksichtigung dieser Umstände jeweils eine Interpretation erfolgen und weiteres Procedere empfohlen werden.

4.7.1 T4216C p.Y304H hom. in ND1

Die Mutation T4216C p.Y304H im Gen ND1 wurde mehrmals in Zusammenhang mit LHON beschrieben (Sartore et al., 1995), später als Haplogruppenmarker der Gruppe J/T identifiziert, wobei ihr nun keine direkte pathogenetische Wirkung mehr attributiert wurde (Mitchell et al., 2006). Eine erhöhte Frequenz im Vergleich zu Kontrollen fand sich nicht (Tabelle 25).

Tabelle 25: Mutation T4216C p.Y304H.

Mutationsprofil	Iutationsprofil Patient		Vorkommen in Kontrollen	
T4216C n V204H hom	33040	Komplex I		
14216C p.1304H nom.	34810, 38543		~9%	
T4216C p.Y304H het.	34796 (30% mut.) 34802 (30% mut.)	Komplex I+IV	(244 von 2704)	

4.7.2 T4336C hom. in der tRNA-Glutamin

Der Status von T4336C ist bei MITOMAP als "unklar" gekennzeichnet. Die in der tRNA-Glutamin angesiedelte Variante ist mehrfach mit Taubheit, Migräne, der Alzheimer'schen Erkrankung sowie dem Morbus Parkinson in Verbindung gebracht worden (Finnila et al., 2001). Da Atmungskettendefekte auch mit Morbus Parkinson zusammen auftreten können, ist die Anwesenheit von T4336C auch in diesem Kontext zu sehen (Simon et al., 2000). In einer anderen Studie konnte ihre pathogene Bedeutung bei Demenz nicht belegt werden (Tysoe et al., 1996). Angesicht der widersprüchlichen Befunde dieser Variante kann die Aussage getroffen werden, dass in den Patientenkollektiven mit Atmungskettendefekten vom Typ I und I+IV keine erhöhte Frequenz im Vergleich zu Kontrollen gefunden wurde (Tabelle 26).

Tabelle 26: Mutation T4336C.

Mutationsprofil	Patient	Patientenkollektiv	Vorkommen in Kontrollen
T4336C hom.	33002	Komplex I	
	31682	Komplex I+IV	~1,2% (33 von 2704)
	36357	Komplex I+IV	
	38529	Komplex I+IV	

4.7.3 A12308G in der tRNA-Leucin(CUN)

A12308G ist unter anderem mit CPEO, Schlaganfällen, Kardiomyopathie und Nieren- und Prostatakrebs assoziiert. Sie ist jedoch auch Haplogruppenmarker der Gruppe U und in Ostund Westeuropa häufig repräsentiert (Brandon et al., 2005). Die Variante A12308G ist in der vorliegenden Arbeit in 6 Patienten identifiziert worden. Grundsätzlich ist sie ein Polymorphismus, da sie in sehr vielen gesunden Kontrollen gefunden wird (mtDB: 347 von 2704 = ~12,8%). Patienten mit dieser Variante und der MELAS-Mutation A3243G können ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle haben (Pulkes et al., 2000) und A12308G kann daher unter bestimmten Umständen den Phänotyp beinflussen. Eine erhöhte Frequenz dieser Variante in den Patientenkollektiven konnte nicht gezeigt werden (Tabelle 27).

Tabelle 27: Mutation A12308G.

Mutationsprofil	Patient	Patientenkollektiv	Vorkommen in Kontrollen (A12308G)
A12308G hom. A1811G het. (45% mut.) G1888A het. (35% mut.) T4216C het. p.Y304H (30% mut.) A15907G het.(45% mut.) G15928A het. (30% mut.)	34802	Komplex I+IV	
A12308G hom. T12188C hom.	38489	Komplex I+IV	
A12308G hom. T12297C hom.	31685	Komplex I+IV	~12,8% (347 von 2704)
A12308G hom. A750G hom. T2352C hom	35826	Komplex I	
A12308G het. (80% mut.) 5752delA hom. T9989C p.S261S het. (60%)	33324	Komplex I	
A12308G het. (40% mut.) C14766T p.T7I het. (30% mut.)	32998	Komplex I	

Patientin 31685 (biochemisches Profil siehe Anhang Kapitel 6.2.3.)

A12308G und die Mutation T12297C wurden in Zusammenhang mit dilatierter Kardiomyopathie in einem 36-jährigen Patienten beschrieben (Grasso et al., 2001). In dieser Veröffentlichung wurde auch insbesondere auf einen möglichen synergistischen Effekt dieser beiden Mutationen verwiesen.

Folgende klinischen Angaben lagen zu der 1997 geborenen bosnischen Patientin 31685 vor, bei der diese Kombination ebenfalls gefunden wurde:

Rezidivierendes Erbrechen, Trinkprobleme, Speichelfluss bei unauffälligem Gastroskopiebefund, fehlender Schluckakt. Keine Muskeleigenreflexe. Labor : Blutgasanalyse (PH 7.23), Laktat 4,1.

Eine Biopsie erfolgte, nachdem die Patientin 2 Wochen alt war. Histologischer Befund: Muskuläre Hypotonie, Laktatazidose, keine *Ragged-Red Fibers*, vermehrte Fettspeicherung in TYP-I-Fasern.



Abbildung 29: T12297C hom. (links) und A12308G hom. (rechts)

Aufgrund der geschilderten Zusammenhänge und der Kombination zweier Mutationen ist anzunehmen, dass die bei der Patientin gefundenen Punktmutationen A12308G und T12297C einen pathogenetischen Kontext besitzen.

Patient 34802

Neben der Variante A12308G wurden zusätzlich mehrere Polymorphismen gefunden, die in unterschiedlichem Umfang heteroplasmisch sind. Die Mutation T4216C p.Y304H, war zu etwa 30% heteroplasmisch. Das Ausmaß der Heteroplasmie ist in diesem Patienten wohl zu gering, um dieser Variante hier krankheitsverursachende Wirkung zusprechen zu können. Die Beschreibung der Variante T4216C entnehme man Kapitel 4.7.1.

Die Patienten 38489, 35826, 33324 und 32998

In diesen Patienten wurde die Variante A12308G gefunden, ohne dass eine besondere Mutation/Variante gefunden wurde, auf deren Wirkung sie hätte Einfluss nehmen können.

4.7.4 T5814C in der tRNA-Cystein

Klinische Angaben:

Erhöhtes Blutlaktat.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 28: Mutationsprofil Patient 35799.

Mutationsprofil	Patient	Patientenkollektiv	Vorkommen in Kontrollen (T5814C)
C1706T hom. C2332T hom. A2358G hom. (unklare Variante, siehe Kapitel 3.5) T2416C hom. T4277C hom. T4370C hom. T5814C hom. G12236A hom	35799	Komplex I	~0,4% (10 von 2703)
Mutationsgrad:	Homoplasmisch	AA	
Patient	35799	٨٨	

Patientenkollektiv: Komplex I

Abbildung 30: T5814C hom.

T5814C (Tabelle 28, Abbildung 30) ist mehrfach in Zusammenhang mit mitochondrialen Erkrankungen verschiedenen klinischen Spektrums beschrieben worden, darunter unter anderem Enzephalomyopathie und Kardiomyopathie (Scuderi et al., 2007). Jedoch scheint nach Scuderi et. al. diese Mutation nur unter bestimmten Bedingungen ihre pathogenetische Wirkung zu entfalten. Dafür spricht auch, dass sie in der Datenbank mtDB in 10 Kontrollen gefunden wurde. In der Publikation wird als Ursache möglicher Interferenzen insbesondere auf nukleäre Faktoren verwiesen, da mehrere Familien bereits mit dieser Variante beschrieben wurden und sich bei der Sequenzierung des kompletten mitochondrialen Genoms dieser Patienten keine weiteren Auffälligkeiten gezeigt haben.

In diesem Projekt ist T5814C in dem Patienten 35799 in Kombination mit vielen

64

Polymorphismen gefunden worden. Es ist wahrscheinlich, dass T5814C bei diesem Patienten pathogen wirkt, da in mehreren Publikationen der Krankheitswert dieser Mutation insbesondere in Zusammenhang mit typischen mitochondrialen Erkrankungen bereits diskutiert wurde, wobei noch nicht alle Umstände, die dazu beitragen, vollständig aufgeklärt sind (Santorelli et al., 1997; Scuderi et al., 2007). Für diesen Patienten ist daher ein Abgleich mit der Klinik als nächster Schritt sinnvoll.

4.7.5 G15928A in der tRNA-Threonin

Diese Variante ist mit Multipler Sklerose (Mayr-Wohlfart et al., 1996) und Parkinson (Mayr-Wohlfart et al., 1996; Simon et al., 2000) assoziiert, weitere Publikationen konnten nach Angaben von MITOMAP jedoch keine signifikante Assoziation feststellen. Eine erhöhte Frequenz in den Patientenkollektiven konnte sich anhand der vorgestellten Daten nicht zeigen.

Mutationsprofil	Patient	Patientenkollektiv	Vorkommen in Kontrollen (G15928A)
A2706G hom. C14766T p.T7l het. (80%) T14783C p.L13L het. (60%) G15928A het. (70%)	33000	Komplex I	~4,9%
G1888A hom. G15928A het. (80%)	33014		
A1811G het. (45%) G1888A het. (35%) T4216C het. p.Y304H (30%) A12308G hom. A15907G het. (45%) G15928A het. (30%)	34802	Komplex I+IV	(132 von 2704)
G15928A hom.	38479		

Tabelle 29: Mutation G15828A.

4.7.6 G7444A p.Ter513K in der Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1

Mutationsprofil	Betroffenes Gen		Patientenkollektiv	Vorkommen in Kontrollen
G7444A hom.	Cytochrom-C- Oxidase U1		Komplex I+IV	~0,4% (10 von 2704)
Mutation	sgrad:	Homoplasmisch	тс	TAAACAA
Pa	atient:	34798	^ (
Patientenkol	lektiv:	Komplex I+IV	(<u>XXYYX~`</u>
Abbildung 31: G7444A hor	n.			

Tabelle 30: Mutationsprofil Patient 34798.

G7444A (Tabelle 30, Abbildung 31) bewirkt eine Leserasterverschiebung, die in das Gen der tRNA-Serin(UCN) hineinreicht. Drei weitere Aminosäuren werden durch diese Veränderung an die Cytochrom-C-Oxidase angehängt. Diese Variante wurde zunächst in zwei Patienten mit LHON und Atmungskettendefekt Typ IV gefunden (Brown et al., 1992b). Ihre verstärkende Wirkung mit der A1555G Mutation wurde bereits in mehreren Publikationen diskutiert (Lu et al., 2010; Yuan et al., 2005). Weiterhin ist die G7444A Veränderung dem 3' L-Strang-RNA Precursor benachbart und beeinflusst damit auch übergreifend die Prozessierung der tRNA-Serin(UCN) und der mRNA von ND6 (Yuan et al., 2005). Bemerkenswert ist, dass sie auch in Kontrollen vorkommt (10 bei mtDB), obwohl ihre Fähigkeit, die Aminosäurenkette zu verlängern und damit zu verändern, für einen Polymorphismus ungewöhnlich ist. In Kombination mit A1555G ist die Penetranz bei Aminoglykosid-induzierter Taubheit und nicht syndromatischem Hörverlust wesentlich höher (Jin et al., 2007).

Für den Patienten 34798 sollte daher nach einem Abgleich mit den klinischen Daten das komplette mitochondriale Genom nachsequenziert werden, um mögliche Co-Mutationen zu identifizieren. Eine pathogene Wirkung ist aufgrund der beschriebenen Evidenz möglich, jedoch nur mit Hilfe der klinischen Daten und weiterer Sequenzierung besser zu evaluieren.
4.7.7 C571A in der Kontrollregion (D-Loop) – Patient 35843

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quell	le Patier	ntenkollektiv
C571A hom.	D-Loop	unklar	Diskuss	sion K	Complex I
Mut	tationsgrad:	Heteroplasmisch ~95% Homoplasmisch	6 bis		
	mtDB:	B: In 1 von 2243 Kontrollen enthalten (~0,0004%)			JUAU
Konservierung:		Schwach		$\Lambda \Lambda \Lambda \Lambda$	$\Lambda \Lambda \Lambda$
Positio	n betroffen:	Non coding region (D-l	_oop)	X V V	VXVY

Tabelle 31: Mutationsprofil Patient 35843.

Abbildung 32: C571A hom.

In der Kontrollregion sind Polymorphismen sehr häufig. Die Variante C571A (Tabelle 31, Abbildung 32) ist bei MITOMAP noch nicht beschrieben und in nur 1 von 2243 Kontrollen anzutreffen, aber am ehesten als nicht pathogene Variante einzustufen, da sie 1) eine nicht kodierende Base betrifft 2) an den Positionen 570, 573, 574, 575 Polymorphismen vorkommen (Brandon et al., 2005) und 3) sich in einem hypervariablen Segment der Positionen 438-574 (Brandon et al., 2005) befindet.

4.7.8 T634C hom. in der tRNA-Phenylalanin – Patient 34853

<u>Klinische Angaben</u>: Therapieresistene Epilepsie, hypotone Bewegungsstörung, geistige Behinderung, POLG1 Mut. negativ, MELAS3243 negativ, MERRF8344 negativ, Depletion negativ, Long range PCR Deletionen negativ.

N	lutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle	Patientenkollektiv
	T634C hom.	tRNA- Phenylalanin	unklar	Diskussion	Komplex I+IV
Г					
	Mut	ationsgrad:	Homoplasmisch	CAC	CACCACC
mtDB (n=2704):		In 0 Kontrollen enthalte	en	Δ	
	Kon	servierung:	~16% T (22 von 136)	· ΛΛΛ	$\Lambda \Lambda \Lambda \Lambda \Lambda$
Position betroffen:		n betroffen:	Loop-Region	<u> </u>	<u>y y y y y v v</u>

Tabelle 32: Mutationsprofil Patient 34853.

Abbildung 33: T634C hom.

T634C (Tabelle 32, Abbildung 33) wurde in einer Dissertation in gesunden Sportpiloten beschrieben (Schmidt, 2007). Trotz der Abwesenheit in 2704 Kontrollen sprechen die Argumente des deskriptiven Modells (schwache Konservierung, Loopregion) eher gegen eine pathogenetische Wirkung.

4.7.9 5743delC (Patient 36349) und A5747G (Patient 34850) im L-Strang

5743delC, Patient 36349

Klinische Angaben:

Haltungsschwäche, Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung, Koordinationsdefizit, konzentrische hypertrophe Kardiomyopathie, Hepatomegalie, Optikusatrophie, Laktaterhöhung im Serum und Liquor, Laktat/Pyruvat erhoeht. MELAS 3243 negativ, MERRF 8344 negativ, Leigh/Narp 8993 negativ.

Biochemisches Profil: Siehe Anhang Kapitel 6.2.3.

Tabelle 33: Mutationsprofil Patient 36349.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle	Patientenkollektiv
G709A hom.		Polymorphismus		
A750G hom.	123-INNA	Polymorphismus		_
T4254C p.P316P het. (~60% mut.)	ND1	Polymorphismus	Syn. Austausch	
5743delC hom.	L-Strang	unklar	Diskussion	Komplex I+IV
5752insA hom.	Ursprung	Polymorphismus	MITOMAP	
C14766T hom. p.T7I	Cutochrom P	Polymorphismus	MITOMAP	
T14783C hom. p.L13L	Cytochrom B	Polymorphismus	Syn. Austausch	-

Mutationsgrad:	Homoplasmisch	
mtDB (n=2704):	In 0 Kontrollen enthalten	CCGC <mark>GGGA</mark>
Konservierung:	Schwach (siehe Abbildung 36)	٨٨٨٨٨٨
Position betroffen:	Loop-Region (siehe Abbildung 35)	

Abbildung 34: 5743delC hom., die Deletion ist als rote Linie dargestellt.

Im Ursprung des sogenannten L-Stranges beginnt die Replikation der mtDNA (Tapper et al., 1981). Dieser ist beim Menschen zwischen den Positionen 5721 und 5798 angesiedelt (Brandon et al., 2005). Ähnlich zur tRNA gibt es hier konservierte Regionen mit

komplementärer Basenpaarung und variable Regionen. Mutationen im L-Strand können den Grad der Replikation beeinflussen, müssen dies jedoch nicht (Hixson et al., 1986).



(rechts) sind mit Rahmen im Alignment markiert.

Abbildung 35: Revers-komplementäre Darstellung des L-Strangs, Positionen 5724 bis 5787 (Hixson et al., 1986). Man erkennt, dass durch 5743delC und den bekannten Polymorphismus 5752insA die Anzahl der Basenpaare in der Loopregion nicht verändert wird.

Homo sapiens Bos taurus Canis familiaris Rattus norvegicus Mus musculus Danio rerio	C T T C T C C C G C C G C - C G G G - A A A A A A A G G C G G G C T T C T C C C G C C G C - A A G A A A A A A A G G C G G G C T T C T C C C G C C G C G T A G A A A A A A A G G C G G G C T T C T C C C G C C T A - T C A G - A A A A A A G G C G G G C T T C T A C C G C C G A - A A A A A A A A A A G G C G G G C T T C T C C C G C C G A - C T T C T C C C G C C G A - C T T C T A C C G C C G A - C T T C T C C G C C G C G T C G A A C C C G G T A A G G C G G G T			
Abbildung 36: Alignment des L-Strangs, Positionen 5730 bis 5758. Die Positionen 5743 (links) und 5747				

Die fehlende Base wird durch den bekannten Polymorphismus 5752insA ausgeglichen. Es ist aufgrund der Variabilität der Region und der geringen Konservierung auch im Zusammenhang mit der veröffentlichten Studie (Hixson et al., 1986) anzunehmen, dass die Deletion einer Base an der Position 5743 in Kombination mit 5752insA keinen pathogenetischen Kontext im Rahmen von Atmungskettendefekten besitzt (Tabelle 33, Abbildungen 34-36).

A5747G, Patient 34850

<u>Klinische Angaben</u>: Ataxie, Myopathie, Histologie aus Muskelgewebe: Kalibervariation mit Einzelfaseratrophien, Hypertrophien.

Tabelle 34: Mutationsprofil Patient 34850.

Mutationsprofil	Betroffenes Gen	Bedeutung	Quelle	Patientenkollektiv
A5747G hom.	L-Strang	unklar	Diskussion	
A5504G het. p. M345M (45% mut.)	ND2	Polymorphismus	Synonymer Austausch	Komplex I+IV

Mutationsgrad:	Homoplasmisch	CGGG <mark>G</mark> AAAA
mtDB (n=2704):	In 3 Kontrollen enthalten	Δ
Konservierung:	Stark (siehe Abbildung 36)	$\Lambda \Lambda \Lambda \Lambda \Lambda$
Position betroffen:	Loop-Region	

Abbildung 37: A5747G hom.

A5747G war nicht bei MITOMAP annotiert, wurde aber bereits bei Patienten mit bipolarer Erkrankung beschrieben (Kato et al., 2001). In dieser Studie konnten keine definitiven Aussagen bezüglich der Pathogenität gemacht werden.

Interpretation: Varianten in dieser Region haben eher die Wirkung, die Replikation zu begünstigen, als zu verschlechtern (Hixson et al., 1986). Trotz der starken Konservierung erschließt sich eine direkte pathogene Wirkung von A5747G bei Patienten mit Atmungskettendefekten aufgrund des Vorkommens in 3 Kontrollen und der Lokalisation in der variablen Loop-Region nicht (Tabelle 34, Abbildung 37).

4.7.10 C1011A und T1386C in der 12S-rRNA

Die folgenden Varianten wurden nicht in Kontrollen gefunden bei schwacher bis mittlerer Konservierung (Tabelle 35, Abbildungen 38-40). Sofern die Mutter ebenfalls gesunde Trägerin der Variante ist, ist dadurch eine alleinige pathogene Wirkung dieser Basenveränderungen ausgeschlossen. Daher ist die Sequenzierung der Mutter für das Gen 12S-rRNA für folgende Patienten als nächster Schritt empfehlenswert. Für die Lokalisation der Varianten im 2D-Modell siehe Abbildung 42.

Genlocus	Variante	Patient	mtDB (n=2704)	Konservierung in Säugetieren	Patientenkollektiv
12S rRNA	C1011A hom.	34804 38494	In 0 Kontrollen enthalten	~9% C (5 von 57)	Komplex I+IV
	T1386C het. (30%)	38548	In 0 Kontrollen enthalten	~42% T (24 von 57)	Komplex I+IV

Tabelle 35: Mutationen C1011A und T1386C.



Abbildung 38: C1011A hom., Patient 34804



Abbildung 39: C1011A hom., Patient 38494



Abbildung 40: T1386C het. 30%, Patient 38548

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der hier vorliegenden Arbeit konnten mithilfe der Hochdurchsatzmutationsanalyse 376 Patienten mit Komplex I- oder kombiniertem Komplex I+IV-Defekt auf Mutationen in der mitochondrialen tRNA und rRNA erfolgreich untersucht werden. *High-Resolution-Melting-Analysis* ermöglicht dabei eine kostengünstige und effiziente Filterungsmethode mit hoher Sensitivität (ca. 96%) und Spezifität (ca. 99%) (Dobrowolski et al., 2009; Reed and Wittwer, 2004). So wurden von ca. 13000-13500 PCR-Reaktionen nur insgesamt 3% sequenziert. Ca. 85% aller gefundenen Varianten waren bereits bei der Datenbank MITOMAP bekannt. Eine weitere, zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die restlichen 15% der gefundenen Varianten mithilfe definierter Pathogenitätskriterien zu sortieren und zu interpretieren. Dies wurde mittels eines deskriptiven Modells erreicht. Die dadurch erlangten Ergebnisse wurden bei der Datenbank MITOMAP eingereicht und werden nun synoptisch aufgelistet:

1) Durch diese Arbeit kann nach der Untersuchung eines relativ großen Patientenkollektivs mit 376 Individuen folgende Aussage getroffen werden:

Mutationen in mitochondrialen tRNA- und rRNA-Genen sind keine häufigen Ursachen von Atmungskettendefekten vom Typ I und Typ I+IV, wenn häufig betroffene Gene vorher als Mutationsarten ausgeschlossen wurden.

2) Es wurden 14 in der Datenbank MITOMAP bis dato unbekannte Varianten identifiziert. Die Daten, die durch das deskriptive Modell in der Diskussion erhoben wurden, sprechen eher gegen eine krankheitsverursachende Wirkung. Zum gänzlichen Ausschluss einer möglichen pathogenen Wirkung ist eine biochemische Validierung auch für diese Varianten empfehlenswert:

C571A¹, T634C¹, G719A, C739T, C1009T, C1011A¹, T1386C¹, A1692T, A1943G, A2294G, A2358G, 5743delC¹, A5747G¹, C5839T (wurden bei MITOMAP eingereicht). 1 : siehe Diskussion.

3) Es wurde in der vorliegenden Arbeit ein in der Datenbank MITOMAP nicht verzeichneter, jedoch bereits bekannter Polymorphismus identifiziert und eingereicht: A2755G. Dieser Nukleotidaustausch kennzeichnet die indische Haplogruppe R8 (Bandelt et al., 2008).

4) Die Variante A750G wurde signifikant gehäuft in Zusammenhang mit dem Komplex I+IV-Defekt gefunden. A750G könnte daher unter speziellen Bedingungen die Rolle einer Verstärkervariante einnehmen bzw. die Penetranz erhöhen. Weiterhin wurde eine signifikant erhöhte Variabilität in der 16S-rRNA bei den Komplex I-Defekt-Patienten beobachtet.

5) Die folgenden Varianten wurden in der Mutationsanalyse gefunden und in der Literatur widersprüchlich diskutiert. In diesem Patientenkollektiv wurde keine erhöhte Frequenz folgender Mutationen gefunden:

T4216C; T4336C; G7444A; A12308G; A15924G; G15928A.

6) Es wurden 7 Mutationen identifiziert, die bereits vorbeschrieben/bekannt waren und die Diagnose der Patienten erklären können:

A1555G - Patient 38512; T3250C - Patient 33041; A3302G - Patient 38807; T5814C - Patient 35799; A12308G + T12297C - Patient 31685; A3243G - Patient 33486; T10191C p.S45P - Patient 35841.

7) Es wurden acht potentiell pathogene Varianten identifiziert, die nicht bei MITOMAP annotiert waren. Vordefinierte Suchkriterien aus Kapitel 1.5.3 wurden angewandt, um das Prädikat "neue Mutation" zu verifizieren. Diese Kriterien wurden von fünf Mutationen erfüllt, die somit auch erstmalig beschrieben sind (G1886A, G12256A, T1607C, G1767A, 1659insTT) und bei MITOMAP eingereicht wurden. Eine biochemische Validierung sowie eine Sequenzierung der mtDNA der Mutter (und möglicher weiterer Geschwister) werden für G1886A, G12256A, T1607C, G1767A, 1659insTT, A2239G und A7570G empfohlen.

6 Anhang

6.1 Bilder

6.1.1 16S-rRNA 2D-Modell



Abbildung 41: 16S-rRNA 2D-Modell. Homo sapiens, Mitochondrion (Cannone et al., 2002). Zur Veranschaulichung sind die Mutationspositionen 1767, 1886 und 2239 eingezeichnet.

6.1.2 12S-rRNA 2D-Modell



Abbildung 42: 12S-rRNA 2D-Modell. Homo sapiens, Mitochondrion (Cannone et al., 2002). Zur Veranschaulichung sind die Mutationspositionen 1011 und 1386 eingezeichnet.

6.1.3 tRNA-Serin(AGY) 2D-Modell



Abbildung 43: 2D-Modell tRNA-Serin(AGY). An der Position 12256 herrscht eine Watson-Crick-Basenpaarung.

6.1.4 tRNA-Aspartat 2D-Modell



Abbildung 44: 2D-Modell tRNA-Aspartat. Die Position 7570 befindet sich in der T-Loop-Region.

6.1.5 tRNA-Valin 2D-Modell



Abbildung 45: 2D-Modell tRNA-Valin. T1607 betrifft den Acceptor-Stamm, wobei keine WC-Paarung vorliegt.



Abbildung 46: Es wird die zu erwartende strukturelle Veränderung durch die Insertion zweier Thymidin-Basen an der Position 1659 veranschaulicht.

6.2 Tabellen

6.2.1 Komplex I Ergebnisse

Tabelle 36: Ergebnisse Komplex I-Patientenkollektiv.

Genlokus	Variante	Patient	MITOMAP-Datenbank
Nicht kodiorondo	567insCCC	35836 36231	Polymorphismus
Region	C568T hom.	33029	Polymorphismus
	C571A het hom.	35843 (>95% mut.)	Nicht annotiert
tRNA-Phenylalanin	-	-	-
	G709A hom.	33008 33030 33343 33486	Polymorphismus
	A750G hom.	35826	Polymorphismus
12S-rRNA	T721C hom.	37795	Polymorphismus
	G769A hom.	33027 35809	Polymorphismus
	G930A hom.	33008 33030	Polymorphismus

		33343 33486	
	T961G hom.	33010	Polymorphismus
	T980C het.	33334 (>95% mut.)	Polymorphismus
	G1018A hom.	35809	Polymorphismus
	T1119C hom.	33331	Polymorphismus
	G1211A hom.	33485	Polymorphismus
	T1406C hom.	33327	Polymorphismus
	A1438G hom.	33461 35811 35830 36229	Polymorphismus
	C1537T hom.	35811	Polymorphismus
tDNIA Valia	T1607C hom.	33267	Nicht annotiert
IRINA-Valli	1659insTT hom.	33354	Nicht annotiert
	T1700C hom.	36229	Polymorphismus
	C1703T hom.	35825	Polymorphismus
	C1706T hom.	35799	Polymorphismus
	C1715T hom.	33036 33348	Polymorphismus
	G1719A hom.	33329 35832 36231 36250 35818 35825	Polymorphismus
	C1721T hom.	33280	Polymorphismus
	G1767A hom.	33485	Nicht annotiert
16S-rRNA	A1811G hom.	33339 33346 35788	Polymorphismus
	A1842G hom.	33339	Polymorphismus
	T1850C hom.	33005	Polymorphismus
	G1888A hom.	33014 33030 33278 33486 35801 33346	Polymorphismus
	A1943G hom.	35802	Nicht annotiert
	C2217T hom.	33339	Polymorphismus
	C2259T hom.	33458	Polymorphismus
	C2332T hom.	35799	Polymorphismus

	T2352C hom.	35826	Polymorphismus
	A2355G hom.	35955	Polymorphismus
	A2358G hom.	35799	Nicht annotiert
	T2416C hom.	35799	Polymorphismus
	T2442C hom.	35955	Polymorphismus
	A2706G het.	33462 (40% mut.)	Polymorphismus
	A2706G hom.	33000 33004 33027 33040 35788 35795 35955	Polymorphismus
	A2707G hom.	35788	Polymorphismus
	A2755G hom.	33325	Nicht annotiert
	C2789T hom.	33027 35795	Polymorphismus
	T2850C hom.	33031	Polymorphismus
	G3010A hom.	33004 33281	Polymorphismus
	T3197C hom.	35792 35846	Polymorphismus
tRNA-Leucin (UUR)	A3243G het.	33486 (35% mut.)	MELAS, Leigh Syndrom, CPEO, Myopathie, u.a.; Pathogene Wirkung gesichert
	T3250C hom.	33041	Myopathie, CPEO,Polymorphismus
ND1 (Untereinheit der NADH- Dehydrogenase)	T4216C hom. p.Y304H	33040	LHON, Insulinresistenz, Haplogruppen J/T Marker, Polymorphismus
ND1 (Untereinheit der NADH- Dehydrogenase)	A4227G p.M307M hom.	36239	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
tRNA-Isoleucin	T4277C hom.	35799	Polymorphismus
tRNA-Glutamin	T4336C hom.	33002	Morbus Alzheimer mit Morbus Parkinson, Taubheit und Migräne/ Polymorphismus
	T4370C hom.	35799	Polymorphismus
	C4375T hom.	35815	Polymorphismus
tRNA-Methionin	-	-	-
tRNA-Tryptophan	-	-	-

Nicht kodierende Region	C5586T hom.	36236	Polymorphismus
tRNA-Alanin	C5601T hom.	33459	Polymorphismus
Nicht kodierende Region	A5656G hom.	35792 35807 36236	Polymorphismus
tRNA-Asparagin	-	-	-
L Strand origin	5752delA hom.	33324	Polymorphismus
	G5768A het.	33488 (~30% mut.)	Polymorphismus
	G5773A hom.	36228	Polymorphismus
	T5774C hom.	33460	Polymorphismus
tRNA-Cystein	T5814C hom.	35799	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Polymorphismus
	G5821A hom.	33255	Polymorphismus
	G5824A hom.	36248	Polymorphismus
tRNA-Tyrosin	C5839T hom.	33344	Nicht annotiert
tRNA-Serin(UCN)	C7476T hom.	33005	Polymorphismus
	A7559G hom.	33028	Polymorphismus
tRNA-Aspartat	A7570G hom.	35803	Nicht annotiert
	T7581C hom.	35827 35841	Polymorphismus
Cytochrom C- Oxidase Untereinheit 1	C7418T p.F505F hom.	33353	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
	G7600A p.A5A hom.	33459	Polymorphismus, Synonymer Austausch
Cytochrom C- Oxidase Untereinheit 2	T7624A p.T13T hom.	36236	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	G8269A p.Ter228Ter hom.	33281 35787	Polymorphismus, Synonymer Austausch
tRNA-Lysin	-	-	-
Cytochrom C- Oxidase Untereinheit 3	T9989C p.S261S het.	33324 (60% mut.)	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	T10115C p.I13I hom.	33027 35795	Polymorphismus, Synonymer Austausch
ND3 (Untereinheit der NaDH-	G10143A p.G29S hom.	35795	Polymorphismus
Dehydrogenase)	T10191C p.S45P hom.	35841	Epilepsie, Schlaganfall, Optikusatrophie, kognitive Verschlechterung,

			Leigh-Syndrom, Leigh- like-Syndrom; Pathogene Wirkung gesichert
	C10192T p.S45F hom.	33026	Polymorphismus
	T10208C p.M50M het.	35793 (80% mut.)	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	T10238C p.I60I hom.	35832 35796	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	A10283G p.L75L hom.	35807	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	G10373A p.E105E hom.	35846	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	A10398G hom. p.T114A	35796	Polymorphismus
tRNA-Glycin	T10034C hom.	35832	Polymorphismus
tRNA-Arginin	T10463C hom.	33040 33486 35801	Polymorphismus
tRNA-Histidin	A12172G het.	33003 (60% mut.)	Polymorphismus
tRNA-Serin(AGY)	G12236A hom.	35799	Polymorphismus
	A12308G het.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.)	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko
tRNA-Leucin (CUN)	A12308G het. A12308G hom.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat	A12308G het. A12308G hom.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 -	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 - 33486	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus - Nicht annotiert
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom. C14766T p.T7l het.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 - - 33486 32998 (30% mut.) 33000 (80% mut.)	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus - Nicht annotiert Polymorphismus
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat Cytochrom B	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom. C14766T p.T7l het. C14766T p.T7l hom.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 - - 33486 32998 (30% mut.) 33000 (80% mut.) 33256 33486	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus - Nicht annotiert Polymorphismus
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat Cytochrom B	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom. C14766T p.T7l het. C14766T p.T7l hom. T14783C p.L13L het.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 - - 33486 32998 (30% mut.) 33000 (80% mut.) 33256 33486 33486 33000 (60% mut.)	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus Polymorphismus Polymorphismus, Synonymer Austausch
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat Cytochrom B	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom. C14766T p.T7l het. C14766T p.T7l hom. T14783C p.L13L het. A15907G het.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 - - 33486 32998 (30% mut.) 33000 (80% mut.) 33256 33486 33486 33000 (60% mut.)	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus Polymorphismus Polymorphismus, Synonymer Austausch Polymorphismus
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat Cytochrom B tRNA-Threonin	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom. C14766T p.T7l het. C14766T p.T7l hom. T14783C p.L13L het. A15907G het. G15928A het.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 35826 - - 33486 32998 (30% mut.) 33000 (80% mut.) 33000 (80% mut.) 33462 (30% mut.) 33000 (70% mut.) 33014 (80% mut.)	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus - Nicht annotiert Polymorphismus Polymorphismus Synonymer Austausch Polymorphismus Multiple Sklerose, Polymorphismus
tRNA-Leucin (CUN) tRNA-Glutamat Cytochrom B tRNA-Threonin	A12308G het. A12308G hom. - 14754delC p.P3fsX8 hom. C14766T p.T7l het. C14766T p.T7l het. C14766T p.T7l hom. T14783C p.L13L het. A15907G het. G15928A het. T15932C het.	32998 (35% mut.) 33324 (80% mut.) 35826 35826 - 33486 32998 (30% mut.) 33000 (80% mut.) 33000 (80% mut.) 33462 (30% mut.) 33014 (80% mut.) 33462 (60% mut.)	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus - Nicht annotiert Polymorphismus Polymorphismus Synonymer Austausch Polymorphismus Bolymorphismus Polymorphismus Polymorphismus

6.2.2 Komplex I+IV Ergebnisse

Genlokus	Variante	Patient	ΜΙΤΟΜΑΡ
Non coding region	568insCCC hom.	36330 36341	Polymorphismus
	C568T hom.	38540	Polymorphismus
tRNA-Phenylalanin	T634C hom.	34853	Nicht annotiert
	G709A hom.	34800 34853 36349 36350	Polymorphismus
	G719A hom.	38540	Nicht annotiert
	C739T hom.	34788 34800	Nicht annotiert
	A750G hom.	34788 34800 34853 36349 36182 36350 38507 38540 38543 38543 38544	Polymorphismus
	A751G hom.	38544	Polymorphismus
12S-rRNA	G769A hom.	34788 38540	Polymorphismus
	G930A hom.	34853 36182 36350	Polymorphismus
	G951A het.	38507 (50% mut.)	Polymorphismus
	G951A hom.	38544	Polymorphismus
	C954T hom.	38540	Polymorphismus
	960delC hom.	31686	Polymorphismus
	T980C hom.	36358	Polymorphismus
	C1009T hom.	34805	Nicht annotiert
	C1011A hom.	34804 38494	Nicht annotiert
	G1018A hom.	34788	Polymorphismus
	A1047G hom.	38693	Polymorphismus
	T1189C hom.	38487	Polymorphismus
	T1243C hom.	34804 38494	Polymorphismus

Tabelle 37: Ergebnisse Komplex I+IV-Patientenkollektiv.

		38497	
	G1303A het	34814 (60% mut.)	Polymorphismus
	T1386C het.	38548 (30% mut.)	Nicht annotiert
	T1406C hom.	34804 38494	Polymorphismus
	G1415T hom.	34783	Polymorphismus
	A1438G hom.	34783 34804 36338 38494 38541 38543	Polymorphismus
	A1555G hom.	38512	Taubheit, pathogene Wirkung gesichert
	G1598A hom.	38815	Polymorphismus
tRNA-Valin	-	-	-
	A1692T hom.	38551	Nicht annotiert
	T1700C hom.	36356 38535	Polymorphismus
	C1721T hom.	38550	Polymorphismus
	A1811G het.	34802 (45% mut.)	Polymorphismus
	A1811G hom.	38513	Polymorphismus
	T1822C hom.	38513	Polymorphismus
	T1834C hom.	38550	Polymorphismus
	G1886A hom.	31673	Nicht annotiert
	G1888A het.	34800 (25% mut.) 34802 (35% mut.)	Polymorphismus
	G1888A hom.	34800	Polymorphismus
16S-rRNA	A1900G hom.	34809	Polymorphismus
	A2239G hom.	36333	Nicht annotiert
	A2294G hom.	38685	Nicht annotiert
	T2352C hom.	38511 38526	Polymorphismus
	T2442C hom.	34782	Polymorphismus
	T2626C hom.	38482	Polymorphismus
	A2706G het.	34796 (50% mut.)	Polymorphismus
	A2706G hom.	34782 38511 38541 38482	Polymorphismus
	C2789T hom.	34788 38541	Polymorphismus

	T2850C hom.	36342	Polymorphismus
	G3010A hom.	31673 38527	Polymorphismus
	T3197C hom.	38535 38688	Polymorphismus
	A3221G het.	34814 (80% mut.)	Polymorphismus
tRNA- Leucine(UUR)	A3302G hom.	38807	Myopathie, pathogene Wirkung gesichert
	T4216C het. p.Y304H	34796 (30% mut.) 34802 (30% mut.)	LHON, Insulinresistenz,
ND1 (Untereinheit	T4216C hom. p.Y304H	34810 38543	J/T, Polymorphismus
Dehydrogenase)	C4251T p.P315P	38514	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
	T4254C het. p.P316P	36349 (60% mut.)	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
tRNA-Isoleucin	-	-	-
tRNA-Glutamin	T4336C hom.	31682 36357 38529	Morbus Alzheimer mit Morbus Parkinson, Taubheit und Migräne/ Polymorphismus
	T4386C hom.	34790	Polymorphismus
ND2 (Untereinheit	T5495C hom. p.F342F	5495C hom. 38497 Polym p.F342F 38684 Synonym	
Dehydrogenase)	A5504G het. p. M345M	34850 (45% mut.)	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
tRNA-Tryptophan	-	-	-
tRNA-Alanin	C5633T hom.	38499	Polymorphismus
Non coding	A5656G hom.	34805 34807 38688 38693	Polymorphismus
tRNA-Asparagin	-	-	-
	5743delC hom.	36349	Nicht annotiert
L-Strand	A5747G hom.	34850	Nicht annotiert
	5752insA hom.	36349	Polymorphismus
tRNA-Cystein	G5773A hom.	31673	Polymorphismus
	T5788C hom.	38688	Polymorphismus
tRNA-Tyrosin	-	-	-
	A5894G hom.	38538	Polymorphismus
Non coding	5895insC hom.	34809 38497	Polymorphismus

Cytochrom Oxidase Untereinheit 1	G7444A hom. Ter513K	34798	LHON, Taubheit, Polymorphismus
tRNA-Ser(UCN)	C7476T hom.	38499	Polymorphismus
	G7521A hom.	34780	Polymorphismus
tRNA-Aspartat	T7581C het.	34800 (60% mut.) 34808 (85% mut.)	Polymorphismus
Non Coding	C8292T hom.	34782	Polymorphismus
Non Coding	C9971T hom.	38540	Polymorphismus
tRNA-Lysin	-	-	-
tRNA-Glycin	T10034C hom.	38495	Polymorphismus
	T10084C hom. p.I9T	38823	Polymorphismus
	A10086G hom. p.N10D	34785	Polymorphismus
	T10115C hom. p.I19I	38540	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	C10142T hom. p.N28N	36358	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	C10192T hom. p.S45F	38527	Polymorphismus
	C10196T hom. p.P46P	38823	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
ND3 (LIntereinheit	T10238C hom. p.I60I	38495 38802 38821	Polymorphismus, Synonymer Austausch
der NADH- Dehydrogenase)	C10244T het. p.F62F	38495 (~30% mut.)	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
	A10301G p.T81T hom.	38688	Nicht annotiert/ Synonymer Austausch
	G10310A hom. p.L84L	36353	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	G10320A hom. p.V88I	36353	Polymorphismus
	A10388G hom. p.G110G	38802	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	A10398G hom. p.T114A	31673 38543 38495 38695 38802 38821	Polymorphismus
	T10463C het.	34810 (70% mut.)	Polymorphismus
tRNA-Arginin	T10463C hom.	31673 38695	Polymorphismus
ND4 (Untereinheit	C12133T hom.	38538	Nicht annotiert/

der NADH- Dehydrogenase)	p.S458S		Synonymer Austausch
	T12188C hom.	38489	Polymorphismus
tRNA-Histidine	T12189C hom.	34782 38540	Polymorphismus
	G12236A hom.	36329	Polymorphismus
tRNA-Serin(AGY)	A12248G hom.	38511	Polymorphismus
	G12256A het.	31673 (~90% mut.)	Nicht annotiert
	T12285C hom.	38538	Polymorphismus
	T12297C hom.	31685	Dilatierte Kardiomyopathie
tRNA-Leucin(CUN)	A12308G hom.	31685 34802 38489	Haplogruppen U Marker/Krankheitsrisiko erhöht für CPEO, Schlaganfall, Kardiomyopathie, Nieren- und Prostatakrebs, Polymorphismus
	C14766T het. p.T7I	34796 (45% mut.) 34797 (40% mut.)	Polymorphismus
Cytochrom B	C14766T hom. p.T7I	34814 36338 36349	Polymorphismus
	T14783C hom. p.L13L	34814 36349	Polymorphismus, Synonymer Austausch
	G15894A het.	38550 (35% mut.)	Nicht annotiert
	A15907G het.	34802 (45% mut.)	Polymorphismus
tRNA-Threonin	A15924G hom.	38550	Letale kindliche mitochondriale Myopathie, Polymorphismus
	G15928A het.	34802 (30% mut.)	Polymorphismus
	G15928A hom.	38479	Polymorphismus
tRNA-Prolin	-	-	-

6.2.3 Biochemische Daten ausgewählter Patienten und Patientenkollektiv

31673	КІ	КІІ	К II / III	K IV	CS
U/ng NCP	4 (15.8-42.8)	95.3 (16-42.6)	12.7 (6-25)	56 (112-351)	194 (45-100)
U/U CS	0.02 (0.17-0.56)	0.49 (0.1-0.5)	0.07 (0.08-0.45)	0.29 (1.1-5)	-

CS = Citratsynthase; K = Komplex

31685	KI	KII	K /	K IV	CS
U/ng NCP	5 (15.8-42.8)	-	3.4 (6-25)	16 (112-351)	46 (45-100)
U/U CS	0.1 (0.17-0.56)	-	0.07 (0.08-0.45)	0.35 (1.1-5)	-

33041	КІ	КІІ	K /	K IV	CS
U/ng NCP	7.2 (15.8-42.8)	-	24.4 (6-25)	259 (112-351)	136 (45-100)
U/U CS	0.05 (0.17-0.56)	-	0.18 (0.08-0.45)	1.9 (1.1-5)	-

33354	КІ	КІІ	K /	K IV	CS
U/ng NCP	1.8 (15.8-42.8)	-	9.7 (6-25)	47 (112-351)	84 (45-100)
U/U CS	0.02 (0.17-0.56)	-	0.11 (0.08-0.45)	0.56 (1.1-5)	-

35799	KI	КІІ	К II / III	K IV	CS
U/ng NCP	8 (15.8-42.8)	-	normal	normal	normal
U/U CS	0.08 (0.17-0.56)	-	normal	normal	-

35803	КІ	КІІ	K /	K IV	CS
U/ng NCP	10.3 (15.8-42.8)	-	normal	normal	normal
U/U CS	0.11 (0.17-0.56)	-	normal	normal	-

35841	КІ	KII	К II / III	K IV	CS
U/ng NCP	5.8 (15.8-42.8)	-	normal	normal	normal
U/U CS	0.05 (0.17-0.56)	-	normal	normal	-

36333	КІ	КІІ	K /	K IV	CS
U/ng NCP	9.4 (15.8-42.8)	-	7.8 (6-25)	49 (112-351)	70 (45-100)
U/U CS	0.13 (0.17-0.56)	-	0.11 (0.08-0.45)	0.7 (1.1-5)	-

36349	КІ	КІІ	K /	K IV	CS
U/ng NCP	3.4 (15.8-42.8)	-	27.1 (6-25)	36 (112-351)	135 (45-100)
U/U CS	0.03 (0.17-0.56)	-	0.2 (0.08-0.45)	0.27 (1.1-5)	-

38807	КІ	КІІ	K /	K IV	CS
U/ng NCP	5.3 (15.8-42.8)	-	20.2 (6-25)	116 (112-351)	? (45-100)
U/U CS	0.04 (0.17-0.56)	-	0.14 (0.08-0.45)	0.81 (1.1-5)	-

	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20	21,22	23,24	
Α	32998	33000	33001	33002	33003	33004	33005	33006	33007	33008	33009	33014	Α
в	36452	35804	35817	35834	35787	35790	35809	35833	35284	36229	36237	36245	в
С	33035	NEG	33036	33332	33041	33255	33256	33324	33325	33326	33328	33331	С
D	35788	35806	35820	35835	35794	35792	35810	35840	35955	36230	36238	36246	D
Е	33333	33334	33336	33338	33339	33340	33341	33343	33344	33346	33347	33352	Е
F	35791	35807	35823	35836	35802	35793	35816	35843	37802	36231	36239_2	36247	F
G	33354	33355	33356	33358	33348	33278	33281	33456	33457	33458	33459	33462	G
н	35796	35808	35824	35838	35813	NEG	35818	35844	NEG	36232	36240_2	36248	н
1	33464	33465	33545	33485	33486	33487	33461	33015	33017	33018	33020	33023	Т
J	35797	35811	35825	35839	35819	35795	35821	35846	36225	36233	36241	36249	J
к	33024	33027	33029	33030	33031	33032	33033	33253	32999	33010	33011	33013	к
L	35799	35812	35828	35841	35822	35798	35826	36453	36226	36234	36242	36250	L
м	33016	33021	33025	33026	33028	33040	33267	33269	33277	33279	NEG	33280	м
Ν	35800	35814	35830	35842	35831_2	35803	35827	37795	36227	36235	36243	36251	Ν
0	33282	33283	33284	33022	33034	33460	33488	33329	33327	33330	33353	33359	0
Р	35801	35815	35832	37796	37797	35805	35829	34741	36228	36236	36244	36252_2	Р
	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20	21,22	23,24	

Tabelle 38: 187 Komplex I-Defekt Patienten, 4 Negativproben, 384-Loch-Platte. Pat. 33352 fiel aus.

Tabelle 39: 189 Komplex I+IV Patienten, 3 Negativproben, 384-Loch-Platte.

	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20	21,22	23,24	
Α	34778	34779	34780	34781	34782	34783	31673	31683	38041	36327	36328	36332	Α
в	38479	38487	38495	38503	38511	38519	38527	38535	38543	38551	38689	38806	в
С	34784	34785	34786	34787	34788	34789	31674	31685	36333	38049	36335	36336	С
D	38823	38488	38496	38504	38512	38520	38528	38536	38544	38552	38690	38807	D
Е	34790	34791	34792	34793	NEG	34795	31684	31686	38684	36339	36340	36341	Е
F	38481	38489	38497	38505	38513	38521	38529	38537	38545	38553	38691	38809	F
G	34796	34797	34798	34799	34800	34801	31676	36347	36342	36343	36344	36346	G
н	38482	38490	38498	38506	38514	38522	38530	38538	38546	38554	38692	38813	Н
Т	34802	34803	34804	34805	34806	34807	31677	31688	36348	36349	36350	36351	I
J	38483	38491	38499	38507	38833	38523	38531	38539	38547	NEG	38693	38815	J
к	34808	34809	34810	38045	34812	34813	31680	31689	36352	36353	36354	36355	к
L	38484	38492	38500	38508	NEG	38524	38532	38540	38548	38685	38694	38817	L
м	34814	34849	34850	34851	34852	34853	31681	38052	36356	36357	36358	38834	м
Ν	38485	38493	38501	38509	38517	38525	38533	38541	38549	38687	38695	38820	Ν
ο	34854	34855	34856	34857	34858	34859	31682	34741	36329	36330	36331	36338	0
Р	38486	38494	38828	38510	38518	38526	38534	38542	38550	38688	38802	38821	Р
	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20	21,22	23,24	

6.2.4 Primer

Gen (Mitochondrion)	Richtung	Oligonukleotidsequenz	Produktlänge	
tDNA Dhanylalanin	Forward	orward 5'-CACACACCGCTGCTAAC-3'		
IRINA-Prienylalanin	Reverse	5'-GATGCTTGCATGTGTAATCTTACT-3'	100	
129 rDNA Evon1	Forward	5'-GCTTACCTCCTCAAAGCAATAC-3'	405	
123-IRINA_EXUIT	Reverse	Reverse 5'-AACTCAGGTGAGTTTTAGCTTTAT-3'		
128 rDNA Evon2	Forward	5'-TAGAAGCCGGCGTAAAGAG-3'	121	
123-IRINA_EXUI2	Reverse	Reverse 5'-CATGGGCTACACCTTGAC-3'		
12S-rRNA_Exon3 plus	Forward	5'-CGCAAGTACCCACGTAAAG-3'	420	
tRNA-Valin	Reverse	5'-GGCTAAGGTTGTCTGGTAGT-3'	420	
169 rDNA Evon1	Forward	5'-ACTTAGGAGATTTCAACTTAACTTGAC-3'	420	
TOS-IRINA_EXOIT	Reverse	5'-TTTAGAGGGTTCTGTGGGCA-3'	439	
16S-rDNA Evon2	Forward	5'-GCTGGTTGTCCAAGATAGAAT-3'	440	
	Reverse	5'-CCTTTCCTTATGAGCATGCC-3'	440	
16S-rDNA Evon3	Forward	5'-CAAGTCATTATTACCCTCACTGTC-3'	447	
	Reverse	5'-CTCGGAGGTTGGGTTCT-3'		
16S-rPNA Evon4	Forward	5'-AAATTTCGGTTGGGGCG-3'	450	
	Reverse	5'-TTACCGGGCTCTGCCAT-3'	-50	
tPNIA_Leucin(LILIP)	Forward	5'-TATACCCACACCCACCCAA-3'	145	
	Reverse	5'-ATGGGTACAATGAGGAGTAGG-3'	145	
tRNA-Isoleucin, -Glutamin,	Forward	5'-CTACCACTCACCCTAGCAT-3'	201	
-Methionin	Reverse	5'-GATTAATTAGTACGGGAAGGGTATAAC-3'	201	
tRNA-Tryptophan, -Alanin,	Forward	5'-CCACGCTACTCCTACCTATC-3'	119	
-Asparagin, -Cystein, -Tyrosin	Reverse	5'-TCGGCGAACATCAGTGG-3'	440	
tDNA Sorin(LICN) Apportat	Forward	5'-TAGAAGAACCCTCCATAAACCTG-3'	207	
iRNA-Senn(UCN), -Aspanai	Reverse	5'-GTGATCATGAAAGGTGATAAGCTC-3'	307	
tDNA Lycino	Forward	5'-GGGCCCGTATTTACCCTA-3'	140	
IRINA-Lysine	Reverse	5'-TGGGCCATACGGTAGTATT-3'	140	
tDNA Chusin	Forward	5'-TGTGGTTTGACTATTTCTGTATGTCTC-3'	225	
	Reverse	5'-GGCAATTTCTAGATCAAATAATAAGAAGGT-3'	525	
tDNA Arginin	Forward	5'-CGCGTCCCTTTCTCCATAA-3'	200	
ITINA-AIginin	Reverse	5'-CTAGAAGTGAGATGGTAAATGCTAGTA-3'	522	
tRNA-Histidin, -Serin(AGY),	Forward	5'-CGACATCATTACCGGGTTT-3'	250	
-Leucin(CUN)	Reverse	5'-TGGTTATAGTAGTGTGCATGGTT-3'	250	
tRNA_Clutamat	Forward	5'-CCCCACAAACCCCATTAC-3'	100	
	Reverse	5'-GAGGTCGATGAATGAGTGGTTA-3'	130	
tRNA-Threenin -Prolin	Forward	5'-ACAAAATACTCAAATGGGCCT-3'	180	
	Reverse	everse 5'-GTGGTACCCAAATCTGCTTC-3'		

Tabelle 40: Liste der für den Screen verwendeten Primer.

6.3 Revised Cambridge Sequence

Als Referenzsequenz ist die 1999 von Andrews et al. als korrigierte Version der "Original Cambridge Reference Sequence" (Anderson et al., 1981) verwendet. Alle detektierten Varianten und Mutationen beziehen sich auf die folgende Sequenz in der GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/):

NCBI Reference Sequence: AC_000021.2, Homo sapiens mitochondrion, complete genome.

6.4 MITOMAP Submissions

Bei MITOMAP wurden neue Varianten unter folgenden Nummern eingereicht: 201103022001-20110302023 (ohne 20110302014).

6.5 Verwendung

Teile dieser Arbeit wurden im September 2008 in Form eines Posters auf dem jährlichen Symposium der "Society for the study of Inborn Errors of Metabolism" in Lissabon präsentiert.

6.6 Danksagung

Großer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Klopstock für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die fruchtbaren Diskussionen. Für die Möglichkeit, die technische Ausstattung und den Arbeitsplatz am Helmholtz-Zentrum Neuherberg nutzen zu können, bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Meitinger. Meinem Betreuer Dr. Holger Prokisch möchte ich für das Einlernen in die Methodik danken. Weiterhin will ich mich bei Prof. Dr. Peter Freisinger, Dr. Uwe Ahting, Dr. Boris Rolinski, Prof. Dr. Wolfgang Sperl und Dr. Johannes Mayr für die Zusammenarbeit und die interessanten Seminare bedanken. Ganz herzlicher Dank geht an die technischen Assistentinnen Anne Löschner und Rosi Hellinger für ihre Geduld. Meinen Eltern, Freunden und meinem Bruder Ingo danke ich für ihre großartige Unterstützung, die ich während des Studiums und meiner Zeit als Doktorand erhalten habe.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

CPEO	Chronische progressive externe Ophtalmoplegie
Het.	Heteroplasmisch (Mutante in % angegeben)
Hom.	Homoplasmisch
LHON	Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie
MELAS-Syndrom	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Epilepsie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Symptome
ΜΙΤΟΜΑΡ	Datenbank für mitochondriale Mutationen: http://www.MITOMAP.org
mtDB	Datenbank, 2704 sequenzierte mitochondriale Kontrollsequenzen, http://www.genpat.uu.se/mtDB/
mt-tRNA und mt-rRNA	Mitochondriale tRNA bzw. rRNA
nDNA	Nukleäre DNA
OXPHOS	Oxidatives Phosphorylierungssystem = Atmungskette
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
rCRS	Revised Cambridge Reference Sequence
WC-Paarung	Watson-Crick-Paarung

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Selbsterstelle schematische Darstellung der Atmungskette und des	
chemiosmotischen Prinzips unter Berücksichtigung der mitochondrialen und	
nukleären Komponenten (DiMauro and Schon, 2003).	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Involvierung vieler verschiedener Ele-	
Mente des mitochondrialen Translationsapparates zur Veranschaulichung der	
mannigfaltigen Möglichkeiten der Prozessierung von RNA-Molekülen.	5
Abbildung 3: Präsentation der klinischen Heterogenität von rRNA- und	
tRNA-Mutationen sowie ihrer Position in der mtDNA.	7
Abbildung 4: Prozessablauf der wichtigsten Bestandteile der verwendeten Methodik.	16
Abbildung 5: Eliminierung der Leerwerte und ausgefallener Proben.	24
Abbildung 6: Normalisierung der Kurven.	24
Abbildung 7: Festlegung des Tm-Shifts auf den Wert 0.05.	25
Abbildung 8: Farbgruppenzuweisung.	25
Abbildung 9: Auswahl der Proben für die Sequenzierung.	26
Abbildung 10: Agoresegelelektrophorese der durchgeführten PCR-Reaktionen mit	
standardisierter DNA und der im Experiment verwendeten Primer.	30
Abbildung 11: Verteilung aller Varianten in beiden Patientenkollektiven.	38
Abbildung 12: G12256A het. 90%	45
Abbildung 13: G1886A het./hom.	45
Abbildung 14: A2239G hom.	46
Abbildung 15: 1659insTT hom.	47
Abbildung 16: T1607C hom.	48
Abbildung 17: G1767A hom.	49
Abbildung 18: A7570G hom.	50
Abbildung 19: Gezeigt wird hier in der Referenzsequenz die Position der	
Basendeletion (14754), die das zweite Nukleotid im dritten Codon	
repräsentiert, sowie die Position des Polymorphismus C14766T p.T7I.	51
Abbildung 20: Frameshift-Mutation 14754delC hom.	52
Abbildung 21: Veränderte Aminosäurensequenz durch 14754delC.	52
Abbildung 22: A3243G het. 35%	52
Abbildung 23: A3302G het. 90%	54
Abbildung 24: A1555G hom.	55
Abbildung 25: T3250C hom.	56
Abbildung 26: T10191C p.S45P hom.	57
Abbildung 27: G15894A het.	58
Abbildung 28: A15924G hom.	58

Abbildung 29: T12297C hom. (links) und A12308G hom. (rechts)	63
Abbildung 30: T5814C hom.	64
Abbildung 31: G7444A hom.	66
Abbildung 32: C571A hom.	67
Abbildung 33: T634C hom.	68
Abbildung 34: 5743delC hom., die Deletion ist als rote Linie dargestellt	69
Abbildung 35: Revers-komplementäre Darstellung des L-Strangs,	
Positionen 5724 bis 5787 (Hixson et al., 1986).	70
Abbildung 36: Alignment des L-Strangs, Positionen 5730 bis 5758.	70
Abbildung 37: A5747G hom.	71
Abbildung 38: C1011A hom., Patient 34804	72
Abbildung 39: C1011A hom., Patient 38494	72
Abbildung 40: T1386C het. 30%, Patient 38548	72
Abbildung 41: 16S-rRNA 2D-Modell.	75
Abbildung 42: 12S-rRNA 2D-Modell.	76
Abbildung 43: 2D-Modell tRNA-Serin(AGY).	77
Abbildung 44: 2D-Modell tRNA-Aspartat.	78
Abbildung 45: 2D-Modell tRNA-Valin.	79
Abbildung 46: Es wird die zu erwartende strukturelle Veränderung durch die	
Insertion zweier Thymidin-Basen an der Position 1659 veranschaulicht.	80

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Messergebnisse des Klinikum München-Schwabings vom 1.1.1998 bis	
zum 31.12.2007.	6
Tabelle 2: Mixtur zum Testen neuer DNA und der Primer.	18
Tabelle 3: PCR-Protokoll.	18
Tabelle 4: Protokoll der Sequenzreaktion.	27
Tabelle 5: Ergebnisse der Konzentrationsmessungen.	30
Tabelle 6: Übersicht über die neuen Mutationen.	33
Tabelle 7: Liste bereits bekannter Mutationen, die in diesem Screen identifiziert wurden.	34
Tabelle 8: Mutationen, die bei MITOMAP sowohl als Polymorphismus als auch	
krankheitsverursachend annotiert waren und als pathogen interpretiert wurden.	34
Tabelle 9: Die Pathogenität der hier gelisteten Varianten war widersprüchlich in	
der Literatur diskutiert worden.	35
Tabelle 10: Nicht bei MITOMAP annotierte, unklare Varianten.	36

Tabelle 11: Frequenz der Variante A750G in 376 Patienten mit Atmungskettendefekten	
ist erhöht im Vergleich zu Kontrollen.	37
Tabelle 12: Die Frequenz der Variante A750G in 189 Patienten mit kominbiertem	
I+IV Defekt ist wesentlich höher im Vergleich zu 187 Patienten mit isoliertem	
Komplex I-Defekt.	37
Tabelle 13: Mutationsprofil Patient 31673.	45
Tabelle 14: Mutationsprofil Patientin 36333.	46
Tabelle 15: Mutationsprofil Patient 33354.	47
Tabelle 16: Mutationsprofil Patient 33267.	48
Tabelle 17: Mutationsprofil Patient 33485.	49
Tabelle 18: Mutationsprofil Patient 35803.	50
Tabelle 19: Mutationsprofil Patient 33486.	51
Tabelle 20: Mutationsprofil Patient 38807.	54
Tabelle 21: Mutationsprofil Patient 38512.	55
Tabelle 22: Mutationsprofil Patient 33041.	56
Tabelle 23: Mutationsprofil Patient 35841.	57
Tabelle 24: Mutationsprofil Patient 38550.	58
Tabelle 25: Mutation T4216C p.Y304H.	60
Tabelle 26: Mutation T4336C.	61
Tabelle 27: Mutation A12308G.	62
Tabelle 28: Mutationsprofil Patient 35799.	64
Tabelle 29: Mutation G15828A.	65
Tabelle 30: Mutationsprofil Patient 34798.	66
Tabelle 31: Mutationsprofil Patient 35843.	67
Tabelle 32: Mutationsprofil Patient 34853.	68
Tabelle 33: Mutationsprofil Patient 36349.	69
Tabelle 34: Mutationsprofil Patient 34850.	71
Tabelle 35: Mutationen C1011A und T1386C.	72
Tabelle 36: Ergebnisse Komplex I-Patientenkollektiv.	80
Tabelle 37: Ergebnisse Komplex I+IV-Patientenkollektiv.	85
Tabelle 38: 187 Komplex I-Defekt Patienten, 4 Negativproben, 384-Loch-Platte.	92
Tabelle 39: 189 Komplex I+IV Patienten, 3 Negativproben, 384-Loch-Platte.	92
Tabelle 40: Liste der für den Screen verwendeten Primer.	93

7.4 Literaturverzeichnis

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290: 457-65

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 1999;23: 147

AWMF-Leitlinien. Allgemeine Diagnostik bei klinischem Verdacht auf eine mitochondriale Erkrankung. In: "Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - mitochondriale Erkrankungen." *Georg Thieme Verlag Stuttgart.* 4. überarbeitete Auflage 2008; S. 654 ff.,

Bandelt HJ, Salas A, Bravi CM. What is a 'novel' mtDNA mutation - and does 'novelty' really matter? *Journal of human genetics* 2006;51: 1073-82

Bandelt HJ, Yao YG, Salas A. The search of 'novel' mtDNA mutations in hypertrophic cardiomyopathy: MITOMAPping as a risk factor. *International Journal of Cardiology* 2008;126: 439-42

Bandelt HJ, Salas A, Taylor RW, Yao YG. Exaggerated status of 'novel' and 'pathogenic' mtDNA sequence variants due to inadequate database searches. *Human Mutation* 2009;30: 191-96

Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowlers RN, Turnbull DM, Weber K. Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. A potential disease mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 1993;268: 19559-64

Blakely EL, Poulton J, Pike M, Wojnarowska F, Turnbull DM, McFarland R, Taylor RW. Childhood neurological presentation of a novel mitochondrial tRNA(Val) gene mutation. *Journal of the Neurological Sciences* 2004;225: 99-103

Blakely EL, Trip SA, Swalwell H, He L, Wren DR, Rich P, Turnbull DM, Omer SE, Taylor RW. A new mitochondrial transfer RNAPro gene mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers and other neurological features. *Archives of Neurology* 2009;66: 399-402

Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Research* 2005 ;33: D611-3

Brown MD, Torroni A, Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial tRNA(Thr) mutations and lethal infantile mitochondrial myopathy. *American Journal of Human Genetics* 1992a;51: 446-7

Brown MD, Yang CC, Trounce I, Torroni A, Lott MT, Wallace DC. A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends the amino acid sequence of cytochrome c oxidase subunit I. *American Journal of Human Genetics* 1992b;51: 378-85

Cannone JJ, Subramanian S, Schnare MN, Collett JR, D'Souza LM, Du Y, Feng B, Lin N, Madabusi LV, Muller KM, Pande N, Shang Z, Yu N, Gutell RR. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 2002;3: 2

Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The changing meanings of 'mutation': A contextualized study of public discourse. *Human Mutation* 2002;19: 69-75

Coulbault L, Deslandes B, Herlicoviez D, Read MH, Leporrier N, Schaeffer S, Mouadil A, Lombes A, Chapon F, Jauzac P, Allouche S. A novel mutation 3090 G>A of the mitochondrial 16S ribosomal RNA associated with myopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;362: 601-5

Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapinij P, Mann JR, Dahl HH, Chinnery PF. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature Genetics* 2008;40: 249-54

Crouse J, Amorese D. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus* 1987;9: 3-5

Danielson SR, Carelli V, Tan G, Martinuzzi A, Schapira AH, Savontaus ML, Cortopassi GA. Isolation of transcriptomal changes attributable to LHON mutations and the cybridization process. *Brain* 2005;128: 1026-37

Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA anbormalities. *Annals of Neurology* 2001;49: 377-83

Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99: 5261-6

DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England Journal of Medicine* 2003;348: 2656-68

Dobrowolski SF, Gray J, Miller T, Sears M. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling. *Human Mutation* 2009;30: 891-8

Druzhyna NM, Wilson GL, LeDoux SP. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 2008;129: 383-90

Eichhorn-Mulligan K, Cestari DM. The genetics of leber hereditary optic neuropathy - prototype of an inherited optic neuropathy with mitochondrial dysfunction. *Seminars in Ophthalmology* 2008;23: 27-37

Esteban JA, Salas M, Blanco L. Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *The Journal of Biological Chemistry* 1993;268: 2719-26

Fernandez-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;1793: 200-11

Finnila S, Autere J, Lehtovirta M, Hartikainen P, Mannermaa A, Soininen H, Majamaa K. Increased risk of sensorineural hearing loss and migraine in patients with a rare mitochondrial DNA variant 4336A>G in tRNAGIn. *Journal of Medical Genetics* 2001;38: 400-5

Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatric Neurology* 2008;39: 223-35

Goto Y, Tojo M, Tohyama J, Horai S, Nonaka I. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a family with mitochondrial myopathy. *Annals of Neurology* 1992;31: 672-5

Grasso M, Diegoli M, Brega A, Campana C, Tavazzi L, Arbustini E. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics : EJHG* 2001;9: 311-5

Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science (New York, N.Y.)* 1999;283: 1476-81

Guan MX, Yan Q, Li X, Bykhovskaya Y, Gallo-Teran J, Hajek P, Umeda N, Zhao H, Garrido G, Mengesha E, Suzuki T, del Castillo I, Peters JL, Li R, Qian Y, Wang X, Ballana E, Shohat M, Lu J, Estivill X, Watanabe K, Fischel-Ghodsian N. Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *American Journal of Human Genetics* 2006;79: 291-302

Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999;41: 95-98

Hanna MG, Nelson IP. Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 1999;55: 691-706

Hixson JE, Wong TW, Clayton DA. Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry* 1986;261: 2384-90

Holbrook JF, Stabley D, Sol-Church K. Exploring whole genome amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* 2005;16: 125-33

Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, Pyle A, Elson J, Howell N, La Morgia C, Valentino ML, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Sadun AA, Salomao SR, Belfort R Jr, Griffiths P, Man PY, de Coo RF, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Torroni A, Chinnery PF. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *American Journal of Human Genetics* 2007;81: 228-33

Hudson G, Keers S, Yu Wai Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Zeviani M, Carrara F, Horvath R, Karcagi V, Spruijt L, de Coo IF, Smeets HJ, Chinnery PF. Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *American Journal of Human Genetics* 2005;77: 1086-91

Ingman M, Gyllensten U. mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. *Nucleic Acids Research* 2006;34: D749-51

Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genetics* 2000;26: 176-81

Jacobs HT, Turnbull DM. Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends in Genetics : TIG* 2005;21: 312-4

Jaksch M, Kleinle S, Scharfe C, Klopstock T, Pongratz D, Muller-Hocker J, Gerbitz KD, Liechti-Gallati S, Lochmuller H, Horvath R. Frequency of mitochondrial transfer RNA mutations and deletions in 225 patients presenting with respiratory chain deficiencies. *Journal of Medical Genetics* 2001;38: 665-73

Jameson D, Gibson AP, Hudelot C, Higgs PG. OGRe: a relational database for comparative analysis of mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 2003;31: 202-6

Jin L, Yang A, Zhu Y, Zhao J, Wang X, Yang L, Sun D, Tao Z, Tsushima A, Wu G, Xu L, Chen C, Yi B, Cai J, Tang X, Wang J, Li D, Yuan Q, Liao Z, Chen J, Li Z, Lu J, Guan MX. Mitochondrial tRNASer(UCN) gene is the hot spot for mutations associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;361: 133-9

Kato T, Kunugi H, Nanko S, Kato N. Mitochondrial DNA polymorphisms in bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders* 2001;62: 151-64

King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246: 500-3

Koga Y, Akita Y, Takane N, Sato Y, Kato H. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Archives of Disease in Childhood* 2000;82: 407-11

Le Pecq JB, Paoletti C. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry* 1966;17: 100-7

Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1951;14: 216-21

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of singlenucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry* 2004;50: 1156-64

Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, Janssen AJ, Triepels RH, Sengers RC, van den Heuvel LP. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Human Mutation* 2000;15: 123-34

Löffler, Petrides, Heinrich. "Biochemie und Pathobiochemie" Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin. 8. Auflage 2007.

Lu J, Qian Y, Li Z, Yang A, Zhu Y, Li R, Yang L, Tang X, Chen B, Ding Y, Li Y, You J, Zheng J, Tao Z, Zhao F, Wang J, Sun D, Zhao J, Meng Y, Guan MX. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion* 2010;10: 69-81

Macherey-Nagel (2008) PCR Clean up Manual.

(http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_NFast96.pdf) 3rd Rev., Stand: 22.11.2008
Manfredi G, Schon EA, Bonilla E, Moraes CT, Shanske S, DiMauro S. Identification of a mutation in the mitochondrial tRNA(Cys) gene associated with mitochondrial encephalopathy. *Human Mutation* 1996;7: 158-63

Maniura-Weber K, Helm M, Engemann K, Eckertz S, Mollers M, Schauen M, Hayrapetyan A, von Kleist-Retzow JC, Lightowlers RN, Bindoff LA, Wiesner RJ. Molecular dysfunction associated with the human mitochondrial 3302A>G mutation in the MTTL1 (mt-tRNALeu(UUR)) gene. *Nucleic Acids Research* 2006;34: 6404-15

Mayr-Wohlfart U, Paulus C, Henneberg A, Rodel G. Mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis patients with severe optic involvement. *Acta Neurologica Scandinavica* 1996;94: 167-71

Mayr JA, Meierhofer D, Zimmermann F, Feichtinger R, Kogler C, Ratschek M, Schmeller N, Sperl W, Kofler B. Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocytoma. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14: 2270-5

Mitchell AL, Elson JL, Howell N, Taylor RW, Turnbull DM. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? *Journal of Medical Genetics* 2006;43: 175-9

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961;191: 144-8

Montoya J, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1787: 476-83

Moslemi AR, Darin N. Molecular genetic and clinical aspects of mitochondrial disorders in childhood. *Mitochondrion* 2007;7: 241-52

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987;155: 335-50

Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 2000;302: 205-17

Ogle RF, Christodoulou J, Fagan E, Blok RB, Kirby DM, Seller KL, Dahl HH, Thorburn DR. Mitochondrial myopathy with tRNA(Leu(UUR)) mutation and complex I deficiency responsive to riboflavin. *The Journal of Pediatrics* 1997;130: 138-45

Opdal SH, Rognum TO. The sudden infant death syndrome gene: does it exist? *Pediatrics* 2004;114: e506-12

Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 1999;48: 427-34

Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, Egholm M, Rothberg JM, Leamon JH. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 2006;7: 216

Pulkes T, Sweeney MG, Hanna MG. Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet* 2000;356: 2068-9

Putz J, Dupuis B, Sissler M, Florentz C. Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. *RNA (New York, N.Y.)* 2007;13: 1184-90

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007;8: 597-608

Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry* 2004;50: 1748-54

Ruppert V, Nolte D, Aschenbrenner T, Pankuweit S, Funck R, Maisch B. Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;318: 535-43

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74: 5463-7

Santorelli FM, Siciliano G, Casali C, Basirico MG, Carrozzo R, Calvosa F, Sartucci F, Bonfiglio L, Murri L, DiMauro S. Mitochondrial tRNA(Cys) gene mutation (A5814G): a second family with mitochondrial encephalopathy. *Neuromuscular Disorders : NMD* 1997;7: 156-9

Sartore M, Grasso M, Piccolo G, Fasani R, Bergamaschi R, Malaspina A, Ceroni M, Kobayashi M, Semeraro A, Arbustini E, et al. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)-related mitochondrial DNA sequence changes in italian patients presenting with sporadic bilateral optic neuritis. *Biochemical and Molecular Medicine* 1995;56: 45-51

Scaglia F, Wong LJ. Human mitochondrial transfer RNAs: role of pathogenic mutation in disease. *Muscle & Nerve* 2008;37: 150-71

Schmidt C. (2007) Molekulargenetische Charakterisierung von Mutationen der mitochondrialen 12S rRNA bei Patienten mit bilateraler Vestibulopathie. *Dissertation LMU München.*

(http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=986865095&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=986865095.pdf) Stand: 22.11.2008

Scuderi C, Borgione E, Musumeci S, Elia M, Castello F, Fichera M, Davidzon G, DiMauro S. Severe encephalomyopathy in a patient with homoplasmic A5814G point mutation in mitochondrial tRNACys gene. *Neuromuscular Disorders : NMD* 2007;17: 258-61

Simon DK, Mayeux R, Marder K, Kowall NW, Beal MF, Johns DR. Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease. *Neurology* 2000;54: 703-9

Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, Allard P, Dillehay DL, Nusinowitz S, Heckenlively JR, MacGregor GR, Wallace DC. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97: 14461-6

Sternberg D, Chatzoglou E, Laforet P, Fayet G, Jardel C, Blondy P, Fardeau M, Amselem S, Eymard B, Lombes A. Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain : a Journal of Neurology* 2001;124: 984-94

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction* 2000;63: 582-90

Swerdlow RH. Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondriopathies. *Journal of Neuroscience Research* 2007;85: 3416-28

Tapper DP, Clayton DA. Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *The Journal of Biological Chemistry* 1981;256: 5109-15

Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1797: 113-28.

Tysoe C, Robinson D, Brayne C, Dening T, Paykel ES, Huppert FA, Rubinsztein DC. The tRNA(Gln) 4336 mitochondrial DNA variant is not a high penetrance mutation which predisposes to dementia before the age of 75 years. *Journal of Medical Genetics* 1996;33: 1002-6

Vogel RO, Smeitink JA, Nijtmans LG. Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007;1767: 1215-27

Wallace DC. Mouse models for mitochondrial disease. *American Journal of Medical Genetics* 2001;106: 71-93

Wang X, Lu J, Zhu Y, Yang A, Yang L, Li R, Chen B, Qian Y, Tang X, Wang J, Zhang X, Guan MX. Mitochondrial tRNAThr G15927A mutation may modulate the phenotypic manifestation of ototoxic 12S rRNA A1555G mutation in four Chinese families. *Pharmacogenetics and Genomics* 2008;18: 1059-70

Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC, Palmer MS, Collinge J. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Human Genetics* 1996;98: 259-64

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 2003;49: 853-60

Yamasoba T, Goto Y, Oka Y, Nishino I, Tsukuda K, Nonaka I. Atypical muscle pathology and a survey of cis-mutations in deaf patients harboring a 1555 A-to-G point mutation in the mitochondrial ribosomal RNA gene. *Neuromuscular Disorders : NMD* 2002;12: 506-12

Yoon KL, Aprille JR, Ernst SG. Mitochondrial tRNA(thr) mutation in fatal infantile respiratory enzyme deficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991;176: 1112-5

Yuan H, Qian Y, Xu Y, Cao J, Bai L, Shen W, Ji F, Zhang X, Kang D, Mo JQ, Greinwald JH, Han D, Zhai S, Young WY, Guan MX. Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial COI/tRNA(Ser(UCN)) genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 2005;138A: 133-40

Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. Current Opinion in Neurology 2007;20: 564-71

Zimmermann FA, Mayr JA, Feichtinger R, Neureiter D, Lechner R, Koegler C, Ratschek M, Rusmir H, Sargsyan K, Sperl W, Kofler B. Respiratory chain complex I is a mitochondrial tumor suppressor of oncocytic tumors. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 2011;3: 315-25

Zweig AS, Karolchik D, Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ. UCSC genome browser tutorial. *Genomics* 2008;92: 75-84