

# Exomdiagnostik verändert die Sicht auf Mitochondriopathien

Der schon lange angekündigte Preis für das 1000-Dollar-Genom ist noch nicht vergeben [9], Exome aber, die Gesamtheit aller kodierenden Sequenzen im Genom, werden heute bereits in dieser Preiskategorie angeboten. Die molekulargenetische Diagnostik steht damit vor einem Umbruch. Unmittelbare Auswirkungen auf die klinische Praxis durch verbesserte diagnostische Verfahren können dabei am ehesten erwartet werden für monogene Erkrankungen, bei denen Mutationen in einer großen Zahl verschiedener Gene klinisch nur schwer voneinander abgrenzbare Phänotypen bewirken. Einen hohen Grad genetischer Heterogenität weisen z. B. die Atmungskettendefekte auf, die größte und wichtigste Untergruppe der Mitochondriopathien, die durch den biochemischen Nachweis einer verminderten oxidativen Phosphorylierung definiert sind [8].

Die Proteinkomplexe der Atmungskette in der Innenmembran der Mitochondrien sind für die Biosynthese und regelrechte Funktionsweise auf Hunderte von Proteinen angewiesen. Der Grund dafür ist zum einen die schiere Größe der Proteinkomplexe und zum anderen der aufwendige Prozess, der für ihre Assemblierung notwendig ist. Dabei werden 2 Proteinbiosyntheseapparate eingesetzt. Die Gene einer Reihe von Untereinheiten sind in der mitochondrialen mtDNA lokalisiert und müssen unter Verwendung organellspezifischer Komponenten repliziert, transkribiert und translatiert werden. Andere Untereinheiten stammen aus dem Zellkern und müssen gezielt in

die Mitochondrien bzw. die innere Membran importiert und dort assembliert werden (■ **Abb. 1**). Die Häufigkeit von Atmungskettendefekten wird mit bis zu 1:8500 angegeben [1]. Von wenigen Ausnahmen abgesehen stehen nur symptomatische Behandlungskonzepte zur Verfügung. Die Erkrankung manifestiert sich meist schon im Kindesalter und verläuft i. d. R. progressiv [17].

Die Diagnostik von Mitochondriopathien stellt hohe Anforderungen an Kliniker, Biochemiker und Molekularbiologen. Die pathophysiologischen Konzepte und mit ihnen die Diagnostik waren lange geprägt vom Prinzip des mitochondrialen Erbgangs, von der Analyse der mtDNA und von biochemischen Untersuchungen der Atmungskettenfunktion. Mit der Einführung der Exomsequenzierung verschiebt sich die Aufmerksamkeit jetzt auf nukleäre Gene, die unterdessen in ihrer Gesamtheit auf pathogene Mutationen hin untersucht werden können. In diesem Artikel wird dieser neue Abschnitt der Mitochondriopathiediagnostik näher beschrieben. Mögliche Veränderungen etablierter diagnostischer Verfahren werden diskutiert.

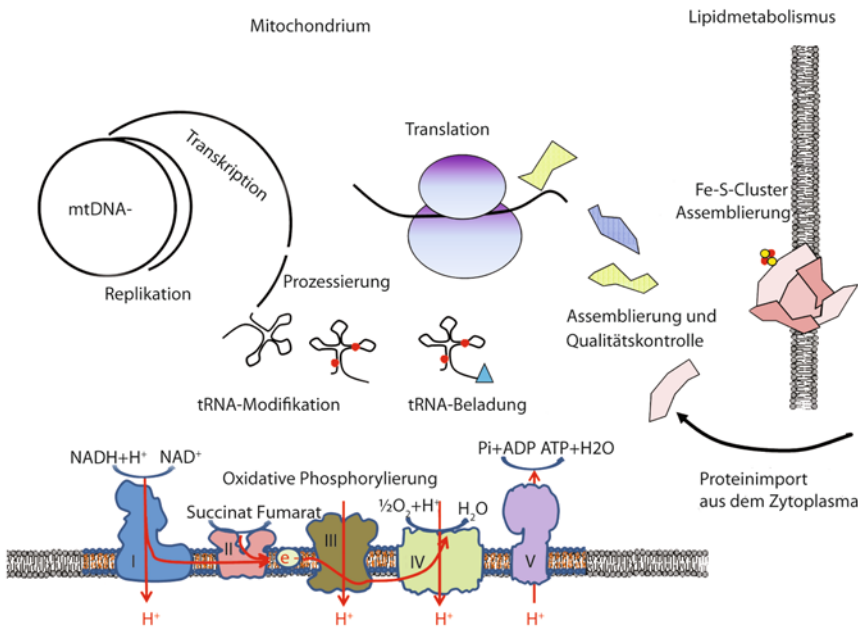
## Atmungskettendefekte

### Molekulare Diagnostik

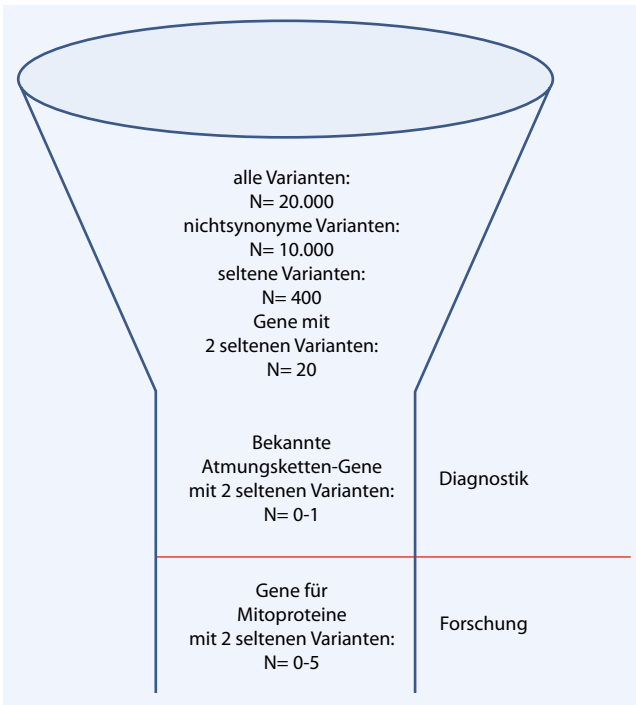
In der klinischen Routine blieb die Mehrzahl der Atmungskettendefekte bisher ohne molekulare Diagnose. Bei klinischem Verdacht auf einen Atmungskettendefekt steht mit Ausnahme einzelner klar

abgrenzbarer Krankheitsbilder wie z. B. der hereditären Leber-Optikusneuropathie („Leber hereditary optic neuropathy“, LHON) zunächst die biochemische Diagnostik am Muskelbiopsat im Vordergrund. Wird ein enzymatischer Defekt der Atmungskette nachgewiesen, folgt die Sequenzierung von Kandidatengenen im mitochondrialen (mtDNA) als auch im Kerngenom (nDNA). Bei Kindern wird der Anteil von identifizierten mtDNA-Mutationen bei biochemisch nachgewiesener mitochondrialer Dysfunktion mit 15–20% angegeben [2, 20]. Der Prozentsatz identifizierter nDNA-Mutationen liegt in einer ähnlichen Größenordnung, er ist abhängig von der Auswahl der untersuchten nukleären Kandidatengene.

Basierend auf Genom- und Proteomexperimenten wird die Gesamtzahl mitochondrialer Proteine und der sie kodierenden Gene auf mehr als 1500 geschätzt [3]. Jede Auswahl aus dieser Gesamtmenge von Genen erlaubt nur begrenzte Einblicke in die Gesamtvarianz. So ergab z. B. die Untersuchung von 5 für die mitochondriale Proteinsynthese notwendigen Genen bei 52 Patienten mit einem kombinierten Atmungskettendefekt nur eine einzige molekulare Diagnose [10]. Bei der Untersuchung von 75 Genen bei 152 Kindern mit Komplex-I-Defekt fanden sich bei 7% (10/153) mtDNA-Mutationen und bei 12% (18/153) nDNA-Mutationen [12]. Betrachtet man die Vielzahl der Prozesse, die durchlaufen werden müssen, um eine funktionierende Atmungskette zu etablieren, erscheint eine Zahl von mehreren Hundert Kandidatengenen als realistische



**Abb. 1** ▲ Schematische Darstellung von mitochondrialen Prozessen, die in die oxidative Phosphorylierung eingebunden sind



**Abb. 2** ◀ Abfolge von Filtern zur Identifizierung seltener (<0,5%) pathogener Mutationen bei der Exomsequenzierung von Patienten mit Atmungskettendefekten. Das gezeigte Schema zeigt beispielhaft Zahlen für typische Filtereinstellungen bei einem rezessiven Modell ( $\geq 2$  Mutationen pro Gen) und unterscheidet zwischen einem Diagnostikmodus (Suche nach Mutationen in bekannten Genen) und einem Forschungsmodus (Suche in allen Genen)

Schätzung. Allein der Komplex I der Atmungskette ist aus 45 Proteinen aufgebaut, wovon 7 auf der mtDNA und 38 im nukleären Genom kodiert sind. Zusätzlich sind eine Reihe so genannter Assemblierungsfaktoren beschrieben, darunter das ACAD9-Protein, das für den korrekten Aufbau des Komplex I benötigt wird. Weitere Kandidaten finden sich im Be-

reich der mitochondrialen DNA-Replikation, Transkription und Translation. Dazu kommen Kandidatengene, die für die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern oder für die Verfügbarkeit von Kofaktoren der Atmungskette benötigt werden. Auch die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membran ist für Einbau und Funktion der Atmungskette von Bedeutung.

Weitere Kandidatengene sind deshalb solche, deren Produkte den Lipidstoffwechsel der mitochondrialen Membran beeinflussen (■ **Abb. 1**).

### „Next generation sequencing“

Die Mehrzahl pathogener Sequenzvarianten bei monogenen Erkrankungen lassen sich auf die kodierenden Sequenzen annotierter Gene kartieren. Mit der Exomsequenzierung steht eine Methodik zur Verfügung, mit der umfassend und kosteneffizient alle Exons des Humangenoms auf Einzelnukleotidveränderungen und Indels bis zu einer Größe von 20–30 Basenpaaren untersucht werden können [18]. Die Sequenzieretechnik kann weitgehend automatisiert werden, angefangen von der Probenvorbereitung über die eigentliche Sequenzierung bis hin zur Analysepipeline der resultierenden Sequenzen mit Leselängen bis zu 200 Basenpaaren, je nach benutzter Apparatur. Voraussetzung für die gezielte hochparallele Sequenzierung von bis zu 2% des Gesamtgenoms war die Entwicklung so genannter Capture-Methoden, die es erlauben, definierte Abschnitte des Genoms mithilfe von synthetischen Oligonukleotiden aus dem Gesamtgenom anzureichern. Eine typische Exomsequenzierung einer Patientenprobe generiert bis zu 10 GB an digitalisierten DNA-Sequenzen in einem Lauf [13]. Etwa 90% dieser Sequenzen lassen sich auf die im Genom annotierten Exons kartieren. Dabei werden die Exomsequenzen im Durchschnitt 100-fach abgedeckt, wodurch sich niedrige Fehlerraten bei der Sequenzierung erzielen lassen. Der Abgleich einer generierten Patientensequenz mit einer Referenzsequenz ergibt etwa 20.000 Varianten per Exom, Splicevarianten an den Exon-Intron-Grenzen mit eingeschlossen. Diese Varianten werden über eine bioinformatische Prozesskette gefiltert nach Häufigkeit in der Population, zu erwartendem Effekt auf das Genprodukt und schon bekanntem Bezug zu speziellen Phänotypen (■ **Abb. 2**).

Die Filtereinstellungen sind variabel und haben Einfluss auf Sensitivität und Spezifität der Untersuchung. Unter der Annahme eines rezessiven Modells sind Varianten in beiden Allelen zu erwarten, also mindestens 2 Varianten pro Gen.

Mit diesem Schritt wird die Anzahl infrage kommender kausaler Sequenzvarianten auf ein überschaubares Maß reduziert. Bei Atmungskettendefekten kann zusätzlich ein weiterer starker Filter zum Einsatz kommen, und zwar die Einschränkung auf Gene, die für mitochondriale Proteine kodieren, sodass als Ergebnis einer Exomsequenzierung in vielen Fällen nur ein einziges Gen mit 2 Mutationen als Kandidat übrigbleibt. Der exomweite Ansatz birgt zusätzlich die Möglichkeit, auch nichtmitochondriale, krankheitsverursachende Mutationen zu entdecken. So konnten wir bei einem Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Mitochondriopathie Mutationen in einem Riboflavintransporter identifizieren, der nicht wie die schon bekannten Transporter im Darmepithel, sondern v. a. im Gehirn exprimiert wird [15].

Die Sensitivität der Exomanalyse ist verfahrensbedingt begrenzt, da regulatorische und strukturelle Mutationen mit aktuellen Sequenzieretechniken praktisch nicht erfasst werden können. Auch die Spezifität (1 – Anteil Falsch-Positiver) des Verfahrens ist limitiert, kann im Fall von Atmungskettendefekten aber erhöht werden, indem man potenziell pathogene Veränderungen per Komplementationsversuch in Zellkulturen testet, was zwar technisch aufwendig, aber sehr effizient ist. Im Rahmen des Netzwerks für seltene Erkrankungen mitoNET (<http://www.mitoNET.de>) und dem E-rare-Programm GENOMIT wurden inzwischen 50 Proben von Patienten mit Atmungskettenkomplexdefekten einer Exomsequenzierung unterzogen. Dabei konnten in mehr als der Hälfte der Proben ursächliche Mutationen nachgewiesen werden, wovon wieder etwa die Hälfte Gene betraf, die zuvor nicht mit Mitochondriopathien in Verbindung gebracht worden waren. Eine Auflistung der mittels Exomanalyse gefundenen und schon publizierten Mitochondriopathiegene findet sich in **Tab. 1**. Die durch die Mutation dieser Gene betroffenen mitochondrialen Prozesse belegen eindrucksvoll die ätiologische Heterogenität der Atmungskettendefekte und erweitern unser Verständnis grundlegender biologischer Prozesse in Mitochondrien.

Mit der Identifizierung von Mutationen in *ACAD9* beispielsweise konnte nicht nur eine relativ häufige Ursache für Komplex-I-Defekte aufgedeckt werden, sondern es eröffnete sich auch ein direkter Therapieansatz (Riboflavinsubstitution) für betroffene Patienten [5, 11]. *ACAD9* gehört zur Familie der Acyl-CoA-Dehydrogenasen, von denen bekannt ist, dass Riboflavin ihre Stabilität und Aktivität steigern kann. Untersuchungen an Zelllinien von 9 Patienten mit homozygoten oder compound-heterozygoten Mutationen in *ACAD9* zeigten durchweg eine signifikante Steigerung der Komplex-I-Aktivität unter Behandlung mit Riboflavin.

### Zukünftige Rolle der molekularen Diagnostik bei Mitochondriopathien

Bei klinischem Verdacht auf eine Mitochondriopathie folgt eine biochemische Diagnostik aus Muskelzellen und/oder Fibroblasten. Erst bei biochemischem Nachweis eines Atmungskettendefekts erfolgt gemäß dem derzeit noch üblichen diagnostischen Vorgehen die Auswahl der zu untersuchenden Gene, und zwar im Sinne einer molekularen Stufendiagnostik, gereiht nach der Häufigkeit bekannter Mutationen in diesen Kandidatengenen. Eine Umstellung der diagnostischen Schrittfolge, also zuerst die DNA-Diagnostik und erst im zweiten Schritt die funktionelle bzw. biochemische Untersuchung auf metabolischer Ebene, sollte wegen des relativen hohen Kostenaufwands und der Invasivität von Gewebeuntersuchungen zukünftig in Erwägung gezogen werden. Trotz des Beweises der technischen Machbarkeit der genomweiten Diagnostik muss aber erst die klinische Brauchbarkeit eines solchen Verfahrens nachgewiesen werden.

Drei Gesichtspunkte sprechen für eine solche Umstellung: Erstens erlaubt die Exomsequenzierung ein rasches Mutationsscreening parallel in Hunderten von potenziell ursächlichen Genen. Zweitens ist der methodische Aufwand einer Exomsequenzierung als Primärdiagnostik inzwischen überschaubar und bereits zum heutigen Zeitpunkt kostengünstiger als wiederholte Einzelgenuntersuchungen. DNA-Präparation, Sequenzierung

medgen 2012 · 24:183–186  
DOI 10.1007/s11825-012-0348-6  
© Springer-Verlag 2012

### H. Prokisch · K. Oexle · T. Meitinger Exomdiagnostik verändert die Sicht auf Mitochondriopathien

#### Zusammenfassung

Indem die molekulargenetische Untersuchung vieler Gene (Gen-Panels bzw. Exomanalyse) immer günstiger wird, steht deren Anwendung in der klinischen Praxis bevor. Dies wird insbesondere den Bereich solcher monogenen Erkrankungen betreffen, die stark heterogen sind, bei denen also Mutationen in vielen verschiedenen Genen zu Phänotypen führen, die klinisch nur schwer voneinander abgrenzbar sind. Ein Beispiel hierfür sind die Atmungskettendefekte. Die Exomsequenzierung ermöglicht hier ein rasches Mutationsscreening, das parallel in allen Genen abläuft, die ursächlich infrage kommen.

#### Schlüsselwörter

Mitochondriopathien · Atmungskette · Genetische Beratung · DNA-Sequenzierung · Exom

### Exome diagnostics are changing our view of mitochondrial diseases

#### Abstract

With molecular-genetic diagnostics of large sets of genes (gene panels, exome sequencing) becoming less expensive, it is expected that they will be increasingly used in clinical practice. This will especially affect those monogenic diseases which are heterogenic, that is, in which mutations of many different genes result in phenotypes that are clinically difficult to distinguish from each other. Respiratory chain defects are an example of such disorders. Exome sequencing allows for rapid, simultaneous screening of all genes that come into question.

#### Keywords

Mitochondrial diseases · Respiratory chain · Genetic counseling · DNA sequencing · Exome

und DNA-Analyse sind vollständig automatisierbar und damit in Zukunft als Primärdiagnostik weitaus kostengünstiger zu realisieren als biochemische Untersuchungen, die auf invasive Maßnahmen (Biopsie) und Zellkulturen (Fibroblasten) angewiesen sind. Drittens kann dem primären Nachweis einer Mutation eine kostenreduzierte, weil informierte biochemi-

**Tab. 1** Durch Exomsequenzierung identifizierte mutierte Gene bei Mitochondriopathien

Gen	Prozess	Reference
ACAD9	Assemblierung von Komplex I	Haack et al. [11]
MRPL3	Translation	Galmiche et al. [4]
AARS2	tRNA-Beladung	Götz et al. [7]
AFG3L2	Qualitätskontrolle	Pierson et al. [19]
AGK	Lipidmetabolismus	Mayr et al. [16]
ACO2	Krebszyklus	Spiegel et al. [21]
MTO1	tRNA-Modifizierung	Ghezzi et al. [6]
NDUFB3	Komplex-I-Untereinheit	Haack et al. [13]
BOLA3	Fe-S-Cluster-Assemblierung	Haack et al. [14]
SERAC1	Lipidmetabolismus	Wortmann et al. [23]
EARS2	tRNA-Beladung	Steenweg et al. [22]

sche Sekundärdiagnostik folgen, durch die die nötige Spezifität im Fall der Identifikation bisher unbekannter Mutationen erreicht wird. In einem großen Teil der Fälle wird die molekulare Diagnostik so dem Patienten die Biopsie – zumindest die Muskelbiopsie – ersparen. In anderen Fällen, speziell dann, wenn die Exomanalyse keine ätiologischen Kandidaten erbringt, wird die biochemische Diagnostik ihre Bedeutung behalten, denn in der Tat entgeht bei der Exomsequenzierung ein kleiner Teil der Punktmutationen der Detektion; zudem werden regulatorische und strukturelle Sequenzvarianten derzeit noch nicht ausreichend abgebildet.

Unabhängig von Fragen der Sensitivität und Spezifität ist schließlich zu berücksichtigen, dass sich bei genomweiten Sequenzierungen wie der Exomanalyse Nebenbefunde ergeben, was bei der Konsent-Erhebung und bei der Befundmitteilung berücksichtigt werden muss.

### Fazit für die Praxis

- Die Diagnostik der Mitochondriopathien wird in Zukunft verstärkt auf Exomsequenzierungen zurückgreifen.
- Die ausgeprägte genetische Heterogenität und die weitgehend homogene Verteilung der Mutationslast auf viele Gene verschaffen dem Feld der Mitochondriopathienetik eine Vorreiterrolle bei der Einführung von parallelen Sequenzieretechniken in die klinische Praxis.
- Eine so beschleunigte Primärdiagnostik wird die Diagnosefindung und Beratung der Patienten erleichtern, unsere Kenntnisse über Pathogenese

**und Genotyp-Phänotyp-Zusammenhänge verbessern und in einigen Fällen sogar helfen, das vorhandene therapeutische Arsenal gezielter einzusetzen.**

### Korrespondenzadresse

#### T. Meitinger

Institut für Humangenetik  
Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München  
Trogerstr. 32, 81675 München  
meitinger@humangenetik.med.tu-muenchen.de

**Danksagung/Interessenkonflikt.** Wir bedanken uns bei den Patienten, die Proben für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt haben. Die Autoren werden unterstützt von den BMBF-geförderten Verbundprojekten mitoNET und E-rare (GENOMIT) sowie den EU-geförderten NGS-Projekten (FP7) GUVADIS und ESGI. Der korrespondierende Autor gibt für sich und seine Koautoren an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

### Literatur

1. Chinnery P (2010) NCBI bookshelf, GeneReviews. Mitochondrial disorders overview. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>. Zugriffen: 01. Sept. 2012
2. Dimauro S, Davidzon G (2005) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 37:222–232
3. Elstner M, Andreoli C, Klopstock T et al (2009) The mitochondrial proteome database: MitoP2. *Methods Enzymol* 457:3–20
4. Galmiche L, Serre V, Beinat M et al (2011) Exome sequencing identifies MRPL3 mutation in mitochondrial cardiomyopathy. *Hum Mutat* 32:1225–1231
5. Gerards M, Bosch BJ van den, Danhauser K et al (2011) Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene. *Brain* 134:210–219
6. Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB et al (2012) Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet* 90:1079–1087

7. Götz A, Tyynismaa H, Euro L et al (2011) Exome sequencing identifies mitochondrial alanyl-tRNA synthetase mutations in infantile mitochondrial cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 88:635–642
8. Koopman WJ, Willems PH, Smeitink JA (2012) Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med* 366:1132–1141
9. Kedes L, Liu ET (2010) The Archon Genomics X PRIZE for whole human genome sequencing. *Nat Genet* 42:917–918
10. Kemp JP, Smith PM, Pyle A et al (2001) Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency. *Brain* 134:183–195
11. Haack TB, Danhauser K, Haberberger B et al (2010) Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet* 42:1131–1134
12. Haack TB, Madignier F, Herzer M et al (2012) Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9. *J Med Genet* 49:83–89
13. Haack TB, Haberberger B, Frisch EM et al (2012) Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet* 49:277–283
14. Haack TB, Rolinski B, Haberberger B et al (2012) Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *J Inher Metab Dis*: 2012 May 5 [Epub ahead of print]
15. Haack TB, Makowski C, Yao Y et al (2012) Impaired riboflavin transport due to missense mutations in SLC52A2 causes Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. *J Inher Metab Dis*: 2012 Aug 3 [Epub ahead of print]
16. Mayr JA, Haack TB, Graf E et al (2012) Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *Am J Hum Genet* 90:314–320
17. Munnich A, Rötig A, Chretien D et al (1996) Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inher Metab Dis* 19:521–527
18. Neveling K, Hoischen A (2012) Exom-Sequenzierung zur Identifizierung von Krankheitsgenen. *Med Genet* 24:4–11
19. Pierson TM, Adams D, Bonn F et al (2011) Whole-exome sequencing identifies homozygous AFG3L2 mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial m-AAA proteases. *PLoS Genet* 7:e1002325
20. Rötig A, Lebon S, Zinovieva E et al (2004) Molecular diagnostics of mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 1659:129–135
21. Spiegel R, Pines O, Ta-Shma A et al (2012) Infantile cerebellar-retinal degeneration associated with a mutation in mitochondrial aconitase, ACO2. *Am J Hum Genet* 90:518–523
22. Steenweg ME, Ghezzi D, Haack T et al (2012) Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate 'LTBL' caused by EARS2 mutations. *Brain* 135:1387–1394
23. Wortmann SB, Vaz FM, Gardetichik T et al (2012) Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nat Genet* 44:797–802