

AUS DER KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK
IM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL
KLINIKUM DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. SCI. NAT. CHRISTOPH KLEIN



**Von der Mutation zur Manifestation:
Pathomechanismen und klinische
Ausprägungen seltener Erkrankungen**

Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt

von

Dr. med. Katharina Danhauser

2025

Fachmentorat

Herr Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Herr Prof. Dr. med. Ingo Borggräfe

Herr Prof. Dr. med. Thomas Klopstock

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Seltene neurometabolische Erkrankungen	4
1.2	Entwicklungen in der molekularen Diagnostik	6
1.3	Einsatz von Next-Generation-Sequencing-Technologien bei seltenen Erkrankungen.....	7
2	Zielsetzung und Bedeutung der Arbeiten für das Fachgebiet	8
3	Teilprojekte	10
3.1	Charakterisierung neuer genetischer Ursachen von neurometabolischen Erkrankungen ..	10
3.1.1	Störung der ADP-Ribosylierung.....	10
3.1.2	Störung des NAD(P)HX-Reparatursystems.....	14
3.1.3	Störung der Homöostase reaktiver Sauerstoffspezies.....	17
3.1.4	Störung im Lysinstoffwechsel.....	19
3.1.5	Störung der mtDNA-Replikation.....	22
3.2	Vertiefung des Verständnisses bekannter genetischer Defekte	24
3.2.1	Kombinierte Störungen der oxidativen Phosphorylierung.....	24
3.2.2	Coenzym Q10 - Defizienz	27
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	30
5	Literatur	31
6	Publikationsverzeichnis.....	35
6.1	Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin	35
6.2	Originalarbeiten als Koautorin.....	36
7	Danksagung.....	40
8	Publikationen, auf denen die Habilitationsschrift beruht.....	41

1 Einleitung

Der Begriff „seltene Krankheiten“ steht für Erkrankungen, die eine geringe Prävalenz in der Bevölkerung aufweisen. Gemäß der Definition der Europäischen Union werden Krankheiten als selten klassifiziert, wenn sie weniger als 5 von 10.000 Einwohnern betreffen (1). Obwohl jede einzelne Erkrankung für sich genommen selten ist, sind weltweit über 300 Millionen Menschen von seltenen Krankheiten betroffen (2). Gegenwärtig wurden bereits zwischen 7.000 und 8.000 seltene Krankheiten identifiziert (3), die verschiedene Organsysteme betreffen können und eine große klinische und phänotypische Heterogenität aufweisen. Trotz ihrer Vielfalt ist ihnen gemeinsam, dass sie häufig zu chronischen Verläufen und erheblichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen, die oft eine verkürzte Lebenserwartung zur Folge haben.

Viele der seltenen Erkrankungen manifestieren sich bereits im Kindesalter und können die Lebensqualität der Betroffenen und ihrer Familien stark beeinträchtigen (1, 4). Es wird geschätzt, dass genetische Ursachen bei mehr als 70 Prozent der seltenen Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielen oder zu ihrer Entstehung beitragen (1). Die genetischen Störungen können oft zu einer Vielzahl von Symptomen führen. Eine Heilung ist nur selten möglich, wodurch die Betroffenen auf langwierige und oft belastende Behandlungsprozesse angewiesen sind. Die Behandlung zielt meist darauf ab, Symptome zu lindern und die Lebensqualität zu verbessern (5).

1.1 Seltene neurometabolische Erkrankungen

Die Gruppe der neurometabolischen Erkrankungen unter den seltenen Erkrankungen umfasst zahlreiche Entitäten, deren zugrundeliegende Mechanismen sich durch eine hohe Komplexität auszeichnen. Die klassischen Konzepte der angeborenen Stoffwechselstörungen sind zur Einteilung der vielfältigen molekularen Pathomechanismen, die neurometabolischen Erkrankungen zugrunde liegen, hilfreich (Abbildung 1). Sie bilden eine Grundlage für das Verständnis dieser Krankheitsgruppe. Die involvierten Gene umfassen in der Regel Gene, die für Enzyme kodieren, welche biochemische Reaktionen katalysieren, sowie Gene, die Kofaktoren kodieren, welche die Enzyme unterstützen. Des Weiteren umfassen sie Gene, die für Transmembrantransporter kodieren. Ein Mangel oder das Fehlen der Funktion dieser Proteine resultiert in einer Akkumulation von Metaboliten vor der Blockade beziehungsweise einem Mangel an Metaboliten nach der Blockade. Ferner kann es zu einer Bildung neuer Metabolite kommen. Durch die Akkumulation von Metaboliten, bei denen bestimmte Zellkompartimente und Gewebe überlastet werden, können sich Speicherkrankheiten entwickeln. Ein Beispiel hierfür sind lysosomale Speicherkrankheiten (6). Die Ansammlung

kann jedoch auch toxische Auswirkungen haben, wie dies etwa bei einer Hyperammonämie als Folge eines Defekts im Harnstoffzyklus der Fall ist (7). Ein beobachteter Enzymmangel muss nicht zwangsläufig auf eine Anomalie des Enzyms selbst zurückzuführen sein. Auch ein Defekt des Substrat- oder Enzymtransports zum Ort des Abbaus kann die Ursache sein. Dies ist am Beispiel der X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie zu sehen, bei der der peroxisomale Transport von sehr langkettigen Fettsäuren gestört ist (8). Aber auch eine Veränderung im Stoffwechsel eines Vitamins, das für die Synthese eines für die korrekte Funktion des Enzyms wesentlichen Kofaktors erforderlich ist, kann eine metabolische Störung zur Folge haben. Durch einen Mangel an 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, einem Coenzym, das als Methylendonator für die Remethylierung des Homocysteins zu Methionin dient, entsteht beispielsweise eine Homocysteinämie (9).

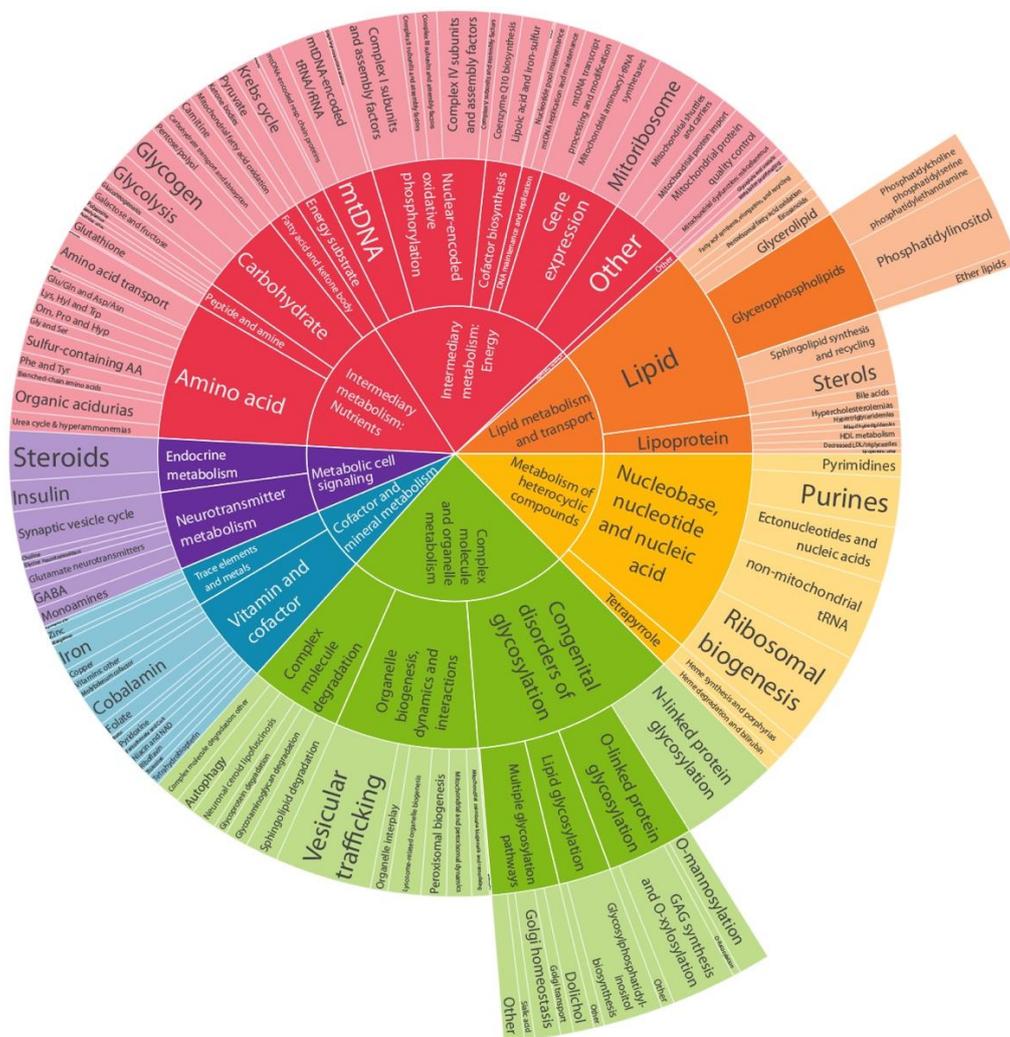


Abbildung 1: Hierarchische Darstellung der Internationalen Klassifikation genetisch bedingter Stoffwechselstörungen aus Ferreira et al. (10): Mittig finden sich die allgemeinen Konzepte, die dann über spezifischere Kategorien im mittleren Ring zu den einzelnen Gruppen genetischer Defekte übergehen. Die Größe der einzelnen Abschnitte des Diagramms entspricht direkt der Anzahl der Störungen in der jeweiligen Gruppe.

Da die betroffenen Stoffwechselwege in verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen erfüllen, können die klinischen Symptome in einem oder mehreren Organen auftreten, was die Komplexität der Erkrankungsgruppe erhöht.

Aufgrund ihrer Seltenheit und der Vielzahl an klinischen Erscheinungsformen stellt die Diagnose neurometabolischer Erkrankungen eine Herausforderung dar. Dennoch haben Fortschritte in der molekularen Diagnostik zu bedeutsamen Verbesserungen im Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Krankheiten geführt.

1.2 Entwicklungen in der molekularen Diagnostik

Um die Ursachen von Krankheiten besser zu verstehen, liegt im Rahmen der medizinischen Forschung ein Schwerpunkt auf der Identifizierung von Genen, die mit bestimmten Krankheiten assoziiert sind. Zu Beginn wurden seltene, syndromale Erkrankungen untersucht, bei denen spezifische Genmutationen für die jeweilige Krankheit verantwortlich sind. Anfängliche molekulargenetische Methoden waren Kopplungsanalysen und eine detaillierte Kartierung innerhalb großer Familien, um krankheitsverursachende Allele zu identifizieren. Im Rahmen von Kopplungsanalysen wird nach genetischen Markern gesucht, die gemeinsam mit einer bestimmten Krankheit vererbt werden. Durch die Analyse der Häufigkeit des Auftretens eines bestimmten genetischen Markers in betroffenen Familienmitgliedern im Vergleich zu nicht betroffenen lässt sich zunächst der Ort des krankheitsverursachenden Gens auf dem Chromosom eingrenzen. Mittels Sanger-Sequenzierung werden dann die Gene innerhalb des festgelegten Genorts untersucht (11). Dieser Ansatz ist mühsam und zeitaufwendig, war aber dennoch erfolgreich. So konnten bis zum Jahr 2000 etwa 1.000 der geschätzten 8.000 monogenen Erbkrankheiten charakterisiert werden (12).

Die Entschlüsselung der menschlichen Genomsequenz im Rahmen des Humangenomprojektes im Jahr 2003 (13) legte den Grundstein für umfassende genetische Untersuchungen. Seitdem hat die molekulare Diagnostik, die mit traditionellen DNA-Sequenzierungsmethoden wie der Sanger-Sequenzierung begann, eine bemerkenswerte Weiterentwicklung erfahren. Ein wesentlicher Fortschritt war die Einführung von Mikroarrays, welche eine parallele Analyse einer Vielzahl von Genen oder DNA-Sequenzen ermöglichte. Die Funktionsweise dieser Technologie basiert auf der Hybridisierung von DNA-Proben mit auf einem Chip immobilisierten DNA-Sonden. Dadurch werden die Erstellung von Genexpressionsprofilen, die Durchführung von Genotypisierungen sowie die Identifizierung genetischer Varianten bei verschiedenen Krankheiten ermöglicht (14). Die Anwendung dieser Methoden hat dazu geführt, dass bei bis zu 50 % der Patienten mit monogenetischen Erkrankungen eine Diagnose gestellt werden konnte (15).

Die Einführung des Next-Generation-Sequencing (NGS) ermöglichte die hochparallele Sequenzierung von Millionen bis Milliarden von DNA-Fragmenten gleichzeitig. Diese Technologie erlaubt eine schnelle und umfassende Analyse großer genomischer Regionen oder sogar des gesamten Genoms. Dies führte nicht nur zu einer signifikanten Beschleunigung und Verbesserung der Genauigkeit genetischer Analysen, sondern auch zu einer Erweiterung der Möglichkeiten, komplexe genetische Ursachen von Krankheiten zu erforschen und präzise Diagnosen zu stellen (16).

1.3 Einsatz von Next-Generation-Sequencing-Technologien bei seltenen Erkrankungen

Insbesondere bei den seltenen Erkrankungen hat die NGS-Technologie zu einer grundlegenden Veränderung der molekularen Diagnostik geführt. Der Einsatz von NGS ermöglichte je nach Erkrankungsgruppe bei etwa 25–50 % der Patienten mit unklarer Diagnose die Stellung einer Diagnose inklusive der Entdeckung neuer erkrankungsassoziierter Gene (17). Die Entdeckungen führten zu einem vertieften Verständnis der pathogenetischen Mechanismen, welche diesen komplexen Erkrankungen zugrunde liegen. Dies bildet die Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Behandlungsstrategien.

Zweifelsohne hat der Einsatz von NGS die Detektion von krankheitsverursachenden Varianten erheblich verbessert und beschleunigt. Dennoch kann die Interpretation der Ergebnisse eine Herausforderung darstellen, insbesondere, wenn es sich um zuvor nicht in Zusammenhang mit der Erkrankung beschriebene Gene handelt und die Erkrankung selten vorkommt.

2 Zielsetzung und Bedeutung der Arbeiten für das Fachgebiet

Das vorliegende Habilitationsprojekt hatte zum Ziel, die molekularen Grundlagen neurometabolischer Störungen besser zu verstehen und genetische Ursachen durch den Einsatz von NGS-Technologien bei Patienten mit bisher ungeklärten Krankheitsursachen zu identifizieren. Neben einer Beschleunigung des diagnostischen Prozesses soll die Charakterisierung der zugrunde liegenden Pathomechanismen langfristig zu einer Entwicklung spezifischer Therapieansätze beitragen.

Im Rahmen des Projekts wurden Exomsequenzierungen durchgeführt, um seltene genetische Varianten zu identifizieren und ihre potenzielle Pathogenität zu bewerten (Abbildung 2). Der Bewertung von im Rahmen der Exomsequenzierung gefundenen potenziell krankheitsverursachenden Varianten kam hierbei eine besondere Bedeutung zu. Dabei wurde ein mehrstufiger Ansatz verfolgt, der sowohl die Filterung genetischer Varianten nach Häufigkeit als auch die funktionelle Analyse in Patientenzellen umfasste.

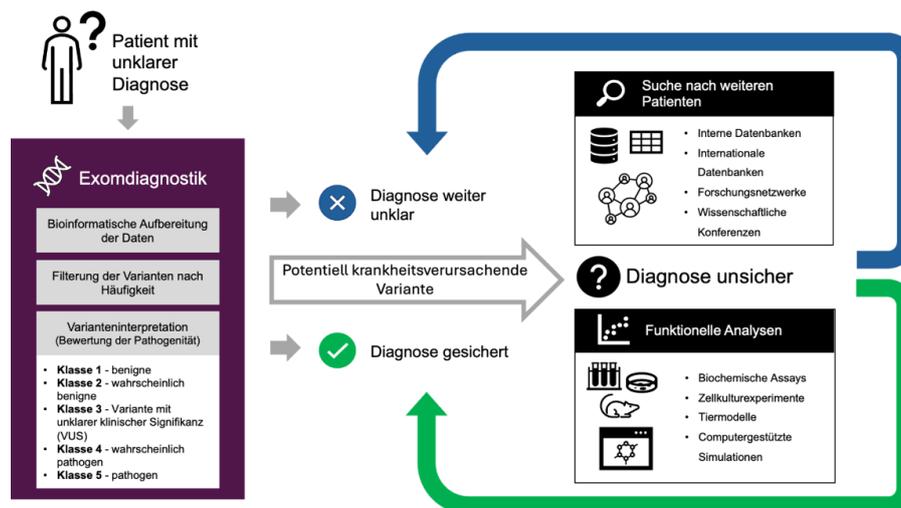


Abbildung 2: Vorgehen bei Patienten mit unklarer Diagnose: Bei einem Patienten, bei dem die Diagnose noch nicht abschließend geklärt werden konnte, wird zur weiteren Abklärung eine Exomdiagnostik veranlasst. Hierbei erfolgt nach bioinformatischer Aufbereitung der Daten und Filterung nach Häufigkeit der detektierten genetischen Varianten in der Allgemeinbevölkerung eine Interpretation der verbliebenen Varianten im Hinblick auf ihre Pathogenität. Im Falle einer eindeutigen diagnostischen Zuordnung der Varianten wird die Diagnose als gesichert betrachtet. Alternativ kann die Bewertung auch keinen richtungsweisenden Befund ergeben, sodass die Diagnose weiterhin als unklar zu betrachten ist. Als dritte Möglichkeit besteht die Einstufung von Varianten als potentiell krankheitsverursachend, was zu einer diagnostischen Unsicherheit führt. Im Falle einer unsicheren Diagnose erfolgt eine Suche nach weiteren Patienten, die einen ähnlichen Phänotyp zeigen und Mutationen im gleichen Gen aufweisen, insbesondere bei Varianten in einem bisher nicht mit dem Phänotyp assoziierten Gen. Ferner können bei potentiell krankheitsverursachenden Varianten funktionelle Analysen dazu dienen, die Diagnose zu sichern oder zu verwerfen. Die finale Diagnoseentscheidung basiert auf den Resultaten der funktionellen Analysen sowie der Suche nach weiteren Patienten. Der Fall wird entweder als diagnostisch gesichert oder als weiterhin unklar betrachtet.

Die Identifizierung neuer genetischer Ursachen für die Erkrankungsgruppe der neurometabolischen Erkrankungen sowie die Erweiterung des klinischen Spektrums bekannter Defekte stellen wesentliche Ergebnisse des Projektes dar.

Erstmalig konnten Mutationen in *ADPRHL2* als ursächlich für eine im Kindesalter beginnende neurodegenerative Erkrankung sowie Mutationen in *NAXE* als kausal für eine früh beginnende Enzephalopathie beschrieben werden. Die Bedeutung einer gestörten Homöostase der reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen von neurometabolischen Erkrankungen zeigte sich an einer Funktionsstörung von Thioredoxin 2. Durch den Nachweis von Mutationen in *DHTKD1* bei der 2-Aminoadipin-2-Oxo-Adipin-Azidurie konnte die Funktion von DHTKD1 im Lysinstoffwechsel geklärt werden. Ferner konnte die Bedeutung des Orphan-Gens *C20orf72* bei der mtDNA-Replikation gezeigt werden.

Der zweite Projektteil verfolgte das Ziel, das klinische Verständnis bekannter neurometabolischer Erkrankungen zu vertiefen. Aufgrund der geringen Anzahl an Fallberichten zu diesen seltenen Erkrankungen ermöglichte die Beschreibung weiterer Individuen mit der jeweiligen Erkrankung eine Erweiterung des phänotypischen Spektrums. Darüber hinaus führten die Beschreibung neuer krankheitsassoziierter Varianten im zugrunde liegenden Gen sowie funktionelle Analysen zu einer Verbesserung des Verständnisses dieser komplexen Erkrankungen. Die dargestellten Forschungsarbeiten befassen sich mit genetischen Defekten mitochondrialer Erkrankungen, der EARS2- und der MTFMT-Defizienz, welche zu einer kombinierten Störung der oxidativen Phosphorylierung führen. Des Weiteren werden das klinische Bild sowie die funktionellen Konsequenzen der Coenzym-Q10-Defizienz bei Mutationen in *COQ9* und *COQ4* beschrieben. Diese Arbeiten tragen zu einer Optimierung der Patientenversorgung bei, indem potenziell involvierte Organsysteme hinsichtlich ihrer Funktionalität regelmäßig evaluiert werden können, um bei Bedarf zeitnah intervenieren zu können.

3 Teilprojekte

Wie erwähnt, resultieren neurometabolische Störungen im Allgemeinen aus Mutationen in Genen, die für Enzyme, Transportproteine oder Kofaktoren kodieren, welche an zentralen Stoffwechselwegen in der Zelle beteiligt sind. Eine direkte oder indirekte Anreicherung toxischer Metabolite oder ein Mangel essenzieller Verbindungen beeinträchtigt die normale neuronale Funktion. Klinisch können sie zu einer Vielzahl von verschiedenen Manifestationen führen. Durch den Einsatz von NGS-Technologien in Kombination mit funktionellen Analysen konnten neue genetische Ursachen für diese Gruppe von Krankheiten identifiziert und das klinische Spektrum bekannter Defekte ausgeweitet werden.

3.1 Charakterisierung neuer genetischer Ursachen von neurometabolischen Erkrankungen

Im Folgenden werden die Arbeiten vorgestellt, in denen neue krankheitsassoziierte Gene beschrieben wurden, die in Zusammenhang mit neurometabolischen Erkrankungen im Kindesalter stehen. Die Studien bieten Einblicke in die genetischen Grundlagen von komplexen neurometabolischen Störungen. Die Identifikation und Charakterisierung neuer Gene, welche mit den Erkrankungen in Verbindung stehen, hat ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ermöglicht.

3.1.1 Störung der ADP-Ribosylierung

Innerhalb der Zelle existieren diverse Mechanismen, welche der funktionellen Regulierung von Proteinen dienen. Einer hiervon ist die ADP-Ribosylierung. Im Rahmen dieser reversiblen posttranslationalen Modifikation erfolgt ein Transfer von ADP-Ribose von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) auf das Zielprotein durch ADP-Ribosyltransferasen. Die Ribosylierung spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung zellulärer Schlüsselprozesse wie der Transkription, der DNA-Reparatur, der Translation und der Apoptose. Eine persistente ADP-Ribosylierung resultiert in einer Akkumulation von Poly-ADP-Ribose (PAR) innerhalb der Zelle, was letztlich zum Zelltod führt (Abbildung 3). Folglich muss die ADP-Ribosylierung reversibel sein. ADP-Ribosylhydrolasen sind in der Lage, diese Reaktion umzukehren (18).

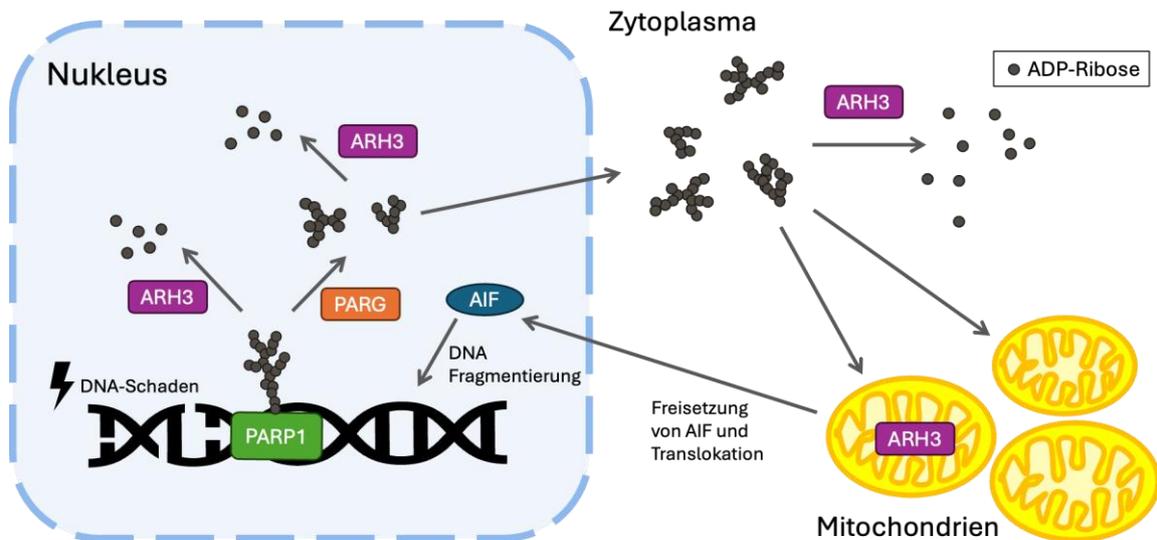


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zelltods durch Poly-ADP-Ribosylierung basierend auf Mashimo et al. (19): Schäden in der DNA führen zu einer Aktivierung von PARP1 und darüber zu einer Poly-ADP-Ribosylierung von PARP1 selbst und anderen Akzeptorproteinen im Zellkern. PARG dient neben ARH3 als Ribosylhydrolase und hydrolysiert PAR, um freie kleine PAR-Moleküle zu erzeugen, wodurch diese in das Zytoplasma und die Mitochondrien verlagert werden können. In der Mitochondrienmembran verankert ist AIF, an welches sich das PAR bindet und es in das Zytoplasma freisetzt. Von dort wird AIF über ein Kernlokalisierungssignal in den Zellkern verlagert, wo es Nukleasen rekrutiert mit der Folge einer Fragmentierung der DNA.

Ein Anstieg der intrazellulären Poly-ADP-Ribose wurde bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen als ein Mechanismus der Pathogenese beschrieben, so beispielsweise bei der seltenen autosomal-rezessiv vererbten spinocerebellären Ataxie 26 (20), aber auch bei weiteren, häufigeren neurologischen Störungen wie der Alzheimer-Krankheit (21), der Parkinson-Krankheit und der amyotrophen Lateralsklerose (22).

ADPRHL2 - CONDSIAS - Neurodegeneration, childhood-onset, stress-induced, with variable ataxia and seizures

Danhauser K, Alhaddad B, Makowski C, Piekutowska-Abramczuk D, Syrbe S, Gomez-Ospina N, Manning MA, Kostera-Pruszczyk A, Krahn-Peper C, Berutti R, Kovács-Nagy R, Gusic M, Graf E, Laugwitz L, Röblitz M, Wroblewski A, Hartmann H, Das AM, Bültmann E, Fang F, Xu M, Schatz UA, Karall D, Zellner H, Haberlandt E, Feichtinger RG, Mayr JA, Meitinger T, Prokisch H, Strom TM, Płoski R, Hoffmann GF, Pronicki M, Bonnen PE, Morlot S, Haack TB. *Bi-allelic ADPRHL2 Mutations Cause Neurodegeneration with Developmental Delay, Ataxia and Axonal Neuropathy*. Am J Hum Genet. 2018 Nov 1;103(5):817-825.

In dieser Arbeit wurde die kausale Bedeutung von Mutationen im *ADPRHL2*-Gen für eine neurodegenerative Erkrankung gezeigt. *ADPRHL2* kodiert für eine ADP-Ribosylhydrolase und wirkt auf diese Weise einer Akkumulation von Poly-ADP-Ribose in der Zelle entgegen. Mittels

Exomsequenzierung wurden bei sieben Patienten aus fünf Familien mit unklarer neurodegenerativer Erkrankung homozygote Missense-, Frameshift- und Stopp-Mutationen in dem Gen nachgewiesen. In Zusammenarbeit mit anderen genetischen Zentren wurden weitere Patienten mit bislang ungeklärter Ursache der neurodegenerativen Erkrankung gefunden, die ebenfalls Mutationen in diesem Gen aufwiesen. Insgesamt konnten 12 Personen aus acht Familien diagnostiziert werden.

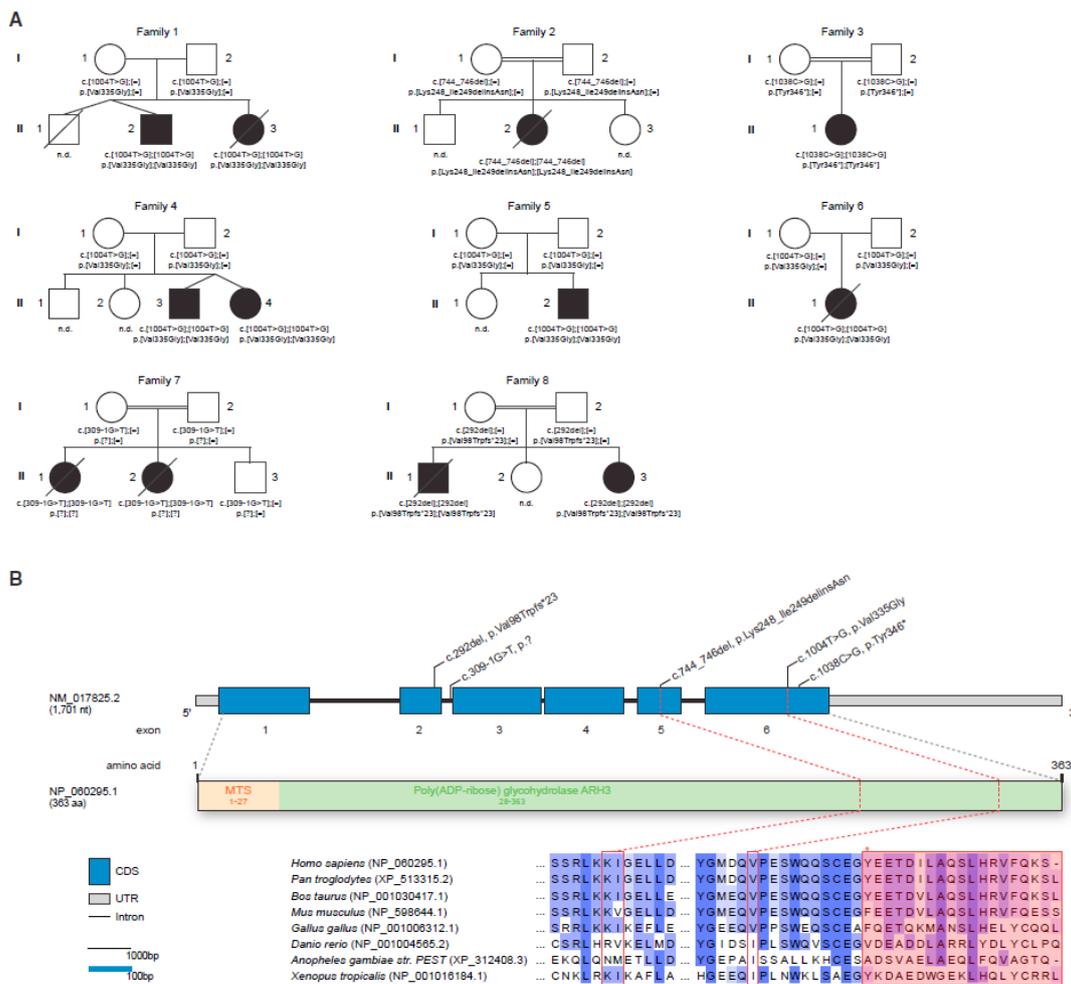


Abbildung 4: Detektierte pathogene Mutationen in ADPRHL2 aus Danhauser et al. (23): Es sind die Stammbäume (A) und die Lokalisation der Mutationen im Gen (B) dargestellt. Es konnten fünf verschiedene pathogene Mutationen gefunden werden. Diese lagen bei den Individuen jeweils homozygot vor.

Die autosomal-rezessiv vererbte neurodegenerative Störung manifestierte sich bereits im Kindesalter mit Verzögerungen in der Sprach- und psychomotorischen Entwicklung. Etwa die Hälfte der betroffenen Individuen zeigte infektionsassoziierte Episoden von Ataxie oder

dystoner Haltung. Im Laufe der Erkrankung waren Gangabnormalitäten im Sinne einer Ataxie oder einer Diplegie bei allen Individuen vorhanden. Weitere Symptome waren epileptische Anfälle, periphere axonale isolierte motorische oder sensomotorische Neuropathie, faziale Myoklonien, sowie visuelle Beeinträchtigungen, wie unter anderem Diplopie, Nystagmus, Strabismus und Ptosis. Die Krankheitsprogression war mit Episoden von erhöhtem Stress, wie Infektionen assoziiert. Unbehandelt war die Erkrankung bei den beschriebenen Patienten progredient. Insgesamt starben drei Personen in der Kindheit, während bei fünf anderen die Krankheit bis ins Teenageralter fortschritt.

Im Rahmen der Untersuchung der zellulären Konsequenzen von Mutationen in *ADPRHL2* wurden Fibroblastenzellen der Patienten mit Kontrollfibroblastenzellen verglichen. Die Analysen zeigten, dass die Menge an dem Protein in den Zelllinien der Patienten im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich reduziert war. PARP1 ist die wichtigste Polymerase, die zum intrazellulären PAR-Pool beiträgt (24). Wasserstoffperoxid (H_2O_2) stimuliert PARP1 über oxidative Schäden an der DNA, was zu einem Anstieg des intrazellulären PAR führt (25). Im Hinblick auf die Bedeutung von *ADPRHL2* für die Umkehrung der Poly(ADP)-Ribosylierung durch Hydrolyse von PAR zu Mono(ADP)-Ribose wurde untersucht, inwieweit ein Mangel an *ADPRHL2* den H_2O_2 -vermittelten Anstieg von PAR fördert. Dies konnte sowohl durch immunhistochemische Färbungen als auch im Immunoblot nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass die Akkumulation von PAR mit einem erhöhten Zelltod assoziiert ist, wurde mittels Zellviabilitätstests unter Stressbedingungen in einem Wachstumsmedium mit niedrigem Glukosegehalt und H_2O_2 in Patientenzellen, mit dem Wildtypgen transduzierten Patientenzellen und mit Kontrollfibroblasten überprüft. Insgesamt zeigte sich unter Stressbedingungen eine signifikant geringere Zellviabilität in *ADPRHL2*-mutierten Zelllinien im Vergleich zu Kontroll- oder mit dem Wildtypgen transduzierten Zellen. Um die Annahme, dass die Akkumulation von PAR tatsächlich der Mechanismus ist, der für die erhöhte H_2O_2 -Sensitivität in *ADPRHL2*-defizienten Zelllinien verantwortlich ist, weiter zu untermauern, erfolgte zudem die Behandlung mit einem PARP1-Inhibitor. Die Kultivierung von *ADPRHL2*-mutierten Fibroblasten unter Stressbedingungen resultierte bei gleichzeitiger Behandlung mit einem PARP1-Inhibitor in einer signifikanten Erhöhung der Lebensfähigkeit.

Die Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Relevanz der untersuchten *ADPRHL2*-Varianten hin und bestätigen, dass eine gestörte Protein-Ribosylierung ein weiterer Signalweg ist, der zu neurodegenerativen Erkrankungen führen kann.

3.1.2 Störung des NAD(P)HX-Reparatursystems

In Zellen dienen verschiedene spezifische Reparaturmechanismen dem Schutz vor der Akkumulation potenziell schädlicher Stoffwechselzwischenprodukte. In diesem Kontext sind das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form, NADH; oxidierte Form, NAD⁺) sowie das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form, NADPH; oxidierte Form, NADP⁺) als Redoxäquivalente von entscheidender Bedeutung für den Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies. Aufgrund der Anfälligkeit einer der Doppelbindungen des Nicotinamidrings in NADH und NADPH für Hydratationen kommt es in den Zellen zur Bildung von NAD(P)HX. Hierbei ist eine spontane Reaktion von NAD(P)HX zu zyklischem NAD(P)HX möglich (26). Weder NADHX noch NADPHX besitzen die Fähigkeit, als Elektronendonatoren oder Elektronenakzeptoren zu fungieren. Zudem wurde eine hemmende Wirkung auf mehrere Dehydrogenasen gezeigt (27), weswegen diese Metaboliten sowohl entbehrlich als auch toxisch sind. Ein Reparatursystem für die zyklische Form von NAD(P)HX ist bislang nicht bekannt. Die Rekonversion der nicht-zyklischen Form von NAD(P)HX zu NAD(P)H erfolgt durch eine ATP-abhängige Dehydratase. Diese Dehydratase reagiert ausschließlich mit dem S-Epimer von NAD(P)HX (28). Um das R-Epimer zu eliminieren, ist eine spezifische Epimerase erforderlich, die beim Menschen von *NAXE* kodiert wird, um die Umwandlung in S-NAD(P)HX zu katalysieren (Abbildung 5).

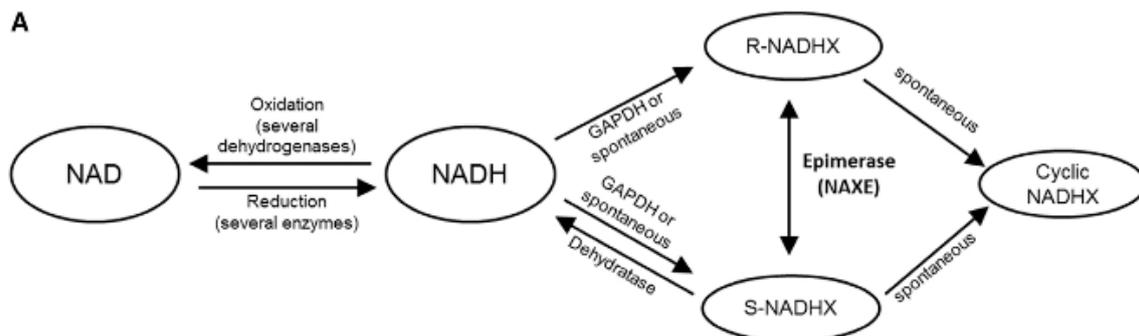


Abbildung 5: Schematische Darstellung des NAD/NADH Metabolismus und des NADHX Reparatursystems aus Kremer et al. (29): NADH kann in der Zelle spontan oder über die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu NADHX reagieren. Die S-Form des NADHX wird über eine Dehydratase zu NADH rekonvertiert. Zur Rückumwandlung der R-Form in NADH muss dieses zunächst über eine Epimerase in die S-Form überführt werden. Sowohl aus der R- als auch der S-Form kann eine zyklische Form des NADHX entstehen, für welches bisher keine Rückumwandlung bekannt ist.

NAXE – PEBEL – Encephalopathy, progressive, early-onset, with brain edema and/or leukencephalopathy

Kremer LS*, Danhauser K*, Herebian D*, Petkovic Ramadža D, Piekutowska-Abramczuk D, Seibt A, Müller-Felber W, Haack TB, Płoski R, Lohmeier K, Schneider D, Klee D, Rokicki D, Mayatepek E, Strom TM, Meitinger T, Klopstock T, Pronicka E, Mayr JA, Baric I, Distelmaier F, Prokisch H. *NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD(P)HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood.* Am J Hum Genet. 2016 Oct 6;99(4):894-902.

Die klinische Bedeutung des NAD(P)HX-Reparatursystems konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Es wurde in einer Kohorte von Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen und noch ungeklärter Krankheitsursache eine Exomsequenzierung durchgeführt. Hierbei wurden bei drei Individuen seltene biallelische Mutationen in *NAXE* gefunden. Unter den gefundenen Varianten bei den Probanden war *NAXE* das einzige Gen, welches für ein Protein mit mitochondrialer Lokalisation kodiert. Während bei einem Patienten eine homozygote Mutation vorlag, zeigten die anderen compound heterozygote Mutationen als Ausdruck der autosomal rezessiven Vererbung. Ein vierter Patient wurde unabhängig im Rahmen einer Exomdiagnostik identifiziert. Es fanden sich insgesamt sechs pathogene Mutationen in *NAXE* bei sechs Kindern aus vier Familien (Abbildung 6).

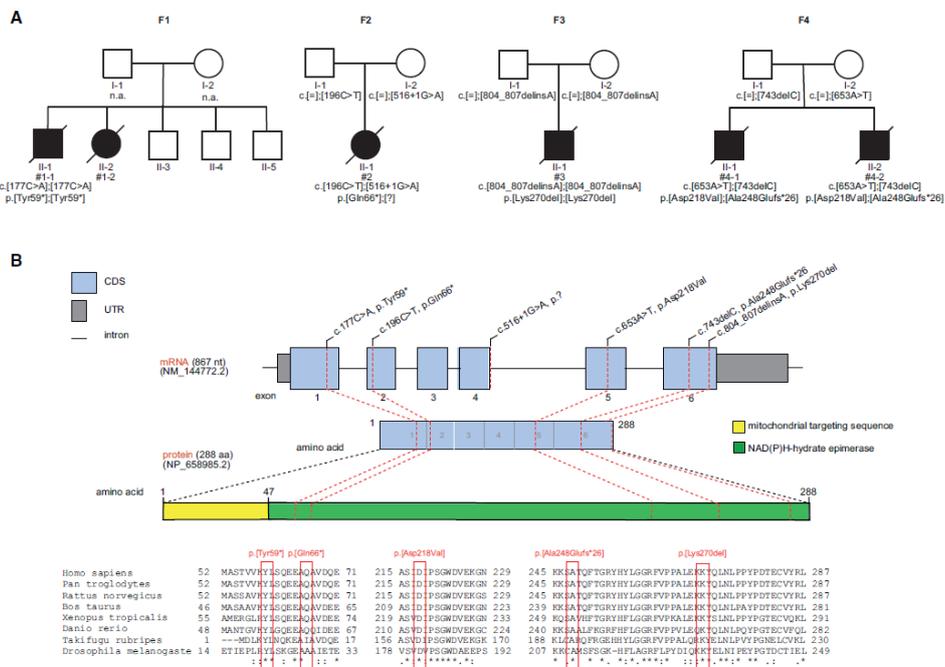


Abbildung 6: Detektierte pathogene Mutationen in *NAXE* aus Kremer et al. (29): Es sind die Stammbäume (A) und die Lokalisationen im Gen (B) dargestellt. Bei den betroffenen Individuen fanden sich biallelische Mutationen in *NAXE*. Bei zwei Patienten lagen homozygote Mutationen in Form einer Stopp-Mutation und einer Deletion vor.

Die anderen zeigten compound heterozygote Mutationen, wobei sich sowohl eine Stopp-, eine Frameshift- als auch eine Missense-Mutation zeigten.

Klinisch präsentierten sich die Betroffenen mit Ataxie, Kleinhirnödemen, spinaler Myelopathie und Hautveränderungen. Das Laktat war im Liquor aller betroffenen Personen erhöht. Die Krankheit begann im zweiten Lebensjahr und die klinischen Anzeichen sowie eine Verschlechterung wurden durch fieberhafte Infektionen ausgelöst. Der Krankheitsverlauf war rasch progredient und führte bei allen Betroffenen zu Koma, globaler Hirnatrophie und schließlich zum Tod.

Die Auswirkungen der Mutationen wurden an Fibroblasten von drei betroffenen Individuen untersucht. Hierbei zeigte sich der Proteingehalt an NAXE in den Zellen erheblich reduziert. Nachdem Mutationen in *NAXE*, die zu einer gestörten Funktion der Epimerase führen, voraussichtlich die NAD(P)HX-Reparatur beeinträchtigen, wurde mittels Massenspektrometrie untersucht, ob es zu einer Anhäufung der abnormen Metaboliten in den Zellen der Patienten kommt. Es wurden die Konzentrationen von R-NADHX, S-NADHX, zyklischem NADHX, NAD und NADH in den Fibroblasten-Zelllinien von zwei betroffenen Personen und in zwei unabhängigen Kontrollzelllinien bestimmt. In den Fibroblasten von Betroffenen zeigten sich stark erhöhte Konzentrationen des zyklischen NADHX, sowie des Levels an R-NADHX und S-NADHX als Konsequenz der verminderten NAXE-Proteinaktivität. Nachdem sich bei allen Patienten eine Verschlechterung im Rahmen von fieberhaften Infektionen zeigte und die Entstehung von NADHX unter erhöhten Temperaturen begünstigt ist (26), wurden die Zellen einem Hitzestress von 40°C ausgesetzt. Auch hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied im Anstieg der Konzentration des zyklischen NADHX in den Fibroblastenzellen der Patienten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten. Das toxische zyklische NADHX hemmt nachweislich verschiedene zelluläre NADH-Dehydrogenasen (26, 30), was einen der möglichen Pathomechanismen bei dieser Erkrankung darstellt.

Zusammenfassend lässt die Identifizierung von biallelischen *NAXE*-Varianten bei fünf Individuen aus vier Familien mit einem auffallend ähnlichen Phänotyp in Kombination mit den funktionellen Analysen den Schluss zu, dass die *NAXE*-Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit für diese im Säuglingsalter auftretende Krankheit verantwortlich sind. Die Erkrankung manifestiert sich durch Ataxie, Kleinhirnödeme, spinale Myelopathie sowie Hautläsionen. Diese werden durch fieberhafte Infektionen ausgelöst und führen innerhalb der ersten drei Lebensjahre zum Koma und schließlich zum Tod.

3.1.3 Störung der Homöostase reaktiver Sauerstoffspezies

Die Klasse der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) umfasst eine Reihe instabiler Moleküle, darunter Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (OH^\cdot), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Superoxid (O_2^\cdot). ROS werden in allen Zellen des menschlichen Körpers produziert (31). Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern sowie der zellulären Signaltransduktion. Des Weiteren ist eine schädliche Wirkung dieser reaktiven Partikel auf die Zellen bekannt, da sie intrazelluläre Proteine, Lipide und Nukleinsäuren schädigen können. Ein unzureichendes Detektions- und Eliminationsvermögen führt in der Regel zu einer Akkumulation dieser reaktiven Spezies, was wiederum mit einer Vielzahl von pathologischen Prozessen assoziiert wird. Dabei kann eine Dysbalance des Systems zu oxidativem Stress führen, der wiederum mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht wird, darunter auch mit neurodegenerativen Störungen (32). Aus diesem Grund unterliegt das Redoxsystem einer strengen Regulierung, um potenzielle Schäden durch eine übermäßige ROS-Produktion zu verhindern.

Der Großteil der intrazellulären ROS stammt aus der Reduktion von Sauerstoff und resultiert aus dem mitochondrialen Superoxid. Die Superoxiddismutase ist für die effiziente Dismutierung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid verantwortlich, wodurch die Mitochondrien zu einem wichtigen Ort der H_2O_2 -Bildung werden. Die Regulierung des mitochondrialen H_2O_2 -Spiegels spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermeidung unspezifischer oxidativer Schäden dieser Organellen (33). In der mitochondrialen Matrix hat sich im Verlauf der Evolution eine effiziente enzymatische Maschinerie entwickelt, die den H_2O_2 -Spiegel puffert (34).

TXN2 - COXPD29 - Combined oxidative phosphorylation deficiency 29

Holzerova E, **Danhauser K**, Haack TB, Kremer LS, Melcher M, Ingold I, Kobayashi S, Terrile C, Wolf P, Schaper J, Mayatepek E, Baertling F, Friedmann Angeli JP, Conrad M, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Distelmaier F. *Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration*. Brain. 2016 Feb;139(Pt 2):346-54.

Neben dem Gluthationweg stellt das Thioredoxinsystem eine zentrale Komponente des Systems zur mitochondrialen Pufferung von ROS dar (Abbildung 7). Dem Thioredoxin 2 (TXN2) kommt hierbei wichtige Bedeutung bei der Eliminierung des H_2O_2 zu. Ferner ist es an der Regulierung der Apoptose beteiligt (35). Die Arbeit beschreibt eine homozygote Stopp-Mutation (c.71G>A, p.Trp24*) in TXN2, die bei einem Jugendlichen mit neurodegenerativer

Erkrankung mit schwerer zerebellärer Atrophie, Epilepsie, Dystonie, optischer Atrophie und peripherer Neuropathie im Rahmen der Exomdiagnostik detektiert wurde.

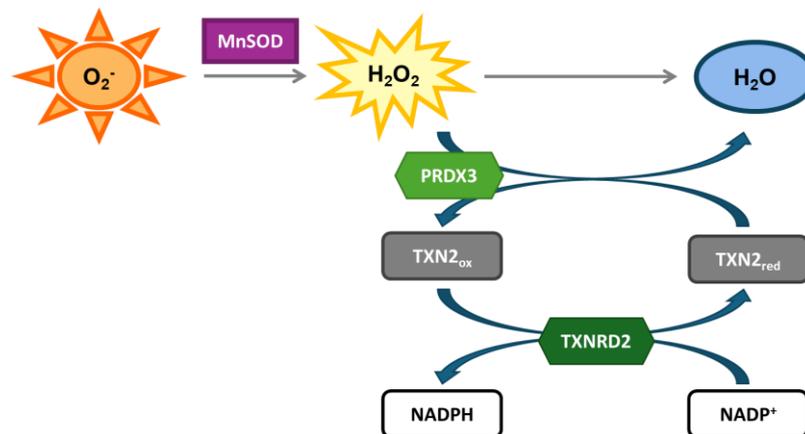


Abbildung 7: Thioredoxinsystem zur Pufferung von ROS innerhalb der mitochondrialen Matrix nach Holzerova et al. (34): Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt durch verschiedene Proteine sowie Komplexe des oxidativen Phosphorylierungssystems in Form von Superoxid (O_2^-), welches spontan oder mittels der Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird. In den Mitochondrien wird H_2O_2 von PRDX3 wahrgenommen und die Oxidation von PRDX3 wird durch TXN2 reduziert. Die Reduktion von TXN2 erfolgt durch TXNRD2 und NADPH.

Da es zum Zeitpunkt der Arbeit keine Beschreibung eines Patienten mit Mutationen in *TXN2* und neurodegenerativer Erkrankung gab, wurden funktionelle Analysen an Fibroblastenzellen des Patienten im Vergleich zu Kontrollzellen und mit dem Wildtypgen transduzierten Patientenzellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass das *TXN2*-Protein in den Fibroblastenzellen des Patienten nicht nachweisbar war. Ferner ergaben sich eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies, eine Beeinträchtigung der Abwehr gegen oxidativen Stress und eine Störung der oxidativen Phosphorylierung in den mutierten Fibroblastenzellen. Die Wiederherstellung der *TXN2*-Expression durch Transduktion des Wildtypgens führte zu einer Normalisierung aller Parameter, was die kausale Rolle der *TXN2*-Mutation bei der Krankheitsentwicklung nahelegt. Durch die Supplementierung mit Antioxidantien, wie Idebenon, konnte eine effektive Unterdrückung der zellulären Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie eine Verbesserung der Lebensfähigkeit der Zellen beobachtet werden. Um den möglichen therapeutischen Nutzen dieser Beobachtung zu evaluieren, erhielt der Patient eine Therapie mit Idebenon. Während einer kurzen Nachbeobachtungszeit über einige Monate ließ sich bereits eine Milderung der klinischen Symptome feststellen.

Die Arbeit über einen Patienten mit *TXN2*-Mangel deutet darauf hin, dass die Homöostase reaktiver Sauerstoffspezies eine wesentliche Rolle für die Aufrechterhaltung des menschlichen Neuronen- und Energiestoffwechsels spielt.

3.1.4 Störung im Lysinstoffwechsel

Lysin zählt zu den essenziellen Aminosäuren und ist ein wichtiger Bestandteil verschiedener physiologischer Prozesse, darunter der Proteinsynthese, der epigenetischen Regulierung sowie der Produktion wichtiger Metabolite (36). Das Lysin wird in einem komplexen Prozess in den Zellen abgebaut, der in mehreren, aufeinanderfolgenden Schritten, in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle, wie den Mitochondrien, dem Zytosol und den Peroxisomen stattfindet (Abbildung 8). Im Rahmen des Abbaus wird das Lysin in bioaktive Verbindungen umgewandelt. Dies erfolgt hauptsächlich in der Leber und wird über den Saccharopin- und den Pipecolinsäure-Stoffwechselweg katalysiert. Beim Menschen wird das Lysin hauptsächlich über den Saccharopinweg abgebaut, wobei Lysin in Acetyl-CoA umgewandelt wird. Dieses dient anschließend im Tricarbonsäurezyklus der Energiegewinnung. Über den Pipecolinsäure-Stoffwechselweg erfolgt die Bildung essenzieller Metabolite wie Pipecolinsäure, welche eine regulatorische Funktion bei der Freisetzung von Neurotransmittern sowie der Steuerung neurologischer Funktionen innehat. Des Weiteren entstehen beim Abbau von Lysin Zwischenprodukte, die als Vorläufer für die Synthese von Carnitin dienen. Dieses Molekül spielt eine zentrale Rolle beim Transport von langkettigen Fettsäuren in die Mitochondrien, wo sie schließlich zur Beta-Oxidation gelangen (37).

Anomalien des Lysinabbaus können zu verschiedenen Stoffwechselstörungen wie beispielsweise der Hyperlysinämie und der Glutarazidurie Typ I führen. Kennzeichnend für diese Erkrankungen sind erhöhte Werte von Lysin und andere Metaboliten im Blut und Urin. Die entsprechenden Metabolite geben dabei Hinweise auf den zugrunde liegenden Enzymdefekt. So ist bei der Hyperlysinämie der Abbau des Lysins durch Mutationen in *AASS*, das für die Alpha-Aminoacetyl-CoA-Semialdehyd-Synthase kodiert, gestört (38). Der Glutarazidurie Typ I liegen Mutationen in *GCDH*, welches für die Glutaryl-Coenzym A-Dehydrogenase kodiert, zugrunde (39). Beide Störungen können zu neurologischen Komplikationen führen.

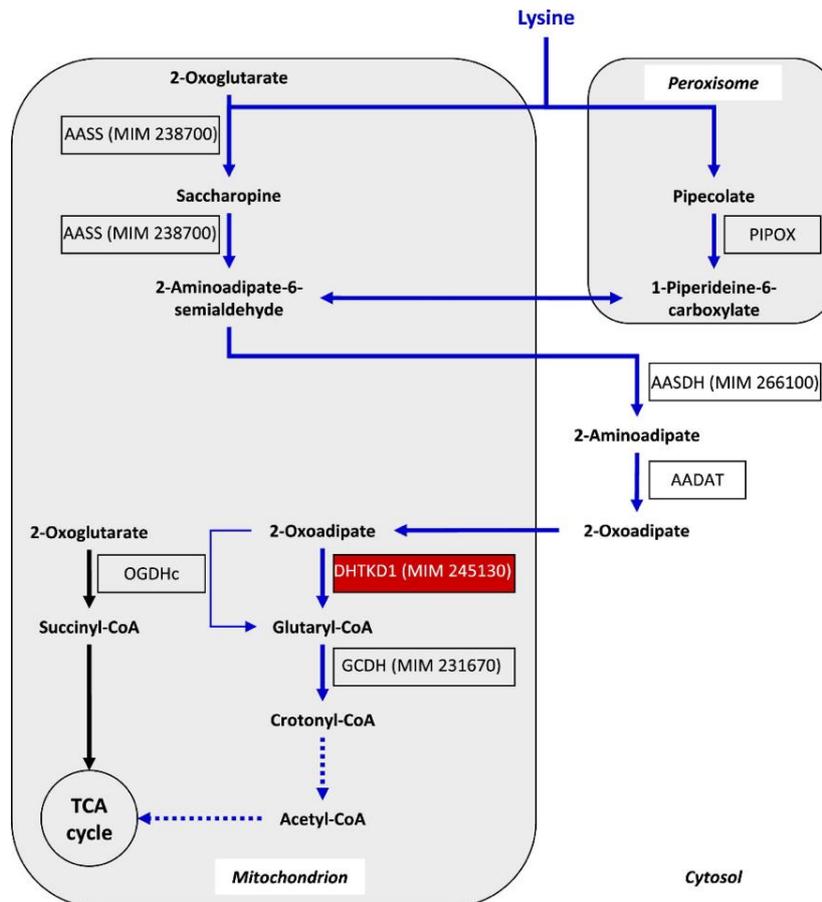


Abbildung 8: Schematische Darstellung des multikompartimentellen Abbaupfades von L-Lysin aus Danhauser et al. (40): Der Abbau von L-Lysin erfolgt entweder durch peroxisomale α -Desaminierung (Pipicolat-Weg) oder durch mitochondriale ϵ -Desaminierung (Saccharopin-Weg). Beide Wege konvergieren in 2-Amino adipat-Semialdehyd, das anschließend zu 2-Amino adipat und 2-Oxoadipat metabolisiert wird.

DHTKD1 - AAKAD - Alpha-amino adipic and alpha-keto adipic aciduria

Danhauser K*, Sauer SW*, Haack TB*, Wieland T, Staufner C, Graf E, Zschocke J, Strom TM, Traub T, Okun JG, Meitinger T, Hoffmann GF, Prokisch H, Kölker S. *DHTKD1 Mutations Cause 2-Amino adipic and 2-Oxoadipic Aciduria*. Am J Hum Genet. 2012 Dec 7;91(6):1082-7.

Die molekularen Ursachen der meisten vererbten Formen einer Störung des Lysinabbaus waren zum Zeitpunkt der Arbeit bereits aufgeklärt. Hinsichtlich der Pathogenese der 2-Amino adipin- und 2-Oxoadipinazidurie bestand noch Unklarheit. Das klinische Bild dieser Stoffwechselstörung ist sehr heterogen. Ein Teil der Betroffenen zeigt keine Symptome, während andere eine leichte bis schwere geistige Behinderung, muskuläre Hypotonie, Entwicklungsverzögerung, Ataxie und Epilepsie aufweisen (41, 42). Im Rahmen der Exomsequenzierung ergaben sich bei einer betroffenen Person compound heterozygote Mutationen in *DHTKD1*, eine initiierende Methionin-Mutation sowie eine Missense-Mutation. *DHTKD1* kodiert für das Dehydrogenase E1 und Transketolase-Domäne-enthaltende

Protein 1, als Teil eines 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex-ähnlichen Proteins. Die Sequenzanalyse eines zweiten Individuums führte zur Detektion einer weiteren Missense-Mutation in dem Gen in Kombination mit einer Nonsense-Mutation (Abbildung 9).

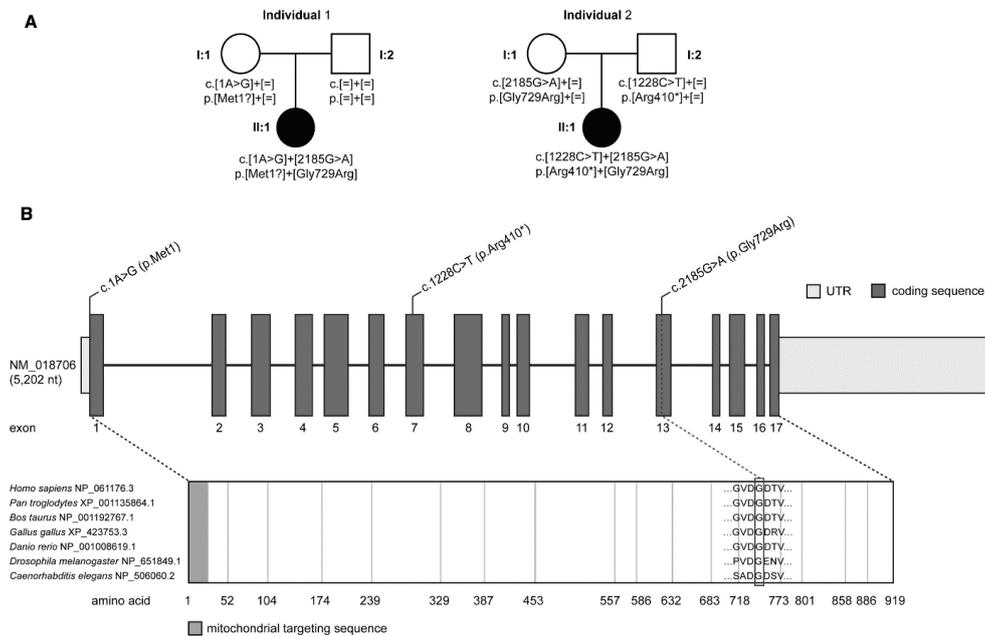


Abbildung 9: Detektierte pathogene Mutationen in *DHTKD1* bei Patienten mit 2-Amino adipin- und 2-Oxoadipinazidurie aus Danhauser et al. (40): Bei den betroffenen Individuen lagen compound heterozygote Mutationen vor (A). Diese waren in unterschiedlichen Exonen des Gens lokalisiert (B).

Um die krankheitsverursachende Relevanz der detektierten Mutationen zu bestätigen, wurden funktionelle Analysen mit Fibroblastenzellen der betroffenen Individuen durchgeführt. In den untersuchten Zelllinien konnte eine signifikante Reduktion des Proteins nachgewiesen werden. Es zeigten sich erhöhte Konzentrationen von 2-Oxoadipat in den Fibroblastenzellen der Patienten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten. Um den Defekt in der Zellkultur zu beheben, erfolgte eine Komplementation zur Expression der Wildtyp-*DHTKD1*-mRNA mittels lentiviraler Transduktion. Hierdurch normalisierten sich die erhöhten Konzentrationen. Zur Untersuchung des Lysin-Stoffwechsels wurde die Anhäufung von Deuterium-markiertem 2-Oxoadipat untersucht, welche ausschließlich in nicht komplementierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Hierdurch konnte belegt werden, dass das Enzym, welches den letzten ungeklärten Schritt im Lysin-Abbauweg vermittelt, durch *DHTKD1* kodiert wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Mutationen im *DHTKD1*-Gen die Ursache für die 2-Amino adipat- und 2-Oxoadipinsäureurie beim Menschen sind. Diese

entsteht durch einen gestörten Umsatz der Decarboxylierung von 2-Oxoadipat zu Glutaryl-CoA.

3.1.5 Störung der mtDNA-Replikation

Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist eine zirkuläre, doppelsträngige DNA, die etwa 16.569 Basenpaare umfasst und 37 Gene codiert. Diese Gene sind für die Synthese von 13 Proteinen verantwortlich, die essenzielle Bestandteile der Elektronentransportkette sind, sowie für 22 Transfer-RNAs (tRNAs) und 2 ribosomale RNAs (rRNAs), die für die mitochondriale Proteinbiosynthese benötigt werden. Die mtDNA wird maternal vererbt und ist besonders anfällig für Mutationen aufgrund des Mangels an schützenden Histonen und der Nähe zur Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Mitochondrien (43).

mtDNA-Erhaltungsstörungen sind eine Gruppe von genetischen Erkrankungen, die durch Mutationen in nukleären Genen verursacht werden, die für die Replikation, Reparatur und Erhaltung der mtDNA notwendig sind. Diese Störungen führen zu einer verminderten mtDNA-Kopienzahl (Depletion) oder zu strukturellen Veränderungen wie Deletionen und Duplikationen. Da die mtDNA eine entscheidende Rolle bei der Energieproduktion in den Mitochondrien spielt, führen diese Störungen zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und damit zu einer Vielzahl klinischer Symptome (44, 45). Erhaltungsstörungen der mtDNA resultieren aus Mutationen in nukleären Genen, zu diesen gehören unter anderem *POLG* (46), *POLG2* (47), *TWINKLE* (48), *TK2* (49) und *SUCLA2* (50). Die klinische Präsentation von mtDNA-Erhaltungsstörungen ist äußerst heterogen und kann je nach betroffenem Gewebe und Schweregrad der mtDNA-Veränderungen variieren. Zu den häufigsten Symptomen gehören Myopathie, neurologische Symptome, Leberdysfunktion und Nierenprobleme. Die Diagnose basiert auf klinischen Befunden, biochemischen Tests zur Bewertung der mitochondrialen Funktion sowie genetischen Analysen, um spezifische Mutationen in den betroffenen Genen zu identifizieren (44).

***MGME1* - *MTDPS11* - Mitochondrial DNA depletion syndrome 11**

Kornblum C, Nicholls T, Haack TB, Schöler S, Peeva V, **Danhauser K**, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H. *Loss of MGME1 impairs mtDNA replication, leads to mtDNA depletion and causes multi-systemic mitochondrial disease*. Nat Genet. 2013 Feb;45(2):214-9.

Die Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung des Orphan-Gens *C20orf72*. Es wurden drei Familien mit Familienmitgliedern untersucht, die von einer schweren multisystemischen mitochondrialen Störung betroffen waren. Diese präsentierte sich klinisch mit einer

Ophthalmoplegie, diffusem Skelettmuskelschwund, Schwäche, starker Abmagerung und Atemnot. Im Rahmen des diagnostischen Prozesses waren in den Muskelbiopsien eine mtDNA-Depletion, sowie multiple mtDNA-Deletionen nachweisbar. Zudem waren die Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette im Skelettmuskel verringert. Die genetische Untersuchung mittels Exomsequenzierung ergab in der ersten Familie bei den untersuchten Patienten nach Filterung der Varianten nach Häufigkeit und intrazellulärer Lokalisation der kodierten Proteine eine homozygote Nonsense-Mutation (c.456G>A, p.Trp152*) in *C20orf72*. In einer weiteren Familie mit Betroffenen mit ähnlichem Phänotyp konnte die gleiche homozygote Variante nachgewiesen werden. Darüber hinaus identifizierten wir eine homozygote Mutation (c.698A>G, p.Tyr233Cys) in einem weiteren Patienten aus einer weiteren Familie. Alle Patienten mit *C20orf72*-Mutationen wiesen einen sehr ähnlichen klinischen und histologischen Phänotyp auf.

Zur Charakterisierung der Funktion von *C20orf72*, umbenannt in *MGME1*, wurde eine Primärstrukturanalyse durchgeführt, die die Zugehörigkeit zu einer Gruppe von Enzymen mit unterschiedlichen Nukleinsäure-spaltenden Aktivitäten ergab. Darüber hinaus wurden funktionelle Analysen an Fibroblasten eines Patienten mit homozygoter Nonsense-Mutation durchgeführt. In diesen Zellen wurde keine nachweisbare Menge an *MGME1* gefunden. Die mitochondriale Lokalisation des Proteins wurde durch Immunhistochemie und Zellfraktionsanalysen bestätigt. Zur Klärung der molekularen Konsequenzen der *MGME1*-Mutationen wurden verfügbare Gewebeproben der Patienten auf das Vorhandensein von mtDNA-Deletionen und mtDNA-Depletion untersucht. Dabei wurden in den Muskelbiopsien aller Betroffenen mehrere mtDNA-Deletionen gefunden. Der Nachweis einer mtDNA-Depletion und von mtDNA-Deletionen in der Skelettmuskulatur von Personen mit *MGME1*-Mutationen deutet auf eine gestörte mtDNA-Erhaltung als Hauptursache der mitochondrialen Erkrankung bei diesen Personen hin. Neben der Verarmung der mtDNA konnte zudem ein relativer Anstieg der 7S-DNA-Spiegel beobachtet werden. Die Bildung von 7S-DNA erfolgt als ein Zwischenprodukt der vorzeitig beendeten Replikation der mtDNA (51). In fünf der untersuchten Patienten konnte ein um das Zwei- bis Achtfache erhöhtes Verhältnis von 7S-mtDNA zur gesamten mtDNA im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Um nachzuweisen, dass die verminderte Funktion von *MGME1* für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist, wurde *MGME1* in Zellen mit small interferierender RNA (siRNA) herunterreguliert, wobei sich das zuvor beschriebene Phänomen bestätigte. Die Einführung des Wildtypgens von *MGME1* mittels lentiviraler Transduktion in den Patientenfibroblasten führte zu einer verringerten Menge an 7S-DNA, was darauf hinweist, dass der Defekt behoben wurde. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurden die enzymatischen Eigenschaften von *MGME1* anhand eines aus humanen Zellen isolierten Proteins bestimmt. Zudem wurden die Replikationsfähigkeit der

mtDNA in den Fibroblastenzellen des Patienten analysiert, wobei auch die Replikationsintermediate untersucht wurden.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Funktion von MGME1 bei der Verarbeitung der mtDNA von essenzieller Bedeutung für eine effektive mtDNA-Synthese ist. Mutationen in dem Gen können zu einer Beeinträchtigung der korrekten mtDNA-Erhaltung führen und somit eine klinisch relevante Ursache für mtDNA-Störungen darstellen.

3.2 Vertiefung des Verständnisses bekannter genetischer Defekte

Im Rahmen dieses Projektteils werden Forschungsarbeiten präsentiert, die zu einer Erweiterung des klinischen Verständnisses von Patienten mit bekannten neurometabolischen Erkrankungen beigetragen haben. Die beschriebenen Arbeiten konzentrieren sich auf genetische Defekte bei kombinierten Störungen der oxidativen Phosphorylierung, der EARS2- und der MTFMT-Defizienz. Ferner werden weitere Patienten mit Coenzym Q10-Defizienz mit Mutationen in *COQ9* und *COQ4* beschrieben.

3.2.1 Kombinierte Störungen der oxidativen Phosphorylierung

Die kombinierten Störungen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) stellen eine heterogene Gruppe von mitochondrialen Erkrankungen dar, deren Ursache in Defekten verschiedener Komponenten des OXPHOS-Systems liegt. Dieses System spielt eine essenzielle Rolle bei der zellulären Energiegewinnung, da es in den Mitochondrien die Produktion von ATP durch die Elektronentransportkette und die damit gekoppelte Phosphorylierung von ADP steuert (52). Die zugrunde liegenden genetischen Ursachen dieser Störungen sind sehr vielfältig und betreffen eine Vielzahl von Genen, die unterschiedliche Rollen innerhalb des OXPHOS-Systems spielen und durch Mutationen in der nukleären oder mitochondrialen DNA (mtDNA) bedingt sein können. Wie zuvor erwähnt, konnten unter anderem Mutationen in Genen, die in die Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA involviert sind (46, 47, 49), für Erkrankungen innerhalb der Gruppe nachgewiesen werden. Aber auch weitere Gene, die an der Prozessierung der mitochondrialen RNA beteiligt sind und für die korrekte Translation und Funktion der mitochondrialen Gene unerlässlich sind, spielen eine Rolle. So umfasst das menschliche OXPHOS-System etwa 90 Strukturproteine. Die von der nukleären DNA kodierten Proteinuntereinheiten werden nach der Translation im Zytoplasma in das Mitochondrium importiert. Die von der mitochondrialen DNA kodierten Proteine werden innerhalb der Organelle translatiert. Hierzu kodiert die mtDNA neben

strukturellen Proteinuntereinheiten der OXPHOS-Komplexe auch für RNA-Komponenten der mitochondrialen Translationsmaschinerie, welche aus 22 mitochondrialen Transfer-RNAs (mt-tRNA) und 2 ribosomalen RNAs (mt-rRNA) bestehen. Des Weiteren sind für die mitochondriale Translation zusätzliche, nukleär kodierte Faktoren erforderlich. Eine Störung der mitochondrialen Proteinsynthese führt in der Regel zu kombinierten Defekten der OXPHOS-Komplexe. Die verantwortlichen Gendefekte manifestieren sich in Genen, die auf verschiedenen Ebenen der mitochondrialen Translation wirken. Zu den betroffenen Faktoren zählen mt-tRNA und mt-rRNA, sowie nukleäre Gene, die für mitochondriale ribosomale Proteine (z.B. MRPL3, MRPL44, MRPS16, MRPS22), tRNA-modifizierende Proteine (z.B. MTO1, PUS1), Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (z.B. AARS2, DARS2, EARS2, FARS2, HARS2, MARS2, RARS2, YARS2) oder auch Elongationsfaktoren (z.B. GFM1, TUFM, TSFM) (53) kodieren.

Ebenso wie die molekularen Ursachen sind die klinischen Erscheinungsbilder der COXPD sehr variabel und können neurologische Anomalien, Myopathie, Leberdysfunktion, Kardiomyopathie und Multisystemversagen umfassen. Die Symptome können bereits im Säuglings- oder frühen Kindesalter manifest werden (52).

Im Folgenden werden Arbeiten zu zwei Erkrankungen mit kombinierter Störung der oxidativen Phosphorylierung beschrieben, bei denen Mutationen in Genen, welche für die mitochondriale Translation eine wichtige Rolle spielen, krankheitsverursachend sind.

***EARS2* - COXPD12 - Combined oxidative phosphorylation deficiency 12**

Danhauser K, Haack TB, Alhaddad B, Melcher M, Seibt A, Strom TM, Meitinger T, Klee D, Mayatepek E, Prokisch H, Distelmaier F. *EARS2 mutations cause fatal neonatal lactic acidosis, recurrent hypoglycemia and agenesis of corpus callosum*. *Metab Brain Dis*. 2016 Jun;31(3):717-21.

Das nukleäre *EARS2*-Gen kodiert die mitochondriale Glutamyl-tRNA-Synthetase, ein Enzym, das eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Translation spielt. Es ist verantwortlich für die Beladung einer tRNA mit der Aminosäure Glutaminsäure, ein entscheidender Schritt für die korrekte Übersetzung der mitochondrialen mRNA in Proteine. Die tRNA-Synthetasen sorgen dafür, dass die entsprechende Aminosäure korrekt an die tRNA gebunden wird, was für die Synthese von Proteinen innerhalb der Mitochondrien unerlässlich ist. Genetische Defekte, die die Funktion mitochondrialer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beeinträchtigen, können pädiatrische mitochondriale Erkrankungen verursachen (54).

In der Arbeit wird über ein Kind mit rezidivierender Hypoglykämie, Agenesie des Corpus callosum und tödlicher neonataler Laktatazidose berichtet. Die genetische Untersuchung mittels Exomsequenzierung ergab zwei heterozygote Missense-Varianten (c.320G>A, p.Arg107His und c.328G>A, p.Gly110Ser) in *EARS2*. Zur Untersuchung der funktionellen Konsequenzen der Varianten wurden Hautfibroblasten des Patienten analysiert. Im Immunoblot war der *EARS2*-Proteinspiegel stark vermindert. Die Analyse der Auswirkung des *EARS2*-Mangels auf die zellulären ROS-Werte, ergab erhöhte Werte für die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und eine veränderte mitochondriale Morphologie.

Die Arbeit veranschaulicht das klinische Spektrum der schweren neonatalen Form bei *EARS2*-Mutationen. Darüber hinaus schienen in diesem Fall die Lebendzellparameter im Vergleich zur Standarddiagnostik empfindlicher auf mitochondriale Dysfunktion zu reagieren. Bei dem Patienten ergaben Messungen der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in Hautfibroblasten normale Werte. Dies weist auf die potenzielle Relevanz von Fibroblastenstudien bei Kindern mit mitochondrialen Erkrankungen hin. Hierbei ist zu beachten, dass Zellstudien in einem größeren Kollektiv erforderlich sind, um festzustellen, ob die beschriebenen Veränderungen ein allgemeines Merkmal des Gendefekts darstellen.

***MTFMT* - COXPD15 - Combined oxidative phosphorylation deficiency 15**

Haack TB, Gorza M, **Danhauser K**, Mayr JA, Haberberger B, Wieland T, Kremer L, Strecker V, Graf E, Memari Y, Ahting U, Kopajtich R, Wortmann SB, Rodenburg RJ, Kotzaeridou U, Hoffmann GF, Sperl W, Wittig I, Wilichowski E, Schottmann G, Schuelke M, Plecko B, Stephani U, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Freisinger P. *Phenotypic spectrum of eleven patients and five novel MTFMT mutations identified by exome sequencing and candidate gene screening*. Mol Genet Metab. 2014 Mar;111(3):342-52.

MTFMT kodiert die mitochondriale Methionyl-tRNA-Formyltransferase, ein Enzym, das ebenfalls an der Translation innerhalb der Mitochondrien beteiligt ist. *MTFMT* spielt eine Rolle in der Initiierung der Proteinsynthese in Mitochondrien, indem es die Umwandlung von Methionyl-tRNA in Formylmethionyl-tRNA katalysiert. Diese Formylierung ist ein entscheidender Schritt für den Start der Translation von Proteinen, die in den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden (55). Mutationen in *MTFMT* wurden in Zusammenhang mit einer kombinierten Störung der oxidativen Phosphorylierung zum Zeitpunkt der Arbeit für fünf Indexpatienten beschrieben (56-58). Im Rahmen der Arbeit wurden neun weitere Fälle aus acht Familien mit *MTFMT*-Mutationen identifiziert. Die Patienten wiesen einen enzephalomyopathischen Phänotyp auf, der durch Ataxie, Muskelhypotonie und psychomotorische Retardierung gekennzeichnet war. Der Schweregrad der Krankheit war unterschiedlich und reichte von frühem Tod im zweiten Lebensjahr bis zu motorischer

Behinderung und Spastik im jungen Erwachsenenalter. Die cMRT-Untersuchungen der meisten Patienten zeigten symmetrische Läsionen in den Basalganglien, vor allem im Putamen und Globus pallidus, entsprechend dem klassischen Leigh-Syndrom.

Die genetische Diagnostik ergab fünf neue Mutationen in *MTFMT* die compound heterozygot mit einer bekannten pathogenen Mutation vorlagen. Der krankheitsverursachende Charakter der neu identifizierten Mutationen wurde durch eine starke Abnahme der MTFMT-Spiegel in den mutierten Fibroblasten der Patienten unterstützt, was darauf hindeutet, dass die Mutationen die Stabilität des Proteins beeinträchtigen. Biochemischen Messungen der Aktivitäten der einzelnen Komplexe der Atmungskette ergaben einen isolierten Komplex-I-Mangel oder einen kombinierten Komplex-I- und IV-Defekt im Skelettmuskel. Dies ließ sich auch in Fibroblastenzellen der Patienten bestätigen. Die Quantifizierung fluoreszenzmarkierter mitochondrialer Komplexe in Fibroblasten eines Patienten mittels 2D BN/SDS-PAGE zeigte eine deutliche Abnahme der Komplex I-haltigen Superkomplexe sowie von Komplex IV, was die Pathogenität der gefundenen Varianten untermauerte.

Zusammenfassend trägt die Arbeit über detaillierte klinische, biochemische und genetische Daten von weiteren Patienten mit MTFMT-Mutationen zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankung bei.

3.2.2 Coenzym Q10 - Defizienz

Coenzym Q10, synonym auch als Ubichinon bezeichnet, stellt ein für den menschlichen Organismus essenzielles, lipophiles Molekül dar, welches in nahezu allen Zellmembranen zu finden ist. Es spielt eine entscheidende Rolle in der Elektronentransportkette in den Mitochondrien, wo es als Elektronenüberträger zwischen den Komplexen I und II zum Komplex III fungiert. Des Weiteren fungiert Coenzym Q10 als starkes Antioxidans, welches die Zellen vor oxidativen Schäden schützt (59, 60). Ein Defizit an Coenzym Q10 ist eine seltene, jedoch bedeutsame Störung, welche den zellulären Energiestoffwechsel beeinträchtigt und infolge der gestörten Mitochondrienfunktion zu einer Vielzahl von klinischen Symptomen führen kann. Ein Mangel an Coenzym Q10 kann durch Mutationen in Genen bedingt sein, die an seiner Biosynthese und Verwertung beteiligt sind. Ein primärer Coenzym Q10-Mangel wird durch Mutationen in nukleären Genen verursacht, die für die Biosynthese von Coenzym Q10 verantwortlich sind. Dazu gehören *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *ADCK3*, *ADCK4* und *COQ9*. Diese Mutationen stören die Synthese von Coenzym Q10 und beeinträchtigen die Funktion der Mitochondrien (61). Die klinischen Symptome und die Diagnose des Coenzym Q10-Mangels sind vielfältig und spiegeln die Auswirkungen auf

mehrere Organsysteme wider. Zu den neurologischen Symptomen zählen Ataxie, Krampfanfälle sowie Enzephalopathie. Muskelschwäche und Myopathie resultieren in einer Belastungsintoleranz sowie Muskelschmerzen. Eine Nierenfunktionsstörung manifestiert sich häufig in Form eines nephrotischen Syndroms. Eine Kardiomyopathie kann zu Herzversagen und Herzrhythmusstörungen führen (62). Die Supplementierung von Coenzym Q10 stellt die primäre Behandlungsmethode eines Coenzym Q10-Mangels dar und hat sich bei einem Teil der Patienten als wirksam hinsichtlich einer Verbesserung der Symptome sowie biochemischer Anomalien erwiesen. Die Effektivität einer Supplementierung ist abhängig von dem spezifischen genetischen Defekt sowie dem Schweregrad des Mangels (63).

COQ9 - Coenzyme Q10 deficiency

Danhauser K, Herebian D, Haack TB, Rodenburg RJ, Strom TM, Meitinger T, Mayatepek E, Prokisch H, Distelmaier F. *Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a novel mutation in COQ9*. Eur J Hum Genet. 2016 Mar;24(3):450-4.

Die Arbeit enthält den zweiten Bericht über einen Patienten mit einer Coenzym Q10-Defizienz durch eine Mutation in COQ9. Beim ersten beschriebenen betroffenen Individuum war eine homozygote Stoppvariante (c.730C>T, p.Arg244*), als ursächlich für die Erkrankung gefunden worden (64). Mithilfe der Exomsequenzierung bei einem Kind mit tödlicher neonataler Laktatazidose und Enzephalopathie identifizierten wir eine homozygote Loss-of-Function-Variante in COQ9 (c.521+1del, p.Ser127_Arg202del), dessen Transkript zu einem Verlust der Exone 4 und 5 führte.

Im Immunoblot von Fibroblasten des Patienten war das Protein COQ9 nicht zu detektieren, was auf eine Degradation des defekten Proteins in den Zellen hinweist. Funktionelle Studien in Fibroblasten des Patienten ergaben, dass das Fehlen des COQ9-Proteins mit einer signifikanten Reduktion des COQ7-Proteins einherging. Dies resultierte in einer Akkumulation des Substrats von COQ7, 6-Demethoxy-Ubichinon, was mittels Massenspektrometrie gezeigt wurde. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Gesamtmenge an Coenzym Q10 nachgewiesen werden. Dies spiegelte sich in einer Abnahme der Aktivität der mitochondrialen Atmungskette, insbesondere der Succinat-Cytochrom-C-Oxidoreduktase (Komplex II/III), wider. Die Wiederherstellung aller dieser Parameter durch lentivirale Expression von COQ9 bestätigt die kausale Rolle der Variante. Eine Supplementierung von Coenzym Q10 in der Zellkultur resultierte in einer Verbesserung der Aktivität der Atmungskette.

Der hier vorgestellte Bericht über den zweiten Patienten mit pathogenen Mutationen in COQ9 erweitert das klinische Spektrum, das mit COQ9-Varianten assoziiert ist, und weist auf die

Bedeutung von COQ9 bereits während der pränatalen Entwicklung hin. Des Weiteren lässt sich aus der Rettung des zellulären Coenzym Q10-Spiegels und der Aktivität des Atmungskettenkomplexes durch eine Coenzym Q10-Supplementierung ableiten, dass eine frühzeitige Diagnose und Behandlung von essenzieller Bedeutung sein kann.

COQ4 - Coenzyme Q10 deficiency

Laugwitz L, Seibt A, Herebian D, Peralta S, Kienzle I, Buchert R, Falb R, Gauck D, Müller A, Grimm M, Beck-Woedel S, Kern J, Daliri K, Katibeh P, **Danhauser K**, Leiz S, Alesi V, Baertling F, Vasco G, Steinfeld R, Wagner M, Caglayan AO, Gumus H, Burmeister M, Mayatepek E, Martinelli D, Tamhankar PM, Tamhankar V, Joset P, Steindl K, Rauch A, Bonnen PE, Froukh T, Groeschel S, Krägeloh-Mann I, Haack TB, Distelmaier F. *Human COQ4 deficiency: delineating the clinical, metabolic and neuroimaging phenotypes*. J Med Genet. 2022 Sep;59(9):878-887.

Es wurden der klinische Verlauf und die neuroradiologischen Befunde einer großen Kohorte pädiatrischer Patienten mit autosomal-rezessiver Coenzym Q10-Defizienz aufgrund von Mutationen in *COQ4* in der Arbeit analysiert und funktionelle Studien an von Patienten stammenden Zelllinien durchgeführt. Insgesamt charakterisierten wir 44 betroffene Personen aus 36 Familien mit *COQ4*-Mangel, wovon 16 erstmalig beschrieben wurden. Die genetischen Analysen zeigten in dem Kollektiv 23 verschiedene Varianten in *COQ4* mit 4 neuen Varianten.

Korrelationsanalysen der klinischen und bildgebenden Befunde ergaben drei Krankheitsbilder. Beim Typ 1 handelt es sich um einen früh einsetzenden Phänotyp mit neonatalen Hirnanomalien und epileptischer Enzephalopathie. Betroffene vom Typ 2 wiesen einen intermediären Phänotyp mit ausgeprägten schlaganfallartigen Läsionen auf. Der Typ 3 manifestierte sich mit einem moderaten Phänotyp mit unspezifischer Hirnpathologie und stabilem Krankheitsverlauf.

Durch in-vitro-Studien mit von Patienten stammenden Fibroblastenlinien wurde die funktionelle Bedeutung der *COQ4*-Varianten analysiert. Die Experimente ergaben signifikant verringerte *COQ4*-Proteinspiegel, verringerte Spiegel von zellulärem Coenzym Q10 und erhöhte Spiegel des metabolischen Zwischenprodukts 6-Demethoxyubiquinon, was die pathogene Natur der Varianten bestätigte.

Zusammenfassend konnten wir in der Studie das heterogene klinische Bild des *COQ4*- Mangels aufzeigen und verschiedene Subtypen dieser Erkrankung identifizieren. Zellbasierte Studien unterstützten die pathogenen Eigenschaften der *COQ4*-Varianten.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Forschungsarbeiten die genetischen Ursachen diverser neurometabolischer Erkrankungen aufgeklärt werden. Es gelang erstmals, krankheitsverursachende Mutationen in den Genen *ADPRHL2*, *NAXE*, *TXN2*, *DHTKD1* und *MGME1* nachzuweisen, die an verschiedenen Signalwegen in der Zelle beteiligt sind. Dies reflektiert das breite Spektrum der Ursachen neurometabolischer Erkrankungen. Darüber hinaus konnten weitere Einblicke in kombinierte Störungen der oxidativen Phosphorylierung bei Störungen der Translation in den Mitochondrien sowie die Coenzym Q10-Defizienz durch die Beschreibung weiterer betroffener Individuen und funktionelle Analysen von Zellkulturen der Patienten gewonnen werden. Die Anwendung von Next-Generation-Sequencing-Technologien, wie Exomsequenzierungen, haben, wie veranschaulicht, bereits zu einer Verbesserung der Diagnostik bei seltenen Erkrankungen geführt hat.

Dennoch bleiben weiterhin Patienten mit unklarer Diagnose, für die eine genaue Identifizierung der zugrunde liegenden genetischen Ursache noch aussteht. Um die Detektionsrate zu verbessern und die Diagnostik bei seltenen Erkrankungen weiter zu optimieren, sind möglicherweise Analysen des gesamten Genoms erforderlich. Darüber hinaus können Kombinationen verschiedener OMICS-Technologien, wie z.B. der Transkriptomik, Proteomik oder Metabolomik, hilfreich sein, um ein umfassenderes Verständnis der molekularen Mechanismen zu gewinnen. Ferner zeigt sich ein weiterer vielversprechender Ansatz im sogenannten Deep-Phenotyping. Dabei werden detaillierte klinische, biochemische und molekulare Daten der Patienten gesammelt und analysiert. Diese Methode umfasst nicht nur die Erfassung genetischer Informationen, sondern auch eine umfassende Dokumentation der klinischen Symptome, biochemischen Marker und weiterer phänotypischer Daten.

Zukünftig wird zudem der rasante Fortschritt der künstlichen Intelligenz in der Analyse und Interpretation der generierten, großen Datenmengen von zentraler Bedeutung sein. Durch die Anwendung von Machine-Learning-Algorithmen und anderen Methoden der künstlichen Intelligenz können große Datenmengen schneller und effizienter analysiert werden. Auf diese Weise können Muster und Korrelationen schneller und präziser erkannt und der Diagnosefindungsprozess beschleunigt werden.

Insgesamt bietet die Zukunft der Genomik und OMICS-Technologien vielversprechende Möglichkeiten, die Diagnostik bei seltenen Erkrankungen weiter zu verbessern. Durch die Kombination von fortschrittlichen Analysemethoden und innovativen Ansätzen in der Datenanalyse können wir uns einem besseren Verständnis der genetischen Ursachen dieser Krankheiten nähern und zukünftig die Lebensqualität von Patienten mit seltenen Erkrankungen weiter verbessern.

5 Literatur

1. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(2):165-73.
2. Lee J, Liu C, Kim J, Chen Z, Sun Y, Rogers JR, et al. Deep learning for rare disease: A scoping review. *J Biomed Inform.* 2022;135:104227.
3. Cortes-Martin J, Sanchez-Garcia JC, Rodriguez-Blanque R. Health Care on Rare Diseases. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;20(1).
4. Stark Z, Scott RH. Genomic newborn screening for rare diseases. *Nat Rev Genet.* 2023;24(11):755-66.
5. Bick D, Bick SL, Dimmock DP, Fowler TA, Caulfield MJ, Scott RH. An online compendium of treatable genetic disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2021;187(1):48-54.
6. Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tiffit CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):27.
7. Matsumoto S, Haberle J, Kido J, Mitsubuchi H, Endo F, Nakamura K. Urea cycle disorders-update. *J Hum Genet.* 2019;64(9):833-47.
8. Yska HAF, Engelen M, Bugiani M. The pathology of X-linked adrenoleukodystrophy: tissue specific changes as a clue to pathophysiology. *Orphanet J Rare Dis.* 2024;19(1):138.
9. Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch Pharm Res.* 2018;41(4):372-83.
10. Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J, Group IA. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis.* 2021;44(1):164-77.
11. Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, Wilkinson E, Fish M, Ramsuran V, et al. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Front Genet.* 2020;11:544162.
12. Claussnitzer M, Cho JH, Collins R, Cox NJ, Dermitzakis ET, Hurles ME, et al. A brief history of human disease genetics. *Nature.* 2020;577(7789):179-89.
13. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931-45.
14. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2003;73(6):1261-70.
15. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald M, et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med.* 2014;16(2):176-82.
16. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet.* 2017;18(1):14.
17. Sullivan JA, Schoch K, Spillmann RC, Shashi V. Exome/Genome Sequencing in Undiagnosed Syndromes. *Annu Rev Med.* 2023;74:489-502.
18. Suskiewicz MJ, Prokhorova E, Rack JGM, Ahel I. ADP-ribosylation from molecular mechanisms to therapeutic implications. *Cell.* 2023;186(21):4475-95.
19. Mashimo M, Kato J, Moss J. ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly (ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(47):18964-9.

20. Hoch NC, Hanzlikova H, Rulten SL, Tetreault M, Komulainen E, Ju L, et al. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia. *Nature*. 2017;541(7635):87-91.
21. Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain*. 1999;122 (Pt 2):247-53.
22. Lee Y, Kang HC, Lee BD, Lee YI, Kim YP, Shin JH. Poly (ADP-ribose) in the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep*. 2014;47(8):424-32.
23. Danhauser K, Alhaddad B, Makowski C, Piekutowska-Abramczuk D, Syrbe S, Gomez-Ospina N, et al. Bi-allelic ADPRHL2 Mutations Cause Neurodegeneration with Developmental Delay, Ataxia, and Axonal Neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2018;103(5):817-25.
24. Bai P, Canto C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab*. 2012;16(3):290-5.
25. Zhang S, Lin Y, Kim YS, Hande MP, Liu ZG, Shen HM. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death Differ*. 2007;14(5):1001-10.
26. Marbaix AY, Tyteca D, Niehaus TD, Hanson AD, Linster CL, Van Schaftingen E. Occurrence and subcellular distribution of the NADPHX repair system in mammals. *Biochem J*. 2014;460(1):49-58.
27. Yoshida A, Dave V. Inhibition of NADP-dependent dehydrogenases by modified products of NADPH. *Arch Biochem Biophys*. 1975;169(1):298-303.
28. Marbaix AY, Noel G, Detroux AM, Vertommen D, Van Schaftingen E, Linster CL. Extremely conserved ATP- or ADP-dependent enzymatic system for nicotinamide nucleotide repair. *J Biol Chem*. 2011;286(48):41246-52.
29. Kremer LS, Danhauser K, Herebian D, Petkovic Ramadza D, Piekutowska-Abramczuk D, Seibt A, et al. NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD(P)HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):894-902.
30. Prabhakar P, Laboy JI, Wang J, Budker T, Din ZZ, Chobanian M, et al. Effect of NADH-X on cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. 1998;360(2):195-205.
31. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
32. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2018;592(5):692-702.
33. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158-67.
34. Holzerova E, Danhauser K, Haack TB, Kremer LS, Melcher M, Ingold I, et al. Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. *Brain*. 2016;139(Pt 2):346-54.
35. Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(12):1738-47.
36. Tan Y, Chrysopoulou M, Rinschen MM. Integrative physiology of lysine metabolites. *Physiol Genomics*. 2023;55(12):579-86.
37. Leandro J, Houten SM. The lysine degradation pathway: Subcellular compartmentalization and enzyme deficiencies. *Mol Genet Metab*. 2020;131(1-2):14-22.
38. Houten SM, Te Brinke H, Denis S, Ruiters JP, Knegt AC, de Klerk JB, et al. Genetic basis of hyperlysinemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:57.

39. Schuurmans IME, Dimitrov B, Schroter J, Ribes A, de la Fuente RP, Zamora B, et al. Exploring genotype-phenotype correlations in glutaric aciduria type 1. *J Inher Metab Dis*. 2023;46(3):371-90.
40. Danhauser K, Sauer SW, Haack TB, Wieland T, Staufner C, Graf E, et al. DHTKD1 mutations cause 2-aminoadipic and 2-oxoadipic aciduria. *Am J Hum Genet*. 2012;91(6):1082-7.
41. Duran M, Beemer FA, Wadman SK, Wendel U, Janssen B. A patient with alpha-ketoadipic and alpha-aminoadipic aciduria. *J Inher Metab Dis*. 1984;7(2):61.
42. Przyrembel H, Bachmann D, Lombeck I, Becker K, Wendel U, Wadman SK, et al. Alpha-ketoadipic aciduria, a new inborn error of lysine metabolism; biochemical studies. *Clin Chim Acta*. 1975;58(3):257-69.
43. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019;8(4).
44. Ramon J, Vila-Julia F, Molina-Granada D, Molina-Berenguer M, Melia MJ, Garcia-Arumi E, et al. Therapy Prospects for Mitochondrial DNA Maintenance Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
45. Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord*. 2010;20(7):429-37.
46. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet*. 2001;28(3):211-2.
47. Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, Hudson G, Durham SE, Taylor RW, et al. Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet*. 2006;78(6):1026-34.
48. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*. 2001;28(3):223-31.
49. Wang J, El-Hattab AW, Wong LJC. TK2-Related Mitochondrial DNA Maintenance Defect, Myopathic Form. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
50. El-Hattab AW, Scaglia F. SUCLA2-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Encephalomyopathic Form with Methylmalonic Aciduria. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.
51. Nicholls TJ, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol*. 2014;56:175-81.
52. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Lett*. 2021;595(8):1062-106.
53. Wang F, Zhang D, Zhang D, Li P, Gao Y. Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:675465.
54. Diodato D, Ghezzi D, Tiranti V. The Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases: Genes and Syndromes. *Int J Cell Biol*. 2014;2014:787956.
55. Spencer AC, Spremulli LL. Interaction of mitochondrial initiation factor 2 with mitochondrial fMet-tRNA. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(18):5464-70.
56. Haack TB, Haberberger B, Frisch EM, Wieland T, Iuso A, Gorza M, et al. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet*. 2012;49(4):277-83.

57. Neeve VC, Pyle A, Boczonadi V, Gomez-Duran A, Griffin H, Santibanez-Koref M, et al. Clinical and functional characterisation of the combined respiratory chain defect in two sisters due to autosomal recessive mutations in MTFMT. *Mitochondrion*. 2013;13(6):743-8.
58. Tucker EJ, Hershman SG, Kohrer C, Belcher-Timme CA, Patel J, Goldberger OA, et al. Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation. *Cell Metab*. 2011;14(3):428-34.
59. Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396(1):74-9.
60. Laredj LN, Licitra F, Puccio HM. The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie*. 2014;100:78-87.
61. Herebian D, Lopez LC, Distelmaier F. Bypassing human CoQ(10) deficiency. *Mol Genet Metab*. 2018;123(3):289-91.
62. Quinzii CM, Emmanuele V, Hirano M. Clinical presentations of coenzyme q10 deficiency syndrome. *Mol Syndromol*. 2014;5(3-4):141-6.
63. Wang Y, Hekimi S. The efficacy of coenzyme Q(10) treatment in alleviating the symptoms of primary coenzyme Q(10) deficiency: A systematic review. *J Cell Mol Med*. 2022;26(17):4635-44.
64. Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Meunier B, Costello H, Hargreaves IP, Lopez LC, et al. A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet*. 2009;84(5):558-66.

6 Publikationsverzeichnis

6.1 Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin

Wang Y, Leutner S, Ingrisch M, Klein C, Hinske LC, **Danhauser K**. *Optimizing Data Extraction: Harnessing RAG and LLMs for German Medical Documents*. Stud Health Technol Inform. 2024 Aug 22;316:949-950. (IF 0,73)

Danhauser K, Alhaddad B, Makowski C, Piekutowska-Abramczuk D, Syrbe S, Gomez-Ospina N, Manning MA, Kostera-Pruszczyk A, Krahn-Peper C, Berutti R, Kovács-Nagy R, Gusic M, Graf E, Laugwitz L, Röblitz M, Wroblewski A, Hartmann H, Das AM, Bültmann E, Fang F, Xu M, Schatz UA, Karall D, Zellner H, Haberlandt E, Feichtinger RG, Mayr JA, Meitinger T, Prokisch H, Strom TM, Płoski R, Hoffmann GF, Pronicki M, Bonnen PE, Morlot S, Haack TB. *Bi-allelic ADPRHL2 Mutations Cause Neurodegeneration with Developmental Delay, Ataxia and Axonal Neuropathy*. Am J Hum Genet. 2018 Nov 1;103(5):817-825. (IF 9,924)

Kremer LS*, **Danhauser K***, Herebian D*, Petkovic Ramadža D, Piekutowska-Abramczuk D, Seibt A, Müller-Felber W, Haack TB, Płoski R, Lohmeier K, Schneider D, Klee D, Rokicki D, Mayatepek E, Strom TM, Meitinger T, Klopstock T, Pronicka E, Mayr JA, Baric I, Distelmaier F, Prokisch H. *NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD(P)HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood*. Am J Hum Genet. 2016 Oct 6;99(4):894-902. (IF 9,025)

* equal contribution

Danhauser K, Haack TB, Alhaddad B, Melcher M, Seibt A, Strom TM, Meitinger T, Klee D, Mayatepek E, Prokisch H, Distelmaier F. *EARS2 mutations cause fatal neonatal lactic acidosis, recurrent hypoglycemia and agenesis of corpus callosum*. Metab Brain Dis. 2016 Jun;31(3):717-21. (IF 2,297)

Danhauser K, Herebian D, Haack TB, Rodenburg RJ, Strom TM, Meitinger T, Mayatepek E, Prokisch H, Distelmaier F. *Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a novel mutation in COQ9*. Eur J Hum Genet. 2016 Mar;24(3):450-4. (IF 4,287)

Danhauser K, Smeitink JA, Freisinger P, Wolfgang Sperl W, Sabir H, Hadzik B, Mayatepek E, Eva Morava E, Distelmaier F. *Treatment options for lactic acidosis and metabolic crisis in children with mitochondrial disease*. J Inherit Metab Dis. 2015 May;38(3):467-75. (IF 3,541)

Danhauser K*, Sauer SW*, Haack TB*, Wieland T, Staufner C, Graf E, Zschocke J, Strom TM, Traub T, Okun JG, Meitinger T, Hoffmann GF, Prokisch H, Kölker S. *DHTKD1 Mutations Cause 2-Aminoadipic and 2-Oxoadipic Aciduria*. Am J Hum Genet. 2012 Dec 7;91(6):1082-7. (IF 11,202)

* equal contribution

Danhauser K, Iuso A, Haack TB, Freisinger P, Brockmann K, Mayr JA, Meitinger T, Prokisch H. *Cellular rescue-assay aids verification of causative DNA-variants in mitochondrial complex I deficiency*. Mol Genet Metab. 2011 Jun;103(2):161-6. (IF 3,193)

Haack TB*, **Danhauser K***, Haberberger B, Hoser J, Strecker V, Boehm D, Uziel G, Lamantea E, Invernizzi F, Poulton J, Rolinski B, Iuso A, Biskup S, Schmidt T, Mewes HW, Wittig I, Meitinger T, Zeviani M, Prokisch H. *Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency*. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1131-4. (IF 36,377)

* equal contribution

6.2 Originalarbeiten als Koautorin

Lobentanzer S, Aloy P, Baumbach J, Bohar B, Carey VJ, Charoentong P, **Danhauser K**, Dođan T, Dreo J, Dunham I, Farr E, Fernandez-Torras A, Gyori BM, Hartung M, Hoyt CT, Klein C, Korcsmaros T, Maier A, Mann M, Ochoa D, Pareja-Lorente E, Popp F, Preusse M, Probul N, Schwikowski B, Sen B, Strauss MT, Turei D, Ulusoy E, Waltemath D, Wodke JAH, Saez-Rodriguez J. *Democratizing knowledge representation with BioCypher*. Nat Biotechnol. 2023 Jun 19. doi: 10.1038/s41587-023-01848-y. (IF 46,9)

Laugwitz L, Seibt A, Herebian D, Peralta S, Kienzle I, Buchert R, Falb R, Gauck D, Müller A, Grimm M, Beck-Woedel S, Kern J, Daliri K, Katibeh P, **Danhauser K**, Leiz S, Alesi V, Baertling F, Vasco G, Steinfeld R, Wagner M, Caglayan AO, Gumus H, Burmeister M, Mayatepek E, Martinelli D, Tamhankar PM, Tamhankar V, Joset P, Steindl K, Rauch A, Bonnen PE, Froukh T, Groeschel S, Krägeloh-Mann I, Haack TB, Distelmaier F. *Human COQ4 deficiency: delineating the clinical, metabolic and neuroimaging phenotypes*. J Med Genet. 2022 Sep;59(9):878-887. (IF 4,0)

Vermehren-Schmaedick A, Huang JY, Levinson M, Pomaville MB, Reed S, Bellus GA, Gilbert F, Keren B, Heron D, Haye D, Janello C, Makowski C, **Danhauser K**, Fedorov LM, Haack TB, Wright KM, Cohen MS. *Characterization of PARP6 Function in Knockout Mice and Patients with Developmental Delay*. Cells. 2021 May 22;10(6):1289. (IF 7,666)

Milev MP, Graziano C, Karall D, Kuper WFE, Al-Deri N, Cordelli DM, Haack TB, **Danhauser K**, Iuso A, Palombo F, Pippucci T, Prokisch H, Saint-Dic D, Seri M, Stanga D, Cenacchi G, van Gassen KLI, Zschocke J, Fauth C, Mayr JA, Sacher M, van Hasselt PM. *Bi-allelic mutations in TRAPPC2L result in a neurodevelopmental disorder and have an impact on RAB11 in fibroblasts*. J Med Genet. 2018 Nov;55(11):753-764 (IF 5,899)

Melcher M, **Danhauser K**, Seibt A, Degistirici Ö, Baertling F, Kondadi AK, Reichert AS, Koopman WJH, Willems PHGM, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Meisel R, Distelmaier F. *Modulation of oxidative phosphorylation and redox homeostasis in mitochondrial NDUF54-deficiency via mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther. 2017 Jun 24;8(1):150. (IF 4,963)

Herebian D, Alhaddad B, Seibt A, Schwarzmayr T, **Danhauser K**, Klee D, Harmsen S, Meitinger T, Strom TM, Schulz A, Mayatepek E, Haack TB, Distelmaier F. *Coexisting variants in OSTM1 and MANEAL cause a complex neurodegenerative disorder with brain iron accumulation*. Eur J Hum Genet. 2017 Sep;25(9):1092-1095. (IF 3,636)

Holzerova E, **Danhauser K**, Haack TB, Kremer LS, Melcher M, Ingold I, Kobayashi S, Terrile C, Wolf P, Schaper J, Mayatepek E, Baertling F, Friedmann Angeli JP, Conrad M, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Distelmaier F. *Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration*. Brain. 2016 Feb;139(Pt 2):346-54. (IF 10,292)

Distelmaier F, Valsecchi F, Liemburg-Apers DC, Lebiedzinska M, Rodenburg RJ, Heil S, Keijer J, Fransen J, Imamura H, **Danhauser K**, Seibt A, Viollet B, Gellerich FN, Smeitink JA, Wieckowski MR, Willems PH, Koopman WJ. *Mitochondrial dysfunction in primary human fibroblasts triggers an adaptive cell survival program that requires AMPK- α* . Biochim Biophys Acta. 2015 Mar;1852(3):529-40. (IF 5,083)

Haack TB, Gorza M, **Danhauser K**, Mayr JA, Haberberger B, Wieland T, Kremer L, Strecker V, Graf E, Memari Y, Ahting U, Kopajtich R, Wortmann SB, Rodenburg RJ, Kotzaeridou U, Hoffmann GF, Sperl W, Wittig I, Wilichowski E, Schottmann G, Schuelke M, Plecko B, Stephani U, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Freisinger P. *Phenotypic spectrum of eleven patients and five novel MTFMT mutations identified by exome sequencing and candidate gene screening*. Mol Genet Metab. 2014 Mar;111(3):342-52. (IF 2,625)

Haack TB, Kopajtich R, Freisinger P, Wieland T, Rorbach J, Nicholls TR, Baruffini E, Walther A, **Danhauser K**, Zimmermann FA, Husain RA, Schum J, Mundy H, Ferrero I, Strom TM, Meitinger T, Taylor RW, Minczuk M, Mayr JA, Prokisch H. *ELAC2 Mutations Cause a Mitochondrial RNA Processing Defect Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy*. Am J Hum Genet. 2013 Aug 8;93(2):211-23. (IF 10,987)

Kornblum C, Nicholls T, Haack TB, Schöler S, Peeva V, **Danhauser K**, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H. *Loss of MGME1 impairs mtDNA replication, leads to mtDNA depletion and causes multi-systemic mitochondrial disease*. Nat Genet. 2013 Feb;45(2):214-9. (IF 29,648)

Haack TB, Madignier F, Herzer M, Lamantea E, **Danhauser K**, Invernizzi F, Koch J, Freitag M, Drost R, Hillier I, Haberberger B, Mayr JA, Ahting U, Tiranti V, Rötig A, Iuso A, Horvath R, Tesarova M, Baric I, Uziel G, Rolinski B, Sperl W, Meitinger T, Zeviani M, Freisinger P, Prokisch H. *Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUF9*. J Med Genet. 2012 Feb;49(2):83-9. (IF 5,703)

Van den Bosch BJ, Gerards M, Sluiter W, Stegmann APA, Jongen ELC, Hellebrekers DMEI, Oegema R, Lambrichts EH, Prokisch H, **Danhauser K**, Schoonderwoerd K, de Coo IF, Smeets HJ. *Defective NDUF9 as a novel cause of neonatally fatal complex I disease*. J Med Genet. 2012 Jan;49(1):10-5. (IF 5,703)

Gerards M, van den Bosch BJ, **Danhauser K**, Serre V, van Weeghel M, Wanders RJ, Nicolaes GA, Sluiter W, Schoonderwoerd K, Scholte HR, Prokisch H, Rötig A, de Coo IF, Smeets HJ. *Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene*. Brain. 2011 Jan;134(Pt 1):210-9. (IF 9,457)

Als Mitglied des PERFORM consortium und DIAMONDS consortium:

Kolberg L, Khanijau A, van der Velden FJS, Herberg J, De T, Galassini R, Cunnington AJ, Wright VJ, Shah P, Kaforou M, Wilson C, Kuijpers T, Martín-Torres F, Rivero-Calle I, Moll H, Vermont C, Pokorn M, Kolnik M, Pollard AJ, Agyeman PKA, Schlapbach LJ, Tsolia MN, Yeung S, Zavadzka D, Zenz W, Schweintzger NA, van der Flier M, de Groot R, Usuf E, Voice M, Calvo-Bado L, Mallet F, Fidler K, Levin M, Carrol ED, Emonts M, von Both U; **PERFORM consortium***. *Raising AWARe-ness of Antimicrobial Stewardship Challenges in Pediatric Emergency Care: Results from the PERFORM Study Assessing Consistency and Appropriateness of Antibiotic Prescribing Across Europe*. Clin Infect Dis. 2024 Mar 20;78(3):526-534. doi: 10.1093/cid/ciad615. (IF 8,2)

*member of PERFORM consortium

Jackson HR, Zandstra J, Menikou S, Hamilton MS, McArdle AJ, Fischer R, Thorne AM, Huang H, Tanck MW, Jansen MH, De T, Agyeman PKA, Von Both U, Carrol ED, Emonts M, Eleftheriou I, Van der Flier M, Fink C, Gloerich J, De Groot R, Moll HA, Pokorn M, Pollard AJ, Schlapbach LJ, Tsolia MN, Usuf E, Wright VJ, Yeung S, Zavadzka D, Zenz W, Coin LJM, Casals-Pascual C, Cunnington AJ, Martinon-Torres F, Herberg JA, de Jonge MI, Levin M, Kuijpers TW, Kaforou M; **PERFORM consortium***. *A multi-platform approach to identify a blood-based host protein signature for distinguishing between bacterial and viral infections in febrile children (PERFORM): a multi-cohort machine learning study*. Lancet Digit Health. 2023 Nov;5(11):e774-e785. (IF 23,8)

*member of PERFORM consortium

Martin AJ, van der Velden FJS, von Both U, Tsolia MN, Zenz W, Sagmeister M, Vermont C, de Vries G, Kolberg L, Lim E, Pokorn M, Zavadzka D, Martín-Torres F, Rivero-Calle I,

Hagedoorn NN, Usuf E, Schlapbach L, Kuijpers TW, Pollard AJ, Yeung S, Fink C, Voice M, Carrol E, Agyeman PKA, Khanijau A, Paulus S, De T, Herberg JA, Levin M, van der Flier M, de Groot R, Nijman R, Emonts M; **PERFORM consortium***. *External validation of a multivariable prediction model for identification of pneumonia and other serious bacterial infections in febrile immunocompromised children*. Arch Dis Child. 2023 Dec 14;109(1):58-66. (IF 4,3)

*member of PERFORM consortium

Shah P, Voice M, Calvo-Bado L, Rivero-Calle I, Morris S, Nijman R, Broderick C, De T, Eleftheriou I, Galassini R, Khanijau A, Kolberg L, Kolnik M, Rudzate A, Sagmeister MG, Schweintzger NA, Secka F, Thakker C, van der Velden F, Vermont C, Vincek K, Agyeman PKA, Cunningham AJ, De Groot R, Emonts M, Fidler K, Kuijpers TW, Mommert-Tripon M, Brengel-Pesce K, Mallet F, Moll H, Paulus S, Pokorn M, Pollard A, Schlapbach LJ, Shen CF, Tsolia M, Usuf E, van der Flier M, von Both U, Yeung S, Zavadska D, Zenz W, Wright V, Carrol ED, Kaforou M, Martinon-Torres F, Fink C, Levin M, Herberg J; **PERFORM consortium***. *Relationship between molecular pathogen detection and clinical disease in febrile children across Europe: a multicentre, prospective observational study*. Lancet Reg Health Eur. 2023 Jul 26;32:100682. (IF 13,6)

*member of PERFORM consortium

Willems E, Gloorich J, Suppers A, van der Flier M, van den Heuvel LP, van de Kar N, Philipsen RHLA, van Dael M, Kaforou M, Wright VJ, Herberg JA, Torres FM, Levin M, de Groot R, van Gool AJ, Lefeber DJ, Wessels HJCT, de Jonge MI; **PERFORM consortium***. *Impact of infection on proteome-wide glycosylation revealed by distinct signatures for bacterial and viral pathogens*. iScience. 2023 Jul 4;26(8):107257. (IF 4,76)

*member of PERFORM consortium

van der Velden FJS, Lim E, Gills L, Broadey J, Hayes L, Roberts E, Courtney J, Ball J, Herberg J, Galassini R, Emonts M; **DIAMONDS consortium***. *Biobanking and consenting to research: a qualitative thematic analysis of young people's perspectives in the North East of England*. BMC Med Ethics. 2023 Jul 5;24(1):47. (IF 3,0)

*member of DIAMONDS consortium

Tan CD, Vermont CL, Zachariasse JM, von Both U, Eleftheriou I, Emonts M, van der Flier M, Herberg J, Kohlmaier B, Levin M, Lim E, Maconochie IK, Martinon-Torres F, Nijman RG, Pokorn M, Rivero-Calle I, Tsolia M, Zenz W, Zavadska D, Moll HA, Carrol ED; **PERFORM consortium***. *Emergency medical services utilisation among febrile children attending emergency departments across Europe: an observational multicentre study*. Eur J Pediatr. 2023 Sep;182(9):3939-3947. (IF 3,6)

*member of PERFORM consortium

van der Velden FJS, de Vries G, Martin A, Lim E, von Both U, Kolberg L, Carrol ED, Khanijau A, Herberg JA, De T, Galassini R, Kuijpers TW, Martínón-Torres F, Rivero-Calle I, Vermont CL, Hagedoorn NN, Pokorn M, Pollard AJ, Schlapbach LJ, Tsolia M, Eleftheriou I, Yeung S, Zavadska D, Fink C, Voice M, Zenz W, Kohlmaier B, Agyeman PKA, Usuf E, Secka F, de Groot R, Levin M, van der Flier M, Emonts M; **PERFORM consortium***. *Febrile illness in high-risk children: a prospective, international observational study*. Eur J Pediatr. 2023 Feb;182(2):543-554. doi: 10.1007/s00431-022-04642-1. (IF 3,6)

*member of PERFORM consortium

Ho A, Orton R, Tayler R, Asamaphan P, Herder V, Davis C, Tong L, Smollett K, Manali M, Allan J, Rawlik K, McDonald SE, Vink E, Pollock L, Gannon L, Evans C, McMenamin J, Roy K, Marsh K, Divala T, Holden MTG, Lockhart M, Yirrell D, Currie S, O'Leary M, Henderson D, Shepherd SJ, Jackson C, Gunson R, MacLean A, McInnes N, Bradley-Stewart A, Battle R, Hollenbach JA, Henderson P, Odam M, Chikowore P, Oosthuyzen W, Chand M, Hamilton MS, Estrada-Rivadeneira D, Levin M, Avramidis N, Pairo-Castineira E, Vitart V, Wilkie C; **DIAMONDS Consortium***; ISARIC4C Investigators; Palmarini M, Ray S, Robertson DL, da Silva Filipe A, Willett BJ, Breuer J, Semple MG, Turner D, Baillie JK, Thomson EC. *Adeno-*

associated virus 2 infection in children with non-A-E hepatitis. Nature. 2023 May;617(7961):555-563. (IF 64,8)

*member of DIAMONDS consortium

Morfopoulou S, Buddle S, Torres Montaguth OE, Atkinson L, Guerra-Assunção JA, Moradi Marjaneh M, Zenezini Chiozzi R, Storey N, Campos L, Hutchinson JC, Counsell JR, Pollara G, Roy S, Venturini C, Antinao Diaz JF, Siam A, Tappouni LJ, Asgarian Z, Ng J, Hanlon KS, Lennon A, McArdle A, Czap A, Rosenheim J, Andrade C, Anderson G, Lee JCD, Williams R, Williams CA, Tutill H, Bayzid N, Martin Bernal LM, Macpherson H, Montgomery KA, Moore C, Templeton K, Neill C, Holden M, Gunson R, Shepherd SJ, Shah P, Cooray S, Voice M, Steele M, Fink C, Whittaker TE, Santilli G, Gissen P, Kaufer BB, Reich J, Andreani J, Simmonds P, Alrabiah DK, Castellano S, Chikowore P, Odam M, Rampling T, Houlihan C, Hoschler K, Talts T, Celma C, Gonzalez S, Gallagher E, Simmons R, Watson C, Mandal S, Zambon M, Chand M, Hatcher J, De S, Baillie K, Semple MG; **DIAMONDS Consortium***; **PERFORM Consortium***; ISARIC 4C Investigators; Martin J, Ushiro-Lumb I, Noursadeghi M, Deheragoda M, Hadzic N, Grammatikopoulos T, Brown R, Kelgeri C, Thalassinos K, Waddington SN, Jacques TS, Thomson E, Levin M, Brown JR, Breuer J. *Genomic investigations of unexplained acute hepatitis in children.* Nature. 2023 May;617(7961):564-573. (IF 64,8)

*member of PERFORM consortium and DIAMONDS Consortium

Patel H, Sintou A, Chowdhury RA, Rothery S, Iacob AO, Prasad S, Rainer PP, Martín-Torres F, Sancho-Shimizu V, Shimizu C, Dummer K, Tremoulet AH, Burns JC, Sattler S, Levin M; **DIAMONDS consortium***. *Evaluation of Autoantibody Binding to Cardiac Tissue in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children and COVID-19 Vaccination-Induced Myocarditis.* JAMA Netw Open. 2023 May 1;6(5):e2314291. (IF 13,8)

*member of DIAMONDS consortium

Tan CD, van der Walle EEPL, Vermont CL, von Both U, Carrol ED, Eleftheriou I, Emonts M, van der Flier M, de Groot R, Herberg J, Kohlmaier B, Levin M, Lim E, Maconochie IK, Martinon-Torres F, Nijman RG, Pokorn M, Rivero-Calle I, Tsoia M, Yeung S, Zenz W, Zavadska D, Moll HA; **PERFORM consortium*** (Personalised Risk assessment in febrile children to optimize Real-life Management across the European Union). *Guideline adherence in febrile children below 3 months visiting European Emergency Departments: an observational multicenter study.* Eur J Pediatr. 2022 Dec;181(12):4199-4209. (IF 3,6)

*member of PERFORM consortium

7 Danksagung

Mit großer Freude ergreife ich diese Gelegenheit, um den Personen, die bisher auf meinem akademischen Weg eine wichtige Rolle gespielt und mich während der gesamten Zeit unterstützt haben, meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Klein danke ich für die Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit im Dr. von Haunerschen Kinderspital am Klinikum der LMU München.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger, der mir die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelte und mich in das faszinierende Gebiet der Genetik eingeführt hat. Ferner danke ich Herrn Dr. Tobias Haack und Herrn Dr. Holger Prokisch für den wissenschaftlichen Austausch und die Einblicke in die Genetik neurometabolischer Erkrankungen, die mir halfen, mein Wissen zu erweitern und meine Forschung zu vertiefen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Felix Distelmeier und Herrn Prof. Dr. Ertan Mayatepek für ihre Unterstützung bei der Verbindung von Wissenschaft und Klinik am Universitätsklinikum Düsseldorf.

Zudem möchte ich mich bei Frau PD Dr. Annette Jansson für Ihre Unterstützung im Bereich der Kinderreumatologie bedanken. Dank Ihrer Hilfe konnte ich mich erfolgreich in diesen neuen Tätigkeitsbereich einarbeiten und mich fachlich weiterentwickeln.

Herrn Prof. Dr. Ludwig Hinske gilt ebenfalls ein besonderer Dank, der mir durch seine Expertise in der medizinischen Informatik ein völlig neues und spannendes Tätigkeitsfeld eröffnet hat. Seine umfassenden Kenntnisse und begeisternde Art, dieses Fachgebiet zu vermitteln, haben mir nicht nur neue Perspektiven eröffnet, sondern auch meine Leidenschaft für die medizinische Informatik entfacht.

Zusammen mit ihnen möchte ich auch meiner Familie danken, die mich während dieser Zeit stetig unterstützt hat.

Schließlich möchte ich allen meinen Kollegen danken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke allen für Ihre Hilfe, Ihr Vertrauen und Ihre Ermutigung.

8 Publikationen, auf denen die Habilitationsschrift beruht

Danhauser K, Alhaddad B, Makowski C, Piekutowska-Abramczuk D, Syrbe S, Gomez-Ospina N, Manning MA, Kostera-Pruszczyk A, Krahn-Peper C, Berutti R, Kovács-Nagy R, Gusic M, Graf E, Laugwitz L, Röblitz M, Wroblewski A, Hartmann H, Das AM, Bültmann E, Fang F, Xu M, Schatz UA, Karall D, Zellner H, Haberlandt E, Feichtinger RG, Mayr JA, Meitinger T, Prokisch H, Strom TM, Płoski R, Hoffmann GF, Pronicki M, Bonnen PE, Morlot S, Haack TB. *Bi-allelic ADPRHL2 Mutations Cause Neurodegeneration with Developmental Delay, Ataxia and Axonal Neuropathy*. Am J Hum Genet. 2018 Nov 1;103(5):817-825.

Kremer LS*, **Danhauser K***, Herebian D*, Petkovic Ramadža D, Piekutowska-Abramczuk D, Seibt A, Müller-Felber W, Haack TB, Płoski R, Lohmeier K, Schneider D, Klee D, Rokicki D, Mayatepek E, Strom TM, Meitinger T, Klopstock T, Pronicka E, Mayr JA, Baric I, Distelmaier F, Prokisch H. *NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD(P)HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood*. Am J Hum Genet. 2016 Oct 6;99(4):894-902.

* equal contribution

Holzerova E, **Danhauser K**, Haack TB, Kremer LS, Melcher M, Ingold I, Kobayashi S, Terrile C, Wolf P, Schaper J, Mayatepek E, Baertling F, Friedmann Angeli JP, Conrad M, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Distelmaier F. *Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration*. Brain. 2016 Feb;139(Pt 2):346-54. (IF 10,292)

Danhauser K*, Sauer SW*, Haack TB*, Wieland T, Staufner C, Graf E, Zschocke J, Strom TM, Traub T, Okun JG, Meitinger T, Hoffmann GF, Prokisch H, Kölker S. *DHTKD1 Mutations Cause 2-Aminoacidipic and 2-Oxoadipic Aciduria*. Am J Hum Genet. 2012 Dec 7;91(6):1082-7.

* equal contribution

Kornblum C, Nicholls T, Haack TB, Schöler S, Peeva V, **Danhauser K**, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Quinzii CM, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Klopstock T, Strom TM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H. *Loss of MGME1 impairs mtDNA replication, leads to mtDNA depletion and causes multi-systemic mitochondrial disease*. Nat Genet. 2013 Feb;45(2):214-9.

Danhauser K, Haack TB, Alhaddad B, Melcher M, Seibt A, Strom TM, Meitinger T, Klee D, Mayatepek E, Prokisch H, Distelmaier F. *EARS2 mutations cause fatal neonatal lactic acidosis, recurrent hypoglycemia and agenesis of corpus callosum*. Metab Brain Dis. 2016 Jun;31(3):717-21.

Haack TB, Gorza M, **Danhauser K**, Mayr JA, Haberberger B, Wieland T, Kremer L, Strecker V, Graf E, Memari Y, Ahting U, Kopajtich R, Wortmann SB, Rodenburg RJ, Kotzaeridou U, Hoffmann GF, Sperl W, Wittig I, Wilichowski E, Schottmann G, Schuelke M, Plecko B, Stephani U, Strom TM, Meitinger T, Prokisch H, Freisinger P. *Phenotypic spectrum of eleven patients and five novel MTFMT mutations identified by exome sequencing and candidate gene screening*. Mol Genet Metab. 2014 Mar;111(3):342-52.

Danhauser K, Herebian D, Haack TB, Rodenburg RJ, Strom TM, Meitinger T, Mayatepek E, Prokisch H, Distelmaier F. *Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a novel mutation in COQ9*. Eur J Hum Genet. 2016 Mar;24(3):450-4.

Laugwitz L, Seibt A, Herebian D, Peralta S, Kienzle I, Buchert R, Falb R, Gauck D, Müller A, Grimmel M, Beck-Woedel S, Kern J, Daliri K, Katibeh P, **Danhauser K**, Leiz S, Alesi V, Baertling F, Vasco G, Steinfeld R, Wagner M, Caglayan AO, Gumus H, Burmeister M, Mayatepek E, Martinelli D, Tamhankar PM, Tamhankar V, Joset P, Steindl K, Rauch A, Bonnen PE, Froukh T, Groeschel S, Krägeloh-Mann I, Haack TB, Distelmaier F. *Human COQ4 deficiency: delineating the clinical, metabolic and neuroimaging phenotypes*. J Med Genet. 2022 Sep;59(9):878-887.